



# Caracterització de paràlegs de la proteïna associada al nucleòide Hha: les proteïnes YdgT, HoIE i YmgB

Laura Pedró Pujibet

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Facultat de Biologia  
Departament de Microbiologia

**Caracterització de paràlegs de  
la proteïna associada al nucleoide Hha:  
les proteïnes YdgT, HoloE i YmgB**

Programa de Doctorat: Microbiologia Ambiental i Biotecnologia  
(2009-2012)

Memòria presentada per Laura  
Pedró Pujibet per optar al grau de  
Doctora per la Universitat de  
Barcelona

Conformitat dels directors de la  
tesi

Laura Pedró Pujibet

Dr. Antonio Juárez Giménez

Dra. Rosa C. Baños Molina

**Barcelona, 2012**





UNIVERSITAT DE BARCELONA



Institut de bioenginyeria  
de Catalunya

**Facultat de Biologia**

**Departament de Microbiologia**

**Caracterització de paràlegs  
de la proteïna associada al nucleòide Hha:  
les proteïnes YdgT, HoloE i YmgB**

Laura Pedró Pujibet

Tesi Doctoral

Barcelona, 2012



## Agraïments

Després de tant de temps dedicat, primer al laboratori i després, a la redacció d'aquesta tesi, finalment ha arribat el moment d'escriure els agraïments. Es tracta d'una part especial, tant pel que significa (estar gairebé al final d'un llarg recorregut), com per la importància que, si més no per mi, té. És el moment d'agrair el suport, l'ajuda i la comprensió a totes aquelles persones que han estat al meu costat i que, d'una manera o altra, han fet possible la realització d'aquest treball.

En primer lloc, m'agradaria donar les gràcies al Dr. Antonio Juárez per haver-me donat l'oportunitat de dur a terme aquesta tesi doctoral en el seu grup de recerca. Aquesta experiència no l'hagués viscuda si no fos per ell.

En segon lloc, voldria agrair-li a la Rosa haver estat una codirectora amiga, comprensiva, intel·ligent i sempre riallera. Gràcies per la teva paciència, pels teus ànims i confiança!

A continuació, voldria esmentar totes aquelles persones que han treballat al grup de recerca amb mi i que segur, en algun moment, m'han ajudat tant a nivell científic com personal: la Sònia Aznar (una gran persona dins i fora del lab), la Mar (sempre estupenda i optimista), l'Aitziber (la meva homòloga, o paràloga ;-)), la Paytu (algú de qui aprendre sense complexos), el Juanda (el xiulador i cantaire del grup), el Jorge (el meu gran company de congrés), la Manu (*thanks for your charm*), el Mário (la nota brasilera del lab), la Carla (l'alegria veneçolana), el Llorenç (més que alegria, ironia), la Marta (treballadora incansable), la Mari de l'IBEC (que m'ha ajudat sempre que ho he necessitat al laboratori), la Francesca (la successora) i les que han marxat abans (la Nahia, l'Íngrid i la Núria). També, a la Cristina, al Carlos i a l'Eduard, els sèniors del grup, als quals agraeixo el seu suport, la seva ajuda i consells.

Per altra banda, m'agradaria agrair el seu suport a les meves amigues Núria, Alba i Júlia perquè tant en els moments bons com dolents puc comptar amb elles. També a l'Anna i a la Cris per saber-me escoltar i donar-me ànims i consells.

Per últim, els vull donar les gràcies a la meva família: als meus pares, germà i àvia que han procurat estar al meu costat i ajudar-me com han pogut, i al Carles, amb qui he pogut comptar en tot moment. Gràcies per la teva comprensió, pels teus ànims i per creure sempre en mi!



**al Carles**





## Índex

<b>1. Introducció</b> .....	1
<b>1.1. Regulació global i proteïnes associades al nucleoide</b> .....	3
<b>1.2. La família de proteïnes H-NS</b> .....	10
1.2.1. La proteïna H-NS .....	10
1.2.1.1. Característiques generals de la proteïna H-NS.....	10
1.2.1.2. Unió a l'ADN i control de la transcripció .....	12
1.2.1.3. Regulació de gens adquirits horitzontalment.....	16
1.2.2. La proteïna StpA, paràleg d'H-NS .....	19
1.2.3. Coexistència de diferents paràlegs d'H-NS en una mateixa cèl·lula.....	21
<b>1.3. La família de proteïnes Hha-YmoA</b> .....	24
1.3.1. La proteïna Hha .....	24
1.3.1.1. Estructura d'Hha i unió a H-NS .....	25
1.3.1.2. Hha com a modulador de l'expressió gènica.....	27
1.3.2. La proteïna YdgT, paràleg d'Hha.....	28
<b>1.4. Possibles nous membres de la família de proteïnes Hha-YmoA</b> .....	30
1.4.1. ADN polimerasa III: la subunitat $\theta$ .....	30
1.4.1.1. Característiques generals de la subunitat $\theta$ de l'ADN polimerasa III i del replisoma d' <i>E. coli</i> .....	30
1.4.1.2. Estructura de la subunitat $\theta$ de l'ADN polimerasa III .....	32
1.4.1.3. Funció de la subunitat $\theta$ de l'ADN polimerasa III .....	33
1.4.1.4. Hot, el paràleg fàgic de $\theta$ .....	35
1.4.2. La proteïna YmgB .....	36
1.4.2.1. Característiques generals de la proteïna YmgB.....	36
1.4.2.2. Estructura de la proteïna YmgB .....	37

1.4.2.3. Funcions de la proteïna YmgB .....	39
<b>1.5. Objectius</b> .....	42
<b>2. Materials i mètodes</b> .....	43
<b>2.1. Soques bacterianes, bacteriòfags i plasmidis</b> .....	45
<b>2.2. Medis de cultiu i antibiòtics</b> .....	48
2.2.1. Medis de cultiu .....	48
2.2.2. Antibiòtics .....	50
<b>2.3. Mètodes microbiològics</b> .....	51
2.3.1. Esterilització .....	51
2.3.2. Manteniment de microorganismes.....	51
2.3.3. Inoculació i cultiu de microorganismes.....	51
<b>2.4. Mètodes de transferència genètica</b> .....	52
2.4.1. Transformació bacteriana .....	52
2.4.2. Conjugació bacteriana .....	53
2.4.3. Transducció generalitzada amb el bacteriòfag P1 vir.....	53
<b>2.5. Tècniques de mutagènesi bacteriana</b> .....	55
2.5.1. Inactivació de gens cromosòmics utilitzant fragments de PCR .....	55
<b>2.6. Tècniques experimentals amb ADN</b> .....	58
2.6.1. Aïllament d'ADN plasmídic.....	58
2.6.2. Ús d'enzims de restricció, lligació i modificació .....	58
2.6.3. Amplificació de fragments d'ADN mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) .....	58
2.6.4. Seqüenciació.....	60
2.6.5. Electroforesi d'ADN.....	61
2.6.6. Aïllament de bandes d'ADN a partir de gels d'agarosa .....	62
<b>2.7. Tècniques experimentals amb ARN</b> .....	63

---

2.7.1. Extracció d'ARN cel·lular total amb kits .....	63
2.7.2. Quantificació espectrofotomètrica de l'ARN .....	63
2.7.3. Electroforesi d'ARN en gels d'agarosa i tinció amb bromur d'etidi.....	63
2.7.4. Anàlisi semi-quantitativa de l'ARNm per RT-PCR.....	63
2.7.5. Assaig de PCR a temps real.....	65
2.7.6. Anàlisi de l'expressió gènica mitjançant microxips .....	69
<b>2.8. Tècniques experimentals amb proteïnes .....</b>	<b>70</b>
2.8.1. Obtenció d'extractes proteics .....	70
2.8.2. Valoració de la concentració de proteïnes pel mètode de Bradford .....	72
2.8.3. Purificació de proteïnes .....	73
2.8.4. Tècniques d'electroforesi de proteïnes .....	74
2.8.5. Tècniques d'immunodetecció de proteïnes (western blotting).....	76
<b>2.9. Valoració d'activitats enzimàtiques .....</b>	<b>78</b>
2.9.1. Determinació de l'activitat $\beta$ -galactosidasa.....	78
<b>2.10. Determinació de la freqüència d'aparició de mutants resistents a la rifampicina .....</b>	<b>79</b>
<b>2.11. Assaig de motilitat.....</b>	<b>80</b>
<b>2.12. Assaig de resistència a l'àcid.....</b>	<b>80</b>
<b>2.13. Assaig de formació de biofilm .....</b>	<b>81</b>
<b>3. Resultats .....</b>	<b>83</b>
<b>3.1. Anàlisi transcriptòmica de mutants <i>hha</i> i <i>ydgT</i>.....</b>	<b>85</b>
3.1.1. Construcció de mutants <i>hha</i> i <i>ydgT</i> a la soca d' <i>E. coli</i> MG1655 .....	85
3.1.2. Fenotip hemolític dels mutants <i>hha</i> , <i>ydgT</i> i del doble mutant <i>hha ydgT</i> .....	85
3.1.3. Anàlisi transcriptòmica de mutants <i>hha</i> , <i>ydgT</i> i del doble mutant <i>hha ydgT</i> .....	86
3.1.3.1. Anàlisi global dels gens alterats: "heatmaps" i diagrames de Venn.....	87

3.1.3.2. Anàlisi de l'expressió gènica diferencial entre mutants <i>hha</i> , <i>ydgT</i> i el doble mutant <i>hha ydgT</i> .....	89
<b>3.2. Anàlisi de l'origen de clons no hemolítics que apareixen en mutants <i>hha ydgT</i> portadors del plasmidi pANN202-312R</b> .....	95
3.2.1. Els mutants d' <i>E. coli</i> que sobreexpressen l' $\alpha$ -hemolisina segreguen colònies no hemolítiques en presència de l'antibiòtic kanamicina.....	95
3.2.2. Els derivats Hly <sup>-</sup> del plasmidi pANN202-312R aïllats de la soca MG1655HY mostren dos patrons de restricció diferents .....	97
3.2.3. La presència de kanamicina provoca l'aparició de clons Hly <sup>-</sup> i no selecciona mutants preexistents .....	100
3.2.4. Paper de RecA, RpoS i la resposta SOS en el procés d'aparició de clons Hly <sup>-</sup> a la soca MG1655HY (pANN202-312R) .....	102
3.2.4.1. Efecte de la mutació <i>recA</i> en la producció de clons Hly <sup>-</sup> a la soca MG1655HY (pANN202-312R).....	102
3.2.4.2. Efecte de la mutació <i>rpoS</i> en la producció de clons Hly <sup>-</sup> a la soca MG1655HY (pANN202-312R).....	104
3.2.4.3. Efecte de la inducció de la resposta SOS en la producció de clons Hly <sup>-</sup> a la soca MG1655HY (pANN202-312R).....	105
3.2.5. La combinació de la sobreexpressió d' $\alpha$ -hemolisina i l'elevada concentració de kanamicina provoca l'aparició de clons Hly <sup>-</sup> a la soca MG1655HY (pANN202-312R).....	106
3.2.6. Efecte de concentracions subinhibitòries de kanamicina sobre la taxa de creixement i la producció d' $\alpha$ -hemolisina a la soca salvatge MG1655 (pHly152) .....	109
3.2.7. Efecte d'altres antibiòtics en la taxa de creixement i pèrdua del determinant hemolític .....	112
<b>3.3. Similituds estructurals i funcionals entre les proteïnes Hha/YdgT i la subunitat <math>\theta</math> de l'ADN polimerasa III</b> .....	114
3.3.1. Estructura de la subunitat $\theta$ de l'ADN polimerasa III .....	115
3.3.2. Interacció de la proteïna HoiE amb altres proteïnes.....	117

3.3.2.1. Construcció de la proteïna recombinant His-HolE.....	118
3.3.2.2. Sobreexpressió i purificació d'His-HolE.....	119
3.3.2.3. Construcció de la proteïna recombinant HolECHis .....	121
3.3.2.4. Sobreexpressió i purificació de HolECHis.....	122
3.3.3. Anàlisi fenotípica de mutants <i>holE</i> .....	123
3.3.3.1. Construcció de mutants <i>holE</i> a la soca d' <i>E. coli</i> MG1655.....	123
3.3.3.2. Efecte de les mutacions <i>holE</i> , <i>holE hha</i> , <i>ydgT holE</i> i <i>hha ydgT holE</i> sobre el creixement d' <i>E. coli</i> en diferents condicions de cultiu.....	126
3.3.4. Estudi de l'efecte de les mutacions <i>holE</i> i <i>ydgT</i> en un mutant en la subunitat $\epsilon$ de l'ADN polimerasa III.....	129
3.3.5. Estudi per PCR a temps real de l'expressió de <i>holE</i> en diferents condicions de creixement .....	131
3.3.6. Anàlisi transcriptòmica d'un mutant <i>holE</i> i comparació amb el patró d'expressió gènica d'un mutant <i>ydgT</i> .....	133
3.3.6.1. Anàlisi global dels gens alterats: "heatmaps" i diagrames de Venn.....	133
3.3.6.2. Anàlisi de l'expressió dels gens flagel·lars .....	135
3.3.7. La sobreexpressió del gen <i>holE</i> restaura la motilitat de dobles mutants <i>hha ydgT</i> .....	139
3.3.7.1. Efecte de les mutacions <i>holE</i> , <i>ydgT</i> i <i>hha</i> en la motilitat .....	139
3.3.7.2. Complementació amb pBRHOLE de la pèrdua de motilitat en placa dels mutants <i>hha ydgT</i> .....	140
3.3.7.3. Efecte de la sobreexpressió de <i>holE</i> sobre l'expressió del gen <i>flgB</i> : anàlisi per RT-PCR .....	142
3.3.8. Mecanisme d'acció de les proteïnes YdgT i HolE: influenciant la terminació de la transcripció?.....	143
<b>3.4. Relació estructural i funcional entre les proteïnes Hha/YdgT i la proteïna YmgB.....</b>	<b>148</b>

3.4.1. Estudi per PCR a temps real de l'expressió d' <i>ymgB</i> en diferents condicions de creixement .....	148
3.4.2. Construcció de mutants <i>ymgB</i> i confirmació del fenotip.....	149
3.4.2.1. Construcció de mutants <i>ymgB</i> a la soca d' <i>E. coli</i> MG1655 .....	150
3.4.2.2. Confirmació del fenotip de mutants <i>ymgB</i> de la soca d' <i>E. coli</i> MG1655: resistència a l'àcid i formació de biofilm .....	151
3.4.3. Efecte de les mutacions <i>ymgB</i> , <i>ymgB hha</i> , <i>ydgT ymgB</i> i <i>ydgT ymgB hha</i> sobre el creixement d' <i>E. coli</i> MG1655 .....	152
3.4.4. Interacció de la proteïna YmgB amb altres proteïnes .....	154
3.4.4.1. Construcció de la proteïna recombinant His-YmgB.....	154
3.4.4.2. Sobreexpressió i purificació d'His-YmgB .....	156
3.4.5. Sobreexpressió de la proteïna YmgB: nous gens regulats.....	158
3.4.5.1. Efecte de la sobreexpressió d' <i>ymgB</i> sobre el creixement.....	159
3.4.5.2. Efecte de la sobreexpressió d' <i>ymgB</i> sobre el patró proteic .....	160
3.4.5.3. Efecte de la sobreexpressió d' <i>ymgB</i> sobre l'expressió d' <i>rplB</i> : estudi per PCR a temps real.....	163
3.4.6. Sobreexpressió de la proteïna YmgB: efecte sobre H-NS i Hha i gens regulats per aquestes proteïnes .....	164
3.4.6.1. Efecte de la sobreexpressió de la proteïna YmgB sobre l'expressió de les proteïnes H-NS i Hha .....	165
3.4.6.2. Efecte de la sobreexpressió d' <i>ymgB</i> sobre l'expressió de gens regulats per H-NS: <i>bgl</i> , <i>proU</i> i <i>hly</i> .....	166
3.4.7. Interacció entre les proteïnes YmgB i Hha/YdgT .....	176
<b>4. Discussió .....</b>	<b>177</b>
<b>4.1. Els paràlegs de les proteïnes associades al nucleoide H-NS i Hha tenen funcions reguladores diferents a H-NS i Hha .....</b>	<b>179</b>

---

<b>4.2. Actuant sobre la terminació prematura de la transcripció: mecanisme d'acció de la proteïna YdgT i evidències de la funció “moonlighting” de la subunitat <math>\theta</math> de la ADN polimerasa III.....</b>	<b>181</b>
<b>4.3. La proteïna YmgB està relacionada amb proteïnes de la família Hha .....</b>	<b>184</b>
<b>4.4. Un fenotip inesperat de mutants <i>hha ydgT</i> evidencia la inestabilitat de determinants de virulència flanquejats per seqüències IS91 quan <i>E. coli</i> creix en presència de concentracions subinhibitòries d'antibiòtics .....</b>	<b>186</b>
<b>5. Conclusions .....</b>	<b>191</b>
<b>6. Bibliografia.....</b>	<b>195</b>
<b>7. Publicacions .....</b>	<b>225</b>
<b>8. Annex (resultats microarrays) .....</b>	<b>CD-ROM</b>





## 1. Introducció

Les proteïnes bacterianes associades al nucleoide (NAPs) juguen un paper clau en l'organització, la replicació, la segregació, la reparació i l'expressió del cromosoma (revisat a Browning *et al.*, 2010). L'estudi de nous membres de les famílies de proteïnes associades al nucleoide, així com de proteïnes paràlogues a les ja conegudes, és important per entendre millor el seu paper biològic. En aquest treball, ens vam proposar estudiar a *Escherichia coli* la relació entre la proteïna associada al nucleoide Hha, caracteritzada al grup de recerca, i altres proteïnes que es pensava que podien ser paràlogues de la proteïna Hha: YdgT, la subunitat  $\theta$  de l'ADN polimerasa III, i YmgB.

En el primer capítol d'aquesta introducció és dona una visió general de les proteïnes associades al nucleoide i la seva implicació tant en la compactació del material genètic

bacterià com en la regulació de l'expressió gènica. En els dos capítols posteriors, es detallen les característiques de les famílies de proteïnes associades al nucleòide H-NS i Hha (dins la qual s'inclou la proteïna YdgT), degut a la rellevància que tenen en aquest treball. Finalment, els dos darrers capítols estan dedicats a les altres dues proteïnes objecte d'estudi: la subunitat  $\theta$  de l'ADN polimerasa III i la proteïna YmgB.

## 1.1. Regulació global i proteïnes associades al nucleoide

Una de les principals característiques de la cèl·lula bacteriana és la seva capacitat per adaptar-se ràpidament als freqüents canvis ambientals de l'entorn en el que es desenvolupa. Els bacteris estan constantment analitzant les condicions físico-químiques extracel·lulars i l'estat metabòlic intern, de tal manera que poden respondre als estímuls modificant el seu patró d'expressió gènica. El punt on existeix una major regulació de l'expressió gènica és a l'inici de la transcripció, tot i que els nivells d'ARN missatger (ARNm) estan també regulats durant l'elongació i la terminació. A *Escherichia coli* gairebé un 8% dels gens estan involucrats en la transcripció i la regulació de la mateixa. En fase de creixement, *E. coli* conté unes 2000 molècules del nucli de l'enzim ARN polimerasa, encarregat de dur a terme la transcripció, (Ishihama, 2000). Aquest nombre és inferior als 4450 gens del genoma d'*E. coli* K12. Per tant, existeix una competència pel que fa a la unió a l'ARN polimerasa, de tal manera que el patró de transcripció d'un genoma depèn del control en la distribució d'aquest enzim. Aquest control es du a terme a través de l'acció de factors  $\sigma$ , de factors de transcripció i del grau de superenrotllament de l'ADN, el qual depèn, entre altres, de la composició de proteïnes associades al nucleoide unides a l'ADN (Ishihama, 2010).

L'organització del material genètic d'un organisme ha de ser compatible amb els processos de replicació de l'ADN, segregació del cromosoma i expressió gènica. En els organismes eucariotes, les proteïnes capaces de plegar l'ADN i mantenir-lo compactat són conegudes com a histones, i tant la seva funció estructural sobre la cromatina com la seva influència en la transcripció de l'ADN estan molt estudiades (Avvakumov *et al.*, 2011). Pel que fa al regne Bacteria, en un inici es van considerar un grup de proteïnes com a histones però més endavant, degut a diferències en la seva naturalesa respecte a les histones eucariotes, van passar a anomenar-se proteïnes associades al nucleoide (NAPs) o tipus histona (*histone-like*). Aquesta denominació reflecteix la seva localització sense implicar necessàriament una similitud estructural i funcional amb les histones eucariotes. Els membres del grup de proteïnes associades al nucleoide són nombrosos, diversos i no sempre es classifiquen de la mateixa manera. En els bacteris Gram-negatius, com *Escherichia coli*, s'han identificat com a mínim 12 tipus diferents de proteïnes associades al nucleoide, cadascuna de les quals es caracteritza per unes

preferències d'unió a l'ADN determinades, pel tipus d'interacció amb l'ADN i pel seu patró d'expressió (Taula 1.1).

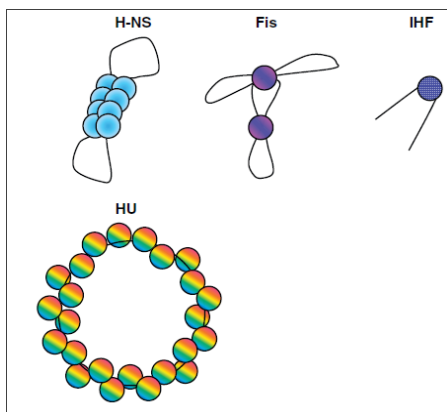
Proteïna	Envolta l'ADN	Forma ponts amb l'ADN	Corba l'ADN	Regió d'unió	Massa molecular	Dimerització/multimerització
HU	Si	ND	Si	preferència per ADN ric en AT o corbat	~9 kDa	Heterodímer (per ex., HU $\alpha$ -HU $\beta$ )
Lrp	Si	Si	ND	(T/C)AG(A/T/C)A(A/T)ATT(A/T)T(A/T/G)CT(A/G)	~18 kDa	Homodímer
MukB	ND	Si	ND	ND	~175 kDa	Homodímer
Fis	Si	Si	Si	Extensions de 17 pb riques en AT	~11 kDa	Homodímer
H-NS	ND	Si	ND	ADN ric en AT i TCGATAAAATT	~15 kDa	Homodímer o heterodímer (H-NS-StpA)
IHF	ND	ND	Si	(A/T)ATCAANNNTT(A/G)	~11 kDa	Heterodímer (IHF $\alpha$ -IHF $\beta$ )
Dps	ND	ND	ND	ND	~19 kDa	Monòmer o dodecàmer
StpA	ND	Si	ND	ADN ric en AT	~15 kDa	Homodímer o heterodímer (H-NS-StpA)
CbpA	ND	ND	ND	ADN corbat	~33 kDa	Homodímer o heterodímer (CbpA-CbpM)
CbpB	ND	ND	ND	ADN corbat	~33 kDa	Monòmer
EbfC	ND	Suggestit	ND	GTNAC	~11 kDa	Homodímer
MvaT	ND	Si	ND	ADN ric en AT	~11 kDa	Homodímer

\*ND, no determinat.

**Taula. 1.1.** Membres del grup de proteïnes associades al nucleoide de bacteris Gram-negatius. Adaptat de Dillon i Dorman, 2010.

La majoria de NAPs tenen la capacitat d'unir-se a l'ADN, ja sigui envoltant-lo, corbant-lo o formant ponts, fent variar d'aquesta manera l'estructura de la molècula d'ADN. De fet, és àmpliament conegut que les proteïnes associades al nucleoide poden alterar els nivells de superenrotllament de l'ADN cromosòmic (Travers i Muskhelishvili, 2005). Aquest fet és important ja que en molts casos l'activitat dels promotors depèn del nivell de superenrotllament, el qual facilita el contacte de factors de transcripció amb l'ARN polimerasa. La importància de les proteïnes associades al nucleoide pel que fa a la

regulació de l'expressió gènica està recolzada per estudis d'immunoprecipitació de cromatina “ChIP-chip” en els quals es mostra com les proteïnes H-NS, IHF i Fis d'*E. coli* s'uneixen majoritàriament a regions reguladores intergèniques (Grainger *et al.*, 2006). Per tant, es pot afirmar que les proteïnes associades al nucleoide contribueixen tant a l'estructura del nucleoide bacterià com a la regulació de l'expressió gènica i són capaces de dur a terme aquests dos rols de manera simultània. D'entre elles, les més ben caracteritzades són la proteïna Fis (“Factor for Inversion Stimulation”), H-NS (“Histone-like Nucleoid Structuring”), HU (“Heat Unstable”) i IHF (“Integration Host Factor”). Cadascuna d'aquestes proteïnes és capaç de proporcionar una determinada estructura a l'ADN al qual s'uneixen. A la Fig. 1.1 es mostren les propietats de plegament de l'ADN de les principals NAPs.



**Fig. 1.1.** Propietats de plegament de l'ADN de les proteïnes associades al nucleoide (NAPs). Adaptat de Browning *et al.*, 2010.

A continuació s'exposen les característiques més rellevants de les principals proteïnes associades al nucleoide:

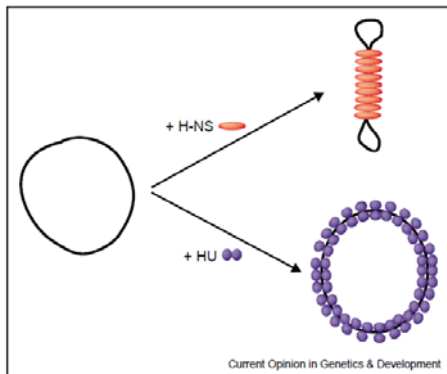
La proteïna **Fis** (“Factor for Inversion Stimulation”) és una proteïna associada al nucleoide l'abundància de la qual depèn de la fase de creixement. S'uneix com a homodímer a una seqüència consens d'ADN, generalment de 17 pb de longitud i rica en AT, excepte en les posicions 2 i 16 en les quals trobem residus G o C (Cho *et al.*, 2008). Un cop unida a l'ADN, Fis provoca una curvatura d'entre 40 i 90° estabilitzant així el bucle d'ADN format. D'aquesta manera, Fis promou la compactació de l'ADN i regula la transcripció. Com a regulador transcripcional, Fis pot actuar com un repressor o com un activador depenent de la posició del seu lloc d'unió en relació a l'ARN polimerasa. Anàlisis d'expressió gènica amb microarrays d'*E. coli* indiquen que un 21% dels gens d'aquest bacteri estan modulats, directa o indirectament, per Fis (Cho *et al.*, 2008). Alguns dels gens regulats per Fis estan involucrats en la traducció (ARN ribosòmic i ARN de transferència), virulència, formació de biofilm, metabolisme energètic, resposta

a l'estrès, metabolisme intermediari, biosíntesi d'aminoàcids, transport, estructura cel·lular, metabolisme de compostos de carboni, metabolisme d'aminoàcids, motilitat i quimiotaxi (Ishihama, 20010).

La proteïna associada al nucleoide **H-NS** (“Histone-like Nucleoid Structuring”) és una proteïna termo-estable i de baix pes molecular (15,4 kDa i 136 aminoàcids) però abundant, ja que se'n troben aproximadament 20.000 còpies per cèl·lula (Spassky *et al.*, 1984; Higgins *et al.*, 1990; Ussery *et al.*, 1994; Sonden i Uhlin, 1996). Les regions d'ADN a les quals s'uneix H-NS són seqüències d'ADN de doble cadena, corbades i riques en AT (Bracco *et al.*, 1989; Yamada *et al.*, 1990; Owen-Hughes *et al.*, 1992). També s'ha suggerit una possible seqüència consens (Taula 1.1). H-NS intervé en el control de la transcripció d'un elevat nombre de gens en bacteris Gram-negatius. A *E. coli*, H-NS actua com a regulador negatiu de l'expressió gènica controlant fins a un 5 % dels gens (Hommais *et al.*, 2001; Schroder i Wagner, 2002). En ocasions, l'activitat d'H-NS és modulada a través de la seva interacció amb altres NAPs, per exemple els membres de la família Hha-YmoA (veure apartat 1.3.1.2). Degut a la importància del paper de les famílies de proteïnes H-NS i Hha en aquest treball, a l'apartat 1.2 i 1.3 d'aquesta introducció s'exposen de manera més extensa les propietats i característiques de les mateixes.

La proteïna **HU** (“Heat Unstable”) és una de les poques NAPs bacterianes que és veritablement una proteïna tipus histona tenint en compte la seva seqüència d'aminoàcids. De fet, la histona eucariota HMGB pot complementar els efectes d'HU pel que fa al superenrotllament de l'ADN en una cèl·lula bacteriana d'*E. coli* mutant en aquesta NAP (Becker *et al.*, 2008). Es tracta d'una proteïna formada per dues subunitats, HU $\alpha$  i HU $\beta$ , les quals tenen un 70% d'identitat en la seva seqüència d'aminoàcids. A *E. coli*, HU existeix tant en forma d'homodímer com d'heterodímer de les seves subunitats, en funció de la fase de creixement. La interacció d'HU amb l'ADN no és específica tot i que sembla tenir preferència per regions de l'ADN deformat o torçat, com els encreuaments de diverses cadenes d'ADN. A baixes concentracions, HU augmenta la flexibilitat de l'ADN. Però, a altes concentracions d'HU, aquesta reforça l'estructura de l'ADN proporcionant rigidesa. És interessant remarcar que s'ha proposat que els efectes estructurals sobre l'ADN d'HU i H-NS són oposats dintre del nucleoide. Mentre que H-NS té l'habilitat de compactar l'ADN, HU no compacta sinó que obliga a

formar superenrotllaments provocant la formació de molècules d'ADN circulars (Dorman i Deighan, 2003) (Fig. 1.2).



**Fig. 1.2.** Propietats de plegament de l'ADN oposades de les proteïnes associades al nucleoide H-NS i HU. Adaptat de Dorman i Deighan, 2003.

Aquests efectes oposats d'H-NS i HU sobre l'estructura de l'ADN es reflecteixen també en els efectes sobre la regulació gènica: HU és capaç d'alleujar l'activitat repressora d'H-NS i en mutants HU la repressió de la transcripció exercida per H-NS es veu incrementada (Dame i Goosen, 2002).

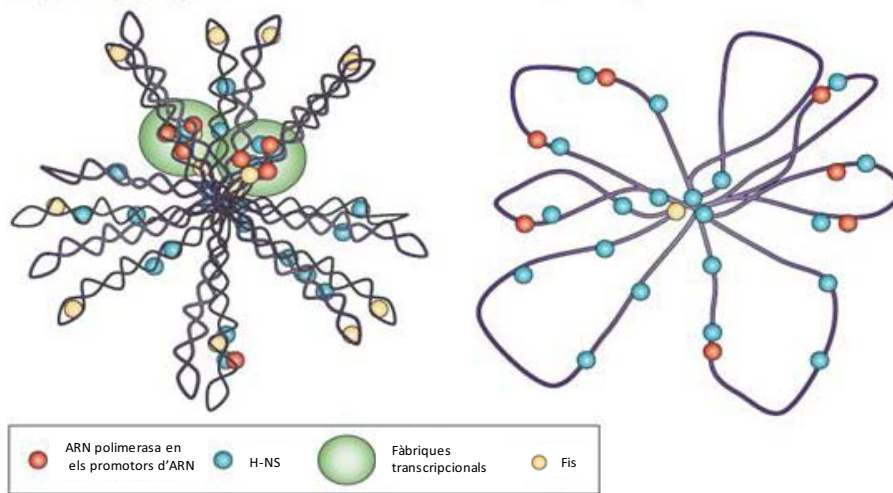
**IHF** (“Integration Host Factor”) fou descrita per primera vegada com a cofactor en el procés de recombinació del bacteriòfag  $\lambda$  (Craig i Nash, 1984). Es tracta d'una NAP que pot desenvolupar diversos rols i unir-se a diferents regions d'ADN. Generalment, IHF corba l'ADN diana formant una U, facilitant d'aquesta manera el contacte d'altres NAPs i factors de transcripció amb l'ARN polimerasa (Fig. 1.1). A més de regular la transcripció, IHF té un paper en l'estructura del nucleoide, en la replicació del cromosoma (Leonard i Grimwade, 2005) i en processos de transposició (Haniford, 2006).

L'activitat transcripcional d'una cèl·lula bacteriana varia en funció del seu estat fisiològic, la qual cosa està directament relacionada amb el grau de superenrotllament de l'ADN, i per tant amb les NAPs. Les cèl·lules en fase exponencial tenen més dominis de superenrotllament i una major activitat transcripcional. En canvi, quan el creixement disminueix (fase estacionària o d'inanició), l'estructura del nucleoide es relaxa i hi ha una reducció en l'activitat transcripcional (Fig. 1.3).



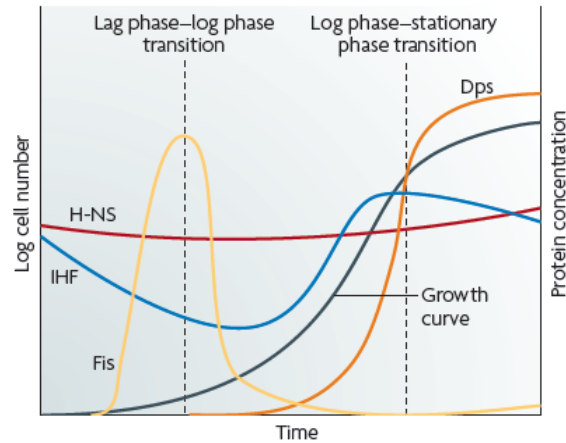
A. Fase exponencial de creixement

B. Fase estacionària de creixement



**Fig. 1.3.** Les proteïnes associades al nucleoide tenen influència en el superenrotllament de l'ADN de manera diferencial en funció de la fase de creixement. En A (fase exponencial) els dominis del cromosoma es troben superenrotllats negativament i H-NS i Fis es troben en abundància associats amb els set operons d'ARN ribosomal. En aquest esquema es mostren dos casos en què aquests components es troben formant "fàbriques transcripcionals" o zones del nucleoide on els promotors són altament transcrits. En B (fase estacionària) els dominis d'ADN estan relaxats i poc superenrotllats. Adaptat de Dillon i Dorman, 2010.

L'expressió de les diverses NAPs descrites varia durant el desenvolupament d'un cultiu bacterià (Fig. 1.4) (Ali Azam *et al.*, 1999). És a dir, no totes les NAPs estan sempre presents. Per exemple, Fis assoleix uns nivells molt elevats en fase exponencial però gairebé no es detecta en fase estacionària. En canvi, IHF és més abundant a mesura que el cultiu entra en fase estacionària. H-NS es manté més o menys estable al llarg de la corba de creixement. Aquesta situació dinàmica dins del nucleoide bacterià té implicacions importants pel que fa al rol d'aquestes proteïnes com a moduladores de l'expressió gènica.



**Fig. 1.4.** Patró d'expressió de les proteïnes associades al nucleòide (NAPs) al llarg de la corba de creixement. Extret de Dillon i Dorman, 2010.

Com ja s'ha esmentat, el conjunt de famílies de proteïnes associades al nucleòide està en constant evolució degut a l'aparició de nous membres els quals s'expressen només en determinades situacions. Un exemple és la proteïna Dps (“DNA Protection during Starvation”), la qual s'expressa durant la fase estacionària (Fig. 1.4) i té un paper protector de l'ADN. No obstant això, els canvis en els nivells relatius de NAPs al llarg de la corba de creixement no només són deguts a canvis en l'estat fisiològic, sinó que també hi estan implicats altres mecanismes que tenen lloc simultàniament a la cèl·lula, com el pas de les forquilles de replicació durant el cicle cel·lular. Per exemple, recentment s'han considerat com a NAPs un grup de proteïnes relacionades amb la replicació del cromosoma: DnaA, SeqA i IciA, les quals tenen preferència per unir-se a regions de l'ADN riques en AT (Azam i Ishihama, 1999). SeqA s'uneix a seqüències d'ADN que són metilades o hemi-metilades en funció del moment del cicle de replicació de l'ADN, contribuint negativament al control de la iniciació de la replicació del cromosoma (Prieto *et al.*, 2007). IciA i DnaA actuen de manera antagònica sobre l'*OriC*, on l'acció d'IciA està encaminada a inhibir el procés d'iniciació (Hwang i Kornberg, 1992).

La característica més important comuna per totes les NAPs és la seva capacitat per unir-se a seqüències d'ADN poc específiques. Això, les converteix en excel·lents reguladors transcripcionals globals ja que són capaces de modular l'expressió d'un ampli rang de gens.

## 1.2. La família de proteïnes H-NS

La família de proteïnes H-NS està formada per un grup de proteïnes que comparteixen una mateixa estructura i que, addicionalment a la seva capacitat d'unir-se a seqüències d'ADN i modificar la seva estructura, regulen l'expressió gènica en bacteris. Molts dels gens regulats per aquest grup de proteïnes han estat adquirits per transferència horitzontal i, en alguns casos, estan relacionats amb la virulència. Algunes de les soques patògenes en les que H-NS està implicada en la regulació de la virulència són: *E. coli* uropatogèniques (Goransson *et al.*, 1990; White-Ziegler *et al.*, 1998; Madrid *et al.*, 2002b), *E. coli* enterotoxigèniques (Trachman i Maas, 1998), *Shigella flexneri* (Maurelli i Sansonetti, 1988; Dorman *et al.*, 1990; Hromockyj *et al.*, 1992; Tobe *et al.*, 1993; Dorman i Porter, 1998), *Salmonella typhimurium* (Harrison *et al.*, 1994), *Vibrio cholerae* ((Nye i Taylor, 2003)) i *Yersinia enterocolitica* (Nieto *et al.*, 2002). A més, s'han trobat proteïnes amb una seqüència aminoacídica similar a la d'H-NS a microorganismes patògens com *Mycobacterium tuberculosis* (Gordon *et al.*, 2008) i *Pseudomonas aeruginosa* (Castang *et al.*, 2008).

Els membres d'aquesta família més estudiats són les proteïnes H-NS d'*E. coli* i *S. enterica* serovar typhimurium i el seu paràleg StpA.

### 1.2.1. La proteïna H-NS

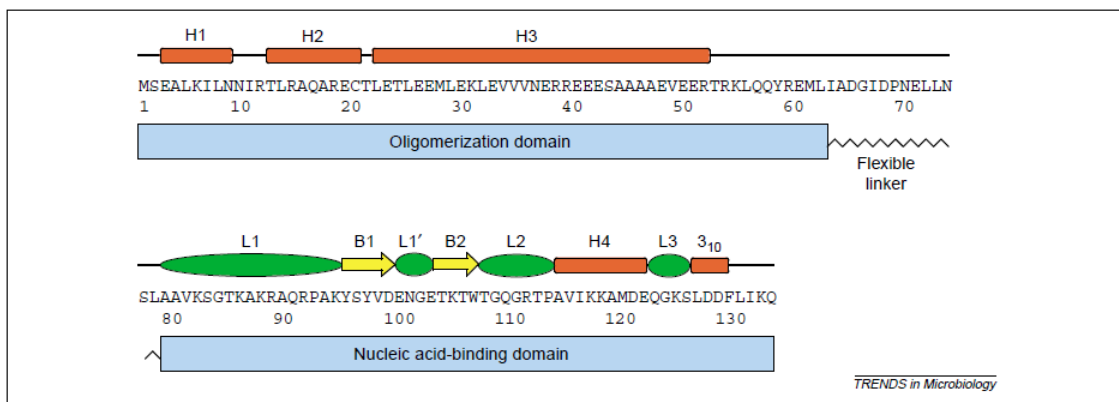
#### 1.2.1.1. Característiques generals de la proteïna H-NS

La proteïna H-NS està codificada pel gen *hns*, el qual es troba localitzat al minut 27,8 del cromosoma d'*E. coli*. Es tracta d'un gen de còpia única, encara que el mateix cromosoma també codifica per un gen paràleg, el gen *stpA*. El gen *hns* es transcriu independentment dels gens que el flanquegen i és capaç d'autoregular negativament la seva pròpia expressió (Hulton *et al.*, 1990; Dersch *et al.*, 1993; Ueguchi i Mizuno, 1993; Falconi *et al.*, 1993). Mutacions en el gen *hns* (que també ha rebut el nom d'H1, *osmZ*, *virR*, *drdX*, *bglY*, *pilG*) han estat descrites en diferents espècies de bacteris Gram-negatius al llarg del temps (Falconi *et al.*, 1991; Hinton *et al.*, 1992; Yoshida *et al.*, 1993; Mojica i Higgins, 1997; Donato *et al.*, 1999; Scott *et al.*, 2003). Aquestes mutacions van ser descrites a causa de l'alteració que produeixen sobre l'expressió de diferents gens que estan regulats, en molts exemples, per temperatura o osmolaritat. Les mutacions en el gen *hns* són altament pleiotròpiques ja que la proteïna H-NS regula

gens que intervenen en diferents processos cel·lulars. Es considera que H-NS és un regulador global de la transcripció que controla l'expressió d'aproximadament el 5 % dels gens a *E. coli* (Hommais *et al.*, 2001).

El mecanisme molecular a través del qual H-NS actua com a modulador de l'expressió gènica encara no es coneix en tot detall. H-NS s'uneix preferentment a regions d'ADN de doble cadena, corbades i riques en AT (Bracco *et al.*, 1989; Yamada *et al.*, 1990; Owen-Hughes *et al.*, 1992). Com ja s'ha esmentat, H-NS és bàsicament un repressor de l'expressió gènica ja que, un cop unit a l'ADN, forma uns complexos nucleoproteics que impedeixen la transcripció per l'ARN polimerasa. Degut al paper que juga en el control de l'expressió de material gènic obtingut per transferència horitzontal (Horizontal Gene Transfer, HGT), recentment molts autors s'han referit a H-NS com a repressor universal i guardià del genoma (Fang i Rimsky, 2008; Dillon i Dorman, 2010).

Pel que fa referència a l'estructura, H-NS presenta dos dominis proteics: el domini N-terminal és el responsable de l'oligomerització, mentre que la unió a l'ADN es produeix en el domini C-terminal (Ueguchi *et al.*, 1996; Shindo *et al.*, 1999) (Fig. 1.5).



**Fig. 1.5.** Representació esquemàtica dels dominis funcionals de la proteïna H-NS. Es mostra el domini N-terminal, que conté tres  $\alpha$ -hèlixs (H1, H2 i H3), a través del qual H-NS forma oligòmers interaccionant amb si mateix o amb altres proteïnes (de l'aminoàcid 1 al 64), la regió flexible central i el domini C-terminal d'unió a l'ADN format pels bucles B1 i B2 i acabat en una  $\alpha$  hèlix (H4) i una hèlix  $\alpha$  3<sub>10</sub>. Extret de Tendeng i Bertin, 2003.

Tot i que el domini N-terminal es defineix com el domini d'oligomerització, s'ha descrit que els 20 primers aminoàcids d'aquest domini són els responsables del silenciament genètic exercit per H-NS (mutacions en aquests aminoàcids eviten la formació d'oligòmers d'elevat ordre). A més, aquesta regió participaria també, juntament amb el

domini C-terminal, en el reconeixement de les zones d'ADN corbades i, per tant, en la unió a l'ADN (Dorman, 2004). El domini N-terminal d'oligomerització de la proteïna H-NS li permet, a més de la formació d'oligòmers, interactuar amb altres proteïnes que mostrin el mateix tipus de domini (Dorman *et al.*, 1999). Aquesta formació d'heteròmers permet una modulació diferent de l'expressió gènica.

Existeix controvèrsia pel que fa a l'estat d'oligomerització que presenta H-NS a la cèl·lula, tot i que sembla que es troba predominantment en forma de dímer o d'oligòmer (Ueguchi *et al.*, 1996; Smyth *et al.*, 2000). Els dímers d'H-NS contenen dos dominis d'unió a l'ADN els quals permeten la formació de "ponts" ADN-H-NS-H-NS-ADN. Aquesta capacitat de formar "ponts" amb l'ADN és essencial perquè H-NS pugui desenvolupar les seves funcions biològiques (Dame *et al.*, 2005; Dame *et al.*, 2006; Dorman, 2007; Stoebel *et al.*, 2008).

### **1.2.1.2. Unió a l'ADN i control de la transcripció**

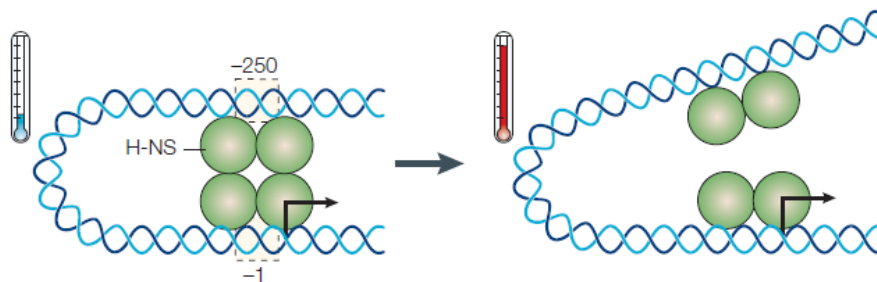
Com ja s'ha esmentat, H-NS s'uneix a regions no específiques de l'ADN riques en AT i que contenen una corbatura intrínseca. Tanmateix, un estudi recent ha identificat una seqüència d'ADN, 5'-TCGATATATT-3', a la qual H-NS s'uniria amb una gran afinitat (Lang *et al.*, 2007). Un gran nombre de promotors d'*E. coli* contenen aquestes regions d'ADN de doble cadena, corbades i riques en AT per les que H-NS té gran afinitat (Bracco *et al.*, 1989). Tot i això, existeixen alguns casos, com en els gens *proU* i *bgl*, en què H-NS requereix, a més de la unió amb el promotor, la interacció amb regions que es troben després de l'inici de transcripció, denominades DRE (Downstream Regulatory Elements) (Nagarajavel *et al.*, 2007).

La unió d'H-NS a l'ADN té lloc en dos passos: una interacció inicial del dímer d'H-NS a la cadena d'ADN, seguida de la unió cooperativa que permet la formació de "ponts" entre zones distals del cromosoma (Dame *et al.*, 2005, 2006; Dorman, 2007). Aquesta capacitat de formar "ponts" permet a H-NS actuar tant com a compactador de l'estructura del nucleòide com a regulador de l'expressió gènica de manera simultània.

Pel que fa al mecanisme molecular a través del qual H-NS és capaç de regular la transcripció, s'han postulat dues hipòtesis: el silenciament transcripcional degut a la formació de complexos nucleoproteïcs que impedeixen la progressió de la transcripció per l'ARN polimerasa (Schröder i Wagner, 2000; Prosseda *et al.*, 2004; Madhusudan *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2005) i la repressió via topologia de l'ADN (Hulton *et al.*, 1990;

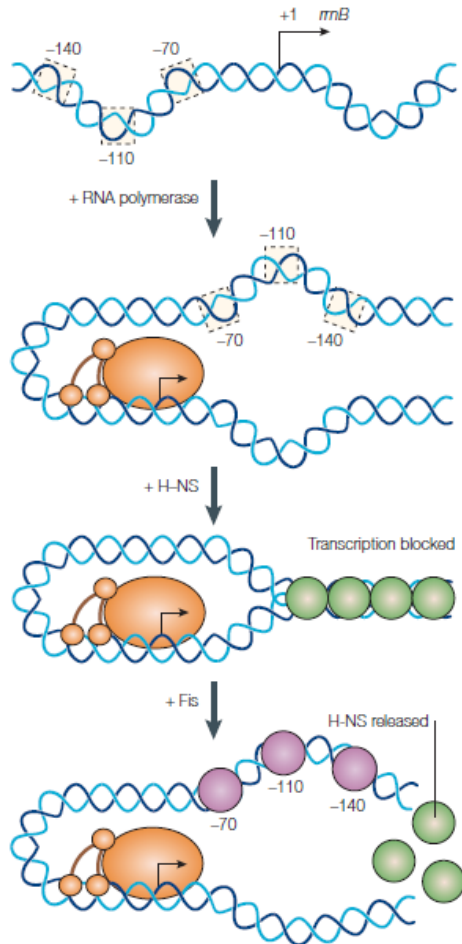
Tupper *et al.*, 1994; Mojica i Higgins, 1997). En ambdós casos es produeix la unió d'H-NS a llocs específics, habitualment seqüències corbades relacionades amb algun promotor, produint-se una nucleació i polimerització de molècules d'H-NS al llarg de la seqüència d'ADN (Williams i Rimsky, 1997). Aquest procés condueix al cobriment de 200-500 pb (Amit *et al.*, 2003), i és el responsable de la inhibició de l'activitat del promotor en qüestió.

El model de silenciament transcripcional proposa la formació d'un complex nucleoproteic H-NS-ADN que impedeix la correcta unió de l'ARN polimerasa i altres factors de transcripció al promotor. Aquest model inclou dos possibles mecanismes de repressió en els quals el complex nucleoproteic provocaria: (i) l'oclusió de l'accés de l'ARN polimerasa al promotor (Prosseda *et al.*, 2004) (Fig. 1.6) o (ii) la captura de l'ARN polimerasa (Schröder i Wagner, 2000; Madhusudan *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2005) (Fig. 1.7). El silenciament transcripcional causat pel complex nucleoproteic H-NS-ADN respon a senyals de tipus ambiental o a la unió d'altres proteïnes o factors de transcripció (Dorman i Deighan, 2003). Aquest és el cas, per exemple, del control per temperatura dels gens *hly* d'*E. coli* (Madrid *et al.*, 2002b) i del promotor de *virF* de *Shigella flexnerii* (Falconi *et al.*, 1998; Prosseda *et al.*, 2004) (Fig. 1.6).



**Fig. 1.6.** Regulació del gen *virF* de *Shigella flexnerii* per la proteïna H-NS. El promotor del gen *virF* presenta dues seqüències d'unió a la proteïna H-NS (posicions -1 i -250). A baixa temperatura, es forma un complex nucleoproteic que impedeix la unió de l'ARN polimerasa i, per tant, es reprimeix la transcripció. Un increment en la temperatura causa un canvi en l'estructura de l'ADN que provoca la pèrdua de contacte entre les molècules d'H-NS, fet que condueix a una desestabilització del complex i una desrepressió de l'expressió del gen *virF* (Dorman, 2004).

En el cas dels gens *rrn* d'*E. coli* (Schröder i Wagner, 2000), la unió d'H-NS a l'ADN provoca la captura de l'ARN polimerasa i la consegüent aturada de la transcripció (Fig. 1.7).



**Fig. 1.7.** Model de repressió de la transcripció per H-NS en operons *rrn* de l'ARN ribosòmic. L'oligomerització de la proteïna H-NS al llarg de determinades regions condueix a la formació d'un complex que evita que l'ARN polimerasa escapi del promotor i iniciï la transcripció. La proteïna Fis (en rosa) antagonitza en aquest cas la repressió mediada per H-NS, per disruptió del complex i l'alliberament de l'ARN polimerasa atrapada (Dorman, 2004).

Aquest model de repressió de la transcripció per H-NS descrit en operons *rrn* de l'ARN ribosòmic va ser recolzat per dos estudis d'immunoprecipitació de cromatina "ChIP-chip" en els quals es va observar la co-precipitació de l'ARN polimerasa i d'H-NS en més de la meitat dels llocs d'unió d'H-NS (Grainger *et al.*, 2006; Oshima *et al.*, 2006).

L'altre model postulat per Hulton *et al.* és el de repressió via topologia de l'ADN el qual deriva de l'observació que la proteïna H-NS pot actuar directament sobre la topologia de l'ADN i produir canvis conformacionals a nivell local. Les curvatures causades a l'ADN per la unió d'H-NS impedirien la correcta unió d'altres proteïnes, factors de transcripció i sobretot de l'ARN polimerasa al promotor (Hulton *et al.*, 1990). Està descrit que molts promotors són sensibles al superenrotllament de l'ADN i que un

augment de la flexibilitat pot promoure l'activitat d'un promotor (Tupper *et al.*, 1994). En aquest cas, la formació del complex nucleoproteic H-NS-ADN podria provocar una disminució de la flexibilitat d'aquest, i aquesta rigidesa del promotor impediria que es portés a terme la transcripció del gen. A més, aquests complexos també eviten la unió de l'ARN polimerasa a la seqüència de l'ADN (Spassky *et al.*, 1984; Rimsky *et al.*, 2001; Schroder i Wagner, 2002).

Els canvis en les propietats físico-químiques de la regió de l'ADN on s'uneix H-NS poden ser essencials perquè es produeixi la unió i es formi l'estructura de "pont" ADN-H-NS-H-NS-ADN. A més dels efectes directes sobre l'estructura de l'ADN, la temperatura i/o altres factors poden influir en la capacitat d'H-NS per dimeritzar/oligomeritzar i per interaccionar amb l'ADN (Ono *et al.*, 2005; Stella *et al.*, 2006). De fet i com ja s'ha indicat anteriorment, H-NS pot actuar com un sensor de canvis ambientals com la temperatura, l'osmolaritat o l'anaerobiosi i regular així l'expressió de diferents gens en resposta a aquets canvis.

De tots els gens descrits a *E. coli* que es troben directa o indirectament afectats per la proteïna H-NS, un 35% formen part de l'embolcall cel·lular o estan regulats en funció dels canvis ambientals (osmolaritat, temperatura, pH o disponibilitat d'oxigen). Un 20% està implicat en la fase de creixement i codifiquen per a proteïnes implicades en l'aparell transcripcional o traduccional. Per altra banda, un altre 35 % dels gens afectats per la proteïna H-NS són de funció desconeguda, fet que indica que encara queden molts aspectes de la regulació d'aquesta proteïna que no es coneixen (Hommals *et al.*, 2001). Recentment, Ono i col·laboradors han determinat quins són els gens expressats diferencialment com a resposta a la temperatura a *S. Typhimurium*, i han observat que la termoregulació del 77% d'aquests gens depèn de la proteïna H-NS (Ono *et al.*, 2005). S'ha proposat que canvis en la temperatura o l'osmolaritat eviten la polimerització d'H-NS al llarg de l'ADN (Dorman i Deighan, 2003).

A més de la regulació de l'expressió gènica, H-NS també participa en altres processos cel·lulars com ho demostra el fet que els mutants *hns* presenten fenotips pleiotròpics. S'ha proposat la implicació d'H-NS en processos de replicació de l'ADN i cicle cel·lular. Estudis de citometria de flux en mutants *hns* d'*E. coli* han permès detectar una disminució de la concentració d'òrgans de replicació o ploïdia, així com un reduït nombre d'òrgans per cèl·lula respecte a una soca salvatge (Atlung i Hansen, 2002). Per



últim, la proteïna H-NS pot actuar també a nivell post-transcripcional, jugant un paper important en l'estabilitat de l'ARN missatger o millorant l'eficiència de traducció (Yamashino *et al.*, 1995; Deighan *et al.*, 2000; Brescia *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2010).

### 1.2.1.3. Regulació de gens adquirits horitzontalment

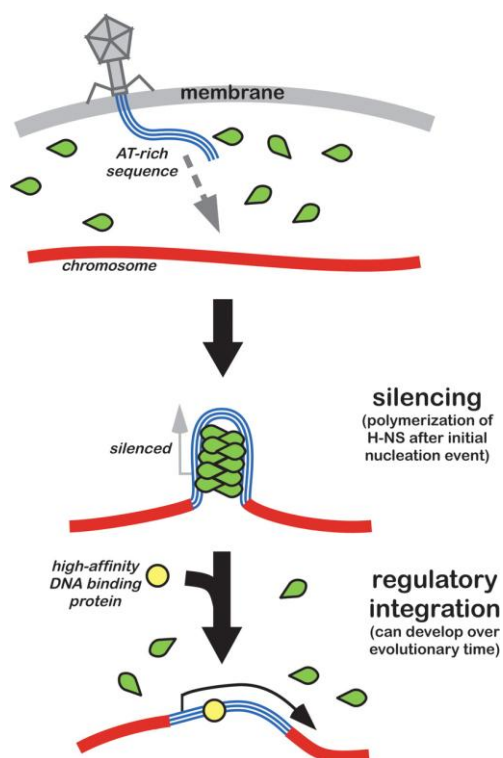
El paper de la transferència horitzontal de material genètic (Horizontal Gene Transfer, HGT) en l'evolució dels microorganismes ha estat extensament estudiat en els microorganismes patògens, i se sap que molts dels factors de virulència d'aquests bacteris han estat adquirits a partir de fonts externes com els fags, els plasmidis o els transposons. L'adquisició d'aquests elements permet un augment del repertori funcional. Aquestes regions mòbils tenen certes característiques comunes que les fan recognoscibles, com el fet que són relativament més riques en AT que el propi cromosoma (Navarre *et al.*, 2007).

L'adquisició de material genètic extern pot causar una disminució del *fitness* del bacteri receptor, ja sigui per integració de material en determinades regions funcionals del genoma, o per la incorporació de gens perjudicials per a la cèl·lula receptora. Fins i tot, en el cas de l'adquisició de nou material que proporcioni a la cèl·lula alguna funció d'utilitat, també es pot produir un impacte negatiu degut a que les noves adquisicions no estan integrades en els circuits de regulació del bacteri.

Recentment, s'ha descrit el paper d'H-NS en el silenciament de l'expressió gènica d'elements genòmics adquirits de manera horitzontal. És més, el fet que H-NS s'uneixi quasi exclusivament a regions riques en AT i que tot i l'absència d'H-NS es mantingui l'estructura del nucleòide (Brunetti *et al.*, 2001; Zimmerman, 2006), han suggerit que una funció important d'H-NS és silenciar l'expressió d'ADN HGT (Lucchini *et al.*, 2006; Navarre *et al.*, 2006; Pflum, 2006).

Diversos estudis d'immunoprecipitació de cromatina "ChIP-chip" duts a terme en els genomes d'*E. coli* (Grainger *et al.*, 2006; Oshima *et al.*, 2006) i de *Salmonella Typhimurium* (Lucchini *et al.*, 2006; Navarre *et al.*, 2006) han evidenciat la unió d'H-NS a regions d'ADN riques en AT adquirides per transferència horitzontal. En el cas de *Salmonella*, aquestes regions pertanyen a gens de virulència, molts dels quals estan localitzats en plasmidis (O'Byrne i Dorman, 1994) i en illes de patogenicitat (Rhen i Dorman, 2005; Abrahams i Hensel, 2006; Ellermeier i Slauch, 2007).

La mutació *hns* en bacteris portadors de plasmidis i illes de patogenicitat dona lloc a una disminució en el *fitness* bacterià, el qual queda restablert quan es complementa amb H-NS. Per tant, H-NS és essencial per la prevenció de la disminució del *fitness* associat a una descontrolada expressió dels gens codificats en aquests elements adquirits per transferència horitzontal (Lucchini *et al.*, 2006). El mecanisme mitjançant el qual es du a terme el control del material genètic extern permetent que la cèl·lula adquireixi noves funcions sense cap compromís en el *fitness* s'anomena silenciament xenogènic (Fig. 1.8) (Navarre *et al.*, 2007).

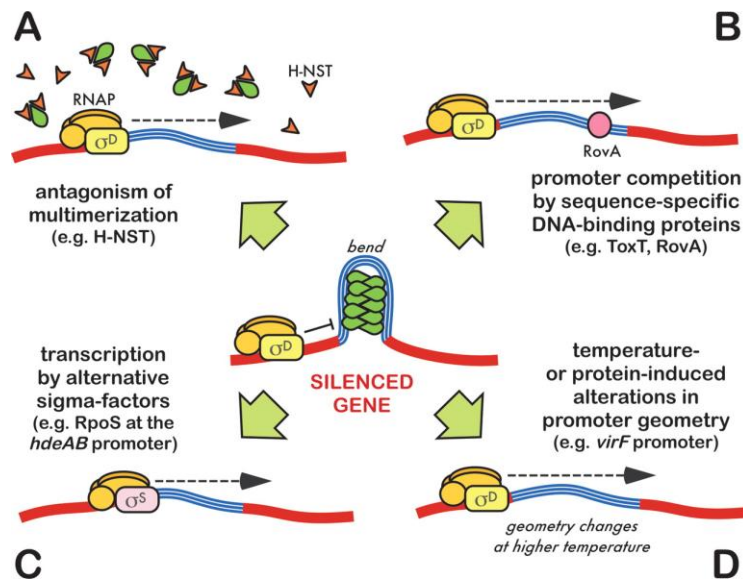


**Fig. 1.8.** Adquisició d'ADN extern facilitat pel silenciament xenogènic. La unió d'H-NS a les seqüències riques en AT silenciarien l'expressió de l'ADN. Determinades condicions o la intervenció de proteïnes específiques podria alliberar aquest silenciament i permetre l'expressió de l'ADN quan es donessin les condicions adequades. Extret de Navarre *et al.*, 2007.

Quan la cèl·lula requereix l'expressió d'aquests elements, H-NS ha de permetre la seva expressió alliberant el fragment d'ADN al que es troba unit. Els mecanismes mitjançant els quals H-NS desfà els complexos de repressió que impedeixen l'expressió dels gens adquirits horitzontalment s'anomenen mecanismes de contrasilenciament. Fins al moment, s'han postulat 4 mecanismes de contrasilenciament (Fig. 1.9) (Navarre *et al.*, 2007):

- A. El trencament dels complexos d'H-NS a causa de la multimerització d'antagonistes com per exemple H-NST (proteïna H-NS truncada amb activitat antagonista davant H-NS) (Williamson i Free, 2005) o la proteïna 5.5 del fag T7 (Ali *et al.*, 2011).
- B. La competència per la unió a l'ADN de proteïnes d'unió específica amb una alta afinitat per l'ADN, com per exemple ToxT o RovA.
- C. L'activació d'alguns promotors com el promotor *spv* de *Salmonella* o el promotor *hdeAB* d'*E. coli* pel factor sigma alternatiu  $\sigma^S$ . L'ARN polimerasa en associació amb  $\sigma^S$  podria activar selectivament gens xenogènics sota certes condicions d'estrès, condicions en les que la seva expressió podria resultar beneficiosa.
- D. Les alteracions en la geometria del promotor causades per proteïnes d'unió o canvis ambientals, que trenquen la formació del complex H-NS, com per exemple al promotor *virF* de *Shigella*.

Aquests mecanismes no són excloents entre ells i és possible que existeixi més d'un mecanisme que pugui estar actuant en algun d'aquests promotors (Navarre *et al.*, 2007).



**Fig. 1.9.** Mecanismes proposats de contrasilenciament de l'expressió d'ADN xenogènic. Extret de Navarre *et al.*, 2007.

### 1.2.2. La proteïna StpA, paràleg d'H-NS

El gen *stpA* (Supressor of *td* mutant phenotype A) va ser identificat l'any 1992 en base a la seva habilitat de suprimir el fenotip mutant en el gen *td* del bacteriòfag T4 contingut en un plasmidi (Zhang i Belfort, 1992). Poc després, la proteïna StpA va ser identificada per la seva capacitat, al ser sobreexpressada, de complementar la repressió exercida per H-NS sobre el gen *adi* (Shi i Bennett, 1994). A partir d'aquest moment, StpA va ser reconeguda com a paràleg d'H-NS a *E. coli*.

StpA i H-NS tenen gairebé el mateix tamany molecular (134 i 137 residus, respectivament) i mostren un 58% d'identitat pel que fa a la seqüència d'aminoàcids. La identitat és major en el domini C-terminal d'unió a l'ADN (73% d'identitat) que en N-terminal (51% d'identitat) (Fig. 1.10).

```

H-NS      MSEALKILNNIRTLRAQARECTLETLEEMLEKLEVVVNERREEESAAAAEVEERTKRLQQ 60
StpA      MSVMLQSLNNIRTLRAMAREFSIDVLEEMLEKFRVVTKERREEEEQQQRELAERQEKIST 60
          ** *: ***** ** :::*****:..*:*:*****. *: ** .*:

H-NS      YREMLIADGIDPNELLNSLAAVKSGTKAKRAQRPAKYSYVDENGETKTWTGQGRTPAVIK 120
StpA      WLELMKADGINPEELLGNSSAAAPRAGKKRQPRPAKYKFTDVNGETKTWTGQGRTPKPIA 120
          : ::: *****:***:.. :. . : ** *****:.* ***** *

H-NS      KAMDEQGKSLDDFLIKQ 137
StpA      QALAE-GKSLDDFLI-- 134
          :*: * *****

```

**Fig. 1.10.** Alineament de les seqüències H-NS i StpA. Els asteriscs indiquen identitat, els dos punts forta similitud i el punt similitud.

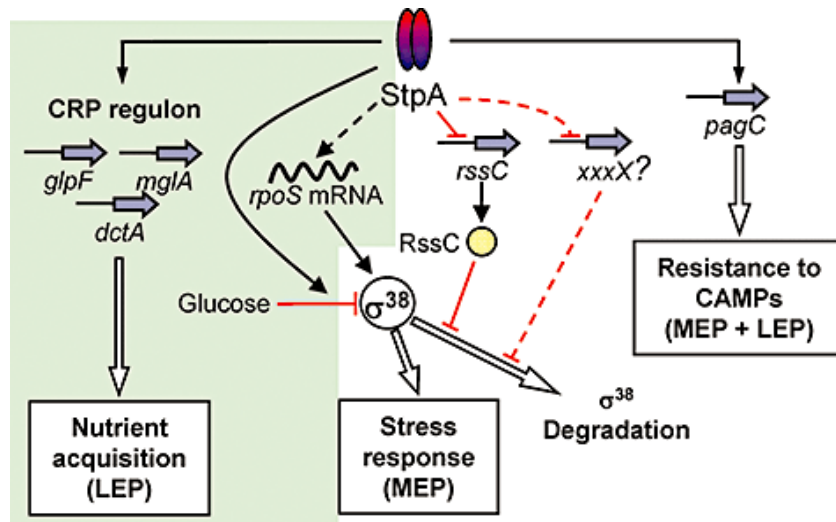
Donada l'elevada similitud entre la seqüència d'StpA i H-NS, no sorprèn el fet que també comparteixin algunes funcions i mecanismes d'acció. Les dues proteïnes poden contenir el superenrotllament, unir-se a regions corbes de l'ADN i inhibir la transcripció. A més, existeix una regulació creuada de l'expressió entre ambdues proteïnes les quals també poden autoregular la seva pròpia expressió (Sonden i Uhlin, 1996; Zhang *et al.*, 1996). En mutants *hns*, l'expressió d'*stpA* es troba molt augmentada, la qual cosa compensa parcialment el fenotip d'aquests mutants *hns* (Sonnenfield *et al.*, 2001; Free *et al.*, 1998). El conjunt de gens regulats per StpA a *E. coli* es troba englobat dins del reguló H-NS (Fig. 1.12). És a dir que, en condicions estàndard de creixement al laboratori (medi LB, creixement a 37°C), no s'ha identificat cap gen que estigui regulat únicament per StpA (sense estar-ho també per H-NS) (Dorman *et al.*, 1999; Doetsch *et al.*, 2010). De manera coherent amb això, mentre que la mutació *hns* provoca uns

efectes evidents en el creixement i en l'estructura cel·lular, a *E. coli* el mutant *stpA* no mostra un fenotip específic. En canvi, a diferència d'*E. coli*, a *Salmonella* aquesta NAP controla l'expressió d'un 5% dels gens del genoma (Lucchini *et al.*, 2009).

StpA i H-NS poden interaccionar i formar complexos H-NS-StpA, la qual cosa evita la proteòlisi d'StpA per acció de la proteasa Lon (Johansson *et al.*, 2001). En soques mutants *hns*, l'estabilitat d'StpA *in vivo* es veu disminuïda degut a la seva degradació (Johansson i Uhlin, 1999). A més, StpA, igual que H-NS, té la capacitat d'unir-se a la proteïna Hha i al seu paràleg YdgT (Paytubi *et al.*, 2004). La formació dels complexos amb Hha i YdgT també protegeix a StpA de la ràpida degradació *in vivo* per la proteasa Lon.

S'ha evidenciat que els patrons d'expressió al llarg de la corba de creixement d'StpA i d'H-NS són diferents. Sota condicions de creixement exponencial, el nombre de molècules d'H-NS estimat és de 20.000, mentre que el d'StpA és només d'unes 200 (Spassky *et al.*, 1984; Sonden i Uhlin, 1996; Williams i Rimsky, 1997; Free i Dorman, 1997). En medi ric, StpA no és abundant, trobant-se només induïda la seva expressió en un període determinat de la fase exponencial de creixement. En canvi, sota condicions d'estrès osmòtic, a elevada temperatura o en condicions de creixement en medi mínim, l'expressió d'*stpA* està induïda (Free i Dorman, 1997). A més, StpA i H-NS es comporten de manera diferent davant estímuls ambientals pel que fa a la formació de filaments amb l'ADN i a l'estabilitat d'aquests. La integritat de l'estructura dels filaments que forma StpA amb l'ADN és insensible als canvis pel que fa a la força iònica (50-300mM KCl), a la temperatura (23-37°C) i al pH (6,6-8,8), a diferència dels ponts ADN-H-NS els quals es trenquen a 200 mM de KCl i 37°C. Aquest diferent comportament suggereix un possible paper d'StpA, independent d'H-NS, en la resistència a l'estrès osmòtic i al xoc tèrmic (Lim *et al.*, 2011). A *S. Typhimurium* els gens que depenen d'StpA corresponen a un subconjunt específic del reguló H-NS que està predominantment sota el control positiu de  $\sigma^{38}$  (RpoS), CRP-cAMP i PhoP (Lucchini *et al.*, 2009). La regulació d'aquests gens exercida per StpA varia en funció de la fase de creixement. Durant la fase de creixement exponencial StpA modula els nivells de  $\sigma^{38}$  per tal de prevenir l'activació d'aquesta. En canvi, al final de la fase exponencial StpA activa el reguló CRP-cAMP (Fig. 1.11). StpA no té un paper regulador ni en la fase exponencial primerenca ni en fase estacionària. Per això, StpA de *Salmonella* s'ha considerat recentment com a un nou regulador específic de la fase de

creixement (fase exponencial mitja i tardana) que juga un paper fisiològic important relacionant els nivells de  $\sigma^{38}$  amb la disponibilitat de nutrients (Lucchini *et al.*, 2009).



**Fig. 1.11.** Model del control de la transcripció mediat per StpA a *S. Typhimurium*. StpA regula els gens de resposta a canvis ambientals pertanyents als regulons  $\sigma^{38}$ , PhoP i CRP-AMPc de manera dependent de la fase de creixement a través de diferents mecanismes. (i) Durant la fase exponencial mitja (Middle Exponencial Phase, MEP), StpA regula els gens dependents de  $\sigma^{38}$  mitjançant la modulació dels nivells de la proteïna  $\sigma^{38}$  a través de la proteïna anti-adaptadora RssC. StpA també influeix negativament en els nivells de  $\sigma^{38}$  en absència de RssC a través d'un mecanisme addicional per la repressió a nivell post-traduccional d'un altre modulator de  $\sigma^{38}$  que queda per determinar. L'efecte negatiu d'StpA sobre els nivells de  $\sigma^{38}$  en fase MEP no es produeix durant la fase de creixement exponencial tardana (Late Exponencial Phase, LEP) degut a què el control de l'estabilitat de  $\sigma^{38}$  probablement és compensat a nivell de l'ARNm d'*rpoS*. StpA és també essencial per la modulació dependent glucosa dels nivells de  $\sigma^{38}$ . (ii) La regulació dels gens dependents de CRP-cAMP (per exemple, *glpF*, *dctA*, *mglA*) es limita a la fase exponencial tardana (LEP). (iii) StpA reprimeix la transcripció dels gens dependents de PhoP (per exemple, *pagC*) tant en MEP com en LEP, i modula la resistència a peptids antimicrobians catiónics (CAMPs). L'àrea ombrejada en verd indica els mecanismes que només s'observen en LEP. Les línies discontinues indiquen la regulació a través d'un hipotètic o desconegut mecanisme. Extret de Lucchini *et al.*, 2009.

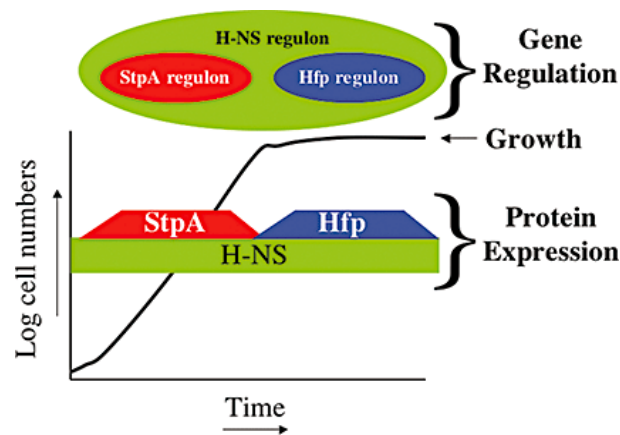
### 1.2.3. Coexistència de diferents paràlegs d'H-NS en una mateixa cèl·lula

L'evolució en el camp de la seqüenciació de genomes ha permès el descobriment de diversos gens que codifiquen per homòlegs o proteïnes que interaccionen amb H-NS (Bertin *et al.*, 2001; Tendeng i Bertin, 2003). Curiosament, molts d'aquests estan codificats en elements genòmics transmissibles horitzontalment, estant molts involucrats en virulència. El motiu pel qual en una cèl·lula coexisteixen diverses

proteïnes que comparteixen una mateixa funció reguladora de l'expressió gènica és desconegut. Una hipòtesi seria que precisament el rol d'aquests homòlegs fos regular l'expressió dels gens codificats en els mateixos plasmidis o illes en les que són transmesos. Diversos estudis sobre aquests homòlegs d'H-NS donen suport a aquesta hipòtesi: (i) La proteïna H-NS<sub>R27</sub>, codificada pel plasmidi R27 de *S. Typhimurium*, silencia predominantment gens adquirits per HGT, sense exercir cap efecte sobre gens cromosòmics regulats per H-NS propi de la cèl·lula com són *rcaA*, *psiF*, *proV* i *stpA* (Baños *et al.*, 2009), (ii) La proteïna Ler d'*E. coli* enteropatogènica, amb un domini d'unió a l'ADN homòleg a H-NS, controla l'expressió de gens de virulència adquirits per HGT competint amb H-NS propi i impedit la repressió gènica que aquest exerceix (Bustamante *et al.*, 2001; Sánchez-SanMartín *et al.*, 2001; Umanski *et al.*, 2002) i (iii) La proteïna codificada pel plasmidi R446 (ORF4) i que té un extrem homòleg al domini C-terminal d'H-NS, és important en el control de l'expressió dels pili requerits en la conjugació del mateix plasmidi (Tietze i Tschäpe, 1994). Una altra opció, que no té perquè excloure la primera, és que aquestes proteïnes homòlogues fossin necessàries per tal de modificar el patró de regulació global de la cèl·lula en benefici del nou element mòbil adquirit. Un exemple d'això és l'homòleg d'H-NS Sfh, el qual està codificat en un plasmidi de *Shigella flexneri* (Beloin *et al.*, 2003; Doyle i Dorman, 2006). Sfh té una homologia del 60% en la seqüència d'aminoàcids amb H-NS i StpA i és capaç d'interactuar amb ambdues proteïnes (Deighan *et al.*, 2003a). A més, és capaç de complementar una mutació *hns* i afecta gens de virulència quan se sobreexpressa, a més d'un paper addicional en la transmissió i el manteniment del plasmidi que la codifica (Beloin *et al.*, 2003; Doyle *et al.*, 2007). En el treball dut a terme a *Shigella*, Deighan *et al.* suggereixen interaccions a tres bandes entre la proteïna H-NS i els paràlegs d'aquesta, StpA i Sfh, presents a la cèl·lula. En concret, descriuen la capacitat tant d'H-NS, StpA com d'Sfh per formar homodímers *in vivo* i heterodímers amb qualsevol dels seus homòlegs. A més, també indiquen una regulació creuada entre Sfh, H-NS i StpA (tant la mutació com la sobreexpressió d'*sfh* provoquen l'alteració dels nivells d'H-NS i d'StpA). Això planteja la possibilitat que Sfh podria modular les activitats d'H-NS i StpA, i viceversa (Deighan *et al.*, 2003b).

Per altra banda, un altre cas en què s'ha descrit una interacció entre paràlegs d'H-NS, és el cas d'Hfp, la qual també pot unir-se tant a H-NS com a StpA (Muller *et al.*, 2010). Hfp és una proteïna codificada en una illa de patogenicitat present en soques d'*E. coli*

uropatogèniques amb homologia amb H-NS i StpA. Igual que en el cas d'StpA, la proteïna Hfp té activitat biològica i pot complementar algun dels fenotips *hns*. A *E. coli*, tant Hfp com StpA s'expressen poc a 37°C, mostrant uns nivells d'expressió diferents en funció de la fase de creixement. A més, mentre que la producció d'StpA augmenta a temperatures superiors a 40°C, la d'Hfp es veu incrementada a 25°C (Muller *et al.*, 2010). Aquest patró d'expressió oposat en resposta a la temperatura i a la fase de creixement podria significar que StpA i Hfp rars vegades estan presents a la mateixa cèl·lula al mateix temps i que participen en diferents relacions amb H-NS (Fig. 1.12) (Dorman, 2010).



**Fig. 1.12.** Producció de les proteïnes H-NS, StpA i Hfp en una soca uropatogènica d'*E. coli* i la seva influència en l'expressió gènica. La producció de les tres proteïnes es mostra en funció del creixement d'un cultiu bacterià. La concentració intracel·lular de la proteïna H-NS (rectangle verd) és constant al llarg de la corba de creixement, mentre que la proteïna StpA (en vermell) es produeix a la primera part del creixement logarítmic, i la proteïna Hfp (en blau) es produeix en una etapa posterior. El conjunt dels gens regulats per H-NS està representat en el cercle verd a la part superior de la figura. Els subgrups de gens en què l'expressió està influenciada per StpA o Hfp estan representats en vermell i blau, respectivament. Extret de Dorman, 2010.

En resum, els estudis més recents ens indiquen que la composició del conjunt de les proteïnes associades al nucleòide de la família H-NS presents en una cèl·lula és variable en funció de les condicions ambientals i de la fase de creixement, resultant en diferents complexos de proteïnes heteromèrics.



### 1.3. La família de proteïnes Hha-YmoA

La família de proteïnes Hha-YmoA inclou un grup de proteïnes de baix pes molecular (aproximadament 8 KDa) relacionades pel que fa a la seva seqüència i que estan involucrades en la regulació gènica en bacteris Gram-negatius. Els gens que codifiquen per aquestes proteïnes es troben exclusivament en els genomes de la família *Enterobacteriaceae* i en plasmidis conjugatius aïllats d'aquests organismes (Madrid *et al.*, 2007b).

Els primers membres descrits d'aquesta família van ser la proteïna Hha d'*E. coli* i la proteïna YmoA de *Yersinia enterocolitica* (Cornelis *et al.*, 1991; Nieto *et al.*, 1991). Aquestes dues proteïnes, que mostren un 82% d'identitat pel que fa a la seva seqüència, regulen l'expressió de gens que expressen factors de virulència i poden ser funcionalment intercanviables (Mikulskis i Cornelis, 1994; Balsalobre *et al.*, 1996). Els mutants en els gens *hha* i *ymoA* presenten propietats similars a les d'una soca amb nivells reduïts d'H-NS. Aquestes propietats inclouen alteracions en la regulació de l'expressió gènica (Cornelis *et al.*, 1991; Carmona *et al.*, 1993; Mouriño *et al.*, 1996; Fahlen *et al.*, 2000; Fahlen *et al.*, 2001), alteracions en el grau de superenrotllament dels plasmidis (Carmona *et al.*, 1993), o una freqüència incrementada pel que fa als fenòmens de transposició de seqüències d'inserció (Mikulskis i Cornelis, 1994; Balsalobre *et al.*, 1996).

