



**Ribonucleotidil Reductases de *Salmonella*
enterica serovar Typhimurium: Regulació
Transcripcional i Participació en la
Patogènesi**

ANAÏS PANOSA BORRÀS

2009



Departament de Genètica i de Microbiologia
Institut de Biotecnologia i de Biomedicina



Ribonucleotidil Reductases de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: Regulació Transcripcional i Participació en la Patogènesi

Tesi Doctoral presentada per
Anaïs Panosa Borràs
per optar al Grau de Doctora

Vist-i-plau dels Directors de la Tesi,

Dr. Isidre Gibert González

Dr. Ignasi Roca Subirà

Bellaterra, Febrer 2009

“La muntanya russa és la meva vida, la vida és un joc fort i al·lucinant, la vida és llançar-se en paracaigudes, és arriscar-se, caure’s i tornar-se a aixecar, és alpinisme, és voler pujar al capdamunt d’un mateix i sentir-se insatisfet i angoixat quan no s’aconsegueix.”

“A montanha-russa é a minha vida, a vida é um jogo forte e alucinante, a vida é lançar-se de páraquedas, é arriscar-se, cair e voltar a levantar-se, é alpinismo, é querer subir ao topo de si mesmo, e ficar insatisfeita e angustiada quando não se consegue.”

Onze minuts, (Onze minutos), Paulo Coelho

Per l'Edu, el meu refugi

Resum

Salmonella enterica serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) és un patògen intracel·lular facultatiu gram negatiu que provoca gastroenteritis en humans però que en ratolins provoca una infecció sistèmica similar a la febre tifoidea humana (provocada en aquest cas per *S. Typhi*). Una de les característiques principals de la infecció per *S. enterica* és la capacitat que presenta per envair activament cèl·lules epitelials i sobreviure i proliferar a l'interior dels macròfags.

S. Typhimurium presenta codificades en el seu genoma tres tipus de ribonucleotidil reductases (RNRs): classe Ia, Ib i III. Les RNRs són enzims essencials ja que són els responsables de la síntesi *de novo* dels desoxiribonucleòtids (dNTPs), necessaris per a la síntesi i reparació del DNA, a partir de la reducció dels ribonucleòtids (NTPs). Fins ara s'han descrit tres classes de RNRs que es diferencien en el mecanisme de generació del radical que utilitzen, l'estructura que presenten, la seva regulació al·lostèrica i la seva dependència de l'oxigen. Tot i així, totes tenen en comú el mecanisme de reacció i la utilització d'un radical lliure orgànic per a iniciar la catàlisi.

La regulació transcripcional de les RNRs és un dels camps més desconeguts dins l'estudi d'aquesta família de proteïnes. En *E. coli*, fins el moment s'hi han descrit reguladors transcripcionals sobretot de la classe Ia (Fis, DnaA) i més recentment de la classe III (FNR).

En aquest treball s'ha estudiat la regulació transcripcional de les tres classes de RNRs presents en *S. Typhimurium*, centrant-nos en dos reguladors: NrdR i Fur. S'ha estudiat l'efecte de la delecció de NrdR sobre l'expressió gènica de les tres classes de RNRs. NrdR és un repressor de les tres classes de RNRs i presenta un major efecte sobre l'expressió de l'operó *nrdHIEF*. També s'han descrit les seves caixes d'unió i s'han obtingut proteïnes mutants en determinats residus que afecten la funcionalitat de NrdR *in vivo*, possiblement degut a la participació d'aquests residus en la unió de dATP/ATP.

L'absència del regulador Fur provoca un augment de l'expressió de l'operó *nrdHIEF* de fins a cinc vegades respecte la soca salvatge. A la regió promotora de l'operó *nrdHIEF* hi hem detectat una possible caixa d'unió de Fur, la mutació de la qual provoca un augment en l'expressió similar a l'observat en la soca amb Fur deletat. Mitjançant assajos de retardament electroforètic hem confirmat la unió de Fur a la regió promotora de l'operó *nrdHIEF*.

En condicions de creixement estàndard de laboratori, *S. Typhimurium* utilitza la RNR de la classe Ia per a la síntesi *de novo* de desoxiribonucleòtids en presència d'oxigen. La classe Ia és essencial per al seu creixement i la classe Ib no és capaç de complementar-ne la seva mutació a no ser que se li introdueixi una còpia extra. La presència de dues RNRs amb activitats redundants en un mateix microorganisme, el fet que en altres espècies bacterianes la síntesi de desoxiribonucleòtids en

presència d'oxigen la dugui a terme la classe Ib, i que tant en *E. coli* com *S. Typhimurium* la classe Ib s'hagi conservat al llarg de l'evolució fa pensar que aquesta classe de RNR ha d'expressar-se en algunes condicions molt concretes de creixement.

En aquest treball s'ha estudiat la participació de les RNRs en la virulència de *S. Typhimurium* SL1344 mitjançant la construcció de mutants de cada una de les tres classes així com de dobles mutants i mutants en els seus reguladors (Fur, NrdR). Mitjançant assajos d'infecció de línies cel·lulars de macròfags i també de cèl·lules epitelials hem intentat esbrinar quina de les RNRs és la responsable del creixement de *S. Typhimurium* durant el procés d'infecció. Els resultats obtinguts indiquen que la RNR responsable de la invasió i de la proliferació a l'interior de macròfags és la classe Ia, mentre que les classes Ib i III no semblen ser essencials. No obstant, si s'observa el comportament de la soca mutant en la classe Ia que presenta la classe Ib sobreexpressada durant les primeres hores d'infecció (2-6 h), aquesta sí que és capaç de sobreviure. Creiem que en aquesta etapa inicial de la infecció, quan es produeix l'*explosió respiratòria*, es generen unes condicions que activen l'expressió de l'operó *nrdHIEF*, possiblement la concentració de peròxid d'hidrogen és capaç d'inhibir l'activitat repressora de Fur. La gran demanda de dNTPs a causa del dany al DNA que s'està produint fa necessari un subministrament extra de dNTPs que aportarà la reductasa NrdEF.

Índex

ABREVIATURES	i
1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. <i>Salmonella</i> com a model d'estudis de patogènesi	1
1.1.1. Patogènesi de <i>Salmonella</i>	2
1.1.2. Factors de virulència	5
1.1.2.1. Factors de virulència relacionats amb la invasió	6
1.1.2.2. Factors de virulència relacionats amb la proliferació i la infecció sistèmica	7
1.1.3. Regulació gènica dels factors de virulència	9
1.1.3.1. Sistemes de dos components	9
1.1.3.2. Reguladors "adaptadors"	11
1.1.3.3. Altres mecanismes de regulació: Regulació global	12
1.2. Ribonucleotidil reductases	14
1.2.1. Classes de ribonucleotidil reductases	15
1.2.2. Regulació al·lostèrica de les RNRs	18
1.2.3. Regulació transcripcional de les RNRs	20
1.2.3.1. Classe Ia	20
1.2.3.2. Classe Ib	24
1.2.3.3. Classe II	28
1.2.3.4. Classe III	29
1.2.3.5. NrdR, regulador global	30
1.2.4. Distribució i evolució de les RNRs	31
1.2.5. El cas de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	38
2. OBJECTIUS	39
3. RESULTATS: PART I: ESTUDI DE LA REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL DE LES RIBONUCLEOTIDIL REDUCTASES DE <i>S. TYPHIMURIUM</i>	41
3.1. Breu introducció	41
3.2. Resultats	42

3.2.1. NrdR és un repressor de l'expressió dels operons <i>nrdAB</i> , <i>nrdHIEF</i> i <i>nrdDG</i> en <i>S. Typhimurium</i> LT2	42
3.2.2. Mutació de les caixes d'unió de NrdR	47
3.2.3. Mutació de l'ATP-cone de NrdR	53
3.2.4. Caracterització de la unió de ATP/dATP de NrdR	56
3.2.5. Purificació de NrdR i assajos de retardament electroforètic	56
3.2.6. Fur és un repressor de l'expressió de l'operó <i>nrdHIEF</i>	57
3.2.7. Mutació de la caixa d'unió de Fur	58
3.2.8. Purificació de la proteïna Fur	60
3.2.9. Unió de Fur al promotor de <i>nrdHIEF</i>	61
3.3. Discussió	63
4. RESULTATS: PART II: ESTUDI DE LA IMPLICACIÓ DE LES RIBONUCLEOTIDIL REDUCTASES EN LA PATOGÈNESI DE LA SOCA VIRULENTA <i>S. TYPHIMURIUM</i> SL1344	71
4.1. Breu introducció	71
4.2. Resultats	72
4.2.1. Obtenció de mutants de les diferents classes de RNRs de <i>S. Typhimurium</i> SL1344	72
4.2.2. Anàlisi fenotípic i de viabilitat del mutants de les RNRs	73
4.2.3. Estudi de la supervivència i proliferació dels mutants de les diferents classes de RNRs de <i>S. Typhimurium</i> SL1344 en macròfags	76
4.2.4. Estudi de la invasió i proliferació dels mutants de les diferents classes de RNRs de <i>S. Typhimurium</i> SL1344 en cèl·lules epitelials	84
4.3. Discussió	86
5. DISCUSSIÓ FINAL	93
6. CONCLUSIONS	97
7. MATERIALS I MÈTODES	99
7.1. Soques bacterianes, plasmidis i oligonucleòtids	99
7.1.1. Condicions de creixement i conservació de soques	99

7.1.2. Oligonucleòtids	99
7.2. Mètodes microbiològics	99
7.2.1. Medis de cultiu, antibiòtics i altres solucions	99
7.2.1.1. Medis de cultiu	99
7.2.1.2. Antibiòtics	100
7.2.1.3. Altres solucions	101
7.2.1.4. Càlcul de la concentració de cèl·lules viables	102
7.3. Mètodes genètics	102
7.3.1. Transformació	102
7.3.1.1. Preparació de cèl·lules competents per a la transformació amb CaCl ₂	102
7.3.1.2. Transformació	103
7.3.1.3. Preparació d'electrocompetents de <i>S. Typhimurium</i>	104
7.3.1.4. Electroporació de <i>S. Typhimurium</i>	105
7.3.2. Transducció de <i>S. Typhimurium</i> amb el bacteriòfag P22	105
7.3.2.1. Obtenció de lisats fàgics de P22	106
7.3.2.2. Titulat de lisats fàgics de P22	106
7.3.2.3. Transducció	107
7.3.2.4. Sensibilitat de <i>S. Typhimurium</i> al fag P22	108
7.3.3. Conjugació	111
7.3.3.1. Conjugació biparental	111
7.4. Mètodes de manipulació del DNA	112
7.4.1. Miniextracció de DNA plasmídic d' <i>E. coli</i>	112
7.4.2. Electroforesi de DNA en gels d'agarosa	115
7.4.3. Purificació de fragments de DNA de gels d'agarosa	117
7.4.4. Digestió del DNA amb enzims de restricció	118
7.4.5. Clonació en vectors plasmídics	118
7.4.5.1. Obtenció d'extrems roms	119
7.4.5.2. Desfosforilació	119
7.4.5.3. Lligació	120
7.4.6. Amplificació i seqüenciació de DNA	121
7.4.6.1. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	121
7.4.6.2. Seqüenciació	123
7.4.7. Marcatge amb DIG-ddUTP a l'extrem 3' de sondes mitjançant la transferasa terminal	124
7.4.8. Mutagènesi	125
7.4.8.1. Mutagènesi dirigida per <i>nested</i> PCR	125

7.4.8.2. Mutagènesi per productes de PCR (Mètode de Wanner & Datsenko)	126
7.4.9. Construcció de fusions transcripcionals amb el gen indicador <i>lacZ</i>	128
7.5. Mètodes de manipulació de proteïnes	129
7.5.1. Sobreproducció de proteïnes recombinants en <i>E. coli</i>	129
7.5.2. Purificació de proteïnes per cromatografia d'afinitat	130
7.5.2.1. Purificació de NrdR	130
7.5.2.2. Purificació de la proteïna Fur	133
7.5.3. Determinació de la concentració de proteïnes	135
7.5.4. Electroforesi de proteïnes	136
7.5.5. Western-blot	140
7.5.6. Gels de retardament electroforètic	143
7.5.6.1. NrdR	143
7.5.6.2. Fur	146
7.5.7. Assaig d'unió a ATP/dATP	147
7.6. Anàlisi de l'expressió gènica	148
7.6.1. Assaig de l'activitat de la β -galactosidasa	148
7.7. Mètodes de manipulació de cultius cel·lulars	150
7.7.1. Manteniment i manipulació de línies cel·lulars	150
7.7.1.1. Manteniment i línies cel·lulars	150
7.7.1.2. Congelació de línies cel·lulars	151
7.7.1.3. Descongelació de línies cel·lulars	151
7.8. Anàlisi de la virulència de <i>S. Typhimurium</i> SL1344	152
7.8.1. Assaig de supervivència i proliferació de <i>S. Typhimurium</i> SL1344 en macròfags de ratolí (<i>gentamicin protection assay</i>)	152
7.8.2. Assaig d'invasió de cèl·lules epitelials amb <i>S. Typhimurium</i> SL1344	153
8. BIBLIOGRAFIA	165
9. AGRAÏMENTS	185

Abreviatures

(d)ADP	(desoxi) Adenosina difosfat
(d)ATP	(desoxi) Adenosina trifosfat
(d)CDP	(desoxi) Citidina difosfat
(d)CTP	(desoxi) Citidina trifosfat
(d)GDP	(desoxi) Guanosina difosfat
(d)GTP	(desoxi) Guanosina trifosfat
(d)NDP	5'-(Desoxi) ribonucleòtid difosfat
(d)NTP	5'-(Desoxi) ribonucleòtid trifosfat
(d)TDP	(desoxi) Timidina difosfat
(d)TTP	(desoxi) Timidina trifosfat
A	Adenina
AdoCob	Adenosilcobalamina
ArcA	<i>Aerobic respiration control</i>
ASP	<i>Acid shock proteins</i> , Proteïnes del xoc àcid
ATR	<i>Acid tolerance response</i> , Resposta de tolerància a l'àcid
CFU	<i>Colony forming units</i> , Unitats formadores de colònia
C-term	Extrem carboxi-terminal
Da	Daltons
DIP	2,2'-Dipiridil
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , àcid desoxirribonucleic
dsDNA	<i>Double stranded DNA</i> , DNA de doble cadena
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> , Organització de les Nacions Unides per a l'Agricultura i l'Alimentació
FBS	<i>Foetal bovine serum</i> , sèrum fetal boví
Fis	<i>Factor for inversion stimulation</i>
FNR	<i>Fumarate and nitrate reduction</i>
Fur	<i>Ferric uptake regulator</i>
G	Guanina o Guanosina
Grx	Glutaredoxina
HU	Hidroxiurea
IFN- γ	Interferó γ
IHF	<i>Integration host factor</i>
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranòsid
KDa	Kilo dalton
LPS	Lipopolisacàrid
Lrp	<i>Leucine-responsive protein</i>

MCS	<i>Multiple cloning site</i> , lloc de clonatge múltiple
MLNs	Ganglis limfàtics mesentèrics
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> , Multiplicitat d'infecció
NAPs	<i>Nucleotide associated proteins</i> , Proteïnes associades al nucleòide
<i>nrd</i>	<i>Nucleotide reduction genes</i> , Gens de reducció de nucleòtids
NrdAB	Subunitats gran i petita de la RNR de la classe Ia
NrdDG	Subunitats gran i petita de la RNR de la classe III
NrdEF	Subunitats gran i petita de la RNR de la classe Ib
NrdJ	RNR de la classe II
NrdZ	RNR de la classe II en <i>M. tuberculosis</i>
N-term	Extrem amino-terminal
NTPs	Ribonucleòtids
OD	Densitat òptica
OMS	Organització Mundial de la Salut
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Reacció en cadena de la polimerasa
PFL	Piruvat format liasa
PFU	<i>Plaque forming units</i> , Unitats formadores de calves
PMN	Leucòcits polimorfonuclears
R1	Subunitat gran de la RNR de la classe I
R2	Subunitat petita de la RNR de la classe I
RBS	<i>Ribosome binding site</i> , Lloc d'unió del ribosoma
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , àcid ribonucleic
RNR	Ribonucleotidil Reductasa
ROI	<i>Reactive oxygen intermediate</i> , Intermediari d'oxigen reactiu
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> , Espècies reactives de l'oxigen
SAM	S-adenosilmetionina
SCV	<i>Salmonella-containing vacuole</i>
SDS-PAGE	SDS- polyacrilamide gel electrophoresis, Electroforesi en gel de SDS-poliacrilamida
SPI	<i>Salmonella pathogenicity island</i> , Illa de patogenicitat de <i>Salmonella</i>
sRNA	<i>Small RNA</i> , petit RNA
T	Timina o timidina
Trx	Tioredoxina
TTSS	<i>Type Three Secretion System</i> , Sistema de secreció de tipus III
U	Uracil o uridina
UDP	Uridina difosfat

Aminoàcids

Ala (A)	Alanina
Arg (R)	Arginina
Asn (N)	Asparagina
Asp (D)	Àcid aspàrtic
Cys (C)	Cisteïna
Gln (Q)	Glutamina
Glu (E)	Àcid glutàmic
Gly (G)	Glicina
His (H)	Histidina
Ile (I)	Isoleucina
Leu (L)	Leucina
Lys (K)	Lisina
Met (M)	Metionina
Phe (F)	Fenilalanina
Pro (P)	Prolina
Ser (S)	Serina
Thr (T)	Treonina
Trp (W)	Triptòfan
Tyr (Y)	Tirosina
Val (V)	Valina

1. Introducció

1.1. *Salmonella* com a model d'estudis de patogènesi

El gènere *Salmonella* spp. es troba dins la família *Enterobacteriaceae*. Està format per bacils gram negatius, no esporulats, anaeròbics facultatius, no fermentadors de la lactosa, i la majoria són mòbils amb flagel·lació peritrica. Són patògens intracel·lulars facultatius que poden causar malalties com la febre tifoïda o la gastroenteritis.

Actualment es considera que dins el gènere *Salmonella* spp. hi ha dues espècies: *Salmonella bongori* i *Salmonella enterica* (Tindall *et al.*, 2005). Aquesta última presenta sis subespècies, de les quals, la més important és *S. enterica* subsp. *enterica*. Fins a l'any 2004 s'han identificat un total de 2501 serotips diferents de *Salmonella* (OMS, 2005), molts d'ells afecten únicament als éssers humans mentre que n'hi ha d'altres que estan associats específicament a determinades espècies, una característica que sovint s'utilitza com a sistema de nomenclatura. Així doncs podem trobar per exemple *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin, que afecta al bestiar. Per tal de facilitar la nomenclatura es recomana emprar només el nom del serotip, és a dir, en aquest exemple seria: *S. Dublin*, o d'altres exemples com, *S. Choleraesuis* que afecta a porcs i *S. Typhi* que afecta a primats.

La febre tifoïda està causada per serotips que afecten exclusivament als éssers humans, com per exemple *S. enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*) i *S. enterica* serovar Paratyphi (*S. Paratyphi*). En canvi, la gastroenteritis està causada per serotips no tifoïdes, essent les dues espècies més importants *S. enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) i *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*). Aquesta última espècie però, quan infecta a ratolins dona lloc a una malaltia equivalent a la febre tifoïda humana, per aquest motiu es fa servir com a model d'estudis de febre tifoïda.

La febre tifoïda és una malaltia sistèmica severa del sistema reticuloendotelial que es caracteritza per febre alta, símptomes gastrointestinals (diarrea i dolor abdominal) sobretot en l'etapa inicial, i a vegades pot aparèixer una erupció característica a la pell. Representa un problema de salut pública a nivell mundial ja que es descriuen entre 16 i 33 milions de casos a l'any i provoca de 500.000 a 600.000 morts anuals (OMS, 2000). La malaltia es transmet quasi exclusivament a través d'aigua contaminada per femta i orina de pacients ja infectats o de persones portadores del bacteri, i es veu afavorida per les baixes condicions higièniques i sanitàries. L'aparició de la malaltia no té lloc fins al cap de 5-21 dies postinfecció. Independentment del tractament antibiòtic o dels factors de risc, la taxa de letalitat és de prop del 4%. Aproximadament, de 1-4% dels pacients continuen presentant *S. Typhi* en el seu tracte gastrointestinal i a la vesícula biliar, és a dir, es converteixen en portadors crònics (Monack *et al.*, 2004).

Introducció

La gastroenteritis causada per *Salmonella* és una de les malalties transmeses pels aliments més comuna. Cada any es declaren milions de casos a nivell mundial i provoca milers de morts. Segons la FAO (de l'anglès, *Food and Agriculture Organization*), des de 1980 la incidència de la salmonel·losi en humans ha oscil·lat entre els 3-14 casos per cada 100.000 habitants. La salmonel·losi en humans es pot adquirir generalment pel consum d'aliments contaminats d'origen animal (principalment carn, ous, i llet). L'aparició de la malaltia té lloc de 8 a 48 hores després de la ingestió, i es caracteritza per febre, dolor abdominal, diarrea, nàusees i de vegades vòmits. És una malaltia autolimitada que normalment desapareix al cap de 5-7 dies sense necessitat de tractament antibiòtic.

Salmonella enterica és un dels patògens bacterians més estudiats (Boyle *et al.*, 2007) ja que (1) té un impacte molt gran en la societat a causa de la seva elevada morbiditat i mortalitat a nivell mundial, (2) té un ampli espectre d'hoste però provoca malalties diferenciades, (3) és capaç d'establir infeccions persistents que serveixen com a reservori per a la seva transmissió, i (4) presenta cada cop més resistència als antibiòtics. Tots aquests motius han impulsat molts grups de recerca, que aprofiten el fet que per a *Salmonella* existeixen moltes eines de manipulació genètica i que hi ha disponibles models d'infecció *in vitro* (cultius cel·lulars) i models en petits animals, per a realitzar estudis d'interacció entre hoste-paràsit o per estudiar els mecanismes fonamentals de la patogènesi bacteriana. (Ohl and Miller, 2001).

1.1.1. Patogènesi de *Salmonella*

Una de les característiques més importants dels microorganismes és la seva ubiqüitat. No tan sols l'ésser humà està contínuament en contacte amb els microorganismes sinó que molts d'ells formen part de la seva microbiota normal, un fet que proporciona beneficis mutus. Així com molts d'aquests microorganismes són aparentment inofensius, en determinades condicions (per exemple en individus immunodeprimits), aquests poden deixar de ser-ho i poden iniciar un procés infecciós. D'altra banda, també hi ha microorganismes, els patògens, la supervivència dels quals depèn de la seva capacitat de causar cert grau de dany cel·lular en l'hoste.

És el cas de *Salmonella enterica* (*S. enterica*), un patògen que com s'ha comentat anteriorment es transmet per la via fecal-oral per mitjà de l'aigua o d'aliments contaminats. Al llarg de tot el procés d'infecció (**Fig. 1**), *S. enterica* haurà de fer front a tota una sèrie de barreres establertes per l'hoste per a defensar-se. El primer impediment se'l troba a l'estómac. Allà, *S. enterica* ha de sobreviure a un pH molt àcid. Aquí és on hi té un paper important la resposta ATR (de l'anglès, *acid tolerance response*) (Foster, 1995; Garcia-del Portillo *et al.*, 1993; Slauch *et al.*, 1997) que permet que pugui sobreviure a pH baix (pH de 3-4) si prèviament s'ha adaptat a pHs mitjans (pH de 5,5-6). La

resposta ATR activa molts enzims essencials que proporcionen protecció davant de danys físics, com ara el xoc tèrmic, l'estrès osmòtic i l'estrès oxidatiu (Bearson *et al.*, 1998; Foster, 1999).

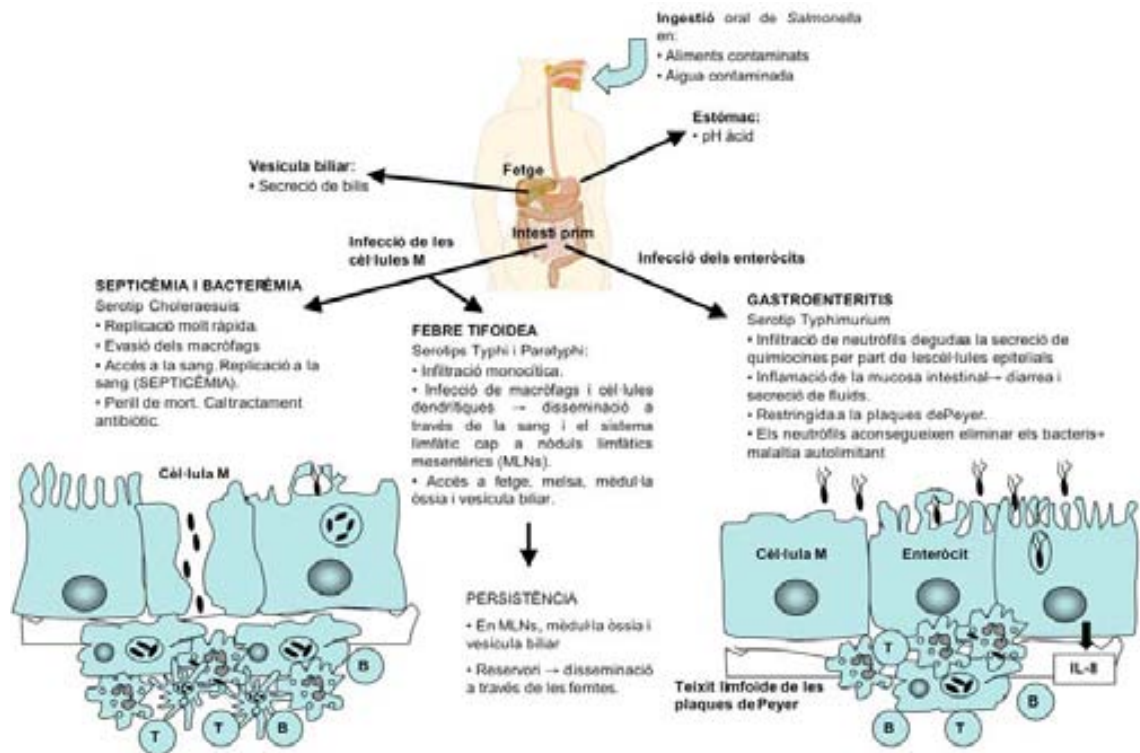


Figura 1. Principals característiques de la infestió produïda per *Salmonella enterica*. T: Limfòcit T, B: Limfòcit B

Un cop superada aquesta primera barrera, *Salmonella* ha d'ajustar-se a l'ambient de l'intestí (anòxia, elevat pH, detergents...), i haurà de competir amb la flora normal pròpia del tracte intestinal. A la vegada, ha de ser capaç d'adherir-se a l'epiteli intestinal i finalment travessar-lo. Aquí hi tenen un paper important les fímbries (Baumler *et al.*, 1996; Darwin and Miller, 1999a), així com els sistemes d'immobilització de ferro i altres sistemes de captació de nutrients (Slauch *et al.*, 1997).

Salmonella penetra l'epiteli intestinal bàsicament a través dels enteròcits (essencials per a l'absorció de nutrients de l'intestí, que representen la diana principal dels serotips de *Salmonella* spp. que causen gastroenteritis) i de les cèl·lules M, cèl·lules epitelials especialitzades la funció principal de les quals és presentar els antígens intestinals (Clark *et al.*, 1994; Neutra *et al.*, 1996) i que es troben a la part superficial de les plaques de Peyer. *Salmonella* penetra a les cèl·lules epitelials no fagocítiques mitjançant un procés d'endocitosi mediada pel mateix bacteri (Ly and Casanova, 2007).

Introducció

Així, les cèl·lules de *Salmonella* invasores alliberen unes proteïnes efectores específiques directament a l'interior de la cèl·lula hoste mitjançant el que es coneix com a "sistema de secreció de tipus III" (TTSS, de l'anglès "*type three secretion system*"). Els TTSS són uns orgànuls cel·lulars dels bacteris que han evolucionat específicament per alliberar proteïnes bacterianes a l'interior de la cèl·lula eucariota, permetent als bacteris modular moltes de les funcions cel·lulars, com ara la dinàmica del citoesquelet, les respostes nuclears i el trànsit endocític (per a més informació veure les següents revisions: (Galan, 2001; Galan and Wolf-Watz, 2006)). Aquests sistemes estan relacionats evolutivament amb l'estructura de l'aparell flagelar i formen una estructura de xeringa que se situa entre les membranes interna i externa de l'envolta cel·lular, molt similar al cos basal del complex flagelar. Les proteïnes alliberades dirigiran la reorganització del citoesquelet de la cèl·lula hoste, donat lloc a la formació d'unes grans evaginacions de membrana (en anglès *ruffles*) que envoltaran els bacteris i n'afavoriran l'entrada (Patel and Galan, 2005).

Els bacteris internalitzats quedaran continguts en una vacuola unida a la membrana anomenada *Salmonella-containing vacuole* (SCV). En aquest punt, els serotips de *Salmonella* spp. que causen gastroenteritis induiran una resposta secretora i iniciaran el reclutament de neutròfils cap al lumen intestinal mitjançant la producció de la potent quimiocina IL-8 (Patel and Galan, 2006). En el cas dels serotips que causen la malaltia sistèmica (febre tifoïda), un cop han penetrat a través de les cèl·lules M, poden penetrar a l'interior dels macròfags per macropinacitosis induïda i evitar les funcions microbicides dels macròfags. *Salmonella* és capaç de sobreviure i replicar-se a l'interior dels macròfags (Garcia-del Portillo, 2001; Jones and Falkow, 1996). Mitjançant el trànsit a través del sistema limfàtic poden migrar cap a altres òrgans del sistema reticuloendotelial i acabar colonitzant el fetge, la melsa, els ganglis limfàtics, i poden arribar a persistir a la vesícula biliar i a la mèdula òssea (Monack *et al.*, 2004).

A l'interior dels macròfags *Salmonella* es troba un ambient de pH àcid, on es produeixen compostos tòxics com el superòxid, el peròxid d'hidrogen, radicals hidroxil, pèptids anitmicrobians i espècies reactives del nitrogen entre d'altres. Per a poder fer front a aquest estrès oxidatiu, *Salmonella* posseeix enzims detoxificants com la superòxid dismutasa i la catalasa (Fang *et al.*, 1999).

L'ambient que *Salmonella* es troba a l'interior de la SCV no ha estat descrit extensament però se n'han fet algunes aproximacions gràcies a estudis amb microxips de DNA (Eriksson *et al.*, 2003; Hautefort *et al.*, 2008). Hi ha certes diferències entre aquests treballs, sobretot pel que fa a la concentració de ferro i la presència d'aminoàcids, així com també diferències entre les SCV de cèl·lules epitelials i les de macròfags. La SCV s'ha descrit sobretot com un medi pobre en fosfats i magnesi però gens limitant pel que fa a la concentració de potassi. La presència d'oxigen tampoc no hi és limitant. En comparació amb el fagolisosoma, la SCV és menys àcida i no té tanta activitat antibacteriana.

Així doncs, per a suportar aquest ambient més aviat hostil, *Salmonella* necessita transportadors d'alta afinitat per a macronutrients i micronutrients necessaris per a la supervivència del bacteri, molts dels quals constitueixen factors de virulència.

Dins la SCV també s'indueix l'expressió d'un altre TTSS que serà l'encarregat de secretar altres proteïnes efectores que alteraran la maduració i la fusió de la vacuola amb els compartiments lisosomals (Brumell and Grinstein, 2004; Knodler and Steele-Mortimer, 2003; Steele-Mortimer, 2008).

1.1.2. Factors de virulència

En l'apartat anterior s'ha descrit de manera breu com *S. enterica* és capaç d'arribar a l'intestí, penetrar a l'interior de les cèl·lules epitelials i dels macròfags i fins i tot de replicar-s'hi. En cadascun d'aquests punts que s'han anat comentant hi intervenen nombrosos factors que permeten al patògen decantar la balança cap al seu favor en la lluita permanent contra les defenses de l'hoste. Aquests factors són el que es coneixen com a **factors de virulència**.

Salmonella ha desenvolupat dues funcions de virulència complexes per tal d'interaccionar activament amb l'hoste i modificar-ne les seves funcions cel·lulars. Aquestes dues funcions característiques són, (1) la capacitat d'envair cèl·lules no fagocítiques i (2) de sobreviure i replicar-se a l'interior dels macròfags. En els apartats que venen a continuació es comentaran els diferents factors relacionats amb la invasió, la supervivència i la proliferació a l'interior dels macròfags.

La majoria dels gens que codifiquen els factors de virulència de *Salmonella* spp. es troben formant agrupacions gèniques, algunes de les quals són força grans i han estat adquirides per transferència genètica horitzontal. Aquestes agrupacions (o clústers) s'anomenen illes de patogenicitat (SPI, de l'anglès *Salmonella pathogenicity islands*) i codifiquen uns determinants responsables d'establir interaccions específiques amb l'hoste i que són necessàries per la plena virulència de *Salmonella* en el model animal (Marcus *et al.*, 2000).

D'illes de patogenicitat se'n troben en molts patògens però totes elles tenen unes característiques particulars per a considerar-les com a tals: (1) presenten gens de virulència que estan presents en microorganismes patògens però que estan absents en les soques emparentades que són benignes, (2) són regions diferenciades i força grans (de 10 a 200 Kb) i (3) que presenten una composició de bases diferent que la resta del cromosoma, (4) es troben insertades prop de gens que codifiquen per tRNAs, (5) es troben associades freqüentment amb elements genètics mòbils (repeticions directes, integrases o transposases críptiques, elements IS, transposons conjugatius integrats, plasmidis, fags...), (6) presenten una inestabilitat genètica i (7) una estructura en forma de mosaic deguda a varis events d'adquisició de material genètic (Schmidt and Hensel, 2004). A *Salmonella* se n'han descrit fins a 10 i recentment, gràcies a la utilització de mètodes bioinformàtics,

Introducció

se n'han descobert algunes més en *S. Typhi* CT18 (Vernikos and Parkhill, 2006). En *S. Typhimurium*, però, se'n troben 5 anomenades SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4 i SPI-5 (Marcus *et al.*, 2000).

En moltes d'aquestes illes de patogenicitat s'hi codifiquen sistemes de secreció de diferents tipus (I, II, III, IV) i també factors de virulència que se secretaran emprant aquests sistemes, coneguts com a proteïnes efectores.

1.1.2.1. Factors de virulència relacionats amb la invasió

En el procés d'invasió de *Salmonella*, hi participa principalment la **SPI-1**, que es troba situada en el centisoma 63. En ella s'hi troben codificats un sistema de secreció de tipus III i diversos operons que codifiquen per proteïnes efectores com *sipBCDA*, *avrA*, *sitDCBA* entre altres (**Fig. 2**).

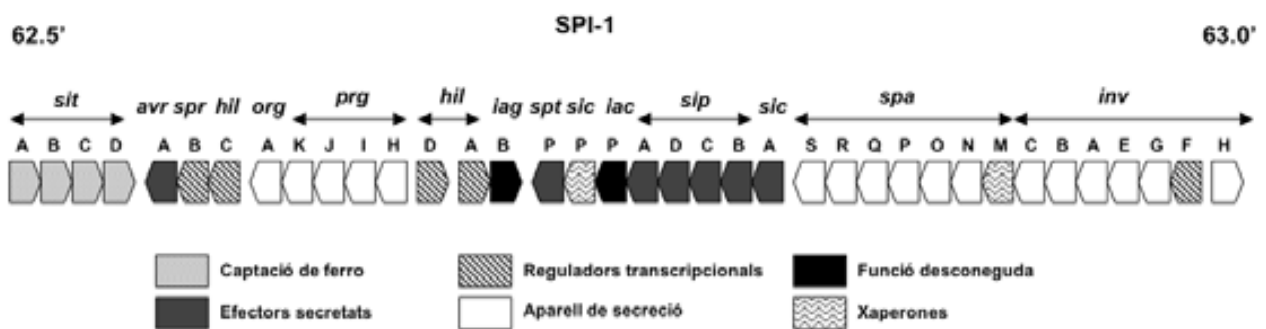


Figura 2. Organització gènica de la SPI-1 de *S. Typhimurium*. Adaptada d'Altier *et al.* (Altier, 2005).

Bàsicament se li han atribuït tres funcions: està implicada en la invasió de cèl·lules no fagocítiques, en la citotoxicitat (apoptosi) *in vitro* dels macròfags (Hersh *et al.*, 1999; Knodler and Finlay, 2001), i intervé en la mediació de la resposta inflamatòria i la diarrea (Altier, 2005; Galan, 2001; Groisman, 2001a; Hansen-Wester and Hensel, 2001; Marcus *et al.*, 2000).

La formació d'aquest sistema de secreció de tipus III permetria l'entrada de proteïnes efectores dins la cèl·lula hoste, modificant-ne les vies de transducció de senyal (Hardt *et al.*, 1998; Stender *et al.*, 2000) de tal manera que es generaria una reorganització dels filaments d'actina (Hayward and Koronakis, 1999; Zhou *et al.*, 1999) donant lloc a la formació d'unes grans evaginacions que acabarien englobant el bacteri per un procés de macropinocitosi. Algunes d'aquestes proteïnes efectores també són les encarregades d'evitar que les vesícules acabades de formar es fusionin amb els lisosomes, fet que conduiria a la destrucció del bacteri (Knodler and

Steele-Mortimer, 2003), i també intervenen en la pèrdua d'electròlits a causa de la diarrea (Wood *et al.*, 1998).

L'expressió i la regulació de la SPI-1 és força complexa i ve mediada per un ampli ventall de reguladors. El regulador més important però és HilA, un regulador de la família ToxR/OmpR que està codificat dins de la pròpia SPI-1 (Bajaj *et al.*, 1995). A aquest regulador central se li han de sumar altres reguladors propis de la SPI-1, com ara HilC i HilD (Lucas and Lee, 2001; Olekhovich and Kadner, 2002; Schechter and Lee, 2001), que activen l'expressió de HilA, i d'altres reguladors alguns dels quals constitueixen sistemes de dos components. La seva expressió també respon a una gran varietat de paràmetres ambientals que es troben a l'intestí, com són l'osmolaritat, la tensió d'oxigen, el pH, la presència de bilis, la concentració de Mg^{2+} , i la presència d'àcids grassos de cadena curta (Altier, 2005).

1.1.2.2. Factors de virulència relacionats amb la proliferació i la infecció sistèmica

A la dècada dels anys 1990 es va descriure una nova illa de patogenicitat en *Salmonella*, la SPI-2, necessària per a la supervivència a l'interior dels macròfags en el model de ratolí mitjançant diferents mètodes (Hensel *et al.*, 1995; Ochman *et al.*, 1996; Shea *et al.*, 1996). La **SPI-2** comprèn 40 Kb situades al centisoma 31 del cromosoma de *Salmonella*, adjacent a un gen de tRNA. Els gens que codifiquen el sistema de secreció es troben situats en una regió de 26 Kb que comença a l'extrem de l'illa al centisoma 30. En aquesta regió hi ha codificats 31 gens que es distribueixen en 4 operons: l'operó regulador, l'estructural I, l'estructural II, i el que conté les proteïnes efectores/xaperones (Cirillo *et al.*, 1998; Hensel *et al.*, 1998; Shea *et al.*, 1996) (**Fig. 3**).

Introducció

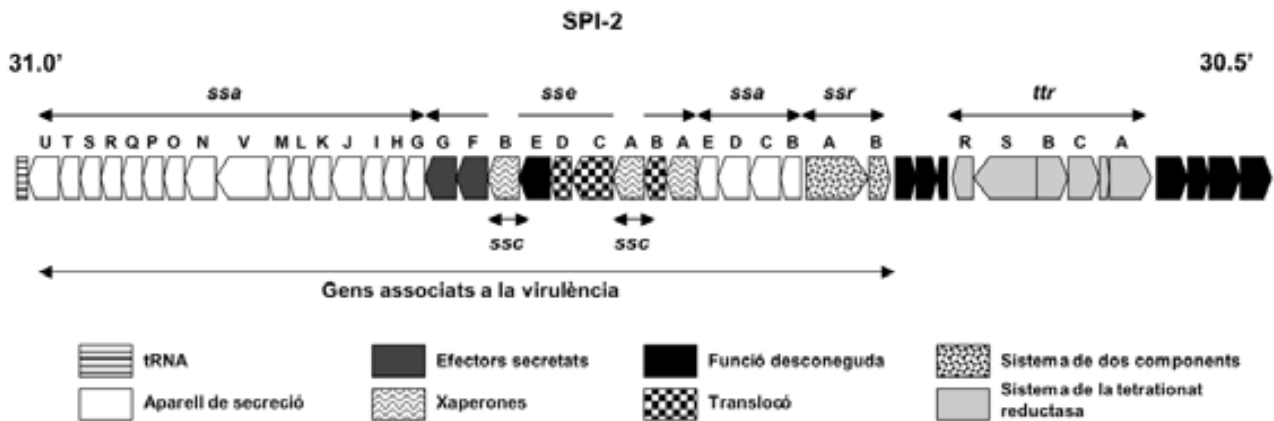


Figura 3. Organització gènica de la SPI-2 de *S. Typhimurium*. Adaptada de Kuhle & Hensel (Hensel, 2004).

Les soques de *Salmonella* mutants en la SPI-2 presenten una atenuació de la virulència en el model de ratolí, independentment de la via d'administració (Ochman *et al.*, 1996; Shea *et al.*, 1996), i un defecte en el creixement intracel·lular en macròfags i també en cèl·lules epitelials (Cirillo *et al.*, 1998; Hensel *et al.*, 1998; Ochman *et al.*, 1996; Uchiya *et al.*, 1999).

La SPI-2, és necessària per a la proliferació a l'interior de la cèl·lula hoste i per a provocar la malaltia sistèmica (Hensel, 2000; Waterman and Holden, 2003). Algunes proteïnes efectores secretades pel TTSS de la SPI-2 tindrien un efecte en el control del trànsit intracel·lular de la SCV, com ara SpiC i SifA. Aquesta última està implicada en la modulació de la membrana de la SCV i té un efecte directe en la manipulació de la dinàmica de la membrana. SifA intervé en la formació dels Sifs (*Salmonella-induced filaments*) (Beuzon *et al.*, 2000), uns filaments de membrana que s'extenen cap a l'exterior de la vacuola i que són essencials per a la integritat de la membrana de la SCV.

Les funcions de SPI-2 també són essencials per a evitar la mort de *Salmonella* a l'interior de la vacuola i la protegeix de les funcions efectores de la immunitat innata. Hi ha evidències que indiquen que SPI-2 evita la colocalització amb la fagòcit oxidasa (Uchiya *et al.*, 1999; Vazquez-Torres *et al.*, 2000b) i també amb la iNOS sintasa (Chakravorty *et al.*, 2002). D'aquesta manera, quan *Salmonella* es troba a l'interior de la SCV està protegida dels efectes de les espècies reactives de l'oxigen i del nitrogen.

La SPI-2 està regulada per un sistema de dos components codificat dins la mateixa illa: SsrAB. El mecanisme a través del qual té lloc aquesta regulació encara és desconegut. Però mutants en qualsevol d'aquests dos gens causen el mateix nivell d'atenuació que les mutacions en el TTSS.

S'ha observat que la proliferació a l'interior dels macròfags està afectada també en estudis amb mutants en *loci* metabòlics que són atenuats *in vivo*, bàsicament degut a que a l'interior de la SCV els nivells de nutrients són força baixos. S'han descrit mutants auxotròfics amb deficiències en les vies biosintètiques d'aminoàcids (*aro*) (Hoiseth and Stocker, 1981), de purines (*pur*) (McFarland and Stocker, 1987), de pirimidines, d'histidina i de metionina (Fields *et al.*, 1986). Molts d'aquests mutants s'han emprat en estudis orientats a cercar soques atenuades per a la producció de vacunes.

Hi ha varis serovars de *Salmonella* que contenen diferents plasmidis de virulència, però tots ells tenen en comú una regió de 7,8 kb que és necessària per a la infecció sistèmica, ja que permet el creixement intracel·lular de *Salmonella* a l'interior de les cèl·lules del sistema reticuloendotelial. Aquesta regió conté *spvR*, que correspon a un activador dels 4 gens que es troben a continuació, *spvABCD* (Guiney *et al.*, 1995; Gulig *et al.*, 1993). Els gens *spv* s'indueixen en fase estacionària i en medis pobres en carboni. La seva expressió és depenent de RpoS (Chen *et al.*, 1995), IHF (Rhen *et al.*, 1993) i es veu reprimida pel complex cAMP-CRP (O'Byrne and Dorman, 1994b), H-NS (O'Byrne and Dorman, 1994a), LRP (*responsive regulatory protein*) (Marshall *et al.*, 1999), la polinucleòtid fosforilasa (Ygberg *et al.*, 2006) i en condicions aeròbiques.

1.1.3. Regulació gènica dels factors de virulència

És evident que l'expressió dels factors de virulència no és constitutiva i que, per tant, és necessària una regulació específica i coordinada. És a dir, s'induiran determinats factors en funció de les alteracions que hi hagi a l'ambient a mesura que el patogen es troba en un determinat hoste o, fins i tot, en els diferents micro-nínxols que hi ha dins d'un mateix hoste.

D'aquests sistemes de regulació n'hi ha d'específics dels factors de virulència mentre que n'hi ha d'altres que són reguladors a nivell més global que també intervenen en la regulació d'altres gens constitutius.

La majoria d'aquests reguladors responen a estímuls externs, alguns són sistemes de dos components, d'altres són reguladors que formen part de famílies d'altres reguladors globals coneguts (LysR, AraC) o factors σ alternatius, entre d'altres.

1.1.3.1. Sistemes de dos components

Els sistemes de dos components són uns sistemes de transducció de senyals en els procarïotes que permeten que aquests microorganismes duguin a terme una resposta adaptativa enfront dels estímuls ambientals, principalment mitjançant la modulació de l'expressió gènica (Beier and Gross, 2006). Els reguladors que constitueixen aquest grup estan formats per un domini sensor i

Introducció

un domini regulador que normalment es troben en proteïnes separades (Neidhardt, 1999). El component sensor es troba a la membrana plasmàtica i és el responsable de fosforilar el component regulador citoplasmàtic quan detecta l'estímul ambiental adequat. El component regulador serà l'encarregat de transmetre la informació que li ha arribat de l'exterior cap al citosol per tal de produir una resposta gènica.

En resposta als estímuls que es troba durant el procés d'infecció, *S. enterica* conté varis sistemes de dos components codificats en el seu genoma. Els estímuls poden ser variacions en les concentracions de cations divalents (com el Ca^{2+} , el Mg^{2+}), canvis en el pH, canvis en les condicions osmòtiques, etc... . Amb aquesta regulació tan fina, *Salmonella* és capaç de controlar l'expressió dels determinants de virulència allà on calguin i en el moment en que les condicions siguin les adequades.

Un dels sistemes de dos components més important és **PhoPQ**. Aquest és essencial per a la virulència, controla l'adaptació a ambients amb concentracions baixes de magnesi i regula varies funcions cel·lulars de moltes espècies de bacteris gram negatius (Groisman, 2001b). La quinasa sensora PhoQ detecta la concentració periplasmàtica de Mg^{2+} i Ca^{2+} . Les concentracions limitants de Mg^{2+} fan que PhoQ fosforili PhoP i aquesta activi determinats gens entre els quals destaquen els relacionats amb la captació de magnesi, la modificació del lipopolisacàrid (LPS) i amb la virulència.

En *Salmonella*, el sistema de dos components PhoP/Q és essencial per a la virulència ja que és necessari per a la supervivència a l'interior de macròfags (Fields *et al.*, 1986; Groisman *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1989), la seva activació també és necessària per la resistència a pH àcid i a pèptids antimicrobians (Fields *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1990), per a la modificació de la presentació d'antígens (Wick *et al.*, 1995), per a la formació d'unes vacuoles espaioses (Alpuche-Aranda *et al.*, 1994), per al trànsit de les SCV a l'interior dels macròfags (Garvis *et al.*, 2001), i per a la modulació de la mort cel·lular dels macròfags (Detweiler *et al.*, 2001). A la vegada però, en determinades condicions actua com a repressor, per exemple de HlIA, el regulador dels gens d'invasió de la SPI-1 (Bajaj *et al.*, 1996).

PhoP, en resposta a baixes concentracions de magnesi és capaç d'activar PmrD, un regulador que activarà un altre sistema de dos components: **PmrA-PmrB** (Kox *et al.*, 2000). Aquest sistema és responsable de la resistència a la polimixina B (Roland *et al.*, 1993), de la resistència a la mort mediada per Fe^{3+} (Wösten *et al.*, 2000), de la modificació del lipopolisacàrid i de la virulència en ratolins (Gunn *et al.*, 2000).

El sistema de dos components **EnvZ-OmpR** va ser descrit per primer cop en *E. coli* com a un sistema que respon a canvis en l'osmolaritat (Alphen and Lugtenberg, 1977). En *Salmonella* aquest sistema de dos components també afecta la transcripció d'un altre sistema de dos components: **SsrA-B** (Lee *et al.*, 2000). Aquest últim, està implicat en la activació dels gens de la SPI-2 necessaris per a la proliferació en l'interior de macròfags (Garmendia *et al.*, 2003).

El **sistema Rcs** es va descriure per primer cop en *E. coli* on hi exercia una regulació positiva del polisacàrid capsular o de la síntesi d'àcid colànic. Actualment es coneix que està implicat en el manteniment de la integritat de la paret cel·lular, en la divisió cel·lular, en la regulació del factor sigma σ^S , en la motilitat, i en la virulència (Majdalani and Gottesman, 2005). Els estímuls que n'indueixen l'activació no són del tot coneguts però s'hi inclouen l'estrès osmòtic o altres estressos que afectin la membrana, el creixement a baixes temperatures en presència de glucosa i zinc, i el creixement en medi sòlid (Majdalani and Gottesman, 2005). La relació d'aquest sistema amb la virulència s'explica en l'atenuació de mutants que activen el sistema Rcs (Dominguez-Bernal *et al.*, 2004; Garcia-Calderon *et al.*, 2005; Mouslim *et al.*, 2004).

Un altre sistema de dos components que està relacionat amb la regulació positiva de la SPI-1 és **SirA-BarA**, que a més, també activa la formació de biofilms i regula negativament els gens responsables de la formació de flagels (Ahmer *et al.*, 1999; Johnston *et al.*, 1996; Teplitski *et al.*, 2003; Teplitski *et al.*, 2006). El sistema a través del qual du a terme aquesta regulació de la virulència és força complex. Hi ha dos grans grups de gens regulats per SirA: el reguló FlhDC que controla la motilitat i la quimiotaxis, i el reguló HilA que controla la invasió associada al TTSS-1 de la SPI-1 (Goodier and Ahmer, 2001).

Així doncs els sistemes de dos components representen un sistema de regulació molt precís i complex a la vegada per donar una resposta ràpida i adequada en funció dels reptes ambientals que ha d'afrontar *Salmonella* al llarg de tot el curs d'una infecció.

1.1.3.2. Reguladors “adaptadors”

Aquest concepte de reguladors “adaptadors” va ser descrit per primer cop per Guiney (Guiney, 1997) referint-se a aquells reguladors que es troben a les mateixes illes de patogenicitat i que en regulen la seva expressió. Això ve donat pel fet que molts dels gens de virulència es van adquirir al llarg de l'evolució mitjançant la integració per transferència horitzontal d'elements genètics accessoris o d'illes de patogenicitat en el cromosoma. Aquests reguladors “adaptadors” són els responsables d'integrar l'expressió dels gens de virulència en resposta a d'altres reguladors globals dels circuits generals o “housekeeping” de la cèl·lula, que es troben tant en els organismes patògens com en no patògens.

Alguns d'aquests reguladors més importants de *S. enterica* són HilA, HilC, HilD, InvF (Darwin and Miller, 1999b; Eichelberg and Galan, 1999), FimZY (Baxter and Jones, 2005) i SpvR.

Un d'aquests reguladors “adaptadors” més ben estudiat és **HilA**, tot i que encara queden per descobrir moltes incògnites de la seva complexa regulació. Com s'ha comentat anteriorment, HilA és el regulador principal de la SPI-1: el responsable de l'activació dels gens *sip* (que codifiquen per

Introducció

proteïnes efectores), els gens d'invasió (*inv*), els gens *prg/org* (que codifiquen pel TTSS) i també activa la SPI-4 (Ahmer *et al.*, 1999; Gerlach *et al.*, 2007; Main-Hester *et al.*, 2008). A més, ell mateix regula la seva pròpia expressió.

La regulació de la seva expressió és molt complexa i hi intervenen altres reguladors codificats a la mateixa SPI-1 com **HiIC** i **HiID** (Ellermeier *et al.*, 2005), a més dels sistemes de dos components PhoPQ, SirA-BarA i EnvZ-OmpR (Teplitski *et al.*, 2003), i els reguladors RtsA, Fis (Wilson *et al.*, 2001), HiIE, Hha (Fahlen *et al.*, 2000; Fahlen *et al.*, 2001), Lon (Takaya *et al.*, 2002), FliZ, FadD (Lucas and Lee, 2001) i Fur (Ellermeier and Slauch, 2008).

Per acabar, també s'ha de destacar el regulador transcripcional **SpvR** del plasmidi de virulència de *S. Typhimurium*. L'operó *spvRABCD* està implicat en la virulència en el model de ratolí de la salmonel·losi sistèmica, on els gens *spv* estan implicats en la replicació dels bacteris a l'interior dels macròfags al fetge i la melsa (Gulig *et al.*, 1993; Gulig and Doyle, 1993). La seva expressió és complexa i respon a uns estímuls ambientals determinats i a tota una sèrie de reguladors transcripcionals. Entre ells destaquen reguladors que n'indueixen l'expressió, com ara PhoP (Groisman, 2001b), el factor σ -alternatiu RpoS (Fang *et al.*, 1992; Kowarz *et al.*, 1994) i l'IHF (*integration host factor*) (Marshall *et al.*, 1999), i d'altres que en reprimeixen l'expressió com el regulador global H-NS (O'Byrne and Dorman, 1994a), Lrp (*leucine responsive regulatory protein*) (Marshall *et al.*, 1999), el sistema de repressió per catabolit (O'Byrne and Dorman, 1994b), i la polinucleòtid fosforilasa (PNPasa) (Ygberg *et al.*, 2006).

1.1.3.3. Altres mecanismes de regulació: Regulació global

Hi ha un petit nombre de proteïnes que tenen la capacitat de regular una gran quantitat de gens, és a dir, d'actuar a un nivell més global. Entre elles destaquen proteïnes que afecten la topologia del DNA, com ara la DNA girasa i la DNA topoisomerasa I, i s'ha vist que els factors que influeixen en el superenrotllament del DNA són els mateixos que influeixen en l'expressió dels gens de virulència (Galan and Curtiss, 1990; Marshall *et al.*, 2000).

També s'han estudiat els efectes en la regulació dels gens de virulència de les proteïnes associades al nucleòide (NAPs, *nucleoid-associated proteins*) com ara **Fis** (*factor for inversion stimulation*), que s'ha vist implicada en la regulació de gens de la SPI-1, SPI-2, SPI-3 i SPI-5 així com de gens flagelars i gens implicats en la motilitat (Kelly *et al.*, 2004); **IHF** (*integration host factor*), implicat en la regulació del plasmidi de virulència (Marshall *et al.*, 1999) i també necessari per la expressió normal dels gens dels TTSS de SPI-1 i 2 i també del TTSS necessari per l'expressió dels flagels, així com dels gens que permeten que el bacteri s'ajusti a la fase de creixement estacionaria

(Mangan *et al.*, 2006); **H-NS**, descrita recentment com a una proteïna silenciadora de molts dels gens adquirits per transferència horitzontal com ara aquells que pertanyen als regulons de la SPI-1 i SPI-2 (Lucchini *et al.*, 2006; Navarre *et al.*, 2006) i **Lrp** (*leucine-responsive regulatory protein*) implicada en l'expressió dels gens de virulència *spv* de manera dependent de L-leucina (Marshall *et al.*, 1999) i també necessària per la transferència per conjugació del plasmidi de virulència (Camacho and Casadesus, 2002).

Un altre mecanisme de regulació global important per al silenciament de l'expressió gènica és la metilació del DNA. Els mutants en la metilació del DNA (**dam**) en *Salmonella* són atenuats (Garcia-Del Portillo *et al.*, 1999; Heithoff *et al.*, 1999). La seva funció en la regulació de la virulència afecta els gens d'invasió de la SPI-1, gens de l'aparell flagelar i l'operó *std* de fímbrics (Balbontin *et al.*, 2006).

Una altra estratègia de regulació és la utilització de factors σ alternatius que desplacen l'habitual factor σ^{70} de la RNA polimerasa i que poden alterar el perfil d'expressió gènica a escala global. Aquests factors σ alternatius estan associats a diferents estressos com ara la manca de nutrients, l'estrès àcid, oxidatiu, osmòtic o tèrmic. Cal destacar la funció del factor σ alternatiu **RpoS**, que s'activa durant la fase estacionària però que també respon a la disminució del pH i serveix per adaptar *Salmonella* a l'estrès àcid, tèrmic, al dany oxidatiu, a la hiper o hipo-osmolaritat i al dany al DNA (Hengge-Aronis, 2002). S'ha descrit que participa en el control de la regulació dels gens *spv* del plasmidi de virulència (Fang *et al.*, 1992) i els mutants en RpoS presenten una menor capacitat de colonitzar les plaques de Peyer murines i un una greu deficiència en la fase sistèmica de la infecció (Coynault *et al.*, 1996; Nickerson and Curtiss, 1997). També hi ha d'altres factors σ alternatius que intervenen en la virulència, com **RpoH**, responsable de l'adaptació a l'estrès tèrmic, i **RpoE**, responsable de la resposta a l'estrès oxidatiu. Aquest últim està implicat en la virulència de *Salmonella* ja que la seva inactivació disminueix la supervivència i el creixement a l'interior dels macròfags (Cano *et al.*, 2001; Humphreys *et al.*, 1999).

L'estrès acídic també provoca una resposta per part de *Salmonella*: la resposta **ATR** (de l'anglès, *acid tolerance response*), que ja s'ha comentat en l'apartat 1.2. Aquesta resposta té dues etapes, una s'activa durant la fase logarítmica, i l'altra durant la fase estacionària. En aquestes etapes s'activaran diferents sistemes d'homeòstasi del pH i se sintetitzen més de 50 proteïnes del xoc àcid (ASP, de l'anglès *acid shock proteins*) (Foster, 1993) que evitaran o repararan el dany macromolecular. Dins d'aquestes proteïnes considerades ASP s'hi troben reguladors com **RpoS** i **Fur** (de l'anglès, *Ferric uptake regulator*) que coordinen la ATR que confereix resistència als àcids orgànics, i també **PhoPQ** que dirigeix la resistència a l'estrès causat per àcids inorgànics (Bearson *et al.*, 1998; Hall and Foster, 1996; Lee *et al.*, 1995). Sembla ser però, que els efectes que s'observen en mutants Fur en la virulència són deguts més aviat a l'efecte pleiotròpic que causen que no pas a l'efecte que tenen en la ATR (Garcia-del Portillo *et al.*, 1993; Riesenber-Wilmes *et al.*, 1996).

1.2. Ribonucleotidil reductases

Fins ara, aquesta introducció s'ha centrat en la patogènesi de *Salmonella*. Aquest treball però, es va dissenyar per a esbrinar quin és el paper de les ribonucleotidil reductases (RNRs) en la patogènesi de *S. Typhimurium*, quina de les tres classes presents en aquest microorganisme (classe Ia, Ib i classe III) és la responsable de la síntesi de dNTPs en unes condicions tant concretes com és el procés d'infecció i a la vegada estudiar-ne la seva regulació. Per a resoldre aquests punts però, és necessari introduir les ribonucleotidil reductases: la seva funció i regulació i el seu paper tant essencial en la biologia.

Les ribonucleotidil reductases són una família de metal·loenzims (EC 1.17.4.1) responsables de la síntesi *de novo* de desoxiribonucleòtids (dNTPs) a partir de ribonucleòtids (NTPs) (**Fig. 4**). Aquest enzim és capaç de reduir el grup 2'-OH dels NTPs per generar dNTPs en una reacció que emprava un radical orgànic lliure per generar un radical tiil transitori altament conservat al centre actiu i que captarà el grup 2'-OH de l'anell de la ribosa.

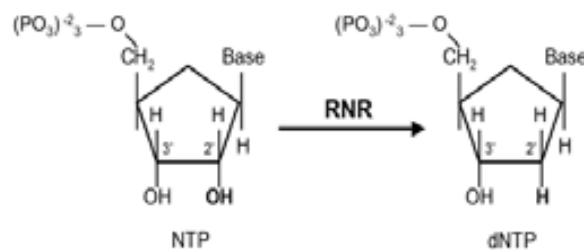


Figura 4. Reacció de reducció del grup 2'OH d'un NTP per generar un dNTP per part de la ribonucleotidil reductasa.

Aquesta reacció és essencial per a la vida ja que els nivells de cada tipus de desoxiribonucleòtid (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) han de ser sempre suficients per a poder mantenir correctament funcions cel·lulars bàsiques com ara la replicació i la reparació del DNA. L'aparició de les RNRs durant l'evolució va ser un prerrequisit per poder realitzar la transició d'un "món de RNA", on amb l'RNA n'hi havia prou per a la transferència de la informació i per a la catàlisi, fins a la situació actual, on la vida depèn de la interrelació entre el DNA, l'RNA i les proteïnes.

Com a proteïnes essencials que són, donat la funció bàsica que realitzen, també presenten tota una sèrie de característiques que les fan interessants com a enzims. Entre aquestes característiques cal destacar la utilització d'un radical proteic per a la reducció del ribonucleòtid. De fet, van ser les primeres proteïnes en que es va descobrir l'utilització d'un radical lliure per a la catàlisi (Nordlund and Reichard, 2006).

Però no només el mecanisme de catàlisi és interessant, sinó també la seva estructura, la seva complexa regulació, tant al·lostèrica com transcripcional, la seva distribució en els éssers vius i, fins i tot, els diferents sistemes que les tres classes han adoptat per a obtenir el radical proteic, tot i utilitzar el mateix mecanisme de reacció. Les RNRs utilitzen diferents cofactors que les fan interessants com a proteïnes model per a altres enzims que impliquen sistemes similars. Per exemple: (a) proteïnes amb radical o transferència de radical com el fotosistema II, citocrom c oxidasa, etc. (Hawkins and Davies, 2001; Stubbe and van Der Donk, 1998) (b) proteïnes amb centres difèrrics units amb un pont d'oxigen (Lange and Que, 1998; Nordlund and Eklund, 1995; Ryle and Hausinger, 2002; Wallar and Lipscomb, 1996) (c) proteïnes dependents de cobalamina (Marsh, 1999, 2000; Matthews, 2001) i (d) proteïnes amb centres de Fe-S dependents de la S-adenosilmetionina (SAM) com la piruvat format liasa (Cheek and Broderick, 2001; Fontecave *et al.*, 2002; Frey and Magnusson, 2003).

1.2.1. Classes de ribonucleotidil reductases

Tots els éssers vius i fins i tot alguns virus, contenen RNRs codificades en els seus genomes. De RNRs n'hi ha tres grans classes que es diferencien segons les seves característiques bioquímiques, com són la seva estructura, la regulació al·lostèrica, la sensibilitat vers l'oxigen, els cofactors necessaris per a la catàlisi i el mecanisme emprat per a generar el radical proteic (**Taula I**).

Introducció

	Classe Ia	Classe Ib	Classe II	Classe III
Dependència de l'oxigen	Aeròbica	Aeròbica	Independent de l'oxigen	Anaeròbica
Estructura	$\alpha_2\beta_2$	$\alpha_2\beta_2$	α o α_2	$\alpha_2(\beta_2)$
Gens	<i>nrdAB</i>	<i>nrdEF</i>	<i>nrdJ</i>	<i>nrdDG</i>
Radical	Tyr...Cys	Tyr...Cys	AdoCbl...Cys	AdoMet..Gly..Cys
Metall / Cofactor	Fe-O-Fe	Fe-O-Fe	AdoCbl	Fe-S / AdoMet
Substrat	NDP	NDP	NDP o NTP	NTP
Sistema de reducció	Tioredoxina Glutaredoxina	NrdH-redoxina Glutaredoxina	Tioredoxina	Format
Llocs al·lostèrics per polipèptid	2	1	1 o 2	2 (1)
Inhibició per dATP	Si	No	No	Si
Distribució	Eucariotes Bacteria Bacteriòfags Virus	Bacteria Bacteriòfags	Arqueobacteria Bacteria Bacteriòfags Alguns eucariotes inferiors	Arqueobacteria Bacteria Bacteriòfags
Prototip	<i>E. coli</i> Ratolí	<i>S. Typhimurium</i>	<i>L. leichmannii</i> <i>T. maritima</i>	<i>E. coli</i> T4

Taula I: Característiques principals de les tres classes de ribonucleotidil reductases (Adaptada de Jordan & Reichard, 1998)

La **classe I** la trobem en organismes eucariotes, des del llevat fins als mamífers, en alguns procariotes i en virus i bacteriòfags (Torrents *et al.*, 2002). Depèn de l'oxigen per a poder generar el radical lliure que es troba localitzat en la Tyr122 (en nomenclatura d'*E. coli*) (Larsson and Sjöberg, 1986). L'oxigen molecular s'acomplexa amb un centre difèrric que és el que genera el radical tirosil (Sahlín *et al.*, 1987) i aquest, per mitjà d'una complexa cadena de transferència d'electrons, es transfereix a una cisteïna situada al centre actiu, iniciant així la reducció del substrat (Stubbe *et al.*, 2003). Posteriorment, aquesta cisteïna serà reduïda al seu torn per dues cisteïnes adjacents que també es troben en el centre actiu. Per tal de regenerar les cisteïnes oxidades calen donadors de poder reductor, que en el cas de la classe I són els sistemes de tioredoxines i glutaredoxines, tot i que el reductant final és el NADPH (per a més informació sobre el mecanisme de catàlisi hi ha nombroses revisions (Fontecave, 1998; Kolberg *et al.*, 2004; Nordlund and Reichard, 2006).

La classe I se subdivideix en **classe Ia** i **classe Ib** basant-se en diferències en la seqüència, la regulació i en la reducció de l'enzim (Jordan *et al.*, 1996a; Jordan *et al.*, 1997). Pel que fa a l'estructura quaternària de la classe I i les possibles diferències entre classe Ia i Ib, el que s'accepta

actualment és la conformació $\alpha_2\beta_2$ tot i que el debat continua obert (Rofougaran *et al.*, 2008). L'homodímer α_2 constitueix la subunitat gran de l'enzim i s'anomena R1 en la classe Ia i R1E en la classe Ib. Està codificat pels gens *nrdA* i *nrdE*, respectivament i conté el centre actiu i els llocs d'unió dels efectors al·lostèrics. L'homodímer β_2 , o també anomenat R2 en la classe Ia i R2F en la classe Ib, està codificat pels gens *nrdB* i *nrdF* respectivament, i conté el radical tirosil i un centre difèrric unit a l'oxigen per monòmer, ambdós necessaris per a l'activitat catalítica de l'enzim. No obstant, a diferència de la classe Ia, la classe Ib presenta els gens *nrdEF* formant un operó amb dos altres gens, *nrdI* i *nrdH*. *nrdI* codifica una proteïna accessòria de funció poc coneguda però aparentment essencial per a l'activitat *in vivo* de l'enzim, i *nrdH* codifica un donador extern d'electrons específic d'aquesta classe.

A nivell de seqüència polipeptídica també trobem diferències entre la classe Ia i la classe Ib. En aquesta última no hi estan presents els 50 residus de l'extrem amino-terminal que en la classe Ia són necessaris per a la unió dels efectors al·lostèrics (Eliasson *et al.*, 1996).

La classe Ib la trobem exclusivament en procarïotes, on en alguns casos constitueix l'única reductasa aeròbica present i, per tant, és la responsable del creixement en presència d'oxigen (*Lactococcus lactis* (Jordan *et al.*, 1996b); *M. tuberculosis* (Yang *et al.*, 1994); *Bacillus subtilis* (Scotti *et al.*, 1996); *Corynebacterium ammoniagenes* (Fieschi *et al.*, 1998)). Ara bé, en d'altres casos, com en els enterobacteris, la classe Ib es troba juntament amb la classe Ia. En el cas dels enterobacteris, tal i com va descriure Jordan *et al.* (1996), la classe Ib es transcriu a nivell molt baix i els mutants nuls en l'operó *nrdAB* no sobreviuen. Així doncs, la classe Ib no és capaç de suportar el creixement en aerobiosi. Ara bé, si s'afegeix una còpia extra de l'operó *nrdHIEF*, bé en el cromosoma, bé extracromosòmica, sí que és capaç de permetre el creixement de mutants en *nrdAB*.

La **classe II** es troba en molts procarïotes així com en alguns eucariotes inferiors (Torrents *et al.*, 2002). El model actual per a les RNRs de la classe II és l'enzim de *Lactobacillus leichmannii* (Licht *et al.*, 1996; Panagou *et al.*, 1972) i presenta una estructura més simple que les altres classes. Només hi ha un tipus de subunitat (α) que conté el centre actiu i el lloc al·lostèric. Però a mesura que s'han anat descobrint altres representants de la classe II s'ha observat que també pot ser homodimèrica (α_2). La subunitat α es troba codificada pel gen *nrdJ*.

En aquesta classe, la formació del radical tiil en la cisteïna té lloc en el mateix centre actiu i és necessària la participació de la 5'-desoxiadensilcobalamina (un derivat de la vitamina B₁₂) (Booker *et al.*, 1994). En aquest cas, la formació del radical no necessita oxigen ni un centre metàl·lic, però tampoc es veu afectada per la presència d'oxigen i, per tant, els enzims d'aquesta classe poden funcionar tant en anaerobiosi com aerobiosi. La font de poder reductor necessària per dur a terme la reacció també l'aporten els sistemes de tioredoxines igual que en la classe Ia.

La **classe III** la trobem en bacteris i arqueobacteris anaerobis estrictes o facultatius i també en alguns bacteriòfags (Torrents *et al.*, 2002). La proteïna activa és un dímer α_2 , codificat pel gen

Introducció

nrdD, que conté un radical glicil estable, el centre actiu i els llocs reguladors al·lostèrics. El radical glicil es genera amb l'ajuda de la S-adenosilmetionina (SAM) juntament amb un centre de ferro-sofre (Eliasson *et al.*, 1990). La subunitat petita β_2 , codificada pel gen *nrdG*, conté aquest centre de ferro-sofre i també se la coneix com a l'activasa, ja que és capaç d'introduir radicals glicil en més d'un subunitat α (Torrents *et al.*, 2001).

En aquest cas el reductant és el format (Mulliez *et al.*, 1995). L'exposició del complex actiu a l'oxigen provoca l'inactivació de l'enzim (King and Reichard, 1995), de manera que els enzims de la classe III són sensibles a l'oxigen i només són actius en condicions anaeròbiques.

Com a enzims models de la classe III es consideren les RNRs anaeròbiques d' *E. coli* (Barlow *et al.*, 1983) i del bacteriòfag T4 (Young *et al.*, 1994).

1.2.2. Regulació al·lostèrica de les RNRs

Els desoxiribonucleòtids són necessaris per a la recombinació, la replicació i la reparació del DNA, tant dels cromosomes com dels mitocondris, i per tant són necessaris uns nivells equilibrats de cada dNTP. Per assolir-ho cal que les RNRs estiguin molt ben regulades tant a nivell transcripcional com a nivell post-transcripcional. En aquest primer apartat es tractarà la regulació al·lostèrica i a continuació la regulació transcripcional de les RNRs.

En general, la regulació al·lostèrica adapta a un enzim als canvis en els requeriments del seu producte per mitjà de la unió d'efectors que augmenten o disminueixen la seva activitat. En el cas de les RNRs, la seva regulació al·lostèrica fa que siguin uns enzims força interessants i que des de que es va establir per primer cop l'al·lostèricisme en la classe Ia (Brown and Reichard, 1969) molts estudis hi hagin centrat l'atenció (Eriksson *et al.*, 1997; Larsson *et al.*, 2004; Uppsten *et al.*, 2003).

Una única proteïna és capaç de reduir els quatre tipus de ribonucleòtids però cal que el procés estigui molt regulat per tal d'obtenir la mateixa proporció de cada un dels desoxiribonucleòtids necessària per a la síntesi de DNA. Es coneix que un desequilibri en les concentracions de dNTPs en la cèl·lula pot tenir un efecte mutagènic i, en certes condicions, pot arribar a provocar malalties o la mort cel·lular (Kunz *et al.*, 1994).

De forma general hi ha dos tipus de regulació al·lostèrica: la regulació de l'activitat general de l'enzim que ve donada per la unió de dATP o ATP en el lloc d'activitat (lloc-A), on el dATP té un efecte inhibitori de l'activitat i l'ATP un efecte activador; i la regulació de l'especificitat de substrat de l'enzim, donada per la unió dels efectors al lloc d'especificitat (lloc-S) que ens assegurarà que l'enzim produeix suficients quantitats de cada dNTP per a la síntesi de DNA. Aquí s'hi uniràn els productes finals totalment fosforilats de la reducció dels ribonucleòtids: dATP (o ATP), dTTP, i dGTP, mentre que el dCTP no sembla tenir-hi cap efecte (Eliasson *et al.*, 1996).