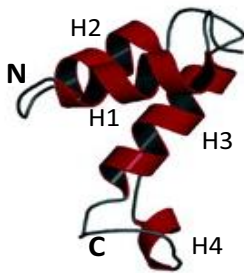
#### 1.3.1. La proteïna Hha

La proteïna Hha (High Hemolytic Activity) va ser descrita inicialment com un modulador de la toxina  $\alpha$ -hemolisina (Nieto *et al.*, 1991). La síntesi d'aquesta toxina es veu reprimida per Hha tant en condicions d'elevada osmolaritat com de baixa temperatura (Mouriño *et al.*, 1994). En aquestes condicions ambientals, la repressió de la toxina  $\alpha$ -hemolisina es veu anul·lada en mutants *hha* (Carmona *et al.*, 1993; Mouriño *et al.*, 1996; Mouriño *et al.*, 1998). La modulació de l'expressió gènica exercida per Hha no està restringida a l'operó de l' $\alpha$ -hemolisina (*hly*) ja que estudis posteriors indiquen la implicació d'aquesta proteïna en la regulació de l'expressió d'altres gens relacionats amb virulència en *E. coli*, tots ells de manera estretament relacionada amb paràmetres ambientals com l'osmolaritat i la temperatura (Mouriño *et al.*, 1994; Mouriño *et al.*, 1996; Balsalobre *et al.*, 1999; Sharma i Zuerner, 2004;). Els estudis de transcriptòmica a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium realitzats per Vivero *et al.* van demostrar que

Hha juga també en aquesta espècie un paper en la regulació d'un elevat nombre de gens, molts d'ells localitzats en seqüències d'ADN riques en AT adquirides per transferència horitzontal (Vivero *et al.*, 2008).

### 1.3.1.1. Estructura d'Hha i unió a H-NS

L'estructura tridimensional d'Hha va ser resolta per ressonància magnètica nuclear (RMN) a 25°C (Yee *et al.*, 2002). Consisteix en quatre segments  $\alpha$ -hèlix: hèlix 1 (residus 8-16), hèlix 2 (residus 21-34), hèlix 3 (residus 37-55) i hèlix 4 (residus 65-70) (Fig. 1.13).

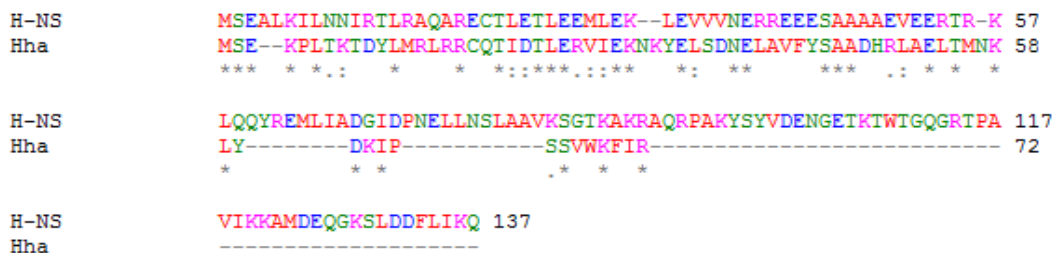


**Fig. 1.13.** Estructura tridimensional de la proteïna Hha. En vermell s'indiquen les estructures  $\alpha$ -hèlix. Adaptat de Yee *et al.*, 2002.

Les hèlixs 1 i 2 d'Hha estan situades a la meitat N-terminal de la proteïna. L'hèlix 3 uneix els dominis N i C-terminal, el qual consisteix en l'hèlix 4.

És important indicar que l'estudi de la interacció ADN-proteïna mitjançant l'anàlisi de retard en gel va permetre observar que la proteïna Hha no és capaç d'unir-se directament a seqüències específiques d'ADN de l'operó de l' $\alpha$ -hemolisina (*hly*). Enlloc d'això, Hha s'uneix a la proteïna H-NS, la qual interacciona amb regions específiques de les seqüències reguladores d'aquest operó (Nieto *et al.*, 2000; Madrid *et al.*, 2002b). Aquests resultats indiquen que el complex Hha-H-NS és necessari per reprimir de manera eficient l' $\alpha$ -hemolisina. Aquest fet és coherent amb l'observació que la màxima desrepressió de l'expressió de l'hemolisina codificada per l'operó *hly* es dona en un doble mutant *hns hha* (Nieto *et al.*, 2000).

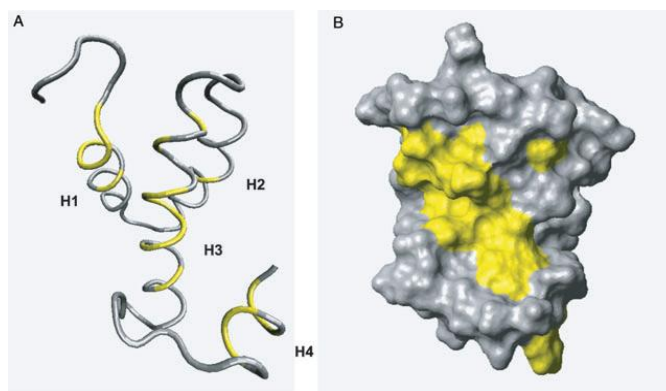
La seqüència d'aminoàcids de la proteïna Hha mostra un remarcable grau de similitud, tenint en compte la llargada de la seqüència, amb el domini N-terminal d'oligomerització d'H-NS (Nieto *et al.*, 2002) (Fig. 1.14).



**Fig. 1.14.** Alineament de les seqüències d'aminoàcids d'H-NS i Hha. Els asteriscs indiquen identitat, els dos punts forta similitud i el punt similitud.

La interacció d'Hha amb la proteïna H-NS va ser demostrada per estudis d'interacció de proteïnes (Nieto *et al.*, 2000). L'anàlisi mutacional de la proteïna Hha va indicar que gairebé tota la seqüència d'aquesta proteïna contribuïa a la interacció amb H-NS (Nieto *et al.*, 2002). A més, la proteïna quimèrica obtinguda reemplaçant el domini N-terminal d'H-NS (residus 1-64) pels 60 primers residus d'Hha va complementar parcialment alguns dels fenotips observats en un mutant *hns* (Rodríguez *et al.*, 2005).

Estudis posteriors han permès determinar per ressonància magnètica nuclear (RMN) els canvis conformacionals d'Hha provocats per la unió amb H-NS (García *et al.*, 2005). La interacció d'Hha amb H-NS<sub>64</sub> (residus 1-64 d'H-NS corresponents al domini N-terminal d'oligomerització) va mostrar la pertorbació de diversos residus d'Hha (tant de la superfície com de la part central hidrofòbica de la proteïna). Això indica que Hha pateix un rearranjament conformacional després d'interaccionar amb H-NS (Madrid *et al.*, 2007a) (Fig. 1.15.).



**Fig. 1.15.** Estudi de les pertorbacions induïdes per H-NS en l'estructura d'Hha. Els residus més afectats estan marcats en groc. A. Estructura tridimensional d'Hha. B. Representació de la superfície d'Hha. Extret de Madrid *et al.*, 2007.

Estudis mutacionals duts a terme recentment han permès identificar el residu D48 d'Hha com a essencial perquè tingui lloc la interacció amb H-NS (de Alba *et al.*, 2011).

### 1.3.1.2. Hha com a modulador global de l'expressió gènica

Els estudis sobre el mecanisme d'acció de la proteïna Hha es basen en l'estudi de l'efecte que aquesta exerceix en funció de canvis ambientals sobre l'operó *hlyCABD* (que codifica per la toxina  $\alpha$ -hemolisina) present en plasmidis d'*E. coli* (Godessart *et al.*, 1988; Nieto *et al.*, 1991; Carmona *et al.*, 1993).

La proteïna Hha és força menys abundant que H-NS, la qual cosa significa que només una fracció d'H-NS pot interaccionar amb Hha. Això estaria relacionat amb el fet que el nombre de gens desregulats en un mutant *hha* és inferior al d'un mutant *hns* (Balsalobre *et al.*, 1999; Hommais *et al.*, 2001). De fet, estudis transcriptòmics duts a terme a *E. coli* i *Salmonella* han evidenciat que els complexos Hha-H-NS modulen l'expressió de només una part dels gens regulats per H-NS (Vivero *et al.*, 2008; García-Contreras *et al.*, 2008; Baños *et al.*, 2009).

Com ja s'ha esmentat a l'apartat referent a H-NS, recentment s'ha indicat un important paper d'aquesta proteïna en el silenciament d'elements gènics rics en AT adquirits per transferència horitzontal en bacteris entèrics. L'estudi transcriptòmic de mutants per les proteïnes Hha i pel seu paràleg YdgT realitzat a *S. Typhimurium* va evidenciar que els gens alterats en aquests mutants també corresponen a seqüències d'ADN riques en AT adquirides per transferència horitzontal (Vivero *et al.*, 2008). Estudis posteriors van corroborar que les proteïnes de la família Hha intervenen, a través de la interacció amb H-NS, en el silenciament selectiu de gens adquirits de manera horitzontal: mentre que la repressió dels gens propis de la cèl·lula la duen a terme homoligòmers d'H-NS, el silenciament dels fragments d'ADN HGT implica la formació de complexos H-NS-Hha (Baños *et al.*, 2009). Una característica adicional comuna per les famílies de NAPs H-NS i Hha és el fet que els membres d'ambdues famílies estan codificats en plasmidis de la família de les Enterobacteriàcies. És destacable que el 55% d'aquests plasmidis codifica simultàniament per un paràleg d'H-NS i per un paràleg d'Hha (Takeda *et al.*, 2011). Per tant, el sistema Hha-H-NS presenta unes característiques evolutives úniques pels bacteris entèrics. La capacitat de discriminar selectivament entre ADN propi o HGT estaria permetent el manteniment de l'ADN que es transmet horitzontalment de manera silenciada, donant als bacteris entèrics un avantatge competitiu a l'hora

d'adaptar-se a noves condicions ambientals, incloent també la invasió de l'hoste (Baños *et al.*, 2009).

Per altra banda, s'ha descrit un paper addicional d'Hha com a inhibidor de la formació de biofilm, rol pel qual podria no requerir la unió amb H-NS (García-Contreras *et al.*, 2008). Aquest efecte és degut a la repressió exercida per Hha sobre la transcripció dels codons rars d'ARN de transferència (ARNt) *argU* i *ileY*. L'addició d'aquests codons en una soca que sobreexpressa *hha* restaura les fimbries tipus I i atenua així l'efecte d'Hha en la formació de biofilm. A més, Hha interacciona amb 15 gens o a regions intergèniques dels profags CP4-57 i DLP12, incloent regions properes als llocs d'integració (*att*). Aquests profags estan involucrats en la formació de biofilm aportant funcions relacionades amb la motilitat i el metabolisme de nutrients. L'estudi de l'efecte de la proteïna Hha un cop unida als gens de profags va permetre observar que aquesta era capaç de provocar la lisi cel·lular mitjançant la inducció de gens lítics del profag i l'activació de toxines via proteases (García-Contreras *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009).

En resum, Hha en els enterobacteris probablement exerceix dues funcions diferenciades: el co-silenciament amb H-NS de gens adquirits per transferència horitzontal i la regulació de gens relacionats amb la formació de biofilms.

### **1.3.2. La proteïna YdgT, paràleg d'Hha**

La proteïna YdgT és una proteïna de pes molecular similar a Hha (8 KDa) que és capaç, quan se sobreexpressa en un mutant *hha*, de compensar parcialment alguns dels fenotips propis d'aquesta mutació (Paytubi *et al.*, 2004). Per aquest motiu, YdgT va ser descrita com a paràloga d'Hha (Paytubi *et al.*, 2004).

YdgT, de la mateixa manera que Hha, és capaç d'unir-se al domini N-terminal d'oligomerització d'H-NS (Paytubi *et al.*, 2004). De fet, entre les seqüències d'aminoàcids d'YdgT i d'Hha existeix un 38% d'identitat i un 67% de similitud (Paytubi *et al.*, 2004) (Fig. 1.16).

```

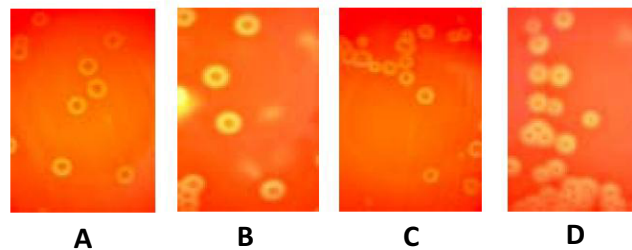
Hha      MSEKPLTKTDYLMRLRRCQTIDTLERVIEKNKYELSDN-ELAVFYSAADHRLAELTMN-K 58
YdgT     -----MTVQDYLLKFRKISSLESLEKLYDHLNLYTLTDDQELINMYRAADHRRRAELVSGGR 55
          :*  ***:***: .:***: : : :* *: * * * * * * * * . . :

Hha      LYDK--IPSSVWKFIR 72
YdgT     LFDLGQVPKSVWHYVQ 71
          **: * .***:***:

```

**Fig. 1.16.** Alineament de les seqüències d'YdgT i Hha. Els asteriscs indiquen identitat, els dos punts forta similitud i el punt similitud.

Considerant que Hha participa en la termo i osmo-regulació de l'expressió de la toxina  $\alpha$ -hemolisina (Mouriño *et al.*, 1996), es va estudiar l'expressió d'aquesta toxina en un mutant *ydgT* (Paytubi *et al.*, 2004). Tot i que la mutació en el gen *ydgT* no va resultar tenir influència en l'expressió de l'operó *hly*, els nivells d'aquesta toxina es veuen significativament incrementats (més que en el mutant *hha*) quan es combinen les mutacions *ydgT* i *hha* (Fig. 1.17).



**Fig. 1.17.** Fenotip hemolític en plaques d'LB agar-sang de soques d'*E. coli* portadores del plasmidi hemolític pHly152 A) soca salvatge, B) mutant *hha*, C) mutant *ydgT* i D) mutant *hha ydgT*. Extret de Paytubi, 2004.

Paytubi *et al.* van observar també que en mutants *hha* es produeix un increment en la transcripció d'*ydgT*. Per tant, es va postular que la sobreexpressió d'*ydgT* que té lloc en un mutant *hha* és la responsable de l'atenuació parcial del fenotip del mutant *hha* (Paytubi *et al.*, 2004).

Pel que fa a la interacció amb la família de proteïnes H-NS, YdgT és capaç d'unir-se tant a H-NS com al seu paràleg StpA. La unió d'YdgT amb H-NS es produeix en els mateixos residus d'H-NS en els que s'uneix Hha, situats a l'hèlix 3 (Bae *et al.*, 2008).

Posteriorment als resultats publicats per Paytubi i col·laboradors, Kim *et al.* van descriure a YdgT com una nova proteïna d'unió a l'origen de replicació d'*E. coli*, *oriC*. Per aquest motiu, fou anomenada també Cnu (*oriC*-binding nucleoid-associated) (Kim *et al.*, 2005). Tot i això, en aquest treball es referirà a aquesta proteïna com a YdgT.

Kim *et al.* van realitzar assaigs de citometria de flux amb mutants *hha*, *ydgT* i *hns* i van detectar una disminució en el nombre d'òrgans de replicació o ploïdia en el doble mutant *hha ydgT*, de la mateixa manera que ja havia estat descrit pel mutant *hns* (Atlung i Hansen, 2002). Aquests resultats suggereixen que la interacció d'H-NS amb l'*oriC* a través de les proteïnes Hha i/o YdgT és important per la replicació del cromosoma bacterià.

## **1.4. Possibles nous membres de la família de proteïnes Hha-YmoA**

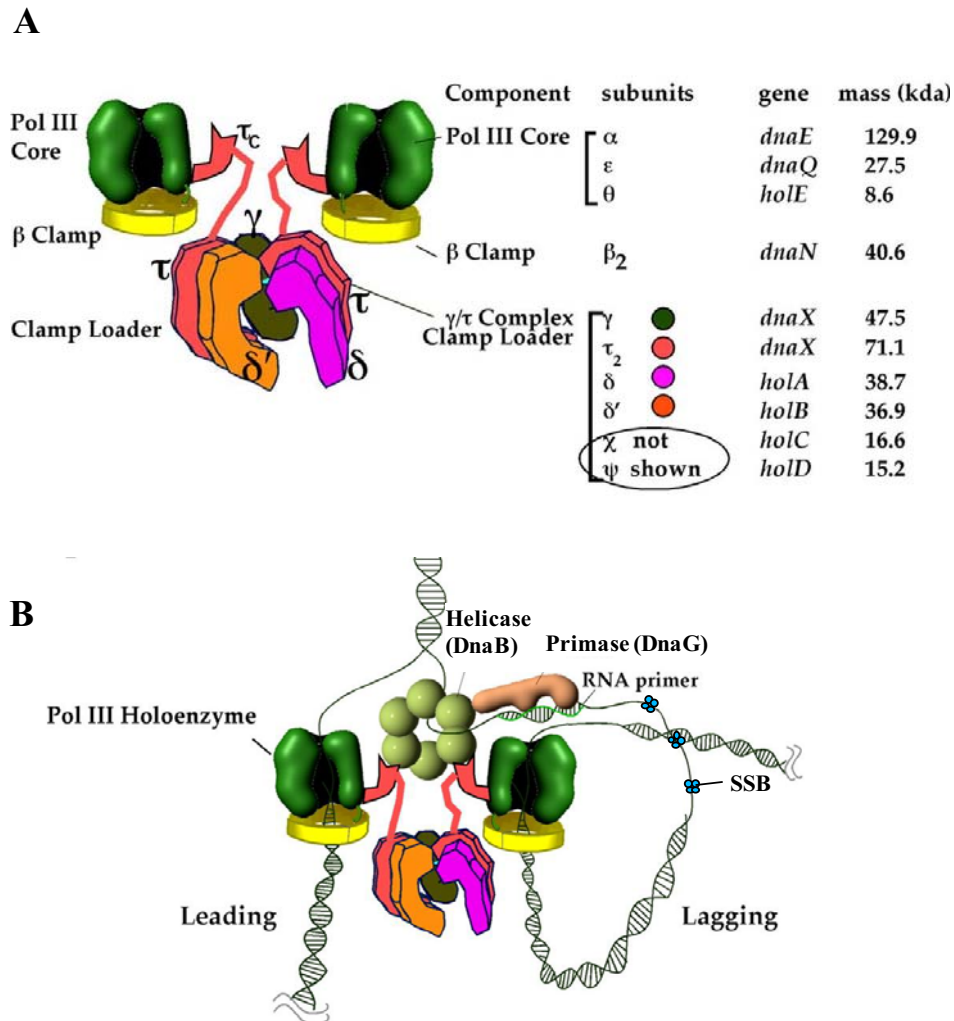
### **1.4.1. ADN polimerasa III: la subunitat $\theta$**

En aquest capítol s'exposen les principals característiques de la subunitat  $\theta$  de l'ADN polimerasa III d'*E. coli*, ja que el treball presentat la relaciona estructural i funcionalment amb la família de proteïnes associades al nucleòide Hha-YmoA.

#### **1.4.1.1. Característiques generals de la subunitat $\theta$ de l'ADN polimerasa III i del replisoma d'*E. coli***

*E. coli* conté cinc complexos d'ADN polimerasa diferents. L'encarregada de replicar el cromosoma és l'ADN polimerasa III, conjuntament amb l'ADN polimerasa I que allarga la cadena retardada de l'ADN. Les ADN polimerases II, IV i V tenen un paper en la reparació.

L'holoenzim de l'ADN polimerasa III (HE) està constituït per un complex dimèric de 17 subunitats, 10 de les quals són diferents (Fig. 1.18A). Cada monòmer d'aquest complex conté un nucli format per tres proteïnes:  $\alpha$ - $\epsilon$ - $\theta$  unides estructuralment en aquest ordre (Studwell-Vaughan i O'Donnell, 1993). Els dos nuclis estan connectats per un dímer de la subunitat  $\tau$ , establint així la disposició bàsica d'una polimerasa dimèrica que és capaç de replicar simultàniament les cadenes líder i retardada. A més, cada HE conté, per cada nucli, una pinça  $\beta$  ( $\beta_2$ ) encarregada de lligar la polimerasa a l'ADN per tal d'assegurar una alta processivitat, i un complex DnaX ( $\tau_2\gamma\delta\delta'\chi\psi$ ) responsable de la unió i alliberament de l'ADN de la pinça  $\beta$ . A la Fig. 18A es mostren tots els components de l'holoenzim de l'ADN polimerasa III, les subunitats corresponents, els gens que les codifiquen i el seu pes molecular.



**Fig. 1.18.** Estructura de l'holoenzim de l'ADN polimerasa III i del replisoma. A. Representació gràfica dels components que formen l'holoenzim de l'ADN polimerasa III d'*E. coli*. B. Estructura del replisoma. Extret de O'Donnell, 2006.

El conjunt de proteïnes encarregades de la replicació del cromosoma bacterià s'engloben dins del concepte de replisoma. El replisoma d'*E. coli* (Fig. 1.18B) està format per l'holoenzim ADN polimerasa III, una helicasa (DnaB), una primasa (DnaG) i la proteïna d'unió a les cadenes simples (SSB). L'helicasa DnaB s'uneix a la cadena retardada i descargola el dúplex d'ADN per davant de la forqueta de replicació. A més, aquesta helicasa també activa l'ARN primasa DnaG que sintetitza una cadena curta d'ARN complementària a la cadena retardada. La proteïna SSB manté separades les dues cadenes. Per últim, el component més important del replisoma és l'holoenzim ADN polimerasa III, ja que és l'encarregat d'unir els desoxiribonucleòtids entre ells per formar les dues noves cadenes d'ADN.

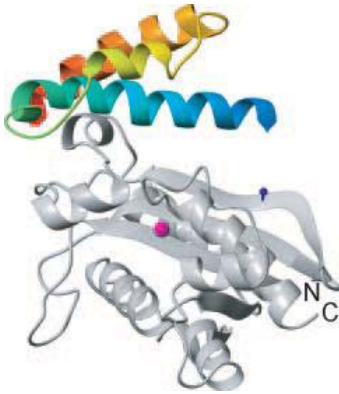


Les funcions de les tres subunitats que constitueixen el nucli catalític de cada dímer de l'holoenzim de l'ADN polimerasa III en *E. coli* es descriuen a continuació:

- $\alpha$ : És la subunitat que té la capacitat de duplicar l'ADN (activitat ADN polimerasa). Té un pes molecular de 129,9 kDa. És el producte del gen *dnaE*.
- $\epsilon$ : És la responsable de corregir els errors que comet l'ADN polimerasa (activitat 3'->5' exonucleasa). Té un pes molecular de 27,5 kDa. És el producte del gen *dnaQ*.
- $\theta$ : És una subunitat de baix pes molecular (8,6 kDa) que està codificada pel gen *holE*. Encara no s'ha adjudicat cap funció concreta a la subunitat  $\theta$  tot i que se sap que es troba unida a  $\epsilon$  incrementant la seva estabilitat (Taft-Benz i Schaaper, 2004).

### 1.4.1.2. Estructura de la subunitat $\theta$ de l'ADN polimerasa III

L'estructura terciària de la subunitat  $\theta$  de l'ADN polimerasa III va ser resolta per primera vegada l'any 2000 per tècniques de ressonància magnètica nuclear (RMN) (Keniry *et al.*, 2000). Més endavant es va resoldre l'estructura de  $\theta$  per RMN en un tampó 60/40 (vol/vol) aigua-metanol obtenint d'aquesta manera més dades que permetien una estructura més lliure (Mueller *et al.*, 2005). Donat que en el nucli enzimàtic de l'holoenzim de l'ADN polimerasa III les subunitats  $\theta$  i  $\epsilon$  es troben íntimament unides, l'última estructura de  $\theta$  correspon a l'estructura del complex  $\theta$ - $\epsilon$  donant així una idea més real de les estructures tridimensionals de les dues subunitats presents al nucli de l'ADN polimerasa III (Keniry *et al.*, 2006). L'estructura de  $\theta$  consisteix en tres dominis  $\alpha$ -hèlix (Fig. 1.19). Quan està unida a  $\epsilon$ , el domini N-terminal de l'hèlix 1 de  $\theta$  (Fig. 1.19, en blau) es disposa de manera paral·lela a una de les làmines  $\beta$  d' $\epsilon$ . La interfície entre  $\theta$  i  $\epsilon$  és gran, plana i hidrofòbica.



**Fig. 1.19.** Estructura tridimensional del complex format per les subunitats  $\theta$ - $\epsilon$  de l'holoenzim de l'ADN polimerasa III d'*E. coli*. Els dominis N i C-terminal de  $\theta$  (part superior en colors) s'indiquen en blau i taronja, respectivament. Els dominis N i C-terminal d' $\epsilon$  (en gris) estan marcats. Adaptat de Keniry *et al.*, 2006.

#### 1.4.1.3. Funció de la subunitat $\theta$ de l'ADN polimerasa III

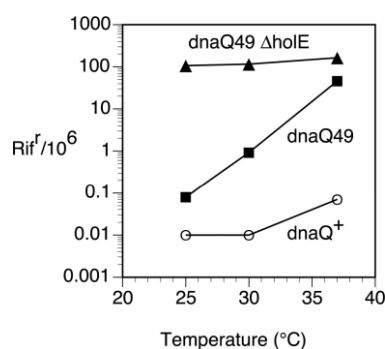
La funció de la subunitat  $\theta$  del nucli de l'ADN polimerasa III, tot i ser objecte d'estudi per diversos grups de recerca, no està completament definida.

Slater *et al.* van construir el primer mutant deficient en  $\theta$  ( $\Delta holE$ ) en *E. coli*. La manca de  $\theta$  va resultar en cèl·lules viables, la qual cosa indicava que  $\theta$  no era indispensable pel correcte funcionament del nucli de l'ADN polimerasa III (Slater *et al.*, 1994). Tot i això, es va detectar un increment en l'activitat exonucleasa d' $\epsilon$  quan aquesta estava unida a  $\theta$ , suggerint un possible rol de  $\theta$  en la fidelitat de la replicació (Studwell-Vaughan i O'Donnell, 1993).

La unió de  $\theta$  amb la subunitat  $\epsilon$  i la seva relació funcional van ser estudiades posteriorment amb mutants en  $\epsilon$  ( $\Delta dnaQ$ ) i en  $\theta$  ( $\Delta holE$ ) (Slater *et al.*, 1994). Donat que  $\epsilon$  és una proteïna essencial, el mutant en el gen *dnaQ* no és viable. Per aquest motiu, es va treballar amb al·lels recessius termo-sensibles com *dnaQ49* (Horiuchi *et al.*, 1978). Els resultats obtinguts van demostrar que així com la manca d' $\epsilon$  dóna lloc a defectes en el creixement, inducció de la resposta SOS i augment en la taxa de mutacions espontànies, la pèrdua de  $\theta$  no causa cap d'aquets efectes (Slater *et al.*, 1994). No obstant, en aquest mateix estudi indiquen la possibilitat que  $\theta$  requereixi estar unida a  $\epsilon$  per exercir la seva funció. Per tant, suggereixen que el mutant *dnaQ* podria estar també mancat de les funcions de  $\theta$ .

Tot i que anteriorment ja s'havia determinat la freqüència d'aparició de mutants de la soca mutant *holE* sense veure efectes significatius (Slater *et al.*, 1994), Taft-Benz i Schaaper van tornar a analitzar aquest fenotip utilitzant, en aquest cas, soques defectives en la reparació (*mutL*). Els resultats obtinguts en l'assaig de freqüència d'aparició de

mutants en funció de la temperatura, van evidenciar un increment tant en la substitució de bases com en la freqüència de mutants amb un desplaçament de la pauta de lectura en el mutant *dnaQ49* a elevada temperatura (37°C) (Taft-Benz i Schaaper, 2004). A més, els estudis amb el doble mutant *dnaQ49 holE* van permetre detectar un paper de la subunitat  $\theta$  en l'estabilització de l'al·lel *dnaQ49* dependent de la temperatura: a baixes temperatures (25°C), la soca *dnaQ49* mostra un modest fenotip mutador, però en canvi, la soca doble mutant *dnaQ49 holE*, a aquesta mateixa temperatura, mostra una activitat mutadora elevada (1000 vegades més que en el mutant senzill *dnaQ49*) (Taft-Benz i Schaaper, 2004) (Fig. 1.20).

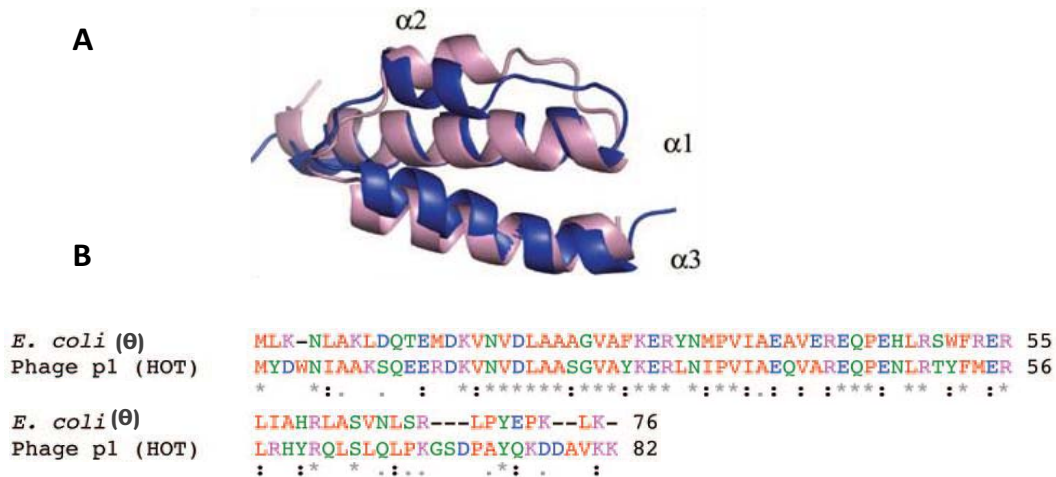


**Fig. 1.20.** Efecte de la mutació *holE* sobre la soca mutant *dnaQ* (al·lel *dnaQ49*) en la freqüència d'aparició de mutants resistents a rifampicina en funció de la temperatura. Extret de Taft-Benz i Schaaper, 2004.

Per altra banda, alguns autors han fet notar que  $\theta$  es troba majoritàriament en organismes amb una activitat correctora 3' present en una subunitat separada (a diferència de les que formen part del polipèptid de la polimerasa). Aquest fet suggereix que  $\theta$  podria ser només necessària quan la subunitat  $\epsilon$  està lliure (Taft-Benz i Schaaper, 2004; Chikova i Schaaper, 2005). Foster i Marinus van estudiar l'estabilitat d' $\epsilon$  en mutants en les proteïnes de xoc de calor ("heat shock proteins") DnaK, DnaJ i GrpE. En aquests mutants, l'estabilitat d' $\epsilon$  es veu molt reduïda, suggerint que la funció xaperona d'aquestes proteïnes és important pel manteniment de la correcta conformació d' $\epsilon$  (Foster i Marinus, 1992). Un estudi d'interactòmica va detectar la interacció de la proteïna DnaK amb la subunitat  $\theta$  (Arifuzzaman *et al.*, 2006). Aquest resultat recolza el paper de  $\theta$  com a estabilitzador de la subunitat  $\epsilon$  de l'ADN polimerasa III.

#### 1.4.1.4. Hot, el paràleg fàgic de $\theta$

La seqüenciació el genoma del bacteriòfag P1 va revelar que codifica per un homòleg de la subunitat  $\theta$  de l'ADN polimerasa III, anomenat Hot (“homolog of theta”) el qual mostra un 47% d'identitat i un 61% de similitud amb  $\theta$  (Lobočka *et al.*, 2004; Chikova i Schaaper, 2005) (Fig. 1.21).



**Fig. 1.21.** Alineaments de l'estructura de la subunitat  $\theta$  de l'ADN polimerasa III i de l'homòleg Hot del profag P1. A. Estructura tridimensional de la proteïna  $\theta$  (en blau) alineada amb HOT (en rosa). B. Alineament de les seqüències d'aminoàcids de  $\theta$  d'*E. coli* i Hot del fag P1. Els asteriscs indiquen identitat, els dos punts forta similitud i el punt similitud. Adaptat de Mueller, G.A. 2005.

El bacteriòfag P1 depèn de la maquinària de replicació de l'hoste i no codifica cap altre component de l'ADN polimerasa III. Les úniques altres proteïnes relacionades amb la replicació que el fag P1 codifica són una ADN helicasa (*ban*) i una proteïna d'unió a cadenes senzilla (*ssb*) (Lemonnier *et al.*, 2003; Lobočka *et al.*, 2004).

Els estudis genètics duts a terme per Chikova i Schaaper van demostrar que Hot pot compensar el fenotip mutador del doble mutant *dnaQ49 hole* a baixes temperatures (efecte “antimutador” de Hot) (Chikova i Schaaper, 2005). En aquets estudis es van construir soques d'*E. coli dnaQ49* i *dnaQ49 hole* a les que es va reemplaçar el gen *hole* per l'homòleg *hot*. Es va calcular la freqüència de mutació i es va observar que la presència de Hot en el mutant *dnaQ49 hole* complementava l'efecte de la mutació *hole* descrita anteriorment (Taft-Benz i Schaaper, 2004). Sorprenentment, el mateix grup d'investigadors van descriure que encara que Hot pot substituir a  $\theta$  en mutants *dnaQ49 hole* (efecte “antimutador”), també és capaç de causar un augment en la freqüència de

mutació en diferents soques d'*E. coli* (efecte “mutador”). Els experiments amb proteïnes quimèriques que contenen diferents dominis de  $\theta$  i Hot van demostrar que tant les regions N- com C-terminal eren importants per estabilitzar la subunitat  $\epsilon$ . En canvi, únicament la regió N-terminal de Hot, a través de la qual es produeix la interacció amb  $\epsilon$ , era responsable de l'efecte “mutador”. Això indica la importància de la interacció entre  $\theta$  i  $\epsilon$  (o Hot- $\epsilon$ ) pel funcionament òptim de l'activitat correctora (Chikova i Schaaper, 2006).

Igual que en el cas del gen *holE* d'*E. coli*, el gen *hot* no és essencial ni per l'establiment i manteniment del profag ni pel desenvolupament lític (Chikova i Schaaper, 2007).

En base a l'estructura del promotor, *hot* s'havia classificat com a un gen tardà, la qual cosa no tenia sentit amb la presumible funció en la replicació. Posteriorment però, Chikova i Schaaper van demostrar que l'expressió de *hot* no es limitava als estadis tardans sinó que aquesta era activa també durant la fase lisogènica i els estadis primerencs de la inducció lítica (Chikova i Schaaper, 2007).

S'ha formulat la hipòtesi que la funció de Hot en el genoma del bacteriòfag P1 és segrestar la subunitat  $\epsilon$  present i assegurar així la disponibilitat de l'holoenzim de l'ADN polimerasa III per poder dur a terme la replicació (Chikova i Schaaper, 2005), ja que el nombre de molècules d'aquest enzim a la cèl·lula és limitat.

### **1.4.2. La proteïna YmgB**

Pel que fa a YmgB, a l'inici d'aquest treball ja trobem descrita a la literatura la relació estructural entre aquesta proteïna i la proteïna associada al nucleòide Hha (Lee *et al.*, 2007b). Aquests resultats suggerien una relació funcional entre ambdues proteïnes. Un dels objectius del present treball és estudiar el possible paper de la proteïna YmgB com a reguladora de l'expressió gènica en col·laboració amb les proteïnes de la família Hha-YmoA.

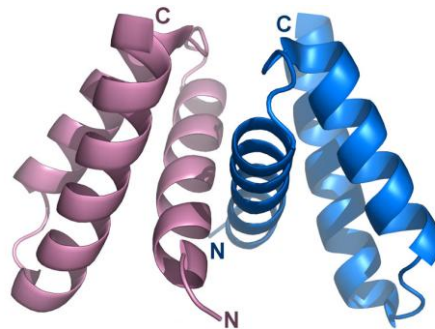
#### **1.4.2.1. Característiques generals de la proteïna YmgB**

El gen que codifica per la proteïna YmgB es troba localitzat dins de l'operó *ymgABC* d'*E. coli*. Aquest operó va ser identificat per estudis transcriptòmics degut al seu paper en el desenvolupament i estabilitat dels biofilms (Domka *et al.*, 2007). Estudis posteriors van demostrar que, a més de reprimir la formació de biofilm, YmgB també inhibeix la motilitat cel·lular i protegeix la cèl·lula de l'àcid i de l'estrès oxidatiu. Degut

a la importància del paper d'YmgB pel que fa a la resistència a l'àcid, Lee *et al.* van reanomenar-la com a AriR (“regulator of acid resistance influenced by indole”) (Lee *et al.*, 2007b). Tot i això, en el present estudi ens referirem a aquesta proteïna com a YmgB.

#### 1.4.2.2. Estructura de la proteïna YmgB

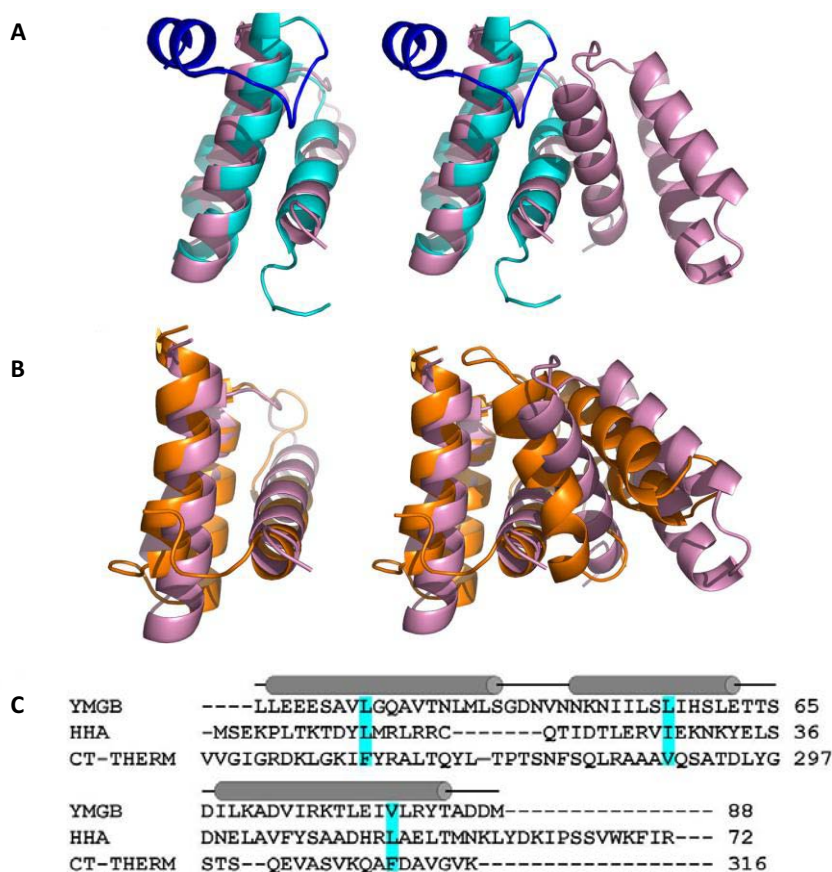
L'estructura d'YmgB va ser resolta per cristal·lografia de raigs X (Lee *et al.*, 2007b). Aquets estudis van permetre determinar que YmgB forma un dímer en solució (Fig. 1.22). Cada subunitat d'aquest dímer consisteix en tres  $\alpha$ -hèlixs:  $\alpha 1$  (residus 27 a 44),  $\alpha 2$  (residus 50 a 62) i  $\alpha 3$  (residus 67 a 84). La regió de contacte per la que té lloc la dimerització està situada predominantment en l'hèlix  $\alpha 1$ .



**Fig. 1.22.** Estructura tridimensional del dímer d'YmgB. Adaptat de Lee *et al.*, 2007b.

El domini C-terminal d'YmgB és molt estable. En canvi, el domini N-terminal és sensible a proteòlisi, la qual cosa indica que és també més flexible.

L'alineament de l'estructura tridimensional d'YmgB amb altres proteïnes va mostrar un elevat grau de similitud amb la proteïna associada al nucleòide Hha i amb el domini C-terminal de la termolisina, una metal·loproteasa aïllada de *Bacillus thermoproteolyticus* àmpliament estudiada pel que fa a la seva estructura i estabilitat (Fig. 2.23).



**Fig. 1.23.** Superposició de l'estructura tridimensional d'YmgB (en rosa) amb Hha (en blau) (A) i amb el domini C-terminal de la termolisina (CT-TERM) (en taronja) (B). A l'esquerra es mostra la superposició del monòmer d'YmgB i a la dreta la del dímer. (C) alineament pel que fa a la seqüència d'aminoàcids d'YmgB, Hha i CT-TERM. Els residus ressaltats en blau són similars. Extret de Lee *et al.*, 2007b.

Tot i l'elevada similitud estructural, el grau d'identitat entre YmgB i la proteïna Hha i el domini C-terminal de la termolisina pel que fa a la seqüència d'aminoàcids és molt baix, d'un 5% i un 7% respectivament (Fig. 1.23C).

Una diferència important entre YmgB i Hha és que la primera forma dímers en solució i la segona no. A més, l'hèlix  $\alpha 1$  d'YmgB dona dues voltes més que la d'Hha la qual té una quarta hèlix ( $\alpha 4$ ) inexistent a YmgB. Tot i això, són les hèlixs  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  i  $\alpha 3$  d'Hha les que se sobreposen amb YmgB. Precisament, aquestes tres hèlixs d'Hha constitueixen el domini d'interacció amb H-NS.

Els estudis d'interacció amb l'ADN van demostrar que YmgB, igual que Hha, s'uneix a l'ADN *in vitro* en seqüències d'ADN no-específiques (Lee *et al.*, 2007b). Aquest fet

suggereix que probablement es tracta d'una unió a l'ADN similar a la descrita pel complex Hha-H-NS.

#### 1.4.2.3. Funcions de la proteïna YmgB

S'han descrit diferents rols per a la proteïna YmgB referents (i) a la formació de biofilms, (ii) la motilitat cel·lular, (iii) la resistència a l'àcid i (iv) l'estrès oxidatiu.

- Regulació de la formació de biofilm

Diversos estudis transcriptòmics amb microarrays han identificat a *ymgB* com a un dels gens alterats en resposta a la formació de biofilm (Ren *et al.*, 2004; Herzberg *et al.*, 2006; Domka *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007a). A més, l'expressió d'*ymgB* en les cèl·lules de biofilm està influenciada per molècules de senyalització cel·lular com l'AI-2 (autoinductor-2) i l'indol (Lombardia *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007a). Els estudis fenotípics de formació de biofilm en medi ric suplementat amb glucosa en soques mutants *ymgB* van corroborar els resultats obtinguts a l'anàlisi transcriptòmica: la deleció d'*ymgB* incrementa la formació de biofilm quatre cops, respecte a la soca salvatge. Aquest increment es veu complementat per la sobreexpressió d'*ymgB* (Lee *et al.*, 2007b).

Per l'estudi del mecanisme a través del qual YmgB inhibeix la formació de biofilm es va dur a terme un assaig amb microarrays d'ADN enriquit amb níquel. Per aquest assaig es va utilitzar la proteïna YmgB amb una cua d'histidines i ADN de cèl·lules de biofilm del mutant *ymgB* (el qual produeix quatre vegades més biofilm que la soca salvatge). YmgB va resultar unir-se a gens que codifiquen per proteïnes implicades en la formació de biofilm (*bcsA* i *rpsV*), al gen que codifica pel regulador global CRP, a gens implicats en el catabolisme de l'AI-2 (*lsrF*) i a gens relacionats amb la divisió cel·lular (*yhjQ*), entre altres. Per tant, aquests resultats indiquen que YmgB és capaç d'unir-se a l'ADN i suggereixen que podria regular l'expressió gènica de manera similar a Hha (Lee *et al.*, 2007b).

Per altra banda, estudis transcriptòmics dissenyats per identificar gens regulats per la temperatura (23°C) en *E. coli* K12, demostren que els gens implicats en la formació de biofilms s'expressen més a 23°C que a 37°C. En aquests estudis detecten el gen *ymgB* com a un dels gens que es troben induïts a baixa temperatura. Aquesta inducció té lloc tant en una soca salvatge com als mutants *rpoS* i *dsrA*, suggerint una regulació alternativa a RpoS davant l'estrès produït per les baixes temperatures. Per tant, YmgB



podria estar implicada en un mecanisme de termoregulació alternatiu a la resposta general a l'estrès (White-Ziegler *et al.*, 2008).

Una altre estudi referent al mecanisme a través del qual YmgB redueix la formació de biofilm va evidenciar que la sobreexpressió d'YmgB a baixes temperatures és capaç de promoure la síntesi d'exopolisacàrid i d'àcid colànic (component de la matriu del biofilm) i de reduir l'expressió dels gens que codifiquen per les fimbries tipus curli (Tschowri *et al.*, 2009). A més, aquestes funcions regulades per YmgB estan sota control, directe o indirecte, del sistema de dos components RcsC/RcsD/RcsB, el qual està implicat en la iniciació i maduració del biofilm (Majdalani i Gottesman, 2005; Beloin *et al.*, 2008).

Per últim, els estudis amb l'anàleg de l'uracil 5-fluorouracil (5-FU) van demostrar un efecte repressor d'aquest fàrmac, utilitzat actualment en la teràpia contra el càncer, en la formació de biofilm en *E. coli*. Aquest efecte es veu anul·lat en una soca mutant *ymgB*. Aquest resultat indica que la proteïna diana a través de la qual el 5-FU reprimeix la formació de biofilm és YmgB (Attila *et al.*, 2009).

- Paper en la motilitat bacteriana

La formació de biofilm està relacionada amb la motilitat ja que aquesta última és important tant per la interacció inicial de les cèl·lules a la superfície on es formarà el biofilm (els pili tipus I són imprescindibles per l'adhesió a la superfície), com pel moviment dins de la matriu del biofilm (Pratt i Kolter, 1998; Herzberg *et al.*, 2006). En consonància amb això, a l'assaig de motilitat en placa el mutant *ymgB* mostra una major motilitat respecte a la soca salvatge (Lee *et al.*, 2007b).

- Control de la resistència a l'àcid

Una altra funció important de la proteïna YmgB és el seu paper pel que fa a la resistència a l'àcid. A l'assaig de resistència a l'àcid (xoc àcid a pH 2,5) el mutant *ymgB* mostra una reducció de la supervivència de 40 vegades respecte a la soca salvatge. Tot i això, aquesta reducció no es veu complementada per la sobreexpressió d'*ymgB*, probablement perquè en la sobreexpressió no s'assoleixen els nivells fisiològics d'YmgB (Lee *et al.*, 2007b).

YmgB exerceix una regulació inversa entre els components relacionats amb la resistència a l'àcid i la formació de biofilm: mentre que té un efecte repressor de la

formació de biofilm, proporciona una major resistència a l'àcid a través de l'activació dels gens *gadABC* i *hdeABD*. D'acord amb això, a l'anàlisi transcriptòmica de cèl·lules de biofilms apareixen reprimits els gens relacionats amb la resistència a l'àcid *gadABC* i *hdeABD* (Lee *et al.*, 2007a). Aquesta regulació creuada té lloc, en part, a través de les molècules de senyalització cel·lular AI-2 i indol que incrementen la formació de biofilm i reprimeixen a la vegada els gens *gadABC* i *hdeABD*. Diversos estudis transcriptòmics demostren que l'operó *yngABC* està regulat de manera gairebé idèntica a aquests gens de resistència a l'àcid (Ren *et al.*, 2004; Lombardia *et al.*, 2006; Domka *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007a; Zhang *et al.*, 2007). De fet, l'addició d'indol a cultius sotmesos a pH àcid provoca una disminució de la supervivència en una soca salvatge que no s'observa en soques mutants *yngB*. Aquest resultat demostra que l'efecte de l'indol en la resistència a l'àcid és a través de la repressió d'*yngB* (Lee *et al.*, 2007b).

Finalment, i pel que fa a la comparació amb Hha, la regulació de la resistència a l'àcid exercida per YngB i per Hha no està dirigida en la mateixa direcció: mentre els gens *gadBC* i *hdeAB* es veuen induïts 4-5 vegades en el mutant *hha*, aquests estan reprimits 2-3 vegades en la deleció *yngB* (resultats no publicats de Lee *et al.*).

- Protecció davant l'estrès oxidatiu

El perfil de gens afectats per l'addició de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a *E. coli* va ser descrit per Zhang *et al.* a través d'un estudi transcripcional amb microarrays d'ADN. En aquest estudi es va detectar una inducció de 20 vegades del gen *yngB* quan la cèl·lula era sotmesa a estrès oxidatiu (Zheng *et al.*, 2001). Estudis posteriors van evidenciar aquest fenotip mitjançant l'assaig de supervivència a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 mM) en soques mutants *yngB* les quals van indicar un increment en la sensibilitat a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> d'un 537% respecte a la soca salvatge. A més, aquest fenotip es va veure completament complementat per la sobreexpressió d'*yngB* (Lee *et al.*, 2007b).

## 1.5. Objectius

L'objectiu central d'aquest treball fou aprofundir en la caracterització de la paràloga de la proteïna associada al nucleoide Hha: YdgT i, addicionalment estudiar les proteïnes  $\theta$  i YmgB per determinar la seva possible relació funcional amb Hha.

L'estudi de noves funcions, independents de les relacionades amb Hha, de la proteïna YdgT es va dur a terme principalment mitjançant l'anàlisi transcriptòmica dels mutants *hha*, *ydgT* i del doble mutant *hha ydgT*. Aquesta anàlisi ens va permetre examinar el conjunt de gens alterats en les tres soques analitzades i determinar diferències entre elles, revelant així noves dianes en la regulació d'YdgT.

Durant l'estudi de les propietats hemolítiques del doble mutant *hha ydgT* va sorgir un fet inesperat que no entrava dins els objectius inicials d'aquest treball però que, per la seva rellevància, es va incloure posteriorment. Es tracta de l'aparició de clons no hemolítics de mutants *hha ydgT* portadors del plasmidi multicòpia hemolític pANN202-312R en presència de l'antibiòtic kanamicina. L'anàlisi de l'origen d'aquests clons no hemolítics es presenta a l'apartat de Resultats 3.2 del present treball. Aquest estudi fou publicat a la revista PLoS one el passat desembre de 2011 (veure annex).

Pel que fa referència a la subunitat  $\theta$  de l'ADN polimerasa III i a la proteïna YmgB, l'objectiu fou relacionar-les estructural i funcionalment amb la família de proteïnes associades al nucleoide Hha. Per això, es va decidir dur a terme diversos estudis genètics que permetessin relacionar-les amb Hha. Aquests estudis es van realitzar tant en soques mutants en els gens que codifiquen per la subunitat  $\theta$  de l'ADN polimerasa III i per la proteïna YmgB (en combinació amb mutacions en els gens *hha*, *ydgT* i *hms*), com en soques que les sobreexpressaven. Addicionalment, en el cas de la subunitat  $\theta$  de l'ADN polimerasa III, es va realitzar una anàlisi transcriptòmica amb la soca mutant en el gen que la codifica (*holE*) per tal de conèixer el conjunt de gens hipotèticament regulats per aquesta proteïna i poder comparar-lo amb el d'Hha i d'YdgT.

## **2. Materials i mètodes**



## 2.1. Soques bacterianes, bacteriòfags i plasmidis

Les soques utilitzades en aquest treball pertanyen a l'espècie *Escherichia coli*, membre de la família *Enterobacteriaceae*. Es tracta de bacils Gram-negatius i anaerobis facultatius. El genotip de les diverses soques utilitzades es detalla a la taula 2.1.

**Taula 2.1.** Soques d'*Escherichia coli* utilitzades en aquest treball.

Soca	Genotip rellevant	Referència/origen
<b>5K</b>	F <sup>-</sup> , <i>hdsR</i> , <i>hdsM</i> , <i>thr</i> , <i>thi</i> , <i>leu</i> , <i>lacZ</i>	(Juárez i Goebel, 1984)
<b>BSN26Y</b>	BSN26 $\Delta$ <i>ydgT</i>	(Paytubi <i>et al.</i> , 2004)
<b>BSN26H</b>	BSN26 $\Delta$ <i>hha</i>	(Nieto <i>et al.</i> , 2000)
<b>MG1655</b>	F- $\lambda$ - <i>ilvG</i> - <i>rfb</i> -50 <i>rph</i> -1	(Blattner <i>et al.</i> , 1997)
<b>MG1655H</b>	MG1655 $\Delta$ <i>hha</i>	Aquest treball
<b>MG1655Y</b>	MG1655 $\Delta$ <i>ydgT</i>	Aquest treball
<b>MG1655HY</b>	MG1655 $\Delta$ <i>hha</i> $\Delta$ <i>ydgT</i>	Aquest treball
<b>MG1655HY<math>\Delta</math><i>recA</i></b>	MG1655 $\Delta$ <i>hha</i> $\Delta$ <i>ydgT</i> $\Delta$ <i>recA</i>	Aquest treball
<b>MG1655HY<math>\Delta</math><i>rpoS</i></b>	MG1655 $\Delta$ <i>hha</i> $\Delta$ <i>ydgT</i> $\Delta$ <i>rpoS</i>	Aquest treball
<b>RH90</b>	MC4100, <i>rpoS</i> 359:: <i>Tn10</i> , TcR	(Hengge-Aronis i Fischer, 1992)
<b>BL21 (DE3)</b>	<i>pLysE</i> ; <i>hsdS</i> , <i>gal</i> , <i>lclts857</i> , <i>ind1</i> , <i>Sam7</i> , <i>Nin5</i> , <i>lacUV5-T7gene1</i>	(Studier i Moffatt, 1986)
<b>BL21 (DE3)<math>\Delta</math><i>hns</i></b>	BL21 (DE3) <i>trp</i> :: <i>Tn10</i> $\Delta$ <i>hns</i>	(Paytubi <i>et al.</i> , 2004)
<b>MG1655E</b>	MG1655 $\Delta$ <i>holE</i>	Aquest treball
<b>MG1655YE</b>	MG1655 $\Delta$ <i>ydgT</i> $\Delta$ <i>holE</i>	Aquest treball
<b>MG1655HE</b>	MG1655 $\Delta$ <i>hha</i> $\Delta$ <i>holE</i>	Aquest treball
<b>MG1655HYE</b>	MG1655 $\Delta$ <i>hha</i> $\Delta$ <i>ydgT</i> $\Delta$ <i>holE</i>	Aquest treball
<b>MG1655M</b>	MG1655 $\Delta$ <i>yngB</i>	Aquest treball
<b>MG1655YM</b>	MG1655 $\Delta$ <i>ydgT</i> $\Delta$ <i>yngB</i>	Aquest treball
<b>MG1655MH</b>	MG1655 $\Delta$ <i>yngB</i> $\Delta$ <i>hha</i>	Aquest treball
<b>MG1655YMH</b>	MG1655 $\Delta$ <i>ydgT</i> $\Delta$ <i>yngB</i> $\Delta$ <i>hha</i>	Aquest treball

<b>MG1655hns</b>	MG1655 $\Delta hns$	Marta Gibert
<b>BW25113 <math>\Delta ymgB</math></b>	K-12 $\Delta ymgB::Km^R$	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
<b>NR9695</b>	<i>dnaQ49 zae-502::Tn10</i>	(Schaaper i Cornacchio, 1992)
<b><i>dnaQ holE</i></b>	NR9695 $\Delta holE$	Aquest treball
<b><i>dnaQ ydgT</i></b>	NR9695 $\Delta ydgT$	Aquest treball
<b><i>dnaQ holE ydgT</i></b>	NR9695 $\Delta holE \Delta ydgT$	Aquest treball
<b>AAG1</b>	MG1655 $\Delta lacZ$	(Aberg <i>et al.</i> , 2008)
<b>AAG1H</b>	AAG1 $\Delta hha$	Aquest treball
<b>AAG1Y</b>	AAG1 $\Delta ydgT$	Aquest treball
<b>AAG1HY</b>	AAG1 $\Delta hha \Delta ydgT$	Aquest treball
<b>AAG1M</b>	AAG1 $\Delta ymgB$	Aquest treball
<b>AAG1hns</b>	AAG1 $\Delta hns$	Aquest treball
<b>GM37</b>	MC4100 $\Phi$ ( <i>proU::lacZ</i> )hyb2( $\lambda plac$ Mu15)	(May <i>et al.</i> , 1986)
<b>AAG1<i>proU::lacZ</i></b>	AAG1 <i>proU::lacZ</i>	Aquest treball

---

A continuació es descriuen les característiques dels plasmidis (taula 2.2) utilitzats en aquest treball.

**Taula 2.2.** Plasmidis utilitzats en la realització d'aquest treball.

Plasmidi	Descripció	Referència
<b>pANN202-321R</b>	pACYC184+ <i>hlyR hlyCABD</i> , Cm <sup>r</sup>	(Godessart <i>et al.</i> , 1988)
<b>pANN202-321R'</b>	pANN202-321R $\Delta$ <i>hly</i>	Aquest treball
<b>pHly152</b>	<i>hlyR hlyCABD</i>	(Noegel <i>et al.</i> , 1981)
<b>pET15b</b>	<i>ori</i> <sub>pMB1</sub> , promoter T7, Ap <sup>r</sup>	Novagen
<b>pETHis-HOLE</b>	pET15b+ <i>hole</i> C-His-Tag en C-terminal, Ap <sup>r</sup>	Aquest treball
<b>pETHOLECHis</b>	pET15b+N- His-Tag <i>hole</i> , Ap <sup>r</sup>	Aquest treball
<b>pKD46</b>	Ap <sup>r</sup> , $\lambda$ Red recombinasa	(Datsenko i Wanner, 2000)
<b>pKD3</b>	<i>oriR<math>\gamma</math></i> ; Cm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	(Datsenko i Wanner, 2000)
<b>pCP20</b>	Cm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup> , recombinasa FLP	(Cherepanov i Wackernagel, 1995)
<b>pBR322</b>	<i>ori</i> <sub>pMB1</sub> ; Ap <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	(Bolivar <i>et al.</i> , 1977)
<b>pBRHOLE</b>	pBR322+ <i>hole</i> , Ap <sup>r</sup>	Aquest treball
<b>pET11a</b>	<i>Ori</i> <sub>pMB1</sub> , promoter T7, Ap <sup>r</sup>	Novagen
<b>pETHis-ymgB</b>	pET11a + <i>ymgB</i> , Ap <sup>r</sup>	Aquest treball
<b>pETH-NS</b>	pET3b+ <i>hns</i> , Ap <sup>r</sup>	(Pons <i>et al.</i> , 2004)
<b>pCAB18</b>	pACYC177, promoter p <sub>lac</sub> , Ap <sup>r</sup>	(Barembuch i Hengge, 2007)
<b>pymgB</b>	pCAB18+ <i>ymgB</i> , Ap <sup>r</sup>	(Tschowri <i>et al.</i> , 2009)
<b>pUBM22</b>	pBR322+ <i>hha</i> , Ap <sup>r</sup>	(Nieto <i>et al.</i> , 2000)
<b>pLG339-30</b>	<i>ori</i> <sub>pSC101</sub> , Km <sup>r</sup> i Tc <sup>r</sup>	(Stoker <i>et al.</i> , 1982)
<b>pLGbgl::lacZ</b>	pLG338-30+ <i>bgl::lacZ</i> , Ap <sup>r</sup>	(Forns Fradera, 2006)



pLG339 <b>bgl::lacZ</b>	pLG339-30+ <b>bgl::lacZ</b> , Km <sup>r</sup>	Aquest treball
pHly152:: <b>lacZ</b>	pHly152 + <b>hlyA::lacZ</b>	(Fernández-Vázquez, 2011)

En aquest treball es va utilitzar el bacteriòfag lític P1 *vir* (Miller, 1992) com a eina per a la transducció generalitzada.

## 2.2. Medis de cultiu i antibiòtics

### 2.2.1. Medis de cultiu

Els medis de cultiu líquids i sòlids que es van utilitzar pel creixement bacterià en aquest treball es detallen a continuació:

- **LB (Luria-Bertani)** (Sambrook *et al.*, 1989): medi de cultiu líquid utilitzat de manera habitual pel creixement bacterià. En alguns experiments s'ha modificat l'osmolaritat del medi canviant la concentració de NaCl. Si en condicions normals l'osmolaritat és de 170 mM (10 g/l), en determinades situacions aquesta s'ha augmentat a 60 g/l.

LB	
Composició	Concentració
Peptona tríptica de caseïna (Schärlau Microbiology)	10 g/l
Extracte de llevat (Schärlau Microbiology)	5 g/l
NaCl (Panreac)	10 g/l

- **LB agar**: medi de cultiu sòlid compost d'LB suplementat amb 15 g/l d'agar per bacteriologia. Aquest medi s'utilitzava habitualment pel creixement bacterià en placa.
- **LB agar-tou**: medi utilitzat en l'obtenció i titulació de lisats fàgics. La composició és la del medi LB suplementat amb 6 g/l d'agar per bacteriologia.
- **Agar-sang**: medi de cultiu sòlid format per LB agar al que se li afegeix un 5% (v/v) de sang desfibrinada estèril d'ovella (Oxoid) quan aquest ja ha estat prèviament esterilitzat amb l'autoclau. Aquest medi s'utilitzava per la detecció en placa d'activitat hemolítica de les soques estudiades.
- **SOB** (Hanahan *et al.*, 1991): medi de cultiu líquid utilitzat per al creixement bacterià en els experiments d'inactivació de gens cromosòmics per fragments de PCR (veure apartat 2.5.1).

SOB	
Composició	Concentració
Peptona tríptica de caseïna (Schärlau Microbiology)	20 g/l
Extracte de llevat (Schärlau Microbiology)	5 g/l
NaCl (Panreac)	0,58 g/l
KCl (Merck)	0,19 g/l
MgCl <sub>2</sub> + MgSO <sub>4</sub> *	20 mM

\*A partir d'una solució mare Mg<sup>2+</sup> 2M (MgCl<sub>2</sub> 1 M i MgSO<sub>4</sub> 1 M).

- **SOC** (Hanahan *et al.*, 1991): medi de cultiu líquid utilitzat en la inactivació de gens cromosòmics per fragments de PCR. S'utilitza com a medi de recuperació de les cèl·lules després de l'electroporació. Es tracta de medi SOB suplementat amb glucosa 20 mM.
- **Medi mínim A** (Miller, 1992): medi mínim utilitzat en la transducció de mutacions a la sota NR9695, amb alta capacitat per generar mutants espontanis.

Medi mínim A	
Composició	Concentració
Agar (Difco)	15 g/l
Sals (1X)	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck)	10,5 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck)	4,5 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Merck)	1 g/l
Citrat sòdic · 2H <sub>2</sub> O (Sigma)	0,5 g/l
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (Merck)	1 mM
Hidroclorur de tiamina (B12) (Sigma)	0,5%
Casaminoàcids (Difco)	50 µg/ml
Glucosa	0,4%

- **Medi TB agar**: medi de cultiu utilitzat en l'assaig de motilitat en placa.

Medi TB	
Component	Concentració
Triptona	1%
NaCl	0,5%
Agar (Difco)	0,25%

Tots els medis citats es van esterilitzar en l'autoclau, durant 15 minuts a una temperatura de 121°C.

### 2.2.2. Antibiòtics

Sempre que era necessari, els medis de cultiu citats a l'apartat anterior se suplementaven amb antibiòtics. Aquests s'afegien al medi estèril a partir de solucions concentrades preparades seguint les instruccions de la bibliografia (Sambrook *et al.*, 1989).

- **Ampicil·lina (Ap)** (Sal sòdica, Roche): es preparava una solució concentrada de 100 mg/ml en aigua destil·lada, s'esterilitzava per filtració i es guardava a -20°C. Les concentracions finals utilitzades eren de 25, 50 o 100 µg/ml, en funció del número de còpies del gen que codificaven per la resistència (cromosòmic o plasmídic de baix, mitjà o alt número de còpies).
- **Cloramfenicol (Cm)** (Fluka): es partia d'una solució concentrada de 100 mg/ml en etanol absolut (Merck) i es conservava a -20°C. Les concentracions finals de treball eren de 12,5 o 25 µg/ml per a resistències cromosòmiques i de 34 o 50 µg/ml segons el plasmidi que codificava per la resistència.
- **Kanamicina (Km)** (Sulfat àcid, Sigma): es preparava una solució mare de 50 mg/ml en aigua destil·lada, s'esterilitzava per filtració i es conservava a -20°C. La concentració final en el medi era de 25 o 50 µg/ml.
- **Tetraciclina (Tc)** (Hidroclorur, Fluka): es preparava una solució a una concentració final de 12,5 mg/ml en etanol al 50% (v/v), s'esterilitzava per filtració i es conservava a -20°C protegida de la llum. La concentració final en el medi va ser de 15 µg/ml.
- **Rifampicina (Rif)** (Fluka): es preparava una solució mare de 50 mg/ml en aigua destil·lada a la que s'afegia, gota a gota, NaOH 2N fins a la completa dissolució. S'esterilitzava per filtració i es guardava a -20°C. La concentració final en el medi ha era de 50 µg/ml (100 µg/ml en els assaigs d'aparició de mutants resistents a rifampicina).

## 2.3. Mètodes microbiològics

### 2.3.1. Esterilització

Els medis de cultiu, material de vidre i plàstic així com algunes solucions utilitzades en aquest treball, es van esterilitzar per calor humit i pressió en un autoclau durant 15 minuts a 121°C i 2 atmosferes.

En canvi, les solucions que no permetien ser esterilitzades per aquest mètode, es van esterilitzar per filtració a través de filtres estèrils de 0,22 µm de diàmetre de porus (Millipore®).

Per l'eliminació de RNases, quan era necessari, s'utilitzaven medis i solucions autoclavades durant 45 minuts o bé, en el cas del material no apte per a ser esterilitzat a l'autoclau, es netejava amb SDS 0,1% (p/v) o NaOH 1M.

### 2.3.2. Manteniment de microorganismes

Totes les soques utilitzades en aquest treball es van mantenir de dues maneres. En primer lloc, es tenien cultius en placa de cada una d'elles i s'anaven ressemblant en els seus corresponents medis sòlids periòdicament. Per altra banda, també es mantenien per congelació a -80°C, en glicerol al 20% (v/v).

Els bacteriòfags es mantenien a 4°C en forma de lisat fàgic en el mateix sobrenedant del cultiu del qual es van obtenir i amb unes gotes de cloroform per tal d'evitar contaminació bacteriana.

### 2.3.3. Inoculació i cultiu de microorganismes

La inoculació es realitzava a partir d'un cultiu crescut durant 18 hores fent una dilució 1:50 o 1:100 en un erlenmeyer que contenia medi líquid fresc (volum màxim d'1/5 de la seva capacitat) i temperat a la temperatura a la que el volíem fer créixer. Posteriorment, aquest medi inoculat s'incubava a la temperatura desitjada amb una agitació de 200 rpm (incubador-agitador orbital, Innova).

La mesura del creixement en medi líquid es realitzava segons dos procediments:

- Seguiment de la densitat òptica dels cultius a una longitud d'ona de 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) (Espectrofotòmetre model UV-mini 1240 Shimadzu).
- Recompte de viables en placa (o unitats formadores de colònies, ufc) mitjançant la sembra en placa de diferents dilucions del cultiu en solució Ringer (Scharlau).

## **2.4. Mètodes de transferència genètica**

### **2.4.1. Transformació bacteriana**

Per aconseguir la transformació de cèl·lules bacterianes amb ADN plasmídic o extern es van utilitzar dues metodologies diferents. Normalment, es va utilitzar el mètode del CaCl<sub>2</sub> fred, però en els casos en què l'eficiència de transformació era molt baixa com en la tècnica d'inactivació de gens cromosòmics utilitzant fragments de PCR, el mètode seguit va ser l'electroporació.

#### **2.4.1.1. Transformació de cèl·lules competents obtingudes mitjançant tractament amb CaCl<sub>2</sub>**

(Cohen *et al.*, 1972)

A partir d'un inòcul crescut tota la nit es realitzava una dilució 1:50 en medi LB fresc i s'incubava a 37°C i 200 rpm fins a assolir una DO<sub>600nm</sub> de 0,2-0,3. En aquest punt del creixement, el cultiu se centrifugava (3000 x g, 10 minuts, 4°C) i es ressuspenia en la meitat de volum de CaCl<sub>2</sub> 50 mM estèril i fred (4°C). Es repetia la centrifugació però aquest cop menys temps (3000 x g, 5 minuts, 4°C) i les cèl·lules es ressuspendien ara en 1/100 del volum inicial de CaCl<sub>2</sub> 50 mM fred. Les cèl·lules competents obtingudes per aquest procés s'incubaven en gel un mínim d'una hora i un màxim de 24 hores abans de ser transformades.

Alíquotes de 100 µl de cèl·lules competents es posaven en contacte amb un volum d'1 a 10 µl d'ADN plasmídic. La barreja s'incubava durant 30 minuts en gel i posteriorment se sotmetia a un xoc tèrmic de 45 segons a 42°C en un bany. A continuació, s'afegia a les cèl·lules 900 µl d'LB fresc i s'incubaven a 37°C durant 1 hora a 200 rpm per tal de permetre l'expressió dels marcadors fenotípics transmesos (expressió de les resistències a antibiòtics). La transformació se semblava en medi sòlid suplementat amb els marcadors selectius del plasmidi permetent així la selecció de les cèl·lules transformades.

#### **2.4.1.2. Electroporació**

(Dower *et al.*, 1988)

Aquesta tècnica permet la captació d'ADN gràcies a la permeabilització de les membranes provocada per una descàrrega elèctrica. L'eficàcia de transformació amb aquesta tècnica és més elevada que en el cas anterior, obtenint entre 10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup> transformants per µg d'ADN.

A partir d'un inòcul crescut tota la nit es realitzava una dilució 1:50 en medi fresc i s'incubava fins a assolir una  $DO_{600nm}$  de 0,5-0,8. Després de refredar en gel, el cultiu se centrifugava repetides vegades a 3000 x g, 5 minuts a 4°C i es ressuspensia successivament en 1; 0,5; 0,1 i finalment en 0,005 volums de glicerol 10% estèril i fred. D'aquesta manera, al rentar les sals, s'aconseguia disminuir la força iònica de la suspensió cel·lular. Tant les cèl·lules com les cubetes d'electroporació prèviament esterilitzades pe radiació ultraviolada es mantenien en gel en tot moment. Seguidament, es barrejaven 100 µl de cèl·lules obtingudes per aquest procés amb 1-5 µl d'una suspensió d'ADN i es transferia a cubetes de 2 mm de separació entre elèctrodes (BTX). Es va utilitzar l'electroporador 2510 (Eppendorf) aplicant un voltatge constant de 1.250 volts.

Un cop realitzada la descàrrega elèctrica s'afegia medi SOC suficient per a un volum final d'1 ml i s'incubava a 37°C durant una hora per tal de permetre l'expressió dels gens de resistència a antibiòtics. Les cèl·lules transformades se seleccionaven en medi sòlid suplementat amb els marcadors corresponents.

#### **2.4.2. Conjugació bacteriana**

En aquest treball es va utilitzar el mètode de conjugació bacteriana en medi sòlid. Aquest procediment va ser utilitzat per la transferència del plasmidi pHly152.

##### **2.4.2.1. Conjugació en medi sòlid**

Es van posar en contacte alíquotes de cultius en fase exponencial de la soca donadora 5K pHly152 (10 µl) i de la soca receptora (100 µl). La barreja es va sembrar en plaques d'LB que es van incubar a 37°C durant 16-18 hores per permetre el contacte entre cèl·lules. Un cop crescut, el cultiu confluent es recollia en 3 ml de medi LB amb l'ajuda d'una nansa de vidre. Amb la suspensió cel·lular obtinguda es va fer un banc de dilucions i es va sembrar en medi agar sang suplementat amb els antibiòtics adequats per a la selecció dels transconjugants.

#### **2.4.3. Transducció generalitzada amb el bacteriòfag P1vir**

(Miller, 1992)

El bacteriòfag P1vir és un derivat virulent del bacteriòfag P1 al qual li manca la capacitat de lisogenitzar les cèl·lules que infecta. Es tracta d'un fag que infecta *Escherichia coli* i es va utilitzar en aquest treball per introduir mutacions a les soques per recombinació homòloga.

#### **2.4.3.1. Obtenció de lisats de P1vir**

Per a l'obtenció de lisats de P1vir es barrejaven  $10^7$  partícules fàgiques procedents d'un lisat pre-existent amb 1 ml d'un cultiu en fase exponencial en medi LB suplementat amb  $\text{CaCl}_2$  5 mM de la soca donadora. A continuació, la barreja s'incubava 20 minuts a  $37^\circ\text{C}$  sense agitació per permetre la unió cèl·lula-fag. Passat aquest temps, s'afegien 2,5 ml d'LB agar-tou (suplementat amb  $\text{CaCl}_2$  2 mM i glucosa 0,1%), s'estenia sobre una placa d'LB agar ( $\text{CaCl}_2$  2 mM i glucosa 0,1%), es deixava solidificar uns minuts i finalment la placa s'incubava a  $37^\circ\text{C}$  sense invertir. Passades 18-24 hores, s'afegien 2 ml d'LB a la capa d'LB agar-tou, es recollien amb la nansa de vidre i s'introduïen en un tub de centrifuga juntament amb unes gotes de cloroform. S'agitava vigorosament i les restes cel·lulars i d'agar se separaven per centrifugació ( $12.000 \times g$ , 10 minuts). El sobrenedant obtingut, corresponent al lisat fàgic, es conservava a  $4^\circ\text{C}$  amb unes gotes de cloroform.

#### **2.4.3.2. Titulació dels lisats de P1vir**

Per tal de titular els lisats P1vir obtinguts segons es detalla en l'apartat anterior, es barrejaven alíquotes de 100  $\mu\text{l}$  d'un cultiu crescut durant tota la nit de la soca *E. coli* 5K en LB suplementat amb  $\text{CaCl}_2$  5 mM amb 100  $\mu\text{l}$  de diferents dilucions del lisat a titular. Després d'incubar la barreja a  $37^\circ\text{C}$  durant 10 minuts sense agitació, s'hi afegien 2,5 ml d'LB agar-tou suplementat amb  $\text{CaCl}_2$  2 mM i glucosa 0,1%, i es decantaven sobre una placa d'LB agar (amb  $\text{CaCl}_2$  2 mM i glucosa 0,1%). Les plaques s'incubaven a  $37^\circ\text{C}$  durant 18-24 h. La titulació del lisat es feia a partir del recompte del número de calbes de lisi.

#### **2.4.3.3. Transducció amb P1vir**

Les cèl·lules d'un cultiu de tota la nit de la soca receptora per ser transduïda se centrifugaven i ressuspenien en el mateix volum de tampó MC. Aquesta suspensió de cèl·lules es barrejava amb 100  $\mu\text{l}$  de diferents dilucions del lisat fàgic per tal de tenir diverses multiplicitats d'infecció (generalment 1:0,1; 1:1; 0,1:1). Després d'incubar la barreja durant 20 minuts a  $37^\circ\text{C}$  sense agitació, s'afegien 0,2 ml de tampó citrat 0,1 M per inhibir la readsorció del bacteriòfag. Finalment, la barreja de transducció se sembrava en plaques d'LB agar suplementades amb els marcadors necessaris per a la selecció de les cèl·lules transductants.

Tampó MC	
Composició	Concentració
MgSO <sub>4</sub>	0,1 M
CaCl <sub>2</sub>	5 mM

Tampó Citrat	
Composició	Concentració
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	0,1 M
Ajustar el pH a 5,5 amb NaOH i autoclavar	

## 2.5. Tècniques de mutagènesi bacteriana

### 2.5.1. Inactivació de gens cromosòmics utilitzant fragments de PCR

(Datsenko i Wanner, 2000)

Amb aquesta metodologia és possible reemplaçar una seqüència cromosòmica per un gen de resistència a un antibiòtic, generat per PCR utilitzant oligonucleòtids amb extensions homòlogues corresponents al gen cromosòmic a delecionar. Aquestes extensions permeten la recombinació, mitjançada per la recombinasa Red, en les regions flanquejants del gen. Després de la selecció de mutants, la resistència pot ser eliminada utilitzant un plasmidi auxiliar que expressa la recombinasa FLP, que actua en la repetició directa (FRT) adjacent al gen de la resistència.

#### 2.5.1.1. Generació del fragment de PCR

La resistència a antibiòtic (Cm) del plasmidi pKD3 es va amplificar utilitzant oligonucleòtids que en l'extrem 5' contenen seqüències homòlogues (d'entre 35 i 50 nucleòtids) al gen a delecionar (H1 i H2) més la seqüència corresponent a P1 i P2 del plasmidi pKD3. En total, els oligonucleòtids mesuraven entre 56 i 70 nucleòtids. D'aquesta manera, a l'amplificar la resistència a cloramfenicol per PCR (veure apartat 2.6.3) utilitzant el plasmidi com a motlle, es generava un fragment que contenia la resistència a cloramfenicol flanquejada pels llocs FRT, les seqüències corresponents a P1 i P2 i les seqüències H1 i H2 homòlogues al gen a delecionar. Després de l'amplificació, es procedia a fer una electroforesi en gel d'agarosa amb tot el volum de la PCR i es purificava el fragment amb el *kit* d'extracció de bandes QIAquick Gel Extraction Kit<sup>®</sup> (Qiagen).

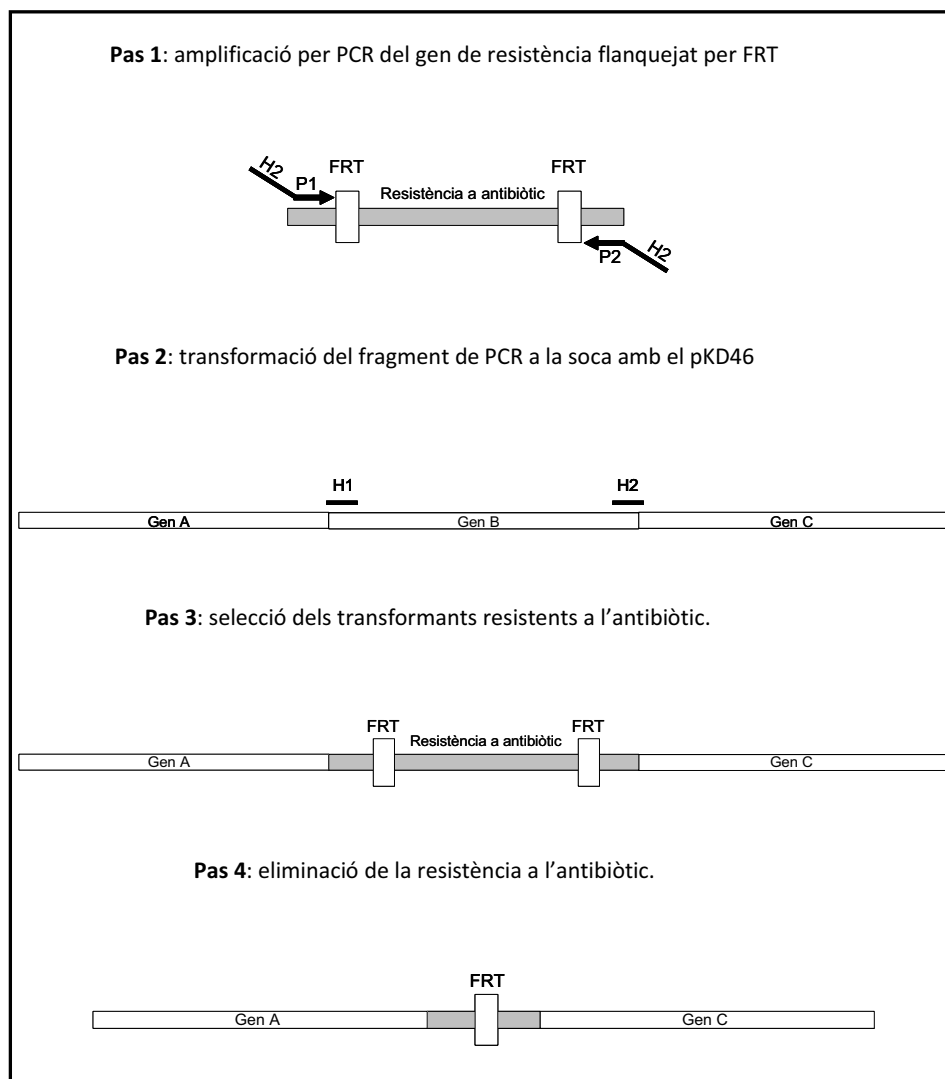
#### 2.5.1.2. Transformació a la soca d'*E. coli* pKD46

Per transformar el fragment de PCR creat a l'apartat anterior a la soca a mutagenitzar, aquesta havia de contenir el plasmidi pKD46 que presenta resistència a ampicil·lina (100 µg/ml). Aquest plasmidi codifica per la recombinasa Red de λ, sota el control d'un promotor induïble per L-arabina, i és fàcilment curable per creixement a 37°C ja que



té un origen de replicació termosensible. La recombinasa Red, a més d'afavorir la recombinació, inhibeix l'exonucleasa V, permetent així l'entrada a la cèl·lula d'un fragment de PCR sense que aquest sigui digerit.