Com a model de la regulació al·lostèrica s'utilitza la classe Ia, però en termes generals es pot aplicar el mateix mecanisme a les tres classes de RNRs (Jordan and Reichard, 1998). En el cas de la classe I els substrats són els ribonucleòtids difosfats, per a la classe III els substrats són els ribonucleòtids trifosfats, mentre que la classe II utilitza tant ribonucleòtids difosfats com trifosfats. La unió d'ATP (o dATP) al lloc-S estimula la unió i reducció del CDP i l'UDP; el producte final d'aquesta reducció, el dTTP, inhibeix la reducció del CDP i l'UDP però promou la reducció del següent ribonucleòtid, el GDP. La seva reducció genera dGTP, la unió del qual al lloc-S inhibeix la reducció del GDP i promou la reducció de l'ADP (Fig. 5).

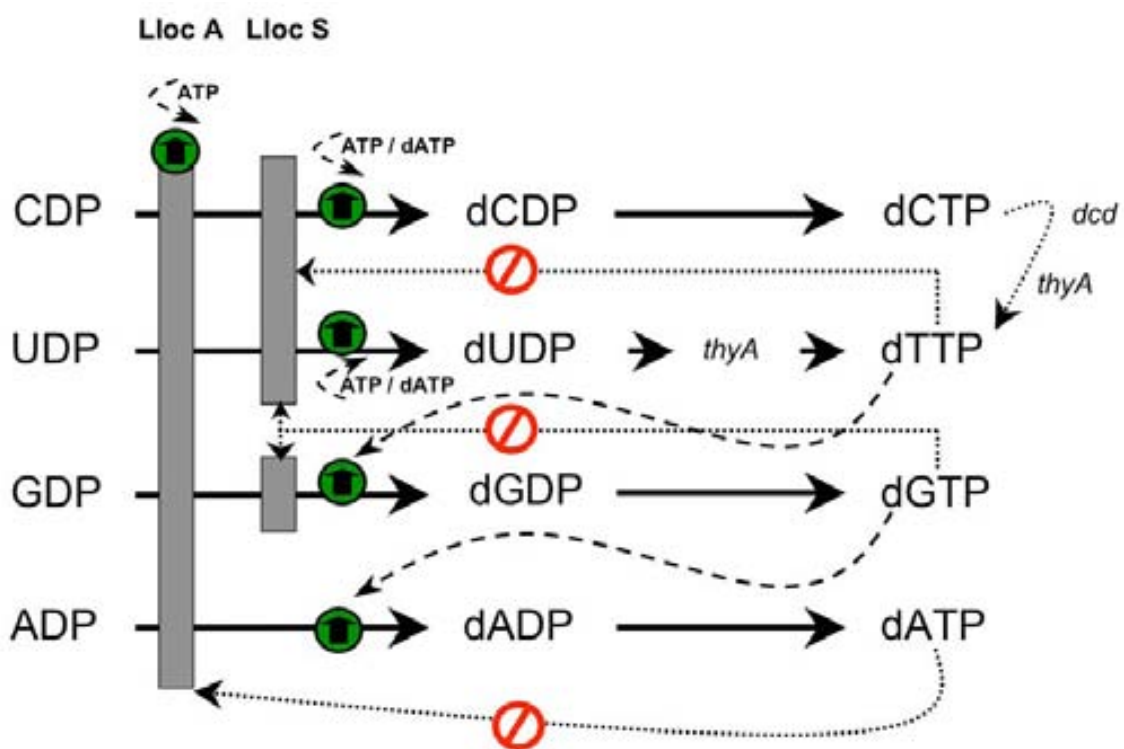


Figura 5. Regulació al·lostèrica de les RNRs. Els símbols de color verd (fletxa vertical encerclada) indiquen l'estimulació de la reducció de ribonucleòtids i els símbols vermells (símbol de prohibit) indiquen la inhibició. Adaptat de Tesi doctoral de Roca, I. (Roca, 2007).

A més del lloc-S, en la classe Ia i en la majoria de RNRs de la classe III també hi ha el lloc-A que regula l'activitat global de l'enzim. La unió de l'ATP activa la reducció de ribonucleòtids mentre que la unió de dATP la inhibeix. Malgrat tot, el lloc-S té més afinitat pel dATP, de manera que la inhibició global de l'enzim només s'assoleix a grans concentracions de dATP.

Introducció

Les RNRs de la classe Ib i algunes representants de la classe II no es veuen afectades per la inhibició per dATP ja que els manquen 50 residus de la cadena polipeptídica de l'extrem amino-terminal, que és la responsable de l'activitat global de l'enzim.

També s'han de constatar lleugeres diferències entre la classe Ia i la classe III. Aquesta última, en el cas d'*E. coli*, conté el que s'anomena lloc-purina i que és l'equivalent al lloc-S de la classe I i II, i també conté el lloc-pirimidina, que correspon al lloc-A de les RNRs de la classe Ia (Eliasson *et al.*, 1994). També hi ha una excepció en la RNR de classe III del bacteriòfag T4, que ha perdut gairebé 100 residus de l'extrem amino-terminal que es troben presents en l'enzim de classe III d'*E. coli*, de manera que tampoc conté el lloc-pirimidina (Logan *et al.*, 1999).

Estudis recents han proposat un tercer lloc de regulació al·lostèrica en la RNR de la classe Ia de mamífers, que es denomina lloc d'hexamerització o lloc-H. Aquest lloc estimularia la formació d'una estructura hexamèrica R_1R_2 després de la unió de l'ATP. Aquesta forma hexamèrica de la RNR seria la forma més activa en les cèl·lules de mamífers (Cooperman and Kashlan, 2003; Kashlan and Cooperman, 2003).

1.2.3. Regulació transcripcional de les RNRs

En l'apartat anterior s'ha parlat de la regulació de les RNRs a nivell proteic, però les RNRs també han d'estar estrictament regulades a nivell transcripcional per a poder assolir una resposta ràpida vers l'ambient canviant al que han de fer front.

Així com el coneixement que es té sobre l'estructura i l'al·lostèricisme és força ampli, el coneixement sobre la regulació gènica de les RNRs és encara força desconegut. En els últims anys però, han aparegut certs estudis que han aportat nous coneixements i fins i tot la descripció d'algun nou regulador.

En aquest apartat es resumeix el que se sap fins ara de la regulació a nivell transcripcional de les diferents classes de RNRs.

1.2.3.1. Classe Ia

La **classe Ia procariota** (en aquest cas es pren com a model *E. coli*) està formada per una única unitat transcripcional de 3,2 Kb formada per dos gens: *nrdA* (2286 pb), que codifica per la subunitat α , i *nrdB* (1131 pb) que codifica per la subunitat β (Hanke and Fuchs, 1983).

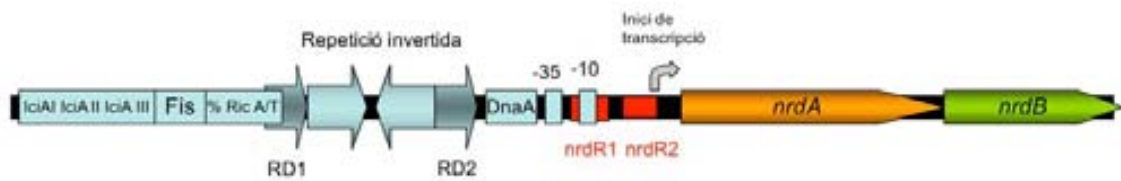


Figura 6. Representació esquemàtica de l'operó *nrdAB* d'*E. coli*.

Com es mostra a la **Figura 6**, en la regió promotora corrent amunt de *nrdA* hi trobem les caixes -10 i -35 amb la seqüència consens típica bacteriana. A continuació hi trobem la seqüència d'unió de la **DnaA**, formada per dos caixes DnaA de 9-mer (Tuggle and Fuchs, 1986), on s'ha demostrat que DnaA s'uneix i regula positivament la transcripció de *nrdAB* (Augustin *et al.*, 1994).

La regulació de l'operó està lligada al cicle cel·lular (Sun and Fuchs, 1992). Inicialment es considerava que aquesta regulació era independent de DnaA i Fis, i que possiblement hi havia un altre mecanisme que lligava la transcripció de l'operó al cicle cel·lular. De fet, s'ha descrit una **seqüència rica en A-T** situada entre la posició -139 i -124 respecte l'inici de transcripció i que queda immediatament corrent amunt d'una **repetició invertida de 45 pb**, que seria la responsable de la connexió entre el cicle cel·lular i la transcripció de *nrdAB* (Jacobson and Fuchs, 1998; Sun *et al.*, 1994). Recentment però, Gon *et al* (Gon *et al.*, 2006) han descrit que la DnaA exerceix de nexa d'unió entre la transcripció de *nrdAB* i el cicle cel·lular. Sembla ser que DnaA unida a ATP actuaria com a repressor de *nrdAB*, fet que estaria en contradicció amb les observacions fetes per Augustin (Augustin *et al.*, 1994) (Per a més informació dirigir-se a la revisió (Herrick and Sclavi, 2007)).

La transcripció de *nrdAB*, a part d'estar lligada al cicle cel·lular, també es troba incrementada pel dany al DNA i per la inhibició de la replicació del DNA (ja sigui per la manca de timina, la inhibició de la DNA girasa provocada pel tractament amb àcid nalidíxic, el tractament amb hidroxiiurea, o bé en mutants condicionals en gens necessaris per l'elongació o la iniciació del DNA) (Filpula and Fuchs, 1977; Hanke and Fuchs, 1983; Tuggle and Fuchs, 1990).

Corrent amunt de les caixes d'unió de DnaA també hi ha descrita una caixa d'unió de **Fis** que també actuaria com a activador de la transcripció de *nrdAB* (Augustin *et al.*, 1994). Sembla ser que aquesta activació de l'operó *nrdAB* dependent de Fis també dependria del superenrotllament del DNA (Sun and Fuchs, 1994). I corrent amunt d'aquesta caixa d'unió de Fis també s'ha descrit una regió d'unió de la proteïna **IciA** que activaria la transcripció fins a 5 vegades més (Han *et al.*, 1998).

S'han descrit mutants deficients en els sistemes de tioredoxines i glutaredoxines, responsables de la reducció de les RNRs de classe I i II, que presenten un augment de l'expressió dels gens *nrdAB* (Gallardo-Madueno *et al.*, 1998). També s'ha descrit que la transcripció de *nrdAB* no s'indueix en resposta al tractament amb peròxid d'hidrogen o paraquat, indicant que no forma part

Introducció

dels regulons OxyR o SoxRS (Prieto-Alamo *et al.*, 2000) responsables de la regulació en resposta a l'estrès oxidatiu. Un estudi d'un mutant en tres membres de la superfamília de tioredoxines no és capaç de créixer degut a la incapacitat de reduir la ribonucleotidil reductasa (Ortenberg *et al.*, 2004). Però l'aparició de mutacions supressores en *dnaA* i *dnaN* són capaces de permetre el creixement degut a un increment en l'expressió de *nrdAB*.

Així doncs hi intervenen varies regions que actuen en *cis* activant la transcripció de l'operó *nrdAB*. La regulació d'aquesta classe sembla ser molt fina. Fins i tot, recentment s'ha descrit en *Streptomyces coelicolor* un nou nivell de regulació. Borovok *et al.* (Borovok *et al.*, 2006) descriuen un **riboswitch**, que es tracta d'una seqüència a l'extrem 5'UTR (regió no traduïda) del mRNA on s'hi uneixen petites molècules (vitamines, aminoàcids, i purines), en aquest cas el coenzim B12, i que genera una estructura secundària alternativa que causa la terminació de la transcripció de manera independent de ρ i, per tant, provoca la repressió de la classe Ia. *S. coelicolor* presenta tant classe Ia com classe II. La classe II és la responsable principal del creixement vegetatiu de *S. coelicolor* i també permet el creixement després d'un període de limitació d'oxigen. La classe Ia s'expressa també durant el creixement vegetatiu però a nivells molt més baixos. Aquesta nova regulació permetria una regulació negativa de l'expressió de la classe Ia dependent de B12 que, al seu torn, també és un cofactor essencial de la classe II.

La **classe Ia eucariota** que s'utilitza com a model és la de ratolí. En aquest cas el gen *nrdA* es troba codificat en el cromosoma 7 i el gen *nrdB* en el cromosoma 12.

La transcripció dels gens *R1* (*nrdA*) i *R2* (*nrdB*) està regulada pel cicle cel·lular amb uns nivells de trànscripats baixos o indetectables durant la fase G_0/G_1 i amb nivells màxims durant la fase S i amb una disminució quan les cèl·lules progressen cap a la fase $G_2 + M$ (Bjorklund *et al.*, 1990; Engstrom *et al.*, 1985). Els nivells de la proteïna R1 es produeixen en excés i són constants durant tot el cicle cel·lular de les cèl·lules en proliferació degut a que presenta una llarga vida mitja. Per tant, l'activitat global de l'enzim ve determinada pels nivells limitants de la proteïna R2, que són indetectables en G_1 i augmenten a la fase S (Engstrom *et al.*, 1985). La vida mitja tant curta de la proteïna R2 ve donada per la seva degradació depenent de Cdh1 durant la mitosis (Chabes *et al.*, 2003).

La transcripció de R1 està sota control d'un promotor sense caixa TATA regulat per proteïnes que s'uneixen a 4 elements del promotor: β , α , Inr (*Initator*) i γ . El elements β i α controlen la força del promotor. L'expressió de R1 específica del cicle cel·lular la controlen proteïnes que s'uneixen a l'element Inr i a l'element γ (Johansson *et al.*, 1995).

La transcripció de R2 està regulada per 4 regions d'interacció DNA-proteïna en el seu promotor, tres de les quals són necessàries per a l'activació específica del promotor durant l'inici de la proliferació i la quarta regió s'ha demostrat que s'uneix específicament al factor transcripcional NF-Y,

necessari per a l'alliberació del bloqueig transcripcional que impedeix passar a fase S. (Filatov and Thelander, 1995). A la vegada, molt proper al domini d'unió de NF-Y es troba un domini d'unió per al factor E2F4, que seria el responsable de la repressió de l'activitat del promotor de R2 durant la fase G₀/G₁ (Chabes *et al.*, 2004).

Els promotors de R1 i R2 també es veuen induïts en resposta al dany al DNA que provoca reparació per escisió de nucleòtids, com per exemple la radiació UV, però no pels danys provocats per altres agents. La inducció per radiació UV del promotor R2 utilitza un mecanisme d'activació diferent que el que és específic de proliferació (Filatov *et al.*, 1996).

Recentment s'ha descrit una nova subunitat R2 induïda pel dany al DNA de manera dependent de p53 (Tanaka *et al.*, 2000). Aquesta nova proteïna p53R2, unida a R1, seria la responsable de subministrar els dNTPs durant la reparació del DNA (Lin *et al.*, 2004; Nakano *et al.*, 2000).

Així com els mecanismes que regulen l'expressió de la classe Ia de ratolí són els mateixos que els de qualsevol RNR de mamífer (tret d'algunes excepcions), el cas de la classe Ia del llevat *Saccharomyces cerevisiae* és ben diferent. En *S. cerevisiae* existeixen dos gens que codifiquen la subunitat R1, RNR1 (el producte gènic es denomina Y1) i RNR3 (Y3). RNR1 és important per a la viabilitat durant la mitosis mentre que RNR3, els nivells de transcripció de la qual són baixos en condicions normals, no hi intervé. Sí que s'ha vist però, que la seva expressió augmenta en resposta al dany al DNA i és capaç de compensar una mutació letal en RNR1 si se sobreexpressa (Elledge and Davis, 1990). La subunitat R2 també està codificada per dos gens: RNR2 (Y2) i RNR4 (Y4). Tant RNR2 com RNR4 són essencials, essent RNR4 essencial per a la viabilitat mitòtica sobretot en determinats fons genètics.

Y4 presenta similituds amb Y2 però li manquen 51 residus a l'extrem amino terminal i presenta substitucions en certs residus conservats, alguns importants per a la unió de ferro, fet que implica que sigui molt difícil que pugui arribar a formar el centre difèrric necessari per a formar el radical tirosil en Y2 (Chabes *et al.*, 2000). Estudis recents han suggerit que la forma activa de Y2 de *S. cerevisiae* conté un heterodímer Y2Y4. No es coneix, però, si Y4 és necessari per proporcionar el ferro a Y2 o per ajudar en el correcte plegament de l'heterodímer i per a estabilitzar l'estructura de Y2, permetent d'aquesta manera la unió del ferro i la formació del radical tirosil (Perlstein *et al.*, 2005).

En llevats existeix un altre control de regulació de l'activitat de la RNR a part de la regulació transcripcional i al·lostèrica. Es va identificar una proteïna, Sml1, que afecta negativament els nivells de dNTPs en llevats. Sml1 interaccionaria amb Y1 durant la fase G₁ i inhibiria la seva activitat (Chabes *et al.*, 1999). Però quan la cèl·lula entra en fase S o experimenta danys en el DNA, aquesta proteïna és degradada i es produeix una desrepressió de l'activitat de la RNR i un conseqüent augment dels nivells de dNTPs que permeten una reparació del DNA més eficient (Zhao *et al.*, 2001).

1.2.3.2. Classe Ib

La classe Ib, que es troba essencialment en organismes procariotes, es va descobrir per primer cop en el nostre laboratori en estudis realitzats amb *S. Typhimurium* (Jordan *et al.*, 1994). La caracterització posterior d'aquesta subclasse portà a la reclassificació de la classe I en classe Ia (*nrdAB*) i classe Ib (*nrdEF*) basant-se tant en les diferències a nivell bioquímic que s'han comentat anteriorment, com en diferències a nivell genètic que es comentaran a continuació.

A nivell general, malgrat algunes excepcions, hi ha quatre gens responsables de la reducció de ribonucleòtids en la classe Ib. Es troben formant un única unitat transcripcional de 3,9 kb. La subunitat gran (α) està codificada per *nrdE* i la subunitat petita (β) està codificada per *nrdF*. A més hi ha dos ORF addicionals: *nrdH*, que codifica per un donador d'electrons similar a les glutaredoxines (Jordan *et al.*, 1997) i *nrdI*, una proteïna fins fa poc de funció desconeguda però que recentment ha demostrat ser una flavodoxina essencial tant *in vitro*, en *E. coli*, per al manteniment del centre difèrric que formarà el radical tirosil (Cotruvo and Stubbe, 2008) com *in vivo* en *S. pyogenes* (Roca *et al.*, 2008b).

A la **Figura 7** es mostra l'organització de l'operó *nrdHIEF* així com les regions més importants implicades en la seva regulació transcripcional. Aquesta organització és la típica que es troba a la família *Enterobacteriaceae* i en la majoria de bacteris gram positius. De tota manera, existeixen alguns microorganismes amb unes reorganitzacions atípiques, com ara *Corynebacterium ammoniagenes*, entre d'altres (Torrents *et al.*, 2003).

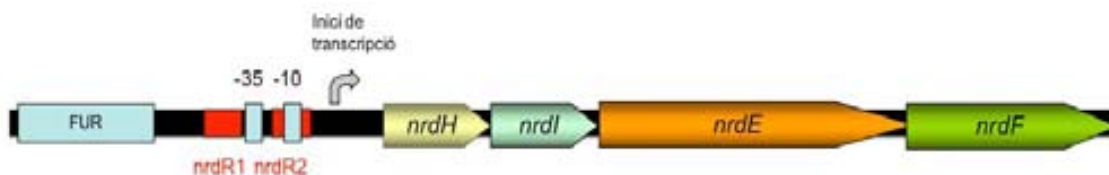


Figura 7. Representació esquemàtica de l'operó *nrdHIEF* de *S. Typhimurium*.

Quan es va descriure aquesta nova classe de RNR es va observar que la transcripció a partir de *nrdEF* era molt baixa en condicions normals de creixement però que s'induïa en un mutant *nrdAB_s* creixent a la temperatura restrictiva, tot i que els nivells absoluts no eren suficients per a suprimir l'efecte letal de la mutació *nrdAB_s*. Només s'aconseguia suprimir la mutació i assolir creixement quan s'afegia una còpia addicional de *nrdEF* en el cromosoma o en un plasmidi (Jordan *et al.*, 1996a).

La presència de dues classe I en la família *Enterobacteriaceae* ha estimulat l'aparició de molts estudis per a descobrir en quines condicions és necessària l'expressió de la classe Ib tenint en compte que és la classe la responsable del creixement en condicions aeròbiques.

L'expressió de l'operó *nrdEF* es veu incrementada pel tractament amb hidroxidreia (de forma anàloga que *nrdAB*) però a diferència de *nrdAB*, no ho és per efecte de molècules que inhibeixen la replicació del DNA o que lesionen el DNA, ni per la limitació de timina (Jordan *et al.*, 1996a). Aquesta activació per efecte de la hidroxidreia és independent del sistema SOS. També s'ha vist que la transcripció de *nrdEF* tampoc es veu afectada pel superenrotllament del DNA (Jordan *et al.*, 1996a).

Les condicions de creixement en medi mínim (M63 + 0,2% de glucosa) han estat descrites com a inductores de l'expressió de *nrdEF* (Tao *et al.*, 1999), així com també hi ha una relació amb la fase de creixement del cultiu, amb un màxim d'expressió a l'inici de la fase exponencial que disminueix fins a nivells molt més baixos al final d'aquesta fase (Monje-Casas *et al.*, 2001).

També s'ha descrit una certa relació amb el sistema oxidatiu cel·lular ja que en mutants en la tioredoxina 1 i en la glutaredoxina 1 l'expressió de *nrdHIEF* augmenta fins a 100 vegades. També hi ha una activació en resposta a l'estrès oxidatiu en tractar les cèl·lules amb peròxid d'hidrogen, 4-nitroquinolina i paraquat, així com en mutants en la hidropoxidasa I i en l'alquilhidropoxidasa. En qualsevol dels casos però, s'ha vist que el mecanisme és independent de RpoS, Fis, cAMP, OxyR, SoxRS o RecA (Monje-Casas *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2001).

La manca de ferro també s'ha descrit com a senyal inductora de l'expressió de l'operó *nrdHIEF*. Vassinova *et al.* (Vassinova and Kozyrev, 2000) describiren una possible caixa d'unió de Fur (*ferric uptake regulator*) en la regió promotora de *nrdHIEF* d'*E. coli*.

Fur és el regulador encarregat d'exercir un control sobre l'homeòstasi intracel·lular de la concentració de ferro ja que un excés d'aquest, sobretot en la seva forma reduïda, pot reaccionar amb les espècies reactives de l'oxigen (ROS, de l'anglès *reactive oxygen species*) potenciant-ne la seva toxicitat mitjançant la generació de radicals hidroxil a través de la reacció de Fenton (Touati, 2000):



Fur es va descriure inicialment en *E. coli* com una proteïna reguladora que controlava els gens implicats en la captació de ferro, però posteriorment s'ha descrit com a un regulador global. Consta de 17 kDa i presenta la capacitat d'unir-se al DNA depenent de la seva unió a Fe^{2+} . En condicions riques en ferro, Fur s'uneix a l'ió divalent, dimeritza i inhibeix la transcripció de determinats gens. La repressió ve mediada per la seva unió a una seqüència consens (caixa Fur) de 19 pb que impedeix l'inici de la transcripció mitjançant el bloqueig de la unió de la RNA polimerasa al promotor. Quan el ferro comença a escassejar, l'equilibri es desplaça per alliberar Fe^{2+} , provocant la desunió de

Introducció

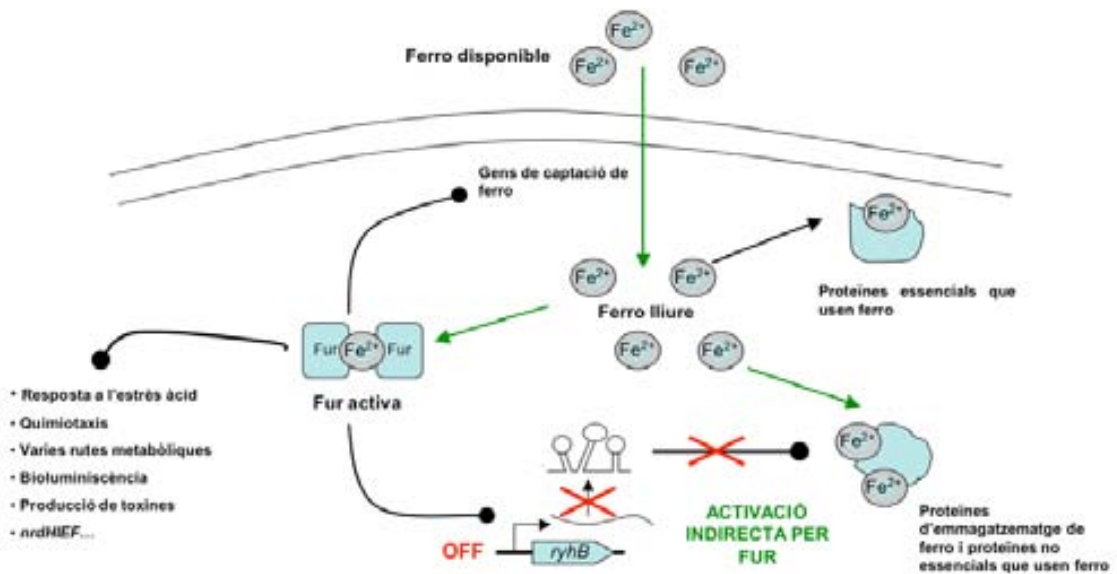
Fur. Llavors la RNA polimerasa té accés als promotors i els gens diana es poden expressar (Escolar *et al.*, 1999).

Normalment Fur actua com a repressor de gens implicats en la captació de ferro, en la resposta a l'estrès àcid, en la defensa contra els radicals d'oxigen, gens implicats en la quimiotaxis, en varies rutes metabòliques, en la bioluminiscència, en la producció de toxines i varis factors de virulència (Escolar *et al.*, 1999).

També s'han descrit gens que són activats per Fur. Entre ells destaquen gens del cicle dels àcids tricarboxílics, gens que codifiquen per ferritina i la superòxid dismutasa (Hantke, 2001). Recentment, en *E. coli* es va descriure que aquesta activació no era per unió directa de Fur als promotors d'aquests gens, sinó per la inhibició de la seva transcripció per efecte d'un sRNA, *ryhB*. Aquest sRNA està regulat negativament per Fur (Masse and Gottesman, 2002) i per tant, l'efecte que s'observava quan es mutava Fur era que *ryhB* s'expressava i el sRNA bloquejava la transcripció d'aquest grup de gens. Més endavant però, mitjançant estudis amb microxips de DNA s'ha vist que la xarxa de regulació de RyhB és més amplia: s'han trobat fins a 18 trànscrips que codifiquen per 56 proteïnes la majoria de les quals estan implicades en el metabolisme del ferro (Masse *et al.*, 2005).

Aquest doble sistema permet que els nivells de ferro intracel·lular disponibles s'ajustin perfectament en resposta a l'ambient on es trobi la cèl·lula. En condicions de limitació de ferro Fur es troba inactiu i RyhB bloqueja l'expressió de proteïnes no essencials que segresten ferro, de manera que la concentració de ferro augmenta significativament perquè el ferro pugui ser usat per proteïnes essencials, com ara les ribonucleotidil reductases, que no són diana per a la regulació negativa de RyhB. Per la seva banda, Fur deixarà de reprimir els gens implicats en la captació de ferro, entre d'altres, per a poder aprofitar al màxim la poca quantitat de ferro present. A la vegada, aquest augment en la concentració de ferro provocat per RyhB finalment acabarà activant altre cop a Fur que aleshores reprimirà els gens implicats en la captació de ferro i també RyhB, tancant així el cercle (Jacques *et al.*, 2006) (**Fig. 8**).

A.



B.

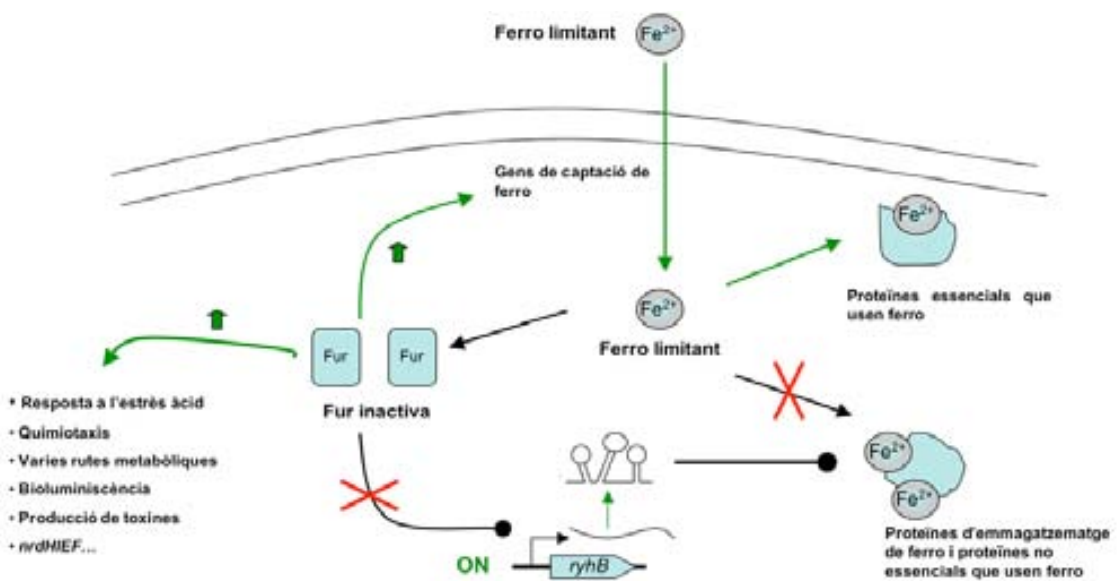


Figura 8. Representació esquemàtica de la funció de Fur en presència de ferro (A) i en condicions limitants de ferro (B). Adaptada de Massé *et al.* (Masse *et al.*, 2007).

Fur és capaç d'autorregular-se quan està unit a Fe^{2+} però a més, la seva regulació està lligada al metabolisme de la cèl·lula mitjançant la unió de CRP (de l'anglès, *cAMP-catabolite repressor protein*) (Escobar *et al.*, 1999) i s'activa en resposta a l'estrès oxidatiu mitjançant OxyR i SoxR (Zheng *et al.*, 1999).

Introducció

D'aquesta manera, quan les concentracions d'espècies reactives com el peròxid d'hidrogen o els ions superòxid són suficientment altes, augmenta la concentració intracel·lular de Fur i d'aquesta manera es paralitza la captació de més ferro que podria ser perjudicial a través de la ja descrita reacció de Fenton (Touati, 2000).

Hi ha altres exemples de l'activació de la classe Ib en resposta a l'estrès oxidatiu. En *Corynebacterium ammoniagenes* (Torrents *et al.*, 2003) la transcripció de l'operó *nrdHIE* i de *nrdF* augmenta de 4-6 vegades en presència de peròxid d'hidrogen i manganès. S'han identificat dues seqüències en el seu promotor que serien reconegudes per DtxR, un regulador transcripcional que respòn a ions metàl·lics, equivalent a Fur (Tao *et al.*, 1994).

La classe Ib doncs, en el cas de la família *Enterobacteriaceae*, es troba acompanyada de la classe Ia i la classe III, però la responsable durant el creixement en condicions aeròbiques és la classe Ia. Això sembla lògic tenint en compte els nivells d'expressió de l'operó *nrdHIEF*, però hi ha altres exemples on la classe Ib és l'única reductasa responsable de la reducció de ribonucleòtids en presència d'oxigen. És el cas dels gèneres *Streptococcus*, *Mycoplasma*, *Bacillus* i *Corynebacterium ammoniagenes*. Queda pendent doncs, esbrinar en quines condicions s'utilitza la classe Ib en la família *Enterobacteriaceae*.

1.2.3.3. Classe II

La regulació gènica de la classe II és potser la més desconeguda fins ara. Experimentalment només es tenen resultats en estudis amb *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces clavuligerus* i *Mycobacterium tuberculosis*. Tots ells presenten a més, la classe I, excepte *P. aeruginosa* que també presenta la classe III.

La classe II està codificada per un únic gen, *nrdJ*, en la majoria de casos tret de *P. aeruginosa*, on es troba codificada en dos gens: *nrdJa* i *nrdJb* que es cotranscriuen (Torrents *et al.*, 2005).

En *P. aeruginosa* la transcripció de la classe II va lligada al cicle cel·lular amb un màxim a la fase estacionària. Tot i ser la classe Ia la reductasa funcional durant el creixement en aerobiosi, la classe II sembla que seria la responsable durant la reparació del DNA i/o la replicació del DNA en condicions de baixa tensió d'oxigen (Torrents *et al.*, 2005).

En *S. clavuligerus* i *S. coelicolor* es va descriure la presència tant d'una RNR de classe Ia com una de classe II. L'expressió d'aquestes dues reductases presentava diferències durant el creixement. La classe II és la responsable del creixement vegetatiu i els seus nivells d'expressió són constants al llarg de tot el cicle cel·lular mentre que la classe Ia s'expressa de 10 a 20 vegades menys que la classe II a l'inici del creixement exponencial i encara disminueix a mitjans i final de la fase

exponencial (Borovok *et al.*, 2002). Posteriorment, va aparèixer un altre estudi on s'especificava que la classe Ia és capaç de suportar el creixement en un mutant en la classe II sense tenir un efecte en el creixement. La classe II a més, facilitaria la recuperació del creixement després de la manca d'oxigen i podria ser la responsable de subministrar dNTPs per a la reparació del DNA (Borovok *et al.*, 2004).

En *M. tuberculosis* la classe Ib és la responsable del creixement en condicions normals mentre que la classe II s'activa en condicions de microaerofilia però no sembla estar implicada en la patogènesi i no és essencial per a la supervivència en condicions hipòxiques *in vitro* (Dawes *et al.*, 2003).

Encara manca molta informació per poder comprendre la regulació de la classe II, però seria força interessant conèixe'n la regulació sobretot en aquells organismes on la classe II és la única present.

1.2.3.4. Classe III

No ha estat fins recentment que la regulació transcripcional de la classe III d'*E. coli* ha estat estudiada amb més profunditat.

La classe III es troba codificada en l'operó *nrdDG* que es transcriu com una sola unitat transcripcional de 3 Kb. *nrdD* codifica per la subunitat α i *nrdG* codifica pel que s'anomena l'activasa, una subunitat més petita necessària per a l'activació del mecanisme de la reacció (Fig. 9).

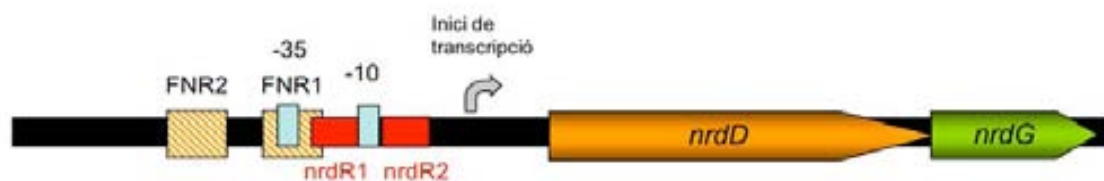


Figura 9. Representació esquemàtica de l'operó *nrdDG* d'*E. coli*.

Com s'ha comentat en l'apartat 1.2.1, la classe III funciona en condicions d'anaerobiosi ja que la presència d'oxigen impedeix la formació del radical glicil. Inicialment es va observar que un mutant en *nrdDG* en condicions de microaerofilia era capaç de créixer sobreexpressant els *nrdAB*, però si es feia créixer en condicions d'anaerobiosi estricta era incapaç de créixer. Aquesta dependència de l'oxigen feia lògic suposar l'existència de mecanismes d'activació o de repressió de les classes aeròbica i anaeròbica en funció de les condicions de creixement (Garriga *et al.*, 1996).

Introducció

Estudis en el nostre grup amb la classe III de *E. coli* semblaven indicar una regulació dependent de FNR (I. Roca, comunicació personal) però no va ser fins l'any 2003 que va aparèixer un treball on es descrivia la presència de dues caixes d'unió a FNR (de l'anglès, *fumarate and nitrate reduction*) en la regió promotora de *nrdDG* i on es demostrava que aquest regulador era el responsable de la seva activació en anaerobiosi (Boston and Atlung, 2003). FNR és un regulador d'un sol component que activa la transcripció d'alguns gens implicats en el metabolisme anaeròbic i reprimeix la síntesi d'alguns gens necessaris pel creixement en aerobiosi (Kiley and Beinert, 1998; Williams *et al.*, 1998).

Recentment, Roca *et al.* (Roca *et al.*, 2008a) han aprofundit una mica més en la regulació de l'operó *nrdDG* mediada per FNR. S'ha vist que l'activació també és independent del sistema de dos components ArcA-ArcB (de l'anglès, *aerobic respiration control*). La proteïna de membrana ArcB és l'encarregada de detectar les condicions de manca d'oxigen i activa ArcA que reprimirà la transcripció de gens que funcionen en aerobiosi (Lynch and Lin, 1996) i activarà alguns gens del metabolisme anaeròbic (Fu *et al.*, 1991; Park and Gunsalus, 1995). Roca *et al.* també demostren tant *in vivo*, mitjançant fusions transcripcionals, com *in vitro*, amb assajos de retardament electroforètic, que la unió de FNR és directa i que s'uneix a les dues caixes consens de la regió promotora de *nrdDG*. L'estudi de mutants en una de les dues caixes (FNR-1 o FNR-2) indica que les dues estan implicades en la unió de FNR, essent la caixa FNR-2 la que presenta major afinitat pel regulador.

El mecanisme de regulació per FNR funcionaria de la següent manera: a mesura que disminueix la pO_2 (condicions de microaerofília), la quantitat de FNR activa va augmentant proporcionalment i ja hi ha suficient FNR activa per unir-se a la caixa FNR-2 d'alta afinitat. En aquesta situació l'expressió de *nrdDG* no és màxima però amb la sobreexpressió de *nrdA* la cèl·lula és capaç de proliferar. Quan la manca d'oxigen és màxima (anaerobiosi estricta), la classe I no és funcional i l'enzim anaeròbic és la única font de reducció de ribonucleòtids. En aquest punt, la quantitat de FNR activa és màxima i s'uneix a les dues caixes d'unió.

1.2.3.5. NrdR, regulador global

Durant l'anàlisi de la classe I i classe II de *Streptomyces* spp. es va detectar un ORF a l'extrem 5' de *nrdJ*, que van denominar *orfR*, i que codificava per una proteïna de 172 aminoàcids de funció desconeguda. Es va descriure com una proteïna que contenia dos parells de cisteïnes en una seqüència que semblava un remanent del lloc actiu redox que es troba en les tioredoxines i les glutaredoxines. També presentava una regió molt conservada amb quatre arginines consecutives de funció desconeguda. L'extrem N-terminal es va descriure com a molt hidrofílic amb molts residus carregats (Borovok *et al.*, 2002).

Més endavant el mateix grup va aprofundir la descripció bioquímica de NrdR demostrant el seu paper com a regulador transcripcional. NrdR conté un ATP-cone com el present en el lloc d'activitat al·lostèrica de molts dels enzims de la classe Ia (Aravind *et al.*, 2000), l'extrem N-terminal és un dit de zinc (*zinc finger*, en anglès) que és el domini responsable de la unió al DNA, i l'extrem C-terminal és un domini àcid de funció desconeguda. Aquest estudi fou el primer en descriure que NrdR és un repressor de la classe Ia i II de *Streptomyces* spp. donat que observaven un augment en la seva transcripció en un mutant *nrdR* (Borovok *et al.*, 2004).

Al cap de poc, mitjançant un estudi de genòmica comparada, es van descriure caixes d'unió de NrdR en la regió promotora de gran part de les tres classes de RNRs presents en molts organismes (Rodionov and Gelfand, 2005). El lloc d'unió de NrdR és una repetició en tàndem de 16 pb el motiu consens de la qual és acaCwAtATaTwGtgt.

Mentre s'estava realitzant la part d'aquest treball que estudia la regulació de NrdR en les diferents classes de RNRs presents en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, Torrents *et al.* (Torrents *et al.*, 2007) van publicar la descripció d'aquesta regulació en un altre membre de la família *Enterobacteriaceae*, en *E. coli*. Per aquest motiu, molts dels resultats que es descriuran en aquest treball en *Salmonella* es troben ja descrits també en *E. coli*.

1.2.4. Distribució i evolució de les RNRs

La vida, tal i com la concebem actualment, està basada en el que anomenem un “món de DNA”, és a dir, la molècula central és el DNA. Si bé aquesta és una molècula essencial, no actua de manera individual, ja que per a la seva auto-replicació i funció també són necessàries altres molècules igualment importants: el RNA i les proteïnes.

El DNA conté la informació necessària per a la formació d'un ésser viu, i es transmet de generació en generació, però aquesta informació s'ha de traduir mitjançant la maquinària cel·lular (on hi intervenen les proteïnes). La molècula que serveix de nexa d'unió entre el DNA i la maquinària cel·lular és el RNA (mRNA).

Però des d'un punt de vista evolutiu, aquest fluxe de la informació genètica (DNA-mRNA-proteïna, o altrement dit, dogma central de la biologia molecular) presenta un problema. Què va aparèixer abans, el RNA, el DNA o les proteïnes?

La solució va aparèixer quan Cech i Altman van descriure que l'RNA presentava capacitat autocatalítica. És a dir, que era capaç de replicar la informació que emmagatzemava (com el DNA) a la vegada que funcionava com a autocatalitzador (com les proteïnes). Això va donar lloc al concepte de “món RNA” (Gilbert, 1986). No obstant això, la molècula de RNA presenta unes característiques que la fan poc estable i per tant, no massa útil per a l'emmagatzematge d'una informació genètica que

Introducció

s'ha de passar de generació en generació, així com també presenta una baixa fidelitat en el procés de transcripció. Per aquests motius, sembla plausible l'aparició d'una molècula més estable i amb una major fidelitat en la transmissió de la informació genètica. Sabent que l'oxigen que es troba en la posició 2'- de la ribosa és el principal responsable de la inestabilitat de la molècula de RNA, l'eliminació d'aquest oxigen ajudaria a estabilitzar la molècula. L'enzim que va fer possible aquesta reacció i que per tant va permetre el pas a un "món DNA" va ser la ribonucleotidil reductasa.

Actualment es troben organismes que presenten només una classe, altres que en presenten dues i d'altres que fins i tot en presenten de les tres classes. Les tres classes presenten diferències tant a nivell estructural, en el mecanisme que utilitzen per a generar el radical, en els cofactors que utilitzen i en el requeriment d'oxigen, però totes elles realitzen la mateixa funció. Això fa sorgir certes qüestions: (1) Les RNRs que trobem a l'actualitat provenen d'un ancestre comú i han seguit un procés d'evolució divergent provocat per la pressió ambiental o bé van sorgir les tres de manera independent i les similituds que veiem són degudes a un procés d'evolució convergent? (2) Si l'evolució és a partir d'un ancestre comú, quina de les tres classes de RNRs és la que està més relacionada amb la "ur"-reductasa primitiva?

La primera qüestió es pot respondre si tenim en compte que l'estructura terciària de les tres classes és molt semblant (les tres comparteixen l'estructura de barril β/α format per 10 làmines β), les cisteïnes del centre actiu es troben en una posició molt conservada en les tres classes, la regulació al·lostèrica és sorprenentment semblant i les tres classes utilitzen el mateix mecanisme per activar el substrat a partir d'un radical tiil. Totes aquestes similituds reforcen la idea de que les tres classes han patit un procés d'evolució divergent (Reichard, 2002; Stubbe *et al.*, 2001).

La segona qüestió és més compromesa i ha creat forces discrepàncies entre aquells que creuen que la "ur"-reductasa havia d'estar relacionada amb l'actual classe II (Poole *et al.*, 2002) i aquells que creien que havia de ser la classe III (Reichard, 1997, 2002). En qualsevol cas, el que sí que està acceptat és que la força que ha exercit de pressió evolutiva divergent sobre les RNRs ha estat l'oxigen. Tenint en compte que el DNA va aparèixer abans que l'oxigen, la primera reductasa havia de ser forçosament una reductasa anaeròbica. Així doncs, quedaria descartada la classe I depenent d'oxigen. La classe III és estrictament anaeròbia i la classe II pot funcionar tant en presència com en absència d'oxigen, per tant les dues serien bones candidates.

Els arguments a favor de la classe III com a RNR més relacionada amb la "ur"-reductasa són: (a) La classe III utilitza S-adenosilmetionina (SAM) per iniciar la reacció, que és un compost més simple que la S-adenosilcobalamina (AdoCobl) que utilitza la classe II. (b) Tant l'estructura com el mecanisme de generació del radical de la classe III són els mateixos que la piruvat format liasa (PFL), un enzim molt antic que catalitza una reacció molt important pel metabolisme energètic en anaerobiosi. (c) Per a generar el radical, a la classe III li cal un centre Fe-S. Aquests dos elements eren molt abundants a l'atmosfera inicial de la Terra, mentre que el cobalt, cofactor necessari per a la

classe II, era poc habitual. (d) La classe III fa servir el format, un dels reductants més simples, com a donador de poder reductor, a diferència dels sistemes complexos de tioredoxines i glutaredoxines que utilitzen les classes I i II. (e) La regulació al·lostèrica és menys especialitzada en la classe III, on cada lloc al·lostèric regula tant l'activitat com l'especificitat. En canvi, en la classe I i II, un dels llocs regula l'especificitat de substrat i l'altre (si hi és present) regula l'activitat de l'enzim (Reichard, 1993, 1997, 2002).

Els arguments a favor de la classe II són que (a) pot funcionar tant en presència com absència d'oxigen, (b) presenta una complexitat estructural més simple, només presenta una única cadena polipeptídica, i (c) la utilització de AdoCobl, malgrat la seva síntesi més complexa, genera el radical 5'desoxiadenosil més ràpidament que la SAM i sense necessitat de proteïnes accessòries (Poole *et al.*, 2002).

L'evolució divergent de les RNRs també va ser recolzada per un estudi sobre la història evolutiva de les RNRs a partir de la comparació de les seves estructures tridimensionals, a la vegada que se'n van deduir les seves relacions filogenètiques (Torrents *et al.*, 2002). També s'hi suggereix la classe III com el candidat més probable de representar la "ur"-reductasa. Consideren que donat que tant la classe II com la classe III estan presents en el domini Bacteria i Archeobacteria, les dues classes coexistien en l'Últim Ancestre Comú Universal (LUCA, de l'anglès, *Last Universal Common Ancestor*) i que la duplicació que va generar la classe II va tenir lloc en una etapa molt inicial en la història evolutiva del nostre planeta.

Així doncs, la primera duplicació a partir d'una classe III ancestral va generar la classe II que permetria la colonització dels ambients aeròbics que s'estaven creant a causa de la fotòlisis de l'aigua. En aquest punt comença la transició cap a una atmosfera aeròbica i es produeix una segona duplicació que permet l'aparició de la classe I, que presentarà una avantatge selectiu en el creixement aeròbic degut a que no necessitarà sintetitzar la costosa AdoCobl. La posterior fusió d'un bacteri portador de la classe I amb un arqueobacteri va produir la primera cèl·lula eucariota que contenia les tres classes, però les classes II i III van degenerar finalment essent la classe I la única present en tots els eucariotes (tret d'algunes excepcions, com *Euglena gracilis*, que també conté la classe II (Torrents *et al.*, 2006)). La classe Ib apareixeria per una duplicació de la classe Ia, o viceversa, aquest punt no queda massa clar.

Pel que fa a la distribució de les tres classes de RNRs en els diferents dominis de la vida, en la **Taula II** hi ha una mostra d'alguns dels organismes més representatius. En termes generals la classe Ia es troba com a única reductasa representant en el domini Eukarya, amb alguna excepció com *Euglena gracilis* (que només té classe II), i *Dictyostelium discoideum* (que té tant classe Ia com II). Les classes II i III són les principals representants en el domini Archaeobacteria (en *Halobacterium* sp. també conté la classe Ia, però es pensa que és degut a una transferència genètica horitzontal). En

Introducció

el cas del domini Bacteria, la diversitat és immensa. En aquest domini hi trobem els tres tipus de classes en totes les combinacions possibles.

Té sentit pensar que la presència de diferents classes de reductases en un mateix organisme és deguda a l'especialització en ambients aerobis o anaerobis. Així un organisme aerobi tindrà la classe I i/o II, un anaerobi, la classes II i/o III i un anaerobi facultatiu, les classes I+II, I+III, o II+III. Però el cert és que no hi ha un patró massa clar. Existeixen molts exemples de microorganismes que contenen reductases que poden funcionar en les mateixes condicions ambientals, altres que posseeixen les tres classes simultàniament, com ara *Pseudomonas aeruginosa* (presenta classe Ia, II i III), o *Bacteroides fragilis* (és anaerobi i presenta classes Ia, II i III) o la família *Enterobacteriaceae* (classe Ia, Ib, III) on hi trobem dues reductases aeròbiques, i fins i tot existeixen exemples de microorganismes amb dues reductases pertanyents a la mateixa classe (*Streptococcus pyogenes*, amb dues classes Ib, (Roca *et al.*, 2008b)). Quin és l'objectiu d'aquesta redundància?

Taula II. Mostra de la distribució de les RNRs en els tres dominis de la vida. La informació del contingut de RNRs en els diferents organismes s'han obtingut de <http://rnrd.b.molbio.su.se/>, actualitzat per última vegada el 28/10/2008. (Adaptat de Tesi doctoral de Roca, I. (Roca, 2007))

Espècie	Metabolisme	Estat de la seqüència	Classe RNR	Número d'accés
ARCHAEBACTERIA				
Crenarchaeota				
<i>Aeropyrum pernix</i>	AE	G	II	NC_000854
Euryarchaeota				
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AN	G	II	NC_000917
<i>Halobacterium sp.</i>	AE	G	Ia, II	NC_002607
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	AN	G	II, III	NC_000916
<i>Methanococcus maripaludis</i>	AN	G	III	NC_005791
<i>Pyrococcus abyssi</i>	AN	G	II, III	NC_000868
<i>Pyrococcus furiosus</i>	AN	G	II, III	NC_003413
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	AN	G	II, III	NC_000961
BACTERIA				
Actinobacteria				
<i>Bifidobacterium longum</i>	AN	G	Ib, III	NC_004307
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	AE	S	Ib	Y09572
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	AE	G	Ib(2F,2I), III	NC_002935
<i>Corynebacterium efficiens</i>	AE	G	Ib(2F), III	NC_004369
<i>Mycobacterium avium</i>	AE	G	Ia, Ib	NC_008595
<i>Mycobacterium bovis</i>	AE	G	Ib, II	NC_008769
<i>Mycobacterium leprae</i>	AE	G	Ib, II	NC_002677
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	AE	G	Ib, II	NC_008596
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	AE	G	Ib(2F), II	NC_000962
<i>Propionibacterium acnes</i>	AN	G	Ia, II, III	NC_006085
<i>Streptomyces clavuligerus</i>	AE	S	Ia, II	AJ224870
<i>Streptomyces coelicor</i>	AE	G	Ia, II	NC_003888
Aquificales				
<i>Aquifex aeolicus</i>	AE	G	Ia	NC_000918
Cyanobacteria				
<i>Anabaena variabilis</i>	AE	G	II	NC_007413
<i>Nostoc sp.</i>	AE	G	II	NC_003272
<i>Prochlorococcus marinus</i>	AE	G	II	NC_007577
<i>Synechocystis sp.</i>	AE	G	Ia	NC_000911
Grup Bacteroidetes/Chlorobi				
<i>Bacteroides fragilis</i>	AN	G	Ia, II, III	NC_003228
<i>Chlorobium chlorochromatii</i>	AN	G	II	NC_007514
<i>Chlorobium tepidum</i>	AN	G	II	NC_002932
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	AN	G	II, III	NC_002950
<i>Salinibacter ruber</i>	AE	G	Ia, II	NC_007677
Firmicutes (bacteris gram positius)				
<i>Bacillus anthracis</i>	AE	G	Ib, III	NC_005945
<i>Bacillus cereus</i>	FA	G	Ib, III	NC_003909
<i>Bacillus halodurans</i>	AE	G	Ia, II	NC_002570
<i>Bacillus subtilis</i>	AE	G	Ib(2x)	NC_000964

Introducció

Espècie	Metabolisme	Estat de la seqüència	Classe RNR	Número d'accés
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	AN	G	Ia, II, III	NC_003030
<i>Clostridium difficile</i>	AN	G	Ib, II, III	AM180355
<i>Clostridium perfringens</i>	AN	G	Ia, III(2x)	NC_003366
<i>Clostridium tetani</i>	AN	G	II, III	NC_004557
<i>Enterococcus faecalis</i>	FA	G	Ib, III	NC_004668
<i>Lactobacillus leichmannii</i>	FA	S	II	L20047
<i>Lactobacillus plantarum</i>	FA	G	Ib, III	NC_004567
<i>Lactococcus lactis</i>	FA	G	Ib, III	NC_002662
<i>Listeria monocytogenes</i>	FA	G	Ia, III	NC_003210
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	FA	G	Ib	NC_004829
<i>Mycoplasma genitalium</i>	FA	G	Ib	NC_000908
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	FA	G	Ib	NC_006360
<i>Mycoplasma penetrans</i>	FA	G	Ib, III	NC_004432
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	FA	G	Ib	U00089
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	FA	G	Ib	NC_002771
<i>Staphylococcus aureus</i>	FA	G	Ib, III	NC_002745
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	FA	G	Ib, III	NC_004461
<i>Streptococcus agalactiae</i>	FA	G	Ib(x2), III	NC_004116
<i>Streptococcus mutans</i>	FA	G	Ib, III	NC_004350
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	FA	G	Ib, III	NC_003098
<i>Streptococcus pyogenes</i>	FA	G	Ib(2x), III	NC_002737
<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	AN	G	II, III	NC_003869
Grup Plantomyces/Chlamydia				
<i>Chlamydia trachomatis</i>	AE	G	Ia	NC_000117
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	AE	G	Ia	NC_002491
Proteobacteria				
Subdivisió Alfa				
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AE	G	Ib, II	NC_003062
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	AE	G	Ia, II	NC_004463
<i>Brucella abortus</i>	AE	G	Ib, II	NC_006932, NC_006933
<i>Caulobacter crescentus</i>	AE	G	Ia, II	NC_002696
<i>Erythrobacter litoralis</i>	AE	G	Ia	NC_007722
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	FA	G	II(2x)	NC_009428
<i>Rhodospseudomonas palustris</i>	FA	G	Ia, II, III	NC_008435
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	FA	G	Ia, II(2x), III	NC_007643
<i>Rickettsia prowazekii</i>	AE	G	Ia	NP_220889 NP_220888
Subdivisió Beta				
<i>Bordetella pertussis</i>	AE	G	Ia	NC_002929
<i>Burkholderia thailandensis</i>	AE	G	Ia, II, III	NC_007650, NC_007651
<i>Chromobacterium violaceum</i>	FA	G	Ia, II, III	NC_005085
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	AE	G	Ia	NC_002946
<i>Neisseria meningitidis</i>	AE	G	Ia	NC_003116
<i>Ralstonia eutropha</i>	FA	G	Ia, II, III	NC_007347, NC_007348
<i>Rhodoferrax ferrireducens</i>	FA	G	Ia, II, III	NC_007908
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	FA	G	Ia, II, III	NC_007404
Subdivisió Delta & Epsilon				
<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	AE	G	Ia, II, III	NC_005363

Espècie	Metabolisme	Estat de la seqüència	Classe RNR	Número d'accés
<i>Campylobacter jejuni</i>	AE	G	Ia	NC_003912
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	AN	G	II, III(2D)	NC_007519
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	AN	G	II	NC_002939
<i>Helicobacter pylori</i>	AE	G	Ia	AE000511
Subdivisió Gamma				
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	FA	G	Ia, III	NC_009053
<i>Chromohalobacter salexigens</i>	AE	G	Ia, Ib	NC_007963
<i>Erwinia carotovora</i>	FA	G	Ia, Ib, III	NC_004547
<i>Escherichia coli (Enterobacteriaceae)</i>	FA	G	Ia, Ib, III	NC_000913
<i>Francisella tularensis</i>	AE	G	Ia	NC_006570
<i>Haemophilus influenzae</i>	FA	G	Ia, III	ABQ98171, ABQ98169, ABQ98015
<i>Legionella pneumophila</i>	AE	G	Ia	NC_006368
<i>Pasteurella multocida</i>	FA	G	Ia, III	NC_002663
<i>Photobacterium profundum</i>		G	Ia, II, III	NC_006370, NC_006371
<i>Photorhabdus luminescens</i>		G	Ia, Ib, III	NC_005126
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	FA	G	Ia, II, III	NC_002516
<i>Pseudomonas putida</i>	FA	G	Ia	NC_002947
<i>S. Typhimurium</i> LT2	FA	G	Ia, Ib, III	NC_003197
<i>Shewanella denitrificans</i>	FA	G	Ia, III	NC_007954
<i>Shigella dysenteriae</i>	FA	G	Ia, Ib, III	NC_007606
<i>Shigella flexneri</i>	FA	G	Ia, Ib, III	NC_004337
<i>Shigella sonnei</i>	FA	G	Ia, Ib, III	NC_007384
<i>Vibrio cholerae</i>	FA	G	Ia, III	NC_002505 NC_002506
<i>Xylella fastidiosa</i>	AE	G	Ia	NC_004556
<i>Yersinia pestis</i>	FA	G	Ia, Ib, III	NC_003143
Spirochaetes				
<i>Borrelia burgorferi</i>	AE	G	Ia	NC_001318
<i>Treponema pallidum</i>	AE	G	Ia	NC_000919
Thermotogales				
<i>Thermotoga maritima</i>	AN	G	II, III	NC_000853
Grup Thermus/Deinococcus				
<i>Deinococcus radiodurans</i>	AE	G	Ib, II	AE001826
<i>Thermus thermophilus</i>	FA	G	Ia, II	NC_006461
Virus de Bacteria				
Micobacteriòfag L5		G	II	S30995
Fag T4		G	Ia, III	AF158101
Fag de <i>Roseobacter</i> SI01		G	II	NC_002519
EUCARYA I VIRUS D'EUCARIOTES				
Tots			Ia	
<i>Euglena gracilis</i>		S	II	CAF05662
<i>Dictyostelium discoideum</i>		G	Ia, II	NC_007087 fins NC_007092

Notes: AE: aerobi; AN: anaerobi; FA: anaerobi facultatiu; G/g: seqüència del genoma disponible (completa/parcial); S: seqüència del gen coneguda.

1.2.5. El cas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

En el cas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, com a membre de la família *Enterobacteriaceae*, presenta les RNRs de la classe Ia, Ib i III.

En el nostre grup estem interessats en esbrinar en quines condicions *S. Typhimurium* fa servir cada una de les RNRs. Com ja s'ha anat explicant en els apartats anteriors, la classe Ia sembla ser la responsable de la reducció de ribonucleòtids en condicions d'aerobiosi i la classe III durant anaerobiosi estricta. En quines condicions utilitza la classe Ib?

La classe Ib s'expressa molt en condicions d'estrès oxidatiu, en medi mínim i semblaria estar regulada pel ferro a través de Fur. Totes aquestes condicions són força similars a les que *S. Typhimurium* es troba durant el procés d'infecció. En aquest treball s'estudiarà quin és el paper de les ribonucleotidil reductases durant el procés infecciós. També es farà un estudi de la regulació que exerceixen el regulador global NrdR sobre les tres classes de RNRs codificades en *S. Typhimurium*, i el regulador Fur sobre l'operó *nrdHIEF*.

2. Objectius

Aquest treball ha estat dividit en dues parts: la primera part correspon a l'estudi a nivell transcripcional de la regulació de les RNRs de *S. Typhimurium* LT2, mentre que la segona part està centrada en l'estudi *in vivo* en cultius cel·lulars de la participació de les diferents classes de RNRs de *S. Typhimurium* SL1344 en el procés infecció. Els objectius concrets per a cada part són:

Part I – Estudi de la regulació transcripcional de les ribonucleotidil reductases de *S. Typhimurium* LT2.

1. Estudi de la regulació per NrdR de les diferents classes de RNRs presents en *S. Typhimurium*.
 - Estudi de l'efecte de la mutació $\Delta nrdR$ en la transcripció dels operons *nrdAB*, *nrdHIEF* i *nrdDG* de *S. Typhimurium*.
 - Relació entre el tractament amb hidroxidurea i l'efecte de NrdR sobre l'expressió dels operons *nrdAB*, *nrdHIEF* i *nrdDG* de *S. Typhimurium*.
 - Descripció de les caixes d'unió de NrdR en els operons *nrdAB*, *nrdHIEF* i *nrdDG* de *S. Typhimurium*.
 - Efecte de la mutació dels llocs d'unió de dATP/ATP de NrdR.
2. Estudi de la regulació de Fur (*ferric uptake regulator*) de l'operó *nrdHIEF* de *S. Typhimurium*.
 - Estudi de l'efecte de Fur en la transcripció de l'operó *nrdHIEF*.
 - Descripció de la caixa d'unió de Fur del promotor de l'operó *nrdHIEF*.
 - Descripció de la unió directa de Fur a l'operó *nrdHIEF* mitjançant assajos de retardament electroforètic.

Part II - Estudi de la implicació de les RNRs en la patogènesi de la soca virulenta *S. Typhimurium* SL1344.

1. Obtenció de mutants en les diferents classes de RNRs de *S. Typhimurium* SL1344.
2. Assajos d'infectivitat en línies cel·lulars de macròfags dels diferents mutants i combinacions de mutants de *S. Typhimurium* SL1344.
3. Assajos d'infectivitat en línies de cèl·lules epitelials dels diferents mutants i combinacions de mutants de *S. Typhimurium* SL1344.

3. Resultats: Part I: Estudi de la regulació transcripcional de les ribonucleotidil reductases de *S. Typhimurium*

3.1. Breu introducció

El genoma de *S. Typhimurium* té codificades tres classes de ribonucleotidil reductases (RNRs): la classe Ia, la classe Ib i la classe III. En condicions normals de creixement al laboratori, *S. Typhimurium* creix utilitzant la classe Ia i, en condicions d'anaerobiosi estricta, utilitza la classe III (Jordan *et al.*, 1996a). L'expressió de la classe Ib és molt baixa en condicions normals però es veu induïda en determinades condicions de creixement com ara la manca de nutrients o l'estrès oxidatiu (Monje-Casas *et al.*, 2001; Tao *et al.*, 1999).

Salmonella ha de ser capaç de respondre a un ambient canviant, així doncs, la síntesi de dNTPs en aquest microorganisme també ha d'anar lligada als canvis ambientals que poden acabar afectant la concentració de dNTPs a l'interior de la cèl·lula. Per tal de fer front a aquests canvis, la síntesi de dNTPs està altament regulada tant a nivell transcripcional com a nivell post-transcripcional (regulació al·lostèrica de l'enzim). La major part dels estudis en l'àmbit de les RNRs s'han centrat en la caracterització bioquímica d'aquests enzims (incloent-hi la regulació al·lostèrica), però encara es desconeixen la majoria dels mecanismes transcripcionals que controlen l'expressió de les ribonucleotidil reductases.

En aquesta part del treball s'ha volgut estudiar la regulació de les RNRs de *S. Typhimurium* LT2, centrant-nos en el paper de dos reguladors: Fur i NrdR. L'estudi del primer és la continuació d'uns treballs iniciats en el nostre laboratori, mentre que l'estudi del regulador NrdR va sorgir arrel de la seva descripció en *Streptomyces* spp. (Borovok *et al.*, 2004) i d'uns estudis previs realitzats al nostre laboratori on s'havia descrit una seqüència comuna a la regió promotora de les tres classes de RNRs de *S. Typhimurium* i que podria ser la seqüència de reconeixement d'un regulador global de totes les RNRs (Jordan *et al.*, 1995).

En aquest treball s'intentarà aprofundir una mica més en la regulació gènica de les RNRs amb l'objectiu d'aportar nova informació en un camp encara força desconegut.

3.2. Resultats

3.2.1. NrdR és un repressor de l'expressió dels operons *nrdAB*, *nrdHIEF* i *nrdDG* en *S. Typhimurium* LT2

En *S. Typhimurium*, el regulador NrdR (descriu inicialment en *Streptomyces coelicolor* (Borovok *et al.*, 2004)), es troba codificat en el gen *ybaD*, formant un operó amb *ribD-ribH-nusB-thiL-ggpA*, operó responsable de la biosíntesi de riboflavina. *ybaD* codifica per a una proteïna de 149 pb i 17,2 KDa de pes molecular que conté un ATP-cone i un dit de zinc (*zinc-finger*, en anglès).

Per tal d'estudiar l'efecte del regulador NrdR sobre l'expressió de les RNRs de *S. Typhimurium* LT2 es va procedir a la mutació del gen *nrdR*. A continuació, es van introduir en aquest fons genètic les fusions transcripcionals entre les regions promotores de les diferents RNRs i el gen indicador *lacZ*, amb la intenció d'estudiar-ne l'expressió mitjançant la mesura de la seva activitat β -galactosidasa.

La construcció del mutant *nrdR* es va realitzar mitjançant el mètode de Wanner & Datsenko (Datsenko and Wanner, 2000), descrit a l'apartat 7.4.8.2 dels Materials i Mètodes, amb els oligonucleòtids MutYbaDUp i MutYbaDLw (**Taula VII**) sobre el plasmidi pKD4 (**Taula VI**). La mutació elimina completament l'ORF del gen *nrdR*. A la soca que conté la resistència a Km associada a la deleció de *nrdR* (soca IG102) se li va eliminar la resistència per a obtenir el mutant sense marcar, generant la soca IG103 (**Taula V**).

Les fusions de les regions promotores de l'operó *nrdAB* i *nrdHIEF* ja formaven part de treballs anteriors realitzats en el nostre laboratori. En aquest treball només es va realitzar la construcció de la fusió de l'operó *nrdDG* emprant els oligonucleòtids SalDproUp i SalDproLw (**Taula VIII**), que amplificaven una regió de 492 pb corrent amunt del gen *nrdD* on s'hi troben les regions reguladores. La construcció de la fusió amb el gen *lacZ* es va realitzar tal i com s'indica a l'apartat 7.4.9 dels Materials i Mètodes.

La soca IG102 és va fer servir per a obtenir un lisat fàgic de P22 HT *int* i se'n va transduir la mutació $\Delta nrdR::Km$ a la soca de *S. Typhimurium* LT2 que contenia la fusió *nrdAB-lacZminiTn5-Spc*, generant la soca LT2 *nrdAB-lacZminiTn5-Spc* $\Delta nrdR::Km$, a la qual se li va eliminar la resistència a kanamicina donant lloc a la soca IG104 (**Taula V**). Les fusions dels operons *nrdHIEF* i *nrdDG* es van transduir de forma similar sobre la soca IG103 (que porta la mutació $\Delta nrdR$ sense marcar) originant les soques de LT2 $\Delta nrdR$ *nrdEF-lacZminiTn5-Km2* i LT2 $\Delta nrdR$ *nrdDG-lacZminiTn5-Km2*, denominades IG105 i IG106 respectivament.

L'anàlisi de l'activitat β -galactosidasa en aquestes soques mostra com la mutació $\Delta nrdR$ (**Fig.10**) augmenta la transcripció de les tres classes de RNRs, un efecte que s'observa al llarg de totes les fases del creixement en el cas de *nrdAB* i *nrdHIEF*. En el cas de *nrdAB* l'augment és de 3 vegades respecte la soca salvatge, i en el cas de *nrdHIEF* l'augment és més espectacular, fins a 12 vegades més expressió respecte la soca salvatge. L'operó *nrdDG* crescut en anaerobiosi mostra un augment de 5 vegades respecte a la soca control crescuda en les mateixes condicions.

Per tal de comprovar que l'efecte d'aquest augment era degut a la mutació en el gen *nrdR*, es va procedir a la complementació de la mutació utilitzant un vector d'expressió induïble per arabinosa, pBAD33, que contenia el gen *nrdR* sota el control del promotor arabinosa (P_{BAD}), amplificat a partir dels oligonucleòtids RBSUpnrdR i RBSLwnrdR (**Taula VII**). Aquest amplicó de 450 pb es va clonar entre les dianes *SacI* i *XbaI* del pBAD33 per donar lloc al plasmidi pIG85 (**Taula VI**). La introducció d'aquest plasmidi a les soques IG104, IG105 i IG106 restaurava, en presència d'arabinosa, els nivells d'expressió de tots tres operons fins a un nivell equivalent a la soca salvatge (**Fig. 10**).

Així doncs, NrdR actua com a repressor de les tres classes de RNRs presents en *S. Typhimurium*, observant-se un efecte més pronunciat en el cas de l'operó *nrdHIEF*.

Part I: Regulació transcripcional de les ribonucleotidil reductases de *S. Typhimurium*

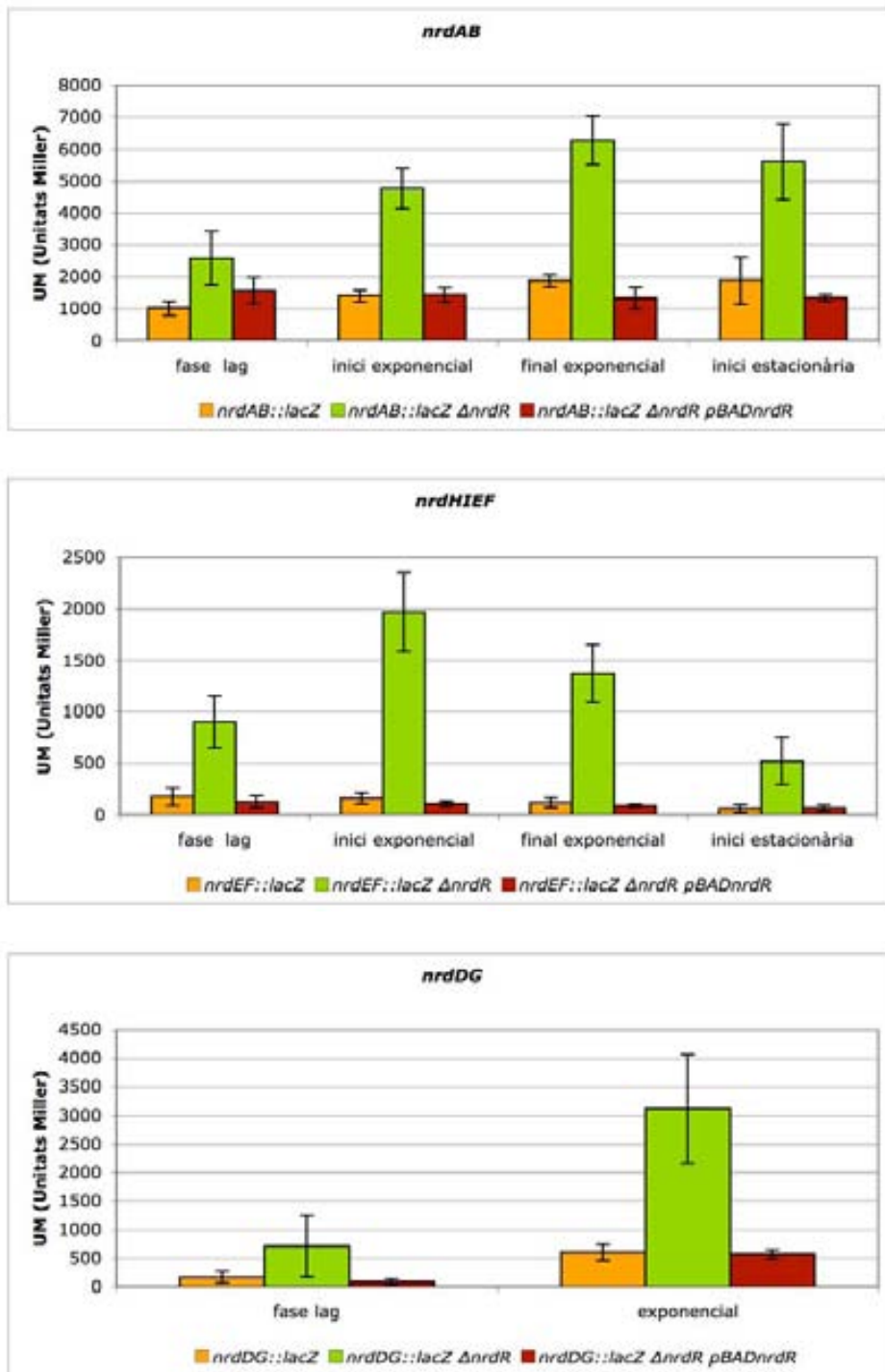


Figura 10. Regulació de l'expressió de les RNRs de *S. Typhimurium* LT2 per NrdR. Representació de l'activitat β -galactosidasa expressada en Unitats Miller de les fusions de les regions promotores dels operons *nrdAB*, *nrdHIEF* i *nrdDG* amb el gen *lacZ*. Els resultats són la mitjana de duplicats de com a mínim tres experiments independents. Les barres d'error representen la desviació estàndard dels experiments.

A finals de la dècada del 1970 Filpula & Fuchs (Filpula and Fuchs, 1977) van observar que l'addició d'hidroxiurea al medi de cultiu induïa l'expressió dels gens de la classe Ia en *E. coli* (Filpula and Fuchs, 1978), i posteriorment es va veure que això també era cert per als gens de classe Ib tant en *E. coli* i *S. Typhimurium* com en altres microorganismes (Jordan *et al.*, 1996a; Torrents *et al.*, 2003). La hidroxiurea és capaç de segrestar el radical tirosil de la subunitat petita de la classe I, inhibint-ne l'activitat enzimàtica, però es desconeix com aquesta dramàtica reducció de l'activitat de l'enzim desencadena un augment de la seva expressió transcripcional. Sempre s'ha cregut en l'existència d'un regulador que s'encarrega de detectar la concentració intracel·lular de nucleòtids i que activa o reprimeix la transcripció dels gens *nrd* en funció de la seva demanda. El repressor NrdR podria ser aquest regulador, ja que podria usar el domini ATP-cone per a detectar la concentració d'ATP o dATP (de manera similar a com ho fa el domini al·lostèric d'activitat en la classe Ia) i modular així la unió del repressor al DNA, activant o reprimint-ne la transcripció.