La soca a mutagenitzar transformada amb el plasmidi pKD46 es va fer créixer a 30°C en medi SOB suplementat amb ampicil·lina i L-arabinosa 10 mM (Sigma) fins a una  $DO_{600}$  de 0,6. Quan la soca arribava a aquest punt del creixement, s'obtenien cèl·lules electrocompetents per centrifugació i rentats (x3) amb glicerol al 10% (v/v) fred concentrant les cèl·lules x 100. Alíquotes de 100 µl de cèl·lules electrocompetents es van electroporar amb 200 ng de producte de PCR (condicions de l'electroporació a l'apartat 2.4.1.2). Un cop realitzat el xoc elèctric, se'ls va afegir 1 ml de medi SOC i es van mantenir durant 1 hora a 37°C per tal d'afavorir la recombinació i l'expressió del marcador. La selecció es va fer sembrant la meitat de les cèl·lules en plaques de medi sòlid LB agar suplementades amb cloramfenicol (marcador de la mutació). La resta de transformants es van deixar entre 18-24 hores a temperatura ambient i es van sembrar passat aquest temps en el mateix medi. Les plaques es van deixar a 37°C entre 2 i 3 dies. Un cop obtinguda alguna possible colònia es va curar el plasmidi pKD46, mitjançant diverses sèmbrs en plaques de LB agar sense Ap i a 43°C. Per comprovar que la inserció era correcte, es van fer amplificacions de fragments per PCR utilitzant diferents parells d'oligonucleòtids. A la Fig. 2.1 es mostra un esquema del procés.



**Fig. 2.1.** Estratègia de delecció gènica pel mètode d'inactivació de gens cromosòmics utilitzant fragments de PCR. H1 i H2 referits a les regions d'homologia del gen. P1 i P2 referits a les regions d'homologia del pKD46 (adaptat de Datsenko i Wanner, 2000).

### 2.5.1.3. Eliminació de la resistència a l'antibiòtic

En el cas que es volgués eliminar la resistència a l'antibiòtic, el mutant obtingut i comprovat per PCR es va transformar amb el plasmidi pCP20 que codifica per la recombinasa FLP induïble per temperatura (43°C), resistent a ampicil·lina i cloramfenicol i amb replicó termosensible. La transformació es va sembrar en plaques d'LB agar amb ampicil·lina i es van incubar a 30°C durant 16 hores. Els transformants obtinguts es van sembrar en medi no selectiu i incubar a 43°C per tal d'afavorir la pèrdua del plasmidi. Es va comprovar que les colònies crescudes en aquestes condicions ja no contenien el plasmidi, ja que normalment, la majoria de pèrdues de la resistència flanquejada per seqüències FRT és simultània a la pèrdua del plasmidi pCP20.

Finalment, per comprovar que el gen de resistència al cloramfenicol s'havia perdut i que el gen original estava delecionat es van fer amplificacions per PCR utilitzant diferents oligonucleòtids.

## **2.6. Tècniques experimentals amb ADN**

### **2.6.1. Aïllament d'ADN plasmídic**

#### **2.6.1.1. Aïllament d'ADN plasmídic amb kits**

De manera rutinària l'aïllament d'ADN plasmídic es va dur a terme mitjançant *kits*. En funció de la quantitat de plasmidi necessària s'utilitzava un *kit* de la casa comercial Qiagen que permetia una extracció a petita o gran escala (QIAprep Spin Miniprep<sup>®</sup> o QIAGEN Plasmid Midi Kit<sup>®</sup>). En ambdós casos el fonament es basa en la lisi alcalina seguida d'una adsorció de l'ADN plasmídic a una matriu de sílice. La purificació d'ADN plasmídic mitjançant Miniprep permetia una extracció ràpida a partir de 5 ml de cultiu de tota la nit, mentre que per l'obtenció d'ADN plasmídic mitjançant Midiprep es partia de 100 ml de cultius de tota la nit.

#### **2.6.2. Ús d'enzims de restricció, lligació i modificació**

Pel tractament d'ADN amb enzims de restricció (Fermentas), es van utilitzar els tampons (x10) subministrats amb els enzims i es van seguir les indicacions proporcionades pel proveïdor. La quantitat d'enzim per reacció no superava mai el 10% del volum total ja que l'activitat enzimàtica podria resultar-ne inhibida a causa del glicerol que contenen les preparacions d'enzims. Pel tractament de l'ADN amb d'altres enzims com la fosfatasa alcalina (Fermentas) o la lligasa de T4 (Fermentas) es van utilitzar els tampons subministrats amb l'enzim (x10) i es van seguir les instruccions proporcionades per les cases comercials. Després del tractament amb cada un dels enzims anteriors, l'ADN es purificava mitjançant el *kit* comercial QIAquick PCR Purification Kit<sup>®</sup> de la casa comercial Qiagen.

#### **2.6.3. Amplificació de fragments d'ADN mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR)**

Per a les reaccions d'amplificació d'ADN per PCR es va utilitzar la polimerasa termoestable High Fidelity PCR Enzyme Mix (Fermentas) que conté una barreja de *Taq* DNA Polymerase i *Pfu* DNA Polymerase amb activitat exonucleasa 3'->5'. Es van seguir les instruccions generals de la bibliografia i del subministrador de l'enzim.

Generalment, l'amplificació es feia a partir de colònia. El volum de les reaccions era normalment de 25 µl, dels quals 24 corresponien a la barreja de reacció i 1 µl a la mostra que es volia amplificar.

La barreja de la reacció contenia:

Barreja de reacció (25µl)	
Composició	Quantitat
Aigua bidestil·lada estèril	18,375 µl
Tampó x 10 (amb MgCl <sub>2</sub> )	2,5 µl
Mix dNTP 2 mM (Fermentas)	2,5 µl
Oligonucleòtids (10 µM)	0,5 µl
<i>taq</i> DNA polymerase (recombinant) LC, 100u	0,125 µl
Mostra	1 µl

Quan s'utilitzava l'amplificació per PCR com a mètode de comprovació o per fer una anàlisi massiva de clons, normalment s'utilitzava la PCR Master Mix (2x) (Fermentas) que conté a més de l'ADN polimerasa, els dNTPs i els tampons necessaris. En aquest cas, també es preparaven volums de reacció de 25 µl i les quantitats de cada component eren les indicades pel fabricant que es detallen a continuació:

Barreja de reacció (25µl)	
Composició	Quantitat
Aigua bidestil·lada estèril	9,5 µl
Oligonucleòtids (10 µM)	1 µl
PCR Master Mix (2X)	12,5 µl
Mostra	1 µl

El programa bàsic d'amplificació variava pel que fa a la temperatura d'hibridació i al temps d'extensió, segons el tamany del fragment a amplificar i els oligonucleòtids utilitzats.

Programa bàsic d'amplificació:

1. Desnaturalització inicial: 94°C, 5'
  2. Desnaturalització: 94°C, 30''  
     Hibridació: 55°C, 30''  
     Extensió: 72°C, 30''
  3. Extensió final: 72°C, 7'
- } 25 cicles

El termociclador utilitzat en tots els cassos va ser un MJ Mini Gradient Thermal Cycler de BioRad.

Els productes d'amplificació resultants de la PCR es van analitzar per electroforesi en gels d'agarosa (apartat 2.6.5.). En el cas que l'ADN amplificat fos utilitzat per un posterior tractament amb enzims de restricció, lligació o modificació, es procedia a la purificació d'aquest amb el *kit* comercial QIAquick PCR Purification Kit<sup>®</sup> de Qiagen.

**2.6.4. Seqüenciació**

Quan va ser necessari, l'ADN es va seqüenciar pel mètode de Sanger basat en la síntesi i terminació amb dideoxinucleòtids mitjançant cicles de PCR. Es va utilitzar el *kit* ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit<sup>®</sup> version 3.1 (Biosystems).

Barreja de reacció (10µl)	
Composició	Quantitat
MIX de seqüenciació	4 µl
Oligonucleòtid	1,6 pmols
Mostra	2,5 µl (200-500ng)
Aigua bidestil·lada estèril	fins a 10 µl

El programa de PCR utilitzat va ser el següent:

1. Desnaturalització inicial: 96°C, 1'.
  2. Desnaturalització: 96°C, 10''.  
     Hibridació: 50°C, 35''.  
     Extensió: 60°C, 4'.
- } 25 cicles

La mostra es va analitzar en el seqüenciador ABI PRISM<sup>®</sup> 3700 DNA Analyzer als Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

### 2.6.5. Electroforesi d'ADN

L'ADN es va analitzar mitjançant l'electroforesi en gels horitzontals d'agarosa i una posterior tinció en una solució de bromur d'etidi per poder visualitzar-lo (Sambrook *et al.*, 1989).

#### 2.6.5.1. Preparació del gel i tampons d'electroforesi

Els gels horitzontals d'agarosa (Pronadisa) es van preparar a concentracions del 0,8 al 2% depenent del tamany de l'ADN a analitzar. El tampó utilitzat tant en els gels com a la cubeta d'electroforesi era TAE x 0,5 que es preparava a partir d'una solució mare de TAE x 50.

TAE x 50	
Composició	Concentració
Tris (Roche)	40 mM
Àcid acètic (Panreac)	20 mM
EDTA (Merck)	1 M

#### 2.6.5.2. Preparació de mostres

Abans de carregar les mostres se'ls afegia 1/5 part de tampó de mostres 5x.

Tampó de mostres 5x	
Composició	Concentració
Bromofenol Blue (Bio-Rad)	0,25%
Xilen Cianol (Bio-Rad)	0,25%
Glicerol (Panreac)	60%

Guardar a 4°C protegit de la llum

#### 2.6.5.3. Marcadors de pes molecular

Tant per determinar la mida com per quantificar l'ADN present en una mostra, es carregaven 0,1 µg de marcadors d'ADN de tamany molecular conegut en un dels carrils dels gels. S'escollia un marcador o altre en funció del tamany molecular esperat dels fragments analitzats. En aquest treball, es van utilitzar dos tipus de marcadors, el tamany dels fragments dels quals (en pb) s'indica a continuació:

Tipus	Marcadors de tamany molecular	
	Tamany dels fragments (pb)	
GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder	250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000	
GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder	50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000	

Generalment, pels gels de baix percentatge d'agarosa (0,8%) s'utilitzava el primer marcador i pels gels d'elevat percentatge d'agarosa (2%) s'utilitzava el segon marcador.

#### 2.6.5.4. L'electroforesi

Totes les electroforesis d'ADN realitzades en aquest treball es van dur a terme en cubetes horitzontals Gel XL Ultra™ V-2 (Labnet). Després de carregar les mostres en els corresponents pous, se'ls aplicava un voltatge de 50 a 100V.

#### 2.6.5.5. Tinció de l'ADN amb bromur d'etidi

Per tal de visualitzar l'ADN en gels d'agarosa, es realitzava una tinció post-electroforètica amb bromur d'etidi (Merck). El gel se submergia durant un temps comprès entre 15-30 minuts en una solució de bromur d'etidi preservat de la llum a una concentració de 0,5 µg/ml en tampó TAE x 0,5 (apartat 2.6.5.1). Aquesta solució de bromur d'etidi es preparava a partir d'una solució mare concentrada de 10 mg/ml, conservada 4°C protegida també de la llum. Un cop tenyits els gels, s'observaven les bandes d'ADN presents amb llum ultraviolada (ImageMaster® VDS de Pharmacia).

#### 2.6.6. Aïllament de bandes d'ADN a partir de gels d'agarosa

Quan es van necessitar fragments específics d'ADN després d'una digestió o d'una amplificació per PCR es va dur a terme el mètode de l'electroelució. Després de la realització de l'electroforesi de l'ADN en agarosa i posterior tinció amb bromur d'etidi (veure apartat 2.6.5), es van retallar les bandes d'interès visualitzades amb l'ajut d'un transil·luminador de longitud d'ona llarga i baixa intensitat per tal de no malmetre l'ADN (UVL-56, BLACK-RAY® LAMP). Un cop teníem el bloc d'agarosa amb l'ADN d'interès, l'aïllament de l'ADN es va dur a terme mitjançant el *kit* QIAquick Gel Extraction Kit® de la casa comercial Qiagen amb el qual es fonia el gel a alta temperatura (50°C) i s'aconseguia purificar l'ADN per adsorció d'aquest en membranes de sílice i posterior elució.

## 2.7. Tècniques experimentals amb ARN

### 2.7.1. Extracció d'ARN cel·lular total amb kits

Les extraccions d'ARN cel·lular realitzades en aquest treball es van dur a terme mitjançant el *kit* SV Total RNA Isolation System de Promega seguint les instruccions de la casa comercial. El fonament d'aquest *kit* és la precipitació amb etanol de l'ARN i la unió d'aquest a la superfície de sílice de les columnes subministrades per la purificació. Les preparacions obtingudes per aquest mètode eren utilitzades generalment per obtenir les mostres per RT-PCR, real-time PCR i per dur a terme anàlisis transcriptòmiques (microarrays).

### 2.7.2. Quantificació espectrofotomètrica de l'ARN

Per quantificar l'ARN es va utilitzar el Nanodrop<sup>®</sup> ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer el qual ens dóna un valor de concentració d'ARN a partir de l'absorbància a 260 nm (1 Unitat de  $DO_{260}$  = 40 µg ARN / ml). Aquest aparell també ens permet tenir una idea de la puresa de l'ARN a partir dels valors resultants de la lectura a les longituds d'ona de 260 i 280 nm. Quan la relació  $DO_{260} / DO_{280}$  és  $< 2$  ens indica que hi ha contaminació amb proteïnes i no es pot realitzar una quantificació precisa.

### 2.7.3. Electroforesi d'ARN en gels d'agarosa i tinció amb bromur d'etidi

Per a la realització d'electroforesi d'ARN i posterior tinció dels gels, es va seguir exactament el mateix procediment que el descrit per l'ADN (apartat 2.6.5) amb algunes precaucions per tal d'evitar la degradació de l'ARN: la cubeta d'electroforesi es va rentar amb SDS al 0,1 % per inhibir les possibles RNases existents en aquesta i el TAE x 0,5 es va esterilitzar amb l'autoclau. El percentatge d'agarosa dels gels variava entre 0,8 i 1,5 %.

### 2.7.4. Anàlisi semi-quantitativa de l'ARNm per RT-PCR

Aquest protocol ens permet conèixer semi-quantitativament els nivells d'expressió d'un determinat gen. Després d'obtenir l'ARN total de la soca crescuda en unes condicions determinades, aquest es va retro-transcriure amb la transcriptasa inversa a ADN complementari (ADNc). Posteriorment, amb aquest ADNc es va realitzar una PCR utilitzant oligonucleòtids específics que amplificaven el gen objecte d'estudi. En tots els



casos, es va fer una prova prèvia utilitzant diferents concentracions d'ARN per tal de determinar quina era l'apropiada perquè no es produís una saturació de la reacció.

#### 2.7.4.1. Digestió amb DNAsa

L'ARN obtingut segons el procediment descrit en l'apartat 2.7.1.1, va ser tractat amb el *kit* TURBO DNA-free™ de la casa comercial Ambion®. Amb aquest *kit* s'aconsegueix eliminar el possible ADN contaminant i els cations divalents presents a les mostres d'ARN. El protocol consistia en afegir 0,1 volums del tampó “Turbo DNase Buffer 10X” i 1 µl de “Turbo DNase” a les mostres d'ARN i incubar a 37°C 20-30 minuts. A continuació, s'afegien 0,1 volums del reactiu “Ressuspended DNase Inactivation Reagent” i s'incubava a temperatura ambient durant 5 minuts barrejant de tant en tant. Finalment, es centrifugava a 10000 x g 1,5 minuts i es conservava el sobrenadant en el qual hi havia l'ARN lliure d'ADN.

#### 2.7.4.2. Reacció d'RT-PCR

En primer lloc, les mostres d'ARN es van diluir a la mateixa concentració (50 o 100 ng/µl). Per tal d'eliminar possibles estructures secundàries de l'ARN totes les mostres ja diluïdes es van incubar durant 5 minuts a 80°C en el termociclador. A continuació, es van mantenir en gel fins a ser utilitzades.

La reacció de retrotranscripció i la consecutiva PCR a partir de l'ADNc resultant es van dur a terme amb el *kit* Transcriptor One-Step RT-PCR kit® (Roche) que permet realitzar ambdues reaccions en un sol pas.

Les quantitats utilitzades per a cada reacció es descriuen a la següent taula:

Barreja de reacció (25 µl)	
Composició	Quantitat
5X reaction buffer	5 µl
Transcriptor Enzyme Mix	0,5 µl
Oligonucleòtids (10 µM)	1 µl
ARN (100 ng/µl)	1 µl
Aigua RNasa free	fins a 25 µl

El programa d'RT-PCR utilitzat va ser el següent:

Retro-transcripció: 50°C, 15'

Desnaturalització inicial: 94°C, 7'

Estàndard PCR:	Desnaturalització	} 10 cicles	
	i inactivació de la		
	Retrotranscriptasa: 94°C, 10''		
	Hibridació: 54°C, 30''		
	Elongació: 68°C, 30''		
	Desnaturalització: 94°C, 10''		
	Hibridació: 54°C, 30''		} 25 cicles
	Elongació: 68°C, 30''+ 1''/cicle		
	Finalització: 68°C, 7'		

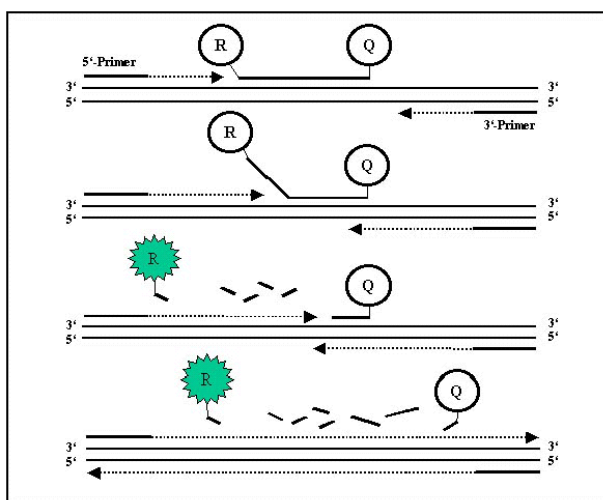
Per tal d'assegurar-nos que la mostra no contenia cap traça d'ADN, es van realitzar els corresponents controls d'inactivació de la retrotranscriptasa amb cada una de les mostres. Per fer-ho, abans d'afegir els ARN, la barreja de tampons, aigua, *taq* polimerasa, retrotranscriptasa i oligonucleòtids (o "mix") es va mantenir durant 10 minuts a 95°C per tal d'inactivar la transcriptasa inversa. A continuació, se li va afegir la mostra d'ARN i es va procedir igual que amb les mostres problema. Si les mostres d'ARN no estaven contaminades amb ADN aquests controls amb la retrotranscriptasa inactivada no mostraven amplificació. Un cop finalitzada la reacció, es van analitzar 10 µl de cada una de les mostres per electroforesi en gel d'agarosa al 2% i tinció en bromur d'etidi (apartat 2.6.5).

### 2.7.5. Assaig de PCR a temps real

Aquest assaig es va dur a terme per mesurar els nivells de transcripció dels gens *holE*, *ymgB* i *rplB*.

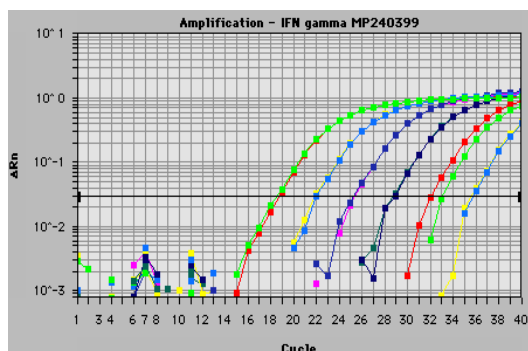
La tècnica de PCR a temps real ens va permetre monitoritzar el procés d'amplificació de l'ADN complementari (ADNc) obtingut després d'una reacció de retrotranscripció de l'ARN missatger (ARNm) dels gens *holE*, *ymgB* i *rplB* per, posteriorment, fer una quantificació de l'abundància relativa dels diferents ARNm. La metodologia de PCR a temps real utilitzada va ser el mètode de sondes TaqMan<sup>®</sup>.

La tecnologia TaqMan<sup>®</sup> consisteix en l'utilització de tres oligonucleòtids en la reacció de PCR. Dos d'ells actuen com encebadors en la PCR per amplificar l'ADNc. L'oligonucleòtid restant (sonda) hibrida a la zona de l'ADNc amplificada pels altres dos encebadors. Aquesta sonda porta unit un fluorocrom indicador a l'extrem 5', en el nostre cas FAM<sup>®</sup>, i en l'extrem 3' un esmorteïdor de fluorescència, en el nostre cas TAMRA<sup>®</sup>. Mentre la sonda està intacta, no hi ha emissió de fluorescència ja que l'esmorteïdor absorbeix la fluorescència emesa pel fluorocrom indicador. Durant l'amplificació del fragment d'ADNc (sobre el qual s'hibrida la sonda) l'activitat exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa degrada la sonda, provocant la separació de l'indicador de l'esmorteïdor, amb la consegüent emissió de fluorescència (Fig. 2.2). La tècnica consisteix en mesurar la fluorescència emesa en cada cicle de la reacció de PCR mentre l'amplificació s'està realitzant, la qual és directament proporcional a la quantitat d'ADNc present a la mostra. Aquest ADNc generat durant la reacció de retrotranscripció és proporcional a la quantitat d'ARNm inicial. D'aquesta manera, és possible dur a terme una quantificació relativa de l'expressió d'un determinat gen en unes condicions determinades.



**Fig. 2.2.** Representació esquemàtica de la reacció de PCR a temps real utilitzant sondes TaqMan<sup>®</sup>. “R” correspon al fluoròfor indicador (“Reporter”) i “Q” a l’esmorteïdor (“Quenching”) de la sonda.

La quantificació de la llum emesa pel colorant indicador en un estat d’excitació és transformada mitjançant un programa informàtic en un gràfic com el que es mostra en la Fig. 2.3. Els cicles de PCR es mostren a l’eix d’abscisses i la intensitat de la senyal en forma logarítmica a l’eix de les ordenades.



**Fig. 2.3.** Gràfic obtingut d'un experiment de PCR a temps real. Les corbes de colors ens indiquen les diverses mostres d'ARN testades amb una sonda que detecta l'expressió d'un determinat gen. La línia horitzontal s'anomena llindar i el punt en que creua cada corba correspon al paràmetre Ct.

La línia horitzontal, anomenada llindar, ha de ser fixada en un punt en el qual en totes les mostres es detecti un clar increment exponencial de la fluorescència emesa. El punt en que la fluorescència d'una mostra creua la línia llindar s'anomena cicle llindar (Ct). Aquest cicle llindar (Ct) és el paràmetre que ens permet dur a terme la quantificació relativa de l'expressió de l'ARNm ja que està relacionat directament amb la concentració de l'ADNc diana a la mostra a analitzar. Quan el valor de Ct és petit significa que han hagut de passar pocs cicles de PCR perquè la sonda detecti l'ADNc i per tant, això es traduiria en que el gen objecte d'estudi, i pel qual s'ha dissenyat la sonda, s'estaria expressant molt. En el cas contrari, una Ct alta ens estaria indicant una quantitat d'ADNc baixa i per tant, una baixa expressió del gen objecte d'estudi.

Per altra banda, és important fer sempre una reacció de PCR a temps real amb oligonucleòtids que amplifiquin un gen calibrador per tal de poder normalitzar les dades d'expressió obtingudes pel gen diana analitzat. Aquest gen calibrador cal que compleixi les següents característiques:

- Mateix número de còpies en totes les cèl·lules
- Expressió en totes les cèl·lules

En el nostre cas, vam utilitzar com a gen calibrador l'ARN ribosòmic 16s. D'aquesta manera, quan es van calcular els nivells d'expressió del gen a analitzar sempre es feia tenint en compte els valors obtinguts per aquest gen.

### 2.7.5.1. Condicions de reacció

Per als assaigs de PCR a Temps Real es va utilitzar el kit "TaqMan<sup>®</sup> RNA-to-C<sub>T</sub><sup>™</sup> 1-Step Kit" d'Applied Biosystems. Aquest kit permet realitzar la retrotranscripció de l'ARNm a ADNc i la posterior amplificació d'aquest en una mateixa reacció. L'assaig es va dur a terme en el termociclador ABI Prism 7700 (Applied Biosystems), i la quantificació de la fluorescència al llarg de la reacció de PCR amb el programa informàtic SDS 1.6 (Sequence Detection System), associat al termociclador.

La composició de la mescla utilitzada per a la reacció, en un volum final de 20 µl va ser la indicada pel fabricant. En tots els casos es van utilitzar 2 µl de mostra (ARN total). El programa de retrotranscripció i amplificació va ser l'indicat pel fabricant.

Les reaccions es van dur a terme en plaques de 96 pous, cobertes amb film òptic adhesiu.

Es van realitzar controls per la contaminació amb ADN genòmic, per als quals es van realitzar assaigs idèntics als esmentats però en què la mostra de reacció havia estat tractada tèrmicament per inactivar la retrotranscriptasa. D'aquesta manera, l'única amplificació possible provenia del possible ADN genòmic contaminant. En tots els casos es van obtenir Ct pròximes a 40, mentre que en l'anàlisi de mostres es van obtenir Ct al voltant de 25. Aquests valors indiquen que les mostres utilitzades presentaven nivells de contaminació prou baixos i no significatius com per a no causar distorsions en els resultats obtinguts.

#### **2.7.5.2. Corba de saturació i eficiència d'amplificació**

Per tal de determinar la quantitat d'ARN total a utilitzar en l'anàlisi amb cadascuna de les sondes, es va realitzar una corba de saturació amb diferents concentracions d'ARN total. D'aquesta manera es va aconseguir evitar una saturació del sistema per excés d'ARNm o uns nivells excessivament baixos de fluorescència per dèficit d'ARNm. Es van utilitzar les quantitats d'ARN total següents: 100, 10, 1, 0,1, i 0,01 ng. Amb l'ajuda del programari informàtic associat al termociclador, es va poder calcular una corba per a cadascuna de les sondes utilitzades. Per a la realització dels diferents assaigs es van escollir les concentracions d'ARN total que oferien una Ct aproximada de 25. Per a les sondes que hibridaven en el gens *holE* i *ymgB* es van utilitzar 10 ng d'ARN i per la que hibridava amb el gen *rplB* 1 ng d'ARN. Pel que fa al gen de referència 16s, es va utilitzar 1 pg d'ARN.

#### **2.7.5.3. Anàlisi de les dades obtingudes**

Tots els experiments es van realitzar per triplicat. Es va fer una mitjana dels valors de Ct de cada mostra analitzada, per tot seguit utilitzar el mètode comparatiu  $\Delta Ct$ . Amb aquest mètode es determina l'increment d'expressió d'un gen en una determinada soca en comparació amb una altra soca de referència (per exemple, un mutant respecte a la soca salvatge o una mateixa soca en diferents condicions de creixement). La fórmula que es va utilitzar fou  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , on  $\Delta\Delta Ct$  és la diferència entre els increments  $\Delta Ct$  de

cada mostra experimental o referència ( $\Delta C_t, r$ ) i el  $\Delta C_t$  de la mostra calibrador, l'ARN ribosòmic 16s en el nostre cas ( $\Delta C_t, cb$ ):

$$\text{Ratio} = 2^{-(\Delta C_t, r - \Delta C_t, cb)} = 2^{-(\Delta \Delta C_t)}$$

### 2.7.6. Anàlisi de l'expressió gènica mitjançant microxips

La tecnologia basada en microxips permet conèixer els nivells d'expressió d'un determinat gen a partir de la mesura del grau d'hibridació entre una sonda específica i l'ADNc diana, el qual es detecta per senyals de luminescència que s'analitzen per anàlisi d'imatge.

Aquesta tècnica es va utilitzar per fer l'estudi del patró d'expressió gènica de diversos mutants i comparar-lo amb el de la soca salvatge.

#### 2.7.6.1. Característiques generals dels microxips GeneChip<sup>®</sup> *E. coli* Genome 2.0 Array

En aquest treball es van utilitzar els microxips comercials de la casa Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> *E. coli* Genome 2.0 Array. Aquests microxips consisteixen en una micromatriu amb aproximadament 10.000 *sets* d'oligonucleòtids que corresponen a seqüències específiques dels gens de les soques d' *E. coli* K12 (soca de laboratori MG1655) i a les tres soques patògenes d'*E. coli* O157:H7 EDL 933 (enteropatogènica), O157:H7 (SAKAI) (enteropatogènica) i CFT073 (uropatogènica). Tot i això, en el present estudi ens vam centrar únicament en els resultats obtinguts a *E. coli* K12. A més, a part de detectar les pautes de lectura oberta codificants de proteïnes (ORF) d'*E. coli*, aquest microxip conté també sondes que inclouen més de 700 regions intergèniques d'*E. coli* i marcadors de resistències a antibiòtics. La base del protocol utilitzat en el GeneChip<sup>®</sup> *E. coli* Genome 2.0 Array consisteix en la hibridació de l'ADNc diana (obtingut a partir de l'ARN total de les cèl·lules objecte d'estudi) prèviament marcat amb biotina, amb els *sets* de sondes d'aquest microxip. La hibridació sonda-diana es detecta i quantifica mitjançant l'addició d'estreptoavidina, la qual reacciona amb la biotina i forma un complex amb color que és detectat per un escàner i analitzat per anàlisi d'imatge.

#### 2.7.6.2. Procediment experimental i anàlisi de les dades obtingudes

El procediment experimental en el laboratori va consistir en l'aïllament de l'ARN total (veure apartat 2.7.1.1) corresponent als diferents mutants objecte d'estudi, el tractament amb Turbo DNasa i la purificació i concentració de l'ARN amb el *kit* de Qiagen

RNeasy MinElute Cleanup Kit<sup>®</sup>. Aquest protocol es va realitzar per triplicat per cada soca per tal d'obtenir mostres més representatives. La síntesi i amplificació de l'ADNc, la fragmentació d'aquest ADNc i el marcatge amb biotina, així com l'anàlisi amb microxips (hibridació, tinció i escanejat) es va encarregar a la Plataforma "Functional Genomics Core" (FGC) pertanyent al Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona (IRB) al Parc Científic de Barcelona.

El processament de les dades obtingudes i l'elaboració dels diagrames de Venn i *heatmaps* es va realitzar a la Unitat de Bioinformàtica dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB) a partir dels fitxers CEL generats pel programari GCOS (Affymetrix).

## **2.8. Tècniques experimentals amb proteïnes**

### **2.8.1. Obtenció d'extractes proteics**

Els mètodes d'obtenció d'extractes proteics utilitzats en aquest treball es van escollir en funció de la finalitat per la qual eren preparats (anàlisi per electroforesi d'extractes totals, obtenció d'extractes crus per estudis d'interacció proteïna-proteïna o fraccionament dels compartiments cel·lulars).

#### **2.8.1.1. Obtenció d'extractes totals**

Aquest mètode es va utilitzar per analitzar per electroforesi en gels de poliacrilamida el contingut proteic total, separant entre fracció soluble i insoluble. Es van recollir les cèl·lules per centrifugació (5000 x g, 5 minuts) i es van ressuspèndre en 1/10 del volum de cultiu en Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 2 mM. A continuació, es va afegir: lisozim a una concentració final de 100 µg/ml, recent preparat en el mateix tampó de ressuspensió, i 1/10 del volum inicial de Tritón X-100 1% (p/v). La mescla es va incubar 15 minuts a 30°C. A continuació, es van sonicar les mostres per trencar l'ADN present fins que van perdre la viscositat. Finalment, es van centrifugar les mostres (12.000 x g, 15 minuts, 4°C) i es va separar el sobrenedant (fracció soluble) del precipitat (fracció insoluble).

#### **2.8.1.2. Obtenció d'extractes crus per French-Press**

Cultius crescuts en 500 ml de medi LB fins a DO<sub>600</sub> entre 0,5 i 1, es van centrifugar (11.000 x g, 10 minuts, 4°C) i el precipitat cel·lular es va ressuspèndre en 10 ml del tampó adient segons l'experiment a realitzar. Aquesta nova suspensió cel·lular es podia congelar i descongelar per tal d'afavorir el trencament de les cèl·lules o bé passar

directament a trencar-les per pressió mitjançant la French Press (French Pressure Cell Press, SLM AMINCO). Les cèl·lules van ser lisades després de passar-les 3 cops consecutius a 1.000 PSIG de pressió. Per tal d'obtenir un extracte clarificat, l'extracte anterior es va centrifugar (16.000 x g, 30 minuts, 4°C) i es va recollir el sobrenedant.

### 2.8.1.3. Fraccionament cel·lular

Aquest mètode permet obtenir les fraccions periplasmàtiques i citoplasmàtiques així com les proteïnes de membrana, de cultius de diferents soques per analitzar el contingut de proteïnes a cada compartiment cel·lular. Les fraccions obtingudes es van quantificar pel mètode de Bradford (apartat 2.8.2) i es van analitzar posteriorment mitjançant electroforesi en gels de poliacrilamida (apartat 2.8.4.1).

- Fracció periplasmàtica

Es van centrifugar (3.000 x g, 10 minuts) 10 ml d'un cultiu en fase exponencial i el precipitat cel·lular es va ressuspendre en 1 ml de tampó de xoc fred, més 100 µl d'una solució fresca de lizozim (1 mg/ml). La barreja es va deixar 3 minuts en gel i posteriorment es va centrifugar durant 30 segons a 16.000 x g. Es va recollir el sobrenedant, corresponent a la fracció periplasmàtica.

Tampó de xoc	
Composició	Concentració
Tris (Roche)	33 mM
EDTA (Merck)	1 M
Sacarosa	20 %
PMSF*	1 mM

Ajustar a pH 8,0, autoclavar i conservar a 4°C.

\* A partir d'una solució 10 mM en isopropanol.

Afegir just abans del seu ús.

- Fracció citoplasmàtica

El sediment obtingut en l'apartat anterior, es va ressuspendre en 1 ml de tampó de xoc fred i 100 µl d'una solució de lizozim (5 mg/ml). La barreja es va deixar 20 minuts en gel i després es va congelar i descongelar. Finalment, es va centrifugar (16.000 x g, 1 minut) i es va recollir el sobrenedant, corresponent a la fracció citoplasmàtica.



- Obtenció de proteïnes de membrana

A partir d'un cultiu crescut tota la nit, es van centrifugar 10 ml durant 10 minuts a 3.000 x g i a 4°C. El precipitat cel·lular es va ressuspèndre en 1 ml de tampó de ressuspensió i es va centrifugar de nou durant 5 minuts. Les cèl·lules es van ressuspèndre amb 1 ml de tampó de ressuspensió i es van lisar per sonicació a 50 W en dos polsos de 30 segons. L'extracte resultant es va centrifugar durant 1 minut per eliminar les restes cel·lulars i a continuació el sobrenedant es va centrifugar a 16.000 x g a 4°C durant 1 hora. Passat aquest temps, es va ressuspèndre el precipitat en 350 µl de tampó de ressuspensió, se li van afegir 350 µl més de Laurosil Sarcosinat Sòdic al 1,2 % (p/v) i es va incubar la barreja durant 20 minuts a temperatura ambient. Transcorregut aquest temps, es va tornar a centrifugar (16.000 x g, 30 minuts, temperatura ambient) i es va retirar el sobrenedant, corresponent a les proteïnes de membrana interna, IM. El precipitat anterior es va ressuspèndre en 100 µl d'H<sub>2</sub>O Milli-Q, se li van afegir 3 volums d'acetona prèviament freda i es va deixar a 4°C un temps mínim de 2 hores. Per últim, es va centrifugar (16.000 x g, 4°C, 15 minuts) i es va ressuspèndre el precipitat en 100 µl d'H<sub>2</sub>O Milli-Q (proteïnes de membrana externa, OM).

### **2.8.2. Valoració de la concentració de proteïnes pel mètode de Bradford**

(Bradford, 1976)

Per la determinació de la quantitat de proteïna present en una mostra es va utilitzar el reactiu "Protein Assay Dye Reagent Concentrates" de Bio-Rad. Es va seguir el procediment indicat per la casa comercial basat en el mètode descrit per Bradford el 1976 segons el qual les proteïnes presenten afinitat pel Blau de Coomassie. Es va preparar una solució concentrada de BSA (Boehringer Mannheim) de 25 mg/ml. A partir d'aquesta solució de BSA es van preparar les dilucions 25, 12,5, 6,25, 3,125 i 1,56 (µg/ml). Es va construir una recta patró barrejant 0,8 ml de cadascuna d'aquestes dilucions de concentració coneguda amb 0,2 ml de reactiu de Bradford per duplicat. Així, les quantitats de proteïna de les diferents dilucions que formarien la recta patró serien de 20, 10, 5, 2,5 i 1,25 (µg). Per la determinació de la concentració de proteïna de les mostres assajades, es van afegir entre 5 i 25 µl de cada mostra problema a barreges de 0,2 ml de reactiu de Bradford més la quantitat corresponent d'aigua fins a arribar a 1 ml de volum total. A continuació, es passava a realitzar la lectura de l'absorbància a DO<sub>595</sub> de totes les mostres. La concentració de proteïna de les mostres es va calcular

extrapolant a partir de la recta patró els valors de l'absorbància de les mostres problema i fent la correcció segons el volum de mostra assajat.

### **2.8.3. Purificació de proteïnes**

#### **2.8.3.1. Inducció de l'expressió de proteïnes**

Per tal de sobreproduir les proteïnes d'interès, es van construir plasmidis recombinants que contenien el gen d'interès clonat sota la influència del promotor de l'ARN polimerasa del fag T7. En aquest treball, es van utilitzar els vectors d'expressió pET11a i pET15b. Com a soca hoste s'utilitzaven les soques BL21(DE3) i BL21(DE3) $\Delta$ hns Km<sup>r</sup> capaces de sintetitzar la polimerasa del fag T7 sota un promotor induïble per IPTG (isopropil-D-galactopiranosid).

En un primer pas, el plasmidi es transformava a la soca hoste i, al dia següent, les colònies obtingudes de la transformació es recollien amb LB i s'utilitzaven per inocular 250 ml, 500 ml o 1 litre de medi LB. El cultiu s'incubava en agitació a 37°C o a 30°C segons la proteïna a expressar fins que assolía una DO<sub>600</sub> de 0,4. En aquest moment, s'afegia IPTG (Promega) a una concentració final de 0,5 mM. Passades 2 hores a partir del moment de la inducció, se centrifugava el cultiu (11.000 x g, 10 minuts, 4°C) i les cèl·lules es ressuspenien en 10 ml (per a cultius de 250 o 500 ml) o 20 ml (per a cultius d'1 litre) de tampó A (apartat 2.8.3.2). Amb aquesta suspensió cel·lular s'obtenia un extracte cru mitjançant French Press, tal i com es descriu en l'apartat 2.8.1.2. Aquest extracte se centrifugava de nou (16.000 x g, 30 minuts, 4°C) per tal d'obtenir un extracte clarificat.

#### **2.8.3.2. Purificació per Ni<sup>2+</sup>-NTA agarosa (Qiagen)**

(Hochuli, 1988)

Aquest mètode és útil per la purificació de les proteïnes a les quals se'ls ha afegit una cua de 6 histidines en el moment de la clonació en el vector d'expressió. Després de l'obtenció de l'extracte clarificat, s'utilitzava el mètode d'immobilització per cromatografia d'afinitat a metalls per tal de purificar la proteïna amb la cua de 6 histidines. Es van barrejar els 10 o 20 ml d'extracte cru obtingut tal i com s'explica en l'anterior apartat amb 500 µl o 1 ml de reïna de Ni<sub>2</sub><sup>+</sup>-NTA agarosa (Qiagen) respectivament i es va deixar en agitació suau durant 2 hores a 4°C per permetre la unió de la proteïna al Ni<sup>2+</sup>. Transcorregut aquest temps, es va centrifugar i ressuspendre la resina varies vegades fins a quedar en un volum final d'1 ml. A continuació, es van fer 5

rentats amb 500 µl de tampó A i 3 rentats amb tampó A' (amb imidazol 200 mM), per tal d'eluir les proteïnes unides a la matriu. Les fraccions obtingudes es van guardar i analitzar posteriorment per electroforesi en gel de poliacrilamida en Tris-Glicina-SDS (veure apartat 2.8.4.1).

	Tampó A	Tampó A'
Hepes pH 7,9*	20 mM	20 mM
KCl	100 mM	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	5 mM
Glicerol	10%	10%
Imidazol	20 mM	200 mM

\* pH ajustat amb KOH

#### 2.8.4. Tècniques d'electroforesi de proteïnes

La separació en funció del tamany molecular de les proteïnes d'una determinada mostra es va realitzar mitjançant electroforesi en gels de poliacrilamida desnaturalitzants utilitzant l'equip MINI-PROTEAN II™ de Bio-Rad, que permet obtenir gels verticals de 7,3 cm d'alçada, 8 cm d'amplada i 0,75 o 1 mm de gruix.

##### 2.8.4.1. Gels de poliacrilamida en Tris-Glicina-SDS

(Laemmli, 1970)

Aquests tipus de gels estan formats per dues fases: la fase de compactació i la fase de resolució. La primera (fase de compactació) correspon a la ¼ part superior del gel i conté un 5% de poliacrilamida en tots els casos. La segona fase (fase de resolució) ocupa la resta del gel i els percentatges més utilitzats de poliacrilamida van ser de 10%, 12,5% i 15% segons els tamanys de les proteïnes que es volguessin separar en cada cas. La composició de cada fase es mostra a la següent taula:

	Fase de resolució			Fase de compactació
	10%	12,5%	15%	5%
Acrilamida/Bis 30,8 % T, 2,6 % C (Bio-Rad)	2 ml	2,5 ml	3 ml	0,8 ml
Tampó de resolució x 4	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	-
Tampó de compactació x 4	-	-	-	1,25 ml
Aigua bidestil·lada	2,5 ml	2 ml	1,5 ml	2,92 ml
APS 10%	30 µl	30 µl	30 µl	35 µl
TEMED (Bio-Rad)	5 µl	5 µl	5 µl	10 µl

% T: Percentatge d'acrilamida + bisacrilamida      % C: Percentatge de bisacrilamida respecte el total (T)

La solució d'APS al 10% correspon a una solució d'APS (Bio-Rad) en aigua destil·lada a una concentració de 100 mg/ml.

La composició del tampó de resolució i del tampó de compactació es detallen a continuació:

Tampó de Resolució x 4	
Composició	Concentració
Tris (Roche)	1,5 mM
SDS (Merck)	0,4%

Ajustar a pH 8,8

Tampó de Compactació x 4	
Composició	Concentració
Tris (Roche)	0,5 mM
SDS (Merck)	0,4%

Ajustar a pH 6,8

Per preparar el gel primer s'afegia la fase de resolució entre els dos vidres de suport fins a  $\frac{3}{4}$  parts de l'alçada total i es recobria amb aigua destil·lada. Un cop aquesta fase havia polimeritzat, s'eliminava l'aigua destil·lada i s'afegia la fase de compactació. Abans que aquesta fase polimeritzés s'introduïa la pinta que definiria els pous de càrrega.

Les mostres es van carregar després d'afegir-hi tampó de mostres x 4 i d'incubar-les durant 5-10 minuts a 100°C. Després de carregar les mostres, s'aplicava un voltatge de 50 V fins que les mostres s'havien alineat a la fase de compactació. A continuació, s'augmentava el voltatge a 120 V fins al final de l'electroforesi. Tot seguit, es detalla la composició de les solucions utilitzades per afegir a les mostres abans de bullir (tampó de càrrega) i per córrer el gel dins la cubeta d'electroforesi (tampó de recorregut):

Tampó de Mostres x 4		Tampó de Recorregut x 10	
Composició	Concentració	Composició	Concentració
Glicerol (Panreac)	20%	SDS (Merck)	1%
$\beta$ -mercaptoetanol (Bio-Rad)	10%	Tris (Roche)	0,25 M
SDS (Merck)	4,6%	Glicina (Fluka)	1,92 M
Tris (Roche)	0,125 M	Ajustar pH a 8,3	
Blau Bromofenol (Millipore)	0,2%		

Ajustar a pH 6,8

#### 2.8.4.2. Tinció de gels de proteïnes amb Blau de Coomassie®

La tinció es va realitzar incubant els gels en la solució de tinció que s'indica a continuació durant 30 minuts. Un cop passat aquest temps es va destenyir mitjançant varis rentats amb la solució de destinció.

Solució de Tinció	
Composició	Concentració
Blau brillant de Coomassie® R-250 (Fluka)	0,25%
Àcid acètic glacial (Panreac)	10%
Metanol (Merck)	50%

Un cop dissolt el colorant, la solució es filtra amb paper de cel·lulosa

Solució de Destinció	
Composició	Concentració
Àcid acètic glacial (Panreac)	5 %
Metanol (Merck)	10 %

#### 2.8.5. Tècniques d'immunodetecció de proteïnes (western blotting)

(Towbin *et al.*, 1979; Burnette, 1981)

Les proteïnes separades per electroforesi en gels de poliacrilamida (apartat 2.8.4.1) eren transferides a un suport sòlid per a ser posteriorment detectades mitjançant antisèrums específics.

##### 2.8.5.1. Transferència de proteïnes a membrana per sistema semi-sec

Les proteïnes separades per electroforesi van ser electrotransferides del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocel·lulosa (Trans-blot® Transfer medium, 0,45  $\mu$ m, Bio-Rad). Tant el gel com la membrana, s'equilibraven en tampó de transferència.

El gel de poliacrilamida es dipositava sobre la membrana, i el conjunt es col·locava entre papers de filtre (Whatman 3 MM) mullats amb el mateix tampó (tres per cada costat). Aquest bloc es dipositava entre el càtode i l'ànode de l'aparell i es procedia a la transferència de les proteïnes amb l'equip Trans-Blot® SD-Semy-Dry Transfer Cell de Bio-Rad, tot aplicant un voltatge de 15 V durant generalment 30 minuts. Si el gel era més gruixut o la proteïna molt gran, aleshores s'augmentava el temps de transferència a 45-60 minuts.

Solució de transferència	
Component	Concentració
Tris (Roche)	48 mM
Glicina (Fluka)	39 mM
Metanol (Merck)	20 %
SDS (Merck)	1,3 mM

pH 9,2 no ajustat

#### 2.8.5.2. Immunodetecció i revelat quimioluminiscent pel sistema ECL™

Després de la transferència, la membrana de nitrocel·lulosa es bloquejava durant 1 hora en tampó TBS-Tween més l'agent de bloqueig, llet descremada en pols al 5% (p/v). A continuació, es realitzaven 3 rentats de 10 minuts cada un en tampó TBS-Tween i després s'incubava 1 hora amb l'anticòs primari contra la proteïna que es volia detectar diluït en 10 ml de tampó TBS-Tween. L'excés d'anticòs unit inespecíficament s'eliminava rentant la membrana 3 vegades amb tampó TBS-Tween (10 minuts cada rentat). La membrana s'incubava altra vegada durant 1 hora amb l'anticòs secundari (Anti-Rabbit o Anti-Mouse IgG conjugat amb peroxidasa a una dilució 1:10.000, Amersham Biosciences) diluït en 10 ml de tampó TBS-Tween. L'excés d'anticòs secundari s'eliminava amb 3 rentats de 10 minuts amb tampó TBS-Tween. Per iniciar la reacció quimioluminiscent de revelat, la membrana es va incubar durant 5 minuts en estàtic amb el reactiu que conté el substrat per la peroxidasa de l'anticòs secundari, seguint les indicacions de la casa comercial (ECL™ Western blotting, Amersham Biosciences). Posteriorment, la membrana es va embolicar amb film de plàstic i es va col·locar dins un cassette d'autoradiografia Gevamic 18 x 24 amb pantalles amplificadores Curix C-2 (Agfa) per exposar-hi una pel·lícula (Hyperfilm MP, Amersham Biosciences). Després d'un temps determinat que podia variar entre 10

segons i 5 minuts d'exposició, es va revelar el film automàticament (RG II, Fuji X-Ray, Film Processor).

Tampó TBS- Tween	
Component	Concentració
Tris (Roche)	20 mM
NaCl	136 mM
Tween-20 (Merck)	0,1 %

Ajustar el pH a 7,

A continuació es mostra una taula amb els anticossos primaris utilitzats en aquest treball:

Anticòs	Antigen	Anticossos primaris		Referència
		Dilució de treball	Origen	
Anti-Hha # 1	Hha	1:1.000	Conill	(Balsalobre <i>et al.</i> , 1996)
Anti-H-NS	H-NS	1:10.000	Conill	Cedit pel Dr. B. Eric Uhlin (Umea Univerity, Suècia)
Anti-StpA	StpA	1:2.000	Conill	Cedit pel Dr. B. Eric Uhlin (Umea Univerity, Suècia)
Anti-YdgT	YdgT	1:100.000	Conill	(Paytubi, 2004)

## 2.9. Valoració d'activitats enzimàtiques

### 2.9.1. Determinació de l'activitat $\beta$ -galactosidasa

(Miller, 1992)

A la  $DO_{600}$  escollida per mesurar l'activitat  $\beta$ -galactosidasa d'un cultiu de la soca objecte d'estudi, es van recollir alíquotes d'entre 50 $\mu$ l- 500 $\mu$ l que es van portar a un volum d'1 ml amb tampó Z. Es van afegir 50  $\mu$ l de cloroform i 25  $\mu$ l d'SDS 0,1% a cada tub i es van agitar amb un vòrtex durant 15 segons per permeabilitzar les cèl·lules. A continuació, es van incubar durant 5 minuts en un bany a 28°C i es va afegir l'ONPG (2-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside, Fluka; 4 mg/ml en tampó fosfat sòdic 0,1 M pH 7). Les mostres es van incubar fins a l'aparició de color groc, moment en el qual s'aturava la reacció afegint 0,5 ml de  $Na_2CO_3$  1 M. Es van deixar reposar uns minuts i es va mesurar l'absorbància a les longituds d'ona de 420 nm i 550 nm.

Tampó Z	
Component	Concentració
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck)	60 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck)	40 mM
KCl (Merck)	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
β- mercaptoetanol	50 mM

pH 7, no autoclavar

El tampó fosfat sòdic 0,1 M pH 7, en el que es dissol l'ONPG, es preparava afegint 61 ml de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M sobre 39 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M.

Amb els dos valors d'absorbància obtinguts es calculava l'activitat β-galactosidasa amb la següent fórmula:

$$\text{Activitat } \beta\text{-galactosidasa (U)} = 1000 \times (\text{DO}_{412} - 1,75 \times \text{DO}_{550}) / (t \times V \times \text{DO}_{600})$$

U: Unitats Miller.

**DO<sub>412</sub> i DO<sub>550</sub>**: valors d'absorbància a les longituds d'ona de 412 nm i 550 nm un cop aturada la reacció.

**DO<sub>600</sub>**: valor d'absorbància a 600 nm del cultiu en el moment d'agafar la mostra.

**t**: temps transcorregut en minuts des de l'addició de ONPG fins que s'atura la reacció amb Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

**V**: volum de cultiu utilitzat per la determinació d'activitat (ml).

## 2.10. Determinació de la freqüència d'aparició de mutants resistents a la rifampicina

Es preparaven 10 cultius de tota la nit en 1 ml de medi LB de la soca a estudiar per posteriorment, ser incubats a les tres temperatures a testar (25, 30 i 37°C). De cada cultiu se sembraven dilucions adequades en plaques LB agar (per fer un recompte de viables) i LB agar suplementat amb 100 µg/ml de rifampicina (per fer recompte de mutants resistents a rifampicina). Les plaques s'incubaven a 30°C durant 48 hores. Per calcular la freqüència de mutació per cada cultiu es dividia el nombre total de mutants



resistents a la rifampicina entre el nombre total de cèl·lules viables. Els resultats s'expressaven com al valor de cèl·lules Rif<sup>R</sup>/10<sup>6</sup>.

## 2.11. Assaig de motilitat

(Aberg *et al.*, 2009)

Aquest assaig ens va permetre mesurar la motilitat d'una determinada soca bacteriana i poder-la comparar amb la d'altres soques.

Les plaques utilitzades en l'assaig de motilitat es preparaven en medi TB agar (veure apartat 2.2.1). Un cop autoclavat el medi i abans de ser plaquejat, s'afegia la quantitat suficient de L-serina i L-valina per obtenir una concentració final de 2 mM. L'L-serina és un quimioatraient. En canvi, l'L-valina és un quimiorepel·lent. A continuació, es repartia el medi en plaques posant-ne exactament 25 ml a cadascuna i es deixaven assecar tapades fora de la vitrina a temperatura ambient.

La inoculació de les plaques de motilitat es realitzava a partir de cultius de tota la nit i consistia en dipositar al centre de cada placa 5µl de cultiu per duplicat.

Les plaques inoculades s'incubaven a 30°C durant 12 hores i es mesurava l'halo de motilitat en cm. Les fotografies de l'halo de motilitat es van realitzar amb l'aparell Gel DOC™ XR+ de la casa BioRad utilitzant la llum blanca.

## 2.12. Assaig de resistència a l'àcid

(Masuda i Church, 2003)

A partir de cultius crescuts durant 18 hores en medi LB es realitzava una dilució 1:100 en medi fresc i s'incubava fins a assolir una  $DO_{600nm} = 1$ . Cada cultiu es diluïa 40 vegades en PBS (pH 7,2) o LB (pH 2,5) temperats a 37°C i s'incubaven a 37°C sense agitació durant el temps establert. Finalment, a cada temps ( $t_1$ ,  $t_2$ , etc.) es realitzaven recomptes de viables. El percentatge de cèl·lules supervivents al tractament amb àcid es va calcular com el nombre de colònies/ml supervivents després de tractament amb àcid, dividit pel nombre de colònies/ml en PBS.

### 2.13. Assaig de formació de biofilm

(Ren *et al.*, 2005)

A partir d'un cultiu crescut tota la nit en medi LB a 37°C de la soca a estudiar, es va realitzar un inòcul 1:100 en LB suplementat amb 0,2% glucosa. D'aquest inòcul es van inocular per duplicat 200 µl/pou en plaques de poliestirè (Nunc). La placa es va deixar incubar durant 24 hores a una determinada temperatura (25°C o 37°C) en estàtic. A les 24 hores es va determinar la densitat òptica a una  $\lambda$  de 620nm per poder normalitzar posteriorment les dades. Seguidament, es va decantar el cultiu líquid i es va procedir a realitzar 3 rentats del pou amb 200 µl d'aigua destil·lada cadascun. A continuació, es van tenyir els biofilms amb 200 µl d'una solució de cristall violeta a l'1% deixant-la actuar durant 20 minuts. Es van realitzar novament tres rentats amb aigua destil·lada i es va ressuspènre la tinció obtinguda mitjançant la solubilització del cristall violeta amb 300 µl d'etanol al 95%. Finalment, es va llegir la  $DO_{540}$ . Els valors obtinguts en aquesta mesura es van normalitzar respecte els obtinguts en el cultiu de partida. Els valors resultants corresponien a la capacitat de formació de biofilms.



### **3. Resultats**



### 3.1. Anàlisi transcriptòmica de mutants *hha* i *ydgT*

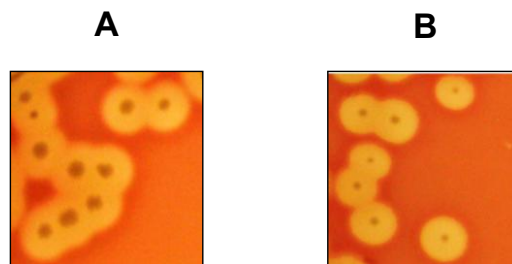
Fins al moment d'inici d'aquesta tesi, tots els estudis sobre la proteïna YdgT es van dur a terme considerant el seu paper com a paràleg de la proteïna Hha (Paytubi *et al.*, 2004; Vivero *et al.*, 2008). Com a primer objectiu d'aquest treball ens vam plantejar estudiar si la proteïna YdgT a *E. coli* té funcions independents de la proteïna Hha.

#### 3.1.1. Construcció de mutants *hha* i *ydgT* a la soca d'*E. coli* MG1655

Els mutants *hha* i *ydgT* utilitzats en aquest treball es van obtenir per transducció generalitzada amb lisats P1 vir (veure Materials i mètodes apartat 2.4.3) obtinguts sobre les soques BSN26H i BSN26Y respectivament. Als nous mutants se'ls va anomenar MG1655H i MG1655Y. Un cop obtinguts aquests mutants senzills, també es va construir la soca doble mutant *hha ydgT* per transducció de la mutació *hha* al nou mutant MG1655Y prèviament curat de la resistència a Cm (veure Materials i mètodes apartat 2.5.1.3). Aquesta última soca es va anomenar MG1655HY.

#### 3.1.2. Fenotip hemolític dels mutants *hha*, *ydgT* i del doble mutant *hha ydgT*

La producció de la toxina  $\alpha$ -hemolisina en *E. coli* es troba altament regulada. Les proteïnes associades al nucleòide H-NS i Hha interaccionen per tal de silenciar l'expressió d'aquesta toxina en determinades condicions ambientals tals com baixa temperatura o alta osmolaritat (Madrid *et al.*, 2002b). El fenotip dels mutants *hns* i/o *hha* és fàcilment perceptible en plaques d'agar sang on aquests mutants, que tenen incrementada l'expressió d' $\alpha$ -hemolisina, mostren halos d'hemòlisi molt grans. Els paràlegs d'H-NS i d'Hha (les proteïnes StpA i YdgT respectivament) presents en el cromosoma d'*E. coli* poden atenuar parcialment el fenotip mutant *hns* i *hha* (Paytubi *et al.*, 2004). Cap d'aquests dos paràlegs és capaç de compensar totalment la manca d'H-NS i d'Hha. Tot i això, un doble mutant *hha ydgT* mostra una major desregulació dels determinants de virulència en comparació amb el mutant senzill *hha* (Vivero *et al.*, 2008). A la Fig. 3.1 s'observa la desregulació pel que fa a l'expressió de la toxina  $\alpha$ -hemolisina del mutant *hha ydgT* quan es transforma amb el plasmidi hemolític pANN202-312R, un plasmidi de mitjà número de còpies que conté l'operó *hly* del plasmidi parental pHly152 (Godessart *et al.*, 1988).



**Fig. 3.1.** Fotografia de colònies hemolítiques en plaques LB agar sang de la soca MG1655 (pANN202-312R) (A) i del doble mutant *hha ydgT* MG1655HY (pANN202-312R) (B) on s’aprecien les diferències pel que fa al diàmetre de l’halo d’hemòlisi.

Durant l’estudi de la caracterització de les propietats hemolítiques del doble mutant *hha ydgT* de la soca d’*E. coli* MG1655 (soca MG1655HY), es va observar un fenotip inesperat. Quan la soca MG1655HY era transformada amb el plasmidi pANN202-312R, es van detectar colònies no hemolítiques a les plaques d’agar sang quan aquestes contenien l’antibiòtic kanamicina (marcador de la mutació *hha*). Sorprenentment, l’aparició de derivats no hemolítics depenia de la presència o no de kanamicina en el medi de cultiu. L’anàlisi del procés implicat en l’aparició de clons no hemolítics s’ha considerat com un nou apartat dins del contingut d’aquest treball, degut a la rellevància dels resultats que s’han obtingut (veure apartat Resultats 3.2.).

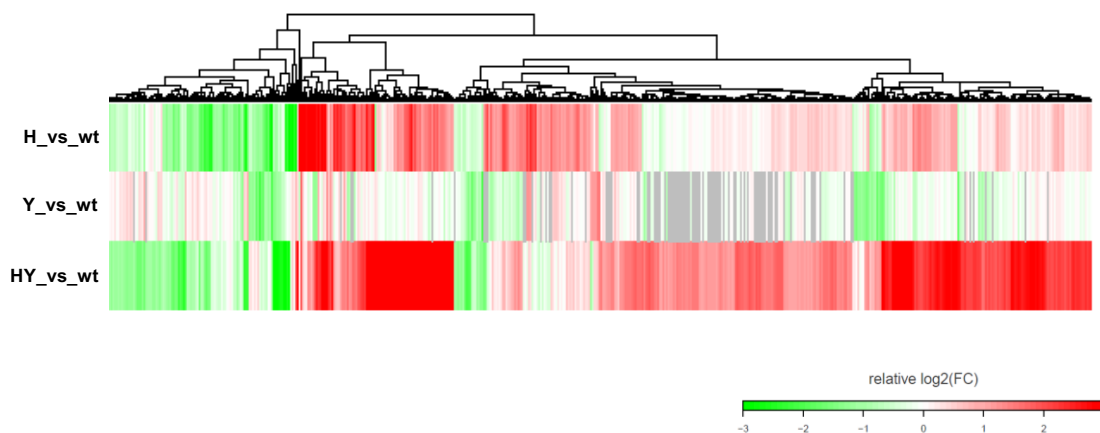
### **3.1.3. Anàlisi transcriptòmica de mutants *hha*, *ydgT* i del doble mutant *hha ydgT***

Un cop obtinguts els mutants i confirmat el seu fenotip hemolític, es va decidir fer un estudi transcriptòmic de mutants independents *hha* i *ydgT* de la soca MG1655 d’*E. coli*.

Es va aïllar l’ARN total de la soca salvatge, dels mutants *hha*, *ydgT* i el doble mutant *hha ydgT* (veure apartat Materials i mètodes 2.7.1) a partir de cultius crescuts en medi LB a 37°C fins a una  $DO_{600} = 0,6$ . Les mostres van ser processades per la Plataforma “Functional Genomics Core” (FGC) de l’Institut de Recerca Biomèdica (IRB) en microxips GeneChip® *E. coli* Genome 2.0 Array de la casa Affymetrix. La Unitat de Bioinformàtica dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB) es va encarregar del tractament de les dades i de l’elaboració dels corresponents llistats de gens alterats, “heatmaps” i diagrames de Venn.

### 3.1.3.1. Anàlisi global dels gens alterats: “heatmaps” i diagrames de Venn

Per tenir una idea general del patró d’expressió gènica dels mutants analitzats i poder fer comparacions entre ells, és útil la realització de “heatmaps”. En aquest tipus de diagrames es representa el patró de gens alterats mostrant, en diverses intensitats de color verd i vermell, els gens reprimits i induïts respectivament. La intensitat dels colors indica els nivells d’expressió o repressió d’un determinat gen, la qual cosa se sol expressar com a  $\log_2$  (FC) o directament com a FC (on FC significa “fold change”). El valor de P ajustat ens indica la probabilitat d’obtenir valors no significatius. En aquest treball es van considerar significatius els valors de P ajustat inferiors a 0,05. L’ordre en què estan ordenats els gens correspon a raons filogenètiques tal i com es veu representat a la part superior del “heatmap” de la Fig. 3.2. En aquesta figura es representen els patrons d’expressió gènica dels mutants MG1655H (H), MG1655Y (Y) i MG1655HY (HY) respecte a la soca salvatge MG1655 (wt).



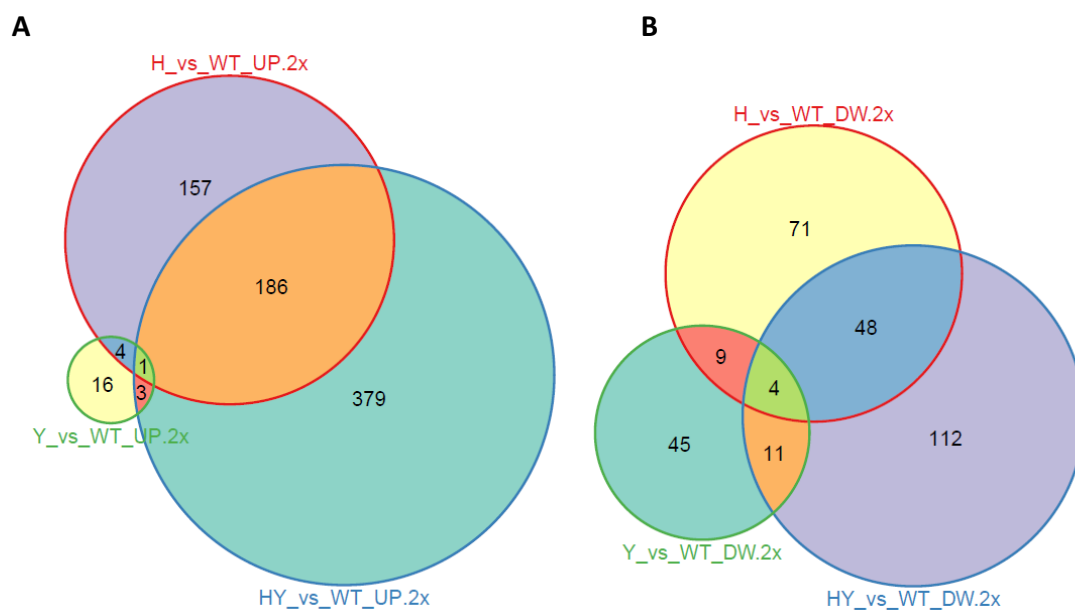
**Fig. 3.2.** “Heatmap” on es representa el patró d’expressió gènica dels mutants senzills *hha* (H) i *ydgT* (Y) i del doble mutant *hha ydgT* (HY) comparat amb el de la soca salvatge (wt) (FC>1,5x i P-valor ajustat<0,05). En verd s’indiquen els gens reprimits i en vermell els induïts (respecte a la soca salvatge). Els gens marcats en blanc no es troben alterats en aquell mutant.

Les principals conclusions que s’extreuen del “heatmap” de la Fig. 3.2 són que el patró d’expressió gènica d’un mutant *hha* és força diferent al d’un mutant *ydgT* i que el doble mutant *hha ydgT* té un patró similar al del mutant senzill *hha* però amb uns nivells de repressió i inducció més pronunciats (verd i vermell més intensos). Dit d’una altra manera, la doble mutació *hha ydgT* potencia els efectes observats en el mutant *hha* i no



els del mutant *ydgT*. Això és consistent amb la hipòtesi que la proteïna YdgT compensa parcialment la pèrdua de la proteïna Hha, però també indica que la proteïna YdgT té també altres funcions.

Els diagrames de Venn són representacions gràfiques que ens permeten visualitzar els diversos conjunts de gens induïts (“upregulated”, UP) o reprimits (“downregulated”, DW) en les soques estudiades respecte a la soca salvatge (wt), i determinar el nombre de gens comuns entre elles. A partir de les dades obtingudes de l’anàlisi transcriptòmica visualitzades a través dels diagrames de Venn (Fig. 3.3), es pot observar que el mutant *hha* té un número de gens alterats molt superior al del mutant *ydgT*. El doble mutant *hha ydgT* mostra un patró d’expressió gènica amb un número de gens desregulats superior al del mutant *hha*, indicant que la manca de les dues proteïnes paràlogues provoca efectes sumatoris de desregulació.



**Fig. 3.3.** Diagrames de Venn on es representa el volum de gens induïts (A) i reprimits (B) dels mutants senzills *hha* (H), *ydgT* (Y) i el doble mutant *hha ydgT* (HY) comparat amb el de la soca salvatge (wt) (FC>1,5x i P-valor ajustat<0,05).

Per altra banda, observem en el diagrama de Venn de la Fig. 3.3 que el mutant *hha* té més gens induïts (348) que reprimits (132), i que amb el mutant *ydgT* passa el contrari (69 gens reprimits i 24 gens induïts). Això ens estaria indicant que, mentre que la

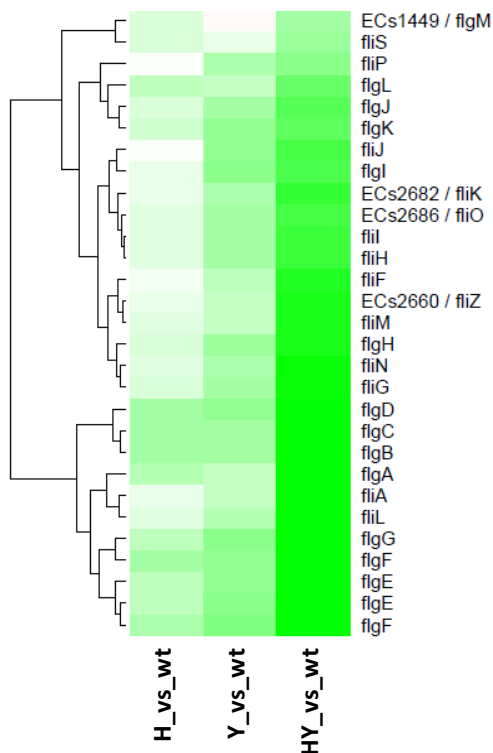
proteïna Hha té una funció predominantment repressora, YdgT actuaria com un inductor o activador.

### **3.1.3.2. Anàlisi de l'expressió gènica diferencial entre mutants *hha*, *ydgT* i el doble mutant *hha ydgT***

La revisió del llistat de gens alterats en els mutants *hha*, *ydgT* i *hha ydgT* respecte a la soca salvatge es va realitzar amb l'ajuda d'eines bioinformàtiques com les presents en la “Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes” (KEGG). La KEGG és una base de dades de gens i genomes que conté aplicacions útils com el “KEGG Mapper”. Aquesta aplicació permet visualitzar el conjunt de gens afectats en un microarray agrupats formant part d'una ruta metabòlica, una ruta de processament de la informació genètica o ambiental, un procés cel·lular, etc., de tal manera que gràcies a un codi de color que indica els nivells d'expressió es pot tenir una idea general de les alteracions dins d'aquell sistema o ruta. D'aquesta manera, es van poder observar diferències en els patrons d'expressió gènica entre els tres mutants objecte d'estudi. A continuació, es detallen algunes de les principals diferències observades:

- **Gens dels operons de motilitat**

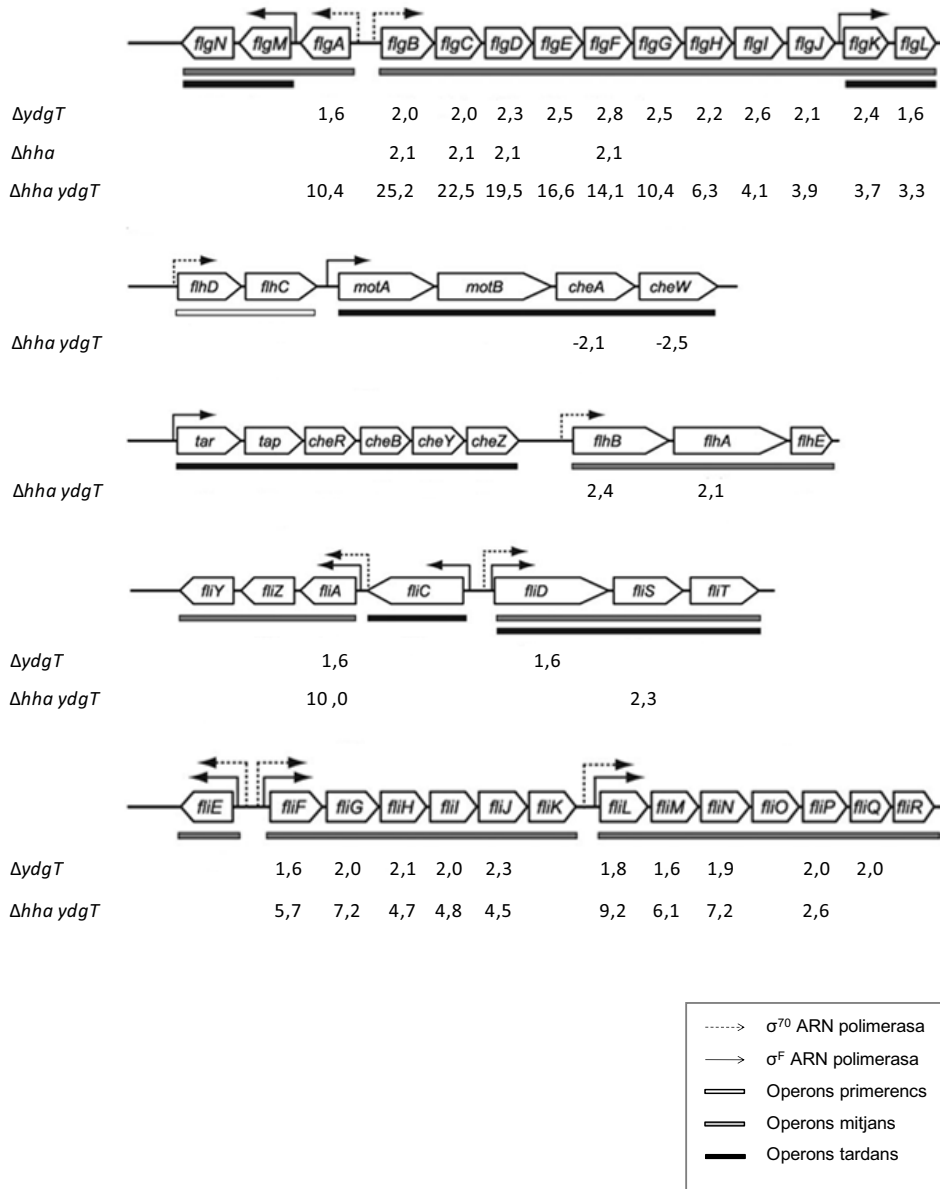
Una de les primeres diferències que es va observar entre els mutants estudiats feia referència a gens pertanyents als operons de motilitat i quimiotaxi. A la Fig. 3.4 es detallen els gens relacionats amb la motilitat i el grau de repressió (intensitat de color verd) en mutants *hha* (H), *ydgT* (Y) i *hha ydgT* (HY) respecte a la soca salvatge (wt) en un diagrama “heatmap”.



**Fig. 3.4.** “Heatmap” on es representa el patró d’expressió dels gens flagel·lars dels mutants senzills *hha* (H) i *ydgT* (Y) i del doble mutant *hha ydgT* (HY) comparat amb el de la soca salvatge (wt) (FC>1,5x i P-valor ajustat<0,05). En verd s’indiquen els gens reprimits respecte a la soca salvatge. Els gens marcats en blanc no es troben alterats en aquell mutant.

A la columna corresponent al mutant *hha* de la Fig. 3.4 es mostren en blanc alguns dels gens flagel·lars, la qual cosa indica que no hi ha diferències respecte a la soca salvatge. El mutant *ydgT*, en canvi, mostra gairebé tots els gens reprimits però amb un FC molt menor al que mostra el doble mutant *hha ydgT*. Habitualment, tal i com s’ha esmentat, un doble mutant *hha ydgT* té un patró d’expressió gènica similar al d’un mutant *hha* però de manera potenciada. En el cas dels gens flagel·lars, però, ens trobem davant d’una excepció ja que són els gens alterats en el mutant *ydgT* els que es veuen potenciats per la doble mutació *hha ydgT*.

A la Fig. 3.5 es detallen els valors de FC (FC>1,5x i “P.value adjusted”<0,05) per cadascun dels gens alterats distribuïts en els corresponents operons de motilitat en els tres mutants estudiats.



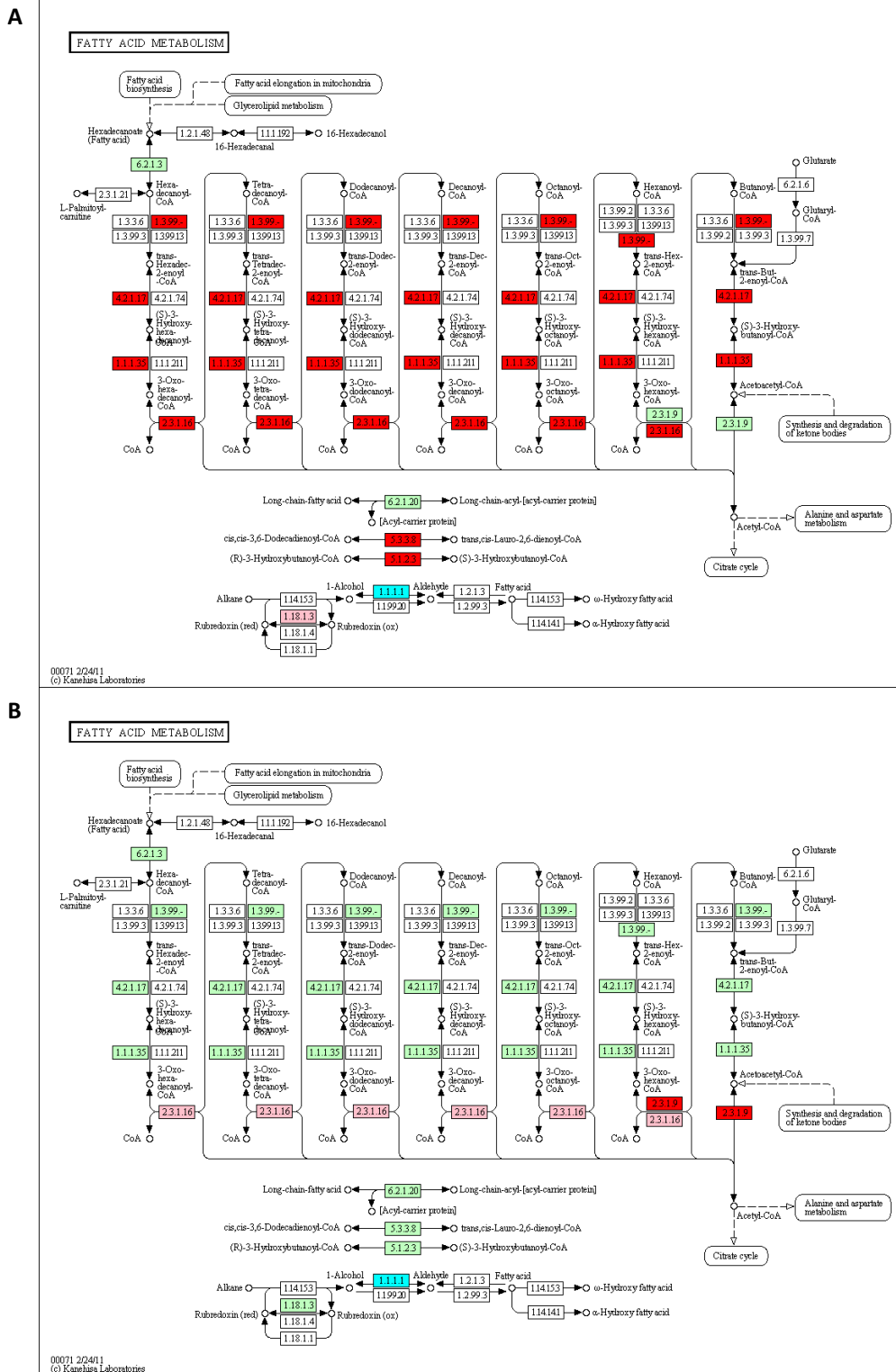
**Fig. 3.5.** Esquema dels diferents operons de motilitat i quimiotáxi d’*E. coli*. Els números sota dels diversos ORF indiquen el “fold change” (FC) negatiu o nivell de repressió dels corresponents mutants respecte a la soca salvatge.