Per tal d'observar la possible relació entre la hidroxiurea i NrdR vam realitzar assajos β -galactosidasa amb les tres classes de RNRs amb i sense la mutació $\Delta nrdR$ en presència de 10 mM d'hidroxiurea. Esperaríem que si el repressor NrdR tenia alguna relació amb l'efecte de la hidroxiurea sobre les RNRs, no hi hauria d'haver diferències entre la inducció produïda per la hidroxiurea en les soques salvatges i en les soques mutants $\Delta nrdR$.

Els nostres resultats (**Fig. 11**) indiquen que efectivament no hi ha diferències entre els nivells d'expressió de la soca salvatge i la soca mutant $\Delta nrdR$ tractades amb hidroxiurea i la soca mutant $\Delta nrdR$ sense tractar en el cas dels operons *nrdAB* i *nrdHIEF* en condicions aeròbiques. En canvi, en el cas de l'operó *nrdDG*, tant en aerobiosi com en anaerobiosi la hidroxiurea no augmenta l'expressió de la soca salvatge ni de la mutant, això té sentit tenint en compte que l'activitat de la hidroxiurea és per l'efecte que aquesta té sobre el radical tirosil i no sobre el radical glicil que utilitza la classe III.

Així doncs, sí que semblaria que l'efecte que té la hidroxiurea sobre les RNRs és degut a la regulació de NrdR.

Part I: Regulació transcripcional de les ribonucleotidil reductases de *S. Typhimurium*

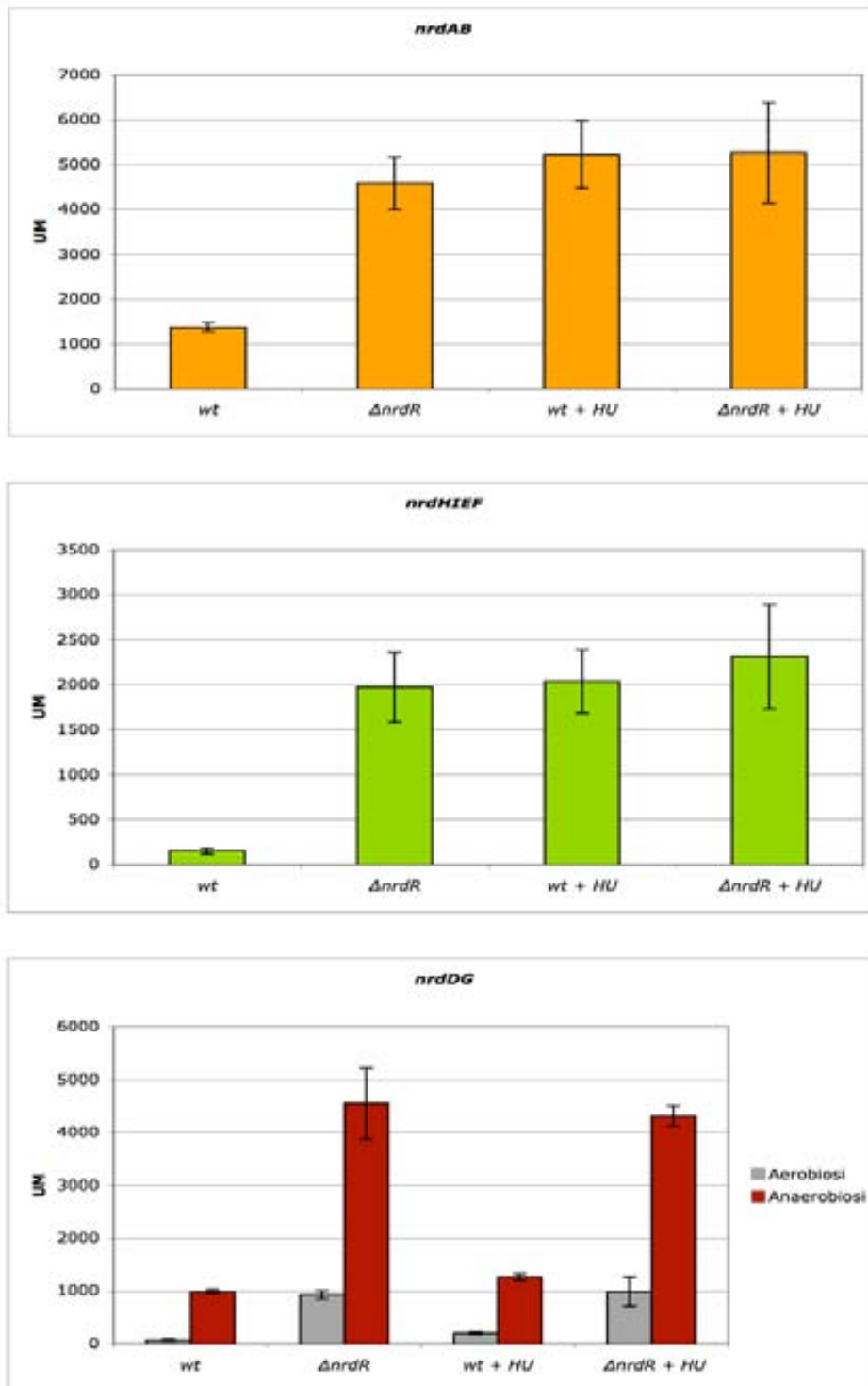


Figura 11. Efecte de l'hidroxiurea sobre l'expressió dels operons *nrdAB*, *nrdHIEF* i *nrdDG* de la soca salvatge i la soca mutant $\Delta nrdR$. Es va realitzar una resembra dels cultius de nit i al cap d'una hora s'inoculaven amb 10 mM d'hidroxiurea. L'assaig β -galactosidasa es va realitzar quan el cultiu havia estat creixent 1h en presència d'hidroxiurea i per tant, es trobava en fase exponencial. Els resultats són la mitjana de duplicats de

com a mínim tres experiments independents. Les barres d'error representen la desviació estàndard dels experiments.

3.2.2. Mutació de les caixes d'unió de NrdR

Ja l'any 1995, Jordan *et al.* (Jordan *et al.*, 1995) van observar que hi havia una seqüència comuna a la regió promotora de l'operó *nrdAB* i *nrdHIEF* tant d'*E. coli* com de *S. Typhimurium*. No en donaven una funció concreta però deixaven entreveure que potser podia tenir alguna relació amb l'augment de la transcripció, tant de *nrdAB* com de *nrdHIEF*, que s'observa quan s'afegeix hidroxidrea al medi. Centrant-nos en aquesta seqüència consens i en l'estudi realitzat per Rodionov & Gelfand on es van descriure les caixes d'unió de NrdR en la regió promotora de gran part de les tres classes de RNRs per mitjà d'un estudi bioinformàtic de genòmica comparada (Rodionov and Gelfand, 2005), vam determinar les possibles caixes d'unió de NrdR en els diferents operons de RNRs en *S. Typhimurium* LT2 (**Fig. 12**).

En paral·lel a la realització d'aquest treball va aparèixer un estudi de Torrents *et al.* (Torrents *et al.*, 2007) on també descriuen les caixes d'unió de NrdR però en *E. coli*. Les nostres caixes estan desplaçades dos parells de bases respecte les descrites per Torrents *et al.*, ja que aquestes dues últimes bases estan molt conservades. Típicament els gens *nrd* presenten dues caixes d'unió a NrdR disposades en tàndem al voltant de les caixes -10 i -35 (en alguns casos fins i tot trobem solapament entre aquestes seqüències).

Part I: Regulació transcripcional de les ribonucleotidil reductases de *S. Typhimurium*



Figura 12. Regions promotores de l'operó *nrdAB*, *nrdHIEF* i *nrdDG* de *S. Typhimurium*. Les caixes NrdR estan marcades amb el requadre vermell, en negreta les caixes -10 i -35, subratllades hi ha les caixes d'unió a DnaA (en *nrdAB*) i de FNR (en *nrdDG*). En negreta i subratllat hi ha el codó d'inici de traducció.

Per tal de demostrar que aquestes seqüències eren realment les caixes d'unió de NrdR, vam procedir a la seva mutació per a observar el seu efecte en la transcripció dels operons *nrdAB*, *nrdHIEF* i *nrdDG*. Per aquest motiu es va dur a terme la mutagènesi per *nested* PCR descrita a l'apartat 7.4.8.1 dels Materials i Mètodes.

Es van emprar els oligonucleòtids següents per amplificar els extrems 5' i 3' dels operons *nrdAB*, *nrdHIEF* i *nrdDG* amb mutacions a la caixa NrdR1 i NrdR2 : extrem 5' i 3' de la caixa AB1: pnrABUp + RboxAB1Lw, pnrABLw + RboxAB1Up; extrem 5' i 3' de la caixa AB2: pnrABUp + RboxAB2Lw, pnrABLw + RboxAB2Up; extrem 5' i 3' de la caixa EF1: pnrEFUp + RMutEF1Lw, pnrEFLw + RMutEF1Up; extrem 5' i 3' de la caixa EF2: pnrEFUp + RboxEF2Lw, pnrEFLw + RboxEF2Up; extrem 5' i 3' de la caixa DG1: pnrDGUp + RMutDG1Lw, pnrDGLw + RMutDG1Up; extrem 5' i 3' de la caixa DG2: pnrDGUp + RboxDG2Lw, pnrDGLw + RboxDG2Up (**Taula VII**). Cada parella d'amplicons (extrem 5' + extrem 3') s'utilitzava de motlle en una segona PCR amb els oligonucleòtids externs, originant uns amplicons d'aproximadament uns 500 pb que contenien una de

Part I: Regulació transcripcional de les ribonucleotidil reductases de *S. Typhimurium*

les dues caixes mutada. A partir d'aquests amplicons també es van obtenir les regions promotores amb mutacions en les dues caixes. Les mutacions que es van realitzar es mostren a la **Figura 13**.

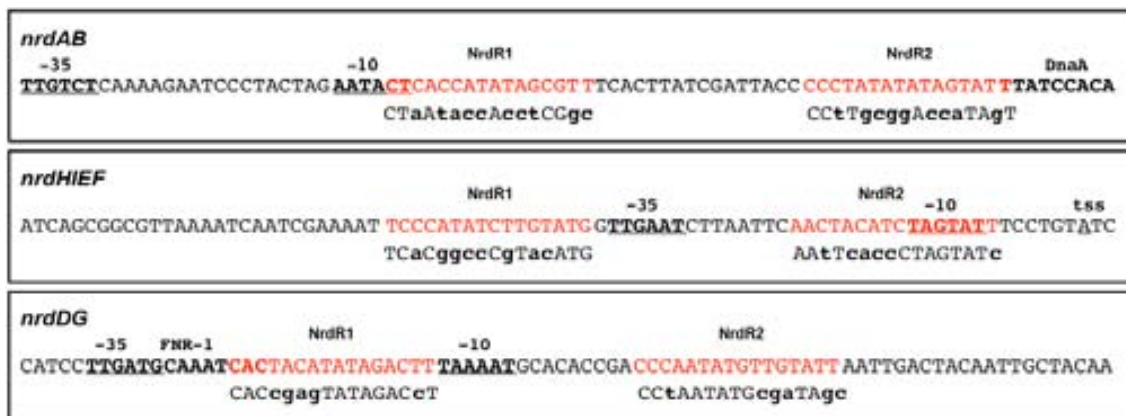


Figura 13. Caixes d'unió de NrdR de les regions promotores dels operons *nrdAB*, *nrdHIEF* i *nrdDG* de *S. Typhimurium* LT2 on s'indiquen les mutacions realitzades a cada una de les caixes. Les bases en minúscula són les que s'han modificat. Subratllades i en negreta es troben les caixes -10 i -35. També s'indiquen en negreta les caixes d'unió de DnaA (en *nrdAB*) i de FNR en (*nrdDG*) així com l'inici de transcripció en aquells casos que s'hagi descrit.

Les regions promotores mutades es varen usar per construir fusions transcripcionals amb el gen indicador *lacZ*, tal com s'indica a l'apartat 7.4.9 dels Materials i Mètodes. Així, es van generar les soques IG110, IG111 i IG112 que contenen la caixa mutada *nrdR1*, *nrdR2* i *nrdR1+nrdR2* de la regió promotora de *nrdAB*, respectivament (**Taula V**). Per a l'operó *nrdHIEF* es van obtenir les soques IG113, IG114 i IG115 amb la caixa *NrdR1*, *NrdR2* i *NrdR1+NrdR2* mutades, respectivament (**Taula V**). Finalment, per l'operó *nrdDG* s'obtingueren les soques IG116, IG117 i IG118, amb la caixa *NrdR1*, *NrdR2* i *NrdR1+NrdR2* mutades, respectivament (**Taula V**). De totes aquestes fusions transcripcionals se'n va mesurar l'activitat β -galactosidasa. Els resultats obtinguts es mostren a la **Figura 14**.

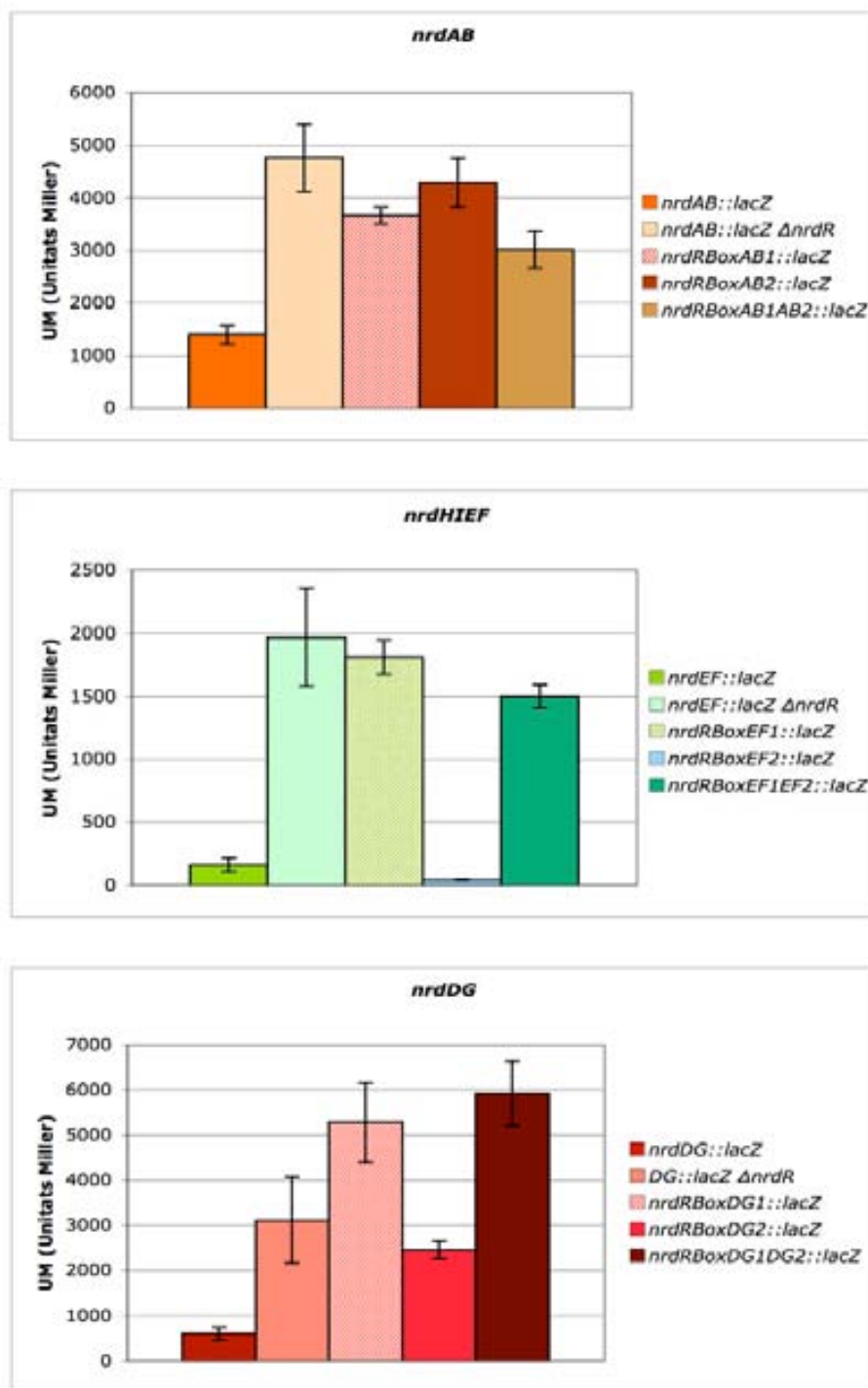


Figura 14. Estudi de la mutació de les caixes NrdR sobre l'expressió de les diferents classes de RNRs. Representació de l'activitat β -galactosidasa expressada en Unitats Miller de les fusions de les regions promotores amb les caixes NrdR mutades dels operons *nrdAB*, *nrdHIEF* i *nrdDG* amb el gen *lacZ*. Els resultats són la mitjana

Part I: Regulació transcripcional de les ribonucleotidil reductases de *S. Typhimurium*

de duplicats de com a mínim tres experiments independents. Les barres d'error representen la desviació estàndard dels experiments.

En el cas de l'operó *nrdAB* s'observa que la mutació de les dues caixes per separat fa que la soca es comporti com un mutant $\Delta nrdR$. La mutació de la caixa NrdR2 no presenta diferències significatives respecte el mutant $\Delta nrdR$. En la soca que presenta la mutació de la caixa NrdR1 i la que presenta la mutació de les dues caixes simultàniament s'observa un augment de l'expressió però tot i així no arriba als nivells que s'observen en el mutant $\Delta nrdR$. Això pot ser degut a que la caixa NrdR1 se solapa parcialment amb la caixa -10, i tot i no haver-ne mutat cap base, potser la mutació de la caixa NrdR1 està exercint algun efecte sobre la caixa -10.

L'operó *nrdHIEF* mostra una tendència similar sobretot en la caixa NrdR1 i la soca amb la mutació doble. Ara bé, quan es muta la caixa NrdR2, els nivells de transcripció baixen dràsticament, fins al punt de ser inferiors a la soca salvatge. En la caixa NrdR2 hi trobem la caixa -10, però la nostra mutació no ha variat cap de les bases que la componen. Es podria pensar que el fet de mutar la regió entre la caixa -10 i -35 afectaria tot el promotor i la unió de la RNA polimerasa. Això queda descartat observant la soca amb les dues caixes mutades. L'expressió del doble mutant és equivalent a la soca $\Delta nrdR$, indicant que la transcripció pot tenir lloc normalment.

Així doncs, semblaria que la caixa NrdR2 o bé no participaria en la unió de NrdR o bé el que observem fos part d'una seqüència de reconeixement d'algun altre regulador. De fet, en aquesta regió i mitjançant un recurs informàtic (<http://www.prodoric.de/vfp/>; (Munch *et al.*, 2005)) que simula un *footprinting* de la majoria de reguladors presents en *E. coli* i altres microorganismes, s'hi ha detectat una caixa de reconeixement de Fis que se solapa amb la caixa NrdR2 (**Fig. 15**). Fis és una proteïna que s'uneix al DNA i hi provoca una flexió, inicialment es va caracteritzar pel seu efecte estimulador en la recombinació específica del DNA (Johnson *et al.*, 1986), tot i que també es veu implicada en altres processos com l'estimulació de l'escisió i integració del fag lambda (Esposito and Gerard, 2003), en la replicació del DNA en l'*oriC* (Ryan *et al.*, 2004), en la transposició (Weinreich and Reznikoff, 1992), i en la repressió i activació d'altres gens (Auner *et al.*, 2003). No obstant, s'ha de tenir en compte que s'ha descrit que ni Fis ni RpoS participen en la regulació depenent de la fase de creixement de l'operó *nrdHIEF* d'*E. coli* (Monje-Casas *et al.*, 2001), i a més, l'efecte produït en l'expressió de la fusió amb la caixa NrdR2 mutada no s'observa en la fusió de les dues caixes mutades.

A part, en aquesta mateixa regió també s'hi ha detectat una possible caixa de reconeixement d'ArgR, repressor de la síntesi d'arginina, tot i que en aquest cas només se solapa una base. La presència d'una possible caixa d'unió d'ArgR podria ser plausible donat que la classe Ib s'activa

Part I: Regulació transcripcional de les ribonucleotidil reductases de *S. Typhimurium*

en condicions de manca de nutrients (Tao *et al.*, 1999) i per tant, en absència de nutrients, aquest repressor deixaria d'unir-se a la regió promotora de *nrdHIEF* i en permetria l'expressió.

Aquests resultats indiquen que la regulació de l'operó *nrdHIEF* no és tan senzilla com semblava i que és probable que presenti múltiples llocs d'unió de molts reguladors.

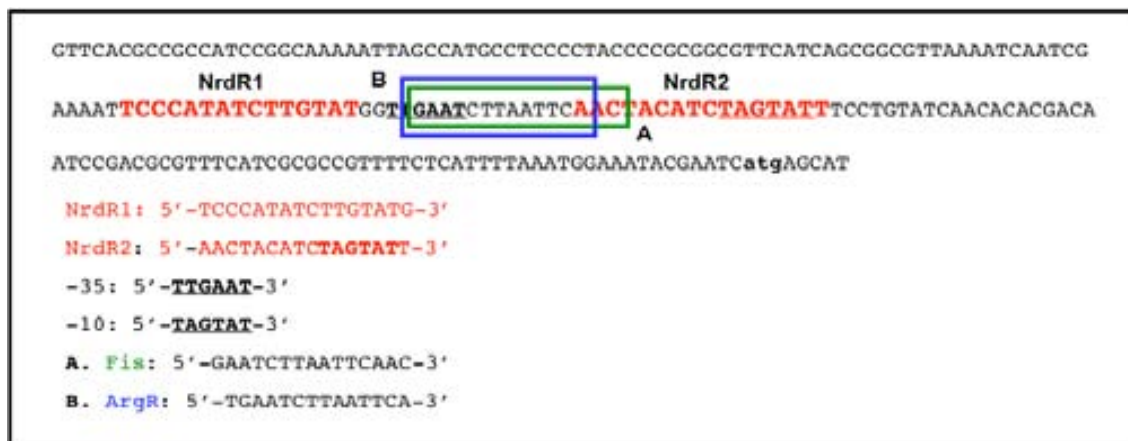


Figura 15. Representació de part de la regió promotora de l'operó *nrdHIEF* de *S. Typhimurium* LT2 on s'hi mostren en vermell, les caixes NrdR1 i NrdR2, en negreta i subratllat les caixes -10 i -35. El requadre verd és la possible seqüència de reconeixent de Fis i en blau la possible seqüència de reconeixement d'ArgR. Aquestes caixes s'han trobat mitjançant el programa Virtual Footprinting (<http://www.prodoric.de/vfp/>).

En el cas de l'operó *nrdDG*, la fusió amb la caixa NrdR1 mutada presenta un augment de la transcripció fins i tot superior a l'observat en la soca $\Delta nrdR$. De fet, aquesta caixa d'unió presenta unes bases que se solapen amb la caixa FNR-1, descrita en *E. coli* (Roca *et al.*, 2008a). La classe III d'*E. coli* està regulada per FNR, un regulador que activa la transcripció d'alguns gens implicats en el metabolisme anaeròbic i reprimeix la síntesi d'alguns gens necessaris pel creixement en aerobiosi (Kiley and Beinert, 1998; Williams *et al.*, 1998). Es podria pensar que la inducció obtinguda en aquest mutant és deguda a l'efecte positiu que exerceix FNR sobre el promotor, ja que en no poder-se unir NrdR sí que ho estaria fent FNR i així estaríem observant la inducció produïda per la presència de FNR i per la incapacitat del repressor NrdR d'unir-se a la caixa NrdR1. Però aquesta situació també hauria de ser la mateixa en la soca $\Delta nrdR$ on NrdR no es produeix i per tant FNR pot unir-se sense dificultats. Per tant, sembla que en aquesta regió promotora potser hi podria haver un altre regulador responsable d'aquesta inducció. De fet, la mutació de la caixa NrdR2 provoca una inducció equivalent a la soca $\Delta nrdR$ però en canvi, la mutació de les dues caixes a la vegada torna a produir una inducció màxima equivalent a la mutació de la caixa NrdR1.

3.2.3. Mutació de l'ATP-cone de NrdR

El regulador NrdR va ser descrit per primer cop en *Streptomyces coelicolor* (Borovok *et al.*, 2004) com a repressor de les dues classes de RNRs presents en aquest microorganisme (classe Ia i classe II). Es va descriure que contenia un domini d'unió a DNA (estructura de dit de zinc) i també un domini ATP-cone equivalent al lloc d'activitat de la subunitat gran (R1) de les RNRs de classe Ia.

En el lloc d'activitat de la R1, la unió d'ATP estimula l'activitat de l'enzim, mentre que la unió del dATP inhibeix la seva activitat. Així doncs, la presència d'aquest domini fa pensar en la possibilitat que la unió del dATP o de l'ATP a NrdR sigui la responsable de la regulació de les RNRs a nivell transcripcional. D'aquesta manera, els nivells d'ATP/dATP funcionarien com a efectors tant a nivell al·lostèric com a nivell transcripcional. Per aquest motiu vam plantejar-nos fer una mutagènesi dels residus més conservats d'aquest domini i estudiar *in vivo* la capacitat de complementació de la mutació *ΔnrdR* amb la proteïna mutada.

A la **Figura 16** es mostra un alineament múltiple de l'ATP-cone del NrdR de *S. Typhimurium* i *E. coli* i el de R1 d'*E. coli*. Veient el grau de conservació de certs residus se'n van escollir alguns com a candidats d'interaccionar amb l'ATP/dATP i que ja s'havien descrit com a tals en la subunitat R1 d'*E. coli* (Eriksson *et al.*, 1997). Aquests residus també es mostren a la **Figura 16**.

		*		20		*		40	
EcNrdA	:	LLVTKRDGSTERINLDKIHRVLDWAAEGLHNVSISQVELRSHIQFY	:	46					
EcNrdR	:	PRVVKSNDVREPFNEEKLRSGMLRALE-KRPVSSDDVEMAIN-HIK	:	44					
StNrdR	:	PRVIKSNDVREPFNEDKLRSGMLRALE-KRPVSADDVEMALN-HIK	:	44					
St5359NrdR	:	PRVIASNDVREPFNEDKLRSGMLRALE-KRPVSADDVEMALN-HIK	:	44					
St6265NrdR	:	PRVIKSNDVREPF AE EDALRSGLRALE-KRPVSADDVEMALN-HIK	:	44					
St6266NrdR	:	PRVIKSNDVREPF AE EDKARSGLRALE-KRPVSADDVEMALN-HIK	:	44					
		*		60		*		80	
EcNrdA	:	DGIKTS DI HETIIKAAADLISRDPDYQYLAARLAI FHLR KKAYG-	:	91					
EcNrdR	:	SQLRATGEREVPSKMIGNLVMEQLKKLDKVA--YIRFASVYRSEED	:	88					
StNrdR	:	SQLRATGEREVPSKMIGNLVMEQLKKLDKVA--YIRFASVYRSEED	:	88					
St5359NrdR	:	SQLRATGEREVPSKMIGNLVMEQLKKLDKVA--YIRFASVYRSEED	:	88					
St6265NrdR	:	SQLRATGEREVPSKMIGNLVMEQLKKLDKVA--YIRFASVYRSEED	:	88					
St6266NrdR	:	SQLRATGEREVPSKMIGNLVMEQLKKLDKVA--YIRFASVYRSEED	:	88					

Figura 16. Alineament múltiple mitjançant ClustalW de la seqüència aminoacídica de l'ATP cone corresponent a la subunitat R1 (NrdA) d'*E. coli* i de l'ATP-cone de NrdR d'*E. coli* i *S. Typhimurium*, la seqüència salvatge i les diferents combinacions de mutants. Totes les seqüències es van obtenir de la base de dades NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). De color gris hi ha marcats els residus conservats en totes elles. En negre hi ha els canvis efectuats a la proteïna. Ec: *E. coli*; St: *S. Typhimurium*.

Part I: Regulació transcripcional de les ribonucleotidil reductases de *S. Typhimurium*

Les mutacions es van realitzar pel mètode de *nested* PCR utilitzant els oligonucleòtids RBSUpnrdR i RBSLwnrdR (**Taula VII**) com a oligonucleòtids externs i mutant diferents residus amb els oligonucleòtids interns. Es van obtenir tres proteïnes mutants amb dos canvis cada una. Així es mutaren el residu 53 K → A i el residu 59 E → A amb els oligonucleòtids NrdR5359Up i NrdR5359Lw donant lloc a la proteïna mutada NrdR5359 que es va clonar en el vector d'expressió induïble per arabinosa pBAD33 entre les dianes *SacI* i *XbaI* generant el vector pIG86 (**Taula VI**). Aquest plasmidi es va transformar a les soques IG104, IG105 i IG106 que contenen les fusions dels promotors dels operons *nrdAB*, *nrdHIEF* i *nrdDG*, respectivament, amb el gen *lacZ* juntament amb la mutació $\Delta nrdR$.

Es va utilitzar un procediment anàleg per a generar la proteïna NrdR6265 que contenia les mutacions en els residus 62 N → A i 65 K → A i la proteïna NrdR6266 amb mutacions en els residus 62 N → A i 66 L → A mitjançant els oligonucleòtids NrdR6265 Up i Lw i NrdR6266 Up i Lw respectivament (**Taula VII**). També es va procedir a la seva clonació en el vector d'expressió pBAD33 donant lloc als plasmidis pIG87 i pIG88 respectivament (**Taula VI**). Aquests plasmidis es van transformar a les soques IG104, IG105 i IG106 que contenen les fusions dels promotors dels operons *nrdAB*, *nrdHIEF* i *nrdDG*, respectivament, amb el gen *lacZ* juntament amb la mutació $\Delta nrdR$.

Els assajos de l'activitat β -galactosidasa de les complementacions amb els diferents tipus de proteïna NrdR mutada es mostren a la **Figura 17**.

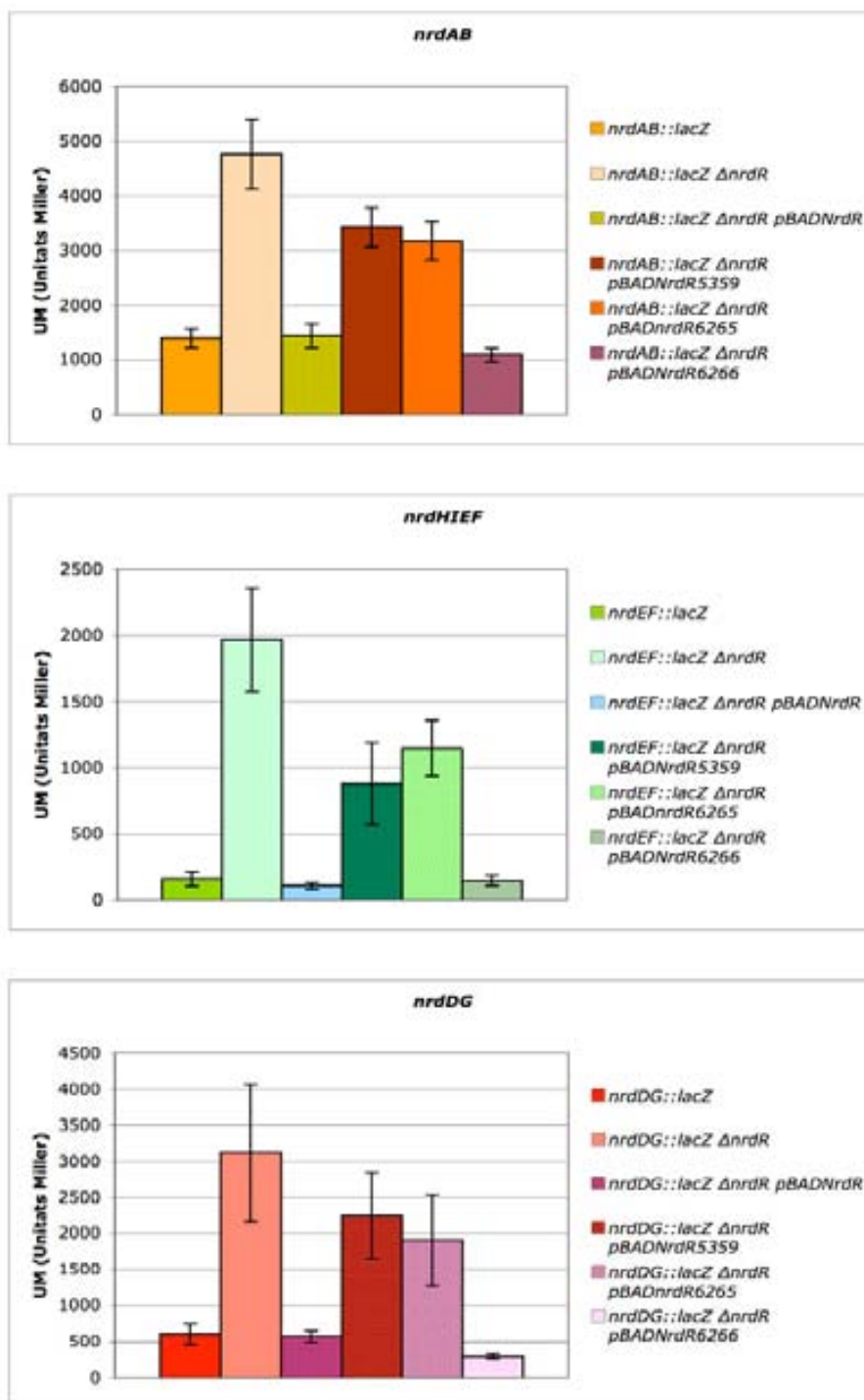


Figura 17. Complementació de la mutació $\Delta nrdR$ amb la proteïna NrdR mutada. Representació de l'activitat β -galactosidasa expressada en Unitats Miller de les fusions de les regions promotores dels operons *nrdAB*, *nrdHIEF* i *nrdDG* amb el gen *lacZ*, de les soques mutants $\Delta nrdR$ complementades amb les diferents mutacions de NrdR. Els resultats són la mitjana de duplicats de com a mínim tres experiments independents. Les barres d'error representen la desviació estàndard dels experiments.

Les mutacions de NrdR dels residus 53-59 i 62-65 no són capaces de complementar la mutació $\Delta nrdR$ en cap de les tres classes de RNRs. No obstant això, la mutació NrdR6266 sí que és capaç de comportar-se com la proteïna salvatge. La única diferència entre les proteïnes mutants NrdR6265 i NrdR6266 és el residu 66, per tant, ni el residu 62 ni el residu 66 afecten la funcionalitat de NrdR. Veient doncs aquests resultats, es pot dir que les mutacions en els residus 65 i 53 o 59 (o tots dos) afecten a NrdR de tal manera que no és capaç d'unir ATP/dATP i per tant d'unir-se a les regions promotores, o bé li produeixen algun canvi conformacional que fa que la proteïna deixi de ser capaç d'unir-se al DNA.

Amb aquests resultats no podem assegurar que aquests residus siguin els responsables de la unió de dATP/ATP però ens permeten afirmar que són necessaris per a la funció de NrdR *in vivo*.

3.2.4. Caracterització de la unió de ATP/dATP de NrdR

Per tal d'esbrinar quina era l'afinitat de NrdR per l'ATP o el dATP vam optar per fer un assaig d'unió d'ATP/dATP (*ATP-binding assay*) marcats amb H^3 tal i com s'indica als Materials i Mètodes. D'entrada volíem veure quina era l'afinitat de NrdR per cada un dels nucleòtids i posteriorment volíem fer assajos de competició per esbrinar quin dels dos nucleòtids era el que tenia més afinitat com a substrat. Posteriorment s'haguessin fet assajos amb la proteïna mutada en els residus que podrien participar en la unió a ATP/dATP que s'han descrit a l'apartat 7.5.7, per acabar de confirmar la seva participació en la funcionalitat de NrdR. Malauradament, va ser impossible aconseguir una corba de saturació, no vam arribar a saturar la proteïna ja que l'afinitat amb la qual s'unia a dATP/ATP era molt baixa.

3.2.5. Purificació de NrdR i assajos de retardament electroforètic

La proteïna NrdR es va purificar segons el protocol descrit als Materials i Mètodes però va ser realment difícil aconseguir que la proteïna no precipités. Es van haver de provar varis tampons de diàlisi i no va ser fins que es va pujar la concentració de sals (300 mM de clorur de sodi) i també del glicerol (10%) que no es va aconseguir una proteïna completament soluble i estable.

Tot i tenir la proteïna estable, a l'hora de realitzar els assajos de retardament electroforètic no vam aconseguir que la proteïna s'unís de manera específica al DNA. Vam canviar les condicions del tampó d'unió, les condicions d'incubació (vam provar diferents temperatures: 37°C, 25°C i 0°C), la concentració de sals (75 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM i 300 mM de NaCl), però tant en la

presència de DNA inespecífic en forma de poli dl-dC (50 ng per reacció) o esperma de salmó (1 µg), el retard es perdia.

Malauradament, durant el transcurs d'aquest treball Torrents *et al.* (Torrents *et al.*, 2007) van publicar un treball en paral·lel, on mostraven la unió de NrdR a les regions promotores dels operons *nrdAB*, *nrdHIEF* i *nrdDG* d'*E. coli*. Les condicions descrites per aquests autors no van resultar ser reproduïbles fet que va fer decidir-nos a aturar el treball en aquest punt.

3.2.6. Fur és un repressor de l'expressió de l'operó *nrdHIEF*

El següent regulador transcripcional que ens vam proposar estudiar ja s'havia descrit com a un possible regulador de la classe Ib d'*E. coli* (McHugh *et al.*, 2003; Vassinova and Kozyrev, 2000), i fins i tot se'n va descriure una caixa d'unió en *E. coli* en el promotor de l'operó *nrdHIEF* (Vassinova and Kozyrev, 2000). En treballs realitzats en el nostre laboratori utilitzant quelants de ferro (2,2'-dipiridil, DIP) també s'observava una inducció de l'expressió de l'operó *nrdHIEF*. Correlacionant d'aquesta manera, aquest comportament transcripcional amb el paper regulador de Fur.

Per veure l'efecte de Fur sobre l'operó *nrdHIEF* vam realitzar un mutant *fur* mitjançant el mètode de Wanner & Datsenko (Datsenko and Wanner, 2000). A partir dels oligonucleòtids MutFurUp i MutFurLw (**Taula VII**) es va realitzar una mutació que eliminava completament la regió codificant de *fur*. En aquest cas es van utilitzar com a plasmidis motlle tant el pKD4 (Km^R) com el pKD3 (Cm^R). Així es van generar les soques IG128 i IG129 respectivament (**Taula V**). A la soca Δfur sense marcar, denominada IG130, se li va transduir la fusió de l'operó *nrdHIEF* amb el gen indicador *lacZ* (soca IG131) i es va procedir a analitzar la seva activitat β -galactosidasa (**Fig. 18**).

La mutació de Fur desreprimeix completament la transcripció de l'operó *nrdHIEF*, amb un augment de fins a 5 vegades respecte la soca salvatge. Una vegada més, per comprovar que aquest efecte era degut a Fur, vam construir un vector d'expressió que contenia la regió codificant de Fur amplificada amb els oligonucleòtids RBSFurUp i Lw (**Taula VII**). Aquest amplicó de 483 pb es va clonar dins les dianes de restricció *SacI* i *XbaI* del plasmidi pBAD33 induïble per arabinosa, generant el plasmidi pIG89 (**Taula VI**). Aquest plasmidi es va transformar a la soca IG131 per donar lloc a la soca IG132 (**Taula V**) que contenia la fusió de l'operó *nrdHIEF* amb el gen *lacZ* i la mutació Δfur .

A la **Figura 18** també es pot observar com el plasmidi pIG89 és capaç de restablir els nivells d'expressió de *nrdHIEF* en presència d'arabinosa.

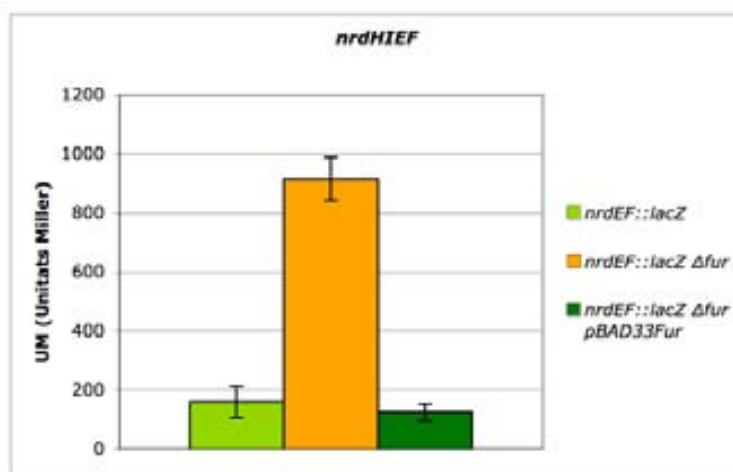


Figura 18. Efecte de la mutació Δfur sobre l'expressió de l'operó *nrdHIEF* de *S. Typhimurium* LT2. Representació de l'activitat β -galactosidasa expressada en Unitats Miller de les fusions de la regió promotora de l'operó *nrdHIEF* amb el gen *lacZ*, de la soca salvatge, de la soca mutant Δfur i de la soca mutant complementada amb un plasmidi d'expressió que conté *fur* i s'indueix amb arabinosa 0,2%. Els resultats són la mitjana de duplicats de com a mínim tres experiments independents. Les barres d'error representen la desviació estàndard dels experiments.

3.2.7. Mutació de la caixa d'unió de Fur

La seqüència consens d'unió de Fur al DNA (coneguda com a Fur Box) va ser descrita inicialment com una seqüència palindròmica de 19 pb on es trobaven dues repeticions invertides de 9pb separades per un nucleòtid (Bagg and Neilands, 1987). Posteriorment, es van descriure altres interpretacions que tenen com a comú denominador la seqüència hexamèrica 5'-GATAAT-3' (Escolar *et al.*, 1998, 1999, 2000; Lavrrar and McIntosh, 2003). Normalment hi ha dues seqüències seguides d'una tercera que pot ser parcialment degenerada o bé invertida (**Fig. 19**).

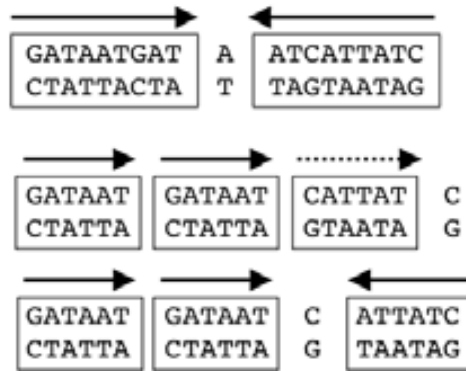


Figura 19. Possibles interpretacions de la caixa Fur consens descrita per Escolar et al. (1999).

Vàrem fer una cerca de possibles caixes de reconeixement de Fur i vam detectar-ne una que es troba a 309 pb corrent amunt de l'inici de transcripció. En un alineament amb la seqüència consens de Fur i la seqüència de reconeixement de Fur del seu propi promotor, vam veure les bases més conservades i vam mutar-les de la següent manera: la seqüència 5'-GCCGAAGATAATATTTACC-3' va passar a ser 5'-GCCGCATCGAATATGGACC-3' (Fig. 20). Es va emprar el mètode de mutagènesi per *nested PCR* mitjançant els oligonucleòtids externs sondaEFUp i Lw i els oligonucleòtids interns FurBoxMutEF Up i Lw (Taula VII). L'amplicó final de 490 pb es va utilitzar per a fer una fusió amb el gen *lacZ* de la regió promotora amb la caixa Fur mutada tal i com s'indica en l'apartat 7.4.9 dels Materials i Mètodes. La soca obtinguda, IG133 (Taula V), es va utilitzar per a mesurar-ne l'activitat β -galactosidasa.

*

```

Consens : GATAATGATAATCATTATC : 19
fur      : TATAATGATACGCATTATC : 19
nrdHIEF : GCCGAAGATAATATTTACC : 19
    
```

Mutació: **GCCGCATCGAATATGGACC**

Figura 20. Alineament múltiple mitjançant ClustalW de la seqüència nucleotídica de la caixa Fur consens d'*E. coli*, de la caixa Fur present al promotor de *fur* de *S. Typhimurium* LT2 i la del promotor de *nrdHIEF* de *S. Typhimurium* LT2. Totes les seqüències es van obtenir de la base de dades NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Les bases conservades en totes elles es mostren en color negre. En gris hi ha les bases que només estan conservades en dues de les tres seqüències. També s'indica la mutació que es va realitzar a la caixa Fur de l'operó *nrdHIEF*.

A la **Figura 21** es pot observar com la mutació de la caixa Fur augmenta la transcripció de l'operó *nrdHIEF* de manera equivalent a la soca que presenta la mutació Δfur . També es mostra

Part I: Regulació transcripcional de les ribonucleotidil reductases de *S. Typhimurium*

l'augment transcripcional de la soca que presenta la mutació $\Delta nrdR$ i la d'una soca que conté les dues mutacions (Δfur i $\Delta nrdR$), construïda a partir de la soca IG105 a la qual se li ha transduït la mutació $\Delta fur::Cm$ present a la soca IG129. El nivell d'expressió de l'operó *nrdHIEF* d'aquesta soca és pràcticament el sumatori dels nivells d'expressió de les soques que contenen la mutació Δfur i $\Delta nrdR$ per separat. També s'hi mostra l'activitat β -galactosidasa de la soca mutant Δfur crescuda en presència de 10 mM d'hidroxiurea, que, com s'ha comentat anteriorment, és un compost que és capaç de desplaçar el radical tirosil de les RNRs. Així doncs, l'efecte de la hidroxiurea és additiu també sobre l'efecte de la mutació de *fur*.

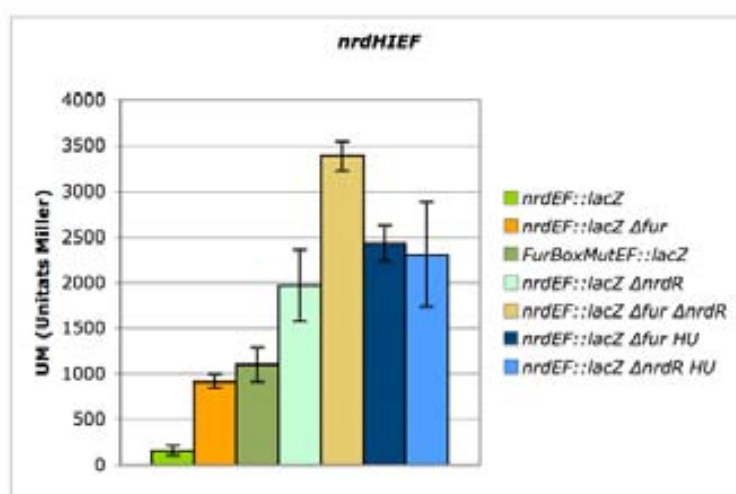


Figura 21. Efecte de la mutació de la caixa Fur sobre l'expressió de l'operó *nrdHIEF* de *S. Typhimurium* LT2. Representació de l'activitat β -galactosidasa expressada en Unitats Miller de les fusions de la regió promotora de l'operó *nrdHIEF* amb el gen *lacZ*, de la soca salvatge, de la soca mutant Δfur , de la soca amb la caixa Fur mutada, de la soca mutant $\Delta nrdR$, de la soca doble mutant $\Delta fur\Delta nrdR$, i de les soques mutant Δfur i mutant $\Delta nrdR$ crescudes amb HU 10mM durant una hora. Els resultats són la mitjana de duplicats de com a mínim tres experiments independents. Les barres d'error representen la desviació estàndard dels experiments.

3.2.8. Purificació de la proteïna Fur

Inicialment, la purificació de la proteïna Fur es va basar en la descrita per de Lorenzo *et al.* (De Lorenzo *et al.*, 1988). En aquest procediment, la proteïna es mantenia en un tampó a base de Tris-bòric i $MnCl_2$. Tal i com s'indica en l'apartat 7.5.2.2 dels Materials i Mètodes, la proteïna un cop passada per la columna d'afinitat es troba en un tampó amb PBS 1X i 330 mM d'imidazol. Aquest tampó s'ha de canviar i inicialment es va realitzar mitjançant columnes de dessalat HiTrap™ Chelating HP (Amersham Biosciences, Uppsala). En el procés d'intercanvi de tampons, és a dir, el pas de PBS

1X +330 mM d'imidazol a Bis Tris-bòric 10 mM + MnCl_2 100 μM es van obtenir una sèrie de fraccions que contenien un precipitat blanc. Es va realitzar un Bradford tant del precipitat de les fraccions com del sobrenadant i el resultat va ser que la major part de la proteïna es trobava al precipitat.

Seguidament, es va optar per la diàlisi i per canviar el tampó de diàlisi. En altres treballs descrits a la bibliografia, s'havia utilitzat BisTris-HCl 10mM per a fer assajos de *footprinting* de Fur (Lavrrar and McIntosh, 2003; Outten *et al.*, 2004). Mentre es realitzava la concentració de proteïna es feia un canvi de tampó, s'afegia BisTris-HCl 50mM i MnCl_2 100 μM . Seguidament, la diàlisi es realitzava amb un tampó que contenia BisTris-HCl 10mM i MnCl_2 100 μM . Tot i així, la proteïna va acabar precipitant.

Semblava que el BisTris provocava la precipitació de la proteïna. A la bibliografia, en determinats assajos de *footprinting* de Fur també s'usava Tris-HCl (Delany *et al.*, 2003). Finalment, es va optar per utilitzar Tris-HCl 50mM, 300 mM de NaCl, 5% glicerol i MnCl_2 100 μM i fer l'intercanvi de tampó per diàlisi. D'aquesta manera es va aconseguir que la proteïna no precipités.

3.2.9. Unió de Fur al promotor de *nrdHIEF*

Per a poder comprovar la unió *in vitro* de la proteïna Fur a la regió promotora de l'operó *nrdHIEF* es van realitzar gels de retardament electroforètic. Les sondes per als assajos es van generar a partir dels oligonucleòtids sondaEFUp i Lw (**Taula VII**) per tal d'amplificar una sonda de 478 pb que conté la regió promotora de l'operó *nrdHIEF*. A partir dels oligonucleòtids sondaFurUp i Lw (**Taula VII**) es va amplificar una sonda de 474 pb que contenia la regió promotora de *fur* i que serviria de control positiu ja que en *E. coli* s'ha descrit la seva autoregulació (De Lorenzo *et al.*, 1988). També es va generar la sonda amb la caixa Fur mutada a partir dels oligonucleòtids sondaEFUp i Lw (**Taula VII**) sobre el plasmidi que contenia el promotor de l'operó *nrdHIEF* amb la caixa Fur mutada. Totes les sondes es van marcar amb DIG-ddUTP a l'extrem 3' tal i com s'indica a l'apartat 7.4.7 dels Materials i Mètodes. Els gels de retardament electroforètic es van dur a terme tal i com es descriu en l'apartat 7.5.6.2 del Material i Mètodes.

Com es pot observar a la **Figura 22**, tant el promotor de l'operó *nrdHIEF* com el promotor de *fur* presenten una banda retardada que augmenta d'intensitat a mesura que augmenta la concentració de proteïna Fur present en la reacció. Com a control negatiu es va utilitzar la sonda corresponent al promotor de l'operó *nrdAB* que no presenta cap seqüència d'unió de Fur (no es mostra la imatge).

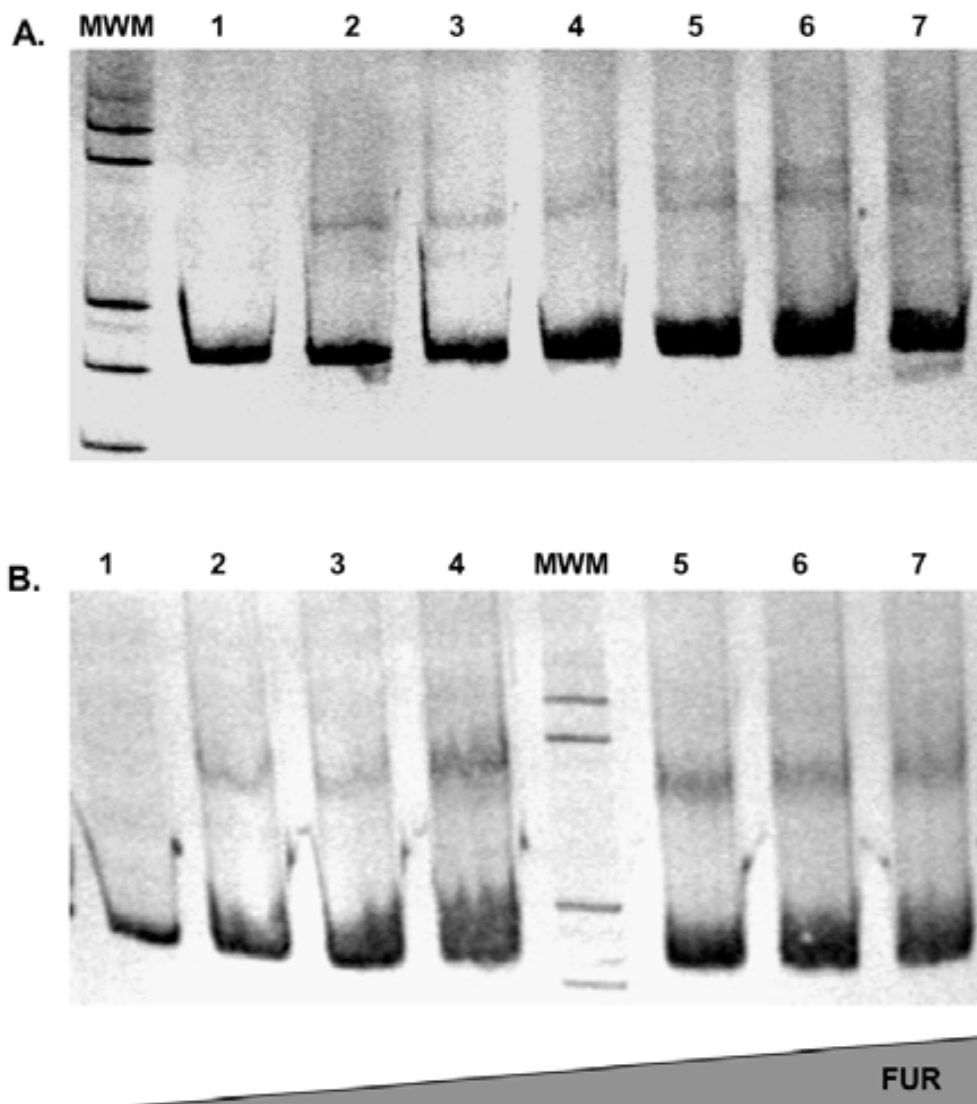


Figura 22. Gels de retardament electroforètic de les sondes corresponents a les regions promotores de l'operó *nrdHIEF* (A) i de *fur* (B) amb concentracions creixents de proteïna Fur: del carril 1 a 7: 0 µg, 0,2 µg, 0,4 µg, 0,8 µg, 1 µg, 1,2 µg i 1,5 µg.

A continuació es va procedir a realitzar els retards electroforètics amb la sonda que contenia la caixa Fur mutada per corroborar que aquesta seqüència era reconeguda per Fur. Els assajos obtinguts van mostrar que així com sí que s'observava retard en el control (sonda del promotor de *fur*), no s'aconseguia observar cap banda retardada utilitzant la sonda del promotor de *nrdHIEF* amb la caixa Fur mutada (no es mostra la figura), corroborant d'aquesta manera els resultats obtinguts en la mesura de l'expressió β -galactosidasa de la corresponent fusió transcripcional.

3.3. Discussió

La regulació a nivell transcripcional de les RNRs potser és l'àmbit més desconegut d'aquesta família de proteïnes ja que se n'han fet relativament pocs estudis. El fet de que siguin enzims que realitzen una funció tan essencial com és la biosíntesi dels dNTPs necessaris per a la síntesi i reparació del DNA, fa que la seva regulació sigui realment complexa (Nordlund and Reichard, 2006).

L'afany de trobar un regulador transcripcional global que sigui el responsable del control de cada una de les RNRs presents en un organisme en funció de la quantitat de dNTPs disponibles ha donat lloc a un augment considerable en el nombre d'estudis sobre la regulació gènica de les RNRs en els últims anys. L'aparició per primer cop d'un possible regulador global va tenir lloc l'any 2004 (Borovok *et al.*, 2004) en un estudi realitzat en *Streptomyces coelicolor*, on es va descriure NrdR com a repressor de la classe Ia i Ib presents en aquest organisme. La posterior publicació d'un estudi on, mitjançant eines bioinformàtiques, es descrivia la presència de caixes d'unió d'aquest regulador en gran nombre de microorganismes va accelerar encara més l'estudi sobre NrdR (Rodionov and Gelfand, 2005). Sense anar més lluny, mentre s'estava realitzant aquest treball Torrents *et al.* (Torrents *et al.*, 2007) van publicar part dels resultats que s'han descrit en aquesta tesi però en *E. coli*.

Tal i com s'ha descrit en aquest treball, NrdR és un repressor de l'expressió de la classe Ia, Ib i III de *S. Typhimurium*, ja que la seva deleció produeix un increment important en la transcripció d'aquests enzims i exerceix un efecte major sobre la classe Ib, tal i com també s'havia descrit en *E. coli* (Torrents *et al.*, 2007). Tot i que en aquest treball l'anàlisi dels nivells d'expressió s'ha realitzat mitjançant fusions transcripcionals amb el gen *lacZ*, els resultats són equivalents als obtinguts per real-time RT-PCR.

La hidroxidreurea és un potent inhibidor de les RNRs perquè és capaç de segrestar el radical tirosil de la subunitat petita de les RNRs de la classe I, inhibint així la seva activitat enzimàtica. A la vegada però, és un inductor de l'expressió dels gens de la classe I (Filpula and Fuchs, 1978; Jordan *et al.*, 1996a; Torrents *et al.*, 2003) ja que produeix un efecte equivalent a la manca de desoxiribonucleòtids. Per aquest motiu sempre s'ha cregut que existia un possible regulador que era capaç de detectar les concentracions de dNTPs/NTPs.

En aquest treball s'ha demostrat que l'efecte de la inducció de l'expressió de les RNRs de la classe I quan es tracta amb hidroxidreurea és degut a NrdR. Si ens centrem en l'efecte que hi té sobre la classe Ib es veu que és un efecte independent de Fur. És a dir, la desrepressió que s'assoleix mutant només *nrdR* no és màxima sinó que la desrepressió de l'operó *nrdHIEF* és la suma de l'efecte d'ambdós reguladors que actuen de manera independent (es pot observar mirant els nivells d'expressió de la soca doble mutant $\Delta nrdR \Delta fur$ i en les soques $\Delta nrdR + HU$ i $\Delta fur + HU$).

Part I: Regulació transcripcional de les ribonucleotidil reductases de *S. Typhimurium*

S'ha demostrat que la mutació de les caixes d'unió de NrdR presents en les tres regions promotores de les RNRs produeixen una desregulació en alguns casos equivalent a la mutació del gen *nrdR*, però a la vegada deixa entreveure un sistema de regulació molt complex.

El primer exemple el trobem observant els nivells d'expressió de la fusió de la regió promotora de l'operó *nrdHIEF* amb la caixa NrdR2 mutada. El motiu pel qual aquesta fusió no es transcriu pràcticament gens no acaba de quedar clar. Aparentment no sembla ser un problema de la unió de la RNA polimerasa a la caixa -10 ja que en la fusió amb la mutació en les dues caixes NrdR no hi ha problemes de transcripció.

S'ha contemplat la possibilitat que podria ser que es tractés d'una regió de reconeixement per una altra proteïna reguladora, en aquest cas d'un activador. Mitjançant un programa informàtic que simula un *footprinting* virtual, és possible detectar diferents caixes d'unió per a diferents factors de transcripció en la seqüència de DNA que es desitgi (<http://www.prodoric.de/vfp/>; (Munch *et al.*, 2005)). A la regió promotora de l'operó *nrdHIEF* de *S. Typhimurium* LT2 s'hi han detectat moltes seqüències de reconeixement de nombrosos factors de transcripció, entre les quals destaquen dues caixes d'unió de Fis, la caixa Fur que nosaltres també hem descrit, una possible caixa d'unió d'OxyR, dues caixes IciA, una caixa ArgR, ArcA, MetR, NarL i CytR (**Fig. 23**). Tot i que no s'ha demostrat experimentalment la seva unió directa, és possible doncs que hi intervinguin més reguladors afegint un grau més de complexitat a la regulació de les RNRs.



Figura 23. Representació de part de la regió promotora de l'operó *nrdHIEF* de *S. Typhimurium* LT2 on s'hi mostren les diferents possibles zones de reconeixement de diferents reguladors transcripcionals trobats mitjançant el programa Virtual footprint i en el cas de Fur i NrdR1 i NrdR2, són les caixes de reconeixement descrites en aquest treball i demostrades experimentalment. Els codis de colors es mostren a la Figura. També hi ha indicades les caixes -10 i -35, així com l'inici de traducció (en minúscula i negreta).

De moment no es coneix el funcionament de la regulació de NrdR, no se sap com es produeix la interacció de NrdR amb el promotor ni si té lloc mitjançant el bloqueig de la unió de la RNA polimerasa per impediments estèrics o si, per contra, probablement la unió de dímers de NrdR a les dues caixes NrdR (recordem que són seqüències palindròmiques) produeix un plegament del DNA que provocaria el bloqueig de la RNA polimerasa.

Potser la caixa NrdR1 i la NrdR2 participen en una unió cooperativa de NrdR, essent la caixa NrdR2 qui dirigeix la posterior unió de NrdR a la caixa NrdR1. Aquest fet aniria amb concordància amb el que postulen Torrents *et al.* (Torrents *et al.*, 2007) sobre la caixa NrdR2 que seria la més important per a la unió de NrdR basant-se en la seva conservació en *E. coli* i *S. Typhimurium*, així com en l'absència de retard electroforètic quan s'utilitza com a sonda la regió promotora de *nrdA* a la qual se li ha mutat la caixa NrdR2. La unió de NrdR a les dues caixes provocaria un plegament del

Part I: Regulació transcripcional de les ribonucleotidil reductases de *S. Typhimurium*

DNA que impediria la unió de la RNA polimerasa (degut a la situació de les caixes -10 i -35 en relació amb les caixes NrdR).

El que semblen indicar els nostres resultats és que NrdR1, degut a la seva naturalesa degenerada, podria ser reconeguda per altres reguladors, possiblement per un repressor, de manera que quan es muta la caixa NrdR2, aquesta ja no pot dirigir la unió de NrdR a la seqüència NrdR1, quedant aquesta lliure per a la unió d'un altre possible repressor. Això podria explicar el resultat obtingut amb la fusió que conté la caixa NrdR2 mutada de l'operó *nrdHIEF*.

Ja s'ha vist que la regulació transcripcional de les RNRs és força complexa i que hi poden intervenir moltes proteïnes reguladores diferents. En el cas de l'operó *nrdDG* els nivells de transcripció deguts a la mutació de la caixa NrdR2 són equivalents a la soca $\Delta nrdR$, però en canvi, la mutació de la caixa NrdR1 presenta una inducció significativament superior a la soca $\Delta nrdR$. La classe III d'*E. coli* està regulada per FNR, un regulador que activa la transcripció d'alguns gens implicats en el metabolisme anaeròbic i reprimeix la síntesi d'alguns gens necessaris pel creixement en aerobiosi (Kiley and Beinert, 1998; Williams *et al.*, 1998). És possible que l'absència de NrdR reprimint l'operó faci que FNR es pugui unir sense cap mena de dificultat a la seva caixa d'unió FNR-1, (Roca *et al.*, 2008a), i esperariem que el nivell d'inducció de la soca $\Delta nrdR$ i el de la caixa NrdR1 o NrdR2 mutades fos el mateix. Però la mutació en la caixa NrdR1 fa que l'expressió fins i tot sigui superior que en la soca $\Delta nrdR$, per la qual cosa o bé en aquella regió hi ha una seqüència de reconeixement per un altre regulador que també s'ha vist afectada per la mutació, o bé, com que la caixa NrdR1 queda just al mig de la caixa -35 i -10, potser s'ha millorat la seqüència d'unió per a la RNA polimerasa i hi ha una major transcripció que en la soca $\Delta nrdR$ on aquesta seqüència ha quedat intacta.

NrdR es va descriure inicialment com un regulador que contenia un extrem N-terminal amb 2 parells de cisteïnes que podien formar un dit de zinc, un domini central que semblava contenir un domini ATP-cone similar a l'ATP-cone que es troba en el lloc d'activitat de la subunitat R1 d'algunes RNRs de la classe Ia (Aravind *et al.*, 2000), i finalment un extrem C-terminal àcid (Borovok *et al.*, 2004). L'ATP-cone present al lloc d'activitat de la subunitat R1 és el responsable de que quan s'hi uneix dATP, s'inhibeixi l'activitat de l'enzim, però la unió d'ATP l'activa (Nordlund and Reichard, 2006).

La presència d'un ATP-cone i el fet que es presentés com un possible regulador global de totes les RNRs ens va fer pensar que podria ser el regulador que fes de vincle entre els nivells de NTPs/dNTPs de la cèl·lula i la regulació a nivell transcripcional de les RNRs. Així, els nivells de dNTPs o NTPs serien els responsables tant de l'activitat de les RNRs (de la classe Ia i classe III) com de la transcripció dels gens de totes les classes de RNRs.

Part I: Regulació transcripcional de les ribonucleotidil reductases de *S. Typhimurium*

La mutació d'alguns dels residus de l'ATP-cone de NrdR que són els equivalents als responsables de la unió de dATP/ATP en l'ATP-cone del lloc d'activitat de la R1 d'*E. coli* es va realitzar per veure l'efecte en la capacitat de l'espècie mutada de NrdR de complementar el fons genètic $\Delta nrdR$. Els nostres resultats semblen indicar que els residus 53, 59 i 65 intervenen en la funció *in vivo* de la proteïna. No podem assegurar però que el defecte de complementació sigui degut a la incapacitat d'unir ATP/dATP o bé a un problema en la funcionalitat/conformació de la proteïna. Paral·lelament va aparèixer un treball similar amb NrdR de *Streptomyces* (Grinberg *et al.*, 2006), on una mutació (Lys50→Asn50 i Arg51→Gly51), que mutava també un dels residus que nosaltres havíem mutat (Lys50 equival a Lys53 de *S. Typhimurium*), provocava que s'observés un retard difuminat i ineficient de la sonda corresponent a la regió corrent amunt de l'operó *nrdABS* de *Streptomyces coelicolor*. Aquesta mutació també impedia purificar la proteïna amb ATP/dATP unit. També demostraren que NrdR copurifica amb un nucleòtid unit, i que pot unir tant ATP com dATP, que el dit de zinc, efectivament, uneix zinc i que és essencial per a la unió al DNA (Grinberg *et al.*, 2006).

Encara més recentment, ha aparegut un altre estudi de la proteïna NrdR de *Streptomyces coelicolor* (Grinberg *et al.*, 2008) que ha confirmat el paper dels residus equivalents als 53, 59, 65 i 66 de *S. Typhimurium* sobre la unió de dATP/ATP i també el seu estat d'oligomerització. Sobretot la mutació Gly62 (en *S. Typhimurium* equival a la Gly65) ha resultat ser incapaç d'unir-se al DNA. Els residus Lys50 i Glu56 (Lys53 i Glu59 en *S. Typhimurium*) uneixen molt menys nucleòtids que la forma salvatge i uneixen més dATP que ATP. El residu Val63 (Val66 en *S. Typhimurium*) presenta unió al DNA tot i que feble. Això estaria d'acord amb els resultats obtinguts amb el nostre mutant NrdR6266, que en aquest cas és capaç de complementar la mutació $\Delta nrdR$.

Així doncs, sembla que l'arquitectura del promotor és important per a la regulació diferencial entre classes de RNRs. En el cas d'*E. coli* i *S. Typhimurium*, les caixes NrdR se solapen amb la caixa -10 o -35 i potser per això es veu una major desrepressió de l'expressió de l'operó *nrdHIEF* en absència de NrdR (aquest treball, (Torrents *et al.*, 2007)). En el cas de *Streptomyces*, l'arquitectura del promotor de *nrdRJ* i *nrdABS* també és diferent. En el cas de la classe Ia, les caixes d'unió de NrdR també se solapen amb la caixa -10 i -35, en canvi, en la classe II queden corrent amunt de les caixes -10 i -35. De manera que probablement la poca transcripció dels gens de la classe Ia que s'observa durant el creixement vegetatiu és degut a la unió de NrdR sobre el promotor i també a la repressió del B12 *riboswitch* (Grinberg *et al.*, 2006).

Recentment, també s'ha descrit que la deleció de *nrdR* produeix un augment de la transcripció només dels gens que codifiquen la classe Ib de *M. tuberculosis* i *M. smegmatis*, mentre que ni els gens *nrdB*, *nrdF1* o *nrdZ* (classe II) es veuen afectats (Mowa *et al.*, 2008). Els autors justifiquen la manca d'efecte sobre aquests últims per l'absència de caixes d'unió de NrdR en les seves regions promotores. Així doncs, en aquest cas, només la RNR de la classe Ib, que és essencial

Part I: Regulació transcripcional de les ribonucleotidil reductases de *S. Typhimurium*

per al creixement de *M. tuberculosis* (Dawes *et al.*, 2003), seria l'única regulada per NrdR. La classe II present en el seu genoma és funcional, però s'ha vist que no participa ni durant la infecció ni durant el creixement normal (Dawes *et al.*, 2003). Així doncs, en *M. tuberculosis* la RNR responsable de la reducció dels ribonucleòtids per a la síntesi i reparació del DNA durant cada etapa de la infecció és la classe Ib i sembla que NrdZ, NrdF1 i NrdB no participen en cap moment, ni tan sols en la seva suposada especialització durant l'estrès nitrosatiu (provocat per l'òxid nítric) o genotòxic que té lloc durant el procés d'infecció de ratolins (Mowa *et al.*, 2008). En aquest cas, la redundància de RNRs no s'utilitza per la síntesi especialitzada de dNTPs en funció de les condicions de creixement, a diferència del que s'observa en altres microorganismes que presenten redundància de RNRs i que les utilitzen en condicions concretes.

Quin és el mecanisme de funcionament de la regulació de NrdR? Tenint en compte el funcionament del lloc d'activitat de la subunitat R1 de la classe Ia s'ha especulat que la unió de dATP o ATP produeix un canvi conformacional en el dit de zinc de la proteïna que modula la seva interacció amb el DNA i permet la repressió o desrepressió dels gens que regula. De tota manera, no s'ha pogut demostrar que aquest canvi conformacional tingui lloc, si bé sí que s'ha demostrat que pot unir tant dATP com ATP (Grinberg *et al.*, 2006). Grinberg *et al.* en el seu últim treball (Grinberg *et al.*, 2008), intenten obtenir la proteïna NrdR sense nucleòtids units i no ho aconsegueixen, no poden demostrar quin és el paper de l'ATP ni del dATP, si presenten o no efectes oposats ni com els possibles canvis conformacionals afecten l'agregació i la unió al DNA.

Així doncs, és la unió a dATP la responsable de que NrdR s'uneixi als promotors de les RNRs per a reprimir-ne l'expressió quan no és necessària la producció de dNTPs? O és la unió d'ATP la responsable de que NrdR deixi d'interaccionar amb el DNA o que no pugui interaccionar amb el DNA i per tant s'activi la síntesi de dNTPs? El més probable és que es tracti d'una combinació de les dues opcions, on l'ATP i el dATP competeixen per la unió a NrdR i la presència de dATP unit a NrdR reprimeix l'expressió de les RNRs i la presència d'ATP unit a NrdR fa desunir el regulador i s'activa la transcripció de les RNRs. Encara no s'ha pogut demostrar cap d'aquestes qüestions però Grinberg *et al.* (2006) demostren que la proteïna NrdR de *Streptomyces* és capaç d'unir ambdós nucleòtids

Recentment s'ha establert un altre mecanisme de regulació de les RNRs basat en el *pool* de dNTPs presents a la cèl·lula i que a la vegada sembla relacionar-ho amb el cicle cel·lular. Aquesta regulació ve mediada per l'estat del nucleòtid unit a DnaA (Gon *et al.*, 2006). Segons aquest mecanisme, ATP-DnaA actuaria com a repressor de *nrdAB* i per tant, de la síntesi de dNTPs. Abans de l'inici de la replicació, la forma més abundant és ATP-DnaA, però en el moment que s'inicia la replicació, Hda hidrolitza ATP-DnaA que passa a la forma ADP-DnaA. En aquest estat, DnaA ja no reprimeix *nrdAB* i per tant es poden sintetitzar els dNTPs necessaris per a l'elongació. Com que ATP-DnaA també autorregula *dnaA*, l'estat ADP-DnaA fa que deixi de reprimir *dnaA* i se sintetitzi més DnaA. Aquesta nova proteïna unirà bàsicament ATP ja que els nivells d'ATP a la cèl·lula són majors

que els d'ADP. La concentració d'ATP-DnaA anirà augmentant fins el moment que sigui necessària per a la següent replicació (Gon *et al.*, 2006).