Si ens fixem en el doble mutant *hha ydgT*, els valors de FC són, en molts casos, considerablement més elevats que en el mutant *ydgT*. A més, el doble mutant *hha ydgT* té un major número de gens alterats.

- **Gens implicats en rutes metabòliques**

La mutació *hha* provoca una important desregulació a nivell metabòlic en *E. coli*. En un mutant *hha* trobem una gran quantitat de gens alterats pertanyents a rutes metabòliques

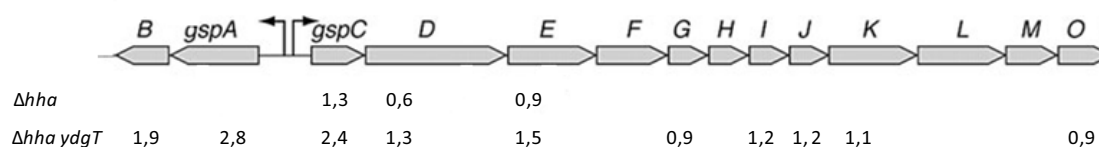
(143) a diferència del mutant *ydgT* (31). En el mutant *hha* es troba alterat el metabolisme de: purines, butanoat, arginina i prolina, alanina, aspartat i glutamat, pirimidina, glioxilat i descarboxilat, piruvat, fenilalanina, glicina, serina i treonina, beta-alanina, àcids grassos, galactosa, fructosa i manosa. En el mutant *ydgT*, només algunes d'aquestes rutes es troben també afectades, tot i que amb un número molt més reduït de gens alterats i amb una menor intensitat respecte a la soca salvatge. Un bon exemple d'aquest fet és la ruta metabòlica dels àcids grassos, en la qual el mutant *hha* té 29 dels gens d'aquesta ruta induïts amb un FC>2, mentre que el mutant *ydgT* només té dos gens induïts amb aquests mateixos valors de FC (Fig. 3.6).



**Fig. 3.6.** Representació del patró d'expressió dels gens del metabolisme dels àcids grassos en un mutant *hha* (A) i en un mutant *ydgT* (B) obtinguda utilitzant l'aplicació bioinformàtica KEGG Mapper. El codi de colors permet conèixer el nivell d'expressió (Fold Change, FC) d'un determinat gen: en vermell (FC>2), en rosa (2 <FC>1,5), en blau (-2 <FC <-1,5), en verd clar (no expressat diferencialment respecte a la soca salvatge) i en blanc (no anotat en aquest organisme).

• **Gens del sistema de secreció tipus II**

El sistema de secreció tipus II (T2S), present en diversos bacteris patògens Gram-negatius, consisteix en un complex multiproteic que intervé en l'alliberament de factors de virulència. Alguns dels gens que codifiquen pel sistema de secreció tipus II, pertanyents a l'operó *gsp*, es troben desregulats en el mutant *hha* i en el doble mutant *hha ydgT*, però no en el mutant *ydgT*. Tant en els mutants *hha* com en el doble mutant *hha ydgT* l'expressió dels gens *gsp* es troba induïda respecte a la soca salvatge (Fig. 3.7). Tot i això, el nombre de gens alterat i el nivell d'inducció (FC) és més elevat en el doble mutant *hha ydgT* que en el mutant *hha*.



**Fig. 3.7.** Representació esquemàtica de l'operó *gsp* situat al min. 74,5 del cromosoma 'd'*E. coli* K12 en el qual s'indiquen els valors de FC o nivells d'inducció dels mutants *hha* i *hha ydgT* respecte a la soca salvatge.

L'operó *gsp* se sap que està reprimat per H-NS (Francetic *et al.*, 2000). Per tant, veient les alteracions en el FC dels gens *gsp* en els mutants *hha* i *hha ydgT*, podem afirmar que Hha té també un paper en el silenciament de l'operó *gsp*, segurament en complex amb H-NS. En canvi, YdgT probablement estaria implicat en la regulació de l'expressió d'aquests gens només en el cas que Hha no estigués disponible.

Aquests resultats evidencien que, si bé una de les funcions de la proteïna YdgT és suplir parcialment la funció de la proteïna Hha, també té funcions reguladores específiques, diferents a les de la proteïna Hha.

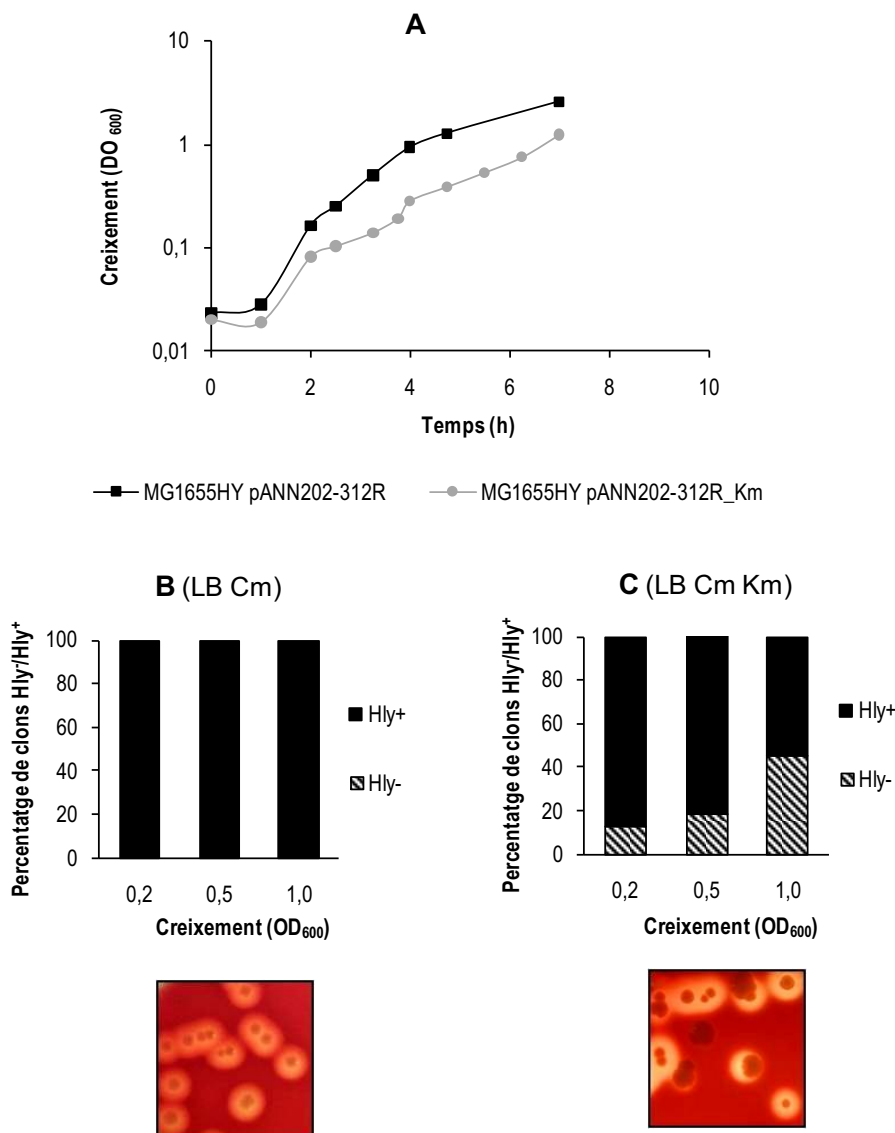
## **3.2. Anàlisi de l'origen de clons no hemolítics que apareixen en mutants *hha ydgT* portadors del plasmidi pANN202-312R**

Aquest apartat sorgeix de l'estudi del fenotip hemolític de la soca doble mutant *hha ydgT* (apartat Resultats 3.1) durant el qual es va observar l'aparició de derivats no productors d'  $\alpha$ -hemolisina quan es transformava el plasmidi pANN202-312R (Fig. 3.8C). Degut a la observació d'aquest fenotip inesperat, es va considerar important estudiar aquest procés en profunditat.

### **3.2.1. Els mutants d'*E. coli* que sobreexpressen l' $\alpha$ -hemolisina segreguen colònies no hemolítiques en presència de l'antibiòtic kanamicina**

Durant l'estudi del fenotip hemolític de mutants *hha ydgT* el primer que es va realitzar fou la transformació del plasmidi hemolític pANN202-312R a aquesta soca doble mutant. El pANN202-312R es tracta d'un plasmidi hemolític de mitjà número de còpies que conté l'operó *hly* del plasmidi parental pHly152 clonat en el vector de clonació pACYC184 en la diana *SalI* (Godessart *et al.*, 1988). La selecció dels transformants es va realitzar en plaques d'LB agar sang amb cloramfenicol (Cm), marcador del plasmidi, i kanamicina (Km), marcador de la mutació *hha*. A les 24 hores es podia observar una barreja de colònies hemolítiques i no hemolítiques. Sorprenentment, si es repetia aquesta transformació i se sembraven plaques d'agar sang només amb Cm, a les 24 hores totes les colònies eren hemolítiques. En conseqüència, es va decidir estudiar la naturalesa dels derivats no hemolítics i la seva relació amb la presència de kanamicina en el medi. Per això, a partir d'un cultiu de tota la nit de la soca MG1655HY (pANN202-312R) en medi LB Cm es van inocular (1:100) dos erlenmeyers que contenien LB Cm i LB Cm Km. Es van seguir les corbes de creixement corresponents i es va quantificar el número de colònies hemolítiques i no hemolítiques, plaquejant en plaques d'LB agar sang a partir de diverses alíquotes de diferents punts al llarg de les dues corbes de creixement (Fig. 3.8).



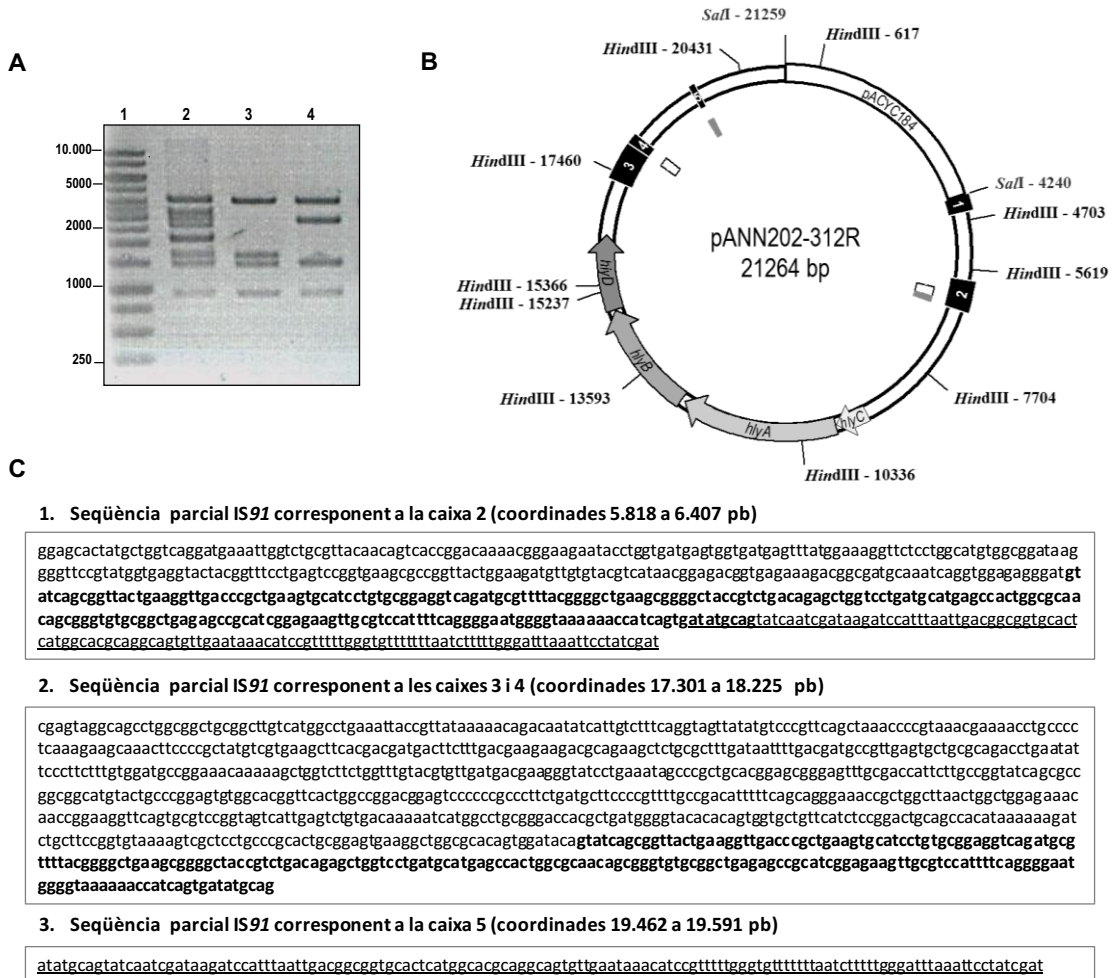


**Fig. 3.8.** A. Corbes de creixement de la soca MG1655HY (pANN202-312R) en absència i presència de kanamicina (25 mg/l). B i C mostren el percentatge de colònies no hemolítiques (Hly<sup>-</sup>) detectades en plaques d'agar sang en diferents estadis del creixement en absència (B) i presència (C) de kanamicina.

Si comparem el creixement del doble mutant portador del plasmidi hemolític amb i sense kanamicina, observem que disminueix la taxa de creixement del cultiu amb kanamicina. A més, en aquest segon cas apareix una quantitat de colònies no hemolítiques que s'incrementa al llarg de la corba de creixement (Fig. 3.8C).

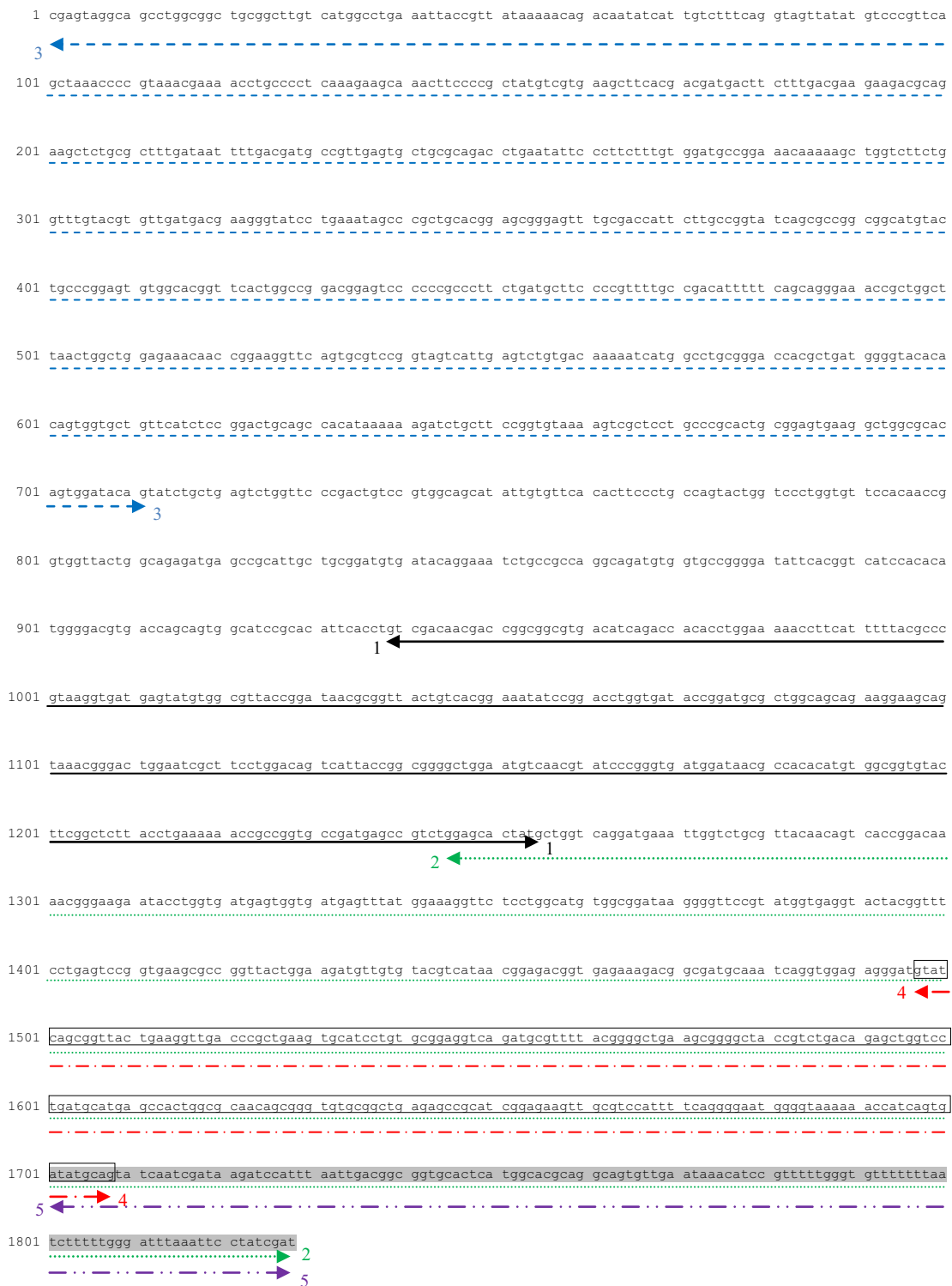
### 3.2.2. Els derivats Hly<sup>-</sup> del plasmidi pANN202-312R aïllats de la soca MG1655HY mostren dos patrons de restricció diferents

Per tal de conèixer l'origen del fenotip Hly<sup>-</sup>, es van aïllar els plasmidis de trenta clons no hemolítics (obtinguts en 6 experiments independents) i es va dur a terme l'anàlisi de restricció amb l'enzim *Hind*III. Tots els clons analitzats contenien dos únics patrons de restricció els quals corresponien a dues possibles delecions (Fig. 3.9A). Per altra banda, es va seqüenciar (apartat Materials i mètodes 2.6.4) el fragment *Sal*I/*Sal*I (17.010 pb) del plasmidi pANN202-312R pertanyent a l'operó hemolític del plasmidi parental pHly152 i es van localitzar totes les dianes *Hind*III. Amb la informació obtinguda tant de l'anàlisi de restricció com de la seqüència del fragment *Sal*I/*Sal*I del plasmidi hemolític, es van poder determinar les regions entre les quals tenia lloc la recombinació que causava la delecio de l'operó hemolític en ambdós patrons (Fig. 3.9B, caixes blanques i grises internes en el mapa del plasmidi). Aquestes regions van resultar estar incloses en seqüències d'inserció IS91 parcials que es trobaven flanquejant l'operó hemolític del plasmidi pANN202-312R. De fet, l'operó hemolític present en aquest plasmidi està flanquejat per cinc IS91 parcials (Fig. 3.9B, caixes negres 1-5 inserides en el mapa del plasmidi). Estudis d'hibridació previs havien indicat la presència de seqüències IS91 flanquejant l'operó hemolític del plasmidi pHly152 (Zabala *et al.*, 1982). Els nostres estudis de seqüenciació van completar aquesta informació i van indicar que es tracta de seqüències parcials IS91. A la Fig. 3.9C es detallen les seqüències IS91 parcials que contenen les regions on es produeix la recombinació causant de la delecio de l'operó hemolític en ambdós patrons. Dins d'aquestes seqüències, s'indica en negreta les regions on es produeix la delecio corresponent a les caixes blanques de la Fig. 3.9B i subratllades les regions corresponents a les caixes grises de la Fig. 3.9B. Si observem aquests dos parells de seqüències en negreta i subratllades veiem que són iguals entre sí. Per tant, podem dir que ens trobem davant d'un fenomen de recombinació que es produeix entre seqüències idèntiques presents en un plasmidi. Aquest procés comporta la pèrdua de la regió d'ADN flanquejada per les dues seqüències idèntiques, en aquest cas del determinant hemolític.



**Fig. 3.9.** **A.** Patrons de restricció amb l'enzim *Hind*III del plasmidi pANN202-312R hemolític (carril 2) i de dos plasmidis aïllats de colònies no hemolítiques cadascun amb una de les dues deleccions descrites (carrils 3 i 4). El carril 1 mostra el marcador de pes molecular. **B.** Mapa del plasmidi pANN202-312R on es mostren les dianes de restricció *Hind*III, les 5 seqüències IS91 parcials (caixes negres 1-5) flanquejant el determinant hemolític i les regions dins d'aquestes seqüències IS91 on té lloc la recombinació (caixes blanques i grises internes). **C.** Seqüències pertanyents a les IS91 parcials 2, 3-4 i 5 dins de les quals es troben les seqüències repetides en negreta i subratllades corresponents a les caixes internes del mapa blanques i grises respectivament.

Si situem les cinc seqüències parcials dins de la seqüència completa IS91 observem que aquelles que contenen les regions repetides per les quals té lloc l'escissió (enquadrat i ressaltat en gris) es troben a l'extrem 3' (Fig. 3.10).



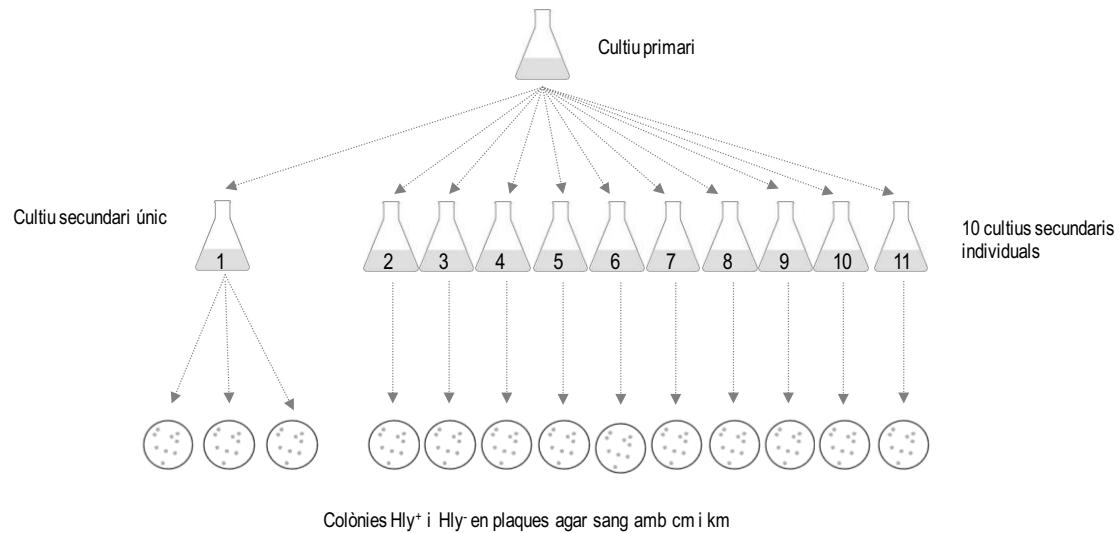
**Fig. 3.10.** Seqüència completa IS91 on s'indiquen les posicions de les 5 seqüències IS91 parcials trobades flanquejant l'operó hemolític en el plasmidi pANN202-312R. Enquadrat i ressaltat en gris s'indiquen les seqüències repetides per on té lloc la recombinació corresponents a les caixes blanques i grises respectivament de la Fig. 3.9B.

### **3.2.3. La presència de kanamicina provoca l'aparició de clons Hly<sup>-</sup> i no selecciona mutants preexistents**

La presència de kanamicina en el medi de cultiu podria ser la causa de l'aparició de colònies no hemolítiques però també podria estar seleccionant clons Hly<sup>-</sup> preexistents en el medi de cultiu. Per tal d'aclarir això, es va dur a terme l'assaig de la fluctuació dissenyat per Luria i Delbrück per demostrar els bacteris podien generar resistència a medis adversos no com a conseqüència d'una resposta adaptativa, sinó com a conseqüència de mutacions aleatòries (Luria i Delbrück, 1943). En aquest experiment, Luria i Delbrück van utilitzar 20 cultius petits amb una concentració inicial de  $10^3$  cèl·lules d'*E.coli*/ml i un cultiu gran amb la mateixa concentració de cèl·lules. Van deixar créixer ambdós tipus de cultius fins a aconseguir una concentració de  $10^9$  cèl·lules d'*E. coli*/ml (al voltant de 20 generacions). Cadascun dels cultius petits es va sembrar per separat en una placa que havia estat coberta amb una densa capa de fag T1. D'altra banda, van prendre mostres del cultiu gran o massiu i les van sembrar per separat en diverses plaques cobertes també amb una densa capa de fag T1. Després d'un temps d'incubació, en algunes plaques van créixer colònies d'*E. coli* resistents al fag T1. Si la resistència fos deguda a una adaptació fisiològica induïda per la presència del fag T1, seria esperable que la taxa de cèl·lules resistents fos la mateixa d'un cultiu a un altre. Per contra, si la resistència és a causa d'una mutació a l'atzar i poc freqüent que ha tingut lloc en alguna de les 20 generacions transcorregudes des de l'inici dels cultius, en cada cultiu petit la mutació s'hauria produït en un moment diferent: en alguns al principi (apareixent com a resultat moltes cèl·lules resistents), en altres al final (apareixent poques cèl·lules resistents) i en altres fins i tot ni s'hauria produït (no hi hauria cèl·lules resistents). Per tant, en els cultius petits s'observaria una variació gran en el nombre de colònies resistents. Aquest darrer cas fou l'observat per Luria i Delbrück pel fag P1. El cultiu gran o massiu serveix com a control, ja que s'espera que totes les mostres preses d'aquest cultiu tinguin el mateix comportament degut a que procedeixen del mateix cultiu gran i comparteixen la mateixa història.

En el nostre cas, a partir d'un cultiu de tota la nit de la soca MG1655HY (pANN202-312R) es van inocular onze cultius en medi LB Cm. Aquests cultius es van incubar varies generacions fins a una  $DO_{600}=1$  i, de deu dels onze cultius es van plaquejar dilucions adequades per fer recomptes de colònies hemolítiques i no hemolítiques en

plaques d'agar sang amb Cm i Km. Del cultiu restant es va realitzar aquest recompte per triplicat (Fig. 3.11).



**Fig. 3.11.** Esquema de l'assaig de fluctuació.

Es va calcular el percentatge de clons no hemolítics a cada placa i es va determinar la mitjana i la variància per cadascun dels cultius (Taula 3.1). Els tres recomptes fets a partir del cultiu únic representen un control de la variància deguda a la manipulació de les mostres.

Cultiu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Mitjana	Variància
Percentatge de clons Hly <sup>-</sup>		95,9	78,8	94,1	86,6	73,2	81,1	79,7	92	80,5	73,7	83,5	66,8
		82,0										82,85	54,1
		90,9											

**Taula 3.1.** Resultats obtinguts a l'assaig de fluctuació

A diferència de l'experiment amb el fag T1 dut a terme per Luria i Delbrück, les dades de variància calculades en el nostre cas pel que fa al percentatge de clons no hemolítics van ser similars tant pel cultiu únic com pels deu cultius individuals (Taula 3.1). Això significa que les diferències observades en els deu cultius individuals eren degudes a

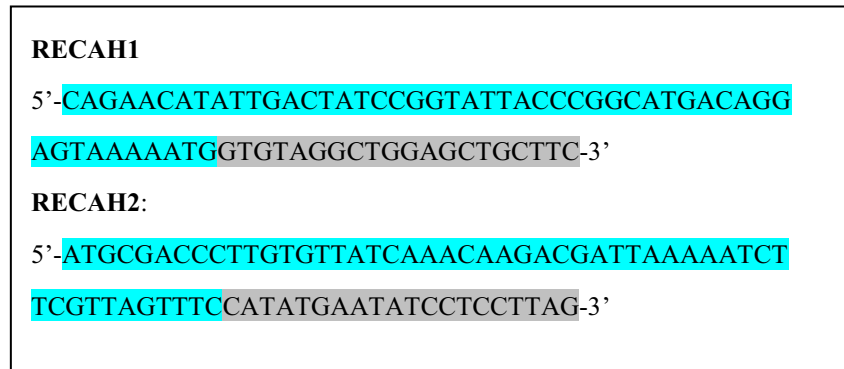
variacions experimentals, de la mateixa manera que passava en les tres plaques sembrades a partir del cultiu únic. Per tant, podem afirmar que és la kanamicina present a les plaques d'agar sang la responsable de l'aparició de clons Hly<sup>-</sup>. Si la kanamicina estigués seleccionant clons Hly<sup>-</sup> preexistents, observariem grans diferències en els recomptes de colònies no hemolítiques en els deu cultius individuals ja que el nombre de clons Hly<sup>-</sup> preexistents presents en cada cultiu seria diferent (a diferència de les tres plaques sembrades a partir del cultiu únic).

### **3.2.4. Paper de RecA, RpoS i la resposta SOS en el procés d'aparició de clons Hly<sup>-</sup> a la soca MG1655HY (pANN202-312R)**

#### **3.2.4.1. Efecte de la mutació *recA* en la producció de clons Hly<sup>-</sup> a la soca MG1655HY (pANN202-312R)**

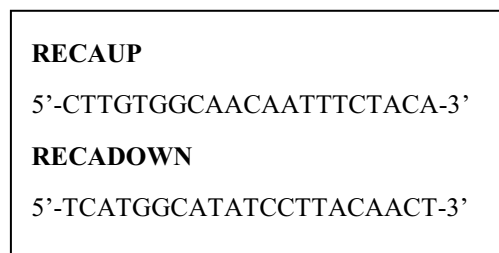
Tenint en compte la funció de la proteïna RecA en diversos processos de recombinació homòloga, vam voler estudiar el paper d'aquesta proteïna en el procés de deleció de l'operó *hly*. Per dur a terme aquest estudi, es va construir el corresponent mutant *recA* de la soca MG1655HY (pANN202-312R) i es van reproduir els mateixos experiments anteriors (corbes en absència/presència de Km i posterior determinació del percentatge de clons Hly<sup>-</sup> en diferents estadis del creixement).

El mutant MG1655HY*recA* es va construir seguint el protocol d'inactivació de gens cromosòmics utilitzant fragments de PCR (veure apartat 2.5.1 de Materials i mètodes). En primer lloc, es van dissenyar els oligonucleòtids RECAH1 i RECAH2 (Fig. 3.12) situats en el gen *recA* (nucleòtids 2.821.789-2.821.833 i 2.820.701-2.820.752 del genoma d'*E. coli* MG1655, respectivament) però amb una part homòloga a les regions P1 i P2 del plasmidi pKD3.



**Fig. 3.12.** Oligonucleòtids utilitzats per la construcció del mutant MG1655HY*recA* seguint el protocol d'inactivació de gens cromosòmics utilitzant fragments de PCR descrita per Datsenko i Wanner. En blau es destaquen les regions homòlogues al gen *recA* i en gris les seqüències homòlogues a P1 i P2 del plasmidi pKD3.

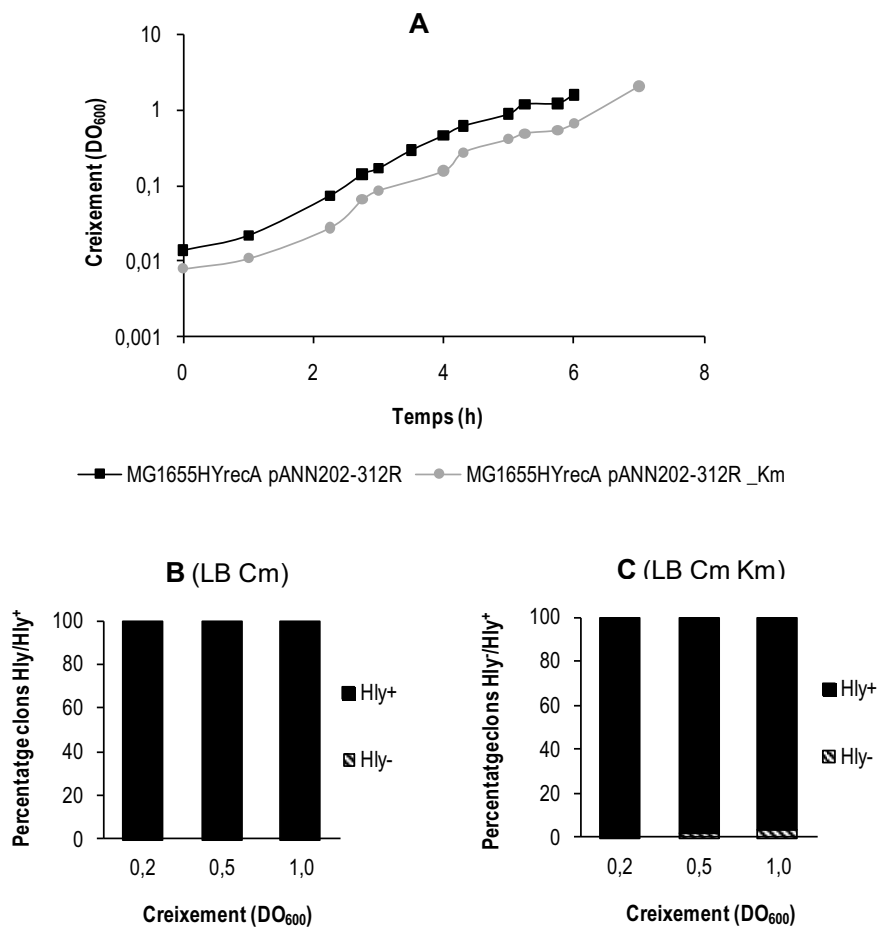
Els oligonucleòtids RECAH1 i RECAH2 es van utilitzar per amplificar la resistència a Cm del plasmidi pKD3. El producte de PCR resultant es va utilitzar per mutagenitzar el gen *recA* a la soca MG1655HY. Els clons recombinants es van seleccionar en plaques d'LB agar que contenien Cm i es va confirmar tant per PCR amb els oligonucleòtids RECAUP i RECADOWN (Fig. 3.13), els quals hibriden a 5' i a 3' del gen *recA*, com per la impossibilitat d'obtenir colònies transductants després de realitzar la transducció del gen *holE* amb lisats del fag P1vir obtinguts sobre la soca MG1655 $\Delta$ *holE*.



**Fig. 3.13.** Oligonucleòtids utilitzats per comprovar la mutació *recA* de la soca MG1655HY*recA*.

El creixement de la soca MG1655HY*recA* (pANN202-312R) en absència/presència de Km va evidenciar que aquest antibiòtic també provocava una disminució en la taxa de creixement i generava l'aparició de colònies no hemolítiques (Fig. 3.14). Tot i això, la proporció de clons Hly<sup>-</sup> era molt inferior que en la soca que expressava *recA* (Fig. 3.8B i C).





**Fig. 3.14.** A. Corbes de creixement de la soca MG1655HY*recA* (pANN202-312R) en absència i presència de kanamicina (25 mg/l). B i C mostren el percentatge de colònies no hemolítiques detectades en plaques d'agar sang en diferents estadis del creixement en absència (B) i presència (C) de kanamicina.

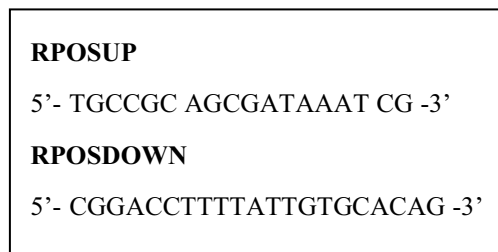
L'anàlisi de restricció amb l'enzim *Hind*III va evidenciar que tots els plasmidis no hemolítics aïllats contenien una de les dues deleccions descrites. Aquests resultats indiquen que RecA té un paper en el procés de recombinació entre seqüències parcials IS91, però les deleccions poden produir-se també en absència d'aquesta proteïna.

### 3.2.4.2. Efecte de la mutació *rpoS* en la producció de clons Hly<sup>-</sup> a la soca MG1655HY (pANN202-312R)

Lombardo i col·laboradors (2004) van identificar RpoS com un element important perquè tinguin lloc mutacions i amplificacions d'ADN en fase estacionària. Per aquest motiu, es va decidir estudiar si la deleció de l'operó *hly* requeria la funció de la proteïna RpoS. Per dur a terme aquest estudi, es va construir el mutant MG1655HY*rpoS*

(pANN202-312R) i es va dur a terme l'anàlisi de la producció de clons Hly<sup>-</sup> d'aquesta soca en presència/absència de l'antibiòtic Km.

El mutant MG1655HY*rpoS* es va obtenir per transducció generalitzada amb lisats de P1vir obtinguts de la soca mutant *rpoS* RH90. Els oligonucleòtids utilitzats per comprovar la mutació es detallen a la Fig. 3.15.

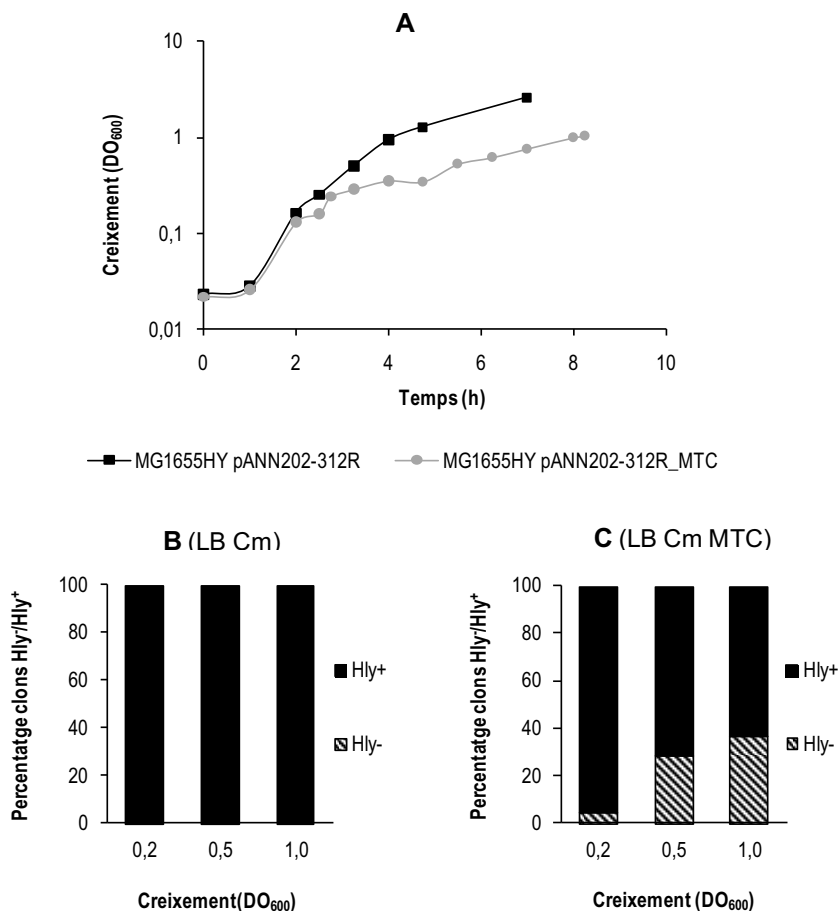


**Fig. 3.15.** Oligonucleòtids utilitzats per comprovar la mutació *rpoS* de la soca MG1655HY*rpoS*.

La taxa de creixement de la soca MG1655HY*rpoS* (pANN202-312R) es va veure reduïda en presència de Km. La proporció de colònies no hemolítiques detectades a partir del cultius que contenen Km va ser similar que en la soca MG1655HY (pANN202-312R) (Fig. 3.8B i C), i els clons Hly<sup>-</sup> aïllats van resultar contenir una de les dues deleccions prèviament caracteritzades. Això indica que RpoS no estaria implicat en el procés de recombinació entre seqüències parcials IS91.

### **3.2.4.3. Efecte de la inducció de la resposta SOS en la producció de clons Hly<sup>-</sup> a la soca MG1655HY (pANN202-312R)**

Un dels efectes descrits pels antibiòtics bactericides, inclosa la kanamicina, és la producció de radicals hidroxil altament nocius que provoquen, entre altres respostes, l'activació del sistema SOS (Kohanski *et al.*, 2007). Per aquest motiu, vam voler estudiar l'efecte d'un inductor de la resposta SOS (mitomicina C) sobre la taxa de creixement i l'aparició de colònies Hly<sup>-</sup> a la soca MG1655HY (pANN202-312R). El disseny de l'experiment era el mateix que s'havia realitzat fins al moment però en aquest cas enlloc de Km afegíem mitomicina C (MTC) (Fig. 3.16).



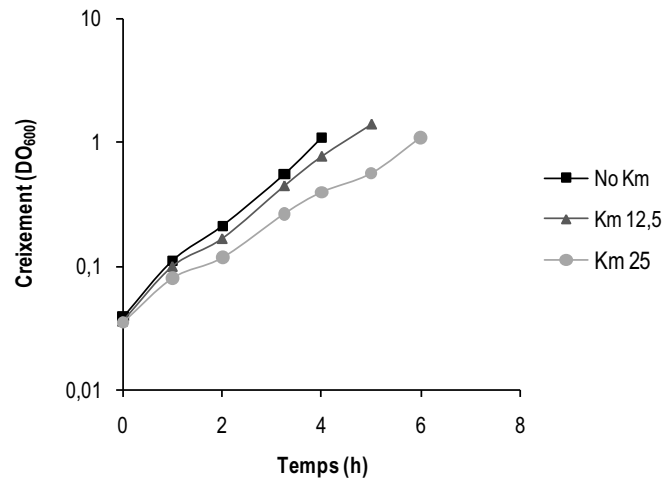
**Fig. 3.16.** A. Corbes de creixement de la soca MG1655HY (pANN202-312R) en absència i presència de mitomicina C (MTC) (0,5 mg/l). B i C mostren el percentatge de colònies no hemolítiques detectades en plaques d'agar sang en diferents estadis del creixement en absència (B) i presència (C) de mitomicina C.

Tal com s'observa a la figura, l'activació de la resposta SOS provoca el mateix efecte que la kanamicina (Fig. 3.8). Per tant, els mecanismes inductors de la resposta SOS, com alguns antibiòtics, també afecten a l'estabilitat de l'operó *hly* del plasmidi pANN202-312R a la soca MG1655HY.

### 3.2.5. La combinació de la sobreexpressió d' $\alpha$ -hemolisina i l'elevada concentració de kanamicina provoca l'aparició de clons Hly<sup>-</sup> a la soca MG1655HY (pANN202-312R)

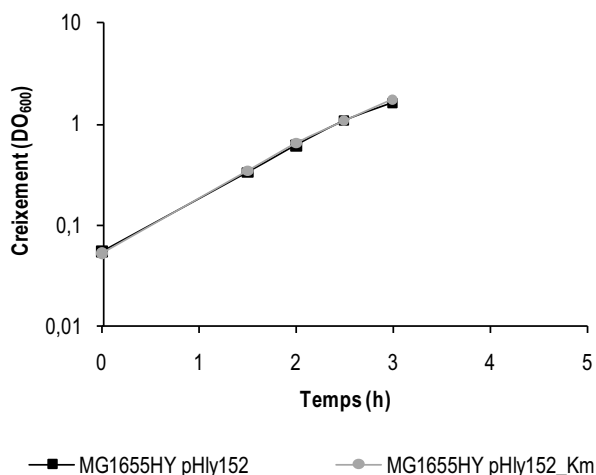
Al següent punt d'aquest estudi vam avaluar el paper independent i conjunt de la concentració de Km al medi de cultiu i de la sobreproducció d' $\alpha$ -hemolisina en la generació de clons Hly<sup>-</sup>. Per això, en primer lloc es van dur a terme corbes de

creixement de la soca MG1655HY (pANN202-312R) en medi LB Cm amb dues concentracions diferents de Km (12,5 i 25 mg/l) i sense Km (Fig. 3.17) i es van sembrar alíquotes dels tres cultius en agar sang per tal de veure la presència de clons Hly<sup>-</sup>. Una concentració de 12,5 mg/l va afectar molt lleugerament el creixement. Addicionalment, només es van observar colònies no hemolítiques en les plaques d'agar sang sembrades a partir de la corba que contenia Km a una concentració de 25 mg/l.



**Fig. 3.17.** Corbes de creixement de la soca MG1655HY (pANN202-312R) en absència de kanamicina i en presència de 12,5 mg/l i 25 mg/l de kanamicina.

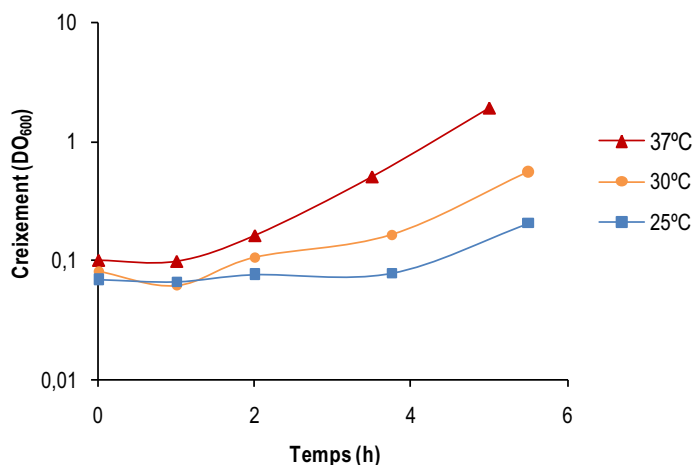
Per altra banda, vam voler saber si l'elevada expressió de la toxina  $\alpha$ -hemolisina (que sabem té lloc en un doble mutant *hha ydgT*) també era un requeriment perquè es produís l'aparició de clons Hly<sup>-</sup>. Per això, es va dur a terme el mateix tipus d'experiment (corbes en absència i presència de 25 mg/l de Km i recomptes en agar sang) amb el doble mutant MG1655HY però amb el plasmidi parental pHly152, de baix número de còpies (Fig. 3.18).



**Fig. 3.18.** Corbes de creixement de la soca MG1655HY (pHly152) en absència de kanamicina i en presència de 25 mg/l de kanamicina.

En aquest cas, la presència de Km al medi no va produir cap efecte a nivell de creixement ni l'aparició de colònies no hemolítiques.

Per tal de descartar la possibilitat que la Km influís en la producció de clons Hly<sup>-</sup> degut al seu efecte sobre el creixement, vam provocar aquest mateix efecte (disminució de la taxa de creixement) cultivant la soca MG1655HY (pANN202-312R) a unes temperatures de 30°C i 25°C i analitzant la producció de clons Hly<sup>-</sup> al llarg de les corbes (Fig. 3.19). Malgrat que el creixement a 30°C i 25°C va afectar significativament la taxa de creixement, no es van detectar clons Hly<sup>-</sup>.



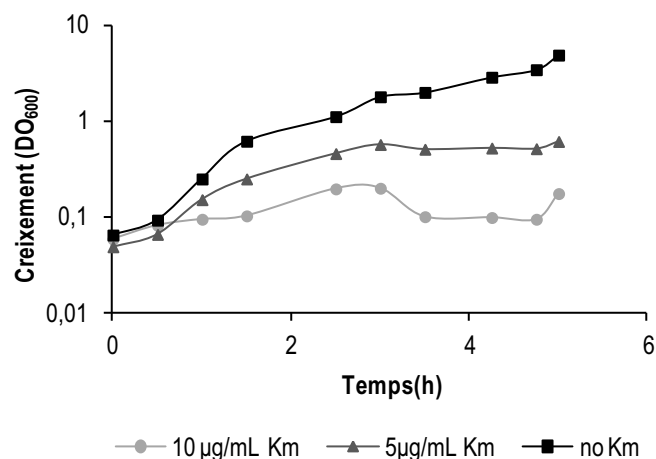
**Fig. 3.19.** Corbes de creixement de la soca MG1655HY (pANN202-312R) a diferents temperatures: 25°C, 30°C i 37°C.

També vam decidir descartar que la presència dels plasmidis alterés la sensibilitat de la Km de la soca MG1655HY. Per fer això, es va determinar la concentració mínima inhibidora (CMI) per l'antibiòtic Km de la soca MG1655HY i de la mateixa amb els plasmidis pANN202-312R (hemolític) i pANN202-312R'( $\Delta hly$ ) (no hemolític). La CMI de la soca MG1655HY (pANN202-312R) va resultar ser 10 vegades inferior a la observada per la soca MG1655HY (100  $\mu\text{g/ml}$  *versus* 1.000  $\mu\text{g/ml}$ ). Tot i això, la soca portadora del plasmidi no hemolític pANN202-312R' va mostrar una CMI similar a la de la soca sense plasmidis. Per tant, l'efecte del plasmidi pANN202-312R sobre la CMI no és degut al replicó del plasmidi sinó a la presència dels gens *hly*.

Aquests estudis evidencien que una concentració de Km superior a 12,5 mg/l té tant efecte sobre la taxa de creixement com sobre l'estabilitat de l'operó *hly* si les cèl·lules sobreproduïxen  $\alpha$ -hemolisina. De fet, per la soca MG1655HY (pANN202-312R), una concentració de 25 mg/l de Km és subinhibitòria. Una possible explicació d'aquest efecte subinhibitori seria que els elevats nivells d'ATP necessaris per la síntesi i secreció de l'  $\alpha$ -hemolisina reduïssin la capacitat de les cèl·lules d'*E. coli* d'inactivar (fosforilar) l'elevada concentració de Km present en el medi (25 mg/l). Per tant, en soques sobreproductores d'  $\alpha$ -hemolisina (mutant *hha ydgT*) la quantitat de Km activa (no fosforilada) seria superior a la de la soca salvatge.

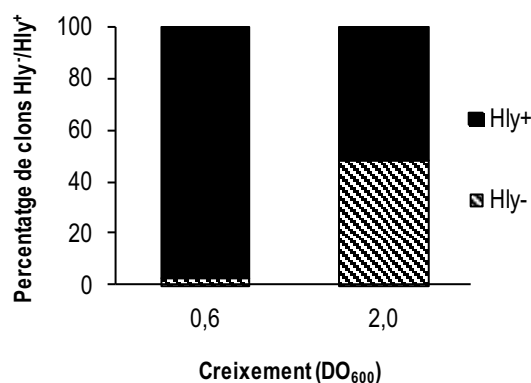
### **3.2.6. Efecte de concentracions subinhibitòries de kanamicina sobre la taxa de creixement i la producció d' $\alpha$ -hemolisina a la soca salvatge MG1655 (pHly152)**

Considerant l'anterior hipòtesi, es va decidir estudiar l'efecte de concentracions subinhibitòries de Km en una soca salvatge MG1655 portadora d'un plasmidi parental de baix número de còpies (pHly152). En primer lloc, es va determinar la concentració de kanamicina màxima que permetia el creixement. Després de provar les concentracions de kanamicina 5 i 10 mg/l, es va concloure que la concentració de Km subinhibitòria per la soca MG1655 (pHly152) era de 5 mg/l (Fig. 3.20).



**Fig. 3.20.** Corbes de creixement de la soca MG1655 (pHly152) en absència de kanamicina i en presència de 5 mg/l i 10 mg/l de kanamicina.

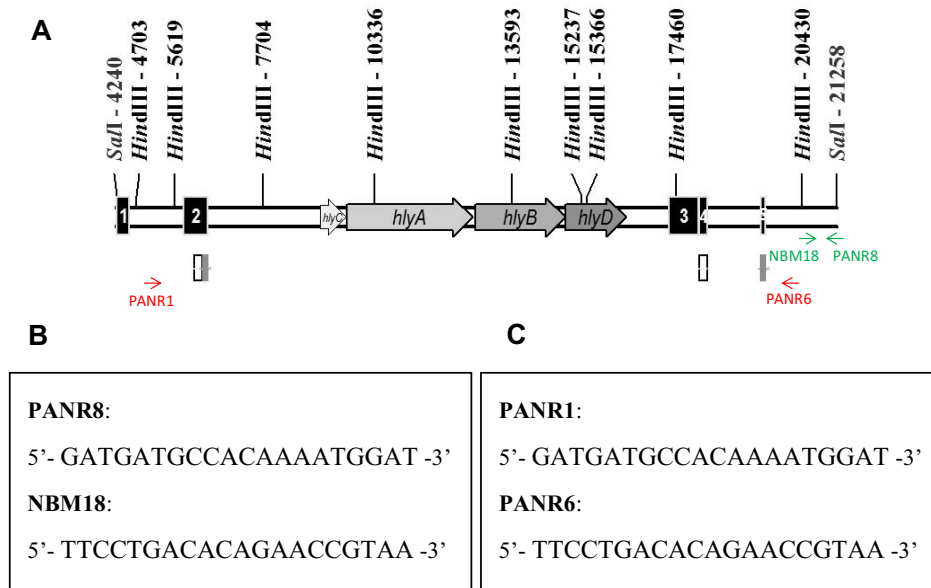
De la mateixa manera que amb el doble mutant *hha ydgT*, a partir de cultius de la soca MG1655 (pHly152) en LB Km 5 mg/l, es van sembrar dilucions adequades en plaques d'LB agar sang per tal de determinar la presència de clons no hemolítics al llarg de la corba de creixement. Els percentatges de colònies hemolítiques i no hemolítiques es detallen a la Fig. 3.21.



**Fig. 3.21.** Percentatge de clons Hly<sup>-</sup> de la soca MG1655 (pHly152) detectat en plaques d'LB agar sang sembrades a partir d'un cultiu en LB km (5 mg/l) a DO<sub>600</sub> 0,6 i 2,0.

Com es pot observar a la Fig. 3.21, a una DO<sub>600</sub> de 2,0 gairebé la meitat (48%) de les colònies eren no hemolítiques. Degut a que el plasmidi pHly152 és conjugatiu i no conté cap marcador de resistència a antibiòtic que permeti assegurar la seva presència, el fenotip Hly<sup>-</sup> podia ser degut a la deleció de l'operó hemolític o a la pèrdua o curació

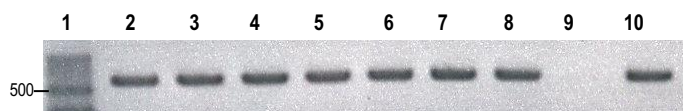
del plasmidi. Per tal de determinar quina de les dues possibilitats (deleció de l'operó hemolític o pèrdua del plasmidi sencer) era la que estava tenint lloc, es va realitzar una PCR amb els oligonucleòtids PANR8 i NBM18 (Fig. 3.22B). Aquests oligonucleòtids són complementaris a dues seqüències del pHly152 situades a la regió del plasmidi que no es perd amb la deleció (Fig. 3.22A, en verd).



**Fig. 3.22.** **A.** Fragment *SalI-SalI* del plasmidi pANN202-312R pertanyent al plasmidi parental pHly152. S'indica l'operó hemolític flanquejat per les 5 seqüències *IS91* parcials (caixes negres 1-5) i les regions dins de les *IS91* 2, 4 i 5 per on té lloc la recombinació (caixes inferiors blanques i grises). També s'indica la posició dels oligonucleòtids per detectar la pèrdua o no del plasmidi (PANR8 i NBM18) i per determinar quina de les dues deleccions ha tingut lloc (PANR1 i PANR6). **B** i **C.** Seqüències dels oligonucleòtids indicats.

L'anàlisi per PCR per detectar la presència del plasmidi pHly152 es va fer a partir de diferents colònies Hly<sup>-</sup> obtingudes dels cultius en medi LB amb una concentració de Km de 5 mg/l (Fig. 3.23).

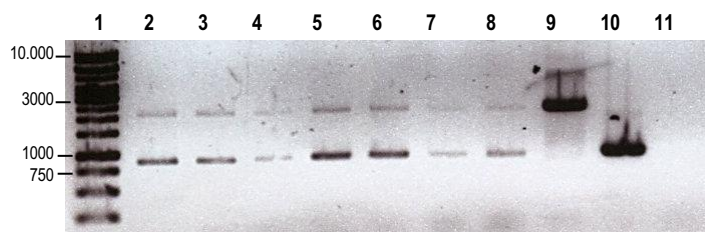




**Fig. 3.23.** Anàlisi per PCR amb els oligonucleòtids PANR8 i NBM18 de 7 clons Hly<sup>-</sup> (carrils 2-8). El carril 9 correspon a la soca MG1655 i el 10 a la mateixa soca portadora del plasmidi hemolític pHly152.

Totes les colònies no hemolítiques obtingudes en diversos experiments independents analitzades per PCR amb els oligonucleòtids PANR8 i NBM18 van resultar contenir el plasmidi. Com a complement a aquest estudi, també es van dissenyar els oligonucleòtids PANR1 i PANR6 (Fig. 3.22C) els quals ens permetien determinar quina de les dues deleccions havia tingut lloc en cada clon Hly<sup>-</sup>. La localització d'aquests oligonucleòtids, flanquejant l'operó hemolític i les seqüències repetides per on té lloc la recombinació, s'indica en vermell a la Fig. 3.22A.

Amb aquesta segona reacció de PCR vam poder evidenciar que ambdues deleccions podien tenir lloc en un mateix clon Hly<sup>-</sup> i que, de fet, això era molt freqüent (Fig. 3.24).

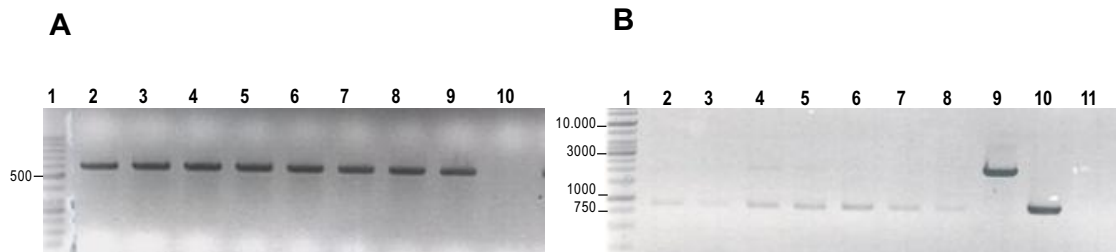


**Fig. 3.24.** Anàlisi per PCR amb els oligonucleòtids PANR1 i PANR6 de 7 clons Hly<sup>-</sup> (carrils 2-8). Els carrils 9 i 10 corresponen als controls de les dues deleccions i el carril 11 a la soca MG1655 portadora del plasmidi hemolític.

### 3.2.7. Efecte d'altres antibiòtics en la taxa de creixement i pèrdua del determinant hemolític

Arribat aquest punt, vam decidir estudiar l'efecte de concentracions subinhibitòries d'altres antibiòtics com l'ampicil·lina (Ap) sobre la soca MG1655 (pHly152). La concentració màxima d'Ap a la que la soca MG1655 (pHly152) era capaç de créixer era de 10 mg/l. Les corbes amb aquesta concentració d'Ap mostraven una taxa de creixement reduïda i les alíquotes sembrades en plaques d'agar sang contenien clons no

hemolítics. Aquests clons van ser analitzats per PCR amb els oligonucleòtids PANR8 i NBM18 per comprovar la presència del plasmidi pHly152 (Fig. 3.25A). Tots els clons testats contenien el plasmidi. L'anàlisi per PCR amb els oligonucleòtids PANR1 i PANR6 ens va indicar la presència de les dues deleccions descrites (Fig. 3.25B).

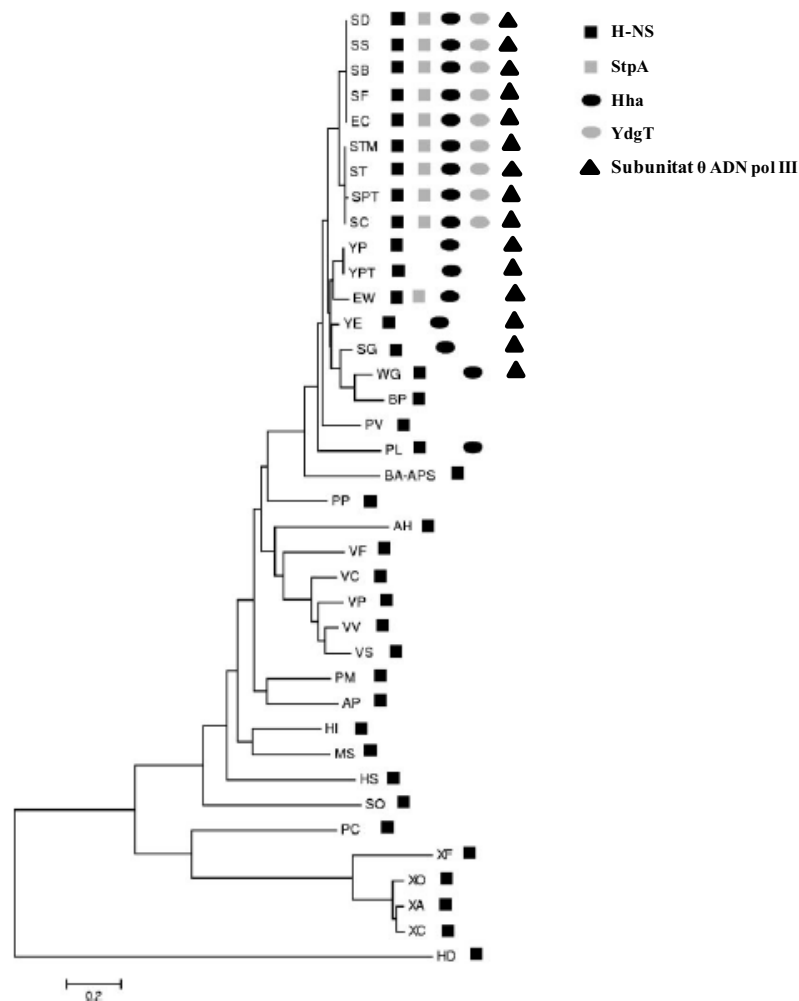


**Fig. 3.25.** **A.** Anàlisi per PCR amb els oligonucleòtids PANR8 i NBM18 de 7 clons Hly<sup>+</sup> de la soca MG1655 (pHly152) obtinguts en el creixement en presència d'Ap (10 mg/l) (carrils 2-8). Carrils 9 i 10 corresponen a les soques MG1655 (pHly152) i MG1655 respectivament. **B.** Anàlisi per PCR amb els oligonucleòtids PANR1 i PANR6 dels 7 clons Hly<sup>+</sup> aïllats (carrils 2-8). Els carrils 9 i 10 corresponen als corresponents controls de les dues deleccions i el carril 11 a la soca salvatge portadora del plasmidi hemolític.

Per tant, l'estabilitat de l'operó *hly* del plasmidi pHly152 és sensible als efectes causats per concentracions subinhibitòries d'antibiòtics en general, i no de la kanamicina en particular.

### 3.3. Similituds estructurals i funcionals entre les proteïnes Hha/YdgT i la subunitat $\theta$ de l'ADN polimerasa III

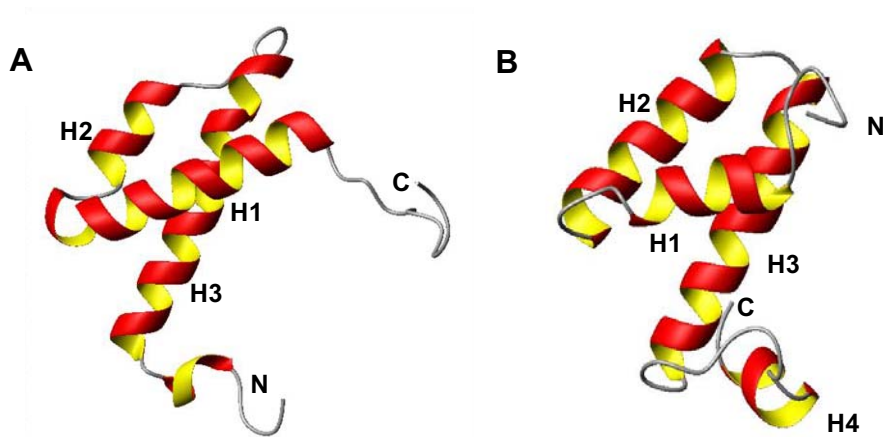
El gen *hha* es troba restringit a la família *Enterobacteriaceae* (Madrid *et al.*, 2007b). Juntament amb el gen *hha*, aproximadament 20 altres gens es troben exclusivament en aquesta família, entre ells el gen *holE* que codifica per la subunitat  $\theta$  de l'ADN polimerasa III. A la Fig. 3.26 s'indica la distribució de les proteïnes H-NS, Hha, YdgT i la subunitat  $\theta$  de l'ADN polimerasa III dins dels  $\gamma$ -Proteobacteris. Alguns endosimbionts de la família d'enterobacteriàcies, degut a processos de reducció genòmica, perden part d'aquests gens. Curiosament, aquests endosimbionts (*Sodalis glossinidus* i *Wigglesworthia glossinida*) retenen els gens *hha* i *holE*. La massa molecular de la subunitat  $\theta$  de l'ADN polimerasa III (codificada pel gen *holE*) és de 8,6 KDa, molt semblant a la de la proteïna Hha (8 KDa). Malgrat que el gen *holE* codifica per una proteïna que forma part de l'ADN polimerasa III, també es troba en elements extracromosòmics com per exemple el fag P1 (Chikova and Schaaper, 2005). Cal destacar que la proteïna Hha també està codificada en plasmidis (Madrid *et al.*, 2002a; Dorman, 2004). Degut a aquestes coincidències, es va decidir estudiar si existia alguna similitud estructural i funcional entre aquesta subunitat del nucli de l'ADN polimerasa III i la família de proteïnes Hha-YmoA.



**Fig. 3.26.** Distribució de les proteïnes H-NS, StpA, Hha, YdgT i la subunitat  $\theta$  de l'ADN polimerasa III en els  $\gamma$ -Proteobacteris. El dendograma mostra la relació filogenètica de la seqüència d'aminoàcids del domini N-terminal de la proteïna H-NS, en el qual s'indica la presència de gens tipus *hns* i tipus *hha* i del gen *holE*.

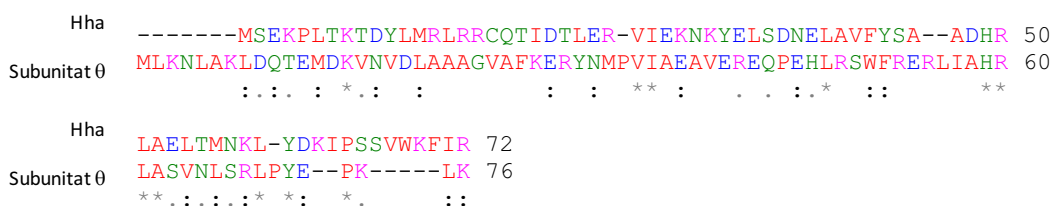
### 3.3.1. Estructura de la subunitat $\theta$ de l'ADN polimerasa III

Gràcies a la col·laboració amb el grup de recerca del Professor M. Pons (RMN Biomolecular), pertanyent a l'Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona (IRB), es va fer una comparació de les estructures terciàries de la subunitat  $\theta$  de l'ADN polimerasa III (**per motius pràctics, malgrat que a la literatura se sol referir com a  $\theta$ , a partir d'aquest punt la referirem com a **HolE****), obtinguda per espectroscopia RMN multidimensional per Keniry *et al.* (2006), i de la proteïna Hha i vam poder establir una similitud estructural entre elles (Fig. 3.27). El nucli central d'ambdues proteïnes era comparable però els extrems carboxi i amino-terminal no es corresponien.



**Fig. 3.27.** Comparació de l'estructura tridimensional de la subunitat  $\theta$  de l'ADN polimerasa III (pdb 2AXD; Keniry *et al.*, 2006) (A) i de la proteïna associada al nucleoide Hha (pdb 1JW2; Yee *et al.*, 2002) (B). Amdues estructures van ser obtingudes per Resonància Magnètica nuclear.

Aquesta similitud estructural entre Hha i HolE no era extrapolable a nivell de seqüència d'aminoàcids, la qual cosa es podia observar al comparar ambdues seqüències (Fig. 3.28).



**Fig. 3.28.** Comparació de les seqüències aminoacídiques de la proteïna associada al nucleoide Hha i de la subunitat  $\theta$  de l'ADN polimerasa III. Els asteriscs indiquen identitat, els dos punts forta similitud i el punt similitud.

Degut a la similitud en l'estructura terciària observada entre Hha i la subunitat  $\theta$  de l'ADN polimerasa III i a que fins al moment no havia estat descrit cap fenotip evident per als mutants *holE*, al marge d'estabilitzar la subunitat exonucleasa  $\epsilon$ , es va plantejar la hipòtesi que la proteïna HolE, addicionalment al paper com a component estructural de l'ADN polimerasa III, pogués tenir un possible paper com a regulador de l'expressió gènica.

### 3.3.2. Interacció de la proteïna HolE amb altres proteïnes

Tenint en compte que la proteïna Hha interacciona amb el regulador global H-NS i que són els complexos Hha-H-NS els que actuen com a regulador transcripcional (Madrid *et al.*, 2007a), el primer que vam voler estudiar va ser la possible interacció d'H-NS amb la subunitat  $\theta$  de l'ADN polimerasa III. Una recerca bibliogràfica va aportar un treball d'interactòmica en el qual se suggeria una possible interacció entre H-NS i HolE detectada per LC-MS/MS però no per MALDI-ToF (Butland *et al.*, 2005).

Bait	Prey	MALDI-ToF	LC-MS/MS
<i>holE</i>	<i>holE</i>	Y	Y
<b>holE</b>	<b>dnaE</b>	Y	Y
<i>holE</i>	<i>dnaK</i>		Y
<b>holE</b>	<b>dnaQ</b>	Y	
<b>holE</b>	<b>dnaX</b>	Y	Y
<i>holE</i>	<i>hns</i>		Y
<b>holE</b>	<b>holA</b>	Y	
<b>holE</b>	<b>holB</b>	Y	
<b>holE</b>	<b>holD</b>	Y	
<i>holE</i>	<i>katG</i>		Y
<i>holE</i>	<i>rplA</i>	Y	
<i>holE</i>	<i>rplL</i>		Y
<i>holE</i>	<i>rplW</i>		Y
<i>holE</i>	<i>rpsB</i>	Y	
<i>holE</i>	<i>rpsF</i>		Y
<i>holE</i>	<i>rpsJ</i>	Y	
<i>holE</i>	<i>rpsP</i>		Y
<i>holE</i>	<i>ssb</i>	Y	
<i>holE</i>	<i>topA</i>		Y
<i>holE</i>	<i>tufA</i>	Y	
<i>holE</i>	<i>ugpB</i>		Y

**Taula 3.2.** Taula extreta de Butland *et al.*, (2005) on s'indica una possible interacció de HolE amb H-NS detectada per LC-MS/MS.

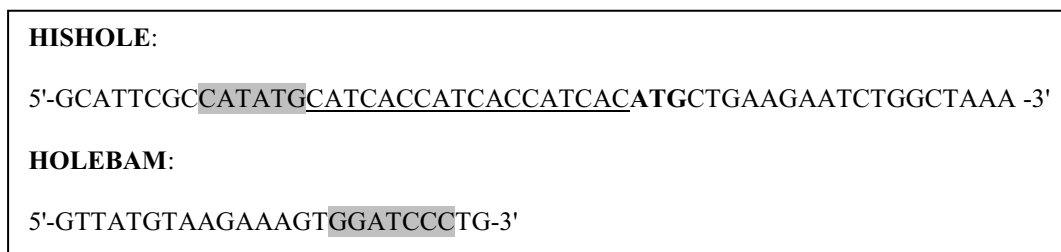
Aquests estudis ens van encoratjar a continuar estudiant el producte del gen *holE* i la seva relació amb les proteïnes associades al nucleòide de les famílies H-NS i Hha.

Partint d'aquesta anàlisi bioinformàtica (Butland *et al.*, 2005) ens vam disposar a determinar la possible interacció *in vitro* de la proteïna HolE amb H-NS i altres proteïnes associades al nucleòide.

### 3.3.2.1. Construcció de la proteïna recombinant His-HolE

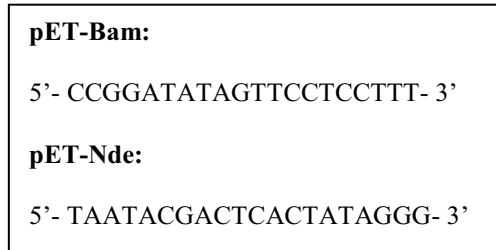
Per estudiar la possible interacció *in vitro* de la proteïna HolE amb H-NS i altres proteïnes associades al nucleoide es va construir una proteïna de fusió His-HolE.

Per a la realització d'aquesta construcció, en primer lloc es va amplificar el gen *holE* de la soca *E. coli* 5K amb els oligonucleòtids HISHOLE i HOLEBAM (Fig. 3.29). L'ús d'aquests oligonucleòtids va permetre introduir una diana per l'enzim de restricció *NdeI* i una cua d'histidines a l'extrem N-terminal i una diana *BamHI* després de l'extrem C-terminal de la proteïna HolE. Aquestes dianes es van utilitzar per la seva posterior clonació en un vector pET15b. La temperatura d'hibridació que es va utilitzar en l'amplificació va ser de 54°C.



**Fig. 3.29.** Oligonucleòtids utilitzats en l'amplificació del gen *holE* per a la clonació en el vector pET15b. En gris es ressalten les dianes *NdeI* i *BamHI*. Subratllat es mostra la cua d'histidines. En negreta es mostra l'inici de traducció de la proteïna HolE.

Després d'aquesta primera amplificació del gen *holE*, es va realitzar una restricció amb els enzims *BamHI* i *NdeI*. A continuació, es va lligar al vector pET15b amb els mateixos enzims. D'aquesta manera, es va obtenir un vector induïble per IPTG amb el gen *holE* clonat amb una cua d'histidines en l'extrem amino-terminal (que vam anomenar pETHis-HolE). El producte d'aquesta lligació es va transformar a la soca d'*E. coli* 5K. Dos transformants independents es van utilitzar per aïllar l'ADN plasmídic i es va comprovar la seqüència de la construcció per seqüenciació (apartat 2.6.4. Materials i mètodes). Es van utilitzar oligonucleòtids que hibridaven en seqüències del propi vector a 5' de la diana *NdeI* i a 3' de la diana *BamHI* (Fig. 3.30). En ambdós casos, la temperatura d'hibridació que es va utilitzar en l'amplificació prèvia a la seqüenciació va ser de 50°C.



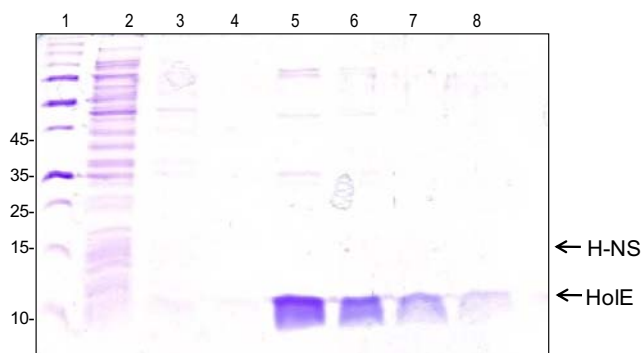
**Fig. 3.30.** Oligonucleòtids utilitzats per a la seqüenciació del gen *his-holE* clonat en el plasmidi pET15b.

### 3.3.2.2. Sobreexpressió i purificació d'His-HolE

Una vegada obtingut el gen *his-holE*, es va procedir a la purificació de la proteïna His-HolE seguint el protocol descrit a l'apartat 2.8.3. de Materials i mètodes. Partint de l'aproximació experimental per evidenciar la interacció d'H-NS amb la proteïna His-Hha (Nieto *et al.*, 2002), es va decidir realitzar el mateix estudi per His-HolE.

El plasmidi pETHis-HolE es va transformar a la soca BL21(DE3). Posteriorment, l'expressió de la proteïna His-HolE es va induir amb IPTG. Finalment, les cèl·lules es van trencar (French-Press, Materials i mètodes 2.8.1.2) i es va obtenir un extracte cel·lular. L'extracte obtingut es va barrejar amb una matriu de Ni<sup>2+</sup>-NTA agarosa. Després de permetre la unió de les proteïnes, i de rentar les no unides amb tampó A (imidazol 20 mM), es van eluir les proteïnes retingudes mitjançant rentats amb tampó A' (imidazol 200 mM) (Materials i mètodes 2.8.3.2). Les proteïnes eluïdes de la matriu de Ni<sup>2+</sup>-NTA agarosa es van analitzar en gels de poliacrilamida en Tris-Glicina-SDS (Materials i mètodes 2.8.4.1) (Fig. 3.31).

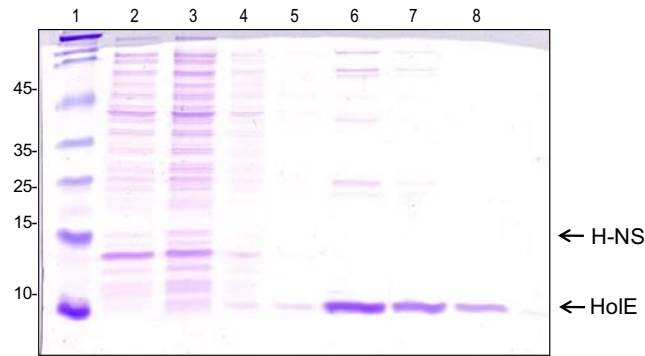




**Fig. 3.31.** Anàlisi electroforètica i tinció amb Coomassie de fraccions eluïdes de Ni<sup>2+</sup>-NTA agarosa. 1) Marcador de pes molecular (PageRuler™ Prestained Protein Ladder de Fermentas), 2, 3 i 4) Rentats de la matriu amb tampó A (20 mM imidazol), 5, 6, 7 i 8) Elució de proteïnes amb tampó A' (200 mM imidazol).

Tal i com s'observa a la figura, la tinció amb Coomassie de les fraccions eluïdes amb 200 mM d'imidazol no va evidenciar la presència de proteïnes amb un pes molecular similar a H-NS (15 kDa). Es va augmentar la sensibilitat de la detecció mitjançant la immunodetecció amb anticossos específics però tampoc es va detectar la presència d'H-NS.

Considerant la hipòtesi que la unió amb H-NS fos molt dèbil, vam pensar de fer el mateix experiment de purificació d'His-HoIE però d'una mescla de dos extractes: BL21(DE3) pETHis-HOLE (*his-hoIE* sobreexpressat) i BL21(DE3) plysS pETHNS (*hns* sobreexpressat). Aquest plasmidi conté el gen *hns* clonat en un vector pET3b i permet la sobreexpressió de la proteïna H-NS sota un promotor induïble per IPTG. L'anàlisi electroforètica i tinció amb Coomassie (Fig. 3.32) i la immunodetecció amb anticossos específics contra H-NS de les fraccions obtingudes tampoc van evidenciar una interacció amb H-NS.