Aquest mecanisme entra però en conflicte amb els coneixements que es tenien fins ara sobre l'efecte activador que produïa la DnaA sobre *nrdAB* (Augustin *et al.*, 1994). Per a reconciliar aquesta situació, Herrick & Sclavi (Herrick and Sclavi, 2007) interpreten que són els nivells cel·lulars de ATP-DnaA els que modulen l'activació o inactivació de l'expressió de *nrdAB*. Nivells baixos d'ATP-DnaA estimularien la transcripció de *nrdAB* mentre que nivells alts la inhibirien. A més, Gon *et al.* també estableixen que la sobreexpressió de les RNRs reprimeix *nrdAB* també mitjançant la DnaA. DnaA també podria unir dNTPs de la mateixa manera que pot unir dATP (Sekimizu *et al.*, 1987). dATP-DnaA podria ser equivalent a ATP-DnaA i per tant, en condicions on hi ha un excés de dNTPs (en la sobreexpressió de RNRs o dany en el DNA), aquesta inhibiria la transcripció de *nrdAB* unint-se a les caixes DnaA presents en la regió promotora de *nrdAB*.

L'anàlisi amb detall del promotor de l'operó *nrdAB* es posa de manifest la gran quantitat de seqüències reguladores i llocs d'unió de factors de transcripció que el situen dins la categoria de "promotors complexos" (Barnard *et al.*, 2004). Aquest nivell de regulació tan complex va lligat a l'essencialitat de NrdAB en el cas d'*E. coli* i *S. Typhimurium*.

NrdR també regula l'operó *nrdHIEF* i l'efecte repressor que hi exerceix és superior al que s'observa en *nrdAB* i *nrdDG*. La regulació de l'operó *nrdHIEF* no ha estat massa estudiada, només s'ha descrit en *E. coli* la seva possible participació en l'estrès oxidatiu (Monje-Casas *et al.*, 2001) i s'ha vist en anàlisi de transcripció global que també respòn als nivells de ferro (McHugh *et al.*, 2003; Vassinova and Kozyrev, 2000). En aquest treball describim la regulació de l'operó *nrdHIEF* de *S. Typhimurium* LT2 per part de NrdR i també per Fur. En aquest últim cas, demostrem que efectivament Fur s'uneix al promotor de *nrdHIEF* de *S. Typhimurium* LT2 en una caixa d'unió que no s'havia descrit fins ara i en reprimeix l'expressió. A la vegada, describim també per primer cop com en *S. Typhimurium*, Fur s'autoregula tal i com també s'havia descrit en *E. coli* (De Lorenzo *et al.*, 1988).

La caixa d'unió de Fur que hem descrit a l'operó *nrdHIEF* tot i ser força similar a la seqüència consens, presenta algunes diferències i es pot interpretar de diverses maneres tenint en compte les propietats interpretades descrites per a la caixa Fur consens (Escolar *et al.*, 1999). La caixa Fur de l'operó *nrdHIEF* es podria interpretar de dues maneres diferents. Sembla com si pogués tenir 3 de les seqüències hexamèriques 5'-GATAAT-3' però amb la primera i la última força degenerades mentre que la segona és pràcticament idèntica. L'altra possible interpretació seria que només tingués dues seqüències hexamèriques, la primera molt conservada i la segona més degenerada (**Fig. 24**).

Part I: Regulació transcripcional de les ribonucleotidil reductases de *S. Typhimurium*

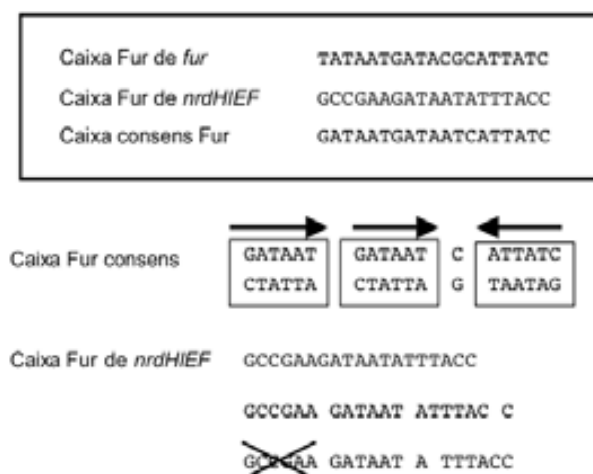


Figura 24. Possibles caixes Fur trobades a regió promotora de *fur* i de l'operó *nrdHIEF* de *S. Typhimurium* LT2. Possibles interpretacions de la caixa Fur trobada a la regió promotora de l'operó *nrdHIEF* de *S. Typhimurium* LT2.

La classe Ib es diferencia de la classe Ia en que li manquen 50 residus de la cadena polipeptídica de l'extrem amino-terminal que és la responsable de l'activitat global de l'enzim. D'aquesta manera NrdEF no es veu inhibida per la unió de dATP. A la seva regió promotora no hi trobem caixes d'unió per la DnaA, de manera que aquesta nova regulació descrita recentement (Gon *et al.*, 2006) no exerceix cap efecte sobre l'expressió de *nrdHIEF*. És a dir, dATP-DnaA, que es formaria en presència de grans concentracions de dNTPs a l'interior de la cèl·lula, i que en condicions normals serviria per reprimir la classe Ia, no pot unir-se al promotor de *nrdHIEF* i per tant la seva expressió no es veuria afectada. Alhora, el dATP tampoc podria unir-se a NrdEF per a inactivar la proteïna ja que aquesta no conté el lloc d'activitat present en la R1.

Així doncs, sembla que *nrdHIEF* seria "insensible" a la presència de grans concentracions de dNTPs presents a la cèl·lula. Aquesta podria ser una situació que es presentaria en produir-se danys en el DNA, en un moment on hi ha una major demanda de dNTPs necessària per a la reparació del DNA.

La vinculació de l'expressió de l'operó *nrdHIEF* en resposta a baixes concentracions de nutrients, baixes concentracions de ferro i la seva resposta a l'estrès oxidatiu ha fet pensar que la seva participació en el procés d'infecció podria ser important. Aquesta possibilitat s'estudiarà a l'apartat següent.

4. Resultats: Part II: Estudi de la implicació de les ribonucleotidil reductases en la patogènesi de la soca virulenta *S. Typhimurium* SL1344

4.1. Breu introducció

Les RNRs són enzims essencials que permeten un subministrament equilibrat dels desoxiribonucleòtids necessaris per a la síntesi i reparació del DNA (Nordlund and Reichard, 2006). La presència de varies classes d'aquests enzims en un mateix organisme ha estat el centre de molts estudis.

Es considera que cada classe de RNRs és important en unes determinades condicions de creixement. Així doncs, la presència d'oxigen en l'ambient condicionarà que la RNR funcional sigui aquella capaç de produir la reacció de reducció dels ribonucleòtids en presència d'oxigen (classe Ia, Ib o II). Ara bé, la presència simultànea de dues RNRs que poden funcionar en aquestes condicions en un mateix organisme, com ara classe Ia + Ib, classe Ia + II o classe Ib + II, fa pensar que hi ha d'haver altres condicions que estimulin l'ús d'una o l'altra, o bé, la seva presència podria ser simplement una relíquia evolutiva.

Aquesta situació és la que trobem en *S. Typhimurium*. La presència de dues classes I (Ia i Ib) al seu genoma fa preguntar-nos en quines condicions les utilitza. La classe Ia s'ha descrit com a responsable del creixement en condicions d'aerobiosi i la classe III en condicions d'anaerobiosi. Però, quan s'utilitza la classe Ib? Tot i els seus nivells baixos d'expressió, insuficients per a mantenir el creixement d'un mutant de la classe Ia, hi ha condicions que indueixen la seva expressió: nutrients limitants, hidroxidreurea, estrès oxidatiu, la manca de ferro (Jordan *et al.*, 1996a; Monje-Casas *et al.*, 2001; Tao *et al.*, 1999). Aquestes condicions són molt semblants a les que *S. Typhimurium* es podria trobar en el procés d'infecció. Per aquest motiu vam plantejar-nos la possibilitat de realitzar assajos d'infecció en macròfags i cèl·lules epitelials per a determinar un possible paper diferencial de les tres RNRs durant el procés infecciós.

4.2. Resultats

4.2.1. Obtenció de mutants de les diferents classes de RNRs de *S. Typhimurium* SL1344

Degut a l'essencialitat de l'operó *nrdAB*, per a poder obtenir-ne un mutant és necessari aportar una còpia extra de l'operó *nrdHIEF* per a permetre'n el creixement (Jordan *et al.*, 1996a). En aquest treball s'han utilitzat dos tipus de mutants de l'operó *nrdAB*: un mutant *nrdA':::ΩSpc'nrdB* amb una còpia cromosòmica extra de l'operó *nrdHIEF* (merodiploid) i un mutant *nrdA':::ΩCm'nrdB* que només és capaç de créixer en anaerobiosi mitjançant l'operó *nrdDG*. La primera construcció conté una deleció de l'operó *nrdAB* amb només 561 pb del gen *nrdA* i 441 pb del gen *nrdB* entre les quals es troba l'interposó Ω -Spc procedent d'un pUT-miniT5-Spc (de Lorenzo *et al.*, 1990) digerit amb *SmaI* (aproximadament 1,9 Kb) i va ser transduïda de la soca LT2 a la soca SL1344.

El segon tipus de mutant es va obtenir transduïnt la mutació *nrdA':::ΩCm'nrdB* de la soca IG1 a la soca *S. Typhimurium* SL1344 salvatge en condicions d'anaerobiosi. Aquesta mutació conté una deleció en l'operó *nrdAB* de manera que només resten 560 pb de l'extrem 5' (corresponen a 168 pb del gen *nrdA* i 392 pb de la regió no codificant cap a l'extrem 5') i una regió de 440 pb de l'extrem 3' del gen *nrdB*, separades entre elles per l'interposó Ω Cm. Aquesta soca només és capaç de créixer en anaerobiosi ja que no pot reduir ribonucleòtids en presència d'oxigen.

Els mutants en els operons *nrdHIEF* i *nrdDG* es van construir mitjançant el mètode de Wanner & Datsenko (2000) en la soca *S. Typhimurium* LT2 mitjançant els oligonucleòtids MutSalEF up i lw i MutSalDG up i lw respectivament (**Taula VII**), i posteriorment es van transduïr a la soca patògena SL1344 i se li van eliminar les resistències donant lloc a les soques IG138 i IG139, respectivament (**Taula V**). En el cas del mutant *nrdHIEF*, se li han deleccionat 3103 pb que corresponen a tota la regió codificant del gen *nrdE* i *nrdF*, però s'han mantingut els gens *nrdH* i *nrdI* intactes. Pel que fa al mutant *nrdDG* s'elimina tota la regió codificant del gen *nrdD* i tota la regió codificant del gen *nrdG*.

També es va construir un doble mutant $\Delta nrdEF \Delta nrdDG$ a partir de la soca IG138 amb la mutació $\Delta nrdEF$, a la qual se li va transduïr la mutació $\Delta nrdDG::km$ i posteriorment se li va eliminar la resistència per acabar donant lloc a la soca IG140 (**Taula V**).

Per a realitzar el doble mutant de l'operó *nrdAB* i de l'operó *nrdDG* és necessari que hi hagi més d'una còpia de l'operó *nrdHIEF* (en un plasmidi o en un merodiploid). Per aquest motiu vam plantejar-nos realitzar el doble mutant amb l'operó *nrdHIEF* sobreexpressat a partir de la mutació Δfur o la mutació $\Delta nrdR$, ja que ja havíem observat que la mutació d'aquests reguladors provocava un

augment de l'expressió de l'operó *nrdHIEF* de 5 vegades en el cas de la mutació Δfur , i de fins a 12 vegades amb la mutació $\Delta nrdR$ (aquest treball).

Aquests dobles mutants es van construir de la següent manera: la mutació $\Delta fur::Km$ de la soca IG128 es va transduir a la soca SL1344 *nrdA':: Ω Cm'nrdB* (IG137). El procés es va realitzar en anaerobiosi però si els clons obtinguts es repicaven en plaques en presència d'oxigen, eren capaços de créixer tot i que a un ritme més lent. Així doncs suposadament, aquest creixement era degut a la sobreexpressió de l'operó *nrdHIEF*. El mateix procediment es va dur a terme amb la mutació $\Delta nrdR$, es va transduir la mutació $\Delta nrdR::Km$ de la soca IG102 a la soca SL1344 *nrdA':: Ω Cm'nrdB* en condicions d'anaerobiosi. Aquests clons obtinguts també eren capaços de créixer en presència d'oxigen, una vegada més, però, amb un creixement més lent. Així doncs, la sobreexpressió de l'operó *nrdHIEF* causada per la mutació de *nrdR* era capaç de permetre el creixement en condicions d'aerobiosi.

En el cas del triple mutant *nrdA':: Ω Cm'nrdB* $\Delta nrdDG$ Δfur (soca IG146), degut a que les resistències de les soques $\Delta nrdDG$ i Δfur eren Km i Cm respectivament, hi havia un conflicte a l'hora de construir el mutant. Així que es va optar per primer transduir la mutació $\Delta fur::Km$ a la soca no marcada $\Delta nrdDG$ (IG139) i, a la soca resultant, transduir-li la mutació *nrdA':: Ω Cm'nrdB* provinent de la soca IG1 pIG8.

El triple mutant *nrdA':: Ω Cm'nrdB* $\Delta nrdDG$ $\Delta nrdR$ (soca IG145) es va construir transduint la mutació $\Delta nrdR::Km$ sobre la soca $\Delta nrdDG$ (IG139), eliminant-ne la resistència a Km i transduint-li la mutació *nrdA':: Ω Cm'nrdB*.

Aquests triples mutants també eren capaços de créixer en aerobiosi més lentament que la soca salvatge però la sobreexpressió de l'operó *nrdHIEF* era suficient per subministrar els desoxiribonucleòtids necessaris.

4.2.2. Anàlisi fenotípic i de viabilitat del mutants de les RNRs

La classe la és la RNR essencial pel creixement *in vitro* tant d'*E. coli* com de *S. Typhimurium*. Un mutant en la classe la no és viable si no hi ha més d'una còpia de l'operó *nrdHIEF* (Jordan *et al.*, 1996a) o, com acabem d'esmentar, si se sobreexpressa l'operó *nrdHIEF* (per exemple en un mutant en *fur* o *nrdR*). L'obtenció dels dobles i triples mutants de les RNRs ens va fer adonar que tot i sobreexpressant l'operó *nrdHIEF*, les soques presentaven deficiències en el creixement.

Part II: Implicació de les RNRs en la patogènesi de *S. Typhimurium* SL1344

D'entrada, tot i que s'està sobreexpressant l'operó *nrdHIEF*, si els cultius líquids es creixien sense agitació, els mutants eren incapaços de créixer. Així doncs, per a poder fer-los créixer era necessari un subministrament d'oxigen constant (agitació).

Vam realitzar la cinètica de creixement de la soca mutant *nrdA'::ΩCm'nrdB* en anaerobiosi respirant nitrats i en vam fer recompte de les cèl·lules viables. Realment, tot i estar creixent en anaerobiosi, i per tant, utilitzant l'operó *nrdDG* per a sintetitzar dNTPs, el mutant presentava un creixement molt més lent comparat amb la soca salvatge així com una fase lag molt llarga (5 hores) (**Fig. 25**). Aquest fenomen probablement és degut a un defecte de creixement durant les primeres hores degut a que encara hi ha traces d'oxigen (microaerofilia), i en aquestes condicions la classe la seria la responsable del creixement, tal i com ja s'havia observat en un mutant *nrdDG* creixent en microaerofilia (Garriga *et al.*, 1996). No és fins que s'assoleix l'anaerobiosi estricta que es detecten nivells de creixement gairebé similars als de la soca salvatge.

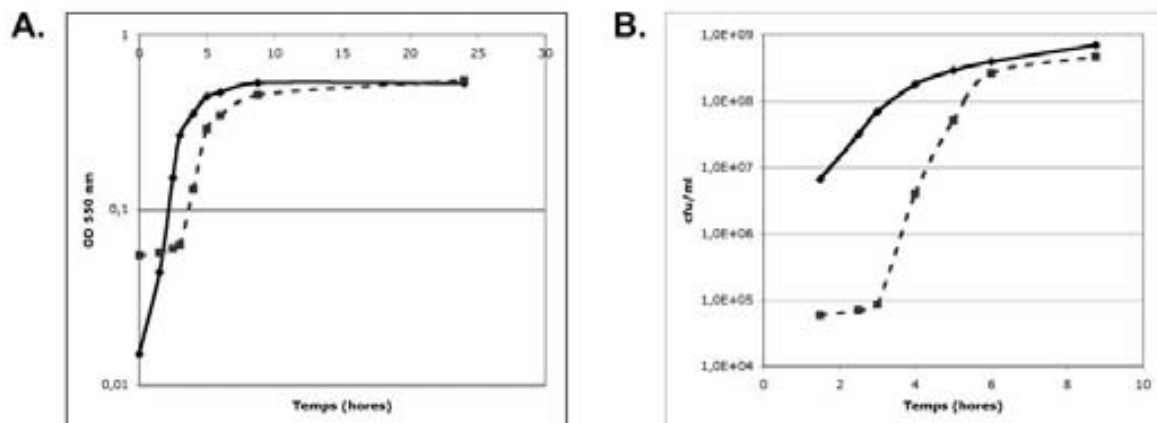


Figura 25. Cinètica de creixement del mutant *nrdA'::ΩCm'nrdB* de *S. Typhimurium* SL1344 creixent en anaerobiosi (A) i el corresponent recompte de viables (B). *S. Typhimurium* SL1344 *wt* (◆ i línia contínua). *S. Typhimurium* SL1344 *nrdA'::ΩCm'nrdB* (■ i línia discontinua).

També vam realitzar cinètiques de creixement i recompte de cèl·lules viables del doble mutant *nrdA'::ΩCm'nrdB Δfur*, i dels triples mutants *nrdA'::ΩCm'nrdB ΔnrdDG ΔnrdR* i *nrdA'::ΩCm'nrdB ΔnrdDG Δfur* (**Fig. 26**). Tots ells mostraven deficiències en el creixement en comparació amb la soca salvatge i el recompte de cèl·lules viables era menor (**Fig. 26**).

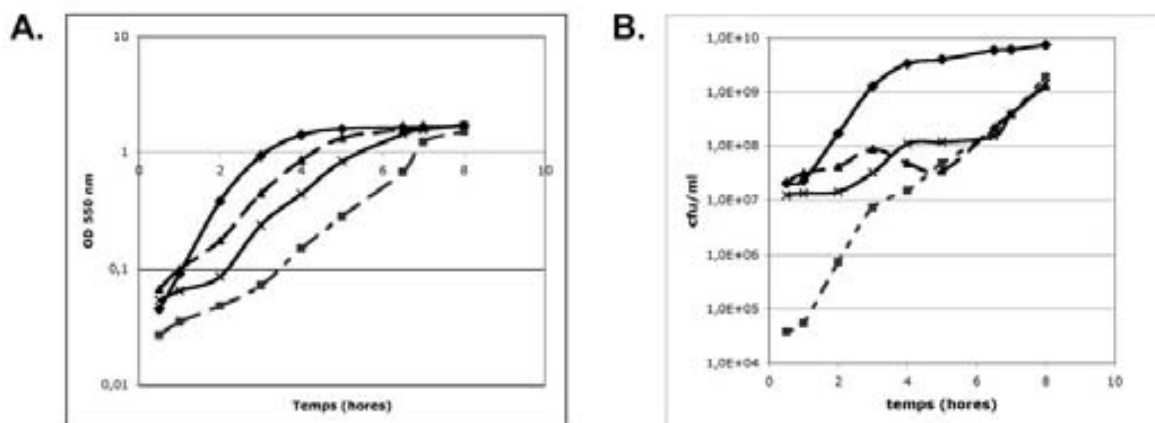


Figura 26. (A) Cinètica de creixement del mutant *nrdA::ΩCm'nrdB Δfur* (■ i línia discontinua), *nrdA::ΩCm'nrdB ΔnrdDG Δfur* (× i línia contínua), del mutant *nrdA::ΩCm'nrdB ΔnrdDG ΔnrdR* (▲ i línia discontinua) i la soca *wt* (◆ i línia contínua) de *S. Typhimurium* SL1344 creixent en aerobiosi i el corresponent recompte de viables (B).

Les cèl·lules bacterianes tenen la capacitat de filamentar quan es troben sota condicions estressants que provoquen l'aturada de la replicació. En aquestes condicions la cèl·lula continua creixent formant un llarg filament que no acaba de dividir-se. En aquestes soques mutants és molt probable que la manca de dNTPs, degut a l'absència de la reductasa essencial NrdAB, estigui aturant el procés de replicació i la cèl·lula no sigui capaç de dividir-se i només filamentari. Per aquest motiu vam voler observar-les al microscopi òptic de contrast de fase per tal de veure si aquestes soques amb problemes de creixement presentaven filamentació cel·lular.

A la **Figura 27** s'observa com només en aquelles soques on hi ha la mutació *nrdA::ΩCm'nrdB* hi ha una filamentació clara. Ni la soca salvatge, ni la mateixa soca mutant en *nrdAB* creixent en anaerobiosi utilitzant l'operó *nrdDG* són filamentades. En el mutant *ΔnrdR* hi ha certa filamentació però són filaments més curts i probablement deguts a una possible desregulació del creixement ja que s'estàn sobreproduint totes les classes de RNRs. El mutant *Δfur* sí que presenta algunes cèl·lules que poden ser filamentades, tal i com ja s'havia descrit anteriorment (Touati *et al.*, 1995), però en cap cas aquest fenomen és superior a la filamentació que s'observa en els dobles i triples mutants (**Fig. 27**).

La mutació de la classe la està produint un efecte molt important sobre el creixement d'aquestes soques mutants demostrant la seva rellevància tot i que teòricament hi hauria una altra RNR capaç de subministrar dNTPs.

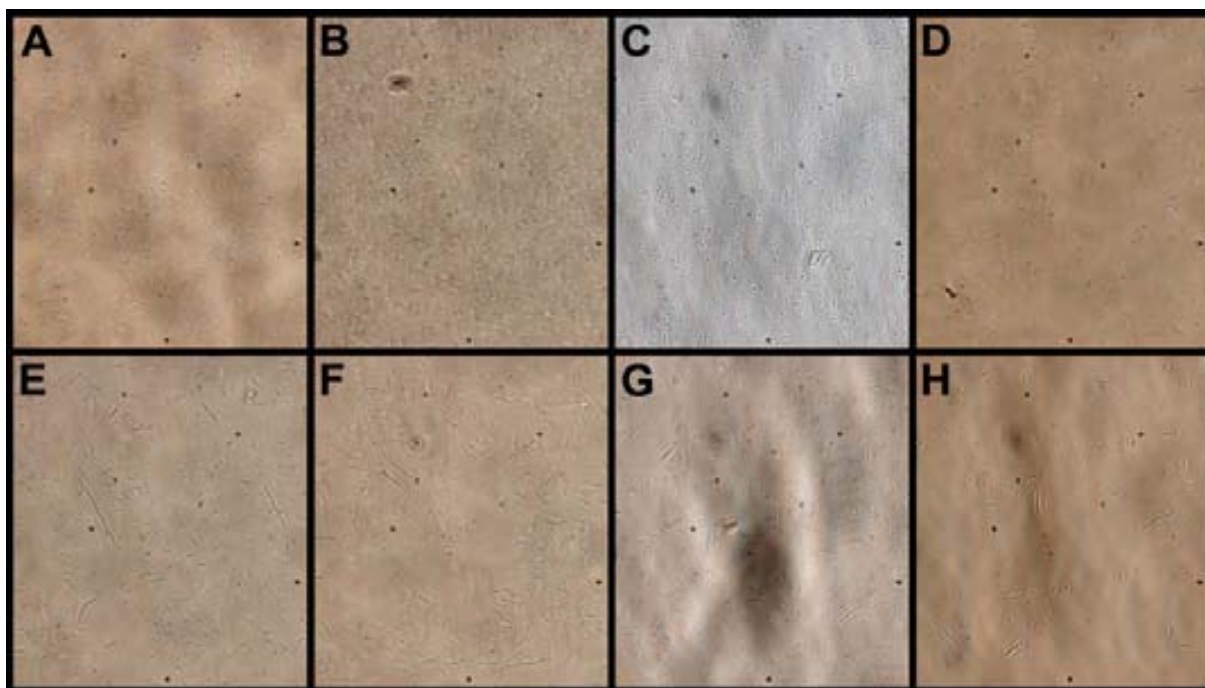


Figura 27. Imatges del microscopi òptic de contrast de fase de preparacions de cada una de les soques mutants en fase exponencial: SL1344 (A), mutant Δfur (B), mutant $\Delta nrdR$ (C), mutant $nrdA'::\Omega Cm'nrdB$ (D), mutant $nrdA'::\Omega Cm'nrdB \Delta fur$ (E), mutant $nrdA'::\Omega Cm'nrdB \Delta nrdR$ (F), mutant $nrdA'::\Omega Cm'nrdB \Delta nrdDG \Delta fur$ (G) i mutant $nrdA'::\Omega Cm'nrdB \Delta nrdDG \Delta nrdR$ (H). Tots els cultius es van fer créixer en agitació i aerobiosi tret del mutant $nrdA'::\Omega Cm'nrdB$ que es va fer créixer en anaerobiosi respirant nitrats.

4.2.3. Estudi de la supervivència i proliferació dels mutants de les diferents classes de RNRs de *S. Typhimurium* SL1344 en macròfags

Una de les característiques més importants de la virulència de *S. Typhimurium* és que és capaç de sobreviure i proliferar a l'interior de macròfags (Buchmeier and Heffron, 1989). Tot i ser un ambient poc favorable: pH àcid, limitació de magnesi i fosfat, manca de nutrients, etc..., *Salmonella* és capaç de proliferar-hi. En aquest treball ens interessava conèixer quina de les RNRs era la responsable de la reducció dels ribonucleòtids a l'interior dels macròfags, i ens plantejàvem si, en aquestes condicions adverses, la RNR responsable podria ser la classe Ib. Per aquest motiu vam realitzar assajos de supervivència i proliferació a l'interior de macròfags (assajos de protecció amb gentamicina, de l'anglès *gentamicin protection assays*) (Elsinghorst, 1994) amb cada un dels mutants i amb combinacions de mutants.

D'entrada es va començar fent un estudi amb la línia cel·lular de macròfags de ratolí RAW264.7, utilitzada àmpliament en estudis *in vitro* de factors de virulència per la seva sensibilitat a la infecció per *Salmonella* (Groisman, 2001a).

Les soques mutants *nrdA'::ΩSpc'nrdB* merodiploid *nrdHIEF*, *ΔnrdEF*, *ΔnrdDG* i el doble mutant *ΔnrdEFΔnrdDG* es van utilitzar per a infectar els macròfags RAW264.7 i se'n va obtenir l'índex de proliferació intracel·lular a les 24h tal i com es descriu en els Materials i Mètodes. Com es pot observar a la **Figura 28**, ni la mutació en l'operó *nrdHIEF* (IP= 2,1), ni en l'operó *nrdDG* (IP= 3,99), ni en el doble mutant (IP= 3,55) tenen cap efecte significatiu en la proliferació de *S. Typhimurium*. Els índexs de proliferació de la soca salvatge i la soca mutant *nrdA'::ΩSpc'nrdB* merodiploid *nrdHIEF* són 3,25 i 0,105 respectivament.

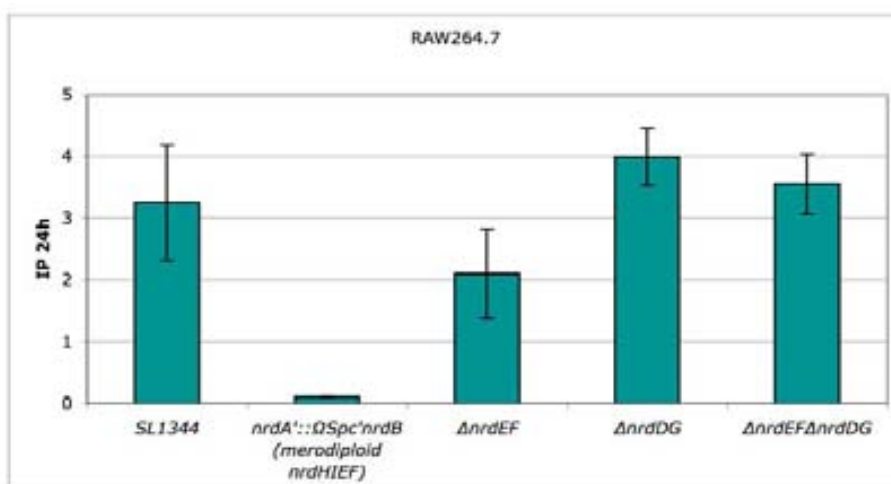


Figura 28. Índex de proliferació (IP) a les 24 h p.i. de les soques *wt*, mutant *nrdA'::ΩSpc'nrdB* merodiploid *nrdHIEF*, mutant *ΔnrdEF*, *ΔnrdDG* i doble mutant *ΔnrdEFΔnrdDG* infectant la línia cel·lular de macròfags de ratolí RAW264.7. IP calculat a partir de les cfu/ml comptades a les 24 h p.i. respecte les obtingudes a les 2 h p.i. Els resultats són la mitjana de mínim tres experiments independents, les barres d'error representen la desviació estàndard de la mitjana.

La no participació de l'operó *nrdDG* en la proliferació de *S. Typhimurium* SL1344 a l'interior dels macròfags era d'esperar degut a que l'interior de la SCV s'ha descrit sempre com un ambient microaeròfilic i, per tant, el radical glicil es destruiria i no seria capaç de reduir els ribonucleòtids.

El resultat obtingut amb la mutació de l'operó *nrdHIEF* sí que va ser més sorprenent. Fins al moment no se n'ha descrit la funció que realitza, però era un candidat a ser el responsable de la reducció de ribonucleòtids durant el procés infeccios. Així que la manca de diferències significatives entre la soca salvatge i la soca mutant en l'operó *nrdHIEF* sembla indicar que la seva presència

tampoc és essencial durant la proliferació de *S. Typhimurium* SL1344 a l'interior dels macròfags. De tota manera, pensem que és important destacar que l'IP d'aquest mutant és lleugerament inferior als valors obtinguts en la soca salvatge, el mutant $\Delta nrdDG$ i el doble mutant $\Delta nrdEF\Delta nrdDG$, tot i no presentar diferències significatives.

En canvi, la soca que presenta la deleció en l'operó *nrdAB*, tot i que és una soca viable i pot créixer *in vitro*, és incapaç de proliferar a l'interior dels macròfags amb les dues còpies de l'operó *nrdHIEF* presents en el seu cromosoma.

En aquest punt ens vam plantejar si les dues còpies de l'operó *nrdHIEF* no eren suficients per a permetre el creixement d'aquesta soca degut a que la infecció l'estàvem realitzant en una línia cel·lular mutant pel transportador de cations divalents *Nramp1*.

La línia cel·lular RAW264.7 és més sensible a la infecció per *Salmonella* degut a que presenta una mutació Gly-169-Asp en *Nramp1* (de l'anglès, *natural resistance-associated macrophage protein*) (Malo *et al.*, 1994). Aquesta proteïna s'ha descrit com un transportador de cations divalents (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , etc...) que s'expressa només als endosomes tardans/lisosomes i als fagosomes/lisosomes de monòcits i macròfags. Aquesta proteïna ha estat el centre de molts estudis i controvèrsies i encara no es coneix ben bé el mecanisme del seu funcionament (Wyllie *et al.*, 2002). Una de les possibilitats és que *Nramp1* podria funcionar com un transportador de ferro cap a l'exterior dels fagosomes, competint d'aquesta manera amb els microorgansimes que necessiten el ferro i altres cations divalents com a cofactors de molts enzims essencials, entre ells alguns responsables de la protecció davant d'espècies reactives de l'oxigen (les superòxid dismutases, per exemple). Un cop al citosol del macròfag, aquest ferro també podria estabilitzar els mRNAs que codifiquen citoquines, responsables del reclutament de neutròfils cap al lloc d'infecció. En certa manera *Nramp1* estaria controlant l'homeòstasi del ferro a l'interior dels macròfags i també modularia la resposta dels macròfags cap a estímuls inflamatoris aguts (Wyllie *et al.*, 2002).

Així doncs, en la línia RAW264.7 (porta la mutació *Nramp1*^{Asp169} i és sensible a la infecció per *S. Typhimurium*, també és denominada *Nramp1*^{-/-}) la SCV no presenta aquest transportador a la seva membrana i per tant és incapaç de transportar Fe^{2+} de l'interior de la vacuola cap a l'exterior. Si la concentració de Fe^{2+} a l'interior de la vacuola és elevada, la proteïna Fur és activa i pot reprimir l'operó *nrdHIEF* inhibint-ne la transcripció. Potser per aquest motiu no s'estava expressant l'operó *nrdHIEF* i la cèl·lula era incapaç de proliferar. Així doncs vam realitzar els mateixos assajos en la línia RAW264.7 *Nramp1*^{Gly169} (també es denomina RAW264.7 *Nramp1*^{+/+}) que sí que presenta el transportador de cations divalents.

La nomenclatura que emprarem a partir d'ara serà RAW264.7 per a la línia cel·lular de macròfags que no porta el transportador *Nramp1* i RAW264.7 *Nramp1*^{+/+} per a la que sí que presenta aquest transportador.

En tots els mutants analitzats s'observa que l'índex de proliferació és menor en la línia RAW264.7 *Nramp1*^{+/+} en comparació a la línia RAW264.7 degut a que és més resistent a la infecció per *Salmonella* (**Fig. 29**), però el resultat general és el mateix, ni la classe Ib (IP= 1,204) ni la classe III (IP= 1,585) presenten diferències significatives respecte la soca salvatge (IP= 1,239). En el mutant de l'operó *nrdA*:: Ω *Spc**nrdB* merodiploid *nrdHIEF* (IP= 0,143), tot i que sembla que hi ha un augment en l'índex de proliferació, aquest no és significatiu respecte la mateixa soca infectant els macròfags RAW264.7 (IP= 0,105), però sí que mostra una tendència.

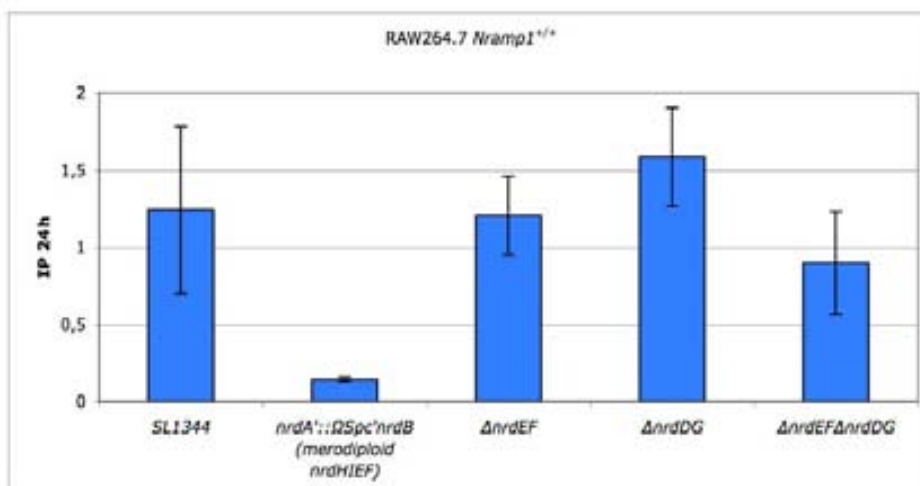


Figura 29. Índex de proliferació (IP) a les 24 h p.i. de les soques *wt*, mutant *nrdA*:: Ω *Spc**nrdB* merodiploid *nrdHIEF*, mutant Δ *nrdEF*, Δ *nrdDG* i doble mutant Δ *nrdEF* Δ *nrdDG* infectant la línia cel·lular de macròfags de ratolí RAW264.7 *Nramp1*^{+/+}. IP calculat a partir de les cfu/ml comptades a les 24 h p.i. respecte les obtingudes a les 2 h p.i. Els resultats són la mitjana de mínim tres experiments independents, les barres d'error representen la desviació estàndard de la mitjana.

Per tal de reproduir aquest efecte de manca de ferro en la línia cel·lular RAW264.7 (*Nramp1*^{-/-}) vam provar de tractar els macròfags d'aquesta línia amb 65 μ M de DIP (2,2'-dipiridil), un quelant del ferro, a veure si d'aquesta manera s'observava alguna diferència en l'índex de proliferació de la soca mutant *nrdA*:: Ω *Spc**nrdB* merodiploid *nrdHIEF* (**Fig. 30**). En aquesta situació l'índex de proliferació obtingut sí que presenta diferències significatives respecte la mateixa soca infectant la línia cel·lular RAW264.7 sense tractar o la RAW264.7 *Nramp1*^{+/+}. Així doncs, eliminar el ferro mitjançant un agent quelant permetia una major expressió de l'operó *nrdHIEF* que era suficient per permetre una certa viabilitat del mutant *nrdAB* a l'interior del macròfag.