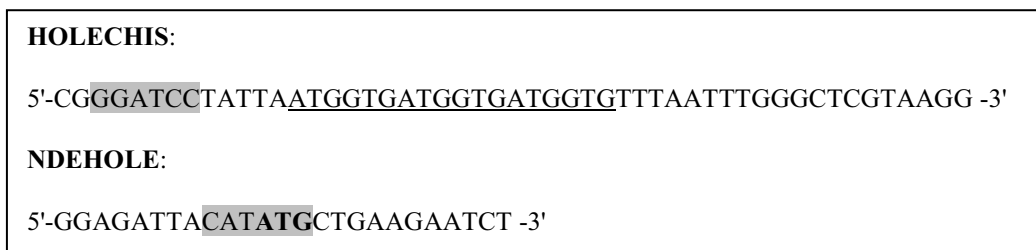


**Fig. 3.32.** Anàlisi electroforètica i tinció amb Coomassie de fraccions eluïdes de Ni<sup>2+</sup>-NTA agarosa de la purificació His-HoIE barrejat amb un extracte que sobreexpressa H-NS. 1) Marcador de pes molecular, 2, 3, 4 i 5) Rentats de la matriu amb tampó A (20 mM imidazol), 6, 7 i 8) Elució de proteïnes amb tampó A' (200 mM imidazol).

### 3.3.2.3. Construcció de la proteïna recombinant HOIECHis

Davant l'evidència que His-HoIE no co-purificava amb H-NS segons el protocol utilitzat, vam pensar com a alternativa, en canviar la cua d'histidines de l'extrem N-terminal al C-terminal de HoIE amb la idea que d'aquesta manera potser es permetia millor la possible interacció amb H-NS.

La construcció del plasmidi pETHOLECHis es va realitzar de manera similar a pETHis-HOLE utilitzant el vector pET15b, però en aquest cas els oligonucleòtids per amplificar el gen *hole* van ser HOIECHIS i NDEHOLE (Fig. 3.33). Aquests oligonucleòtids van permetre la introducció d'una cua d'histidines seguida d'una diana *Bam*HI a l'extrem C-terminal, i d'una diana *Nde*I a l'extrem N-terminal.



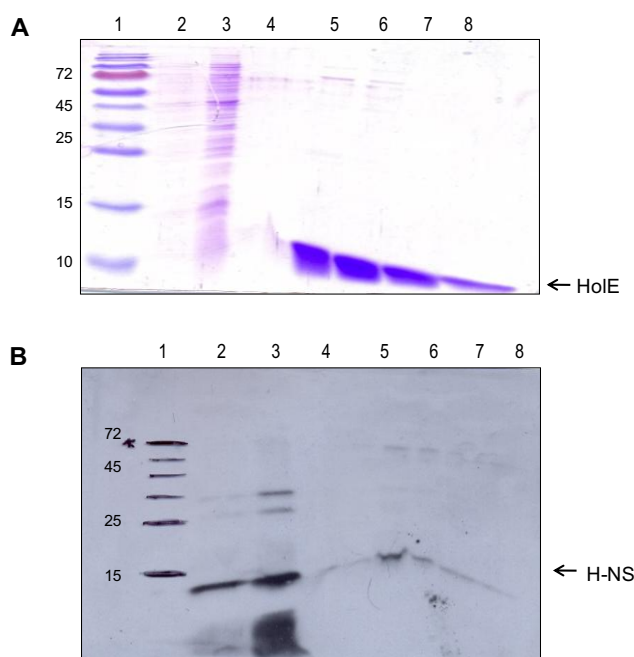
**Fig. 3.33.** Oligonucleòtids utilitzats en l'amplificació del gen *hole-his* per a la clonació en el vector pET15b. En gris es ressalten les dianes *Nde*I i *Bam*HI. Subratllat es mostra la cua d'histidines. En negreta es mostra l'inici de traducció de la proteïna HoIE.

Seguidament, es va dur a terme la restricció amb *Nde*I i *Bam*HI del plasmidi pET15b i la lligació amb la banda corresponent al gen *hole* amb una cua d'histidines en C-

terminal i extrems *NdeI* i *BamHI*. La comprovació de la inserció de *hole* en aquest plasmidi recombinant es va fer tant per PCR com per seqüenciació amb els oligonucleòtids pET-Bam i pET-Nde (Fig. 3.30).

### 3.3.2.4. Sobreexpressió i purificació de HoIECHis

Una vegada construït el vector d'expressió pETHOLECHis, aquest es va transformar a la soca BL21(DE3). Un cop induïda l'expressió de *holeChis* i obtingut l'extracte cel·lular, aquest extracte de HoIE amb cua d'histidines en C-terminal es va barrejar amb un extracte d'H-NS sobreexpressat i es va procedir a la purificació de HoIE per unió de la cua d'histidines a una matriu de Ni<sup>2+</sup>-NTA agarosa (Fig. 3.34).



**Fig. 3.34.** Anàlisi electroforètica tenyida amb Coomassie (A) i immunodetecció amb anti-sèrum anti-H-NS (B) de fraccions eluïdes de Ni<sup>2+</sup>-NTA agarosa després d'unir una barreja d'extractes que sobreexpressaven HoIECHis i H-NS. Carril 1) marcador de pes molecular, carril 2) restes sense unir, carrils 3 i 4) rentats de la matriu R1 i R5 respectivament i carrils 5, 6, 7 i 8) elucions E1, E2, E3 i E4 amb imidazol 200 mM.

Si bé la tinció amb Coomassie (Fig. 3.34A) no va permetre detectar H-NS, la presència d'aquesta proteïna es va evidenciar per immunodetecció amb anticossos anti-H-NS (Fig. 3.34B). Tot i que H-NS va aparèixer també als rentats de la columna, aquest es detecta amb més intensitat a la primera elució amb 200 mM d'imidazol que a l'últim rentat de la columna. Això fa que no es pugui descartar completament una interacció dèbil entre

H-NS i HolE. El fet que H-NS aparegués també en els rentats de la matriu de Ni<sup>2+</sup>-NTA agarosa previs a les elucions ens va fer pensar que potser perquè aquesta interacció es produís era important la presència d'altres proteïnes. A més, investigadors del grup col·laborador de RMN Biomolecular de l'Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona (IRB), van detectar per RMN una interacció dèbil entre la subunitat  $\epsilon$  de l'ADN polimerasa III (la subunitat que interacciona amb HolE en el nucli de l'ADN polimerasa III) i YdgT, la qual es veia afavorida per la presència de HolE (J. García, resultats no publicats). Per aquest motiu, vam decidir realitzar co-purificacions de diverses barreges d'extractes que contenien la subunitat  $\epsilon$  de l'ADN polimerasa III i/o YdgT juntament amb els extractes de HolEC-His i H-NS. Cap dels experiments duts a terme van permetre visualitzar millor una interacció entre la proteïna HolEC-His i H-NS.

### 3.3.3. Anàlisi fenotípica de mutants *holE*

La mutació *holE* ja havia estat estudiada i resultava en cèl·lules sanes sense cap canvi morfològic, i amb un baix o inexistent augment en la freqüència de mutació degut al seu hipotètic paper com a estabilitzador de la subunitat exonucleasa  $\epsilon$  (Slater *et al.*, 1994). Considerant la hipòtesi de l'existència d'una relació estructural i/o funcional entre HolE i les proteïnes Hha/YdgT, vam plantejar la possibilitat que un mutant *holE* no tingués un fenotip detectable perquè les proteïnes Hha/YdgT poguessin suplir la funció de la proteïna HolE (tal i com s'ha evidenciat en altres treballs i també en aquesta memòria per les proteïnes Hha i YdgT). Per confirmar aquesta hipòtesi, es van construir tant mutants senzills en aquest gen com mutants dobles i triples en combinació amb mutacions *hha* i *ydgT*.

#### 3.3.3.1. Construcció de mutants *holE* a la soca d'*E. coli* MG1655

La mutació insercional del gen *holE* es va realitzar seguint el protocol d'inactivació de gens cromosòmics utilitzant fragments de PCR (Materials i mètodes apartat 2.5.1) sobre la soca d'*E. coli* MG1655. Per això, es va partir de la seqüència del gen *holE* (Fig. 3.35) extreta de la seqüència completa del genoma d'*E. coli* K-12 MG1655 (Blattner *et al.*, 1997).

1923000	tattcctttt	tgtaataact	tttttacaga	gcataacctt	gtctaattgc	tgagtcgagg
1923060	atcatcaatt	ccggccttgcc	atcctggctc	actccttagta	acttttgccc	gcgaatgatg
1923120	aggagattaa	gaaatgctgaa	gaatctggct	aaactggatc	aaacagaaat	ggataaagtg
1923180	aatgtcgatt	tggcgcgggc	cgggggtggca	tttaaagaac	gctacaatat	gccggtgatc
1923240	gctgaagcgg	ttgaacgtga	acagcctgaa	catttgcgca	gctggtttcg	cgagcggctt
1923300	attgccacc	gtttggcttc	ggtcaatctg	tcacgtttac	cttacgagcc	caaacttaaa
1923360	taaacttat	acagagttac	actttcttac	ataacgcctg	ctaaattatg	agtattttct

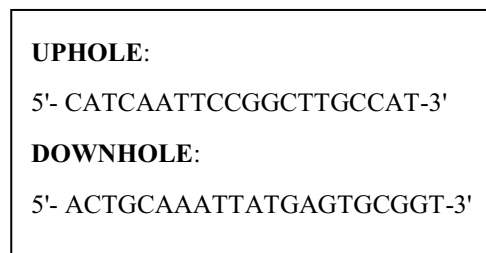
**Fig. 3.35.** Seqüència de nucleòtids del gen *hole* d'*Escherichia coli* K-12 (extret d'*E.coli* K12 MG1655 NC\_000913 regió: 1923132..1923362). Els triplets subratllats i en negreta indiquen inici (fletxa) i final de la traducció. L'estrella indica l'inici de transcripció teòric. En vermell es mostren les regions homòlogues als extrems del gen *hole* corresponents als oligonucleòtids HOLEH1 i HOLEH2 utilitzats en la obtenció del mutant *hole* (veure Fig. 3.11).

Per a la primera reacció de PCR, la qual genera el fragment d'ADN que es recombina amb el cromosoma permetent la inserció del gen de resistència a Cm del plasmidi pKD3 (apartat 2.5.1 de Materials i mètodes), es van dissenyar els oligonucleòtids HOLEH1 i HOLEH2 (Fig. 3.36). L'extrem 5' de l'oligonucleòtid HOLEH1 és homòleg a un nucleòtid aigües amunt de l'inici de traducció de *hole*, i l'extrem 5' de l'oligonucleòtid HOLEH2 es troba 39 nucleòtids després del final de traducció de *hole* (Fig. 3.35, en vermell). D'aquesta manera es va aconseguir delectonar el gen *hole* al complet, des de l'inici fins al final de la traducció. La temperatura d'hibridació de la PCR va ser de 52°C i es va allargar el temps d'hibridació a 45 segons ja que els oligonucleòtids tenien una seqüència de 61 pb.

<b>HOLEH1:</b>
5'- TCTTAGTAACTTTTGCCCGGAATGATGAGGAGATTAA
GAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC -3'
<b>HOLEH2:</b>
5'- AGCAGGCGTTATGTAAGAAAAGTGTAACTCTGTATAAGT
TCATATGAATATCCTCCTTAGT -3'

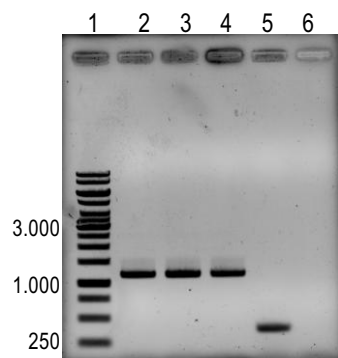
**Fig. 3.36.** Oligonucleòtids utilitzats per a la generació del fragment *Hole*-Cm. En rosa estan ombrejades les seqüències corresponents als extrems del gen *hole*, i en gris les corresponents a les seqüències P1 i P2 respectivament del plasmidi pKD3.

Un cop obtingut el fragment de PCR HOLEH1-HOLEH2, es va electroporar a la soca d'*E. coli* 5K prèviament transformada amb el plasmidi pKD46 seguint les condicions indicades en l'apartat 2.5.1 de Materials i mètodes. Es va fer un escritini per PCR dels possibles mutants a partir de les colònies que van créixer de l'electroporació. Els oligonucleòtids utilitzats per comprovar la deleció del gen *hole* i la presència del "cassette" de Cm són UPHOLE i DOWNHOLE, corresponents a seqüències presents aigües amunt i aigües avall del gen *hole* (Fig. 3.37).



**Fig. 3.37.** Oligonucleòtids utilitzats per a l'amplificació del gen *hole*.

La temperatura d'hibridació d'aquesta reacció de PCR va ser de 56°C. En comprovar els possibles mutants obtinguts, es va poder observar l'aparició d'una banda d'ADN corresponent a 1163 pb, que equivaldria a la mida del fragment *hole-Cm* introduït. En contraposició, l'amplificació del gen salvatge utilitzant aquests oligonucleòtids produïa un fragment de 380 pb (Fig. 3.38).



**Fig. 3.38.** Anàlisi electroforètica en un gel d'agarosa 0,8% on es mostra l'amplificació per PCR del gen *hole* utilitzant els oligonucleòtids UPHOLE i DOWNHOLE dels tres clons mutants (carrils 2, 3 i 4) obtinguts pel protocol d'inactivació de gens cromosòmics utilitzant fragments de PCR. El carril 1 correspon al marcador de pes molecular GeneRuler™ 1 Kb de Fermentas, el carril 5 correspon a la soca salvatge i el 6 al

El mutant *hole* obtingut a la soca d'*E. coli* MG1655 es va anomenar MG1655E.

A continuació, es va procedir a eliminar per recombinació homòloga el gen corresponent a la resistència al cloramfenicol. Per fer-ho, es va utilitzar el plasmidi pCP20 i es va seguir el procediment que es detalla en l'apartat 2.5.1.3 de Materials i mètodes. De cadascun dels mutants es va obtenir gran quantitat de clons no resistents a

l'antibiòtic i que, altra vegada, es van comprovar per PCR pel mateix procediment. En aquest cas, en realitzar la detecció del gen *holE* utilitzant els oligonucleòtids UPHOLE i DOWNHOLE, es va amplificar una banda de 202 pb, corresponent al fragment *holE-Cm* sense la seqüència del gen *cat*.

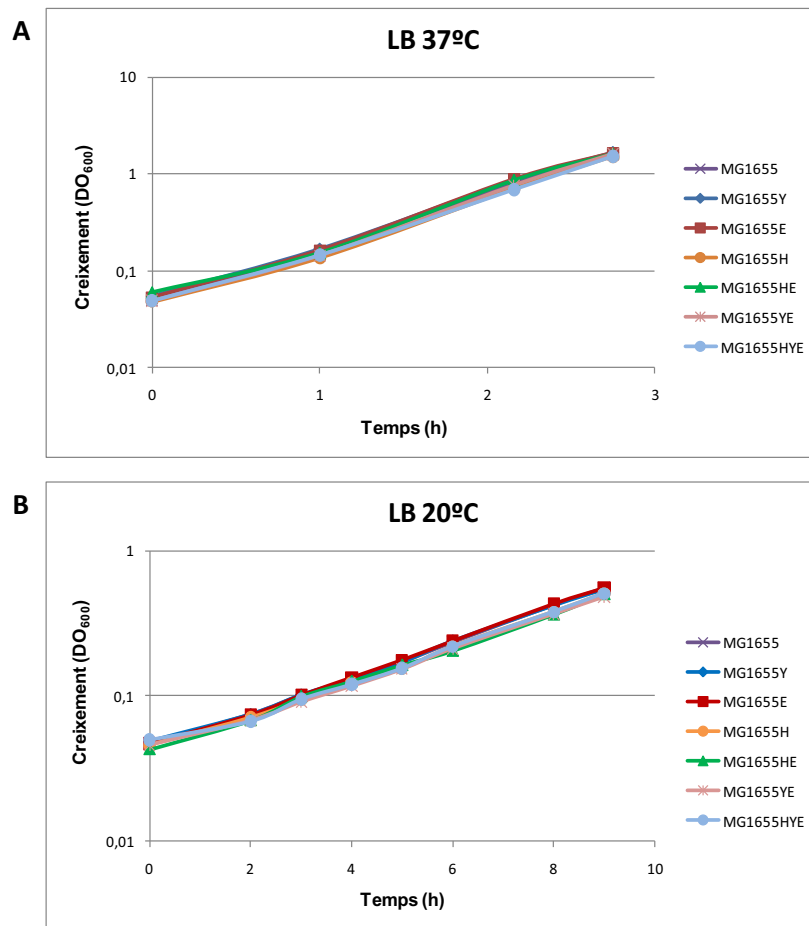
Finalment, es va transduir la mutació *holE* associada a resistència a cloramfenicol als corresponents mutants *hha* (MG1655H) i *ydgT* (MG1655Y), així com al doble mutant MG1655HY. Per això, es va partir de la soca mutant *holE* resistent a Cm per poder utilitzar la resistència a aquest antibiòtic com a marcador de la transducció. Seguint el protocol descrit a l'apartat 2.4.3. de Materials i mètodes, es va obtenir un lisat del fag P1 vir sobre el mutant *holE* resistent a Cm i es va utilitzar per transduir aquesta mutació als mutants *hha*, *ydgT* i *hha ydgT*. D'aquesta manera es van obtenir les soques mutants senzills, dobles i triple per poder-les utilitzar en estudis posteriors.

### **3.3.3.2. Efecte de les mutacions *holE*, *holE hha*, *ydgT holE* i *hha ydgT holE* sobre el creixement d'*E. coli* en diferents condicions de cultiu**

Per tal de determinar si les mutacions obtingudes tenien algun efecte sobre el creixement, es va realitzar el seguiment de la DO<sub>600</sub> de la soca MG1655 i les seves derivades en cultius crescuts en diferents condicions de temperatura i osmolaritat, ja que aquestes són condicions ambientals que influeixen la regulació de l'expressió gènica per les proteïnes associades al nucleòide Hha i H-NS.

Es van utilitzar les soques MG1655, MG1655E (mutant en el gen *holE*), MG1655Y (mutant en el gen *ydgT*), MG1655H (mutant en el gen *hha*), MG1655HE (doble mutant *hha holE*), MG1655YE (doble mutant *ydgT holE*) i MG1655HYE (triple mutant *hha ydgT holE*).

Pel que fa a la temperatura, es va realitzar el seguiment de la DO<sub>600</sub> dels cultius incubats a 37°C i 20°C ( Fig. 3.39A i B respectivament).

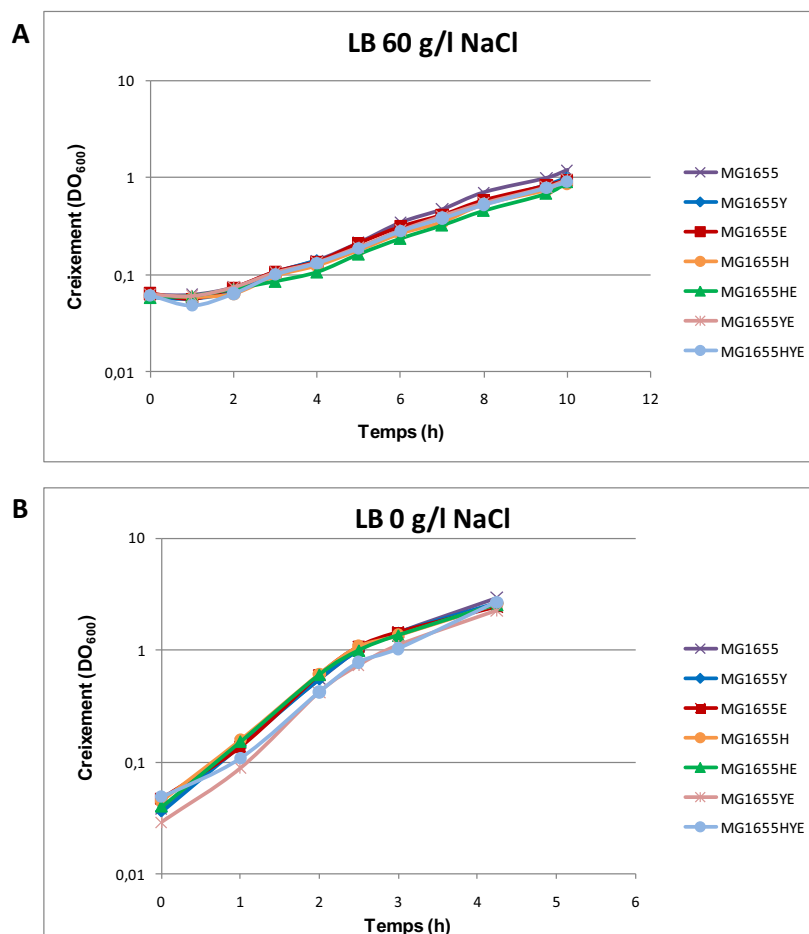


**Fig. 3.39.** Corbes de creixement a 37°C (A) i 20°C (B) de les soques isogèniques MG1655, MG1655Y, MG1655E, MG1655H, MG1655HE, MG1655YE i MG1655HYE.

Com es pot observar a l'anterior figura, el creixement de les diverses soques mutants analitzades és igual entre totes elles a ambdues temperatures. Sembla evident, doncs, que la mutació *holE*, a nivell individual o combinada amb *hha/ydgT*, no afecta al creixement de les soques ni a 37°C ni a 20°C.

Pel que fa a l'osmolaritat, es va seguir igualment la  $DO_{600}$  de cultius incubats a 37°C, en medi LB 60 g/l NaCl i 0 g/l NaCl (Fig. 3.40A i B respectivament).



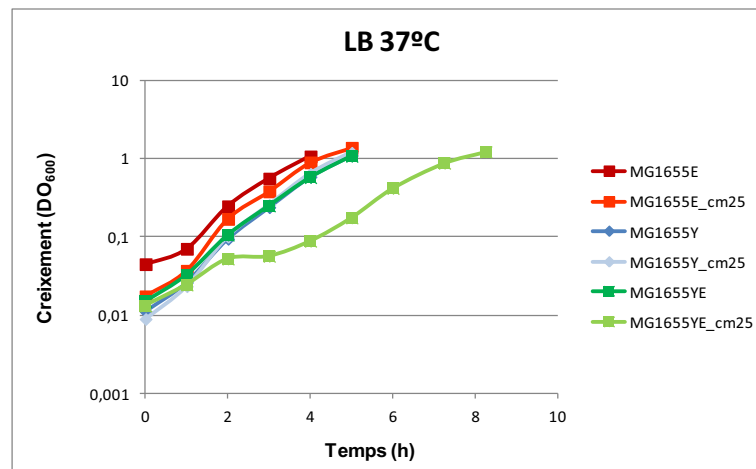


**Fig. 3.40.** Corbes de creixement a 60g/l NaCl (A) i 0g/l NaCl (B) de les soques isogèniques MG1655, MG1655Y, MG1655E, MG1655H, MG1655HE, MG1655YE i MG1655HYE.

A elevades concentracions de NaCl totes les soques analitzades presenten un creixement més lent. Tot i això, no s’observa cap diferència en la taxa de creixement quan comparem les diverses soques entre elles. Per altra banda, quan es va eliminar la sal del medi de cultiu es van observar algunes diferències tot i que no es van considerar significatives.

Malgrat no s’han pogut detectar diferències en la taxa de creixement dels diferents mutants en les diferents condicions de cultiu estudiades, cal esmentar en aquest punt un resultat aparentment incongruent però que en funció de resultats posteriors s’interpreta a l’apartat de discussió de la present memòria. Les soques que conserven el “cassette” de Cm (protocol de mutagènesi de Datsenko i Wanner), MG1655E, MG1655Y i MG1655YE, presenten un comportament diferencial quan es suplementa el medi de cultiu amb Cm (25 mg/l): mentre que els mutants *ydgT* no es veuen afectats, els mutants

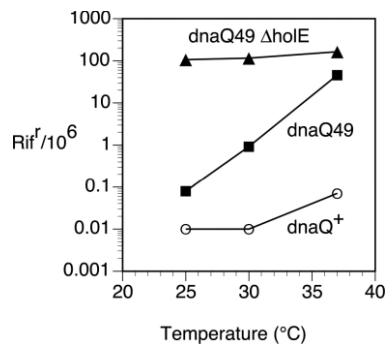
*holE* presenten una moderada reducció en la seva taxa de creixement en presència de l'antibiòtic. Aquest efecte és molt notable en un doble mutant *ydgT holE* (Fig. 3.41).



**Fig. 3.41.** Corbes de creixement a 37°C de les soques isogèniques resistentes a Cm MG1655E, MG1655Y, MG1655YE en medi LB sense antibiòtics i en presència de Cm (25 mg/l).

### 3.3.4. Estudi de l'efecte de les mutacions *holE* i *ydgT* en un mutant en la subunitat $\epsilon$ de l'ADN polimerasa III

Com ja s'ha esmentat anteriorment, existeixen diversos treballs que relacionen funcionalment la subunitat  $\theta$  amb la subunitat  $\epsilon$  de l'ADN polimerasa III (Studwell-Vaughan i O'Donnell, 1993; Slater *et al.*, 1994; Taft-Benz i Schaaper, 2004; Chikova i Schaaper, 2005). Particularment, es creu que  $\theta$  exerceix un efecte positiu en la fidelitat de la replicació i que estabilitza la subunitat  $\epsilon$  (codificada pel gen *dnaQ*), amb activitat correctora. Per estudiar l'efecte de les mutacions en els gens *holE* i *dnaQ*, diversos autors han determinat les alteracions en la freqüència d'aparició de mutants resistent a rifampicina (Taft-Benz i Schaaper, 2004; Chikova i Schaaper, 2005). Degut a què  $\epsilon$  és una subunitat crítica per la viabilitat de la cèl·lula, la construcció d'un mutant en el gen que la codifica (*dnaQ*) no és possible. Per aquest motiu, els estudis esmentats (Taft-Benz i Schaaper, 2004; Chikova i Schaaper, 2005) utilitzen l'al·lel *dnaQ49* que és sensible a la temperatura i el qual dóna lloc a una subunitat  $\epsilon$  amb un fenotip mutador moderat a baixa temperatura (28°C) i elevat a alta temperatura (37°C). Quan la mutació *holE* es combina amb *dnaQ49* observen que el doble mutant *dnaQ holE* mostra un fenotip mutador a qualsevol temperatura (Fig. 3.42). Per això, es creu que, a part d'augmentar la fidelitat d' $\epsilon$ , *holE* té un paper com a estabilitzador de la sensibilitat a la temperatura de *dnaQ*.

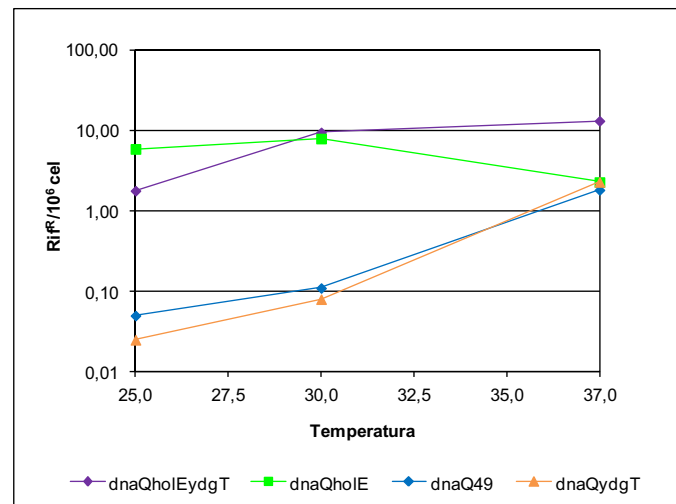


**Fig. 3.42.** Efecte de la mutació *holE* en la freqüència d'aparició de mutants resistents a rifampicina de la soca mutant *dnaQ* (al·lel *dnaQ49*). Extret de Taft-Benz i Schaaper, 2004.

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, investigadors del grup col·laborador RMN Biomolecular pertanyent a l'Institut de Recerca Biomèdica (IRB) van detectar una interacció dèbil entre  $\epsilon$  i YdgT la qual es veia afavorida per la presència de *HolE*.

Seguint amb l'objectiu de trobar una relació funcional entre la subunitat  $\theta$  de l'ADN polimerasa III i les proteïnes associades al nucleòide de la família Hha/YdgT, i coneixent aquest darrer resultat obtingut per ressonància magnètica nuclear (RMN), vam decidir estudiar l'efecte de la mutació *ydgT* en mutants *dnaQ* i *dnaQ holE*.

Per dur a terme aquests estudis es va utilitzar la soca mutant *dnaQ49* sensible a la temperatura NR9695 (Chikova i Schaaper, 2005), i es van transduir sobre aquesta les mutacions *holE* i *ydgT* utilitzant lisats P1 vir. La mutació *holE* va ser transduïda utilitzant un lisat de P1 vir obtingut sobre la soca MG1655E resistent a Cm. El lisat de P1 vir utilitzat per transduir la mutació *ydgT* es va obtenir sobre una soca amb una mutació *ydgT* associada a resistència a Km. Totes les transduccions es van realitzar a baixa temperatura (30°C) i en medi mínim A per evitar l'aparició de mutants espontanis degut a l'efecte mutador de la soca NR9695 (*dnaQ49*) a elevades temperatures. D'aquesta manera, es van obtenir els mutants *dnaQ holE*, *dnaQ ydgT* i *dnaQ holE ydgT*. Aquests mutants es van cultivar en 1 ml de medi LB a 25, 30 i 37°C (10 cultius independents per cada soca i temperatura). De cada cultiu es van sembrar les dilucions adequades per fer recomptes de viables en plaques d'LB agar i LB agar rifampicina (Materials i mètodes 2.10). Amb els valors dels recomptes obtinguts es va calcular la freqüència de mutació (mutants rif<sup>R</sup>/10<sup>6</sup> cèl·lules viables) per cada soca i temperatura (Fig. 3.43).



**Fig. 3.43.** Efecte de les mutacions *holE* i *ydgT* en la freqüència d'aparició de mutants resistents a rifampicina de la soca mutant *dnaQ49* a diferents temperatures.

Com s'observa a la figura, la introducció de la mutació *ydgT* en el mutant senzill *dnaQ49* o en el doble mutant *dnaQ49 holE* no provoca cap alteració en el fenotip mutador d'aquestes soques. Per tant, podem afirmar que YdgT no està implicat en el rol de  $\theta$  com a estabilitzador de la subunitat  $\epsilon$  de l'ADN polimerasa III a baixes temperatures.

### 3.3.5. Estudi per PCR a temps real de l'expressió de *holE* en diferents condicions de creixement

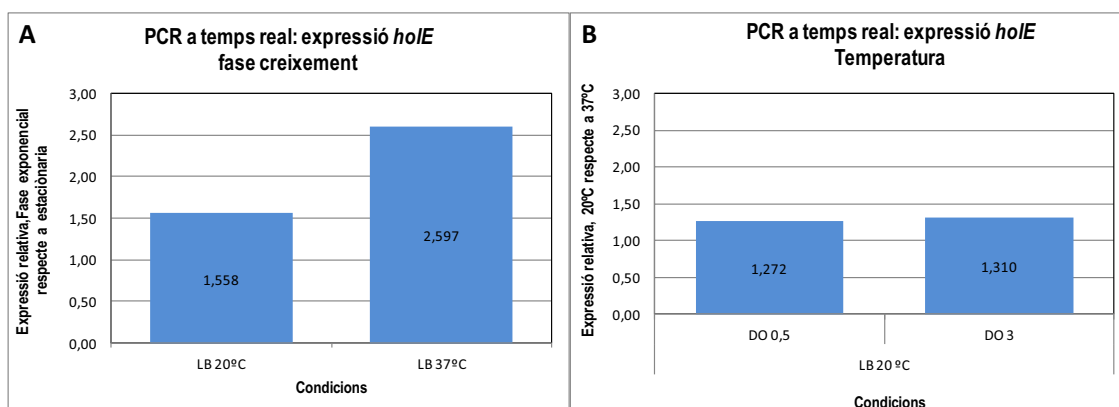
Un aspecte no estudiat fins al moment era l'expressió del gen *holE* en diferents condicions de creixement.

Per això, vam decidir estudiar per PCR a temps real l'expressió de *holE* a 20 i a 37°C i en fase exponencial i estacionària de creixement. Es van dissenyar els oligonucleòtids i la sonda TaqMan® corresponents al gen *holE* (Fig. 3.44) per tal de poder realitzar la reacció de PCR a temps real tal i com s'explica a l'apartat de Materials i mètodes 2.7.5. Com a gen de referència es va utilitzar l'ARN ribosòmic 16s. Els oligonucleòtids i la sonda TaqMan® per aquest gen de referència es detallen a la mateixa figura.

<p><b>Sonda HOLE:</b> 5'-CGCGAGCGGCTTA-3'</p> <p><b>Oligonucleòtid FW-HOLE:</b> 5'-GAACATTTGCGCAGCTGGTT-3'</p> <p><b>Oligonucleòtid HOLE-RV:</b> 5'-AGCCAAACGGTGGGCA-3'</p>	<p><b>Sonda 16s:</b> 5'-CCCGGGCCTTGAC-3'</p> <p><b>Oligonucleòtid FW-16s:</b> 5'-AGAATGCCACGGTGAATACGT-3'</p> <p><b>Oligonucleòtid 16s-RV:</b> 5'-GGTGTGACGGGCGGTG-3'</p>
---	---

**Fig. 3.44.** Oligonucleòtids i sondes TaqMan® utilitzats per a l'amplificació del gen *holE* i del gen de referència 16s.

Com a material de partida es va utilitzar l'ARN aïllat de cultius de la soca MG1655 a diferents punts del creixement ( $DO_{600}=0,5$  i 3) tant a 20°C com a 37°C. Els resultats d'expressió relativa del gen *holE* es poden expressar en funció de la fase de creixement o bé en funció de la temperatura (Fig. 3.45A i B respectivament).



**Fig. 3.45.** Resultats d'expressió relativa obtinguts per PCR a temps real del gen *holE* en funció de la fase de creixement (fase exponencial respecte a estacionària) (A) i en funció de la temperatura (20°C respecte a 37°C) (B).

Si comparem l'expressió de *holE* en funció de la fase de creixement (Fig. 3.45A) veiem que tant a 20°C com a 37°C aquest s'expressa més en fase exponencial de creixement. En canvi, si comparem l'expressió de *holE* en funció de la temperatura (Fig. 3.45B) veiem que, independentment de la fase de creixement, *holE* s'expressa més a 20°C que a 37°C.

Per altra banda, és important remarcar que les diferències en els nivells d'expressió obtinguts en les condicions utilitzades (expressió de *holE* en fase exponencial respecte a estacionària i a 20°C respecte a 37°C) no són gaire elevats i que existeix la possibilitat de que el gen *holE* es pugui sobreexpressar en entorns ambientals no reproduïts en les condicions utilitzades en aquest treball.

### **3.3.6. Anàlisi transcriptòmica d'un mutant *holE* i comparació amb el patró d'expressió gènica d'un mutant *ydgT***

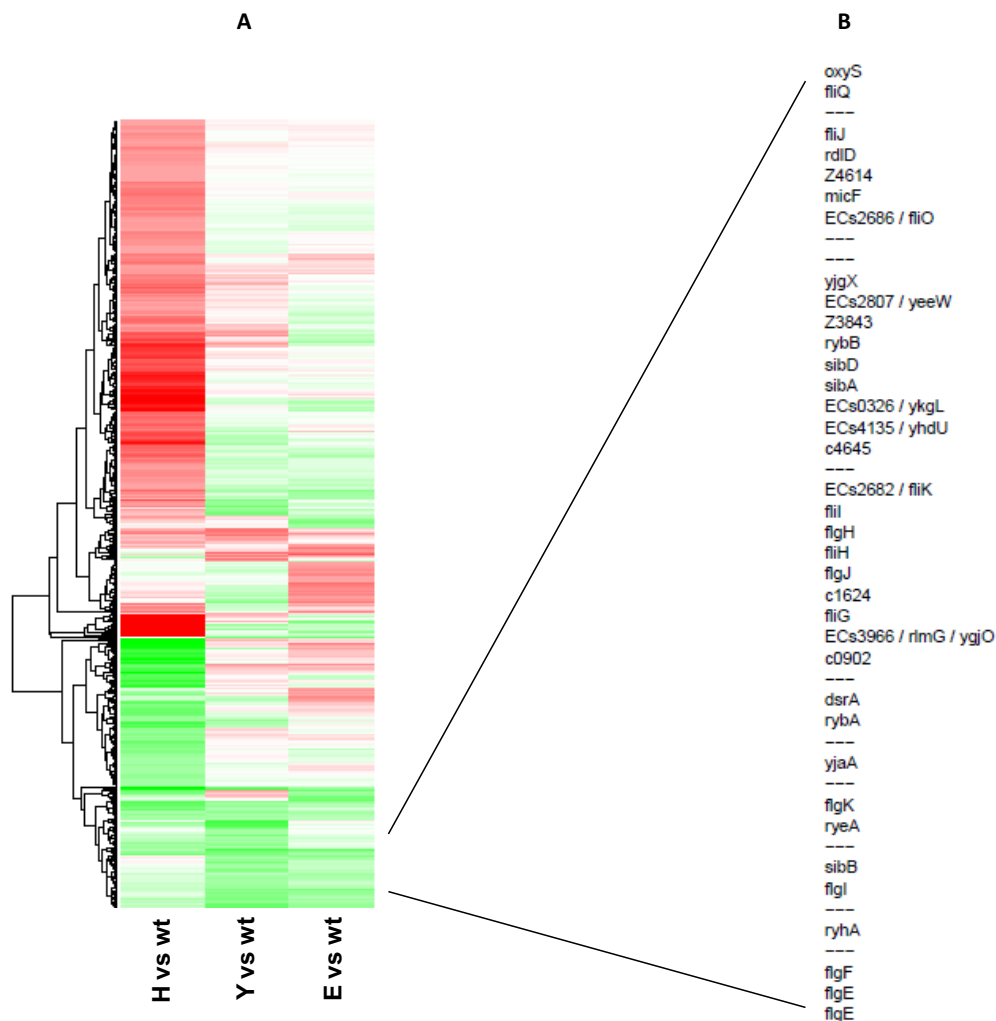
En funció dels resultats obtinguts per J. García que evidencien que YdgT pot interaccionar també amb la subunitat  $\epsilon$  de l'ADN polimerasa III, vam considerar la possibilitat que la proteïna HolE estigués funcionalment relacionada amb YdgT. Com que ja disposàvem de les dades transcriptòmiques del mutant *ydgT*, es va realitzar una anàlisi transcriptòmica per poder comparar els patrons d'expressió gènica del mutant *holE* i la soca salvatge.

L'ARN total de les soques citades es va aïllar (veure Materials i mètodes 2.7.1) de cultius crescuts en medi LB a 37°C fins a una  $DO_{600}$  de 0,6. Les mostres van ser processades per la Plataforma "Functional Genomics Core" (FGC) de l'Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona (IRB) en microxips GeneChip® *E. coli* Genome 2.0 Array de la casa Affymetrix. La Unitat de Bioinformàtica dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB) fou l'encarregada del tractament de les dades i de l'elaboració dels corresponents llistats de gens alterats, "heatmaps" i diagrames de Venn.

#### **3.3.6.1. Anàlisi global dels gens alterats: "heatmaps" i diagrames de Venn**

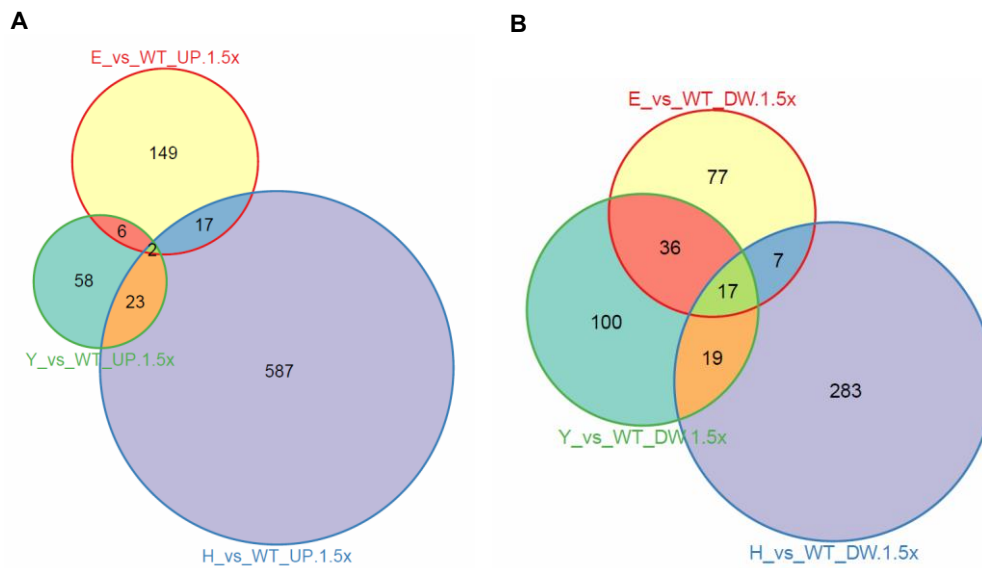
Igual que es va fer amb les dades obtingudes de l'anàlisi transcriptòmica dels mutants *hha*, *ydgT* i *hha ydgT*, es van elaborar els "heatmaps" i diagrames de Venn per poder tenir una idea global del patró de gens alterats. En aquest cas, ens interessava comparar sobretot els mutants senzills *holE* i *ydgT*, però també vam decidir incloure el mutant *hha*. A la Fig. 3.46A es mostren els "heatmaps" corresponents als gens alterats en mutants *holE* (E), *hha* (H) i *ydgT* (Y) tots ells respecte al patró obtingut per la soca salvatge (wt). És destacable que en conjunt, el nombre de gens reprimits (Fig. 3.46A, en verd), tant en un mutant *holE* com *ydgT* és més nombrós que en un mutant *hha*. A la

Fig. 3.46B s'indica un llistat d'aquests gens reprimits en els mutants *holE* i *ydgT* que corresponen o bé a gens relacionats amb la funció del flagel o bé a ARN petits.



**Fig. 3.46.** **A.** “Heatmap” on es representa el patró d’expressió gènica dels mutants senzills *holE* (E), *hha* (H) i *ydgT* (Y) comparat amb el de la soca salvatge (WT) (FC>1,5x i P-valor ajustat<0,05). En verd s’indiquen els gens reprimits i en vermell els induïts (respecte a la soca salvatge). Els gens marcats en blanc no es troben alterats en aquell mutant. **B.** Llistat d’alguns dels gens reprimits tant en el mutant *holE* com *ydgT*.

A més a més, a la Fig. 3.46 es pot observar que el patró d’expressió del mutant *holE* és més similar al del mutant *ydgT* que al del mutant *hha*. Aquest fet queda reflectit també en els diagrames de Venn (Fig. 3.47).



**Fig. 3.47.** Diagrames de Venn on es representa el volum de gens induïts (UP) (A) i reprimits (DW) (B) dels mutants senzills *hole* (E), *hha* (H) i *ydgT* (Y) comparat amb el de la soca salvatge (WT) (FC>1,5x i P-valor ajustat<0,05).

Una de les primeres conclusions que es poden extreure dels diagrames de la Fig. 3.47, és que el número de gens desregulats en un mutant *hha* és molt superior respecte tant al mutant *hole* com al mutant *ydgT*. Pel que fa referència als gens induïts, existeix poca coincidència pel que fa als gens alterats en el mutant *hole* i els mutants *ydgT* i *hha*. En canvi, si ens fixem amb els gens reprimits (Fig. 3.47B), els mutants *hole* i *ydgT* tenen 53 (36+17) gens en comú, mentre que els mutants *hha* i *ydgT*, considerats paràlegs, en tenen 36 (17+19). Dit d'una altra manera, mentre que només un 4,6% dels gens induïts en el mutant *hole* són comuns amb els induïts en un mutant *ydgT*, un 38,7% dels gens reprimits en el mutant *hole* és comú al conjunt de gens també reprimits en el mutant *ydgT*. Pel que fa al mutant *ydgT*, aquests percentatges representen un 8,9% dels gens induïts i un 30,8% dels gens reprimits comú al mutant *hole*.

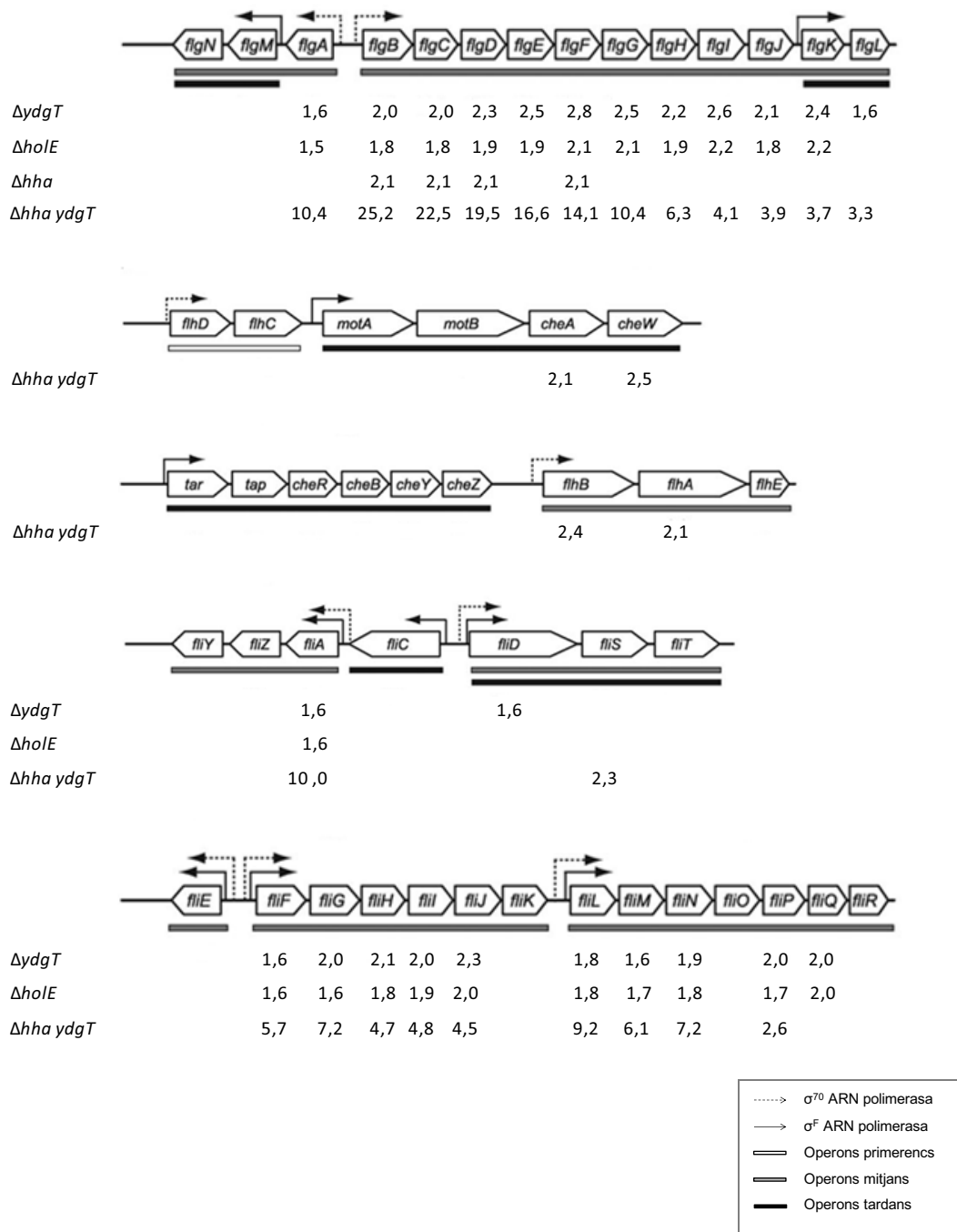
Aquests resultats recolzen la hipòtesi que les proteïnes YdgT i HolE poden tenir alguna relació funcional tal i com les dades d'interacció proteïna-proteïna suggereixen (J. García, dades no publicades).

### 3.3.6.2. Anàlisi de l'expressió dels gens flagel·lars

Després de la revisió del patró global d'expressió gènica obtingut de l'anàlisi transcriptòmica, es va decidir estudiar els gens comuns alterats en els mutants *ydgT* i *hole*. Aquest grup de gens bàsicament codifica per l'aparell flagel·lar i es troba reprimat



tant en els mutants senzills *holE* com *ydgT*. Tot i que aquests gens no es troben gaire afectats a un mutant *hha* però molt afectats a un doble mutant *hha ydgT*, vam decidir incloure aquests dos darrers mutants en aquesta anàlisi. Els gens que codifiquen per l'aparell flagel·lar es troben formant part d'operons de motilitat. A la Fig. 3.48 s'indica el "fold change" (FC) dels diferents gens d'aquest grup situant-los en els operons de motilitat corresponents, per cadascun dels diferents mutants.

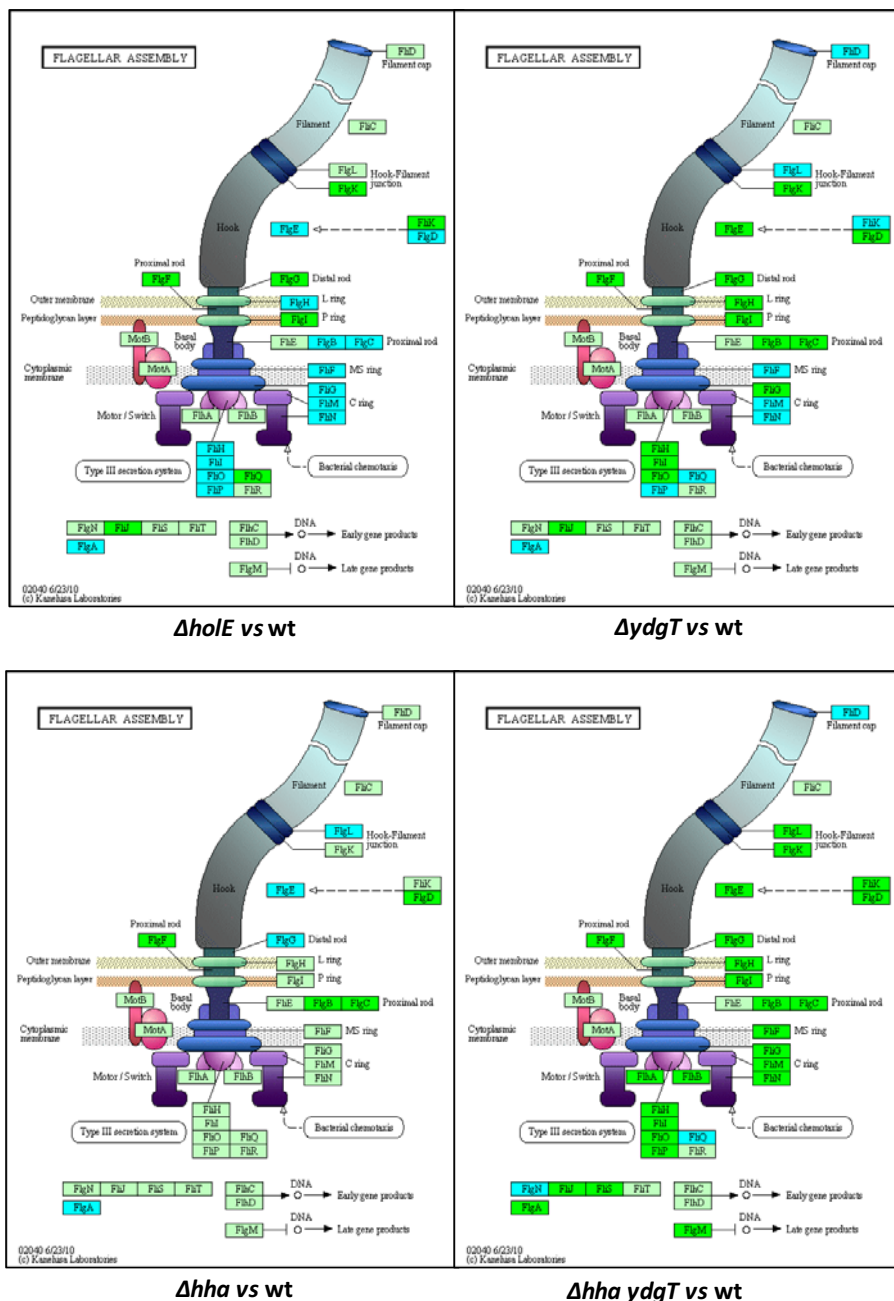


**Fig. 3.48.** Esquema dels diferents operons de motilitat d'*E. coli* on s'indica per cadascun dels gens el "fold change" (FC) negatiu o nivell de repressió en cada mutant respecte a la soca salvatge.

Si observem detalladament els valors de FC dels gens flagel·lars representats a la figura anterior es pot deduir que:

- La mutació *hha* no afecta de la mateixa manera l'expressió dels gens flagel·lars que les mutacions *holE* o *ydgT*, ambdues amb uns patrons molt similars. Malgrat això, els nivells de repressió del mutant *ydgT* són sempre una mica superiors que els dels del mutant *holE*, en pràcticament tots els gens de tots els operons.
- Els nivells de repressió observats per al doble mutant *hha ydgT* són més elevats que a la resta de mutants. Això, tal i com ja s'ha comentat a l'apartat 3.1.3.2 es pot interpretar com que la proteïna Hha cobreix parcialment la funció de la proteïna YdgT.

El patró d'expressió dels gens flagel·lars en els mutants esmentats pot visualitzar-se també mitjançant diagrames 'elaborats amb el programa "KEGG Mapper" (Fig. 3.49).



**Fig. 3.49.** Representació del patró d'expressió dels gens flagel·lars utilitzant l'aplicació bioinformàtica "KEGG Mapper" dels mutants senzills *holE*, *hha* i *ydgT* i del doble *hha ydgT* respecte a la soca salvatge. El codi de colors permet conèixer el nivell d'expressió (Fold Change, FC) d'un determinat gen flagel·lar; en verd fosc ("FC" < -2), blau (-2 < "FC" < -1,5) i verd clar (no expressat diferencialment respecte a la soca salvatge).

Les conclusions que es poden extreure a partir de la Fig. 3.49 es corresponen amb les que s'exposen per l'anterior Fig. 3.48.

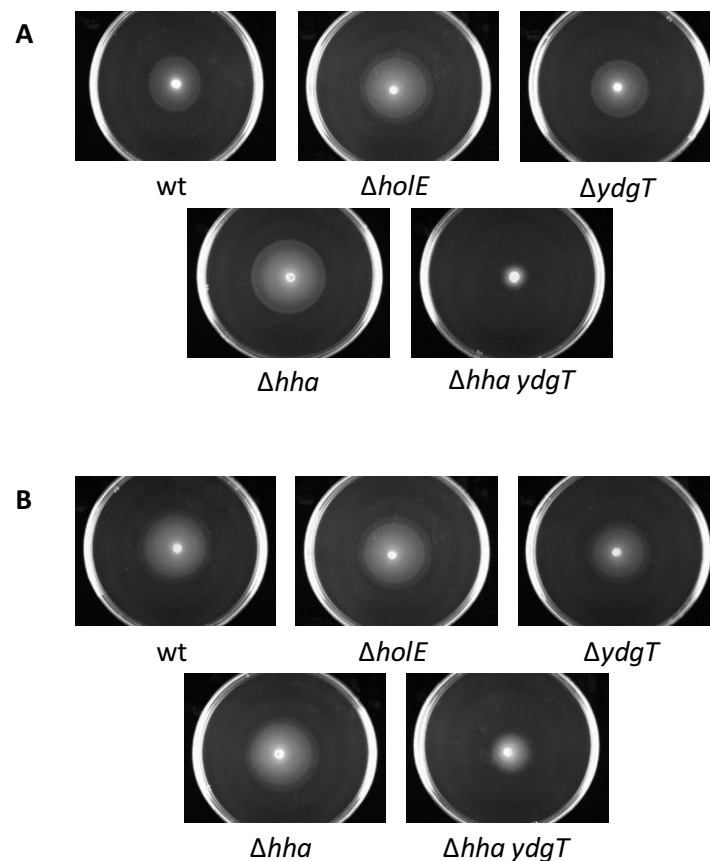
Per confirmar aquests resultats de transcriptòmica que relacionaven les proteïnes HoIE i YdgT, es va decidir realitzar un estudi fenotípic de motilitat (apartat 3.3.7).

### 3.3.7. La sobreexpressió del gen *holE* restaura la motilitat de dobles mutants *hha ydgT*

#### 3.3.7.1. Efecte de les mutacions *holE*, *ydgT* i *hha* en la motilitat

Per tal de corroborar les dades obtingudes a l'anàlisi transcriptòmica dels mutants *holE*, *ydgT* i *hha*, en les quals s'observa la repressió d'una gran quantitat de gens pertanyents als operons flagel·lars, es va decidir dur a terme assaigs de motilitat en placa (veure Materials i mètodes apartat 2.11).

En primer lloc, es va realitzar l'assaig de motilitat en placa dels mutants següents: *holE*, *ydgT*, *hha* i *hha ydgT*. Després d'incubar les plaques durant 12 hores a 30°C, els halos que apareixien eren clars i es veien diferències entre les soques mutants (Fig. 3.50).



**Fig. 3.50.** Halos de motilitat en plaques de TB agar 0,25% + L-serina 2 mM (A) i + L-valina 2 mM (B).

Tal i com s'ha comentat anteriorment, i tenint en compte l'important efecte d'YdgT en l'expressió dels gens flagel·lars i el reduït efecte d'Hha, el fenotip de reduïda motilitat del doble mutant *hha ydgT* és probablement degut a que Hha ja no compensa la funció d'YdgT, cosa que sí deu de succeir en el mutant *ydgT*.

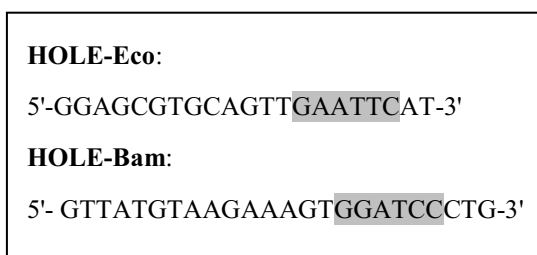
Per demostrar la relació funcional entre YdgT i HOLE, es va decidir determinar a nivell fenotípic l'efecte de la sobreexpressió del gen *hole* en els mutants que tenien la motilitat afectada (*hha ydgT*).

### 3.3.7.2. Complementació amb pBRHOLE de la pèrdua de motilitat en placa dels mutants *hha ydgT*

#### 3.3.7.2.1. Construcció del plasmidi pBRHOLE i evidència per PCR a temps real de la sobreexpressió de *hole*

Per tal de dur a terme la complementació es va construir el plasmidi pBRHOLE clonant el gen *hole* en el vector de mitjà número de còpies pBR322.

El gen *hole* fou amplificat mitjançant PCR utilitzant com a motlle l'ADN de la soca d'*E. coli* 5K (Materials i mètodes 2.6.3). Els oligonucleòtids que es van utilitzar corresponen a les seqüències HOLE-Eco i HOLE-Bam (Fig. 3.51) que permetien l'amplificació del gen *hole* i del seu promotor putatiu. A més, aquests oligonucleòtids introduïen una diana *Eco*RI i una diana *Bam*HI als extrems 5' i 3' respectivament.

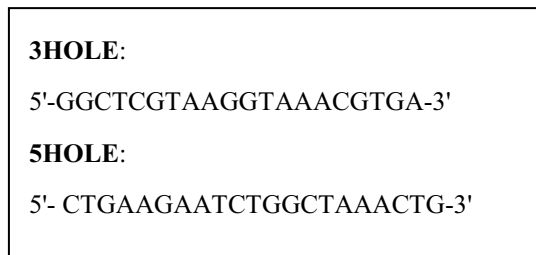


**Fig. 3.51.** Oligonucleòtids utilitzats per a l'amplificació del gen *hole*. En gris es ressalten les dianes *Eco*RI i *Bam*HI respectivament.

La temperatura d'hibridació que es va utilitzar en l'amplificació va ser de 52°C.

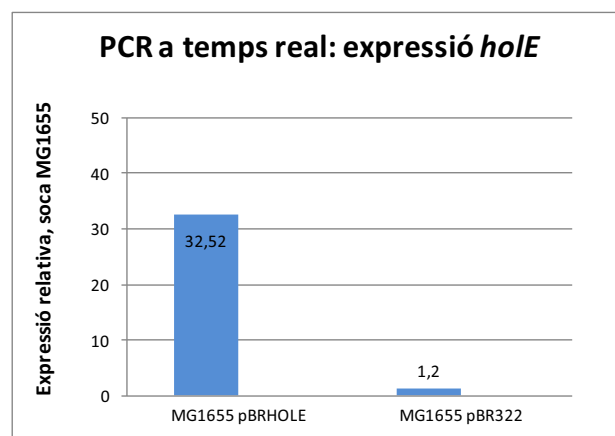
El producte de l'amplificació va ser digerit amb els enzims de restricció corresponents i clonat en el vector pBR322 prèviament digerit amb els mateixos enzims. El plasmidi resultant es va anomenar pBRHOLE el qual es va comprovar per seqüenciació utilitzant

els oligonucleòtids 3HOLE i 5HOLE, per seqüenciar a 3' i 5' del gen *hole* respectivament (Fig. 3.52).



**Fig. 3.52.** Oligonucleòtids utilitzats per comprovar el gen *hole* clonat en el vector pBR322.

Per altra banda, per tal de comprovar que aquest plasmidi sobreexpressava correctament el gen *hole* es va aïllar l'ARN total de les soques MG1655, MG1655 pBR322 i MG1655 pBRHOLE i es va realitzar una reacció de PCR a temps real amb els oligonucleòtids i sonda TaqMan® indicats a la Fig. 3.44 amb els quals es detecta l'expressió del gen *hole*. Tal i com s'esperava, l'expressió de *hole* de la soca portadora del plasmidi pBRHOLE és 32 vegades superior a la de la soca salvatge. La diferència d'expressió entre la MG1655 i la MG1655 pBR322 no és significativa (Fig. 3.53).

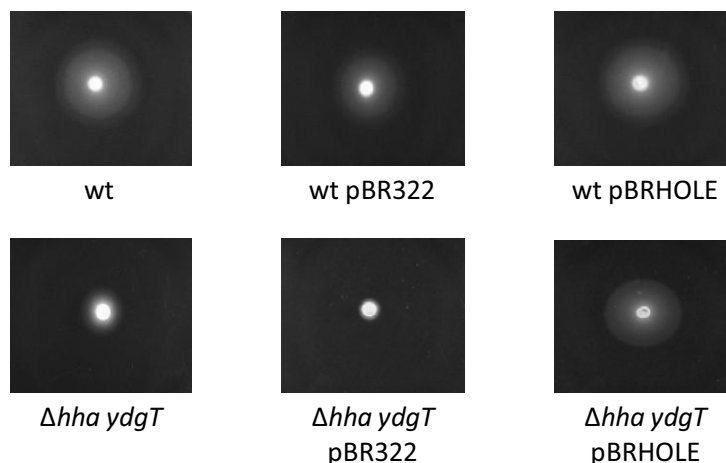


**Fig. 3.53.** Resultats d'expressió relativa obtinguts per PCR a temps real del gen *hole* de les soques MG1655 pBR322 i MG1655 pBRHOLE respecte a la soca salvatge MG1655.

### 3.3.7.2.2. Transformació del plasmidi pBRHOLE a la soca mutant *hha ydgT*. Avaluació de la motilitat en medi sòlid

Tant el plasmidi pBRHOLE com el vector pBR322 es van transformar a la soca salvatge (wt) i al mutant *hha ydgT*. Amb els transformants obtinguts es van inocular

plaques de medi TB agar 0,25% amb L-serina i amb L-valina per tal de determinar el diàmetre dels halos de motilitat. Les diferències en els halos de motilitat a les plaques amb L-serina i L-valina de les soques testades eren molt similars. Per aquest motiu a la Fig. 3.54 es mostren únicament els resultats obtinguts en les plaques que contenien L-serina.



**Fig. 3.54.** Halos de motilitat en plaques de TB agar 0,25% i L-serina 2 mM. Complementació amb pBRHOLE de la disminució del diàmetre de l’halo de motilitat dels mutants *hha ydgT*. A la primera línia es mostren els halos per la soca salvatge (wt).

A la Fig. 3.54 es pot observar l’augment en l’halo de motilitat dels mutants *hha ydgT* quan se sobreexpressa *holE* (pBRHOLE). Això suggereix que la proteïna HolE quan és sobreexpressada pot, almenys parcialment, suplir la funció d’YdgT.

### 3.3.7.3. Efecte de la sobreexpressió de *holE* sobre l’expressió del gen *flgB*: anàlisi per RT-PCR

Per tal de corroborar els resultats descrits en els apartats anteriors es va dur a terme l’anàlisi semiquantitativa d’ARNm per RT-PCR (Materials i mètodes 2.7.4) del gen flagel·lar *flgB* a la soca MG1655HY i en la mateixa quan sobreexpressàvem *holE*. El gen *flgB* és el primer gen d’un dels operons de motilitat, el qual està pràcticament en la seva totalitat afectat per les mutacions *ydgT*, *holE* i *hha*, veient-se especialment afectat en el doble mutant *hha ydgT*.

Les soques objecte d’estudi (la soca salvatge MG1655, el doble mutant MG1655HY i aquesta última soca portadora dels plasmidis pBR322 o pBRHOLE) es van cultivar a 37°C fins a una  $DO_{600}$  de 0,6 i es va aïllar l’ARN corresponent. La quantitat d’ARN

adequada per mesurar la transcripció d'*flgB* va ser de 10 ng. En aquesta reacció d'RT-PCR, a més d'un control per demostrar la inexistència d'ADN a la mostra (inactivació de la retrotranscriptasa durant 10 minuts a 95°C), es va incloure un control intern amb l'ARN 16s, per tal d'assegurar la qualitat de l'ARN.

Els oligonucleòtids específics pel gen *flgB* i pel gen de referència 16s es detallen a la Fig. 3.55.

<p><b>FLGBFW:</b> 5'-GCAGCAAACATCGCCAATGC-3'</p> <p><b>FLGBRW:</b> 5'-GATATGGATCGCGAACGCAC-3'</p>	<p><b>16SR:</b> 5'-TTCCTCCAGATCTCTACGCA-3'</p> <p><b>16SF:</b> 5'-CCTCAGCACATTGACGTTAC-3'</p>
---	---

**Fig. 3.55.** Oligonucleòtids utilitzats en la reacció de RT-PCR pel gen *flgB* i pel gen de referència 16s.

L'anàlisi per RT-PCR de la transcripció del gen *flgB* va mostrar una expressió diferencial d'aquest gen en les diverses soques analitzades. A la Fig. 3.56 es detallen els resultats d'expressió del gen *flgB* i del gen de referència 16s obtinguts per la soca MG1655, pel mutant *hha ydgT* i per aquest darrer portador dels plasmidis pBR322 o pBRHOLE.



**Fig. 3.56.** Producte de l'amplificació de l'anàlisi per RT-PCR del gen *flgB* i del gen de referència 16s de les soques MG1655 (carril 1), MG1655HY (carril 2), MG1655HY pBR322 (carril 3) i MG1655HY pBRHOLE (carril 4).

A l'anterior figura s'observa, en primer lloc, que el doble mutant *hha ydgT* té reprimida l'expressió del gen *flgB*, tal i com ja s'havia vist en els resultats dels microarrays. Per altra banda, s'observa també la complementació de l'expressió del gen flagel·lar *flgB* al sobreexpressar *hole* en el doble mutant *hha ydgT* (MG1655HY pBRHOLE).

### 3.3.8. Mecanisme d'acció de les proteïnes YdgT i HolE: influenciant la terminació de la transcripció?

Els resultats obtinguts en aquesta memòria en respecte al paper regulador de la proteïna HolE suggereixen que juga un paper relacionat amb la proteïna YdgT. En qualsevol cas,



les dades obtingudes fins aquest punt no permetien entendre quin era el mecanisme a través del qual les proteïnes *HolE/YdgT* exerceixen el seu efecte regulador.

Un treball aparegut en el moment de la redacció d'aquesta memòria, i que fa referència a l'efecte de la família de proteïnes H-NS sobre la terminació Rho-dependent (Saxena i Gowrishankar, 2011), evidencia que la sobreexpressió de la proteïna *YdgT* anul·la els fenotips de supressió de polaritat en mutants *rho*, el que permet a aquets bacteris que sobreexpressen *YdgT* incrementar l'eficiència de la terminació de la transcripció. És a dir, que la proteïna *YdgT* pot estar implicada en processos de terminació de la transcripció. Considerant aquesta informació, i fent una recerca bibliogràfica referent a la terminació intragènica de la transcripció dependent de la proteïna Rho, el treball de Peters i col·laboradors (2009) demostra que la proteïna Rho juga un paper molt important en la terminació de la síntesi d'ARN petits ("small RNAs" (sRNA)) i ARN de transferència (localitzats en regions intergèniques), així com d'un grup de gens (regions intragèniques) molts dels quals mostren transcripció antisentit. Aquests estudis es van fer inhibint de manera específica la proteïna Rho amb l'antibiòtic biciclomicina (BCM) i fent estudis ChIP-chip.

Si considerem les nostres dades de transcriptòmica, on es refereixen els gens desregulats comuns tant en mutants *ydgT* com *holE*, podem comprovar que una bona part d'aquests gens són ARN petits (Taula 3.3).

Gen	Descripció	FC	FC
		$\Delta ydgT\_vs\_WT$	$\Delta holE\_vs\_WT$
<i>dsrA</i>	ARN antisentit que interacciona amb la traducció d' <i>rpoS</i> , silenciant <i>rcaA</i>	2,21	1,75
<i>micF</i>	ARN antisentit que afecta l'expressió d' <i>ompF</i>	2,83	1,62
<i>oxyS</i>	ARN regulador global OxyS	2,32	2,82
<i>rdlB</i>	ARN antisentit, regulador de la traducció de <i>ldrB</i>	1,76	---
<i>rdlC</i>	ARN antisentit, regulador de la traducció de <i>ldrC</i>	1,81	1,20
<i>rdlD</i>	ARN antisentit, regulador de la traducció de <i>ldrD</i>	3,40	1,82
<i>rybA</i>	ARN antisentit relacionat amb la homeostasi del manganès	2,33	1,67
<i>ryeA</i>	ARN antisentit de funció desconeguda	2,55	2,36
<i>ryhA (ArcZ)</i>	ARN antisentit que regula positivament RpoS; s'uneix a Hfq	2,42	2,17
<i>sibA</i>	ARN antisentit que regula la proteïna tòxica lbsA	2,42	1,63
<i>sibB (ryeD)</i>	ARN antisentit que regula la proteïna tòxica lbsB	2,83	2,31
<i>sibC</i>	ARN antisentit que regula la proteïna tòxica lbsC	2,92	2,20
<i>sibD (rygD)</i>	ARN antisentit que regula la proteïna tòxica lbsD	2,76	1,81
<i>sokB</i>	ARN antisentit que bloqueja la traducció de <i>mokB</i> i <i>hokB</i>	2,28	---
<i>sokC</i>	ARN antisentit que bloqueja la traducció de <i>mokC</i> i <i>hokC</i>	3,05	2,07

**Taula 3.3.** Llistat de gens corresponents a ARN petits del cromosoma d'*E. coli* alterats en els mutants *ydgT* i *holE*. A les dues últimes columnes es mostren els valors de FC obtinguts a l'anàlisi transcriptòmica de mutants *ydgT* i *holE* respecte a la soca salvatge (wt) per cadascun d'aquests gens. Els gens que mostraven una expressió reprimida respecte a la soca salvatge s'indiquen en color verd i els que presentaven una expressió induïda respecte a la soca salvatge s'indiquen en vermell (FC>1,5x i P-valor ajustat<0,05).

Per altra banda, com ja s'ha esmentat, la meitat de les regions terminadores dependents de Rho estan localitzades després dels extrems 3' dels gens (intergèniques) (Peters *et al.*, 2009). Fent una revisió de les dades de l'anàlisi transcriptòmica dels mutants *ydgT* i

*holE*, vam comprovar que una part significativa de seqüències desregulades en aquests mutants eren intergèniques (Taula 3.4).

AffyID	Descripció	FC		AffyID	Descripció	FC	
		$\Delta ydgT_{vs\_wt}$	$\Delta holE_{vs\_wt}$			$\Delta ydgT_{vs\_wt}$	$\Delta holE_{vs\_wt}$
<a href="#">1765223 s_at</a>	regió intergènica	1,79	3,68	<a href="#">1763172 s_at</a>	regió intergènica	1,88	1,60
<a href="#">1760467 s_at</a>	regió intergènica	1,56	1,53	<a href="#">1768378 s_at</a>	regió intergènica	1,89	1,58
<a href="#">1765013 s_at</a>	regió intergènica	1,54	1,94	<a href="#">1768174 s_at</a>	regió intergènica	1,92	1,68
<a href="#">1762876 s_at</a>	regió intergènica	1,58	1,52	<a href="#">1768517 s_at</a>	regió intergènica	1,98	1,87
<a href="#">1759809 s_at</a>	regió intergènica	1,58	1,54	<a href="#">1769292 s_at</a>	regió intergènica	2,02	1,70
<a href="#">1768147 s_at</a>	regió intergènica	1,61	1,56	<a href="#">1766684 s_at</a>	regió intergènica	2,17	1,70
<a href="#">1765084 s_at</a>	regió intergènica	1,61	1,67	<a href="#">1760860 s_at</a>	regió intergènica	2,18	1,75
<a href="#">1759846 s_at</a>	regió intergènica	1,63	1,62	<a href="#">1766427 s_at</a>	regió intergènica	2,22	1,64
<a href="#">1759370 s_at</a>	regió intergènica	1,65	1,55	<a href="#">1766555 s_at</a>	regió intergènica	2,22	1,75
<a href="#">1765260 s_at</a>	regió intergènica	1,68	1,61	<a href="#">1766273 s_at</a>	regió intergènica	2,38	2,12
<a href="#">1760692 s_at</a>	regió intergènica	1,69	1,66	<a href="#">1762731 s_at</a>	regió intergènica	2,45	1,91
<a href="#">1767968 s_at</a>	regió intergènica	1,71	1,67	<a href="#">1766270 s_at</a>	regió intergènica	2,56	2,03
<a href="#">1759738 s_at</a>	regió intergènica	1,75	1,64	<a href="#">1760181 s_at</a>	regió intergènica	2,70	2,94
<a href="#">1761733 s_at</a>	regió intergènica	1,75	1,61	<a href="#">1763548 s_at</a>	regió intergènica	2,72	2,09
<a href="#">1764823 s_at</a>	regió intergènica	1,75	1,82	<a href="#">1766672 s_at</a>	regió intergènica	2,76	1,80
<a href="#">1761416 s_at</a>	regió intergènica	1,76	1,54	<a href="#">1768041 s_at</a>	regió intergènica	2,81	2,12
<a href="#">1762386 s_at</a>	regió intergènica	1,79	1,72	<a href="#">1768226 s_at</a>	regió intergènica	2,85	2,34
<a href="#">1761221 s_at</a>	regió intergènica	1,79	2,03	<a href="#">1767547 s_at</a>	regió intergènica	3,30	2,28
<a href="#">1765788 s_at</a>	regió intergènica	1,80	1,71	<a href="#">1759307 s_at</a>	regió intergènica	3,39	2,43
<a href="#">1765994 s_at</a>	regió intergènica	1,86	1,72	<a href="#">1762486 s_at</a>	regió intergènica	3,64	2,15
<a href="#">1765158 s_at</a>	regió intergènica	1,88	1,65	<a href="#">1759103 s_at</a>	regió intergènica	4,33	2,56
<a href="#">1762897 s_at</a>	regió intergènica	1,88	1,81	<a href="#">1765088 s_at</a>	regió intergènica	4,39	3,51

**Taula 3.4.** Llistat de les regions intergèniques del cromosoma d'*E. coli* alterades en els mutants *ydgT* i *holE*. A la primera columna s'indiquen els identificadors d'Affymetrix utilitzats per localitzar les regions intergèniques alterades comuns en ambdós mutants. A les dues últimes columnes es mostren els valors de FC obtinguts a l'anàlisi transcriptòmica de mutants *ydgT* i *holE* respecte a la soca salvatge (wt). Els gens que mostraven una expressió reprimida respecte a la soca salvatge s'indiquen en color verd i els que presentaven una expressió induïda respecte a la soca salvatge s'indiquen en vermell (FC>1,5x i P-valor ajustat<0,05).

Finalment, vam decidir comparar el llistat de gens desregulats en presència de BCM (Taula S1 de Peters *et al.*, (2009)) amb els gens desregulats en mutants *ydgT* i *holE*. Aquests resultats es mostren a la Taula 3.6. Tal i com es pot comprovar, un nombre significatiu (35,7%) dels gens desregulats en presència de BCM es troben també alterats en mutants *ydgT* i *holE* (Taula 3.6).

Gen	FC	FC	Gen	FC	FC
	$\Delta ydgT\_vs\_WT$	$\Delta holE\_vs\_WT$		$\Delta ydgT\_vs\_WT$	$\Delta holE\_vs\_WT$
<i>araF</i>	1,55	1,77	<i>ppsA</i>	2,01	---
<i>argA</i>	1,24	1,12	<i>purD</i>	1,16	1,67
<i>argG</i>	1,23	---	<i>purK</i>	1,10	1,30
<i>b2275</i>	1,29	1,23	<i>rdlD</i>	3,40	1,82
<i>b2859</i>	1,27	---	<i>rem</i>	1,35	1,12
<i>bcp</i>	1,27	1,23	<i>rnb</i>	1,50	---
<i>bgfI</i>	1,47	1,41	<i>rnr</i>	1,43	1,30
<i>cdaR</i>	1,36	1,16	<i>rybA</i>	2,34	1,68
<i>cfa</i>	1,28	1,62	<i>sibB//ryeD</i>	2,83	2,31
<i>corA</i>	1,81	1,36	<i>sibD//rygD</i>	2,76	1,81
<i>cspB</i>	3,20	1,35	<i>slyB</i>	1,31	1,42
<i>cspG</i>	2,30	---	<i>stpA</i>	2,54	1,45
<i>deaD</i>	1,99	1,70	<i>sugE</i>	1,74	1,10
<i>dsdC</i>	1,77	---	<i>udp</i>	1,29	---
<i>eutB</i>	1,17	1,46	<i>yahM</i>	2,84	2,14
<i>fic</i>	1,55	1,83	<i>yaiA</i>	1,54	---
<i>gdhA</i>	1,26	1,21	<i>yaiE</i>	1,51	---
<i>glnB</i>	1,26	---	<i>ybiO</i>	---	2,11
<i>glpD</i>	1,50	---	<i>ybiU</i>	1,27	1,15
<i>gltF</i>	1,31	---	<i>ybjX</i>	1,28	1,38
<i>guaB</i>	1,14	1,40	<b><i>ydcW</i></b>	1,31	1,62
<i>hisP</i>	1,54	---	<i>ydfK</i>	1,68	1,26
<i>IS092</i>	7,58	---	<i>ydiE</i>	---	1,71
<i>kch</i>	1,12	1,27	<i>yehV</i>	---	1,56
<b><i>mgIA</i></b>	3,52	1,53	<i>yejG</i>	1,66	1,32
<i>mgIC</i>	3,03	1,67	<i>yffJ</i>	1,10	1,25
<b><i>osmB</i></b>	---	1,84	<i>ygiP</i>	1,20	1,30
<i>pinQ</i>	1,53	1,30	<i>yicE</i>	1,17	1,81
<i>pinR</i>	1,53	1,30	<i>yjeB</i>	1,27	1,38
<b><i>ppdD</i></b>	1,59	1,31	<i>yobA</i>	---	3,04

**Taula 3.6.** Llistat de gens afectats en presència de biciclomicina (alterats en absència de Rho (Peters *et al.*, 2009)) i també per les mutacions *ydgT* i *holE*. Els valors de FC obtinguts en l'anàlisi transcriptòmica dels mutants *ydgT* i *holE* respecte a la soca salvatge (wt) s'indiquen en verd (repressió) o vermell (inducció) (FC>1,5x i P-valor ajustat<0,05 ) per a cadascun d'aquests gens.

### 3.4. Relació estructural i funcional entre les proteïnes Hha/YdgT i la proteïna YmgB

Tal i com s'ha indicat a la introducció, la proteïna YmgB té una massa molecular i una estructura terciària molt similars a les de la proteïna associada al nucleòide Hha (Lee *et al.*, 2007b). Com a continuació als estudis duts a terme per Lee *et al.* (2007b), i dins de l'objectiu global d'aquesta tesi d'estudiar i caracteritzar proteïnes que poguessin esdevenir paràlogues d'Hha, hem volgut aprofundir en les possibles relacions funcionals entre YmgB i les proteïnes Hha/YdgT.

#### 3.4.1. Estudi per PCR a temps real de l'expressió d'*ymgB* en diferents condicions de creixement

Tschowri *et al.* (2009) van posar de manifest que la proteïna YmgB s'expressa més a baixa temperatura (25°C) que a elevada temperatura (37°C). En primer lloc, vam decidir complementar aquests estudis i estudiar addicionalment a l'efecte de la temperatura, l'efecte de la fase de creixement. L'expressió del gen *ymgB* es va estudiar per PCR a temps real (Materials i mètodes 2.7.5). Aquest estudi es va dur a terme combinant dues fases de creixement ( $DO_{600} = 0,5$  i  $3$ ) i tres temperatures diferents (15, 20 i 37°C).

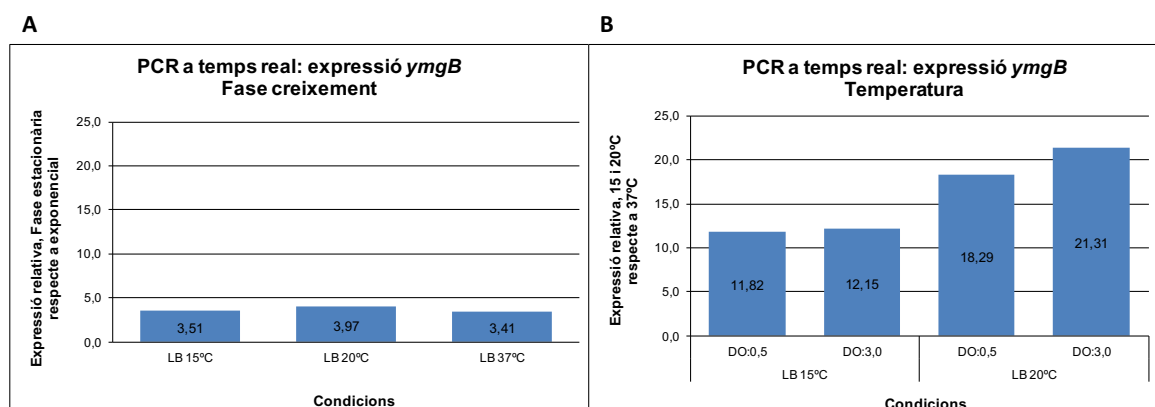
Es van dissenyar els oligonucleòtids i la sonda TaqMan® corresponents al gen *ymgB* (Fig. 3.57). Com a gen de referència es va utilitzar l'ARN ribosòmic 16s. Els oligonucleòtids i la sonda TaqMan® per aquest gen de referència es detallen a la mateixa figura.

<p><b>Sonda YMGB:</b> 5'-AGAAGAAGAATCAGCAGTGTT-3'</p> <p><b>Oligonucleòtid FW-YMGB:</b> 5'-TTCGCAGTTCGGGTAATTTGT-3'</p> <p><b>Oligonucleòtid YMGB-RV:</b> 5'-ATTGGTGACAGCCTGCCC-3'</p>	<p><b>Sonda 16s:</b> 5'-CCCGGGCCTTGTAC-3'</p> <p><b>Oligonucleòtid FW-16s:</b> 5'-AGAATGCCACGGTGAATACGT-3'</p> <p><b>Oligonucleòtid 16s-RV:</b> 5'-GGTGTGACGGGCGGTG-3'</p>
--	--

**Fig. 3.57.** Oligonucleòtids i sondes TaqMan® utilitzats per a l'amplificació del gen *ymgB* i del gen de referència 16s.

Es va aïllar l'ARN de cultius de la soca MG1655 crescuts en medi LB a 15, 20 i 37°C agafant mostra tant a fase exponencial ( $DO_{600}= 0,5$ ) com a fase estacionària ( $DO_{600}= 3$ ) (veure Materials i mètodes 2.7.1).

Els resultats d'expressió relativa obtinguts es van analitzar en funció de la fase de creixement i de la temperatura (Fig. 3.58A i B respectivament).



**Fig. 3.58.** Resultats d'expressió relativa obtinguts per PCR a temps real del gen *ymgB* en funció de la fase de creixement (fase estacionària respecte a exponencial) (A) i en funció de la temperatura (15 i 20°C respecte a 37°C) (B).

Pel que fa a la fase de creixement (Fig. 3.58A), es van analitzar els resultats obtinguts comparant l'expressió del gen *ymgB* en fase estacionària respecte a exponencial, a les tres temperatures utilitzades. Els resultats indiquen que, independentment de la temperatura, *ymgB* s'expressa de 3 a 4 vegades més en fase estacionària que en exponencial.

Pel que fa a la temperatura (Fig. 3.58B), es van normalitzar els resultats prenent com a referència els resultats dels cultius crescuts a 37°C. D'aquesta manera, podem dir que a 15°C, l'expressió d'*ymgB* està unes 12 vegades augmentada respecte a 37°C, tant en fase exponencial com estacionària. A 20°C, l'expressió augmenta una mica més: 18 i 21 vegades a fase exponencial i estacionària, respectivament. Aquests resultats coincideixen amb els publicats anteriorment (Tschowri *et al.*, 2009).

### 3.4.2. Construcció de mutants *ymgB* i confirmació del fenotip

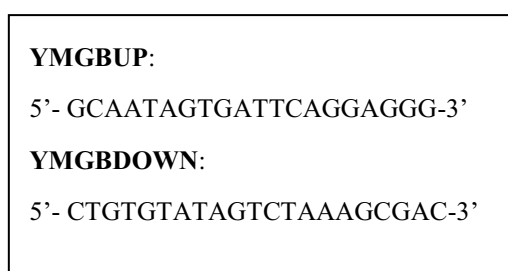
La mutació *ymgB* ja havia estat estudiada en soques mutants d'*E. coli* de la col·lecció Keio (Baba *et al.*, 2006). En aquests estudis es van observar diversos fenotips del

mutant *ymgB* entre els que destaquen l'augment en la producció de biofilm i la disminució en la resistència a l'àcid (Lee *et al.*, 2007b).

#### 3.4.2.1. Construcció de mutants *ymgB* a la soca d'*E. coli* MG1655

A fi i efecte de continuar amb la caracterització del gen *ymgB*, vam decidir obtenir el corresponent mutant *ymgB* a la soca MG1655 per tal de realitzar estudis comparatius amb mutants *hha/ydgT* obtinguts a la mateixa soca d'*E. coli*.

El mutant MG1655 $\Delta$ *ymgB*, anomenat MG1655M, es va construir per transducció de la mutació *ymgB* (Materials i mètodes 2.4.3) amb un lisat P1 vir obtingut sobre la soca mutant *ymgB* BW25113  $\Delta$ *ymgB* (cedida per la col·lecció japonesa Keio (Baba *et al.*, 2006). Aquesta soca conté la resistència a kanamicina del plasmidi pKD13 la qual ens va permetre seleccionar els transductants *ymgB*. La mutació *ymgB* es va comprovar per PCR utilitzant els oligonucleòtids de la Fig. 3.59.



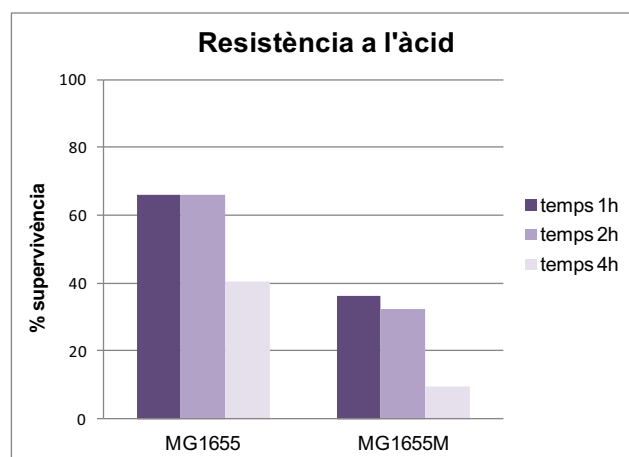
**Fig. 3.59.** Oligonucleòtids utilitzats per comprovar la mutació *ymgB*.

La soca MG1655M es va utilitzar per obtenir mutants dobles i triples, transduint la mutació *ymgB* a mutants *hha* i *ydgT*. En els mutants *ydgT* la transducció de la mutació *ymgB* es va fer directament, obtenint-se així la soca *ydgT ymgB* (MG1655YM). Per tal d'obtenir les soques mutants *ymgB hha* (MG1655MH) i *ydgT ymgB hha* (MG1655YMH), es va partir dels mutants MG1655M i MG1655YM als quals se'ls va curar la resistència a kanamicina associada a la mutació *ymgB* (Materials i mètodes 2.5.1.3) i per últim, es va transduir la mutació *hha* la qual porta associada la mateixa resistència a antibiòtic (Km).

### 3.4.2.2. Confirmació del fenotip de mutants *yngB* de la soca d'*E. coli* MG1655: resistència a l'àcid i formació de biofilm

Lee *et al.* (2007b) van descriure a YmgB com a una proteïna que proporciona resistència a l'àcid i que inhibeix la formació de biofilm. Per tal de confirmar el fenotip del mutant *yngB* de la soca d'*E. coli* MG1655, vam dur a terme tant l'assaig de resistència a l'àcid com el de formació de biofilm.

L'assaig de resistència a l'àcid es va realitzar seguint el protocol descrit per Masuda i Church (2003) en el qual se sotmet el cultiu bacterià a un xoc àcid (pH 2,5) i es calcula la supervivència després de transcorregut un cert temps. A la Fig. 3.60 s'indiquen els percentatges de supervivència a temps 1, 2 i 4 hores després del xoc àcid per la soca salvatge MG1655 i pel mutant isogènic *yngB*.



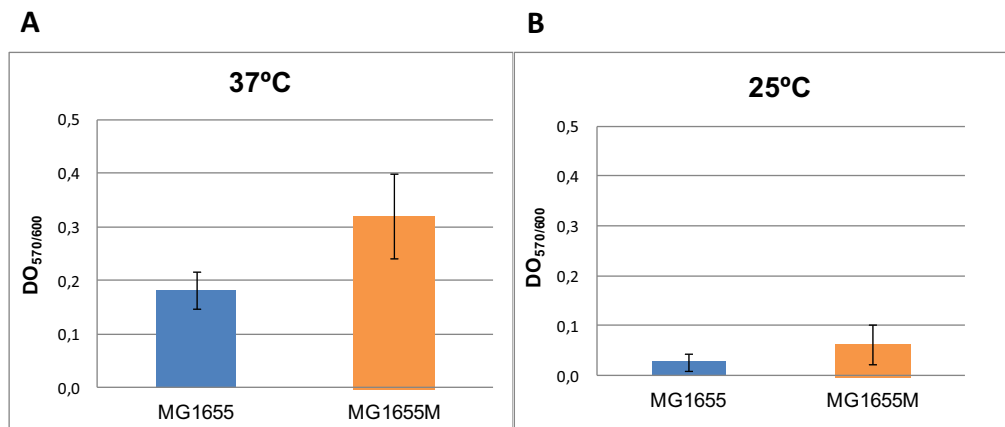
**Fig. 3.60.** Resistència a l'àcid de les soques MG1655 i del mutant *yngB* en medi LB (pH 2,5) a 37°C durant 1, 2 i 4 hores.

Tal com s'esperava, el mutant *yngB* obtingut en aquest treball (MG1655M) mostra una menor resistència a l'àcid que la soca salvatge MG1655.

A fi i efecte de continuar confirmant el fenotip de mutants *yngB* publicats anteriorment (Lee *et al.*, 2007b), en el que s'identifica a la proteïna YmgB com a un inhibidor de la formació de biofilms, vam realitzar l'assaig de formació de biofilm (veure Materials i mètodes 2.13) amb la soca salvatge i el mutant *yngB*.

Es va quantificar la producció de biofilm de la soca salvatge i del mutant *yngB* a les 24 hores en medi LB suplementat amb glucosa a 37 i a 25°C (Fig. 3.61).





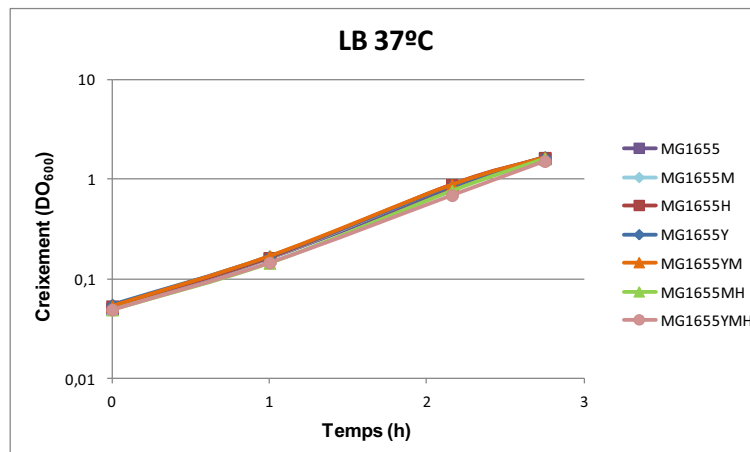
**Fig. 3.61.** Formació de biofilm de les soques MG1655 i del mutant *ymgB* en medi LB glucosa a les 24 hores a 37°C (A) i a 25°C (B).

El mutant *ymgB* obtingut en aquest treball (MG1655M) mostra un fenotip similar al descrit (Lee *et al.*, 2007b) pel que fa a la producció de biofilm, mostrant-se una major quantitat de biofilm en el mutant *ymgB* que en la soca salvatge tant a 37°C com a 25°C.

### 3.4.3. Efecte de les mutacions *ymgB*, *ymgB hha*, *ydgT ymgB* i *ydgT ymgB hha* sobre el creixement d'*E. coli* MG1655

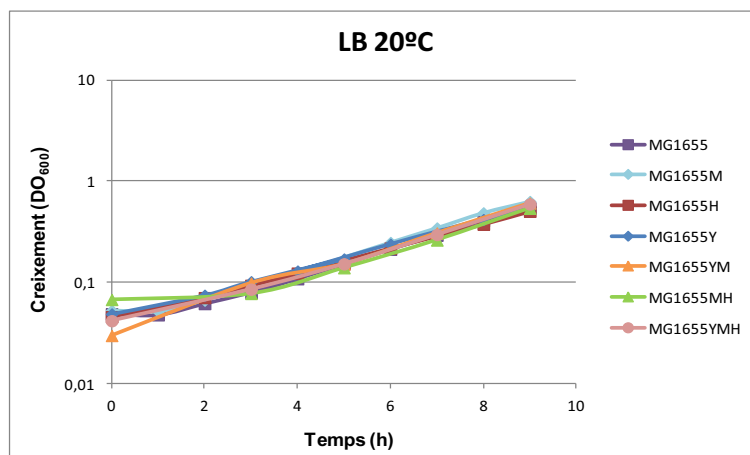
Amb el joc de mutants simple *ymgB* (MG1655M), dobles *ydgT ymgB* (MG1655YM) i *ymgB hha* (MG1655MH) i triple *ydgT ymgB hha* (MG1655YMH), es van dur a terme corbes de creixement tant en medi LB a 37°C com a baixa temperatura i alta concentració de NaCl.

A les corbes de creixement en medi LB a 37°C cap dels mutants testats va presentar diferències pel que fa a la taxa de creixement respecte a la soca salvatge MG1655 (Fig. 3.62).



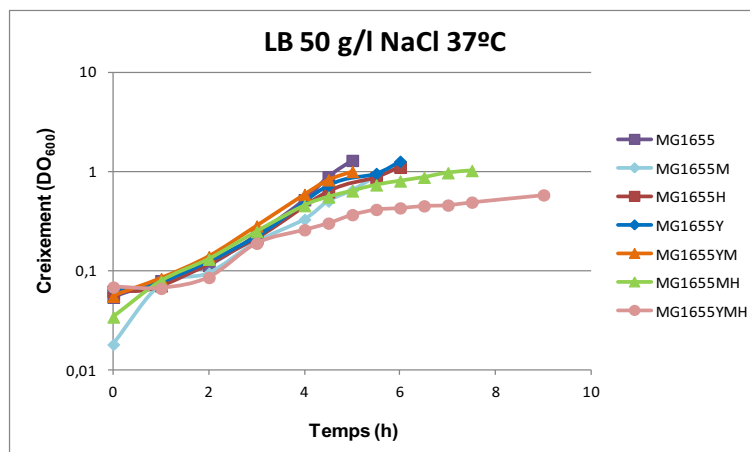
**Fig. 3.62.** Corbes de creixement de mutants *ymgB* en LB a 37°C.

Sabem pels estudis d'expressió de *ymgB* que aquest gen s'expressa més a baixes temperatures. Per aquest motiu, es van realitzar les corbes de creixement en LB a 20°C (Fig. 3.63) en les quals no s'aprecia cap alteració pel que fa a la taxa de creixement dels mutants respecte a la soca salvatge.



**Fig. 3.63.** Corbes de creixement de mutants *ymgB* en LB a 20°C.

Degut a què les proteïnes associades al nucleòide tenen un paper important a elevada osmolaritat, es van realitzar corbes de creixement a 37°C en medi LB amb 50 g/l NaCl (Fig. 3.64).



**Fig. 3.64.** Corbes de creixement de mutants *ymgB* en LB amb 50 g/l NaCl a 37°C.

A la figura anterior es pot observar una moderada disminució en la taxa de creixement del doble mutant *ymgB hha* (MG1655MH), la qual es veu incrementada quan manquen els tres gens *ydgT*, *ymgB* i *hha* (mutant MG1655YMH). Això ens podria estar indicant un possible paper comú entre les tres proteïnes YdgT, YmgB i Hha ja que és necessària la triple mutació per veure un defecte en el creixement sota condicions d'elevada osmolaritat.

### 3.4.4. Interacció de la proteïna YmgB amb altres proteïnes

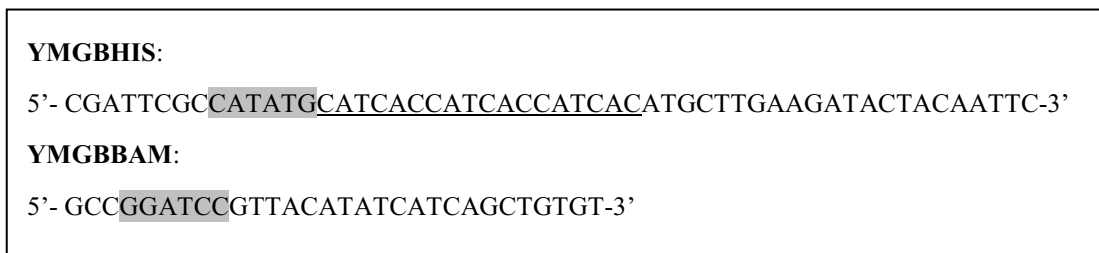
Els estudis amb YmgB descriuen a aquesta proteïna com a un possible modulador de l'expressió gènica que s'uneix a l'ADN *in vitro* de manera inespecífica (Lee *et al.*, 2007b). Aquests estudis suggereixen també que aquesta unió podria ser directa o indirecta a través d'una altra proteïna d'unio a l'ADN. Tenint en compte la similitud estructural amb Hha, i sabent que Hha s'uneix a H-NS per actuar com a regulador transcripcional, vam pensar que YmgB també podria estar unint-se a l'ADN de manera indirecta bé a través d'H-NS o de la seva paràloga StpA.

Per estudiar aquesta possible interacció entre YmgB i H-NS es va sobreexpressar la proteïna recombinant His-YmgB i, després de la unió de la cua d'histidines a una matriu de Ni<sup>2+</sup>-NTA agarosa, es va determinar quines proteïnes co-purificaven amb YmgB.

#### 3.4.4.1. Construcció de la proteïna recombinant His-YmgB

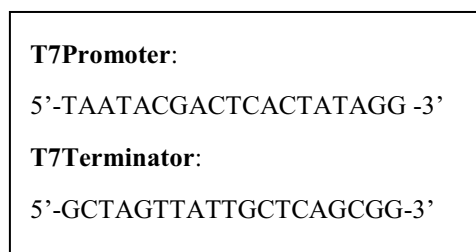
Per a la construcció de la proteïna recombinant YmgB amb cua d'histidines en N-terminal (His-YmgB), es va amplificar el gen *ymgB* amb els oligonucleòtids YMGBHIS i YMGBBAM (Fig. 3.65). L'ús d'aquests oligonucleòtids va permetre introduir una

diana *NdeI* i una cua d'histidines a l'extrem N-terminal i una diana *BamHI* 'després de l'extrem C-terminal d'*YmgB*. Aquestes dianes es van utilitzar per la seva posterior clonació en un vector pET11a. La temperatura d'hibridació que es va utilitzar en l'amplificació va ser de 54°C. Després d'aquesta primera amplificació, es va realitzar una restricció amb els enzims *BamHI* i *NdeI*.



**Fig. 3.65.** Oligonucleòtids utilitzats en l'amplificació del gen *ymgB* per a la clonació en el vector pET11a. En gris es ressalten les dianes *NdeI* i *BamHI*. Subratllat es mostra la cua d'histidines.

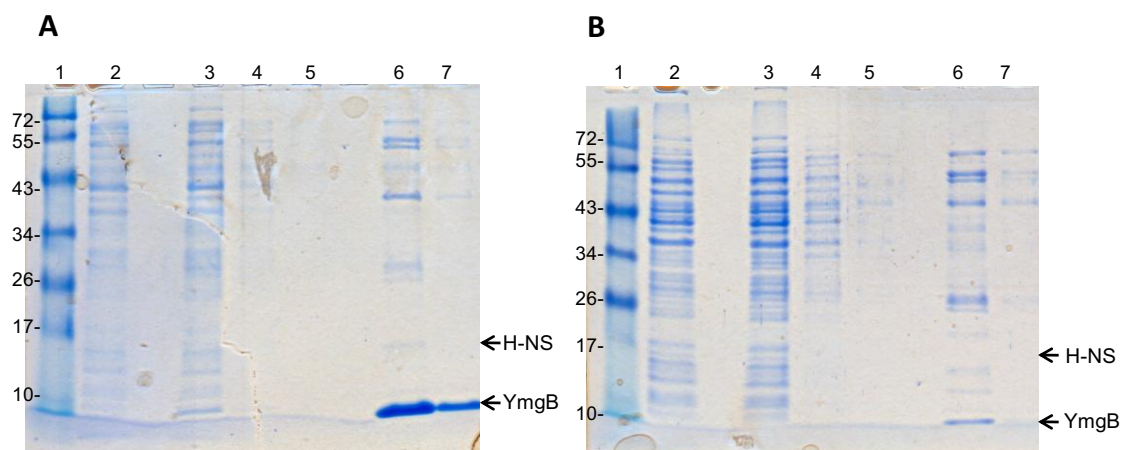
A continuació, es va linealitzar el vector pET11a per restricció amb els enzims *NdeI* i *BamHI*, i es va lligar amb el producte de l'amplificació per PCR amb els oligonucleòtids YMGBHIS i YMGBBAM digerit amb els mateixos enzims. D'aquesta manera es va obtenir un vector induïble per IPTG amb el gen *ymgB* clonat amb una cua d'histidines en N-terminal. El producte d'aquesta lligació, que es va anomenar pETHis-YmgB, es va transformar a la soca d'*E. coli* 5K. L'ADN plasmídic es va aïllar de nou d'aquesta soca i es va seqüenciar (apartat 2.6.4. Materials i mètodes) amb els oligonucleòtids T7Promoter i T7Terminator (Fig. 3.66) que hibriden amb seqüències del propi vector a '5' i 3' del lloc de clonació múltiple del vector. En ambdós casos, la temperatura d'hibridació que es va utilitzar en l'amplificació prèvia a la seqüenciació va ser de 50°C.



**Fig. 3.66.** Oligonucleòtids utilitzats per comprovar la correcta inserció del gen *ymgB* en el vector d'expressió pET11a.

### 3.4.4.2. Sobreexpressió i purificació d'His-YmgB

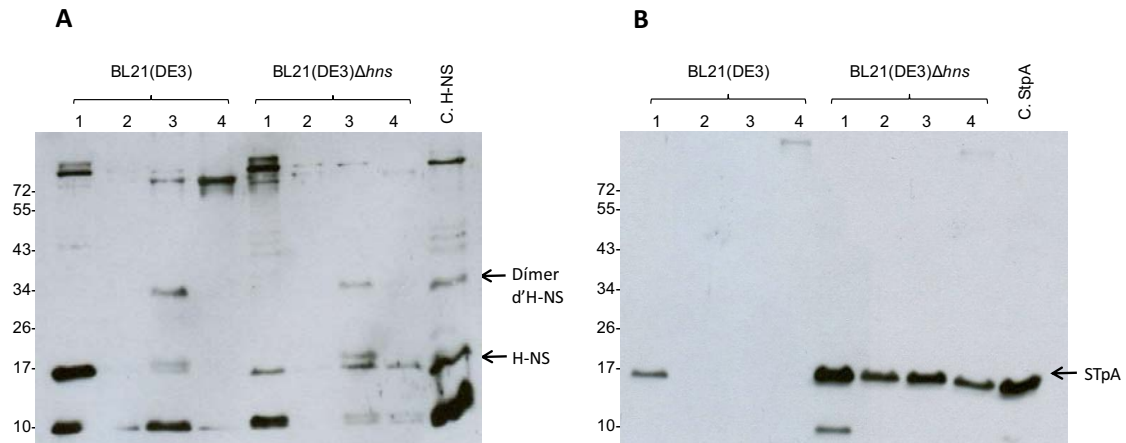
Un cop obtingut el gen *his-ymgB* clonat en un vector d'expressió es va sobreexpressar la proteïna His-YmgB tant a la soca BL21(DE3) com al corresponent mutant *hns* (BL21(DE3) $\Delta$ *hns*) seguint el protocol descrit en l'apartat 2.8.3 de Materials i mètodes. Els extractes obtinguts es van barrejar cadascun amb una matriu de Ni<sup>2+</sup>-NTA agarosa. Després de permetre la unió de les proteïnes i rentar les no unides amb tampó A (20 mM imidazol), es van eluir les proteïnes retengudes mitjançant rentats amb tampó A' (200 mM imidazol). Les fraccions pertanyents als rentats i a les elucions es van analitzar en gels de poliacrilamida Tris-Glicina-SDS (Materials i mètodes 2.8.4.1). A la Fig. 3.67 es mostren els rentats i les elucions obtingudes en les dues purificacions BL21(DE3) pETHis-YmgB (A) i BL21(DE3) $\Delta$ *hns* pETHis-YmgB (B).



**Fig. 3.67.** Anàlisi electroforètica i tinció amb Coomassie de fraccions eluïdes de Ni<sup>2+</sup>-NTA agarosa de la purificació His-YmgB en una soca BL21(DE3) (A) i en un mutant *hns* (B). 1) Marcador de pes molecular, 2) Restes sense unir, 3, 4 i 5) Rentats de la matriu amb tampó A (20 mM imidazol), 6 i 7) Elució de proteïnes amb tampó A' (200 mM imidazol).

La tinció amb Coomassie no va permetre evidenciar la copurificació d'H-NS amb His-YmgB.

A continuació, es va dur a terme la transferència de les proteïnes a una membrana de nitrocel·lulosa i la posterior immunodetecció amb anticossos contra H-NS (Fig. 3.68A). Paral·lelament, es va dur a terme la immunodetecció amb anticossos contra StpA, paràleg d'H-NS (Fig. 3.68B).



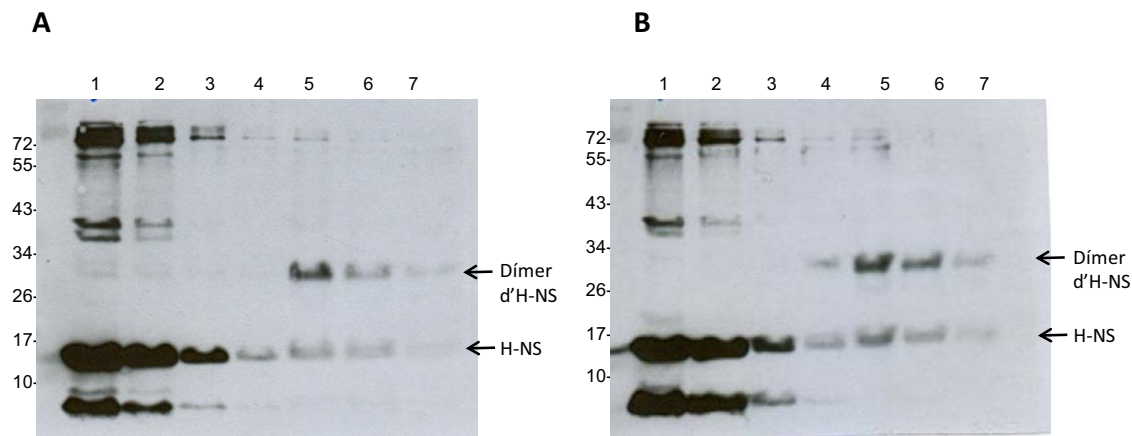
**Fig. 3.68.** Immunodetecció amb anti-sèrum anti-H-NS (A) i anti-StpA (B) de fraccions eluïdes de la matriu de Ni<sup>2+</sup>-NTA agarosa dels extractes BL21(DE3) i BL21(DE3)Δ*hns* amb His-YmgB sobreexpressat. Carrils 1 i 2) primer i últim rentat, carrils 3 i 4) primera i última elució amb imidazol 200 mM. L'últim carril correspon al control d'H-NS purificat.

A la immunodetecció amb anti-sèrum anti-H-NS de les fraccions eluïdes de la matriu de Ni<sup>2+</sup>-NTA agarosa de l'extracte BL21(DE3) pETHis-YmgB (Fig. 3.68A, esquerra), H-NS es va detectar al primer rentat amb tampó A (20 mM imidazol) i a la primera elució amb tampó A' (200 mM imidazol). Al no aparèixer H-NS a l'últim rentat amb 20 mM imidazol i reaparèixer a la posterior elució amb 200 mM imidazol podem afirmar que una part de l'H-NS present a l'extracte cel·lular es trobava unida a His-YmgB.

Pel que fa a l'extracte del mutant *hns*, a la immunodetecció amb anticossos anti-H-NS (Fig. 3.68A, dreta) apareixen algunes bandes que podrien correspondre a la proteïna StpA, la qual també és reconeguda per l'anticòs anti-H-NS de manera inespecífica. Per aquest motiu, quan fem la immunodetecció amb anticòs anti-StpA en el mutant *hns* (Fig. 3.68B, dreta) detectem la proteïna StpA tant en els rentats com en les elucions. Sabem que StpA està molt sobreexpressada en un mutant *hns* i això explicaria la presència d'aquesta proteïna en els rentats. A més, la banda corresponent a la primera elució és més intensa que la de l'últim rentat. Tot i que aquesta interacció es va repetir realitzant més rentats, a la immunodetecció continuava observant-se StpA en els rentats. Aquest fet podria explicar-se en el cas que la interacció YmgB-StpA fos molt dèbil i es despregués proteïna StpA unida a YmgB durant els rentats.

Els estudis d'expressió d'*ymgB* ens van indicar que aquest gen s'expressa més en fase estacionària que exponencial. Per aquest motiu, vam voler repetir l'experiment anterior

de co-purificació de His-YmgB en una matriu de Ni<sup>2+</sup>-NTA agarosa amb extractes de cultius de la soca BL21(DE3) pETHis-YmgB on s'indueix l'expressió d'aquesta proteïna amb IPTG en fase exponencial i en fase estacionària (Fig. 3.69A i B respectivament).



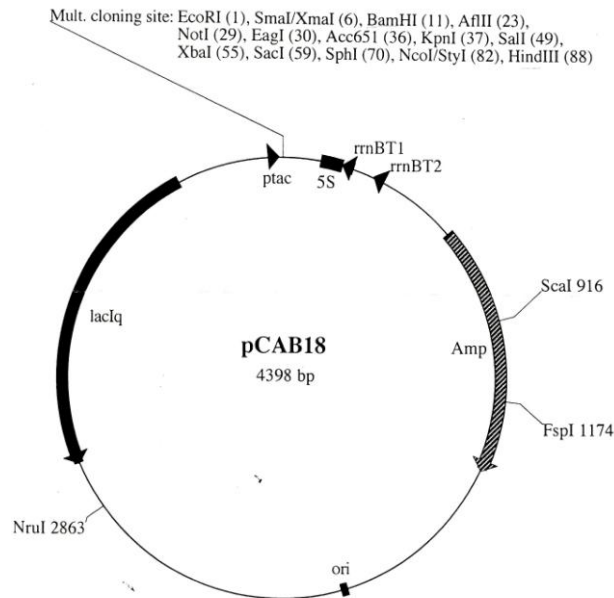
**Fig. 3.69.** Immunodetecció amb anti-sèrum anti-H-NS de fraccions eluïdes de la matriu Ni<sup>2+</sup>-NTA agarosa de dos extractes BL21(DE3) pETHis-YmgB induïts amb IPTG durant la fase exponencial (A) o estacionària (B). Carrils 1) restes sense unir, carrils 2, 3 i 4) rentats amb tampó A (20 mM imidazol) i carrils 5, 6 i 7) elucions amb tampó A' (200 mM imidazol).

No es van veure diferències entre les induccions a diferents fases de creixement (Fig. 3.69A i B). H-NS es va detectar tant en els rentats amb tampó A (20 mM imidazol) com en les fraccions eluïdes amb tampó A' (200 mM imidazol). En les fraccions eluïdes amb 200 mM imidazol es detecta sobretot el que correspondria al dímer d'H-NS.

Aquests estudis recolzen la hipòtesi que la proteïna YmgB pot interaccionar amb H-NS.

### 3.4.5. Sobreexpressió de la proteïna YmgB: nous gens regulats

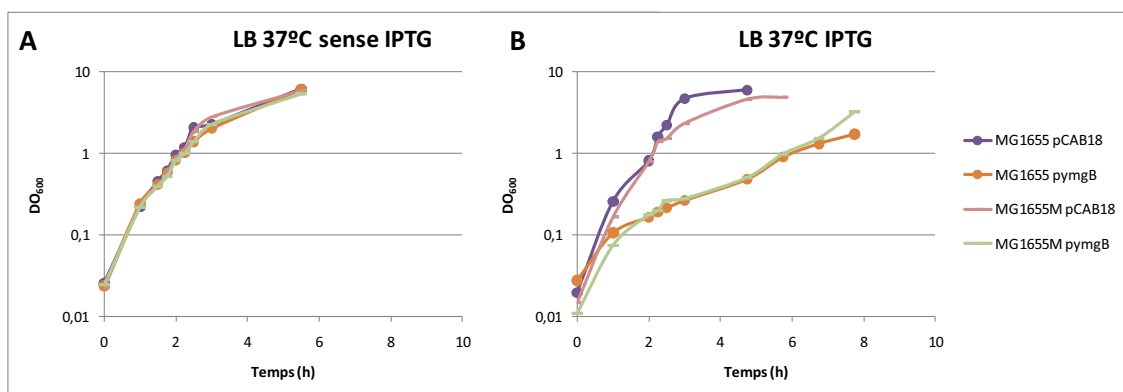
L'estudi dels mutants *ymgB* de la soca MG1655 ens va permetre corroborar el fenotip ja descrit d'aquests mutants (Lee *et al.*, 2007b), però no ens va permetre identificar nous fenotips. Una estratègia alternativa per estudiar la funció d'una proteïna, a part de l'estudi amb mutants, és a través de la sobreexpressió de la mateixa. Per aquesta raó, vam decidir estudiar l'efecte de la sobreexpressió d'*ymgB* sobre el proteïnograma de la soca MG1655. El vector d'expressió utilitzat fou cedit per Tschowri *et al.* (2009). Es tracta del vector pCAB18 induïble per IPTG amb *ymgB* clonat, el qual anomenem pYmgB. El mapa del plasmidi pCAB18 es mostra a la Fig. 3.70.



**Fig. 3.70.** Mapa del plasmidi de baix número de còpies pCAB18. De les dianes *ScaI* (916) a *NruI* (2863) correspon al vector pACYC177 (origen) i de *NruI* a *ScaI* al pRH800 (*lacIq* i promotor *taq*).

### 3.4.5.1. Efecte de la sobreexpressió d'*yngB* sobre el creixement

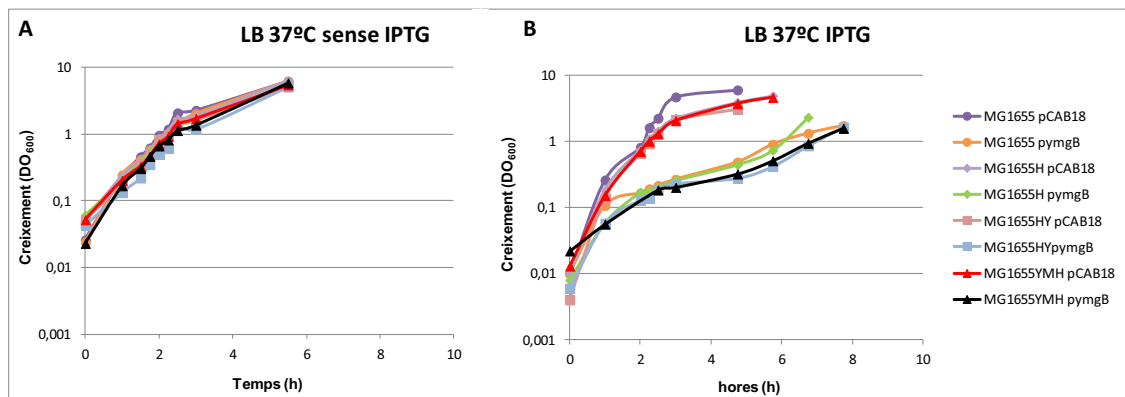
El primer efecte que vam observar al transformar el vector pYmgB a la soca salvatge i al mutant simple *yngB*, va ser una disminució en la taxa de creixement quan s'indueïa l'expressió d'*yngB* plasmídic amb 0,5 mM IPTG (Fig. 3.71).



**Fig. 3.71.** Corbes de creixement a 37°C en LB sense IPTG (A) i amb 0,5 mM IPTG (B) de les soques salvatge i mutant *yngB* portadores dels plasmidis pCAB18 i pYmgB.

Aquest mateix efecte es va observar a continuació per la resta de mutants *hha* (MG1655H), *ydgT hha* (MG1655YH) i *ydgT yngB hha* (MG1655YMH) (Fig. 3.72).





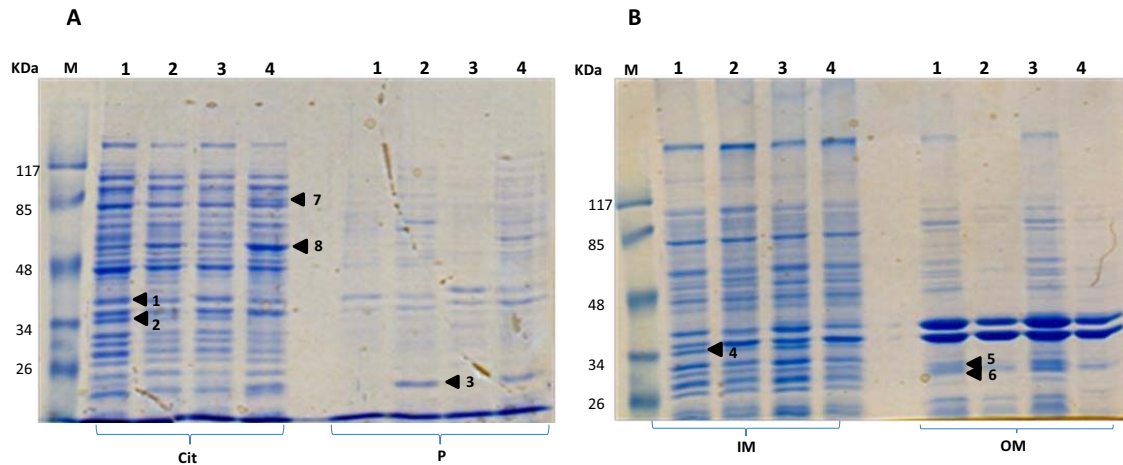
**Fig. 3.72.** Corbes de creixement a 37°C en LB sense IPTG (A) i amb 0,5 mM IPTG (B) de les soques salvatge i mutants *hha*, *hha ydgT* i *hha ydgT ymgB* portadores dels plasmidis pCAB18 i pYmgB.

Aquest efecte tòxic degut a la sobreexpressió d'*ymgB*, s'havia observat també anteriorment per la sobreexpressió d'*hha* (García-Contreras *et al.*, 2008).

### 3.4.5.2. Efecte de la sobreexpressió d'*ymgB* sobre el patró proteic

Tenint en compte que els estudis d'interacció proteïna-proteïna referits en l'apartat anterior suggereixen una possible interacció entre YmgB i H-NS, vam decidir estudiar també l'efecte de la sobreexpressió d'YmgB en una soca salvatge i en un mutant *hns*.

Per tal d'estudiar l'efecte de la sobreexpressió d'*ymgB* sobre el patró proteic es van realitzar fraccionaments cel·lulars (Materials i mètodes 2.8.1.3) de cultius en medi LB induïts amb IPTG de les soques MG1655 i MG1655*hns* portadores dels plasmidis pCAB18 i pYmgB a una DO<sub>600</sub> de 0,2. Les fraccions corresponents a citoplasma (cit), periplasma (P), membrana interna (IM) i membrana externa (OM) es van quantificar pel mètode de Bradford i la mateixa quantitat de proteïna es va analitzar mitjançant electroforesi SDS-PAGE en gels 10% acrilamida (Fig. 3.73).



**Fig. 3.73.** Anàlisi electroforètica de les fraccions corresponents a: **A.** citoplasma (cit) i periplasma (P) i **B.** membrana interna (IM) i membrana externa (OM). En ambdós gels els carrils 1 i 2 corresponen a la soca MG1655 portadora de pCAB18 i pYmgB respectivament. Els carrils 3 i 4 corresponen a la soca MG1655*hns* portadora de pCAB18 i pYmgB respectivament. M correspon al marcador de pesos moleculars indicats en kDa. Les fletxes indiquen les bandes expressades diferencialment a les soques analitzades.

Les bandes que mostraven una expressió diferencial entre les soques estudiades es van retallar i es van portar a identificar per MALDI-ToF (Plataforma de Proteòmica del Parc Científic de Barcelona). A les Taules 3.7 i 3.8 s'especifica, per a cada banda, la proteïna identificada en la soca salvatge MG1655 i en el mutant *hns* respectivament, i l'efecte que provoca la sobreexpressió d'*ymgB* sobre els nivells de cadascuna.

Número de banda	Efecte de la sobreexpressió d' <i>yngB</i> a la soca salvatge MG1655	Identificació
1	Reprimida per <i>YngB</i> (apareix amb més intensitat en la soca MG1655 pCAB18)	Outer membrane protein C (OmpC)
2	Reprimida per <i>YngB</i> (apareix amb més intensitat en la soca MG1655 pCAB18)	50s ribosomal protein L2
3	Induïda per <i>YngB</i> (apareix només en la soca MG1655 p <i>YngB</i> )	Periplasmic protein
4	Reprimida per <i>YngB</i> (apareix amb més intensitat en la soca MG1655 pCAB18)	50s ribosomal protein L2
5	Reprimida per <i>YngB</i> (apareix amb més intensitat en la soca MG1655 pCAB18)	Outer membrane protein A (OmpA)
6	Reprimida per <i>YngB</i> (apareix amb més intensitat en la soca MG1655 pCAB18)	Outer membrane protein C (OmpC)

**Taula 3.7.** Proteïnes expressades diferencialment en la sobreexpressió d'*yngB* a la soca salvatge MG1655.

Número de banda	Efecte de la sobreexpressió d' <i>yngB</i> a la soca MG1655 <i>hns</i>	Identificació
7	Induïda per <i>YngB</i> (apareix amb més intensitat en la soca MG1655 <i>hns</i> p <i>YngB</i> )	Lysine decarboxylase 1
8	Induïda per <i>YngB</i> (apareix amb més intensitat en la soca MG1655 <i>hns</i> p <i>YngB</i> )	Glutamate decarboxylase isozyme

**Taula 3.8.** Proteïnes expressades diferencialment en la sobreexpressió d'*yngB* en el mutant MG1655*hns*.

Les bandes retallades número 1 i 6, així com la 2 i la 4, es van identificar com les mateixes proteïnes (lisina descarboxilasa i proteïna ribosomal L2, respectivament), probablement degut a contaminacions entre els compartiments cel·lulars.

Els efectes de la sobreexpressió d'*yngB* observats en la soca salvatge MG1655 també s'observen en el mutant *hns* (Fig. 3.73). L'efecte més comú de la sobreexpressió d'*yngB* és la repressió de certes proteïnes (Taula 3.7) entre les quals ressaltarem les proteïnes de membrana externa OmpA i OmpC i la proteïna ribosomal L2. Pel que fa a les proteïnes de membrana externa, *YngB* reprimeix *ompA*. Aquest mateix efecte ha estat descrit també per la proteïna Hha (Balsalobre *et al.*, 1999; Paytubi, 2004).

També és destacable el fet que la proteïna ribosomal L2, que es troba reprimida quan sobreexpressen *ymgB*, és una proteïna relacionada amb la traducció. La proteïna ribosomal L2 està codificada pel gen *rplB* el qual s'ha descrit recentment com un modulador de la transcripció que interacciona amb l'ARN polimerasa, a més de jugar un paper en l'assemblatge del ribosoma (Rippa *et al.*, 2010). A fi i efecte de trobar una relació entre YmgB i la proteïna ribosomal L2, es van dur a terme experiments de PCR a temps real per conèixer l'expressió del gen *rplB* en condicions en què YmgB estava sobreexpressat (veure apartat Resultats 3.4.5.3).

Per últim, la sobreexpressió d'*ymgB* en un mutant *hns* provoca la inducció de dues proteïnes relacionades amb la resistència a l'àcid: la glutamat descarboxilasa i la lisina descarboxilasa. La primera (codificada per *gadA*) ja havia estat descrita anteriorment com a una proteïna implicada en la resistència a l'àcid que està reprimida en un mutant *ymgB* (Lee *et al.*, 2007b). En canvi, la lisina descarboxilasa, tot i que també està implicada en la resistència a l'àcid, no s'havia relacionat mai directament amb YmgB.

### 3.4.5.3. Efecte de la sobreexpressió d'*ymgB* sobre l'expressió d'*rplB*: estudi per PCR a temps real

Els experiments de PCR a temps real per conèixer l'expressió del gen *rplB* es van dur a terme en la soca que sobreexpressava *ymgB* (MG1655 pYmgB).

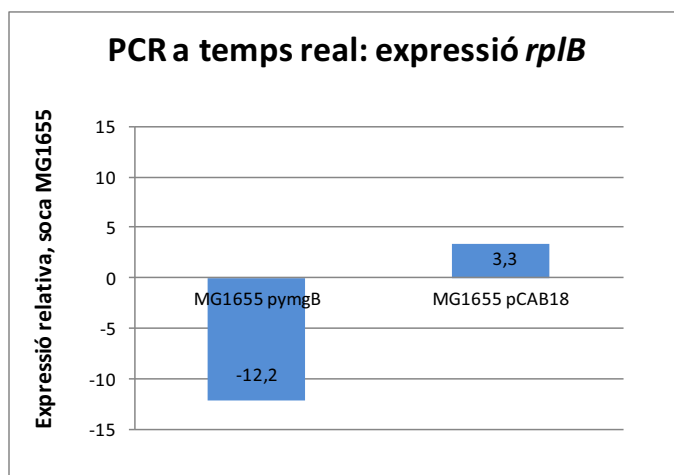
Es van dissenyar els oligonucleòtids i la sonda TaqMan® corresponents al gen *rplB* (Fig. 3.74). Com a gen de referència es va utilitzar l'ARN ribosòmic 16s. Els oligonucleòtids i la sonda TaqMan® per aquest gen de referència es detallen a la mateixa figura.

<p><b>Sonda RPLB:</b> 5'-TGAACGTCTTGAGTACGATCCGAACCG-3'</p> <p><b>Oligonucleòtid FW-RPLB:</b> 5'- AAGACGGTATCCCGGCAGT-3'</p> <p><b>Oligonucleòtid RPLB-RV:</b> 5'-CGCGATGTTTCGCGGA-3'</p>	<p><b>Sonda 16s:</b> 5'-CCCGGGCCTTGTAC-3'</p> <p><b>Oligonucleòtid FW-16s:</b> 5'-AGAATGCCACGGTGAATACGT-3'</p> <p><b>Oligonucleòtid 16s-RV:</b> 5'-GGTGTGACGGGCGGTG-3'</p>
---	--

**Fig. 3.74.** Oligonucleòtids i sondes TaqMan® utilitzats per a l'amplificació del gen *rplB* i del gen de referència 16s.

Es va aïllar l'ARN de cultius de les soques MG1655 pCAB18 i MG1655 pYmgB a 37°C (DO<sub>600</sub>= 0,6) (veure Materials i mètodes 2.7.1).

Els resultats d'expressió relativa obtinguts es van analitzar per tal de comparar l'expressió del gen *rplB* a les soques portadores dels plasmidis pYmgB i pCAB18 respecte a la soca salvatge (Fig. 3.75).



**Fig. 3.75.** Resultats d'expressió relativa obtinguts per PCR a temps real del gen *rplB* per les soques MG1655 pYmgB i pCAB18 en funció de l'expressió a la soca salvatge MG1655.

Quan sobreexpressem *ymgB* (MG1655 pYmgB), el gen *rplB* es troba reprimit unes 12 vegades respecte a la soca MG1655 pCAB18 (Fig. 3.75). Aquest resultat és coherent amb les dades obtingudes de la sobreexpressió d'*ymgB* en el patró proteic sobre la proteïna ribosomal L2 (Fig. 3.73).

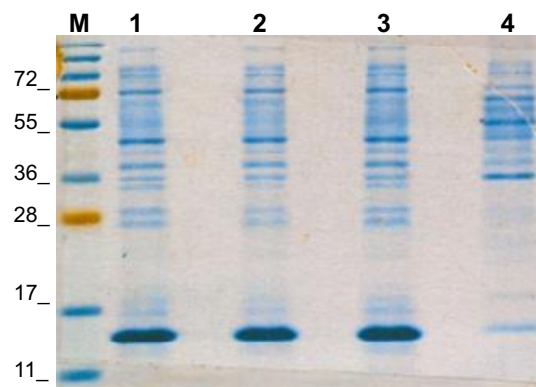
### 3.4.6. Sobreexpressió de la proteïna YmgB: efecte sobre H-NS i Hha i gens regulats per aquestes proteïnes

Les proteïnes associades al nucleòide de la famílies H-NS i Hha mostren una regulació creuada de la seva expressió (Madrid *et al.*, 2007a). Per trobar noves evidències experimentals a nivell de regulació que permetessin relacionar YmgB amb els membres d'aquestes famílies, es va estudiar l'expressió d'*hns* i d'*hha* i de gens regulats per aquests en soques que sobreexpressaven *ymgB*.

### 3.4.6.1. Efecte de la sobreexpressió de la proteïna YmgB sobre l'expressió de les proteïnes H-NS i Hha

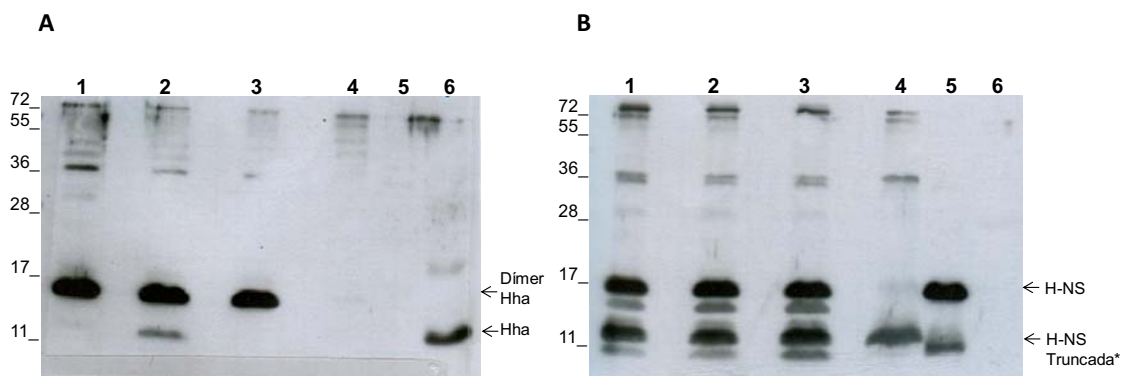
Els plasmidis pCAB18 i pYmgB es van transformar a la soca salvatge MG1655 i es van obtenir extractes totals de proteïnes (Materials i mètodes 2.8.1.1) a partir de cultius crescuts en medi LB amb 0,5 mM IPTG. Com a control es va transformar també la soca MG1655 amb els vectors pBR322 i pUBM22 (pBR322 amb *hha* clonat (Nieto *et al.*, 2000)), aquest darrer extracte simplement per confirmar la localització de la proteïna Hha en un extracte cel·lular.

Els extractes proteics totals obtinguts es van quantificar pel mètode de Bradford (Materials i mètodes 2.8.2) i es va dur a terme l'anàlisi electroforètica en gels SDS-PAGE al 15% d'acrilamida carregant 10 µg de proteïna de cada mostra. La tinció amb Coomassie va permetre detectar un patró proteic alterat per l'extracte de la soca MG1655 pYmgB (Fig. 3.76) com ja s'havia observat anteriorment (Fig. 3.73 i Taula 3.7).



**Fig. 3.76.** Anàlisi electroforètica i tinció amb Coomassie dels extractes proteics totals de: 1) MG1655 pBR322, 2) MG1655 pUBM22, 3) MG1655 pCAB18 i 4) MG1655 pYmgB. M correspon al marcador de pesos moleculars indicats en kDa. En tots els carrils es van carregar 10 µg de proteïna.

A continuació, es va fer la transferència de les proteïnes a dues membranes de nitrocel·lulosa amb les quals es va dur a terme la immunodetecció amb antisèrum anti-Hha i anti-H-NS (Fig. 3.77A i B respectivament).



**Fig. 3.77.** Immunodetecció amb anti-sèrum anti-Hha (A) i anti-H-NS (B) dels extractes totals de: 1) MG1655 pBR322, 2) MG1655 pUBM22, 3) MG1655 pCAB18, 4) MG1655 *ymgB*, 5) control H-NS i 6) control Hha. En tots els carrils es van carregar 10 µg de proteïna. \*La banda que apareix amb un PM inferior a H-NS correspon a formes de degradació o truncades d'aquesta proteïna.

Tal i com s'esperava, al sobreexpressar *hha* (MG1655 pUBM22) obtenim més quantitat d'aquesta proteïna de 8,6 kDa i del corresponent dímer (Fig. 3.77A, carril 2). En canvi, al sobreexpressar *ymgB* l'expressió d'*hha* queda reprimida (Fig. 3.77A, carril 4). Per tal de trencar els dímers observats en els carrils 1, 2 i 3 es va fer un tractament amb DTT 1 M, però no es va aconseguir obtenir monòmers.

Pel que fa a la immunodetecció amb antisèrum anti-H-NS (Fig. 3.77B), els anticossos van reconèixer quatre bandes diferents. D'aquestes, dues corresponen al monòmer d'H-NS (15,5 kDa) i possiblement a formes resultants de la degradació parcial d'H-NS. La sobreexpressió d'*ymgB* resulta en la desaparició de la proteïna H-NS nadiua detectant-se exclusivament una hipotètica H-NS truncada (Fig.3.77B, carril 4).

Aquests resultats suggereixen una regulació creuada entre *YmgB* i les proteïnes associades al nucleòide H-NS i Hha.

### 3.4.6.2. Efecte de la sobreexpressió d'*ymgB* sobre l'expressió de gens regulats per H-NS: *bgl*, *proU* i *hly*

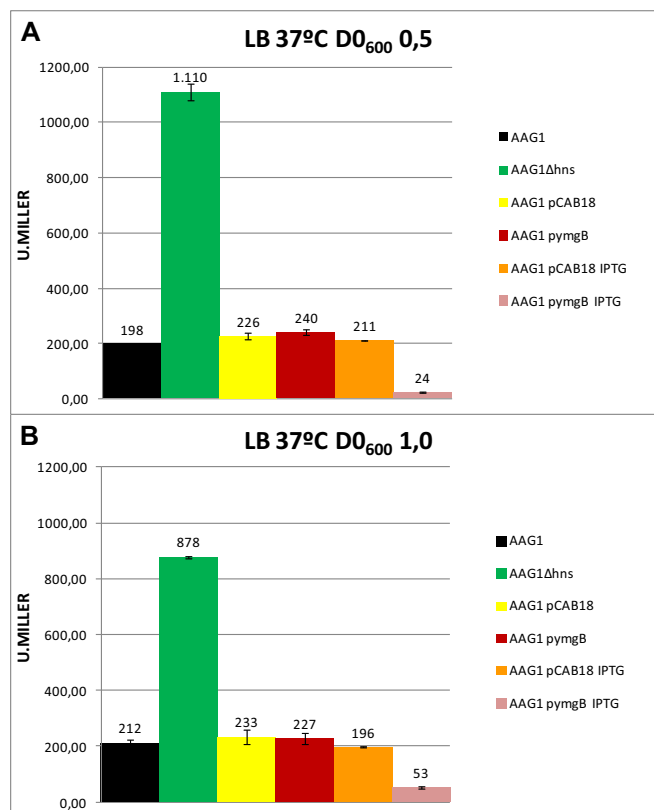
Tant els resultats d'interacció proteïna-proteïna com l'efecte de la sobreexpressió d'*ymgB* sobre els gens *hha* i *hns*, suggereixen una relació funcional entre *YmgB* i H-NS/Hha. A fi i efecte d'aportar noves evidències experimentals sobre aquesta relació, vam decidir estudiar si la sobreexpressió d'*ymgB* afecta a gens regulats per H-NS/Hha. Es van escollir tant gens regulats exclusivament per H-NS (*proU* i *bgl*) com gens regulats pel complex H-NS/Hha (*hly*).

#### 3.4.6.2.1. Efecte de la sobreexpressió d'*yngB* en l'expressió de *proU*

L'operó *proU* d'*E. coli* representa un exemple prototip de *locus* regulat per H-NS (Williams *et al.*, 1996; Ueguchi *et al.*, 1996; Ueguchi *et al.*, 1997). L'operó *proU* codifica per un sistema de transport d'elevada afinitat de glicina-betaïna. La glicina-betaïna és un osmoprotector que s'acumula en condicions d'estrès osmòtic en *E. coli* i *S. Typhimurium* per contrarestar l'osmolaritat externa i per restaurar la turgència. L'expressió de *proU* està regulada molt finament per l'osmolaritat del medi, així doncs, a baixa osmolaritat no es dona pràcticament expressió i en canvi a elevada osmolaritat (500 mM) l'expressió d'aquest augmenta fins a 100 vegades (Lucht *et al.*, 1994). Mutacions en el gen *hns* permeten la desrepressió del gen *proU* a baixa osmolaritat (Higgins *et al.*, 1988). Aquest fet és degut a que a baixa osmolaritat, H-NS funciona com a repressor transcripcional de *proU* (Ueguchi and Mizuno, 1993).

Per tal d'estudiar l'efecte de la sobreexpressió d'*yngB* sobre l'operó *proU* d'*E. coli*, es va construir una soca portadora d'una fusió cromosòmica *proU::lacZ*. 'Es va obtenir un lisat P1vir 'sobre la soca d'*E. coli* GM37 i es va transduir la fusió cromosòmica *proU::lacZ* a la soca AAG1 (MG1655 $\Delta$ *lacZ*). A continuació, es va valorar l'activitat  $\beta$ -galactosidasa (Materials i mètodes 2.9.1) d'aquesta soca amb els plasmidis pCAB18 o pYngB en presència o no d'IPTG a 37°C a diferents fases de creixement (Fig. 3.78). La soca mutant *hns* es va utilitzar com a control de l'assaig. Aquest mutant també va ser transformat amb pCAB18 i pYngB, però no va ser possible avaluar la seva activitat  $\beta$ -galactosidasa degut a la pèrdua dels plasmidis a estadis primerencs del creixement quan afegíem IPTG al medi per tal d'induir l'expressió d'*yngB*.

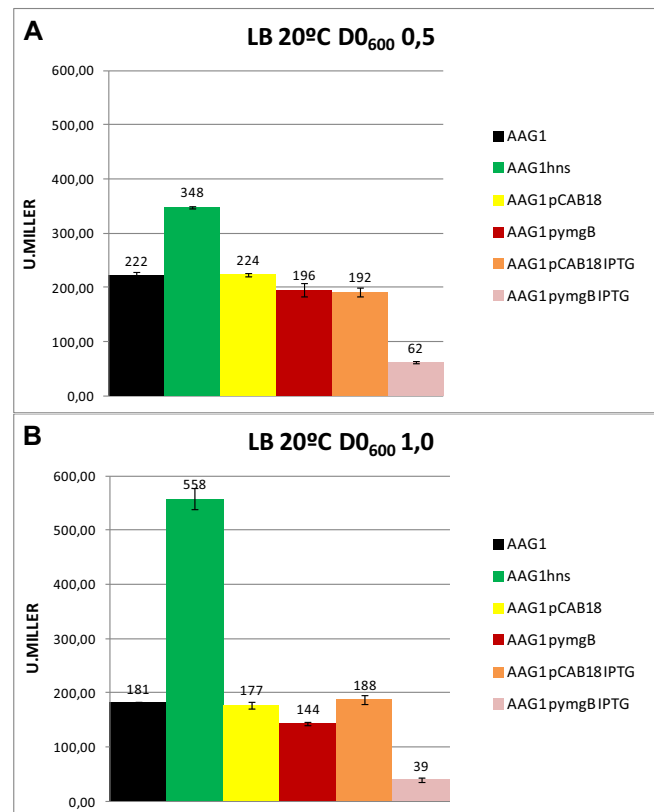




**Fig. 3.78.** Activitat β-galactosidasa de les soques indicades portadores de la fusió cromosòmica *proU::lacZ* crescudes a 37°C a diferents estadis de creixement: DO<sub>600</sub>=0,5 (A) i DO<sub>600</sub>=1,0 (B).

La sobreexpressió d'*yngB* a 37°C provoca una disminució de l'expressió de *proU* a la soca salvatge AAG1. Tal i com s'esperava, en el mutant *hns* l'expressió de *proU* es veu molt augmentada.

Sabent que *yngB* s'expressa més a baixa temperatura, es va dur a terme l'assaig de β-galactosidasa anterior utilitzant cultius crescuts a 20°C (Fig. 3.79).

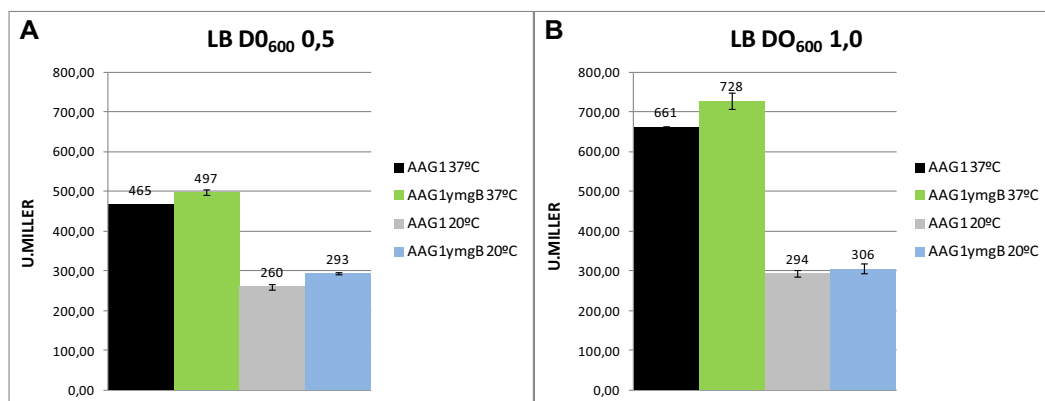


**Fig. 3.79.** Activitat  $\beta$ -galactosidasa de les soques indicades portadores de la fusió cromosòmica *proU::lacZ* crescudes a 20°C a diferents estadis de creixement: DO<sub>600</sub>=0,5 (A) i DO<sub>600</sub>=1,0 (B).

A 20°C, la sobreexpressió d'*yngB* també provoca una disminució de l'expressió de *proU*.

A continuació, es va dur a terme aquest mateix assaig de  $\beta$ -galactosidasa amb el mutant *yngB* tant a 20°C com a 37°C i es van comparar els nivells d'expressió amb els de la soca salvatge (Fig. 3.80). A cap d'aquestes dues temperatures es va observar una expressió de *proU* diferent a la de la soca salvatge.

Per tant, podem dir que *YngB* és una proteïna que quan se sobreexpressa pot reprimir l'expressió de *proU* tant a una temperatura de 37°C com de 20°C.



**Fig. 3.80.** Activitat  $\beta$ -galactosidasa de les soques salvatge i mutant *yngB* portadores de la fusió cromosòmica *proU::lacZ* crescudes a 37°C i a 20°C a diferents estadis de creixement:  $DO_{600} = 0,5$  (A) i  $DO_{600} = 1,0$  (B).

### 3.4.6.2.2. Efecte de la sobreexpressió d'*yngB* en l'expressió de *bgl*

L'operó *bgl* d'*E. coli* codifica per proteïnes que duen a terme les funcions d'internalització i utilització dels  $\beta$ -glucòsids aromàtics arbutina i salicina.

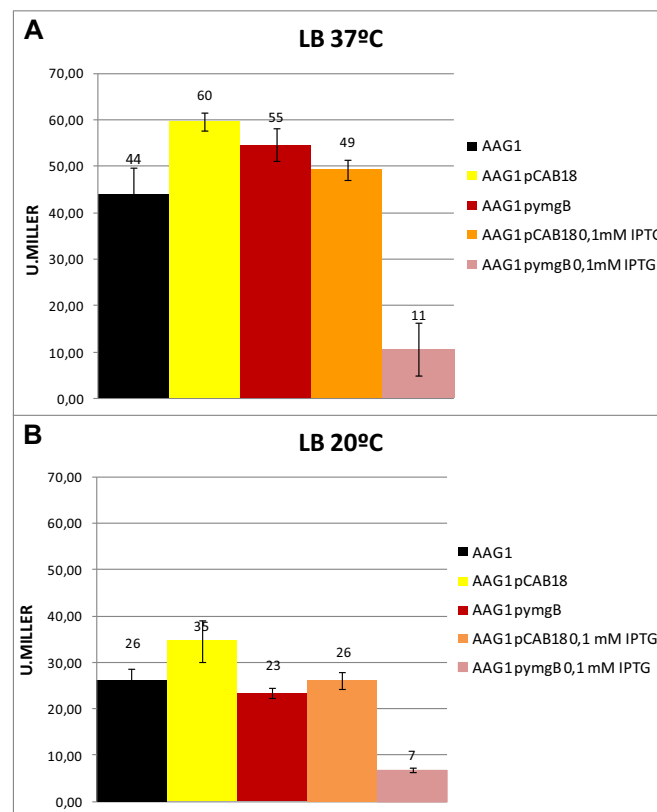
La proteïna H-NS és essencial pel silenciament de l'operó *bgl* (Defez i De Felice, 1981; Higgins *et al.*, 1988). H-NS reprimeix el promotor de l'operó *bgl*, que és dependent de CRP, unint-se a una zona rica en AT (silenciador) localitzada just abans del lloc d'unió de la proteïna CRP (Schnetzer, 1995; Schnetzer i Wang, 1996; Mukerji i Mahadevan, 1997).

Tot i això, a part d'H-NS s'ha determinat que hi ha altres proteïnes que intervenen en el silenciament de l'operó *bgl*, com són les proteïnes FIS, RpoS, StpA, Hfq, LeuO i BglJ (Tsui *et al.*, 1994; Giel *et al.*, 1996; Free *et al.*, 1998; Ueguchi *et al.*, 1998; Ohta *et al.*, 1999). Per altra banda, existeixen dues evidències que ens van fer pensar en una possible implicació d'YngB en la regulació de l'operó *bgl*: (i) s'ha detectat la interacció d'YngB amb el promotor de CRP en *microarrays* d'ADN enriquit amb níquel (Lee *et al.*, 2007b) i (ii) s'ha determinat que l'expressió de l'operó *bgl* es veu alterada en funció de la fase de creixement (inducció de 4 vegades en fase estacionària respecte a exponencial) (Madan *et al.*, 2008). Com ja s'ha indicat anteriorment, YngB es tracta d'una proteïna que s'expressa més en fase estacionària i baixa temperatura.

Per mesurar l'expressió de *bgl*, es va construir un plasmidi que contenia una fusió transcripcional *bgl::lacZ*, el qual es va co-transformar conjuntament amb pCAB18 o pYmgB a la soca AAG1 (MG1655  $\Delta lacZ$ ).

Per la construcció del plasmidi amb la fusió *bgl::lacZ* es va utilitzar el vector pLG339-30 (resistent a km). La part corresponent a la fusió *bgl::lacZ* es va obtenir per restricció amb els enzims *Bam*HI i *Sal*I del plasmidi pLG*bgl::lacZ* (Forns, 2006). A continuació, es va dur a terme la lligació del fragment *Bam*HI-*Sal*I que contenia la fusió *bgl::lacZ* amb el vector pLG339-30 prèviament tallat amb els mateixos enzims. El nou vector obtingut es va anomenar pLG339*bgl::lacZ*.

Després de co-transformar els vectors pLG339*bgl::lacZ* ( $km^R$ ) i pYmgB o pCAB18 ( $Ap^R$ ) a la soca salvatge AAG1, es va determinar l'expressió de *bgl* mitjançant l'assaig de  $\beta$ -galactosidasa de cultius crescuts fins a  $DO_{600}=1$  a diferents temperatures (20 i 37°C) i en presència o no de 0,1 mM IPTG (Fig. 3.81).



**Fig. 3.81.** Activitat  $\beta$ -galactosidasa de les soques indicades portadores del plasmidi pLG339*bgl::lacZ* crescudes a diferent temperatura: 37°C (A) i 20°C (B).

L'efecte de la sobreexpressió d'*ymgB* s'observa quan induïm amb 0,1 mM IPTG. Aquest efecte consisteix en la disminució de l'expressió de *bgl* tant a 37°C com a 20°C. Per tant, la proteïna YmgB està implicada en el silenciament de *bgl* de manera independent de la temperatura.

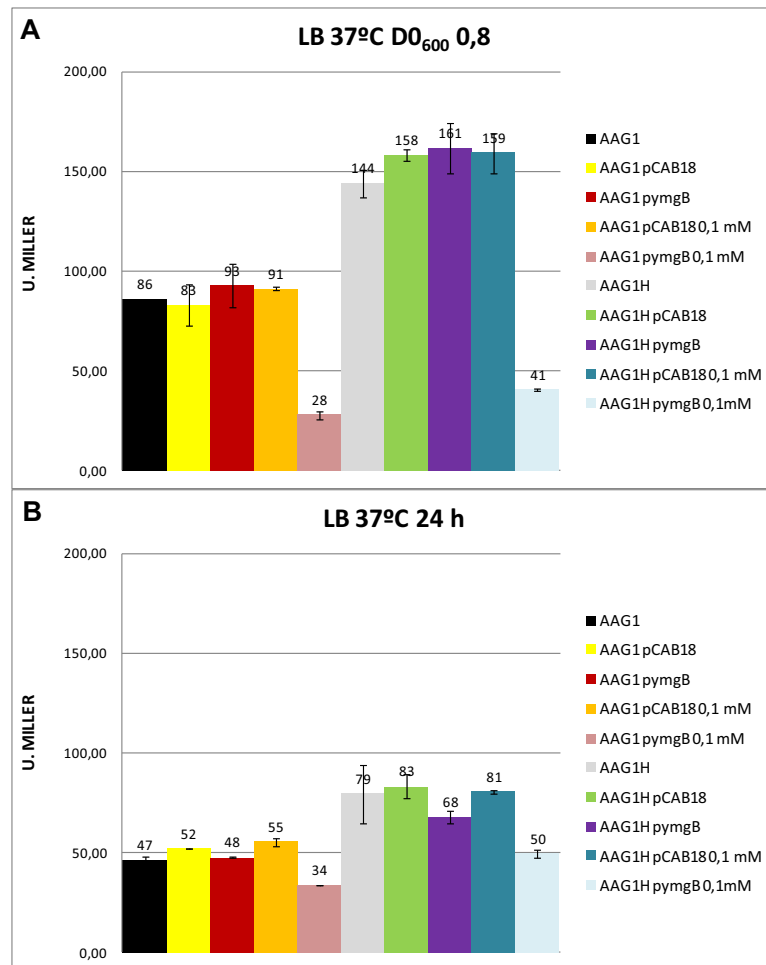
#### **3.4.6.2.3. Efecte de la sobreexpressió d'*ymgB* en l'expressió de la toxina $\alpha$ -hemolisina**

El conjunt de proteïnes tipus Hha poden unir-se al domini d'oligomerització d'H-NS i formar complexos amb aquest per tal de reprimir l'expressió de la toxina  $\alpha$ -hemolisina (Madrid *et al.*, 2007a). Per tant, l'operó *hly* representa un altre possible punt de regulació per YmgB, en aquest cas comú per H-NS i per Hha/YdgT.

De la mateixa manera que en els dos apartats anteriors, vam voler determinar mitjançant l'assaig de  $\beta$ -galactosidasa l'expressió de l' $\alpha$ -hemolisina en soques que sobreexpressaven *ymgB*. Per això, es va utilitzar el plasmidi pHly152::*lacZ* que consisteix en el plasmidi hemolític pHly152 amb una fusió *lacZ* amb el gen *hlyA*, gen de l'operó hemolític que codifica per la toxina.

El plasmidi pHly152::*lacZ* ( $\text{km}^R$ ) es va co-transformar juntament amb els plasmidis pCAB18 i pYmgB ( $\text{Ap}^R$ ) a la soca AAG1 (MG1655 $\Delta$ *lacZ*) i als derivats mutants *hha* (AAG1H), *ydgT* (AAG1Y) i *hha ydgT* (AAG1HY). Aquestes tres soques mutants es van construir per transducció de la soca AAG1 utilitzant lisats P1vir obtinguts dels corresponents mutants *hha* i *ydgT* de la soca MG1655 (Materials i mètodes 2.4.3).

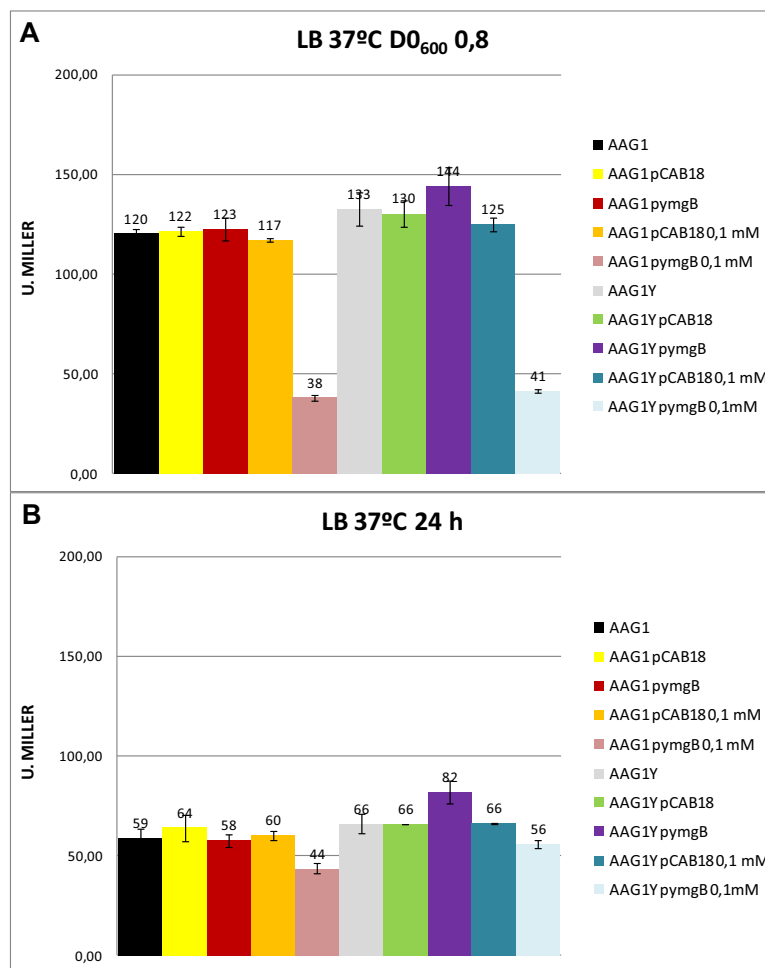
A la Fig. 3.82 es detallen els resultats d'expressió d'*hlyA* obtinguts a l'assaig de  $\beta$ -galactosidasa de la soca salvatge AAG1 i del mutant *hha* (AAG1H) portadors dels plasmidis pCAB18 o pYmgB en presència o no d'IPTG a 37°C. Es va agafar mostra tant de cultius a  $\text{DO}_{600}=0,8$  (pic d'expressió de l' $\alpha$ -hemolisina) (A) com a les 24h de creixement (B).



**Fig. 3.82.** Activitat  $\beta$ -galactosidasa de les soques indicades portadores del plasmidi pHly152::*lacZ* crescudes a 37°C a diferents estadis de creixement: DO<sub>600</sub>= 0,8 (A) i cultius de 24 hores (B).

Tal i com està descrit, la mutació *hha* provoca la desregulació de l'expressió de l' $\alpha$ -hemolisina respecte a la soca salvatge (Fig. 3.82, columna gris respecte columna negra en A i B) (Godessart *et al.*, 1988). Quan se sobreexpressa *ymgB* afegint 0,1 mM IPTG al cultiu de la soca AAG1 pYmgB es produeix una disminució de l'expressió d'*hlyA* tant a la soca salvatge com al mutant *hha* (Fig. 3.82). Aquest efecte és més acusat a la DO<sub>600</sub> on es produeix el pic d'expressió de l' $\alpha$ -hemolisina (DO<sub>600</sub>=0,8) que en fase estacionària.

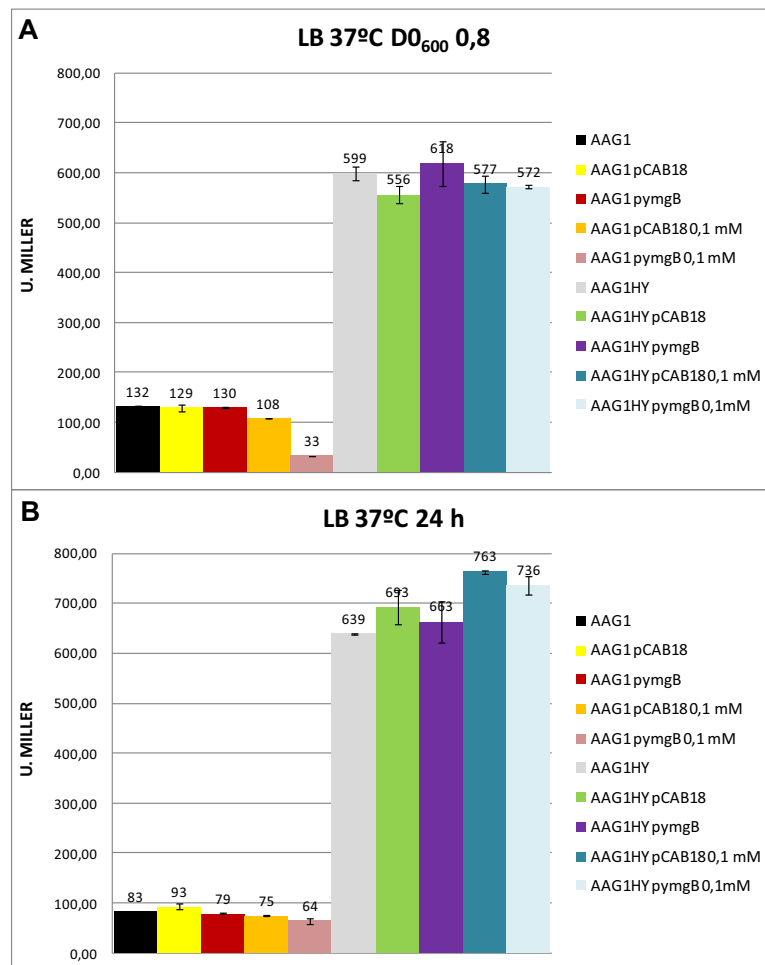
A continuació, es van co-transformar els plasmidis al mutant *ydgT* (AAG1Y) i es va valorar l'activitat  $\beta$ -galactosidasa. A la Fig. 3.83 es mostren els resultats obtinguts.



**Fig. 3.83.** Activitat  $\beta$ -galactosidasa de les soques indicades portadores del plasmidi pHly152::*lacZ* crescudes a 37°C a diferents estadis de creixement: DO<sub>600</sub>=0,8 (A) i cultius de 24 hores (B).

En el cas del mutant *ydgT*, igual que en el mutant *hha*, veiem l'efecte produït per la sobreexpressió d'*yngB* quan afegim IPTG 0,1 mM. Aquest efecte consisteix en una disminució de l'expressió del gen *hlyA*.

Per últim, es va dur a terme el mateix experiment amb el doble mutant *hha ydgT* (AAG1HY). Els valors d'expressió d'*hlyA* obtinguts per les soca AAG1HY co-transformada amb els vectors pHly152::*lacZ* i pCAB18 o pYngB amb/sense 0,1 mM IPTG es detallen a la Fig. 3.84.



**Fig. 3.84.** Activitat  $\beta$ -galactosidasa de les soques indicades portadores del plasmidi pHly152::*lacZ* crescudes a 37°C a diferents estadis de creixement: DO<sub>600</sub>=0,8 (A) i cultius de 24 hores (B).

Sorprenentment, la sobreexpressió d'*yngB* en el doble mutant *hha yngT* no provoca canvis en l'expressió d'*hlyA* (Fig. 3.84). Això ens indica que perquè *YngB* pugui reprimir l'expressió d'*hlyA* requereix o bé la presència d'*Hha* o bé d'*YngT*. Per això, quan manquen aquestes dues proteïnes ja no s'observa la disminució en l'expressió d'*hlyA* que mostraven els mutants senzills *hha* i *yngT*. Per tant, ens trobem davant d'un sistema de regulació de l'expressió de la toxina  $\alpha$ -hemolisina en la qual es troben implicades les proteïnes associades al nucleòide *Hha/YngT* i la proteïna *YngB*.

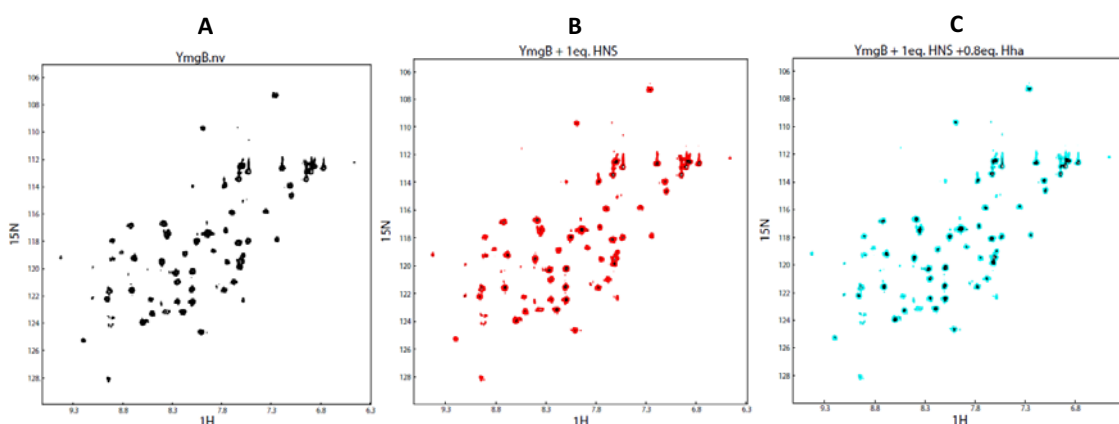


### 3.4.7. Interacció entre les proteïnes YmgB i Hha/YdgT

Els resultats anteriors, que indiquen una relació entre YmgB i les proteïnes Hha/YdgT, suggereixen una possible interacció entre YmgB i Hha i/o YdgT.

Degut a la similitud pel que fa al pes molecular d'Hha/YdgT i la proteïna YmgB, l'estudi de la interacció entre aquestes proteïnes mitjançant la barreja d'extractes sobreexpressats i posterior co-purificació en una resina de Ni<sup>2+</sup>-NTA agarosa, requeria l'obtenció d'anticossos específics anti-YmgB que permetessin detectar aquesta proteïna a les elucions.

Com a alternativa, J. García del grup col·laborador de RMN Biomolecular de l'Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona (IRB) va realitzar un estudi d'interacció per ressonància magnètica nuclear (RMN). En aquests estudis d'RMN es va marcar amb <sup>15</sup>N la proteïna YmgB i es van adquirir els espectres que es mostren a la Fig. 3.85: (A) de la proteïna YmgB sola, (B) en presència d'un equivalent d'HNS i (C) d'un equivalent d'HNS + 0,8 equivalents d'Hha. Els espectres en els tres casos són indistingibles, el que significa que en aquestes condicions no es detecta interacció.



**Fig. 3.85.** Espectre <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC realitzat a pH=7,2 d'YmgB marcat amb <sup>15</sup>N (55uM) abans (negre) (A) i després de l'addició d'un equivalent d'H-NS (vermell) (B) i d'un equivalent d'H-NS+0,8 equivalents d'Hha (blau) (C).

Els estudis d'interacció d'YmgB amb la proteïna YdgT són objecte d'estudi en aquests moments en el grup de recerca.

## **4. Discussió**



#### 4.1. Els paràlegs de les proteïnes associades al nucleòide H-NS i Hha tenen funcions reguladores diferents a H-NS i Hha

Pocs anys després de la caracterització de la proteïna H-NS es va identificar la proteïna StpA (Zhang i Belfort, 1992). Tal i com s'ha referit a la introducció, StpA mostra un 58% de similitud amb H-NS a nivell de la seqüència d'aminoàcids. Degut a aquesta similitud, StpA va ser identificada inicialment com un supressor multicòpia que podia substituir a H-NS en cèl·lules mutants per aquest gen (Shi i Bennett, 1994). Durant alguns anys, aquesta va esdevenir la funció generalment acceptada de la proteïna StpA. Tot i això, diferents evidències experimentals han posat de manifest que el paràleg d'H-NS té funcions diferents i, amb tota probabilitat, específiques.

Si bé tant H-NS com StpA tenen autoregulació negativa i totes dues proteïnes poden reprimir el promotor de l'altre (Zhang *et al.*, 1996; Sonden i Uhlin, 1996), la regulació de l'expressió d'StpA té característiques diferents a les d'H-NS. Mentre que aquesta darrera sembla expressar-se de forma constitutiva al llarg del cicle de creixement (Ali Azam *et al.*, 1999), l'expressió d'StpA s'indueix en condicions d'alta osmolaritat i alta temperatura (Free i Dorman, 1997; Muller *et al.*, 2010). És a dir que, tot i que a *E. coli* creixent en medi LB i a 37°C sembla evident que l'impacte de la regulació d'StpA és menor que el de la regulació d'H-NS, tant pel que fa referència al reguló H-NS (Bertin *et al.*, 1990) com al proteoma total (Muller *et al.*, 2006), les dades referenciades anteriorment evidencien que, almenys en determinades condicions de creixement, les funcions d'StpA no poden ser cobertes per H-NS i que ambdues proteïnes presenten rols diferents. Així mateix, estudis desenvolupats a *Salmonella* van evidenciar que la proteïna StpA regula un important número de gens depenent de la fase de creixement: durant la fase exponencial mitja, StpA reprimeix l'expressió prematura del reguló  $\sigma^{38}$ , i en la fase exponencial tardana StpA es requereix per l'adequada expressió del reguló CRP-cAMP (Lucchini *et al.*, 2009).

A més dels efectes reguladors, el tipus d'interacció de la proteïna StpA amb àcids nucleics és diferent al descrit per H-NS. StpA pot hidrolitzar ARN *in vivo* de manera més eficient que H-NS (Zhang *et al.*, 1996). Això és probablement degut a la capacitat d'StpA per facilitar l'alineament, el desplaçament i el plegament de l'ARN (Zhang *et al.*, 1996; Cusick i Belfort, 1998; Mayer *et al.*, 2007). Respecte a l'ADN, totes dues proteïnes poden formar un filament rígid al llarg de l'ADN (Liu *et al.*, 2010). Tot i això,

les estructures que formen són diferents. La integritat del filament format per StpA és insensible a la força iònica (50-300 mM), mentre que el filament format per H-NS és sensible a 200 mM KCl a 37°C (Lim *et al.*, 2011). Aquestes dades obtingudes *in vitro* podrien tenir significat biològic *in vivo*. A més, estudis recents suggereixen que StpA i H-NS es localitzen de forma diferent en les cèl·lules bacterianes (Wang *et al.*, 2011).

Cal també fer esment a estudis recents (Muller *et al.*, 2010) a *E. coli*, on es posa de manifest que els tres paràlegs que coexisteixen (H-NS, StpA i la proteïna Hfp, de transferència horitzontal) complementen les seves funcions depenent de les condicions ambientals. Per tant, cal pensar que la presència de paràlegs de proteïnes bacterianes associades al nucleoide té significats més enllà de simplement cobrir mútuament la possible pèrdua de l'altra.

Quan al nostre grup de recerca es va identificar el paràleg d'Hha, la proteïna YdgT, es va interpretar la seva presència de forma similar a la d'StpA: reemplaçar a Hha en situacions de pèrdua d'aquesta. De la mateixa manera que amb StpA, un mutant YdgT d'*E. coli* semblava no tenir fenotip (Paytubi *et al.*, 2004). De fet, pensant en evitar que l'expressió d'YdgT pogués afectar al fenotip de mutants *hha*, es va utilitzar un doble mutant *hha ydgT* per analitzar el paper d'Hha com a modulador global de l'expressió gènica a *Salmonella* (Vivero *et al.*, 2008). De forma també similar a StpA, estudis duts a terme per diversos grups de recerca van suggerir que YdgT pot tenir funcions específiques. Així doncs, YdgT es va caracteritzar com un regulador de l'expressió de l'illa de patogenicitat 2 (SPI-2) de *Salmonella*, afectant una mutació *ydgT* a la virulència (Coombes *et al.*, 2005). Posteriorment, altres estudis van evidenciar que tant Hha com YdgT participen en la regulació de l'SPI-2 (Silphaduang *et al.*, 2007).

Els estudis transcriptòmics globals duts a terme en aquest treball reforcen la hipòtesi que la proteïna YdgT, a més de poder substituir a la proteïna Hha en algunes funcions, té funcions específiques: els efectes sobre els patrons transcriptòmics globals a *E. coli* de mutants independents *hha* i *ydgT* són clarament diferents. Tal i com ja s'havia reportat, Hha té un paper predominantment repressor de l'expressió gènica (Vivero *et al.*, 2008). Aquestes dades són consistents amb la interacció descrita d'Hha amb H-NS, proteïna que presenta una predominant funció de repressor transcripcional. En canvi, de forma diferent a Hha, YdgT presenta un paper majoritàriament inductor de l'expressió gènica.

## 4.2. Actuant sobre la terminació prematura de la transcripció: mecanisme d'acció de la proteïna YdgT i evidències de la funció “moonlighting” de la subunitat $\theta$ de la ADN polimerasa III

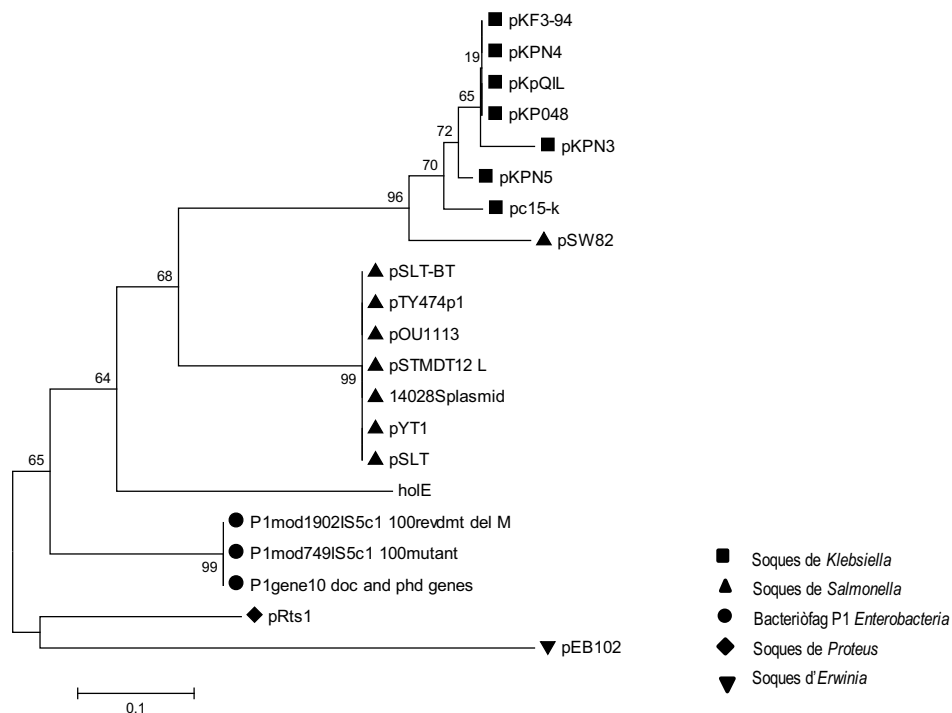
Encara que cronològicament va ser a l'inici d'aquest treball quan es van obtenir les dades transcriptòmiques de mutants *hha* i *ydgT*, no ha estat fins a l'etapa final del mateix quan s'ha pogut disposar de resultats que suggereixen un mecanisme pel que la proteïna YdgT modula l'expressió gènica. Dos tipus d'estudis han estat claus per avançar en la comprensió del mecanisme d'acció d'aquesta proteïna. Un d'ells pertany a aquesta memòria, y correspon als estudis realitzats amb la proteïna HolE, originats per la nostra hipòtesi que la mateixa podria tenir alguna relació estructural i/o funcional amb Hha/YdgT. L'altre estudi, clau per interpretar les dades obtingudes amb YdgT i HolE, correspon al treball publicat per Saxena i Growishankar (Saxena i Gowrishankar, 2011), en el que es suggereix un possible paper d'YdgT en processos de terminació/antiterminació de la transcripció.

Pel que fa referència al gen *holE*, de fet, bona part dels estudis duts a terme en aquesta memòria amb la finalitat de bé obtenir un nou fenotip o bé associar HolE amb Hha/YdgT, van proporcionar resultats inicialment poc encoratjadors: els resultats d'interacció proteïna-proteïna no són conclouents i el mutant *holE* obtingut no va evidenciar un fenotip clar, tampoc quan es va combinar amb els al·lels *hha* o *ydgT*. Tanmateix, els estudis d'expressió de *holE* en diferents condicions de creixement van evidenciar que aquest gen a *E. coli* s'expressa a nivells força semblants tant a baixa com a alta temperatura. Curiosament, l'únic fenotip que no es va poder interpretar en el seu moment però que es discuteix més endavant, és la major sensibilitat al cloramfenicol dels mutants *holE* i *ydgT holE*, malgrat tots dos tenen “cassettes” de resistència a l'antibiòtic.

L'anàlisi transcriptòmica d'un mutant *holE* va aportar indicis experimentals que associen les proteïnes YdgT i HolE, els quals recolzaven la hipòtesi d'una possible relació estructural entre YdgT i HolE suggerida pels estudis d'interacció proteïna-proteïna duts a terme per J. García i M. Pons, ja referits en aquesta memòria. Però, amb la informació existent quan es van obtenir les dades transcriptòmiques, no resultava aparent el possible mecanisme pel qual les proteïnes YdgT i HolE podien influenciar

l'expressió d'un conjunt de gens que inclou gens flagel·lars, molts ARN petits i, el que en un primer moment no vam donar molta importància, moltes seqüències intergèniques. Pel que fa referència als ARN petits, una possible hipòtesi era a través de la proteïna Hfq, però la seva expressió no es trobava modificada en mutants *holE* o *ydgT*. En aquest punt, el treball de Saxena i Growishankar, publicat a mitjans de 2011, ha estat crític per continuar la recerca sobre la relació entre YdgT/HolE i el mecanisme a través del qual aquestes proteïnes regulen l'expressió gènica (Saxena i Gowrishankar, 2011). En el seu treball associen la complementació del fenotip de recuperació de la polaritat transcripcional en mutants *rho* o *nusG* amb la sobreexpressió de la proteïna YdgT. Tal i com s'ha comentat ja en el corresponent apartat de resultats d'aquesta memòria, aquesta informació ha permès establir una correlació entre el patró de desregulació comú a mutants *ydgT/holE* amb el patró d'alteració de l'expressió gènica que s'obté inhibint el factor d'antiterminació Rho amb biciclomicina. Això clarament suggereix que les proteïnes YdgT i HolE participen en processos de terminació prematura de la transcripció. A més, aquests resultats permeten per primera vegada atribuir una funció reguladora a la proteïna HolE. Futurs treballs han de confirmar aquestes dades i precisar si el paper d'aquestes proteïnes és reduir o potenciar la terminació prematura de la transcripció, i si aquest efecte de reducció/potenciació és variable segons el gen afectat.

Específicament pel que fa referència a la proteïna HolE, el que aquesta proteïna tingui, addicionalment al seu paper en la maquinària de replicació de l'ADN, un paper modulador de la transcripció, és coherent amb diferents observacions. Per una part, un paràleg de HolE està codificat al fag P1 (gen *hot*) i aquest gen s'expressa tant al cicle lític com al cicle lisogènic (Chikova i Schaaper, 2007). Si la proteïna HolE s'expressés exclusivament per funcions de replicació, no tindria sentit la seva expressió quan el fag no es replica. Per altra banda, una cerca bioinformàtica feta durant l'any 2011 buscant homòlegs del gen *holE* evidencia que molts plasmidis conjugatius són portadors de paràlegs de *holE* (Fig. 4.1). Sembla difícil imaginar que gens de codificació plasmídica es transmetin per modificar la maquinària de replicació. En canvi, un paper modulador de l'expressió gènica d'aquestes proteïnes és coherent amb la hipòtesi plantejada recentment, i que indica que processos de terminació prematura de la transcripció poden afectar a la regulació de l'ADN transferit horitzontalment (Cardinale *et al.*, 2008).



**Fig. 4.1.** Relació evolutiva dels paràlegs de la proteïna HoLE codificats en plasmidis de diferents espècies de la família *Enterobacteriaceae*. L'anàlisi de l'evolució s'ha realitzat utilitzant el programa MEGA5.

Actualment, estem treballant amb la hipòtesi que aquestes proteïnes de la família HoLE de codificació plasmídica tenen fonamentalment una funció reguladora de l'expressió gènica actuant al nivell de terminació prematura de la transcripció. Considerant aquest model, l'efecte del cloramfenicol afectant molt significativament la taxa de creixement d'un mutant *ydgT hole* pot interpretar-se considerant el mecanisme d'acció d'aquest antibiòtic, el qual afecta a la traducció. És ben conegut que molts mecanismes de terminació prematura de la transcripció depenen de que un ribosoma bloquejat provoqui la formació de terminadors en l'ARNm. Un exemple clàssic és l'expressió de l'operó del triptòfan. Per tant, en presència de cloramfenicol i sense l'acció de les proteïnes YdgT/HoLE, poden produir-se en un doble mutant *ydgT hole* processos de terminació prematura de la transcripció en gens importants pel creixement. Aquesta hipòtesi és actualment subjecte d'estudi al grup de recerca.



### 4.3. La proteïna YmgB està relacionada amb proteïnes de la família Hha

En el cas de la proteïna YmgB, existien estudis previs que ja havien posat de manifest la possible relació estructural i funcional entre YmgB i Hha (Lee *et al.*, 2007b; Tschowri *et al.*, 2009). Els estudis duts a terme en aquest treball confirmen les dades anteriors i estableixen noves relacions entre YmgB i altres proteïnes associades al nucleòide. Per una part, el mutant *ymgB* derivat de la soca MG1655 presenta un fenotip de resistència a l'àcid i de formació de biofilm semblant al descrit en la bibliografia per la soca *E. coli* K12 BW25113  $\Delta$ *ymgB* (Lee *et al.*, 2007b). Pel que fa a l'efecte sobre la taxa de creixement, la mutació *ymgB*, sola o en combinació amb *hha* i *ydgT*, no ha presentat nous fenotips en les condicions de creixement utilitzades, amb l'excepció de l'efecte sobre la taxa de creixement que té l'elevada osmolaritat quan es combinen les mutacions *ymgB*, *hha* i *ydgT*. En aquests moments no disposem d'informació que ens permeti interpretar aquest efecte.

Els estudis d'interacció proteïna-proteïna suggereixen que YmgB pot interaccionar amb H-NS, i eventualment, amb StpA. Per confirmar aquestes dades *in vitro*, caldria identificar gens regulats conjuntament per H-NS i YmgB. Donat que YmgB s'indueix en condicions de baixa temperatura i fase estacionària, és possible que calgui determinar la hipotètica correulació per H-NS i YmgB en cultius crescuts en condicions ambientals d'estrès.

Els resultats més interessants que aporta aquest treball en referència a la relació entre YmgB i altres proteïnes associades al nucleòide, s'han obtingut sobreexpressant YmgB. Tal i com es descriu a la bibliografia (White-Ziegler *et al.*, 2008; Tschowri *et al.*, 2009) i també s'ha corroborat en aquest treball, l'expressió d'*ymgB* s'indueix tant a baixa temperatura com a fase estacionària. És per tant raonable pensar que, en condicions de cultiu estàndard, es dir, creixement en medi ric, 37°C i fase exponencial, els mutants *ymgB* no tinguin un fenotip evident. Per tant, la sobreexpressió d'YmgB és una alternativa per aprofundir en el coneixement d'aquesta proteïna.

L'anàlisi de l'efecte de la sobreexpressió d'YmgB sobre el patró d'expressió de proteïnes ens ha permès, per una part, confirmar dades preexistents, com són la regulació de la glutamat descarboxilasa (Lee *et al.*, 2007b) però, addicionalment, també hem pogut evidenciar la regulació de la lisina descarboxilasa, també associada a la

resistència a l'àcid, però no descrita fins ara com a regulada per YmgB. Una altra proteïna alterada per la sobreexpressió d'YmgB és la proteïna ribosomal L2. A més del seu paper en l'assemblatge del ribosoma, la proteïna L2 sembla jugar un paper en la traducció (Rippa *et al.*, 2010). Per tant, la proteïna YmgB podria tenir efectes globals sobre l'expressió gènica a través de la proteïna L2. Pel que fa referència a la glutamat descarboxilasa i a la lisina descarboxilasa, tots dos enzims estan reprimits per H-NS (Shi *et al.*, 1993; Waterman i Small, 2003). El paper d'YmgB com a repressor de la glutamat descarboxilasa ja havia estat descrit (Lee *et al.*, 2007b). En canvi, l'efecte d'YmgB sobre l'expressió de la lisina descarboxilasa era fins ara desconegut. El fet que l'efecte d'YmgB sobre aquests dos enzims s'hagi detectat exclusivament en el mutant *hns*, es pot interpretar com YmgB competint per seqüències reguladores a les que s'uneix H-NS. Tot i que el mecanisme que implica a YmgB modulant els gens *gdaA* i *cadA* (que codifiquen per la glutamat descarboxilasa i per la lisina descarboxilasa, respectivament) en presència/absència d'H-NS requereix més aportacions experimentals, aquests resultats reforcen la relació entre YmgB i H-NS. Els gens *gdaA* i *cadA* esdevenen models interessants per estudiar el sistema YmgB/H-NS.

L'efecte de la sobreexpressió d'YmgB també reforça la relació entre aquesta proteïna i H-NS/Hha. Tal i com s'ha referit a la introducció, és ben coneguda la regulació creuada entre les proteïnes H-NS/StpA i Hha/YdgT (Madrid *et al.*, 2007a). En aquest treball s'evidencia la regulació d'YmgB sobre H-NS i Hha: la sobreexpressió d'YmgB dràsticament redueix l'expressió d'Hha, i també d'H-NS. Tanmateix, l'estudi de la sobreexpressió d'YmgB sobre gens regulats bé per H-NS o per Hha torna a relacionar aquestes proteïnes. Tant *proU* com *bgl*, gens reprimits per H-NS, també estan reprimits quan sobreexpressem YmgB. Pel que fa referència a l'operó *hly*, regulat per H-NS i Hha, i en absència d'aquest últim per YdgT (Paytubi *et al.*, 2004), els resultats obtinguts a l'analitzar la sobreexpressió d'YmgB resulten, per una banda molt interessants i, per altra, sorprenents. Tant en un mutant *hha* com en un mutant *ydgT* la sobreexpressió d'YmgB reprimeix l'expressió de l'operó *hly*, però això no té lloc en un doble mutant *hha ydgT*. Aquests resultats *in vivo* clarament suggereixen que, per modular l'expressió de l'operó *hly*, YmgB requereix la presència bé d'Hha o d'YdgT. Si això implicés una interacció directa proteïna-proteïna entre YmgB i Hha/YdgT, els estudis d'interacció realitzats per J. García haurien evidenciat la interacció, però aquest resultat no s'ha

obtingut. Per tant, cal pensar en un efecte indirecte de la presència d'Hha/YdgT per explicar aquest resultat.

Els resultats obtinguts en aquest treball reforcen la hipòtesi d'una relació entre YmgB i altres proteïnes bacterianes associades al nucleoide, com H-NS/StpA i Hha/YdgT. Amb tota probabilitat, el fet que l'expressió òptima d'YmgB té lloc en condicions que s'allunyen de les òptimes pel creixement d'*E. coli* (medi ric i elevada temperatura), condicions en les que aquest i altres grups han estudiat els sistemes H-NS/StpA i Hha/YdgT, dificulta obtenir dades concloents que evidencin que YmgB, en combinació amb H-NS o amb Hha/YdgT, modulen l'expressió de determinats operons. Treballs futurs han de considerar analitzar l'efecte individual i combinat de les mutacions *ymgB* i *hha* sobre el transcriptoma d'*E. coli* en condicions d'estrès i fase estacionària.

#### **4.4. Un fenotip inesperat de mutants *hha ydgT* evidencia la inestabilitat de determinants de virulència flanquejats per seqüències IS91 quan *E. coli* creix en presència de concentracions subinhibitòries d'antibiòtics**

La major part dels estudis sobre l'efecte dels antibiòtics en la cèl·lula bacteriana s'han dut a terme principalment utilitzant concentracions capaces de matar o inhibir el creixement de les cèl·lules diana. En els darrers anys però, l'interès i el coneixement de l'efecte de concentracions subinhibitòries dels antibiòtics sobre la cèl·lula bacteriana ha augmentat considerablement (veure revisions a (Davies *et al.*, 2006; Couce i Blazquez, 2009). Entre altres efectes, l'exposició a concentracions subinhibitòries d'antibiòtics provoca un augment en la taxa de mutagènesi (Couce i Blazquez, 2009; Kohanski *et al.*, 2010), alteracions en el patró de transcripció global (Goh *et al.*, 2002; Yim *et al.*, 2006), la transferència horitzontal de gens (Beaber *et al.*, 2004) i la recombinació intracromosòmica (Lopez *et al.*, 2007; Lopez i Blazquez, 2009). En aquest treball es proporcionen dades experimentals que recolzen encara més la relació entre els antibiòtics i la variabilitat genètica bacteriana. El nostre interès en l'estudi d'una observació inesperada ens va portar a demostrar que l'exposició a concentracions subinhibitòries d'antibiòtics pot donar lloc a reordenaments genòmics els quals poden modificar significativament el fenotip bacterià. Com va dir Shapiro (Shapiro, 2009), els descobriments fortuïts poden proporcionar una visió més completa de la capacitat que

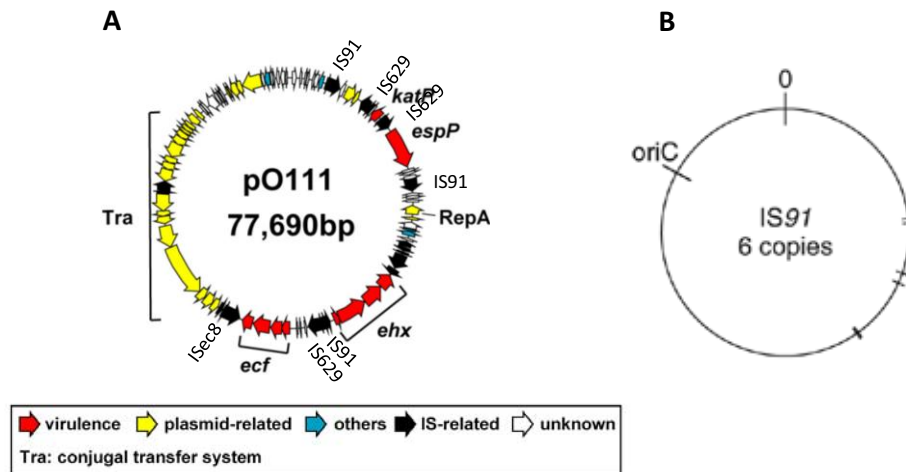
presenten les cèl·lules bacterianes per reestructurar el seu genoma en resposta a diversos estímuls.

Les seqüències d'inserció IS91 van ser caracteritzades per primera vegada en plasmidis  $\alpha$ -hemolítics d'*E. coli* (Zabala *et al.*, 1982; Zabala *et al.*, 1984). En l'actualitat les seqüències IS91 són el prototip de la família dels elements d'inserció ISCR (Toleman *et al.*, 2006), els quals s'han trobat adjacents tant a determinants de virulència (Wolf *et al.*, 1997; ; Burland *et al.*, 1998; Schlor *et al.*, 2000; Garcillan-Barcia *et al.*, 2002) com de gens de resistència a antibiòtics (Toleman *et al.*, 2006). Cal destacar que la família ISCR està molt estesa entre els bacteris, tot i que els elements IS91 es troben majoritàriament restringits a soques d'*E. coli* i *Shigella*. En ambdues espècies, les seqüències IS91 han estat associades a reordenaments genètics. Alguns exemples fan referència a gens que codifiquen enterotoxines termolàbils (*eltAB*) de soques enterotoxigèniques d'*E. coli* i a l'illa de patogenicitat SLR de *S. flexneri*. La presència de seqüències IS91, completes o parcials, acompanyant els gens *eltAB* de soques enterotoxigèniques d'*E. coli* va resultar, entre altres efectes, en transposicions espontànies d'aquests mateixos gens al plasmidi pSU2600 (Schlor *et al.*, 2000). A la soca de *S. flexneri* 2a, la recombinació entre dos elements IS91 esdevé un dels tres mecanismes que donen lloc a la deleció de l'illa de patogenicitat SLR (Turner *et al.*, 2001). Els resultats obtinguts en aquest treball són coherents amb aquestes dades. Cal destacar que el fragment d'ADN entre les dianes *SalI/SaII* del plasmidi pHly152 clonat en el vector pACYC184, que inclou l'operó *hly*, conté només còpies incompletes d'IS91. Tal i com s'indica a l'apartat de resultats, algunes d'aquestes seqüències que flanquegen l'operó *hly* en la mateixa orientació, són responsables de les recombinacions que condueixen a la supressió de dos possibles fragments d'ADN diferents, amb la conseqüent pèrdua de l'operó *hly*. En algunes circumstàncies, el mecanisme mitjançant el qual es perden els gens *hly* pot ser la recombinació homòloga RecA-dependent (per exemple, quan el sistema SOS està induït), però la recombinació RecA-independent també pot ocórrer. En soques d'*E. coli* enterotoxigèniques els reordenaments genètics sense la intervenció de RecA també s'han descrit per als gens *eltAB* (Schlor *et al.*, 2000). El mecanisme a través del qual té lloc la supressió de l'operó *hly* del plasmidi pHly152 és necessàriament independent de la transposasa *tnpA* IS91, ja que ni en el plasmidi pANN202-312R ni en el cromosoma de la soca d'*E. coli* MG1655 no es troba present cap còpia completa del gen *tnpA* (resultats no publicats). Durant aquest estudi

vam formular també la hipòtesi que l'ORF121, el segon i encara no caracteritzat ORF codificat per IS91 present en una de les IS91 parcials del plasmidi pANN202-312R, podria tenir un paper en aquests processos de recombinació. No obstant això, la supressió d'aquesta seqüència no va influenciar en la pèrdua de l'operó de l'hemolisina en la soca MG1655HY (pANN202-312R) (resultats no publicats). La replicació és un procés clau independent de RecA en el que s'hi veuen involucrades seqüències d'ADN repetitives i inestables (Bzymek i Lovett, 2001). Per tant, les alteracions provocades pels antibiòtics en la replicació de l'ADN podrien explicar l'eliminació de les seqüències *hly* en absència de RecA.

Diversos antibiòtics com el trimetoprim, les quinolones i els antibiòtics  $\beta$ -lactàmics indueixen la resposta SOS (Guerin *et al.*, 2009). Recentment, s'ha demostrat que la inducció de la resposta SOS pot provocar la recombinació d'integrans i l'expressió dels determinants de resistència a antibiòtics en *E. coli* i *Vibrio cholerae* (Guerin *et al.*, 2009). En *Staphylococcus aureus*, la inducció de la resposta SOS desencadena la difusió de les illes de patogenicitat que s'empaqueten en bacteriòfags (Ubeda *et al.*, 2005). En aquest treball presentem una prova més que demostra que la inducció de la resposta SOS provoca l'escissió d'un determinant de virulència en *E. coli*. Per tant, els elements que promouen la inducció de la resposta SOS (entre aquests, diversos antibiòtics) també poden originar diferents tipus de reordenaments genòmics en bacteris.

Dades referents a anàlisis genòmiques revelen que les seqüències IS91 estan predominantment presents en plasmidis aïllats de soques d'*E. coli* enterohemorràgiques (serotips O111, O26 i O157) (Ogura *et al.*, 2009) (Fig. 4.2A), o en el cromosoma i/o plasmidis aïllats de *Shigella* (resultats no publicats). Curiosament, les sis còpies IS91 presents en el cromosoma de la soca de *S. flexneri* 2457T es troben agrupades flanquejant diversos determinants de virulència (Zaghloul *et al.*, 2007) (Fig. 4.2B).



**Fig. 4.2.** **A.** Mapa del plasmidi pO111 de la soca enterohemorràgica d'*E. coli* O111:H 11128 el qual conté diverses seqüències IS, entre les quals 3 còpies de la seqüència IS91. Aquest plasmidi codifica per determinants de virulència (en vermell) tals com una hemolisina (*ehx*), una serina proteasa (*espP*), una catalasa (*catP*) i un sistema de modificació del lípid A (operó *ecf*). Adaptat de (Ogura, Y. 2009). **B.** Distribució de les IS91 en el cromosoma de la soca *S. flexneri* 2557T, les quals mostren una important agrupació. Extret de (Zaghloul, L. 2007).

Com a continuació d'aquest treball, caldria explicar el patró d'agrupació i el fenotip dels determinants flanquejats per IS91, tant en plasmidis d'*E. coli* com en el cromosoma de *Shigella*, i estudiar la possible deleció i pèrdua d'aquests. El fet que es trobin seqüències IS91 flanquejant determinants de virulència només en certes soques d'*E. coli* i *Shigella* pot indicar que aquestes soques presenten fenotips patogènics molt variables. Per tant, les soques que no incorporen elements IS91 o similars estarien prevenint la inestabilitat genòmica causada per la presència d'aquests elements.

Per últim, remarcar la importància dels estudis sobre els efectes de concentracions subinhibitòries d'antibiòtics en bacteris ja que és probable que en medis naturals aquests es trobin amb més freqüència en ambients que contenen concentracions subinhibitòries que concentracions inhibidores. D'altra banda, són relativament freqüents les situacions clíniques en les que el bacteri pot estar exposat a baixos nivells d'antibiòtics (per exemple, el tractament incomplet amb antibiòtics o la diferent resposta farmacològica de certs teixits als antibiòtics). Com s'indica en aquest treball, en el cas de les soques patògenes d'*E. coli* i *Shigella* que contenen seqüències IS91 flanquejant determinants de virulència, l'exposició a baixos nivells d'antibiòtics pot donar lloc a reordenaments genètics i a la pèrdua d'aquests determinants. Mentre que alguns canvis poden ser

perjudicials pel bacteri, altres poden proporcionar nous fenotips que potenciïn la seva virulència en determinats nínxols, augmentant així la seva agressivitat. Per tant, és important evitar el no compliment de la pauta de dosificació i els tractaments incomplets amb antibiòtics. Una millor comprensió dels mecanismes mitjançant els quals els elements *IS91* intervenen en els processos de deleció de determinants de virulència en resposta a l'exposició a antibiòtics pot ajudar a definir millor noves metes per a la teràpia antimicrobiana.

## **5. Conclusions**





- La proteïna YdgT regula a *E. coli* un grup de gens no regulat per la proteïna Hha.
- Les seqüències parcials de l'element IS91 que flanquejen l'operó *hly* del plasmidi pHly152 són responsables de la deleció d'aquest operó hemolític.
- La deleció de l'operó *hly* del plasmidi pHly152 es produeix en resposta a concentracions subinhibitòries d'antibiòtics.
- La subunitat  $\theta$  de l'ADN polimerasa III té funcions reguladores transcripcionals.
- Les proteïnes  $\theta$  i YdgT presenten un conjunt de gens regulats comuns, que inclou gens flagel·lars i ARN petits.
- La proteïna YmgB presenta similituds estructurals i funcionals amb la proteïna Hha.
- La sobreexpressió d'*ymgB* en una soca mutant *hns* provoca l'inducció dels enzims de resistència a l'àcid lisina descarboxilasa i glutamat descarboxilasa.
- La sobreexpressió d'*ymgB* té efectes sobre l'expressió de les proteïnes associades al nucleòide H-NS i Hha, així com sobre l'expressió de gens regulats per aquestes.



## **6. Bibliografia**



- Aberg, A., Fernandez-Vazquez, J., Cabrer-Panes, J.D., Sanchez, A. i Balsalobre, C.** (2009) Similar and divergent effects of ppGpp and DksA deficiencies on transcription in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **191**:3226-3236.
- Aberg, A., Fernandez-Vazquez, J., Cabrer-Panes, J.D., Sanchez, A. i Balsalobre, C.** (2009) Similar and divergent effects of ppGpp and DksA deficiencies on transcription in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **191**:3226-3236.
- Abrahams, G.L. i Hensel, M.** (2006). Manipulating cellular transport i immune responses: dynamic interactions between intracellular *Salmonella enterica* and its host cells. *Cellular Microbiology* **8**:728-737.
- Ali Azam, T., Iwata, A., Nishimura, A., Ueda, S. i Ishihama, A.** (1999). Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *Journal of Bacteriology* **181**:6361-6370.
- Ali, S.S., Beckett, E., Bae, S.J. i Navarre, W.W.** (2011). The 5.5 protein of phage T7 inhibits H-NS through interactions with the central oligomerization domain. *Journal of Bacteriology* **193**:4881-4892.
- Amit, R., Oppenheim, A.B. i Stavans, J.** (2003). Increased bending rigidity of single DNA molecules by H-NS, a temperature and osmolarity sensor. *Biophysical Journal* **84**:2467-2473.
- Arifuzzaman, M., Maeda, M., Itoh, A., Nishikata, K., Takita, C., Saito, R., Ara, T., Nakahigashi, K., Huang, H.C., Hirai, A., Tsuzuki, K., Nakamura, S., Altaf-Ul-Amin, M., Oshima, T., Baba, T., Yamamoto, N., Kawamura, T., Ioka-Nakamichi, T., Kitagawa, M., Tomita, M., Kanaya, S., Wada, C. i Mori, H.** (2006). Large-scale identification of protein-protein interaction of *Escherichia coli* K-12. *Genome Research* **16**:686-691.
- Atlung, T. i Hansen, F.G.** (2002) Effect of different concentrations of H-NS protein on chromosome replication and the cell cycle in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **184**:1843-1850.
- Attila, C., Ueda, A. i Wood, T.K.** (2009) 5-Fluorouracil reduces biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 through global regulator AriR as an antivirulence compound. *Applied Microbiology and Biotechnology* **82**:525-533.

- Avvakumov, N., Nourani, A. i Côté, J.** (2011) Histone Chaperones: Modulators of Chromatin Marks. *Molecular Cell* **41**:502-514.
- Azam, T.A. i Ishihama, A.** (1999) Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **274**:33105-33113.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L. i Mori, H.** (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology* **2**:2006.0008.
- Bae, S.H., Liu, D., Lim, H.M., Lee, Y. i Choi, B.S.** (2008) Structure of the nucleoid-associated protein Cnu reveals common binding sites for H-NS in Cnu and Hha. *Biochemistry* **47**:1993-2001.
- Balsalobre, C., Juarez, A., Madrid, C., Mouriño, M., Prenafeta, A. i Munoa, F.J.** (1996) Complementation of the *hha* mutation in *Escherichia coli* by the *ymoA* gene from *Yersinia enterocolitica*: dependence on the gene dosage. *Microbiology* **142**:1841-1846.
- Balsalobre, C., Johansson, J., Uhlin, B.E., Juarez, A. i Munoa, F.J.** (1999) Alterations in protein expression caused by the *hha* mutation in *Escherichia coli*: influence of growth medium osmolarity. *Journal of Bacteriology* **181**:3018-3024.
- Baños, R.C., Vivero, A., Aznar, S., García, J., Pons, M., Madrid, C. i Juarez, A.** (2009) Differential regulation of horizontally acquired and core genome genes by the bacterial modulator H-NS. *PLoS Genetics* **5**:e1000513.
- Barembuch, C. i Hengge, R.** (2007) Cellular levels and activity of the flagellar sigma factor FliA of *Escherichia coli* are controlled by FlgM-modulated proteolysis. *Molecular Microbiology* **65**:76-89.
- Beaber, J.W., Hochhut, B. i Waldor, M.K.** (2004) SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* **427**:72-74.
- Becker, N.A., Kahn, J.D., Maher i L.J 3rd.** (2008) Eukaryotic HMGB proteins as replacements for HU in *E. coli* repression loop formation. *Nucleic Acids Research* **36**:4009-4021.

- Beloin, C., Deighan, P., Doyle, M. i Dorman, C.J.** (2003) *Shigella flexneri* 2a strain 2457T expresses three members of the H-NS-like protein family: characterization of the Sfh protein. *Molecular Genetics and Genomics* **270**:66-77.
- Beloin, C., Roux, A. i Ghigo, J.M.** (2008) *Escherichia coli* biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **322**:249-289.
- Bertin, P., Lejeune, P., Laurent-Winter, C. i Danchin, A.** (1990) Mutations in *bglY*, the structural gene for the DNA-binding protein H1, affect expression of several *Escherichia coli* genes. *Biochimie* **72**:889-891.
- Bertin, P., Terao, E., Lee, E.H., Lejeune, P., Colson, C., Danchin, A. i Collatz, E.** (1994) The H-NS protein is involved in the biogenesis of flagella in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **176**:5537-5540.
- Bertin, P., Hommais, F., Krin, E., Soutourina, O., Tendeng, C., Derzelle, S. i Danchin, A.** (2001) H-NS and H-NS-like proteins in Gram-negative bacteria and their multiple role in the regulation of bacterial metabolism. *Biochimie* **83**:235-241.
- Blattner, F.R., Plunkett, G 3rd., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B. i Shao, Y.** (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453-1462.
- Bolivar, F., Rodríguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H. i Falkow, S.** (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**:95-113.
- Bracco, L., Kotlarz, D., Kolb, A., Diekmann, S. i Buc, H.** (1989) Synthetic curved DNA sequences can act as transcriptional activators in *Escherichia coli*. *EMBO Journal* **8**:4289-4296.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**:248-254.
- Brescia, C.C., Kaw, M.K. i Sledjeski, D.D.** (2004) The DNA binding protein H-NS binds to and alters the stability of RNA *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Molecular Biology* **339**:505-514.



- Browning, D.F., Grainger, D.C. i Busby, S.J.** (2010) Effects of nucleoid-associated proteins on bacterial chromosome structure and gene expression. *Current Opinion in Microbiology* **13**:773-780.
- Brunetti, R., Prosseda, G., Beghetto, E., Colonna, B. i Micheli, G.** (2001) The looped domain organization of the nucleoid in histone-like protein defective *Escherichia coli* strains. *Biochimie* **83**:873-882.
- Burland, V., Shao, Y., Perna, N.T., Plunkett, G., Sofia, H.J. i Blattner, F.R.** (1998) The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Research* **26**:4196-4204.
- Burnette, W.N.** (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry* **112**:195-203.
- Bustamante, V., Santana, F.J., Calva, E. i Puente, J.L.** (2001) Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H - NS - dependent repression. *Molecular Microbiology* **39**:664-678.
- Butland, G., Peregrin-Alvarez, J.M., Li, J., Yang, W., Yang, X., Canadien, V, Starostine, A., Richards, D., Beattie, B., Krogan, N., Davey, M., Parkinson, J, Greenblatt, J. i Emili, A.** (2005) Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature* **433**:531-537.
- Bzymek, M. i Lovett, S.T.** (2001) Instability of repetitive DNA sequences: the role of replication in multiple mechanisms. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA* **98**:8319-8325.
- Cardinale, C.J., Washburn, R.S., Tadigotla, V.R., Brown, L.M., Gottesman, M.E. i Nudler, E.** (2008) Termination factor Rho and its cofactors NusA and NusG silence foreign DNA in *E. coli*. *Science* **320**:935-938.
- Carmona, M., Balsalobre, C., Munoa, F., Mouriño, M., Jubete, Y., De la Cruz, F. i Juarez, A.** (1993) *Escherichia coli hha* mutants, DNA supercoiling and expression of the haemolysin genes from the recombinant plasmid pANN202-312. *Molecular Microbiology* **9**:1011-1018.

- Castang, S., McManus, H.R., Turner, K.H. i Dove, S.L.** (2008) H-NS family members function coordinately in an opportunistic pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **105**:18947-18952.
- Cherepanov, P.P. i Wackernagel, W.** (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**:9-14.
- Chikova, A.K. i Schaaper, R.M.** (2005) The bacteriophage P1 hot gene product can substitute for the *Escherichia coli* DNA polymerase III {theta} subunit. *Journal of Bacteriology* **187**:5528-5536.
- Chikova, A.K. i Schaaper, R.M.** (2006) Mutator and antimutator effects of the bacteriophage P1 hot gene product. *Journal of Bacteriology* **188**:5831-5838.
- Chikova, A.K. i Schaaper, R.M.** (2007) The bacteriophage P1 hot gene, encoding a homolog of the *E. coli* DNA polymerase III theta subunit, is expressed during both lysogenic and lytic growth stages. *Mutation Research* **624**:1-8.
- Cho, B.K., Knight, E.M., Barrett, C.L. i Palsson, B.O.** (2008) Genome-wide analysis of Fis binding in *Escherichia coli* indicates a causative role for A-/AT-tracts. *Genome Research* **18**:900-910.
- Cohen, S.N., Chang, A.C. i Hsu, L.** (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **69**:2110-2114.
- Coombs, B.K., Wickham, M.E., Lowden, M.J., Brown, N.F. i Finlay, B.B.** (2005) Negative regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 is required for contextual control of virulence during typhoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **102**:17460-17465.
- Cornelis, G.R., Sluiter, C., Delor, I., Geib, D., Kaniga, K., Lambert de Rouvoit, C., Sory, M.P., Vanooteghem, J.C. i Michiels, T.** (1991) *ymoA*, a *Yersinia enterocolitica* chromosomal gene modulating the expression of virulence functions. *Molecular Microbiology* **5**:1023-1034.
- Couce, A. i Blazquez, J.** (2009) Side effects of antibiotics on genetic variability. *FEMS Microbiology Reviews* **33**:531-538.

- Craig, N.L. i Nash, H.A.** (1984) *E. coli* integration host factor binds to specific sites in DNA. *Cell* **39**:707-716.
- Cusick, M.E. i Belfort, M.** (1998) Domain structure and RNA annealing activity of the *Escherichia coli* regulatory protein StpA. *Molecular Microbiology* **28**:847-857.
- Dame, R.T. i Goosen, N.** (2002) HU: promoting or counteracting DNA compaction? *FEBS Letters* **529**:151-156.
- Dame, R.T., Luijsterburg, M.S., Krin, E., Bertin, P.N., Wagner, R. i Wuite, G.J.** (2005) DNA bridging: a property shared among H-NS-like proteins. *Journal of Bacteriology* **187**:1845-1848.
- Dame, R.T., Noom, M.C. i Wuite, G.J.** (2006) Bacterial chromatin organization by H-NS protein unravelled using dual DNA manipulation. *Nature* **444**:387-390.
- Datsenko, K.A. i Wanner, B.L.** (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**:6640-6645.
- Davies, J., Spiegelman, G.B. i Yim, G.** (2006) The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Current Opinon in Microbiology* **9**:445-453.
- de Alba, C.F., Solorzano, C., Paytubi, S., Madrid, C., Juarez, A., García, J. i Pons, M.** (2011) Essential residues in the H-NS binding site of Hha, a co-regulator of horizontally acquired genes in Enterobacteria. *FEBS Letters* **585**:1765-1770.
- Defez, R. i De Felice, M.** (1981) Cryptic operon for beta-glucoside metabolism in *Escherichia coli* K12: genetic evidence for a regulatory protein. *Genetics* **97**:11-25.
- Deighan, P., Free, A. i Dorman, C.J.** (2000) A role for the *Escherichia coli* H-NS-like protein StpA in OmpF porin expression through modulation of *micF* RNA stability. *Molecular Microbiology* **38**:126-139.
- Deighan, P., Beloin, C. i Dorman, C.J.** (2003) Three-way interactions among the Sfh, StpA and H-NS nucleoid-structuring proteins of *Shigella flexneri* 2a strain 2457T. *Molecular Microbiology* **48**:1401-1416.
- Dersch, P., Schmidt, K. i Bremer, E.** (1993) Synthesis of the *Escherichia coli* K-12 nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS is subjected to growth-phase control and autoregulation. *Molecular Microbiology* **8**:875-889.

- Dillon, S.C. i Dorman, C.J.** (2010) Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nature Reviews Microbiology* **8**:185-195.
- Doetsch, M., Gstrein, T., Schroeder, R. i Furtig, B.** (2010) Mechanisms of StpA-mediated RNA remodeling. *RNA Biology* **7**:735-743.
- Domka, J., Lee, J., Bansal, T. i Wood, T.K.** (2007) Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Environmental Microbiology* **9**:332-346.
- Donato, G.M. i Kawula, T.H.** (1999) Phenotypic analysis of random *hns* mutations differentiate DNA-binding activity from properties of *fimA* promoter inversion modulation and bacterial motility. *Journal of Bacteriology* **181**:941-948.
- Dorman, C.J., Ni Bhriain, N. i Higgins, C.F.** (1990) DNA supercoiling and environmental regulation of virulence gene expression in *Shigella flexneri*. *Nature* **344**:789-792.
- Dorman, C.J. i Porter, M.E.** (1998) The *Shigella* virulence gene regulatory cascade: a paradigm of bacterial gene control mechanisms. *Molecular Microbiology* **29**:677-684.
- Dorman, C.J., Hinton, J.C. i Free, A.** (1999) Domain organization and oligomerization among H-NS-like nucleoid-associated proteins in bacteria. *Trends in Microbiology* **7**:124-128.
- Dorman, C.J. i Deighan, P.** (2003) Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Current Opinion in Genetics and Development* **13**:179-184.
- Dorman, C.J.** (2004) H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nature Reviews Microbiology* **2**:391-400.
- Dorman, C.J.** (2007) Probing bacterial nucleoid structure with optical tweezers. *Bioessays* **29**:212-216.
- Dorman, C.J.** (2010) Horizontally acquired homologues of the nucleoid-associated protein H-NS: implications for gene regulation. *Molecular Microbiology* **75**:264-267.
- Dower, W.J., Miller, J.F. i Ragsdale, C.W.** (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* **16**:6127-6145.

- Doyle, M. i Dorman, C.J.** (2006) Reciprocal transcriptional and posttranscriptional growth-phase-dependent expression of *sfh*, a gene that encodes a paralogue of the nucleoid-associated protein H-NS. *Journal of Bacteriology* **188**:7581-7591.
- Doyle, M., Fookes, M., Ivens, A., Mangan, M.W., Wain, J. i Dorman, C.J.** (2007) An H-NS-like stealth protein aids horizontal DNA transmission in bacteria. *Science* **315**:251-252.
- Ellermeier, J.R. i Slauch, J.M.** (2007) Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Current Opinion in Microbiology* **10**:24-29.
- Fahlen, T.F., Mathur, N. i Jones, B.D.** (2000) Identification and characterization of mutants with increased expression of *hilA*, the invasion gene transcriptional activator of *Salmonella typhimurium*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **28**:25-35.
- Fahlen, T.F., Wilson, R.L., Boddicker, J.D. i Jones, B.D.** (2001) Hha is a negative modulator of transcription of *hilA*, the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion gene transcriptional activator. *Journal of Bacteriology* **183**:6620-6629.
- Falconi, M., McGovern, V., Gualerzi, C., Hillyard, D. i Higgins, N.P.** (1991) Mutations altering chromosomal protein H-NS induce mini-Mu transposition. *The new biologist* **3**:615-625.
- Falconi, M., Higgins, N.P., Spurio, R., Pon, C.L. i Gualerzi, C.O.** (1993) Expression of the gene encoding the major bacterial nucleotide protein H-NS is subject to transcriptional auto-repression. *Molecular Microbiology* **10**:273-282.
- Falconi, M., Colonna, B., Prosseda, G., Micheli, G. i Gualerzi, C.O.** (1998) Thermoregulation of *Shigella* and *Escherichia coli* EIEC pathogenicity. A temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of *virF* promoter to transcriptional repressor H-NS. *The EMBO Journal* **17**:7033-7043.
- Fang, F.C. i Rimsky, S.** (2008) New insights into transcriptional regulation by H-NS. *Current Opinion in Microbiology* **11**:113-120.
- Felmlee, T., Pellett, S. i Welch, R.A.** (1985) Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal hemolysin. *Journal of Bacteriology* **163**:94-105.

- Fernandez-Vazquez, J.** (2011) Regulación de la expresión de factores de virulencia a través del canal secundario de la ARN Polimerasa. Tesis doctoral. Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.
- Forns, N.** (2006) Les famílies de proteïnes Hha/YmoA i H-NS: regulació de l'expressió gènica a "*Escherichia coli*" i paper de la conjugació plasmídica. Tesis doctoral. Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.
- Foster, P.L. i Marinus, M.G.** (1992) Levels of epsilon, an essential replication subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III, are controlled by heat shock proteins. *Journal of Bacteriology* **174**:7509-7516.
- Francetic, O., Belin, D., Badaut, C. i Pugsley, A.P.** (2000) Expression of the endogenous type II secretion pathway in *Escherichia coli* leads to chitinase secretion. *The EMBO Journal* **19**:6697-6703.
- Francez-Charlot, A., Laugel, B., Van Gemert, A., Dubarry, N., Wiorowski, F., Castanie-Cornet, M.P., Gutierrez, C. i Cam, K.** (2003) RcsCDB His-Asp phosphorelay system negatively regulates the *flhDC* operon in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **49**:823-832.
- Free, A. i Dorman, C.J.** (1997) The *Escherichia coli* *stpA* gene is transiently expressed during growth in rich medium and is induced in minimal medium and by stress conditions. *Journal of Bacteriology* **179**:909-918.
- Free, A., Williams, R.M. i Dorman, C.J.** (1998) The StpA protein functions as a molecular adapter to mediate repression of the *bgl* operon by truncated H-NS in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **180**:994-997.
- García, J., Cordeiro, T.N., Nieto, J.M., Pons, I., Juarez, A. i Pons, M.** (2005) Interaction between the bacterial nucleoid associated proteins Hha and H-NS involves a conformational change of Hha. *The Biochemical Journal* **388**:755-762.
- García-Contreras, R., Zhang, X.S., Kim, Y., Wood, T.K.** (2008) Protein translation and cell death: the role of rare tRNAs in biofilm formation and in activating dormant phage killer genes. *PLoS One* **3**:e2394.
- Garcillán-Barcia, M., Bernales, I., Mendiola, M. i De la Cruz, F.** (2002) IS91 rolling-circle transposition. Mobile DNA II. ASM Press, Washington, DC 891-904.

- Giel, M., Desnoyer, M. i Lopilato, J.** (1996) A mutation in a new gene, *bglJ*, activates the *bgl* operon in *Escherichia coli* K-12. *Genetics* **143**:627-635.
- Godessart, N., Munoa, F.J., Regue, M. i Juarez, A.** (1988) Chromosomal mutations that increase the production of a plasmid-encoded haemolysin in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology* **134**:2779-2787.
- Goh, E.B., Yim, G., Tsui, W., McClure, J., Surette, M.G. i Davies, J.** (2002) Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **99**:17025-17030.
- Goransson, M., Sonden, B., Nilsson, P., Dagberg, B., Forsman, K., Emanuelsson, K. i Uhlin, B.E.** (1990) Transcriptional silencing and thermoregulation of gene expression in *Escherichia coli*. *Nature* **344**:682-685.
- Gordon, B.R., Imperial, R., Wang, L., Navarre, W.W. i Liu, J.** (2008) Lsr2 of *Mycobacterium* represents a novel class of H-NS-like proteins. *Journal of Bacteriology* **190**:7052-7059.
- Grainger, D.C., Hurd, D., Goldberg, M.D. i Busby, S.J.** (2006) Association of nucleoid proteins with coding and non-coding segments of the *Escherichia coli* genome. *Nucleic Acids Research* **34**:4642-4652.
- Guerin, E., Cambray, G., Sánchez-Alberola, N., Campoy, S., Erill, I., Da Re, S., Gonzalez-Zorn, B., Barbe, J., Ploy, M.C. i Mazel, D.** (2009) The SOS response controls integron recombination. *Science* **324**:1034.
- Hanahan, D., Jessee, J. i Bloom, F.R.** (1991) Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods in Enzymology* **204**:63-113.
- Haniford, D.B.** (2006) Transpososome dynamics and regulation in Tn10 transposition. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **41**:407-424.
- Harrison, J.A., Pickard, D., Higgins, C.F., Khan, A., Chatfield, S.N., Ali, T., Dorman, C.J., Hormaeche, C.E. i Dougan, G.** (1994) Role of *hns* in the virulence phenotype of pathogenic salmonellae. *Molecular Microbiology* **13**:133-140.

- Hengge-Aronis, R. i Fischer, D.** (1992) Identification and molecular analysis of *glgS*, a novel growth-phase-regulated and *rpoS*-dependent gene involved in glycogen synthesis in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **6**:1877-1886.
- Herzberg, M., Kaye, I.K., Peti, W., Wood, T.K.** (2006) YdgG (TqsA) controls biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 through autoinducer 2 transport. *Journal of Bacteriology* **188**:587-598.
- Higgins, C.F., Dorman, C.J., Stirling, D.A., Waddell, L., Booth, I.R., May, G. i Bremer, E.** (1988) A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell* **52**:569-584.
- Higgins, C.F., Hinton, J.C., Hulton, C.S., Owen-Hughes, T., Pavitt, G.D. i Seirafi, A.** (1990) Protein H1: a role for chromatin structure in the regulation of bacterial gene expression and virulence? *Molecular Microbiology* **4**:2007-2012.
- Hinton, J.C., Santos, D.S., Seirafi, A., Hulton, C.S., Pavitt, G.D. i Higgins, C.F.** (1992) Expression and mutational analysis of the nucleoid-associated protein H-NS of *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology* **6**:2327-2337.
- Hochuli, E.** (1988) Large-scale chromatography of recombinant proteins. *Journal of Chromatography* **444**:293-302.
- Hommais, F., Krin, E. Laurent-Winter, C., Soutourina, O., Malpertuy, A., Le Caer, J.P., Danchin, A. i Bertin, P.** (2001) Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Molecular Microbiology* **40**:20-36.
- Horiuchi, T., Maki, H. i Sekiguchi, M.** (1978) A new conditional lethal mutator (*dnaQ49*) in *Escherichia coli* K12. *Molecular and General Genetics* **163**:277-283.
- Hromockyj, A.E., Tucker, S.C. i Maurelli, A.T.** (1992) Temperature regulation of *Shigella* virulence: identification of the repressor gene *virR*, an analogue of *hns*, and partial complementation by tyrosyl transfer RNA (tRNA<sup>Tyr</sup>). *Molecular Microbiology* **6**:2113-2124.
- Hulton, C.S., Seirafi, A., Hinton, J.C., Sidebotham, J.M., Waddell, L., Pavitt, G.D., Owen-Hughes, T., Spassky, A., Buc, H. i Higgins, C.F.** (1990) Histone-like protein H1 (H-NS), DNA supercoiling, and gene expression in bacteria. *Cell* **63**:631-642.



- Hwang, D.S. i Kornberg, A.** (1992) Opposed actions of regulatory proteins, DnaA and IciA, in opening the replication origin of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* **267**:23087.
- Ishihama, A.** (2000) Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annual Review of Microbiology* **54**:499-518.
- Ishihama, A.** (2010) Prokaryotic genome regulation: multifactor promoters, multitarget regulators and hierarchic networks. *FEMS Microbiology Reviews* **34**:628-645.
- Johansson, J. i Uhlin, B.E.** (1999) Differential protease-mediated turnover of H-NS and StpA revealed by a mutation altering protein stability and stationary-phase survival of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**:10776-10781.
- Johansson, J., Eriksson, S., Sonden, B., Wai, S.N. i Uhlin, B.E.** (2001) Heteromeric interactions among nucleoid-associated bacterial proteins: localization of StpA-stabilizing regions in H-NS of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **183**:2343-2347.
- Juarez, A. i Goebel, W.** (1984) Chromosomal mutation that affects excretion of hemolysin in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **159**:1083-1085.
- Keniry, M.A., Berthon, H.A., Yang, J.Y., Miles, C.S. i Dixon, N.E.** (2000) NMR solution structure of the theta subunit of DNA polymerase III from *Escherichia coli*. *Protein Science* **9**:721-733.
- Keniry, M.A., Park, A.Y., Owen, E.A., Hamdan, S.M., Pintacuda, G., Otting, G. i Dixon, N.E.** (2006) Structure of the theta subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III in complex with the epsilon subunit. *Journal of Bacteriology* **188**:4464-4473.
- Kim, M.S., Bae, S.H., Yun, S.H., Lee, H.J., Ji, S.C., Lee, J.H., Srivastava, P., Lee, S.H., Chae, H., Lee, Y., Choi, B.S., Chatteraj, D.K. i Lim, H.M.** (2005) Cnu, a novel *oriC*-binding protein of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **187**:6998-7008.
- Ko, M. i Park, C.** (2000a) H-NS-Dependent regulation of flagellar synthesis is mediated by a LysR family protein. *Journal of Bacteriology* **182**:4670-4672.

- Ko, M. i Park, C.** (2000b) Two novel flagellar components and H-NS are involved in the motor function of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **303**:371-382.
- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Hayete, B., Lawrence, C.A. i Collins, J.J.** (2007) A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* **130**:797-810.
- Kohanski, M.A., DePristo, M.A. i Collins, J.J.** (2010) Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Molecular Cell* **37**:311-320.
- Koronakis, V., Koronakis, E. i Hughes, C.** (1989) Isolation and analysis of the C-terminal signal directing export of *Escherichia coli* hemolysin protein across both bacterial membranes. *The EMBO Journal* **8**:595-605.
- Krin, E., Danchin, A. i Soutourina, O.** (2010) RcsB plays a central role in H-NS-dependent regulation of motility and acid stress resistance in *Escherichia coli*. *Research in Microbiology* **161**:363-371.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lang, B., Blot, N., Bouffartigues, E., Buckle, M., Geertz, M., Gualerzi, C.O., Mavathur, R., Muskhelishvili, G., Pon, C.L., Rimsky, S., Stella, S., Babu, M.M. i Travers, A.** (2007) High-affinity DNA binding sites for H-NS provide a molecular basis for selective silencing within proteobacterial genomes. *Nucleic Acids Research* **35**:6330-6337.
- Lee, J., Jayaraman, A. i Wood, T.K.** (2007a) Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. *BMC Microbiology* **7**:42.
- Lee, J., Page, R., García-Contreras, R., Palermino, J.M., Zhang, X.S., Doshi, O., Wood, T.K. i Peti, W.** (2007b) Structure and function of the *Escherichia coli* protein YmgB: a protein critical for biofilm formation and acid-resistance. *Journal of Molecular Biology* **373**:11-26.
- Lemonnier, M., Ziegelin, G., Reick, T., Munoz Gomez, A., Diaz-Orejas, R. i Lanka, E.** (2003) Bacteriophage P1 Ban protein is a hexameric DNA helicase that interacts with and substitutes for *Escherichia coli* DnaB. *Nucleic Acids Research* **31**:3918-3928.

- Leonard, A.C. i Grimwade, J.E.** (2005) Building a bacterial orisome: emergence of new regulatory features for replication origin unwinding. *Molecular Microbiology* **55**:978-985.
- Lim, C.J., Whang, Y.R., Kenney, L.J i Yan, J.** (2011) Gene silencing H-NS paralogue StpA forms a rigid protein filament along DNA that blocks DNA accessibility. *Nucleic Acids Research* 2011 1-13.
- Liu, Y., Chen, H., Kenney, L.J. i Yan, J.** (2010) A divalent switch drives H-NS/DNA-binding conformations between stiffening and bridging modes. *Genes & Development* **24**:339-344.
- Lobocka, M.B., Rose, D.J., Plunkett, G.3rd, Rusin, M., Samojedny, A., Lehnerr, H., Yarmolinsky, M.B. Blattner, F.R.** (2004) Genome of bacteriophage P1. *Journal of Bacteriology* **186**:7032-7068.
- Lombardia, E., Rovetto, A.J., Arabolaza, A.L. i Grau, R.R.** (2006) A LuxS-dependent cell-to-cell language regulates social behavior and development in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **188**:4442-4452.
- Lombardo, M.J., Aponyi, I. i Rosenberg, S.M.** (2004) General stress response regulator RpoS in adaptive mutation and amplification in *Escherichia coli*. *Genetics* **166**:669-680.
- Lopez, E., Elez, M., Matic, I. i Blazquez, J.** (2007) Antibiotic-mediated recombination: ciprofloxacin stimulates SOS-independent recombination of divergent sequences in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **64**:83-93.
- Lopez, E. i Blazquez, J.** (2009) Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on intrachromosomal homologous recombination in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**:3411-3415.
- Lucchini, S., Rowley, G., Goldberg, M.D., Hurd, D., Harrison, M. i Hinton, J.C.** (2006) H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria. *PLoS Pathogens* **2**:e81.
- Lucchini, S., McDermott, P., Thompson, A. i Hinton, J.C.** (2009) The H-NS-like protein StpA represses the RpoS (sigma 38) regulon during exponential growth of *Salmonella Typhimurium*. *Molecular Microbiology* **74**:1169-1186.

- Luria, S.E. i Delbruck, M.** (1943) Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* **28**:491-511.
- Madan, R., Moorthy, S. i Mahadevan, S.** (2008) Enhanced expression of the *bgl* operon of *Escherichia coli* in the stationary phase. *FEMS Microbiology Letters* **288**:131-139.
- Madhusudan, S., Paukner, A., Klingen, Y., i Schnetz, K.** (2005) Independent regulation of H-NS-mediated silencing of the *bgl* operon at two levels: upstream by BglJ and LeuO and downstream by DnaKJ. *Microbiology* **151**:3349-3359.
- Madrid, C., Nieto, J.M. i Juarez, A.** (2002a) Role of the Hha/YmoA family of proteins in the thermoregulation of the expression of virulence factors. *International Journal of Medical Microbiology* **291**:425-432.
- Madrid, C., Nieto, J.M., Paytubi, S., Falconi, M., Gualerzi, C.O. i Juarez, A.** (2002b) Temperature- and H-NS-dependent regulation of a plasmid-encoded virulence operon expressing *Escherichia coli* hemolysin. *Journal of Bacteriology* **184**:5058-5066.
- Madrid, C., Balsalobre, C., García, J. i Juarez, A.** (2007a) The novel Hha/YmoA family of nucleoid-associated proteins: use of structural mimicry to modulate the activity of the H-NS family of proteins. *Molecular Microbiology* **63**:7-14.
- Madrid, C., García, J., Pons, M. i Juarez, A.** (2007b) Molecular evolution of the H-NS protein: interaction with Hha-like proteins is restricted to *enterobacteriaceae*. *Journal of Bacteriology* **189**:265-268.
- Majdalani, N. i Gottesman, S.** (2005) The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annual Review of Microbiology* **59**:379-405.
- Masuda, N. i Church, G.M.** (2003) Regulatory network of acid resistance genes in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **48**:699-712.
- Maurelli, A.T. i Sansonetti, P.J.** (1988) Identification of a chromosomal gene controlling temperature-regulated expression of *Shigella* virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **85**:2820-2824.

- May, G., Faatz, E., Villarejo, M. i Bremer, E.** (1986) Binding protein dependent transport of glycine betaine and its osmotic regulation in *Escherichia coli* K12. *Molecular & General Genetics* **205**:225-233.
- Mayer, O., Rajkowitsch, L., Lorenz, C., Konrat, R. i Schroeder, R.** (2007) RNA chaperone activity and RNA-binding properties of the *E. coli* protein StpA. *Nucleic Acids Research* **35**:1257-1269.
- Mikulskis, A.V. i Cornelis, G.R.** (1994) A new class of proteins regulating gene expression in enterobacteria. *Molecular Microbiology* **11**:77-86.
- Miller, J.H.** (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Mojica, F.J. i Higgins, C.F.** (1997) *In vivo* supercoiling of plasmid and chromosomal DNA in an *Escherichia coli* *hns* mutant. *Journal of Bacteriology* **179**:3528-3533.
- Mouriño, M., Munoa, F., Balsalobre, C., Diaz, P., Madrid, C. i Juarez, A.** (1994) Environmental regulation of alpha-haemolysin expression in *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis* **16**:249-259.
- Mouriño, M., Madrid, C., Balsalobre, C., Prenafeta, A., Munoa, F., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J.E. i Juarez, A.** (1996) The Hha protein as a modulator of expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **64**:2881-2884.
- Mouriño, M., Balsalobre, C., Madrid, C., Nieto, J.M., Prenafeta, A., Munoa, F.J. i Juarez, A.** (1998) Osmolarity modulates the expression of the Hha protein from *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* **160**:225-229.
- Mueller, G.A., Kirby, T.W., DeRose, EF., Li, D., Schaaper, R.M. i London, R.E.** (2005) Nuclear magnetic resonance solution structure of the *Escherichia coli* DNA polymerase III theta subunit. *Journal of Bacteriology* **187**:7081-7089.
- Mukerji, M. i Mahadevan, S.** (1997) Characterization of the negative elements involved in silencing the *bgl* operon of *Escherichia coli*: possible roles for DNA gyrase, H-NS, and CRP-cAMP in regulation. *Molecular Microbiology* **24**:617-627.

- Muller, C.M., Schneider, G., Dobrindt, U., Emody, L., Hacker, J. i Uhlin, B.E.** (2010) Differential effects and interactions of endogenous and horizontally acquired H-NS-like proteins in pathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **75**:280-293.
- Nagarajavel, V., Madhusudan, S., Dole, S., Rahmouni, A.R. i Schnetz, K.** (2007) Repression by binding of H-NS within the transcription unit. *The Journal of Biological Chemistry* **282**:23622-23630.
- Navarre, W.W., Porwollik, S., Wang, Y., McClelli, M., Rosen, H., Libby, S.J. i Fang, F.C.** (2006) Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science* **313**:236-238.
- Navarre, W.W., McClelli, M., Libby, S.J. i Fang, F.C.** (2007) Silencing of xenogeneic DNA by H-NS-facilitation of lateral gene transfer in bacteria by a defense system that recognizes foreign DNA. *Genes & Development* **21**:1456-1471.
- Nicaud, J.M., Mackman, N., Gray, L. I Holli, I.B.** (1985) Characterisation of HlyC and mechanism of activation and secretion of haemolysin from *E. coli* 2001. *FEBS Letters* **187**:339-344.
- Nieto, J.M., Carmona, M., Bolli, S., Jubete, Y., de la Cruz, F. i Juarez, A.** (1991) The *hha* gene modulates haemolysin expression in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **5**:1285-1293.
- Nieto, J.M., Bailey, M.J., Hughes, C. i Koronakis, V.** (1996) Suppression of transcription polarity in the *Escherichia coli* haemolysin operon by a short upstream element shared by polysaccharide and DNA transfer determinants. *Molecular Microbiology* **19**:705-713.
- Nieto, J.M., Mouriño, M., Balsalobre, C., Madrid, C., Prenafeta, A., Munoa, F.J. i Juarez, A.** (1997) Construction of a double *hha hns* mutant of *Escherichia coli*: effect on DNA supercoiling and alpha-haemolysin production. *FEMS Microbiology Letters* **155**:39-44.
- Nieto, J.M., Madrid, C., Prenafeta, A., Miquelay, E., Balsalobre, C., Carrascal, M. i Juarez, A.** (2000) Expression of the hemolysin operon in *Escherichia coli* is modulated by a nucleoid-protein complex that includes the proteins Hha and H-NS. *Molecular and General Genetics* **263**:349-358.

- Nieto, J.M., Madrid, C., Miquelay, E., Parra, J.L., Rodriguez, S. i Juarez, A.** (2002) Evidence for direct protein-protein interaction between members of the enterobacterial Hha/YmoA and H-NS families of proteins. *Journal of Bacteriology* **184**:629-635.
- Noegel, A., Rdest, U., Goebel, W.** (1981) Determination of the functions of hemolytic plasmid pHly152 of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **145**:233-247.
- Nye, M.B. i Taylor, R.K.** (2003) *Vibrio cholerae* H-NS domain structure and function with respect to transcriptional repression of ToxR regulon genes reveals differences among H-NS family members. *Molecular Microbiology* **50**:427-444.
- O'Byrne, C.P. i Dorman, C.J.** (1994) Transcription of the *Salmonella typhimurium* spv virulence locus is regulated negatively by the nucleoid-associated protein H-NS. *FEMS Microbiology Letters* **121**:99-105.
- O'Donnell, M.** (2006) Replisome architecture and dynamics in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* **281**:10653.
- Ogura, Y., Ooka, T., Iguchi, A., Toh, H., Asadulghani, M., Oshima, K., Kodama, T., Abe, H., Nakayama, K., Kurokawa, K., Tobe, T., Hattori, M. i Hayashi, T.** (2009) Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **106**:17939-17944.
- Ohta, T., Ueguchi, C. i Mizuno, T.** (1999) *rpoS* function is essential for *bgl* silencing caused by C-terminally truncated H-NS in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **181**:6278-6283.
- Ono, S., Goldberg, M.D., Olsson, T., Esposito, D., Hinton, J.C. i Ladbury, J.E.** (2005) H-NS is a part of a thermally controlled mechanism for bacterial gene regulation. *The Biochemical Journal* **391**:203-213.
- Oshima, T., Ishikawa, S., Kurokawa, K., Aiba, H. i Ogasawara, N.** (2006) *Escherichia coli* histone-like protein H-NS preferentially binds to horizontally acquired DNA in association with RNA polymerase. *DNA Research* **13**:141-153.
- Owen-Hughes, T.A., Pavitt, G.D., Santos, D.S., Sidebotham, J.M., Hulton, C.S., Hinton, J.C. i Higgins, C.F.** (1992) The chromatin-associated protein H-NS

- interacts with curved DNA to influence DNA topology and gene expression. *Cell* **71**:255-265.
- Park, H.S., Ostberg, Y., Johansson, J., Wagner, E.G. i Uhlin, B.E.** (2010) Novel role for a bacterial nucleoid protein in translation of mRNAs with suboptimal ribosome-binding sites. *Genes & Development* **24**:1345-1350.
- Paytubi, S.** (2004) Regulació de l'expressió gènica a enterobactèries: caracterització d'YdgT, una nova proteïna de la família Hha/YmoA, i interaccions amb altres proteïnes associades al nucleoide. Tesi Doctoral. Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.
- Paytubi, S., Madrid, C., Forns, N., Nieto, J.M., Balsalobre, C., Uhlin, B.E. i Juarez, A.** (2004) YdgT, the Hha paralogue in *Escherichia coli*, forms heteromeric complexes with H-NS and StpA. *Molecular Microbiology* **54**:251-263.
- Peters, J.M., Mooney, R.A., Kuan, P.F., Rowland, J.L., Keles, S. i Landick, R.** (2009) Rho directs widespread termination of intragenic and stable RNA transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **106**:15406-15411.
- Pflum, M.K.** (2006) H-NS gives invading DNA the silent treatment. *Nature Chemical Biology* **2**:400-401.
- Pons, J.I., Rodríguez, S., Madrid, C., Juarez, A. i Nieto, J.M.** (2004) *In vivo* increase of solubility of overexpressed Hha protein by tandem expression with interacting protein H-NS. *Protein Expression and Purification* **35**:293-297.
- Pratt, L.A. i Kolter, R.** (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology* **30**:285-293.
- Prieto, A.I., Jakomin, M., Segura, I., Pucciarelli, M.G., Ramos-Morales, F., García-del Portillo, F. i Casadesus, J.** (2007) The GATC-binding protein SeqA is required for bile resistance and virulence in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology* **189**:8496.
- Prosseda, G., Falconi, M., Giangrossi, M., Gualerzi, C.O., Micheli, G. i Colonna, B.** (2004) The *virF* promoter in *Shigella*: more than just a curved DNA stretch. *Molecular Microbiology* **51**:523-537.



- Queiroz, M.H., Madrid, C., Paytubi, S., Balsalobre, C. i Juárez, A.** (2011) Integration host factor alleviates H-NS silencing of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium master regulator of SPI1, hilA. *Microbiology* **157**:2504-2514.
- Ren, D., Bedzyk, L.A., Ye, R.W., Thomas, S.M. i Wood, T.K.** (2004) Differential gene expression shows natural brominated furanones interfere with the autoinducer-2 bacterial signaling system of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* **88**:630-642.
- Ren, D., Zuo, R., Gonzalez Barrios, A.F., Bedzyk, L.A., Eldridge, G.R., Pasmore, M.E. i Wood, T.K.** (2005) Differential gene expression for investigation of *Escherichia coli* biofilm inhibition by plant extract ursolic acid. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:4022-4034.
- Rhen, M. i Dorman, C.J.** (2005) Hierarchical gene regulators adapt *Salmonella enterica* to its host milieus. *International Journal of Medical Microbiology* **294**:487-502.
- Rimsky, S., Zuber, F., Buckle, M. i Buc, H.** (2001) A molecular mechanism for the repression of transcription by the H-NS protein. *Molecular Microbiology* **42**:1311-1323.
- Rippa, V., Cirulli, C., Di Palo, B., Doti, N., Amoresano, A. i Duilio, A.** (2010) The ribosomal protein L2 interacts with the RNA polymerase alpha subunit and acts as a transcription modulator in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **192**:1882-1889.
- Rodríguez, S., Nieto, J.M., Madrid, C. i Juárez, A.** (2005) Functional replacement of the oligomerization domain of H-NS by the Hha protein of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **187**:5452-5459.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. i Maniatis, T.** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sánchez-SanMartín, C., Bustamante, V.H., Calva, E. i Puente, J.L.** (2001) Transcriptional Regulation of the *orf19* Gene and the tir-cesT-eae Operon of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **183**:2823-2833.
- Saxena, S. i Gowrishankar, J.** (2011) Compromised factor-dependent transcription termination in a *nusA* mutant of *Escherichia coli*: spectrum of termination

- efficiencies generated by perturbations of Rho, NusG, NusA, and H-NS family proteins. *Journal of Bacteriology* **193**:3842-3850.
- Schaaper, R.M. i Cornacchio, R.** (1992) An *Escherichia coli dnaE* mutation with suppressor activity toward mutator mutD5. *Journal of Bacteriology* **174**:1974-1982.
- Schlör, S., Riedl, S., Blass, J. i Reidl, J.** (2000) Genetic rearrangements of the regions adjacent to genes encoding heat-labile enterotoxins (eltAB) of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:352-358.
- Schnetz, K.** (1995) Silencing of *Escherichia coli bgl* promoter by flanking sequence elements. *The EMBO Journal* **14**:2545-2550.
- Schnetz, K. i Wang, J.C.** (1996) Silencing of the *Escherichia coli bgl* promoter: effects of template supercoiling and cell extracts on promoter activity *in vitro*. *Nucleic Acids Research* **24**:2422-2428.
- Schröder, O., i Wagner, R.** (2000) The bacterial DNA binding protein H-NS represses ribosomal RNA transcription by trapping RNA polymerase in the initiation complex. *Journal of Molecular Biology* **298**: 737-748.
- Schröder, O. i Wagner, R.** (2002) The bacterial regulatory protein H-NS- a versatile modulator of nucleic acid structures. *Biological Chemistry* **383**:945-960.
- Scott, M.E., Melton-Celsa, A.R., O'Brien, A.D.** (2003) Mutations in *hns* reduce the adherence of Shiga toxin-producing *E. coli* O91:H21 strain B2F1 to human colonic epithelial cells and increase the production of hemolysin. *Microbial Pathogenesis* **34**:155-159.
- Shapiro, J.A.** (2009) Letting *Escherichia coli* teach me about genome engineering. *Genetics* **183**:1205-1214.
- Sharma, V.K. i Zuerner, R.L.** (2004) Role of *hha* i *ler* in transcriptional regulation of the *esp* operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Bacteriology* **186**:7290-7301.
- Shi, X., Waasdorp, B.C. i Bennett, G.N.** (1993) Modulation of acid-induced amino acid decarboxylase gene expression by *hns* in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **175**:1182-1186.

- Shi, X. i Bennett, G.N.** (1994) Plasmids bearing *hfq* and the *hns*-like gene *stpA* complement *hns* mutants in modulating arginine decarboxylase gene expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **176**:6769-6775.
- Shin, M., Song, M., Haeng Ree, J., Hong, Y., Kim, Y.J., Seok, Y.J., Ha, K. S., Jung, S.H., Choy, H.E.** (2005) DNA looping-mediated repression by histone-like protein H-NS: specific requirement of  $E\sigma^{70}$  as a cofactor for looping. *Genes & Development* **19**:2388-2398.
- Shindo, H., Ohnuki, A., Ginba, H., Katoh, E., Ueguchi, C., Mizuno, T. i Yamazaki, T.** (1999) Identification of the DNA binding surface of H-NS protein from *Escherichia coli* by heteronuclear NMR spectroscopy. *FEBS Letters* **455**:63-69.
- Silphaduang, U., Mascarenhas, M., Karmali, M. i Coombes, B.K.** (2007) Repression of intracellular virulence factors in *Salmonella* by the Hha and YdgT nucleoid-associated proteins. *Journal of Bacteriology* **189**:3669-3673.
- Slater, S.C., Lifshits, M.R., O'Donnell, M. i Maurer, R.** (1994) *holE*, the gene coding for the theta subunit of DNA polymerase III of *Escherichia coli*: characterization of a *holE* mutant and comparison with a *dnaQ* (epsilon-subunit) mutant. *Journal of Bacteriology* **176**:815-821.
- Smyth, C.P., Lundback, T., Renzoni, D., Siligardi, G., Beavil, R., Layton, M., Sidebotham, J.M., Hinton, J.C., Driscoll, P.C., Higgins, C.F. i Ladbury, J.E.** (2000) Oligomerization of the chromatin-structuring protein H-NS. *Molecular Microbiology* **36**:962-972.
- Sonden, B. i Uhlin, B.E.** (1996) Coordinated and differential expression of histone-like proteins in *Escherichia coli*: regulation and function of the H-NS analog StpA. *The EMBO Journal* **15**:4970-4980.
- Sonnenfield, J.M., Burns, C.M., Higgins, C.F. i Hinton, J.C.** (2001) The nucleoid-associated protein StpA binds curved DNA, has a greater DNA-binding affinity than H-NS and is present in significant levels in *hns* mutants. *Biochimie* **83**:243-249.
- Soutourina, O., Kolb, A., Krin, E., Laurent-Winter, C., Rimsky, S., Danchin, A. i Bertin, P.** (1999) Multiple control of flagellum biosynthesis in *Escherichia coli*:

- role of H-NS protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the *flhDC* master operon. *Journal of Bacteriology* **181**:7500-7508.
- Soutourina, O.A., Krin, E., Laurent-Winter, C., Hommais, F., Danchin, A. i Bertin, P.N.** (2002) Regulation of bacterial motility in response to low pH in *Escherichia coli*: the role of H-NS protein. *Microbiology* **148**:1543-1551.
- Spassky, A., Rimsky, S., Garreau, H. i Buc, H.** (1984) H1a, an *E. coli* DNA-binding protein which accumulates in stationary phase, strongly compacts DNA in vitro. *Nucleic Acids Research* **12**:5321-5340.
- Stella, S., Falconi, M., Lammi, M., Gualerzi, C.O. i Pon, C.L.** (2006) Environmental control of the *in vivo* oligomerization of nucleoid protein H-NS. *Journal of Molecular Biology* **355**:169-174.
- Stoebel, D.M., Free, A. i Dorman, C.J.** (2008) Anti-silencing: overcoming H-NS-mediated repression of transcription in Gram-negative enteric bacteria. *Microbiology* **154**:2533-2545.
- Stoker, N.G., Fairweather, N.F. i Spratt, B.G.** (1982) Versatile low-copy-number plasmid vectors for cloning in *Escherichia coli*. *Gene* **18**:335-341.
- Studier, F.W. i Moffatt, B.A.** (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* **189**:113-130.
- Studwell-Vaughan, P.S. i O'Donnell, M.** (1993) DNA polymerase III accessory proteins. V. Theta encoded by *holE*. *The Journal of Biological Chemistry* **268**:11785-11791.
- Taft-Benz, S.A. i Schaaper, R.M.** (2004) The theta subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III: a role in stabilizing the epsilon proofreading subunit. *Journal of Bacteriology* **186**:2774-2780.
- Takeda, T., Yun, C.S., Shintani, M., Yamane, H. i Nojiri, H.** (2011) Distribution of genes encoding nucleoid-associated protein homologs in plasmids. *International Journal of Evolutionary Biology* **2011**:685015.
- Tendeng, C. i Bertin, P.N.** (2003) H-NS in Gram-negative bacteria: a family of multifaceted proteins. *Trends in Microbiology* **11**:511-518.

- Tietze, E. i Tschäpe, H.** (1994) Temperature - dependent expression of conjugation pili by IncM plasmid - harbouring bacteria: Identification of plasmid - encoded regulatory functions. *Journal of Basic Microbiology* **34**:105-116.
- Tobe, T., Yoshikawa, M., Mizuno, T. i Sasakawa, C.** (1993) Transcriptional control of the invasion regulatory gene *virB* of *Shigella flexneri*: activation by *virF* and repression by H-NS. *Journal of Bacteriology* **175**:6142-6149.
- Toleman, M.A., Bennett, P.M. i Walsh, T.R.** (2006) ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **70**:296-316.
- Towbin, H., Staehelin, T. i Gordon, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **76**:4350-4354.
- Trachman, J.D. i Maas, W.K.** (1998) Temperature regulation of heat-labile enterotoxin (LT) synthesis in *Escherichia coli* is mediated by an interaction of H-NS protein with the LT A-subunit DNA. *Journal of Bacteriology* **180**:3715-3718.
- Travers, A. i Muskhelishvili, G.** (2005) Bacterial chromatin. *Current Opinion in Genetics & Development* **15**:507-514.
- Tschowri, N., Busse, S. i Hengge, R.** (2009) The BLUF-EAL protein YcgF acts as a direct anti-repressor in a blue-light response of *Escherichia coli*. *Genes & Development* **23**:522-534.
- Tsui, H.C., Leung, H.C. i Winkler, M.E.** (1994) Characterization of broadly pleiotropic phenotypes caused by an *hfq* insertion mutation in *Escherichia coli* K-12. *Molecular Microbiology* **13**:35-49.
- Tupper, A.E., Owen-Hughes, T.A., Ussery, D.W., Santos, D.S., Ferguson, D.J., Sidebotham, J.M., Hinton, J.C. i Higgins, C.F.** (1994) The chromatin-associated protein H-NS alters DNA topology *in vitro*. *The EMBO Journal* **13**:258-268.
- Turner, S.A., Luck, S.N., Sakellaris, H., Rajakumar, K. i Adler, B.** (2001) Nested deletions of the SRL pathogenicity island of *Shigella flexneri* 2a. *Journal of Bacteriology* **183**:5535-5543.

- Ubeda, C., Maiques, E., Knecht, E., Lasa, I., Novick, R.P. i Penades, J.R.** (2005) Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in *staphylococci*. *Molecular Microbiology* **56**:836-844.
- Ueguchi, C. i Mizuno, T.** (1993) The *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS functions directly as a transcriptional repressor. *The EMBO Journal* **12**:1039-1046.
- Ueguchi, C., Suzuki, T., Yoshida, T., Tanaka, K. i Mizuno, T.** (1996) Systematic mutational analysis revealing the functional domain organization of *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. *Journal of Molecular Biology* **263**:149-162.
- Ueguchi, C., Seto, C., Suzuki, T. i Mizuno, T.** (1997) Clarification of the dimerization domain and its functional significance for the *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. *Journal of Molecular Biology* **274**:145-151.
- Ueguchi, C., Ohta, T., Seto, C., Suzuki, T. i Mizuno, T.** (1998) The *leuO* gene product has a latent ability to relieve *bgl* silencing in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **180**:190-193.
- Umanski, T., Rosenshine, I. i Friedberg, D.** (2002) Thermoregulated expression of virulence genes in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **148**:2735.
- Ussery, D.W., Hinton, J.C., Jordi, B.J., Granum, P.E., Seirafi, A., Stephen, R.J., Tupper, A.E., Berridge, G., Sidebotham, J.M. i Higgins, C.F.** (1994) The chromatin-associated protein H-NS. *Biochimie* **76**:968-980.
- Vivero, A., Baños, R.C., Mariscotti, J.F., Oliveros, J.C., García-del Portillo, F., Juárez, A. i Madrid, C.** (2008) Modulation of horizontally acquired genes by the Hha-YdgT proteins in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology* **190**:1152-1156.
- Vogel, M., Hess, J., Then, I., Juárez, A. i Goebel, W.** (1988) Characterization of a sequence (*hlyR*) which enhances synthesis and secretion of hemolysin in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics* **212**:76-84.
- Wang, X., Kim, Y. i Wood, T.K.** (2009) Control and benefits of CP4-57 prophage excision in *Escherichia coli* biofilms. *The ISME journal* **3**:1164-1179.

- Wang, W., Li, G.W., Chen, C., Xie, X.S. i Zhuang, X.** (2011) Chromosome organization by a nucleoid-associated protein in live bacteria. *Science* **333**:1445-1449.
- Waterman, S.R. i Small, P.L.** (2003) Transcriptional expression of *Escherichia coli* glutamate-dependent acid resistance genes *gadA* and *gadBC* in an *hns rpoS* mutant. *Journal of Bacteriology* **185**:4644-4647.
- White-Ziegler, C.A., Angus Hill, M.L., Braaten, B.A., van der Woude, M.W., Low, D.A.** (1998) Thermoregulation of *Escherichia coli pap* transcription: H-NS is a temperature-dependent DNA methylation blocking factor. *Molecular Microbiology* **28**:1121-1137.
- White-Ziegler, C.A., Um, S., Perez, N.M., Berns, A.L., Malhowski, A.J. i Young, S.** (2008) Low temperature (23 degrees C) increases expression of biofilm-, cold-shock- and RpoS-dependent genes in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology* **154**:148-166.
- Williams, R.M., Rimsky, S. i Buc, H.** (1996) Probing the structure, function, and interactions of the *Escherichia coli* H-NS and StpA proteins by using dominant negative derivatives. *Journal of Bacteriology* **178**:4335-4343.
- Williams, R.M. i Rimsky, S.** (1997) Molecular aspects of the *E. coli* nucleoid protein, H-NS: a central controller of gene regulatory networks. *FEMS Microbiology Letters* **156**:175-185.
- Wolf, M.K., de Haan, L.A., Cassels, F.J., Willshaw, G.A., Warren, R., Boedeker, E.C. i Gastra, W.** (1997) The CS6 colonization factor of human enterotoxigenic *Escherichia coli* contains two heterologous major subunits. *FEMS Microbiology Letters* **148**:35-42.
- Yamada, H., Muramatsu, S. i Mizuno, T.** (1990) An *Escherichia coli* protein that preferentially binds to sharply curved DNA. *Journal of Biochemistry* **108**:420-425.
- Yamashino, T., Ueguchi, C. i Mizuno, T.** (1995) Quantitative control of the stationary phase-specific sigma factor, sigma S, in *Escherichia coli*: involvement of the nucleoid protein H-NS. *The EMBO Journal* **14**:594-602.
- Yee, A., Chang, X., Pineda-Lucena, A., Wu, B., Semesi, A., Le, B., Ramelot, T., Lee, G.M., Bhattacharyya, S., Gutierrez, P., Denisov, A., Lee, C.H., Cort, J.R.,**

- Kozlov, G., Liao, J., Finak, G., Chen, L., Wishart, D., Lee, W., McIntosh, L.P., Gehring, K., Kennedy, M.A., Edwards, A.M. i Arrowsmith, C.H.** (2002) An NMR approach to structural proteomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **99**:1825-1830.
- Yim, G., de la Cruz, F., Spiegelman, G.B. i Davies, J.** (2006) Transcription modulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium promoters by sub-MIC levels of rifampin. *Journal of Bacteriology* **188**:7988-7991.
- Yoshida, T., Ueguchi, C., Yamada, H., Mizuno, T.** (1993) Function of the *Escherichia coli* nucleoid protein, H-NS: molecular analysis of a subset of proteins whose expression is enhanced in a *hns* deletion mutant. *Molecular & General Genetics* **237**:113-122.
- Zabala, J.C., de la Cruz, F. i Ortiz, J.M.** (1982) Several copies of the same insertion sequence are present in alpha-hemolytic plasmids belonging to four different incompatibility groups. *Journal of Bacteriology* **151**:472-476.
- Zabala, J.C., García-Lobo, J.M., Diaz-Aroca, E., de la Cruz, F. i Ortiz, J.M.** (1984) *Escherichia coli* alpha-haemolysin synthesis and export genes are flanked by a direct repetition of IS91-like elements. *Molecular & General Genetics* **197**:90-97.
- Zaghloul, L., Tang, C., Chin, H.Y., Bek, E.J., Lan, R. i Tanaka, M.M.** (2007) The distribution of insertion sequences in the genome of *Shigella flexneri* strain 2457T. *FEMS Microbiology Letters* **277**:197-204.
- Zhang, A. i Belfort, M.** (1992) Nucleotide sequence of a newly-identified *Escherichia coli* gene, *stpA*, encoding an H-NS-like protein. *Nucleic Acids Research* **20**:6735.
- Zhang, A., Rimsky, S., Reaban, M.E., Buc, H. i Belfort, M.** (1996) *Escherichia coli* protein analogs StpA and H-NS: regulatory loops, similar and disparate effects on nucleic acid dynamics. *The EMBO Journal* **15**:1340-1349.
- Zhang, X.S., García-Contreras, R. i Wood, T.K.** (2007) YcfR (BhsA) influences *Escherichia coli* biofilm formation through stress response and surface hydrophobicity. *Journal of Bacteriology* **189**:3051-3062.
- Zheng, M., Wang, X., Templeton, L.J., Smulski, D.R., LaRossa, R.A. i Storz, G.** (2001) DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *Journal of Bacteriology* **183**:4562-4570.



**Zimmerman, S.B.** (2006) Cooperative transitions of isolated *Escherichia coli* nucleoids: implications for the nucleoid as a cellular phase. *Journal of Structural Biology* **153**:160-175.

## **7. Publicacions**



# Antibiotics Shaping Bacterial Genome: Deletion of an IS91 Flanked Virulence Determinant upon Exposure to Subinhibitory Antibiotic Concentrations

Laura Pedró<sup>1</sup>, Rosa C. Baños<sup>1</sup>, Sonia Aznar<sup>2</sup>, Cristina Madrid<sup>2</sup>, Carlos Balsalobre<sup>2</sup>, Antonio Juárez<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Institut de Bioenginyeria de Catalunya, Parc Científic de Barcelona, Barcelona, Spain, <sup>2</sup> Departament de Microbiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

## Abstract

The nucleoid-associated proteins Hha and YdgT repress the expression of the toxin  $\alpha$ -hemolysin. An *Escherichia coli* mutant lacking these proteins overexpresses the toxin  $\alpha$ -hemolysin encoded in the multicopy recombinant plasmid pANN202-312R. Unexpectedly, we could observe that this mutant generated clones that no further produced hemolysin (Hly). Generation of Hly<sup>-</sup> clones was dependent upon the presence in the culture medium of the antibiotic kanamycin (km), a marker of the *hha* allele (*hha::Tn5*). Detailed analysis of different Hly<sup>-</sup> clones evidenced that recombination between partial IS91 sequences that flank the *hly* operon had occurred. A fluctuation test evidenced that the presence of km in the culture medium was underlying the generation of these clones. A decrease of the km concentration from 25 mg/l to 12.5 mg/l abolished the appearance of Hly<sup>-</sup> derivatives. We considered as a working hypothesis that, when producing high levels of the toxin (combination of the *hha ydgT* mutations with the presence of the multicopy hemolytic plasmid pANN202-312R), the concentration of km of 25 mg/l resulted subinhibitory and stimulated the recombination between adjacent IS91 flanking sequences. To further test this hypothesis, we analyzed the effect of subinhibitory km concentrations in the wild type *E. coli* strain MG1655 harboring the parental low copy number plasmid pHly152. At a km concentration of 5 mg/l, subinhibitory for strain MG1655 (pHly152), generation of Hly<sup>-</sup> clones could be readily detected. Similar results were also obtained when, instead of km, ampicillin was used. IS91 is flanking several virulence determinants in different enteric bacterial pathogenic strains from *E. coli* and *Shigella*. The results presented here evidence that stress generated by exposure to subinhibitory antibiotic concentrations may result in rearrangements of the bacterial genome. Whereas some of these rearrangements may be deleterious, others may generate genotypes with increased virulence, which may resume infection.

**Citation:** Pedró L, Baños RC, Aznar S, Madrid C, Balsalobre C, et al. (2011) Antibiotics Shaping Bacterial Genome: Deletion of an IS91 Flanked Virulence Determinant upon Exposure to Subinhibitory Antibiotic Concentrations. PLoS ONE 6(11): e27606. doi:10.1371/journal.pone.0027606

**Editor:** Arnold Driessen, University of Groningen, The Netherlands

**Received:** June 10, 2011; **Accepted:** October 20, 2011; **Published:** November 11, 2011

**Copyright:** © 2011 Pedró et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by funds from the Spanish MICINN-FEDER (Bio2010-15683, BFU2010-21836-C02-01 and CSD2008-00013) and the Generalitat de Catalunya (2009SGR13352). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: [ajuarez@ub.edu](mailto:ajuarez@ub.edu)

## Introduction

Pathogenic bacteria incorporate in their genomes DNA stretches that have been horizontally acquired (HGT DNA) and that contain genes required for the colonization of their hosts. The term "pathogenicity island" (PAI) refers to DNA regions that can be unstable, carry virulence determinants and are usually HGT [1,2]. These DNA regions can also include, or be flanked by, insertion elements (IS elements) which, in turn, may facilitate integration in different regions of the chromosome. Genes other than those specifically required for virulence can be present in these islands (i.e., antibiotic resistance determinants, catabolic genes or even paralogues of genes encoded in the core genome). Several pathogenicity islands can be spontaneously excised from the chromosome at detectable rates. In most cases, the instability of PAIs is due to their precise excision from the chromosome via recombination between identical directed repeated sequences that flank the element. These short (9 to 20 bp) repeats are analogous to phage *att* sites. Upon PAI deletion, only one copy of the directed repeat remains on the chromosome [3]. In other instances, IS elements that flank some PAIs mediate deletion of the flanked

DNA sequences [4]. As an example, recombination between two flanking IS100 elements has been shown to account for deletion of the high-pathogenicity island (HPI) from *Yersinia pestis* [5].

IS91 was first discovered in plasmids encoding the toxin  $\alpha$ -hemolysin (Hly) in *Escherichia coli* [6]. IS91 is usually associated to various plasmid and chromosomal pathogenicity islands that harbor the  $\alpha$ -hemolysin operon [7,8,9], and it was suggested that this element was involved in the dissemination of these pathogenicity determinants [10]. Although initially considered a rarity among IS elements, new examples have evidenced this element flanking several virulence determinants [11]. In addition to the *hly* genes, IS91 and closely related isoforms have also been located adjacent to several other virulence determinants in enteropathogenic, enterohemolytic and enterotoxigenic strains of *E. coli* [12,13]. IS91 like elements differ from other IS elements in that they lack terminal inverted repeats and are considered to transpose by a mechanism termed rolling circle transposition [14].

Bacterial cells have developed several strategies to cope with sudden changes in environmental conditions that result in stress. Several stress-responsive mechanisms rely on regulatory circuits that modify the gene expression pattern [15]. In addition to

altering DNA expression, it is also known that stress may account for changes in the DNA sequences. The SOS response, triggered by the accumulation of ssDNA, is a well-characterized mechanism by which bacterial cells, in response to environmental factors that cause DNA damage, increase the mutation or DNA rearrangement rates [16]. Stress-induced adaptive amplifications of DNA have been reported in living organisms [17] and, within the bacterial kingdom, are most studied in *E. coli* [18,19,20]. This microorganism can respond to starvation stress by amplifying specific DNA sequences that allow cells to adjust to these conditions. The general stress response regulator RpoS appears to be required for that response [19]. In enteric bacteria deletions of large DNA stretches, such as those flanked by directed repeats or IS elements, are known to occur. It has been reported that these DNA rearrangements occur spontaneously, at fixed rates [21]. However, in the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*, stress generated by host defenses leads to excision of certain genomic islands and other DNA rearrangements [22]. In this work, experimental data that correlate environmental stress with induction of DNA deletions in Enterobacteria are presented. Our results let us to conclude that exposure to subinhibitory concentrations of certain antibiotics accounts for deletions of genomic islands flanked by partial IS91 sequences.

## Results

### Kanamycin-dependent deletion of a DNA fragment including the operon encoding the toxin $\alpha$ -hemolysin in *Escherichia coli*

Production of *E. coli*  $\alpha$ -hemolysin is tightly regulated. The nucleoid-associated proteins H-NS and Hha interact to silence expression of the toxin under several environmental conditions, such as low temperature and high osmolarity [23]. Proteins of the Hha family mimic the oligomerization domain of H-NS and form complexes with this latter protein to repress the expression of several virulence determinants (as reviewed in [24]). *hns/hha* mutants upregulate hemolysin expression, which can be readily visualized on blood agar plates because of their large hemolysis haloes (see Figure 1B). In the *E. coli* chromosome paralogues to both H-NS and Hha proteins are found: the StpA and YdgT proteins respectively [25]. These protein paralogues can compensate for the lack of either H-NS or Hha, partially attenuating the mutant phenotype. Hence, double *hha ydgT* mutants show a higher derepression of the hemolysin expression than single *hha* mutants [26]. The characterization studies of a double *hha ydgT* mutant from the *E. coli* strain MG1655 (strain MG1655HY) raised an unexpected phenotype. When strain MG1655HY was transformed with the plasmid pANN202312R (a medium-copy plasmid containing a 17010 bp *SaII/SaII* fragment with the complete *hly* operon from the wt plasmid pHly152 [27]), non-hemolytic (Hly<sup>-</sup>) colonies could be detected on blood agar plates. Interestingly, detection of non-hemolytic derivatives was dependent upon the presence of kanamycin (km) (a marker of the *hha* mutation) at a concentration of 25 mg/l in the culture medium. We decided to characterize the non-hemolytic derivatives and their relationship to the presence of km in the medium. Overnight cultures of the strain MG1655HY (pANN202-312R) in LB containing chloramphenicol (cm), the plasmid marker were used to inoculate (1:100) fresh LB cm and LB cm km media. Growth was monitored and the presence of non-hemolytic clones was quantified. When compared to the growth rate in km-free LB medium, the growth rate in medium containing km was significantly reduced

(Figure 1A). Moreover, in LB cm km cultures but not in cultures in LB cm, Hly<sup>-</sup> clones could be detected. Their proportion increased at the later growth stages (Figures 1B and C).

### Hly<sup>-</sup> clones from strain MG1655HY harbor pANN202-312R plasmid derivatives exhibiting two different deletion patterns

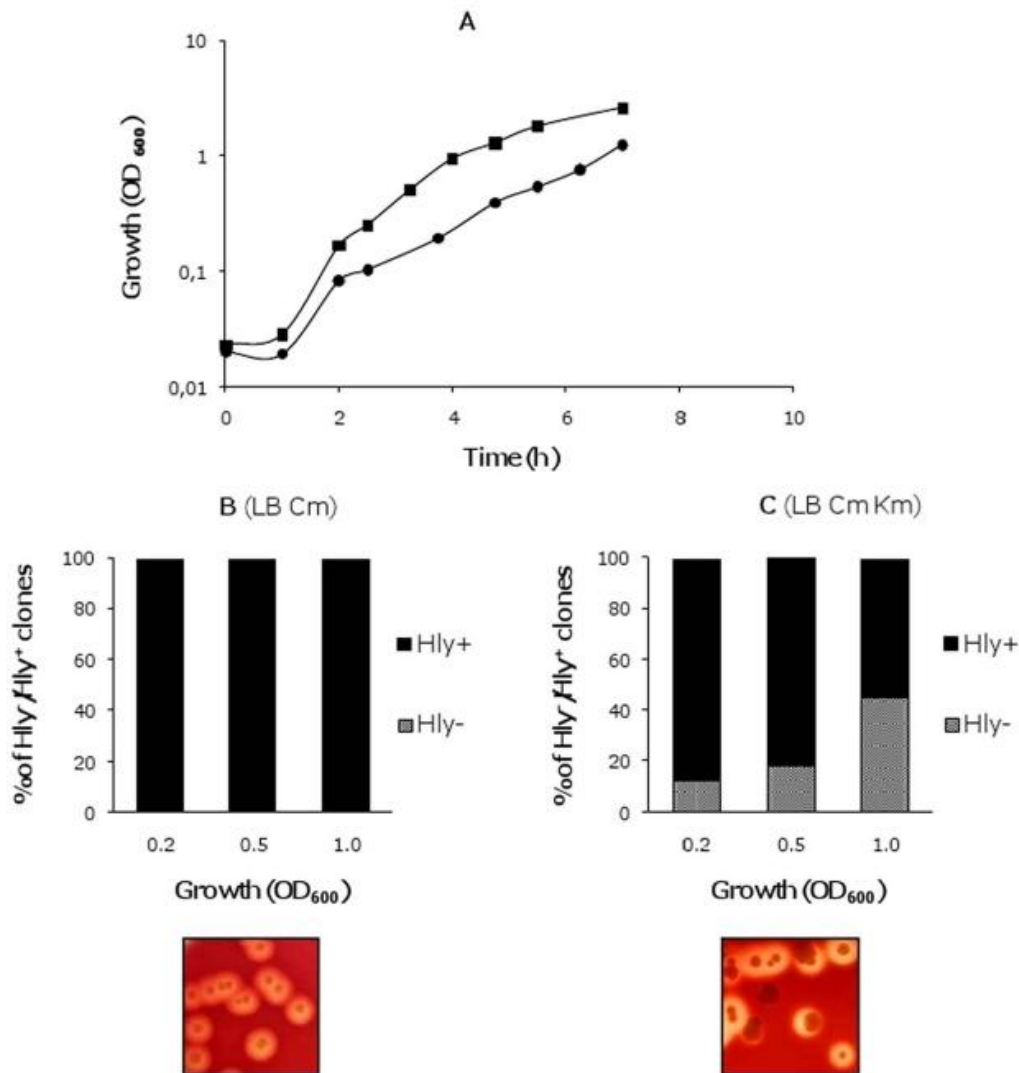
To gain insight into the origin of the Hly<sup>-</sup> clones, plasmid DNA from thirty Hly<sup>-</sup> colonies isolated in 6 independent experiments and was characterized by restriction analysis. Interestingly, two deletion patterns were found (Figure 2A). The complete sequence of the 17010 bp *SaII/SaII* fragment of plasmid pANN202-312R was obtained (GenBank accession number BankIt1460463 Seq1 JN130365), and the sites affected in both types of deletions were precisely determined (Figure 2B internal boxes in white and grey). The DNA sequence obtained complemented previous hybridization studies [6] and evidenced that five incomplete IS91 elements flank the hemolytic determinant of plasmid pHly152. Two DNA motifs, located in IS91 incomplete elements 2, 4 and 5 are repeated in direct orientation flanking both ends of the *hly* genes (Figure 2C, Figure S1). These sequences are the targets for the deletions that generate the two different restriction patterns observed.

### Kanamycin accounts for the generation of Hly<sup>-</sup> clones

The fact that Hly<sup>-</sup> clones are only detected when MG1655HY (pANN202-312R) cells are grown in LB medium containing km could be interpreted as either the presence of km in the culture directly accounts for the generation of non-hemolytic derivatives, or it just selects preexisting Hly<sup>-</sup> clones because of their higher fitness in the presence of the antibiotic. To discern among these two possibilities, a fluctuation test was performed [28] (Figure 3). The mean and variance in the percentage of Hly<sup>-</sup> clones on the blood agar plates was similar for replicates taken from a single secondary culture and for individual samples taken from different secondary cultures (10). Hence, the fluctuations observed were due to random sampling only, and not to the selection of a preexisting population of Hly<sup>-</sup> clones. If this latter hypothesis should have been the case, significant fluctuations in the percentage of Hly<sup>-</sup> clones in the ten independent cultures should have been observed, with a consequently drastic increase in the variance when compared to that of replicates from the same secondary culture. The fluctuation test clearly indicates that the presence of the antibiotic in the culture medium is the underlying cause of deletion of the *hly* operon and does not account for the selection of preexisting spontaneous deletions.

### The role of RecA, RpoS and the SOS response in generating Hly<sup>-</sup> clones in the strain MG1655HY (pANN202-312R)

We tested the dependence of the deletions leading to the Hly<sup>-</sup> phenotype on the RecA protein. A *recA* mutant of strain MG1655HY was constructed by following the Datsenko&Wanner protocol (see Materials and Methods). *recA* knockout was confirmed both by PCR and by evidencing that P1-mediated transduction of different markers from strain MG1655 was not possible (data not shown). The strain MG1655HY*recA* was transformed with the plasmid pANN202-312R and the transformants grown in LB medium with and without km. Growth of strain MG1655HY*recA* (pANN202-312R) was monitored and the proportion of Hly<sup>-</sup> clones was determined (Figure 4A). km



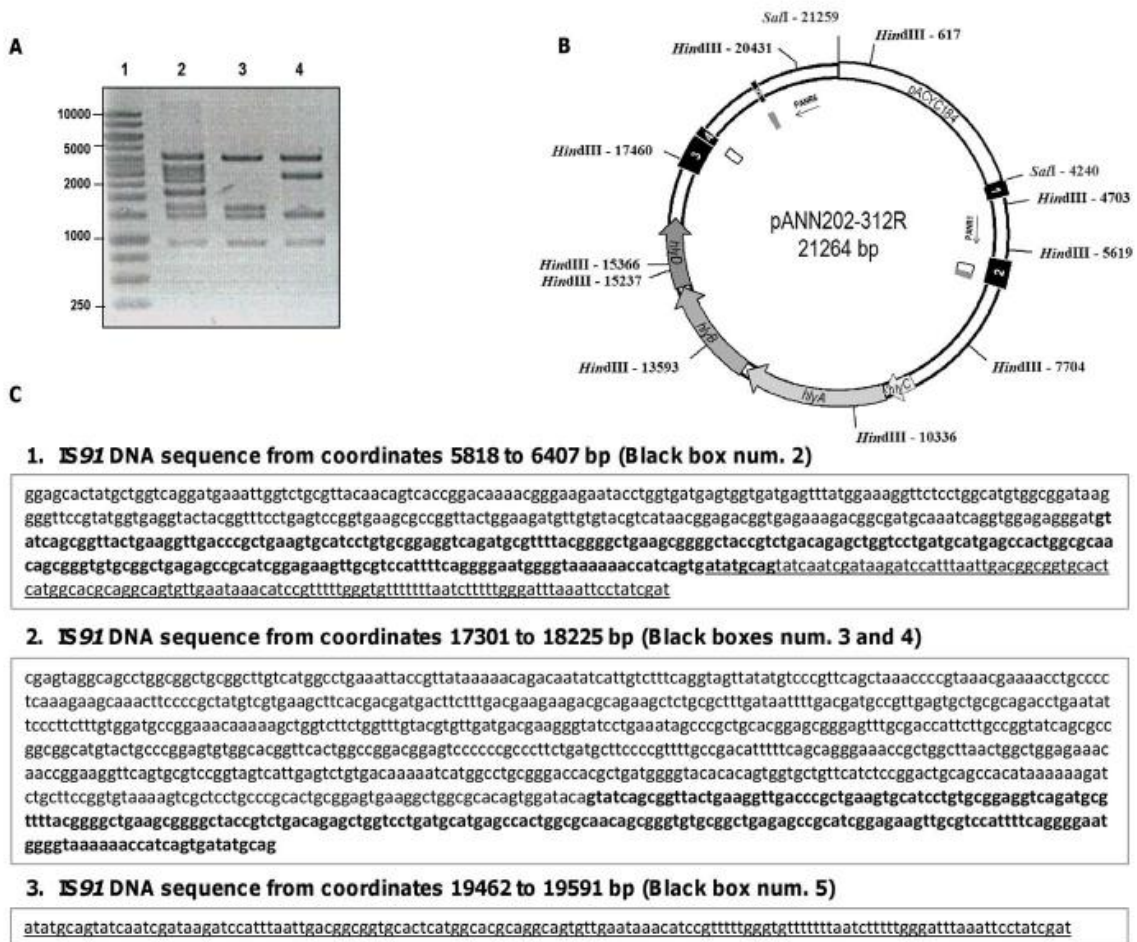
**Figure 1. Generation of non-hemolytic colonies from strain MG1655HY (pANN202-312R).** A. Growth curves of strain MG1655HY (pANN202-312R) in the absence (—■—) and presence (—●—) of km; B and C, proportion of hemolytic and non-hemolytic clones in both cultures at different stages of the growth curve. Insets show blood agar plates inoculated with cells collected from both cultures. doi:10.1371/journal.pone.0027606.g001

significantly affected the growth rate of strain MG1655HY *recA* (pANN202-312R) and Hly<sup>-</sup> derivatives could be isolated, but at a lower frequency than in the MG1655HY strain. Restriction analysis of plasmid DNA isolated from Hly<sup>-</sup> clones derived from the *recA* strain indicated the presence of the two types of deletions previously identified (see Figure 2A). Hence, RecA function appears to facilitate recombination processes between the homologous *IS91* sequences, but deletions can also occur in the absence of this protein.

RpoS has been shown as a requirement for stationary-phase mutation and DNA amplification [19]. We assessed if deletion of the *hly* operon required RpoS function. To test this, an *rpoS* deletion mutant from the strain MG1655HY was constructed and

the effect of km on the growth rate and generation of Hly<sup>-</sup> derivatives was studied. The growth rate of the strain MG1655HY *rpoS* (pANN202-312R) was also reduced by the presence of km, and Hly<sup>-</sup> clones harboring the previously characterized deletions were also detected (data not shown).

A well-characterized effect of several bactericidal antibiotics, including km, is the generation of highly deleterious hydroxyl radicals, which leads, among other responses, to the induction of the SOS response [29]. We decided to test if the SOS inducer mitomycin C might also account for the generation of Hly<sup>-</sup> clones in cultures of the strain MG1655HY (pANN202-312R) in LB medium containing cm. Mitomycin C altered the growth rate and Hly<sup>-</sup> derivatives could also be isolated (Figure 4B).



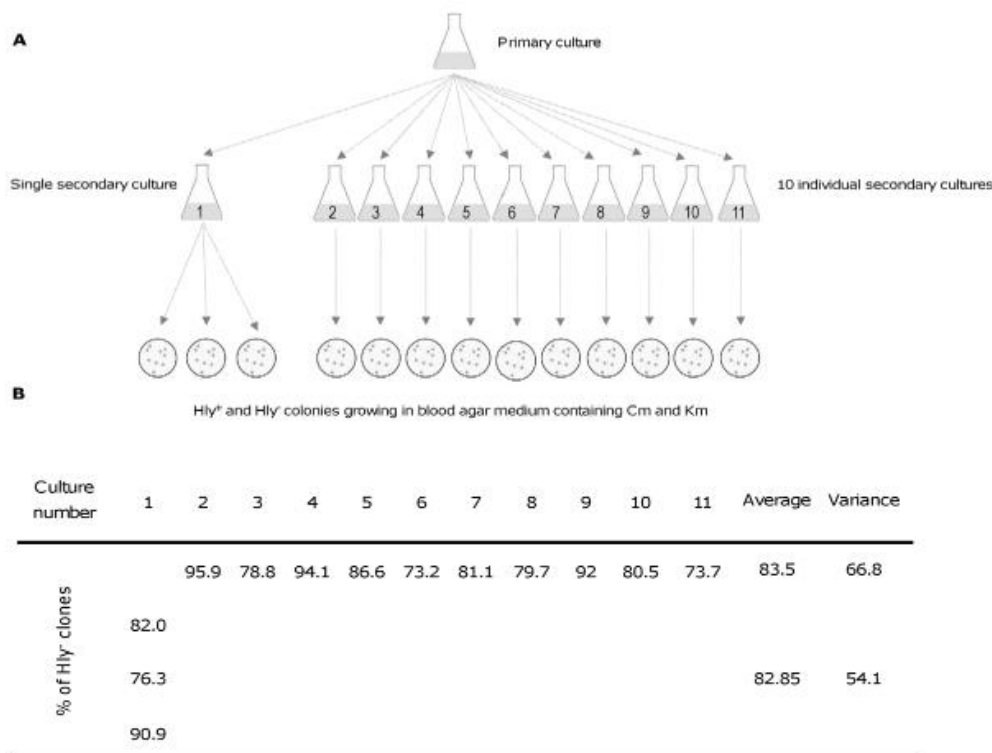
**Figure 2. Mapping of the IS91 directed repeats that generate the two deletion patterns observed.** A. HindIII restriction analysis of pANN202-312R plasmid DNA (lane 2) and plasmid DNA isolated from two Hly<sup>-</sup> clones exhibiting the two different deletion patterns identified (lanes 3 and 4, deletions 1 and 2 respectively). Lane 1 corresponds to the molecular mass marker. B. Physical map of plasmid pANN202-312R. HindIII and Sall restriction sites and their corresponding coordinates are shown. Black boxes 1 to 5 correspond to the five partial IS91 sequences that flank the hly genes. Internal grey boxes correspond to IS91 direct repeats generating deletion 1. Internal white boxes correspond to IS91 direct repeats generating deletion 2. C. DNA sequences of both IS91 direct repeats that flank the deletions. Box 1 shows the DNA sequence corresponding to IS91-2 from coordinates 5818 to 6407. The direct repeat generating deletion 1 is shown underlined. The direct repeat generating deletion 2 is shown in bold. Box 2 corresponds to the DNA sequences of IS91-3 and 4. The direct repeat generating deletion 2 is shown in bold. Box 3 corresponds to the DNA sequence of IS91-5. The direct repeat generating deletion 1 is shown underlined.  
doi:10.1371/journal.pone.0027606.g002

**A combination of a high kanamycin concentration (25 mg/l) and a high-level of hemolysin production are required to generate non-hemolytic derivatives from the strain MG1655HY**

To gain insight into the mechanism underlying km-dependent deletion of the hemolytic determinant of plasmid pANN202-312R, we tested if the concentration of km in the culture medium influenced the generation of Hly<sup>-</sup> clones. Strain MG1655HY (pANN202-312R) was grown in LB medium with cm (50 mg/l) and different concentrations of km (0, 12.5 and 25 mg/l). Growth and generation of Hly<sup>-</sup> clones were monitored (Figure 5A). Remarkably, when the km concentration was reduced to

12.5 mg/l the growth rate was similar to that obtained in LB medium and the generation of Hly<sup>-</sup> clones was no longer observed.

Next we studied if the copy number of the hly operon would influence the sensitivity to 25 mg/l of km and the generation of Hly<sup>-</sup> derivatives. Strain MG1655HY harboring the parental low-copy number plasmid pHly152 was grown in LB medium containing no km and LB medium supplemented with 25 mg/l of km (Figure 5B). When growing in the presence of a km concentration of 25 mg/l, no Hly<sup>-</sup> derivatives were obtained from strain MG1655HY (pHly152). Hence, if hemolysin production is decreased by reducing the copy number of the hemolytic plasmid, no Hly<sup>-</sup> derivatives are obtained in LB medium containing 25 mg/l of km.



**Figure 3. Fluctuation test.** A. Shows the protocol used. The test was designed to determine if Hly<sup>+</sup> clones arose prior to exposure to km or specifically in response to exposure. A primary culture of strain MG1655HY (pANN202-312R) was grown in LB medium containing cm but lacking km. Eleven secondary cultures were performed by transferring small amounts of the primary culture (final cell concentration in the secondary culture, 10<sup>3</sup> cells/ml) into the same culture medium. These cultures underwent many rounds of cell division. From one of the cultures, three replicate subsamples were plated on blood agar plates containing cm and km. From the rest of the cultures, a single sample was plated onto identical plates. B. The percentage of Hly<sup>+</sup> clones in the different viable counts on blood agar medium containing cm and km. doi:10.1371/journal.pone.0027606.g003

We also determined if plasmids pHly152 or pANN202-312R would modify the sensitivity to km of strain MG1655HY. The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined. When comparing the km sensitivity of strains MG1655HY and MG1655HY (pHly152) no significant differences were observed. The presence of the plasmid did not alter the MIC value (data not shown). However, the km MIC was determined for the strains MG1655HY, MG1655HY (pANN202-312R) and MG1655HY (pANN202-312R' ( $\Delta hly$ )), and a very important reduction (10 fold) in the MIC was observed when the strain carries the plasmid pANN202-312R (1000  $\mu$ g/ml versus 100  $\mu$ g/ml). Nevertheless, cells harboring plasmid pANN202-312R' exhibited a km MIC similar to that of plasmid-free cells.

Taking into account that km (25 mg/l) influences the growth rate of strain MG1655HY (pANN202-312R), we decided to rule out that the generation of Hly<sup>+</sup> clones is a consequence of an alteration in the growth rate. Strain MG1655HY (pANN202-312R) was grown in LB medium containing cm (50 mg/l) and no km, at 37, 30 and at 25°C. Growth at 25°C resulted in a significant reduction in the growth rate (Figure 5C) but no Hly<sup>+</sup> derivatives could be observed in the absence of km.

The above reported results suggest that generation of Hly<sup>+</sup> derivatives takes place in the hemolysin overproducing strain MG1655HY (pANN202-312R) when it grows in medium

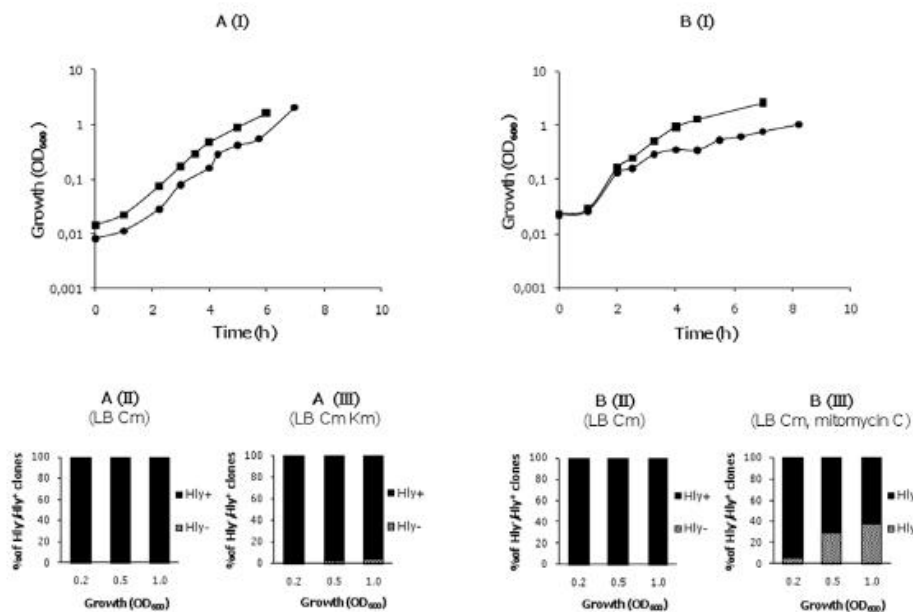
containing a km concentration of at least 25 mg/l. Whereas that km concentration is not bactericidal for these cells (km MIC is 100 mg/l), it causes significant effects on the growth rate and also accounts for the generation of Hly<sup>+</sup> derivatives.

**Subinhibitory concentrations of km and other antibiotics result in the deletion of the hemolysin operon in the wild-type MG1655 (pHly152) strain**

The biochemical basis underlying the generation of Hly<sup>+</sup> derivatives in MG1655HY (pANN202-312R) cells growing in medium containing 25 mg/l of km remains to be determined. Nevertheless, the studies described above suggest that 25 mg/l of km is subinhibitory in the strain MG1655HY (pANN202-312R). Growth in the presence of 12.5 mg/l km results both in a significant increase in the growth rate and in the absence of Hly<sup>+</sup> clones. A feasible explanation for the high sensitivity to km showed by the strain MG1655HY (pANN202-312R) relies on the fact that the ATP-demanding process of producing such high levels of hemolysin would render cells inefficient in completely phosphorylating (inactivating) km at this concentration.

Assuming as correct the hypothesis that a km concentration of 25 mg/l is subinhibitory for strain MG1655HY (pANN202-312R) and that this results in the stress-induced deletion of the *hly*

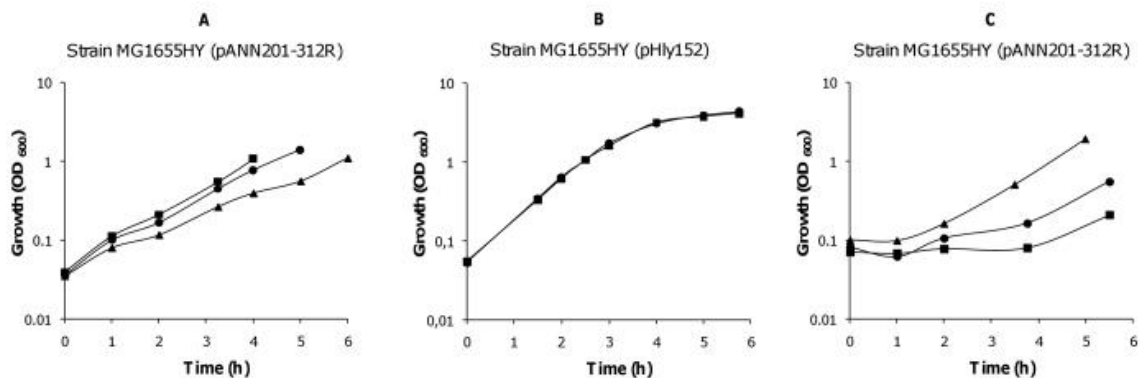




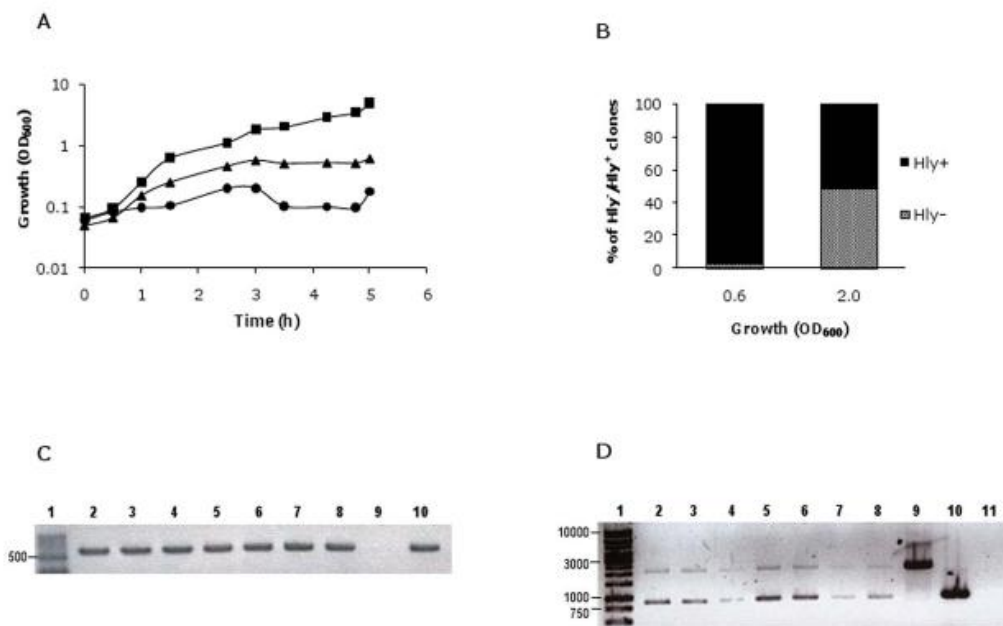
**Figure 4. RecA protein and the SOS system play a role in the generation of Hly<sup>+</sup> derivatives.** A. I. Growth curves of the strain MG1655HYrecA (pANN202-312R) in the absence (—■—) and presence (—●—) of km; II and III, the proportion of hemolytic and non-hemolytic clones in both cultures at different stages of the growth curve. B. I. Growth curves of the strain MG1655HY (pANN202-312R) in the absence (—■—) and presence (—●—) of mitomycin C. II and III, the proportion of hemolytic and non-hemolytic clones in both cultures at different stages of the growth curve. doi:10.1371/journal.pone.0027606.g004

sequences, it should be expected that the deletion of the *hly* operon could be also detected by growing the wt strain MG1655 harboring the parental low-copy number hemolytic plasmid pHly152 in the presence of km concentrations that result inhibitory for an *E. coli* strain lacking a km<sup>R</sup> determinant. To assess this, the strain MG1655 (pHly152) was grown in LB medium containing 0, 1, 2, 5 and 10 mg/l of km (Figure 6A). A km concentration of 5 mg/l was the highest antibiotic concentration that allowed cells to grow. Thus, cells growing in liquid LB

medium containing 5 mg/l of km were plated on blood agar at different stages of the growth curve. Several non-hemolytic colonies could be detected (48% at an OD<sub>600</sub> of 2.0, Figure 6B). The Hly<sup>-</sup> phenotype could be due either to plasmid curing or to the deletion of *hly* sequences. To distinguish between these cases, a PCR analysis of several of the Hly<sup>-</sup> clones was performed using the primers PANR8 and NBM18 (Table 1, Figure 6C). The presence of the hemolytic plasmid was observed in several independent experiments. To determine which deletion of the *hly* sequences



**Figure 5. Effect of km concentration, copy number of the hemolytic plasmid and growth temperature on growth rate and generation of Hly<sup>+</sup> clones.** A. Growth curves of the strain MG1655HY (pANN201-312R) in LB medium containing either no km (—■—), 12.5 mg/l km (—●—) or 25 mg/l km (—▲—). B. Growth curves of the strain MG1655HY (pHly152) in LB medium containing either no km (—■—) or 25 mg/l km (—●—). C. Growth curves of strain MG1655HY (pANN201-312R) in LB medium at 25 (—■—), 30 (—●—) or 37°C (—▲—). Hly<sup>+</sup> derivatives were only detected in the culture of strain MG1655HY (pANN202-312R) grown in LB medium containing 25 mg/l km. doi:10.1371/journal.pone.0027606.g005



**Figure 6. Subinhibitory km concentrations result in deletion of Hly sequences in strain MG1655 (pHly152).** A. Growth curves of strain MG1655 (pHly152) in LB medium containing no km (—■—), 5 (—▲—) and 10 (—●—) mg/l of km. B. The percentage of Hly<sup>+</sup> clones in the culture grown in LB km (5 mg/l). C. PCR analysis using primers PANR8 and NBM18 to confirm the presence of pHly152 in seven Hly<sup>-</sup> clones (lanes 2 to 8). Lane 1, molecular mass marker. Lane 9, negative control (strain MG1655). Lane 10, positive control (strain MG1655 (pHly152)). D. PCR analysis to confirm deletions 1 and 2 in the Hly<sup>-</sup> clones. Primers used were PANR1 and PANR6, and the fragments amplified were of 875 bp and 2126 bp for the deletions 1 and 2 respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0027606.g006

had taken place, different Hly<sup>-</sup> clones were tested with primer pairs PANR1 and PANR6 (Table 1, Figure 2B). It was observed that both previously described types of deletion occurred, even within the same colony (Figure 6D). These results verify that subinhibitory km concentrations significantly increase the deletion rate of the *hly* operon of the plasmid pHly152.

Finally, the effect of subinhibitory concentrations of other antibiotics such as ampicillin (ap) was also tested. In this case the maximal antibiotic concentration allowing MG1655 (pHly152) cells to grow was of 10 mg/l. Again, Hly<sup>-</sup> clones could readily be detected when cells were grown in LB ap (10 mg/l) medium, and those harboring the plasmid pHly152 exhibited the previously characterized deletions of the *hly* genes (Figure 7).

## Discussion

Several studies about the effect of antibiotics on bacterial cells have been performed using antibiotic concentrations known to either kill or inhibit the growth of their target cells. The knowledge of the effect on bacteria of subinhibitory antibiotic concentrations has been significantly enhanced in the last years (as reviewed by Davies *et al.* [30] and Couce and Blazquez [31]). Among other effects, exposure to subinhibitory concentrations of antibiotics leads to increased mutagenesis rates [31,32], alterations in the global transcriptional pattern [33,34], lateral gene transfer [35] and intrachromosomal recombination [36,37]. In this report we provide experimental data that further support the relationship between antibiotics and bacterial genetic variability. Our interest in studying an unexpected observation led us to demonstrate that

exposure to subinhibitory concentrations of antibiotics may result in genomic rearrangements that significantly modify the bacterial phenotype. As stated by Shapiro [38], serendipity has led to a more complete view of the capacity that the bacterial cells exhibit for restructuring their genomes in response to several stimuli.

IS91 was first characterized in  $\alpha$ -hemolytic plasmids of *E. coli* [6,39]. Presently IS91 is the prototype of an expanding family of insertion elements (the ISCR elements, [40]) that have been found adjacent to both virulence determinants ([7], [12], [13], [41]) and antibiotic resistance genes [40]. Remarkably, the ISCR family is widespread among bacteria, but IS91 elements are mainly restricted to *E. coli* and *Shigella* strains. In both *E. coli* and *Shigella* IS91 has previously been associated to genetic rearrangements. The presence of either complete or partial IS91 sequences flanking the genes encoding heat-labile enterotoxins (*eltAB*) of enterotoxigenic *E. coli* strains resulted, among other effects, in spontaneous transpositions of the *eltAB* genes to the target plasmid pSU2600 [41]. In *S. flexneri* strain 2a, recombination between two flanking IS91 elements underlies one of the three mechanisms that result in deletion of the SLR pathogenicity island [21]. Our results are in accordance with these data. Remarkably, the 17,010 bp *SaI*/*SaI* DNA fragment that includes the Hly operon of plasmid pHly152 cloned in pACYC184 contains only incomplete IS91 copies and, in fact, some of these sequences, flanking the *hly* operon in a directed repeat orientation, are responsible for the recombinational events that lead to the deletion of two different DNA fragments. In some circumstances, RecA-dependent homologous recombination may be the mechanism underlying deletion of the *hly* genes (e.g. when the SOS system is induced), but RecA-

**Table 1.** Oligonucleotides used in this study.

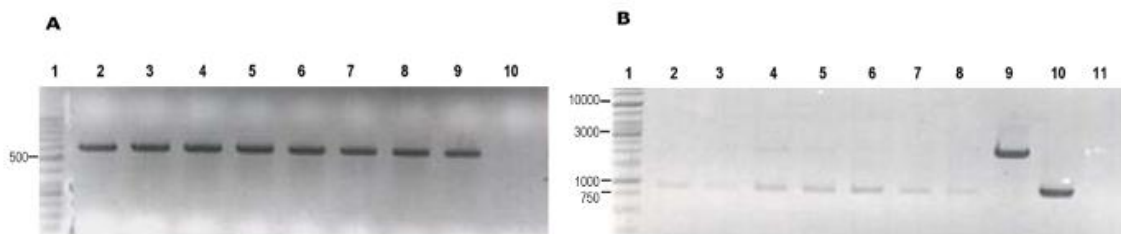
Name	Sequence (5' 3')	Purpose
PANR8	TCTGCGTGGAAAGTATGAGC	To determine the presence/absence of pHly152
NBM18	CCATGCTGATGTGGCGCTTA	
PANR1	GATGATGCCACAAAATGGAT	To determine which recombination took place
PANR6	TTCCTGACACAGAACCCTAA	
NBM1	ACTCAGGAAACCGTAGTACCT	To sequence pANN202-312R
NBM3	GTAAGCCGCGGAGGACAACG	
NBM4	GAAGCCAAGTCAACAACAG	
NBM5	GCTGCTTCTTCAACTGCCA	
NBM6	GGATTGCGACCGGAAACCC	
NBM8	GATGCTTCCCGTTTGGCCG	
NBM12	TATGACGCCACCCCTACCAGT	
NBM14	CATTGCCATTGAAGCGGAGC	
RECAH1	CAGAACATATTGACTATCCGGTATTACCCGGCATGACAGGAGTAAAAATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	To construct <i>recA</i> mutants
RECAH2	ATGCGACCTGTGTACAAACAAGACGATTAATAATTCGTTAGTTCCATATGAATATCCTCCTTAGT	
RECAUP	CTTGTGGCAACAATTTCTACA	To check for <i>recA</i> mutation
RECADOWN	TCATGGCATATCCTTACAACCT	
RPOSUP	TGCCGACGCGATAAATCG	To check for <i>rpoS</i> mutation
RPOSDOWN	CGGACCTTTTATTGTGCACAG	

doi:10.1371/journal.pone.0027606.t001

independent recombination also takes place. RecA-independent IS91-mediated genetic rearrangements were also described for the *eltAB* genes of enterotoxigenic *E. coli* strains [41]. The mechanism that accounts for the deletion of the *hly* operon from plasmid pHly152 is necessarily independent of the IS91 TnpA transposase, since no complete copies of the *tnpA* gene are present either in the plasmid pANN202-312R or in the chromosome of the *E. coli* strain MG1655 (our unpublished results). We hypothesized that ORF121, the second and yet uncharacterized ORF encoded by IS91, which is present in one of the partial IS91 copies of the plasmid pANN202-312R, might play a role in these recombinational processes. However, deletion of that sequence did not influence loss of the hemolysin operon in the strain MG1655HY (pANN202-312R) (our unpublished results). Replication is a key process involved in RecA-independent instability of repetitive DNA sequences [42]. Hence, antibiotic-mediated alterations in

DNA replication might account for deletion of the *hly* sequences in the absence of RecA.

Genomic analysis data reveal that IS91 is predominantly present in plasmids isolated from enterohemorrhagic *E. coli* strains (serotypes O111, O26 and O157), or in the chromosome and/or plasmids from *Shigella* isolates (our unpublished results). Interestingly, the six IS91 copies present in the chromosome of the *S. flexneri* strain 2457T cluster together and flank several virulence determinants [43]. Local hopping was proposed to explain the clustering pattern of these determinants. Nevertheless, if these IS91 elements can under certain circumstances be responsible for genomic rearrangements, then their random distribution in the *Shigella* chromosome would in many cases result in lethality. The fact that IS91 flanked virulence determinants are restricted to certain *E. coli/ Shigella* strains may indicate that these strains display highly variable pathogenic phenotypes. Therefore, strains that do



**Figure 7. Deletion of the *hly* operon in strain MG1655 (pHly152) growing with a subinhibitory ampicillin concentration.** Analysis of seven Hly<sup>+</sup> clones isolated from strain MG1655 (pHly152) grown in LB medium containing ap (10 mg/l). A. PCR analysis using primers PANR8 and NBM18 to confirm the presence of pHly152. B. PCR analysis to confirm deletions 1 and 2 in the Hly<sup>+</sup> clones. Primers used were PANR1 and PANR6, and the fragments amplified were of 875 bp and 2126 bp for the deletions 1 and 2 respectively.  
doi:10.1371/journal.pone.0027606.g007

not incorporate IS91-like elements prevent genomic instability due to the presence of these elements in their genomes.

Several antibiotics such as trimethoprim, quinolones and  $\beta$ -lactams induce the SOS response [44]. It has recently been shown that induction of the SOS response can lead to integrons recombination and the expression of antibiotic resistance determinants in *E. coli* and *Vibrio cholerae* [44]. In *Staphylococcus aureus*, induction of the SOS response leads to dissemination of pathogenicity islands that are packaged in bacteriophages [45]. In this paper we present further evidence demonstrating that induction of the SOS response underlies the excision of a virulence determinant in *E. coli*. Hence, factors resulting in SOS induction (among them, several antibiotics) may also account for different types of genomic rearrangements in bacteria.

It is likely that bacteria in natural environments encounter subinhibitory concentrations of antibiotics more often than inhibitory concentrations. Moreover, clinical situations where bacteria may be exposed to low levels of antibiotics can occur due to several reasons (e.g. incomplete antibiotic treatment of an infection or the differential pharmacological response of certain tissues to antibiotics). In the case of the *E. coli/Shigella* pathogenic strains that harbor virulence determinants flanked by IS91 elements, exposure to low levels of antibiotics may result in genetic rearrangements and the deletion of IS91-flanked determinants. Whereas some changes might be deleterious, others may confer new phenotypes that potentiate their virulence in specific niches, hence increasing their invasiveness. Therefore, non-compliance with or incomplete antibiotic treatments should be avoided. Furthermore, a better understanding of the mechanisms underlying IS91-mediated deletion of virulence determinants in response to antibiotic exposure may help to better define additional targets for antimicrobial therapy.

## Materials and Methods

### Bacterial strains, plasmids, and media

The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 2. The plasmid pANN202-312R carries the *hlyCABD* gene cluster from the low-copy-number hemolytic plasmid pHly152, and was previously described by Godessart *et al.* [27]. *E. coli* strains were grown on Luria-Bertani (LB) medium (10 g NaCl, 10 g tryptone and 5 g yeast extract per liter) at 37°C under aerobic conditions. Blood agar was LB medium supplemented with a 5%

of sheep blood defibrinated (Oxoid). In the growth medium the following antibiotics were used: chloramphenicol (cm), 50  $\mu$ g/ml; kanamycin (km), 25  $\mu$ g/ml (unless otherwise stated) and ampicillin (ap), 10  $\mu$ g/ml. To study generation of Hly<sup>+</sup> derivatives from strain MG1655HY as well as from its *recA* and *rpoS* derivatives, the corresponding strain was transformed first with plasmid pANN202-312R. Transformant colonies were selected in blood agar containing cm. Single colonies were used to inoculate LB-cm cultures that were grown overnight and used to inoculate (1:100) erlenmeyer flasks containing LB cm and LB cm km. Five independent colonies from five independent transformation experiments were studied.

### Molecular techniques

Plasmid DNA preparations were carried out from 5 ml of overnight cultures according to the Qiagen kit protocol. Restriction analysis of the plasmid pANN202-312R isolated from hemolytic and non-hemolytic colonies was performed by standard techniques. PCR amplifications of the plasmid pHly152 were performed with a MJ Mini Gradient Thermal Cycler (BioRad®) using the oligonucleotides PANR1-PANR6 and PANR8-NBM18 (listed in table 1) at a T<sub>m</sub> of 58 and 56°C respectively.

### DNA sequencing

Sequencing was performed with the ABI PRISM Big Dye II Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) in an ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. The sequencing primers used are listed in Table 1.

### Genetic manipulations

P1vir mediated transduction was performed as previously described (Miller, [46]) to construct MG1655*hha ydgT* (HY) using lysates obtained from the strains BSN26*hha* [47] and BSN26*ydgT* [25]. An MG1655HY*rpoS* mutant was obtained by P1vir transduction using a lysate from the RH90 strain [48]. The P1vir mediated transduction was also used to check the *recA* deletion. A *recA* deletion mutant was obtained by one-step inactivation using PCR products, as previously described [49]. We used the sequence of the *recA* gene to define the corresponding amplification primers. The antibiotic resistance of the plasmid pKD3 (cm) was amplified using primers RECAH1 and RECAH2

**Table 2.** Strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Description	Source or reference
<b><i>E. coli</i> K-12 laboratory strains:</b>		
MG1655	F- lambda- <i>ilvG- rfb-50 rph-1</i>	[50]
BSN26H	MC4100 <i>trp::Tn10 hha::Tn5</i>	[47]
BSN26Y	MC4100 <i>trp::Tn10 ΔydgT</i>	[25]
MG1655HY	F- lambda- <i>ilvG- rfb-50 rph-1 hha ydgT</i>	This work
MG1655HYΔ <i>recA</i>	F- lambda- <i>ilvG- rfb-50 rph-1 hha ydgT recA</i>	This work
MG1655HYΔ <i>rpoS</i>	F- lambda- <i>ilvG- rfb-50 rph-1 hha ydgT rpoS</i>	This work
RH90	MC4100, <i>rpoS359::Tn10, Tc<sup>R</sup></i>	[48]
<b>Plasmids:</b>		
pHly152	<i>hlyR hlyCABD</i>	[51]
pANN202-321R	<i>hlyR hlyCABD</i> cloned in pACYC184, cm <sup>r</sup>	[27]
pANN202-321R'	pANN202-321R Δ <i>hly</i>	This work

doi:10.1371/journal.pone.0027606.t002

(Table 1), corresponding to sequences P1 and P2 of plasmid pKD3, with homology extensions corresponding to nucleotides 2821789-2821833, and 2820701-2820752 of the complete genome of *E. coli* K-12 MG1655 (NC\_000913). The PCR product was *DpnI* digested, purified and used to electroporate strain MG1655HY carrying the plasmid pKD46 grown at 30°C in the presence of arabinose 10 mM, conditions where the expression of Red recombinase was induced. Recombinants were selected at 37°C in LB medium containing chloramphenicol (cm) and then tested for the presence of pKD46. All the recombinants obtained were checked with RECAUP and RECADOWN primers (Table 1) and only one was found correct. We termed this mutant MG1655HY*recA*.

**Determination of hemolysin production**

Strains carrying hemolytic plasmids (pANN202-312R or pHly152) were grown in presence and in absence of the antibiotic km. We checked hemolysin production by visualizing hemolysin haloes on blood agar plates.

**Fluctuation test (Luria-Delbrück experiment)**

An overnight culture of the strain MG1655HY (pANN202-312R) was used to inoculate eleven erlenmeyer flasks containing

20 ml of LB cm medium (final cell concentration after inoculation, 10<sup>3</sup> cells/ml). Cultures were incubated at 37°C to a final OD<sub>600</sub> = 1. Serial dilutions were then made. From one of the subcultures, three independent serial dilutions were made. From the other ten cultures only one serial dilution was made. Appropriate dilutions were then plated on blood agar containing cm and km and the proportion of Hly<sup>+</sup> clones was determined.

**Supporting Information**

**Figure S1 Location within the complete IS91 sequence of the five partial IS91 sequences present in plasmids pANN202-312R and pHly152.**

(TIF)

**Author Contributions**

Conceived and designed the experiments: AJ CB CM. Performed the experiments: LP RB SA CB CM. Analyzed the data: AJ CB CM. Contributed reagents/materials/analysis tools: LP RB. Wrote the paper: AJ.

**References**

1. Blum G, Ott M, Lischewski A, Ritter A, Imrich H, et al. (1994) Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect Immun* 62: 606-614.
2. Hacker J, Blum-Oehler G, Muhldorfer I, Tschape H (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* 23: 1089-1097.
3. Dozois CM, Curtiss III R (1999) Pathogenic diversity of *Escherichia coli* and the emergence of "exotic" islands in the gene stream. *Vet Res* 30: 157-179.
4. Hacker J, Kaper JB (1999) The concept of pathogenicity islands. In: Kaper JB, Hacker J, eds. Pathogenicity islands and other mobile virulence elements. WashingtonDC: American Society for Microbiology.
5. Fetherston JD, Schuetz P, Perry RD (1992) Loss of the pigmentation phenotype in *Yersinia pestis* is due to the spontaneous deletion of 102 kb of chromosomal DNA which is flanked by a repetitive element. *Mol Microbiol* 6: 2693-2704.
6. Zabala JC, de la Cruz F, Ortiz JM (1982) Several copies of the same insertion sequence are present in alpha-hemolytic plasmids belonging to four different incompatibility groups. *J Bacteriol* 151: 472-476.
7. Garcillan-Barcia MP, de la Cruz F (2002) Distribution of IS91 family insertion sequences in bacterial genomes: evolutionary implications. *FEMS Microbiol Ecol* 42: 303-313.
8. Garcillan-Barcia MP, Bernales I, Mendiola MV, de la Cruz F (2002) IS91 rolling-circle transposition. In: Craig NL, Craigie R, Gellert Mand, Lambowitz AM, eds. Mobile DNA II ASM Press WashingtonDC: American Society for Microbiology.
9. Hacker J, Knapp S, Goebel W (1983) Spontaneous deletions and flanking regions of the chromosomally inherited hemolysin determinant of an *Escherichia coli* O6 strain. *J Bacteriol* 154: 1145-1152.
10. Knapp S, Hacker J, Then I, Muller D, Goebel W (1984) Multiple copies of hemolysin genes and associated sequences in the chromosomes of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *J Bacteriol* 159: 1027-1033.
11. Diaz-Aroca E, de la Cruz F, Zabala JC, Ortiz JM (1984) Characterization of the new insertion sequence IS91 from an alpha-hemolytic plasmid of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 193: 493-499.
12. Burland V, Shao Y, Perna NT, Plunkett G, Sofia HJ, et al. (1998) The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Res* 26: 4196-4204.
13. Wolfe MK, de Haan LA, Cassels PJ, Willshaw GA, Warren R, et al. (1997) The CN6 colonization factor of human enterotoxigenic *Escherichia coli* contains two heterologous major subunits. *FEMS Microbiol Lett* 148: 35-42.
14. Bernales I, Mendiola MV, de la Cruz F (1999) Intramolecular transposition of insertion sequence IS91 results in second-site simple insertions. *Mol Microbiol* 33: 223-234.
15. Sharma UJ, Chatterji D (2010) Transcriptional switching in *Escherichia coli* during stress and starvation by modulation of sigma activity. *FEMS Microbiol Rev* 34: 646-657.
16. Baharoglu Z, Bikard D, Mazel D (2010) Conjugative DNA transfer induces the bacterial SOS response and promotes antibiotic resistance development through integron activation. *PLoS Genet* 6: e1001165.

17. Hastings PJ (2007) Adaptive amplification. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42: 271-283.
18. Hastings PJ, Bull HJ, Klump JR, Rosenberg SM (2000) Adaptive amplification: an inducible chromosomal instability mechanism. *Cell* 103: 723-731.
19. Lombardo MJ, Aponyi I, Rosenberg SM (2003) General stress response regulator RpoS in adaptive mutation and amplification in *Escherichia coli*. *Genetics* 166: 669-680.
20. Slack A, Thornton PC, Magner DB, Rosenberg SM, Hastings PJ (2007) On the mechanism of gene amplification induced under stress in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* 2: e48.
21. Turner SA, Luck SN, Sakellaris H, Rajakumar K, Adler B (2001) Nested deletions of the SRL Pathogenicity Island of *Shigella flexneri* 2a. *J Bacteriol* 183: 5535-5543.
22. Arnold DL, Jackson RW, Waterfield NR, Mansfield JW (2007) Evolution of microbial virulence: the benefits of stress. *Trends Genet* 23: 293-300.
23. Madrid C, Nieto JM, Payubi S, Falconi M, Gualerzi CO, et al. (2002) Temperature- and H-NS-dependent regulation of a plasmid-encoded virulence operon expressing *Escherichia coli* hemolysin. *J Bacteriol* 184: 5058-5066.
24. Madrid C, Balalobre C, Garcia J, Juárez A (2007) The novel Hha/YmoA family of nucleoid-associated proteins: use of structural mimicry to modulate the activity of the H-NS family of proteins. *Mol Microbiol* 63: 7-14.
25. Payubi S, Madrid C, Forn N, Nieto JM, Balalobre C, et al. (2004) YdgT, the Hha paralogue in *Escherichia coli*, forms heteromeric complexes with H-NS and StpA. *Mol Microbiol* 54: 251-263.
26. Vivero A, Baños RC, Mariscotti JF, Oliveros JC, Garcia-del Portillo F, et al. (2008) Modulation of horizontally acquired genes by the Hha-YdgT proteins in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 190: 1152-1156.
27. Godessart N, Munoa FJ, Regue M, Juárez A (1988) Chromosomal mutations that increase the production of a plasmid-encoded haemolysin in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 134: 2779-2787.
28. Luria SE, Delbrück M (1943) Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* 28: 491-511.
29. Kohanski MA, Dwyer DA, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ (2007) A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* 130: 797-810.
30. Davies J, Spiegelman GB, Yin G (2006) The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr Opin Microbiol* 9: 445-453.
31. Couce A, Blázquez J (2009) Side effects of antibiotics on genetic variability. *FEMS Microbiol Rev* 33: 531-538.
32. Kohanski MA, DePristo MA, Collins JJ (2010) Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol Cell* 37: 311-320.
33. Goh E, Yin G, Tsui W, McClure J, Surette MG, et al. (2002) Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 17025-17030.
34. Yin G, de la Cruz F, Spiegelman GB, Davies J (2006) Transcription modulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium promoters by Sub-MIC levels of rifampin. *J Bacteriol* 188: 7988-7991.
35. Beaber JW, Hochhut B, Waldor MK (2004) SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* 427: 72-74.

36. López E, Elez M, Matic I, Blázquez J (2007) Antibiotic-mediated recombination: ciprofloxacin stimulates SOS-independent recombination of divergent sequences in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 64: 83–93.
37. López E, Blázquez J (2009) Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on intrachromosomal homologous recombination in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 3411–3415.
38. Shapiro JA (2009) Letting *Escherichia coli* teach me about genome engineering. *Genetics* 183: 1205–1214.
39. Zabala JC, García-Lobo JM, Díaz-Aroca E, de la Cruz F, Ortiz JM (1984) *Escherichia coli* alpha-haemolysin synthesis and export genes are flanked by a direct repetition of IS91-like elements. *Mol Gen Genet* 197: 90–97.
40. Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR (2006) ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st Century? *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 296–316.
41. Schlor S, Reidl S, Blass J, Reidl J (2000) Genetic arrangements of the regions adjacent to genes encoding heat-labile enterotoxins (eltAB) of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* 66: 352–358.
42. Bzymek M, Lovett ST (2001) Instability of repetitive DNA sequences: The role of replication in multiple mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 8319–25.
43. Zaghoul L, Tang C, Chin HY, Bek EJ, Lan R, et al. (2007) The distribution of insertion sequences in the genome of *Shigella flexneri* strain 2457T. *FEMS Microbiol Lett* 277: 197–204.
44. Guerin E, Cambray G, Sanchez-Alberola N, Campoy S, Erill I, et al. (2009) The SOS Response controls integron recombination. *Science* 324: 1034.
45. Úbeda C, Maiques E, Knecht E, Lasa I, Novick RP, et al. (2005) Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci. *Mol Microbiol* 56: 836–844.
46. Miller JH (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 456 p.
47. Nieto JM, Madrid C, Prenaleta A, Miquelay E, Balsalobre C, et al. (2000) Expression of the hemolysin operon in *Escherichia coli* is modulated by a nucleoid-protein complex that includes the proteins Hha and H-NS. *Mol Gen Genet* 263: 349–358.
48. Hengge-Aronis R, Fischer D (1992) Identification and molecular analysis of *glgS*, a novel growth-phase-regulated and *rpoS*-dependent gene involved in glycogen synthesis in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 6: 1877–1886.
49. Datsenko KA, Wanner LB (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6640–6645.
50. Bachmann BJ (1987) Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12. In: Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Schaechter Mand, Umberger HE, eds. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. WashingtonDC: American Society for Microbiology.
51. Noegel A, Rdest U, Goebel W (1981) Determination of the functions of hemolytic plasmid pHly52 of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 145: 233–247.