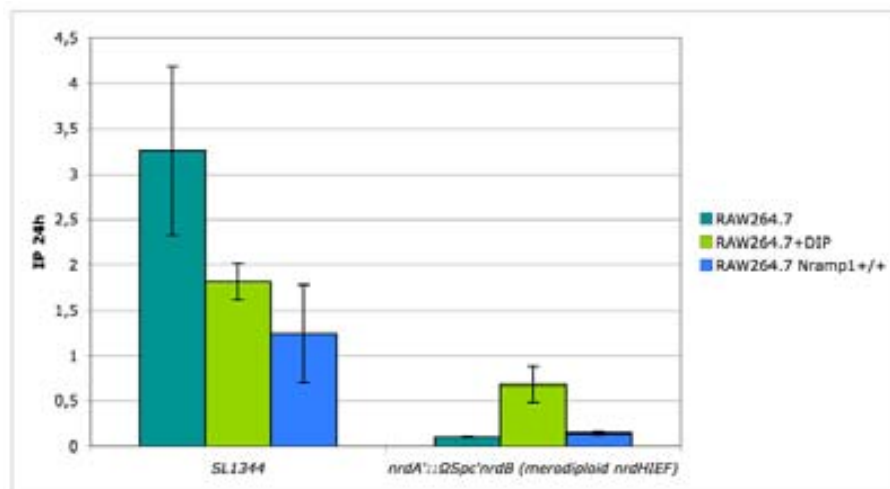


Figura 30. Índex de proliferació (IP) a les 24 h p.i. de les soques *wt* i mutant *nrdA':::ΩSpc'nrdB* merodiploid *nrdHIEF* infectant la línia cel·lular de macròfags de ratolí RAW264.7, la línia cel·lular RAW264.7 tractada amb DIP 65 μ M, i la línia RAW264.7 *Nramp1*^{+/+}. IP calculat a partir de les cfu/ml comptades a les 24 h p.i. respecte les obtingudes a les 2 h p.i. Els resultats són la mitjana de mínim tres experiments independents, les barres d'error representen la desviació estàndard de la mitjana.

De tota manera, s'ha de tenir en compte que aquesta soca mutant en l'operó *nrdAB*, presenta dues còpies de l'operó *nrdHIEF*: una pròpia del cromosoma i una d'extra introduïda a través d'un transposó en una altra posició del seu cromosoma (merodiploid). Per aquest motiu vam plantejar-nos realitzar un mutant que només contingués la única còpia cromosòmica de l'operó *nrdHIEF*. Vam construir un mutant *nrdA':::ΩCm'nrdB* que només pot créixer en anaerobiosi, tal i com s'ha explicat a l'apartat 4.2.1., i vam realitzar els assajos d'infecció en les línies RAW264.7 i RAW264.7 *Nramp1*^{+/+}.

En aquest cas, vam realitzar els assajos prenent diferents temps post-infecció, ens interessava veure què passava en els primers temps. Així vam agafar mostres a les 4, 6 i 24 h post-infecció. A la **Figura 31** es pot observar com el mutant es manté les primeres hores, però a partir de les 6h és incapaç de proliferar i acaba morint. Això ho observem tant en la línia RAW264.7 com en la línia RAW264.7 *Nramp1*^{+/+}. En conjunt, aquests resultats indiquen que per a la proliferació sembla necessària la presència de l'operó *nrdAB* però, en les primeres etapes de la infecció, la còpia única de l'operó *nrdHIEF* és capaç si més no, de permetre la producció de dNTPs per a mantenir la viabilitat durant unes hores.

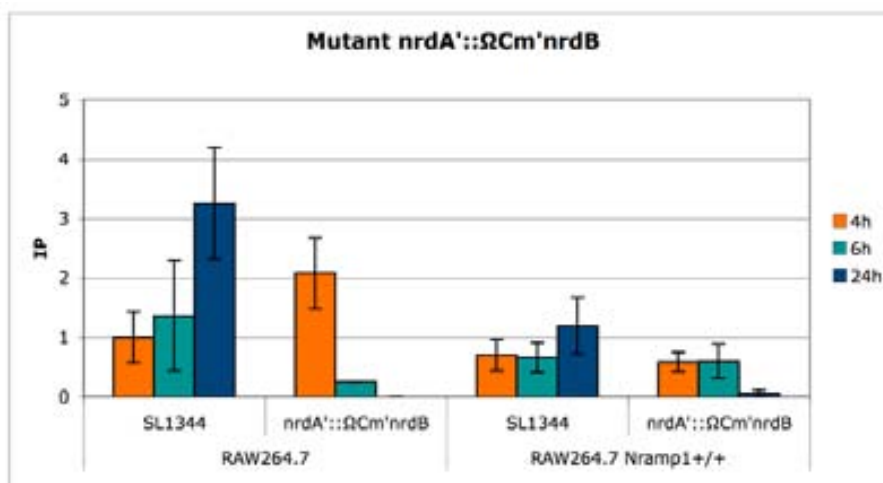
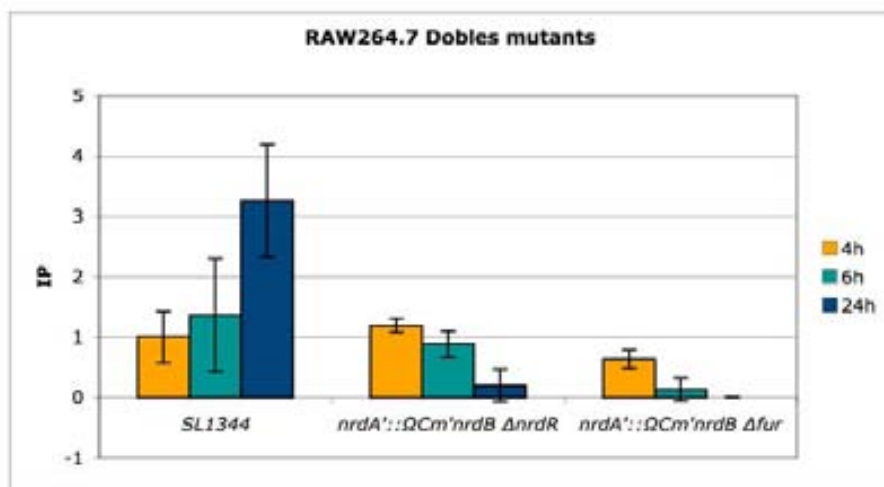


Figura 31. Índex de proliferació (IP) a les 4, 6 i 24 h p.i. de les soques *wt*, mutant *nrdA'::ΩCm'nrdB* (còpia única de l'operó *nrdHIEF*) infectant la línia cel·lular de macròfags de ratolí RAW264.7 i RAW264.7 *Nramp1*^{+/+}. IP calculat a partir de les cfu/ml comptades a les 4, 6 i 24 h p.i. respecte les obtingudes a les 2 h p.i. Els resultats són la mitjana de mínim tres experiments independents, les barres d'error representen la desviació estàndard de la mitjana.

El següent pas a seguir va ser la realització dels assajos d'infecció amb els dobles i triples mutants que presenten l'operó *nrdHIEF* sobreexpressat, ja sigui pel fet de contenir la mutació $\Delta nrdR$ o Δfur . També ens vam centrar en les primeres hores del procés infecció (4, 6 i 24h) per si s'observava el mateix efecte que amb el mutant *nrdA'::ΩSpc'nrdB*.

Els resultats obtinguts amb els dobles mutants *nrdA'::ΩSpc'nrdB ΔnrdR* i *nrdA'::ΩSpc'nrdB Δfur* (**Fig. 32**) indiquen que també hi ha un cert manteniment de la viabilitat a l'interior del macròfag durant les primeres hores d'infecció però la sobreexpressió de l'operó *nrdHIEF* no permet tampoc la progressió de la infecció i l'efecte que observem és doncs, equivalent a l'observat amb la soca mutant *nrdA'::ΩSpc'nrdB* sense sobreexpressar l'operó *nrdHIEF*.

A.



B.

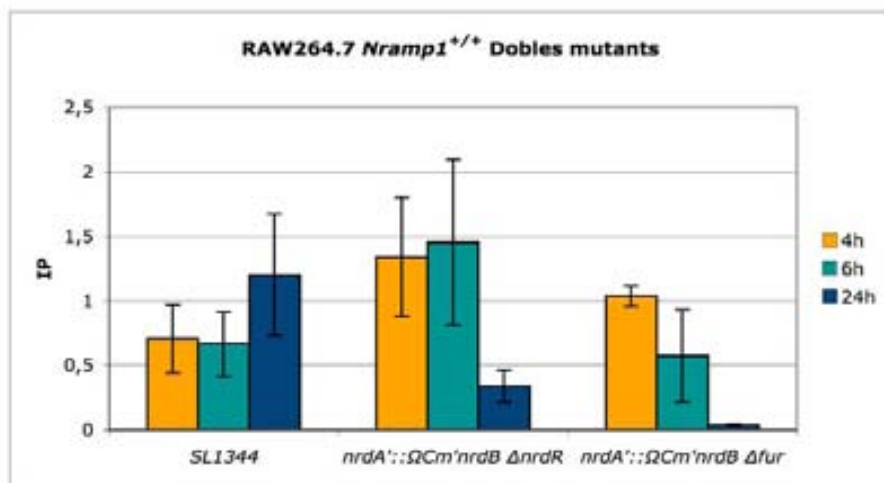
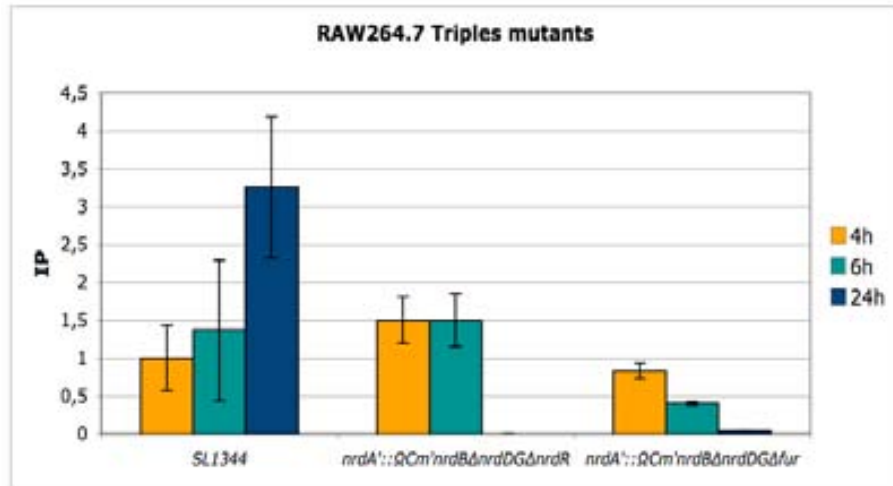


Figura 32. Índex de proliferació (IP) a les 4, 6 i 24 h p.i. de les soques *wt*, doble mutant *nrdA::ΩCm'nrdB ΔnrdR* i *nrdA::ΩCm'nrdB Δfur* infectant la línia cel·lular de macròfags de ratolí RAW264.7 (A) i RAW264.7 *Nrampl*^{+/+} (B). IP calculat a partir de les cfu/ml comptades a les 24 h p.i. respecte les obtingudes a les 2 h p.i. Els resultats són la mitjana de mínim tres experiments independents, les barres d'error representen la desviació estàndard de la mitjana.

Pel que fa als resultats obtinguts amb els triples mutants *nrdA::ΩSpc'nrdB ΔnrdDG ΔnrdR* i *nrdA::ΩSpc'nrdB ΔnrdDG Δfur* també s'observa una tendència similar a la dels dobles mutants. El fet de mutar *ΔnrdDG*, no sembla que afecti més el comportament de la soca que en els dobles mutants (Fig. 33).

A.



B.

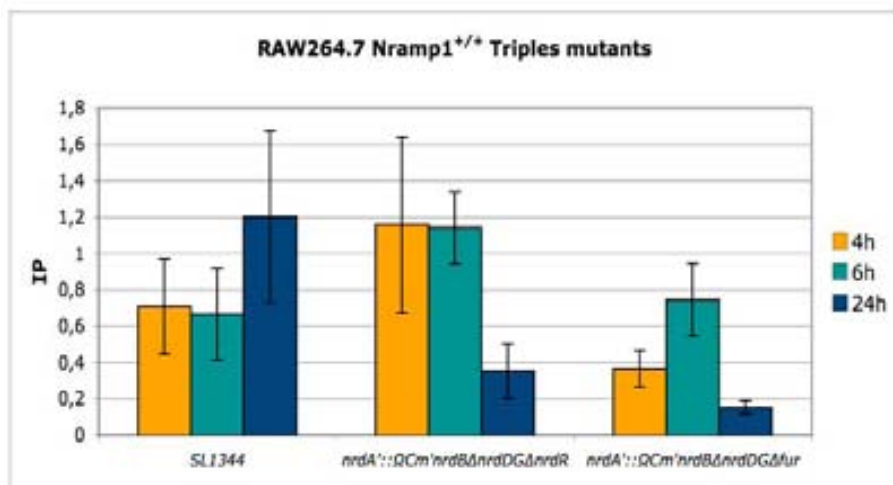


Figura 33. Índex de proliferació (IP) a les 4, 6 i 24 h p.i. de les soques *wt*, triple mutant *nrdA::ΩCm'nrdB ΔnrdDG ΔnrdR* i *nrdA::ΩCm'nrdB ΔnrdDG Δfur* infectant la línia cel·lular de macròfags de ratolí RAW264.7 (A) i RAW264.7 *Nramp1^{+/+}* (B). IP calculat a partir de les cfu/ml comptades a les 24 h p.i. respecte les obtingudes a les 2 h p.i. Els resultats són la mitjana de mínim tres experiments independents, les barres d'error representen la desviació estàndard de la mitjana.

Si es comparen els valors dels dobles i els triples mutants amb els valors obtinguts en la soca mutant *nrda':: Ω Cm'nrdb* a les 4 i 6 h no hi ha diferències significatives. Semblaria com si en aquell moment ja hi hagués unes condicions que permetessin la sobreexpressió de l'operó *nrdHIEF* ja que no s'observa un efecte additiu de la inducció produïda per les mutacions dels seus reguladors (Fur i NrdR).

4.2.4. Estudi de la invasió i proliferació dels mutants de les diferents classes de RNRs de *S. Typhimurium* SL1344 en cèl·lules epitelials

Tal i com s'ha comentat anteriorment, una de les principals característiques de *S. Typhimurium* és la seva capacitat d'envair cèl·lules epitelials i de proliferar a l'interior dels macròfags. Per tant doncs, és força habitual realitzar els estudis dels efectes dels possibles factors de virulència tant en la invasió de cèl·lules epitelials com en la proliferació en macròfags.

Ja hem vist que la RNR responsable de la proliferació de *S. Typhimurium* a l'interior del macròfag és la RNR de classe Ia. En aquest punt ens interessava saber quina ho era durant el procés d'invasió de les cèl·lules epitelials. Per això vam realitzar assajos d'infecció de la línia de cèl·lules epitelials humanes HeLa per a obtenir els índexs d'invasivitat així com també l'índex de proliferació en el seu interior a les 24h post-infecció.

Es va emprar la línia cel·lular de cèl·lules epitelials HeLa perquè és un model ben definit per la infecció de cèl·lules de mamífers amb *S. Typhimurium* i també s'ha emprat per a caracteritzar la biogènesi i l'evolució de la SCV (Beuzon *et al.*, 2000; Steele-Mortimer *et al.*, 1999)

Els resultats obtinguts indiquen que una vegada més, la RNR responsable de l'invasió i proliferació a les cèl·lules epitelials és la classe Ia i no s'observa cap efecte en les soques mutants en la classe Ib ni en la classe III (**Taula III**).

Els dobles i triples mutants que sobreexpressen la classe Ib són incapaços d'envair les cèl·lules epitelials, i els microorganismes que aconsegueixen penetrar són incapaços de proliferar.

Part II: Implicació de les RNRs en la patogènesi de *S. Typhimurium* SL1344

	Índex d'invasivitat HeLa, % *	Índex de proliferació HeLa [‡]
SL1344	100 ± 27,6 7	25,86 ± 3,271
IG137 ($\Delta nrdAB$)	0,027 ± 0,019 [#]	ND
IG138 ($\Delta nrdEF$)	65,27 ± 3,011	29,388 ± 13,162
IG139 ($\Delta nrdDG$)	130,94 ± 92,446	23,51 ± 1,901
IG140 ($\Delta nrdEF \Delta nrdDG$)	131,951 ± 62,227	24,339 ± 9,109
IG144 ($\Delta nrdAB \Delta fur$)	0,078 ± 0,065 [#]	0,027 ± 0,04 [#]
IG143 ($\Delta nrdAB \Delta nrdR$)	1,658 ± 0,385 [#]	0,299 ± 0,306 [#]
IG146 ($\Delta nrdAB \Delta nrdDG \Delta fur$)	0,142 ± 0,049 [#]	0,623 ± 0,347 [#]
IG145 ($\Delta nrdAB \Delta nrdDG \Delta nrdR$)	N D	N D

* Percentatge de bacteris que invaeixen les cèl·lules epitelials HeLa durant 20 min i sobreviuen un assaig de protecció amb gentamicina. La sembra de viables es va realitzar a les 2h post-infecció. Els valors estan normalitzats respecte la soca salvatge (0,76 ± 0,211).

[‡] Relació entre bacteris intracel·lulars viables a les 24 h respecte els de les 2 h post -infecció.

Tots els valors són la mitjana de mostres realitzades per triplicat en almenys dos experiments independents.

[#] Dades significativament diferents respecte la soca salvatge (p<0,05).

ND: No s'han detectat cèl·lules viables en cap dels experiments realitzats.

Taula III. Índexs d'invasivitat i de proliferació de les diferents soques mutants infectant la línia de cèl·lules epitelials humanes HeLa.

4.3. Discussió

L'essencialitat de la classe Ia en *E. coli* i *S. Typhimurium* creixent en condicions normals de laboratori ja fa temps que es coneix, però en aquest treball també s'ha demostrat que, tot i que *Salmonella* és capaç de créixer *in vitro* a expenses de la classe Ib sobreexpressada, el creixement es veu molt disminuït, li cal un subministrament d'oxigen constant i la cèl·lula tendeix a filamentar. Aquest fenomen de filamentació ja s'havia descrit en *E. coli* també en un mutant amb una inserció Mud1 en *nrdB* (Hantke, 1988) quan creixia en aerobiosi i que, en canvi, no s'observava durant el creixement en anaerobiosi. De manera semblant, un mutant en l'operó *nrdDG* en condicions d'anaerobiosi estricta també presenta filaments a causa de l'incapacitat de sintetitzar DNA per la manca d'activitat de la RNR NrdAB (Garriga *et al.*, 1996).

Fins ara moment, s'han publicat molt pocs estudis *in vivo* sobre l'estudi de les RNRs en microorganismes patògens. La presència de diverses classes de RNRs en un mateix microorganisme patògen i el seu paper en el procés infecciós s'ha estudiat en el cas de *M. tuberculosis* (Dawes *et al.*, 2003), que conté classe Ib i classe II (*nrdZ*). En aquest patògen intracel·lular la classe Ib és essencial per al creixement *in vitro*, mentre que la classe II s'activa en condicions de microaerofília i semblava que podria ser la RNR responsable de la síntesi de dNTPs durant la infecció. Però els estudis en el model de ratolí amb un mutant $\Delta nrdZ$ no semblen indicar que contribueixi en la patogènesi de *M. tuberculosis* (Dawes *et al.*, 2003). També hi ha un estudi més recent amb *S. aureus* (Kirdis *et al.*, 2007), el genoma del qual conté les RNRs de classe Ib i de classe III. En un model murí també demostren que la classe III és la responsable del creixement en anaerobiosi i que és necessària per a la virulència.

En aquest treball també s'ha intentat esbrinar *in vivo* (en aquest cas, en cultius cel·lulars) el possible paper diferencial de les tres classes de RNRs presents en el patògen *S. enterica* serovar Typhimurium.

L'oxigen probablement va ser l'element responsable de l'evolució de les diferents classes de RNRs (Poole *et al.*, 2002; Reichard, 2002), i la presència de diferents classes de RNR en un mateix microorganisme li permeten adaptar-se als diferents ambients en funció de quina en sigui la concentració.

Aquesta visió aparentment simple es compleix en alguns casos com en *Staphylococcus aureus* (classe Ib + III), *Bacteroides fragilis* (Ia + III), *Lactococcus lactis* (Ib + III), *Mycobacterium tuberculosis* (Ib + II) i *Streptomyces coelicolor* (Ia + II), entre d'altres. Però en d'altres casos la relació no és tan evident i és possible trobar la concurrència de dues reductases que presenten funcions redundants. És el cas per exemple de *Pseudomonas aeruginosa* (Ia + II + III) i els membres de la família *Enterobacteriaceae* (Ia + Ib + III). Quin és el paper d'aquestes reductases redundants?

Una de les possibilitats és que cada una de les RNRs s'utilitzi en unes condicions de creixement molt concretes, independentment de la seva capacitat de funcionar en presència o no d'oxigen. Així doncs, en el cas d'*E. coli* s'ha especulat sobre el possible paper de l'operó *nrdHIEF* en la síntesi de nucleòtids en resposta a l'estrès oxidatiu (Monje-Casas *et al.*, 2001), tot i que no s'ha pogut observar una relació directa en la regulació de la seva transcripció per part d'OxyR (regulador principal de la resposta a estrès oxidatiu causat pel peròxid d'hidrogen) (Monje-Casas *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2001) ni per SoxRS (regulador principal de la resposta a estrès oxidatiu causat pel superòxid) (Blanchard *et al.*, 2007; Monje-Casas *et al.*, 2001), i també s'havia especulat sobre la seva possible participació durant la patogènesi ja que les condicions que n'activen la seva transcripció (creixement en medi mínim, pH àcid, manca de ferro) són molt similars a les que *S. Typhimurium* troba a l'interior del seu hoste.

En aquest treball s'ha estudiat la presència de les tres classes de RNRs codificades al genoma del patògen intracel·lular facultatiu *S. Typhimurium*, i se n'ha volgut determinar la seva funció en la patogènesi mitjançant assajos d'invasió, supervivència i proliferació en línies de cultius cel·lulars amb mutants en cada una de les classes i amb combinació d'aquests. Els resultats dels assajos d'infecció realitzats tant en línies cel·lulars de macròfags de ratolí com en cèl·lules epitelials humanes han mostrat que, en les condicions emprades, la RNR essencial per a la proliferació a l'interior dels macròfags i per la invasió i proliferació en cèl·lules epitelials és la **classe Ia**. Ni l'absència de la classe III ni de la classe Ib ha suposat cap efecte sobre la proliferació intracel·lular o la invasió de *S. Typhimurium*.

S'ha demostrat que en els dos tipus de mutants de la classe Ia (el mutant amb una còpia extra de l'operó *nrdHIEF*, i el mutant que creix en condicions d'anaerobiosi amb la classe III) la proliferació a l'interior dels macròfags no és possible en cap de les línies cel·lulars utilitzades, si bé sí que s'ha observat que el tractament de la línia cel·lular RAW264.7 amb un quelant de ferro (DIP) permet una major proliferació del mutant de la classe Ia merodiploid de l'operó *nrdHIEF*, probablement degut a que tenim dues còpies de l'operó i a que l'eliminació del ferro impedeix que aquest pugui participar en la reacció de Fenton per a generar radicals tòxics, i ho fa de manera més efectiva que el transportador *Nramp1*.

Si bé la RNR de la classe Ib no sembla ser la responsable de la síntesi de dNTPs durant la proliferació intracel·lular ni durant la invasió de cèl·lules epitelials, sí que s'ha observat que durant les primeres hores de la infecció (4-6 h) dels macròfags l'operó *nrdHIEF* és capaç de subministrar suficients dNTPs per mantenir la viabilitat cel·lular d'un mutant deficient en la RNR de la classe Ia.

També s'ha de considerar que la sobreexpressió de l'operó *nrdHIEF* causada per la mutació de *fur* o *nrdR* no provoca un efecte additiu sobre la proliferació del mutant *nrdAB*, és a dir, no hi ha diferències significatives respecte aquestes soques sobreexpressades i la soca mutant que només presenta una còpia de l'operó *nrdHIEF*. Ara bé, sí que s'observa que en el cas dels dobles i triples

Part II: Implicació de les RNRs en la patogènesi de *S. Typhimurium* SL1344

mutants, amb la mutació de *nrdR* s'obtenen uns índexs de proliferació lleugerament superiors als obtinguts amb la soca que presenta la mutació Δfur . Aquest fet s'explicaria si es tenen en compte els resultats de la inducció de l'expressió de l'operó *nrdHIEF* en un fons $\Delta nrdR$ i Δfur on la inducció és de 12 i 5 vegades respectivament.

El defecte en la invasió de cèl·lules epitelials per part de totes les soques que presenten la classe la mutada podria ser degut a la dificultat de creixement (la presència de filaments que hem observat que es formen en els mutants *nrdAB in vitro* corrobora la manca de replicació en aquestes cèl·lules), per la qual cosa és poc probable que aquestes cèl·lules siguin capaces d'utilitzar tots els seus recursos per a activar els mecanismes de virulència si ja els és prou difícil créixer.

Com es pot explicar aquest manteniment de la viabilitat durant les primeres hores d'infecció on la síntesi de dNTPs només és a càrrec de l'operó *nrdHIEF*? Aquest fet podria tenir una explicació si ens centrem en els esdeveniments que tenen lloc en les etapes inicials de la infecció del macròfag. Els macròfags presenten mecanismes de defensa davant els patògens intracel·lulars basats en la producció de pèptids antimicrobians, enzims ribosomals, i radicals generats per la NADPH oxidasa i l'òxid nítric sintasa induïble (iNOS) (Vazquez-Torres and Fang, 2001). La NADPH oxidasa, responsable de l'explosió oxidativa (o explosió respiratòria, de l'anglès *respiratory burst*), catalitza la reacció de reducció de l'oxigen molecular a superòxid ($O_2^{\bullet-}$). Aquest radical no té una gran activitat antibacteriana però és el precursor d'espècies reactives de l'oxigen (ROS, de l'anglès *reactive oxygen species*) molt més tòxiques (Miller and Britigan, 1997). Per exemple, el superòxid pot passar a peròxid d'hidrògen (H_2O_2) per dismutació enzimàtica o espontània, una espècie que és molt més tòxica que el superòxid i que difón ràpidament a través de la membrana.

El mecanisme en si vindria donat de manera seqüencial, l'efecte bactericida de l'explosió oxidativa mediada per la NADPH oxidasa tindria lloc durant les fases inicials (a les 2-4h) (Buchmeier *et al.*, 1993; Shiloh *et al.*, 1999; Vazquez-Torres *et al.*, 2000a) i posteriorment tindria lloc l'explosió nitrosativa mediada per la iNOS, que tindria un efecte bacteriostàtic més sostingut (De Groote *et al.*, 1997; Vazquez-Torres *et al.*, 2000a).

La producció d'aquests radicals causa dany a les membranes, als enzims i al DNA. De fet, s'ha descrit que mutants deficients en els sistemes de recombinació (*recA* i *recBC*) de *S. Typhimurium* són avirulents i sensibles a l'explosió oxidativa dels macròfags (Buchmeier *et al.*, 1993). Si l'explosió oxidativa malmet el DNA, és necessària una major síntesi de dNTPs per a poder reparar-lo. Tenint això en compte i sabent que el peròxid d'hidrògen també intervé en l'explosió oxidativa i s'ha descrit com a inductor de l'expressió de l'operó *nrdHIEF* d'*E. coli* (Monje-Casas *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2001), sembla lògic pensar que la RNR de la classe Ib podria ser la responsable d'un subministrament extra de dNTPs en un moment on la cèl·lula es veu estressada i està patint danys al seu DNA.

Aquest subministrament extra de dNTPs que estaria produint la classe Ib en un període d'estrès oxidatiu màxim seria semblant al que s'ha observat en el microorganisme anaerobi estricte *Bacteroides fragilis* que, sorprenentment, presenta una classe I en el seu genoma, a part de la classe III. Tot i ser un microorganisme anaerobi pot tolerar períodes de temps força llargs en presència d'oxigen. Això és capaç de fer-ho gràcies a la classe Ia que li permet sintetitzar dNTPs per facilitar la reparació del DNA i per la recuperació del creixement després d'una exposició continuada a l'oxigen (Smalley *et al.*, 2002).

Les noves tècniques de microxips també han permès monitoritzar l'expressió gènica durant el procés infecció, tant en macròfags com en cèl·lules epitelials. Un dels primers treballs descrits fou el d'Eriksson *et al.* (Eriksson *et al.*, 2003). En aquest treball semblava que l'expressió de les RNRs en general estava disminuïda durant el procés infecció i ho atribuïen al fet que la taxa de replicació de *S. Typhimurium* en macròfags era molt lenta (Garcia-Del Portillo *et al.*, 1999), 1999. Un altre treball amb microxips, però en aquest cas realitzat en *E. coli* creixent en presència de peròxid d'hidrògen (Zheng *et al.*, 2001) mostra que hi ha un clar augment de l'expressió de l'operó *nrdHIEF* en resposta a l'estrès oxidatiu i que ho fa de manera independent a OxyR. Més recentment, Hautefort *et al.* (Hautefort *et al.*, 2008) han realitzat un estudi comparatiu del perfil d'expressió gènica de *S. Typhimurium* creixent a l'interior de macròfags i a l'interior de cèl·lules epitelials. En aquest cas, els temps utilitzats eren a les 4, 8 i 12 hores post-infecció i es pot observar que en aquestes fases inicials hi ha una clara inducció de l'expressió de l'operó *nrdHIEF* quan *S. Typhimurium* infecta macròfags.

També cal considerar que durant l'estrès oxidatiu la cèl·lula ha de fer front a un dilema: els radicals formats també poden oxidar molts dels cations divalents essencials com a cofactors de moltes proteïnes. És per exemple el cas del Fe^{2+} . El peròxid d'hidrògen és capaç d'oxidar els cluster (4Fe-4S) de moltes proteïnes que passen a la forma (3Fe-4S), de manera que el ferro queda lliure i pot actuar via la reacció de Fenton danyant el DNA (Jang and Imlay, 2007; Keyer and Imlay, 1996). També s'ha vist que en mutants de la hidroxiperoxidasa d'*E. coli*, condicions micromoleculares de peròxid d'hidrògen poden impedir a Fur controlar els nivells de ferro lliure ja que l'oxidació del Fe^{2+} a Fe^{3+} a causa del peròxid d'hidrògen fa que quedi inactivada la funció repressora de Fur i la cèl·lula interpreti que hi ha una manca de ferro quan en realitat no existeix, a la vegada que es generen radicals molt tòxics que poden danyar el DNA (Park *et al.*, 2005; Varghese *et al.*, 2007) Aquest fet seria letal per la cèl·lula si no fos perquè la cèl·lula presenta OxyR, que s'activa per la presència del peròxid d'hidrògen i activa Fur i Dps (Zhao *et al.*, 2002), una proteïna que emmagatzema ferro i, d'aquesta manera, es pot suprimir parcialment el dany al DNA segregant el ferro en una forma no reactiva.

Així doncs la presència de peròxid d'hidrògen pot estar-nos activant de manera indirecta l'expressió de l'operó *nrdHIEF* per l'efecte que produeix sobre la oxidació del Fe^{2+} , i aquest sobre

Part II: Implicació de les RNRs en la patogènesi de *S. Typhimurium* SL1344

l'activitat de Fur. Si bé cal tenir en compte que no es tracta d'una reacció de tot o res, sinó més aviat un equilibri inestable on Fe^{2+} s'oxida a la vegada que la síntesi de Fur també augmenta.

Tampoc no es pot descartar el possible efecte que podria tenir el peròxid d'hidrògen i també l'òxid nítric sobre el radical de la RNR (Lepoivre *et al.*, 1991), de manera que la cèl·lula podria veure afectats els seus nivells de dNTPs i llavors activaria l'expressió dels gens *nrd*.

Aquest treball es va dissenyar com a un estudi preliminar de la funció de les RNRs durant la patogènesi de *S. Typhimurium*. En les condicions emprades hem pogut determinar que la RNR essencial durant la infecció és la classe Ia. La possible funció de la classe Ib mereix un estudi en més profunditat i probablement serà la base dels propers estudis. Cal tenir en compte que els assajos d'infecció es van realitzar en macròfags naïf, és a dir, no activats ni per $\text{IFN-}\gamma$ ni LPS, que s'han descrit com a inductors de la capacitat bactericida dels macròfags ja que potencien l'explosió oxidativa i nitrosativa (Kalupahana *et al.*, 2005; Vazquez-Torres *et al.*, 2000a). Potser si s'haguéssim utilitzat aquestes condicions hauríem observat una major proliferació en la soca mutant de l'operó *nrdAB* que sobreexpressa l'operó *nrdHIEF*. O fins i tot, el mutant de l'operó *nrdHIEF* hagués mostrat una certa atenuació en la infecció dels macròfags sobretot a les fases inicials quan té lloc l'explosió oxidativa.

També s'ha descrit que el LPS activa l'expressió de *Nramp1* dels macròfags de manera dependent del temps i la dosi, i de fet, l'inducció màxima de l'expressió de *Nramp1* s'observa amb un pretractament amb $\text{IFN-}\gamma$ i seguit de l'exposició a LPS (Govoni *et al.*, 1997). Així doncs, amb l'activació dels macròfags potser també haguéssim observat unes diferències més marcades entre la línia RAW264.7 deficient en *Nramp1* i la línia RAW264.7 *Nramp1*^{+/+}.

Recentment, García-del Portillo (García-Del Portillo, 2008) posa de manifest els problemes que suposa l'estudi de factors de virulència en cultius cel·lulars, destaca l'heterogeneïtat que s'observa dins d'una mateixa població tant del patogen estudiat com de l'hoste. Fins i tot, l'expressió gènica de diferents factors de virulència també es pot veure afectada pel mecanisme d'internalització utilitzat: si les cèl·lules estaven opsonitzades o no, i fins i tot amb quin tipus d'opsonització (Drecktrah *et al.*, 2006).

Cal tenir en compte que els resultats que s'han obtingut fins ara s'han realitzat en condicions *in vitro*, i que aquestes no són les mateixes amb les que el patogen es troba infectant l'hoste natural. Per aquest motiu, considerem aquest treball com una primera aproximació i com a continuació del treball caldria realitzar assajos *in vivo* infectant un model animal. Potser d'aquesta manera podríem observar una resposta més ajustada a la realitat i podríem trobar que potser, alguna de les altres classes de RNRs és important en alguna de les fases de la patogènesi de *S. Typhimurium*, ja que els ambients que va trobant al llarg del seu recorregut a l'interior del seu hoste són molt variats: el pH extremadament àcid (1-2) de l'estómac, el pH (6-7) de l'intestí prim i la competència amb la flora

normal (la seva presència contribueix a crear un ambient pobre en nutrients, i produeixen bacteriocines), l'augment de la pressió osmòtica, la secreció de bilis al duodè i la disminució de la concentració d'oxigen a mesura que avança per l'intestí (Rychlik and Barrow, 2005).

5. Discussió final

Aquest treball s'ha centrat en l'estudi de les Ribonucleotidil Reductases (RNRs) presents a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, tant des del punt de vista de la seva regulació transcripcional com de la seva participació durant el procés d'infecció de cultius cel·lulars.

Quina és doncs la participació d'aquests enzims essencials en un patogen intracel·lular com és *S. Typhimurium*? De les dades obtingudes en aquest treball i de les que s'han publicat fins ara podem dir que *S. Typhimurium* en condicions normals de creixement al laboratori i durant el procés d'infecció de línies cel·lulars, tant en la proliferació dins de macròfags de ratolí com de la invasió i proliferació de cèl·lules epitelials humanes utilitza la RNR de la classe Ia. Quan ha de créixer en condicions d'anaerobiosi utilitza la classe III i en condicions de microaerofília, també usa la classe Ia (Jordan *et al.*, 1996a).

En quines condicions doncs s'utilitza la classe Ib? Quina funció tenen els reguladors NrdR i Fur sobre la transcripció de la classe Ib?

En condicions normals de creixement l'expressió de la classe Ib es veu reprimida tant per l'efecte del repressor NrdR com del complex Fur-Fe²⁺. La classe Ib no és essencial per al creixement de *S. Typhimurium* i creix exclusivament amb la classe Ia.

Quan *S. Typhimurium* entra dins del seu hoste, passa a l'estómac, i d'allà a l'intestí. A l'intestí la presència de nutrients no és baixa, però també ha d'afrontar la presència d'altres microorganismes presents a la flora normal. En aquestes condicions probablement continua utilitzant la classe Ia, ja que ferro encara n'hi ha concentracions suficients com per reprimir l'expressió de l'operó *nrdHIEF* a través de Fur. Quan *S. Typhimurium* penetra les cèl·lules M de l'epiteli intestinal (gràcies a l'activació de factors de virulència com la SPI-1) i entra en contacte amb els macròfags presents al teixit limfoide subjacent a les plaques de Peyer, també s'activen els mecanismes per a proliferar a l'interior dels macròfags (SPI-2) (Schmidt and Hensel, 2004).

A l'interior de la SCV (de l'anglès, *Salmonella*-containing vacuole) la concentració de ferro ja disminueix, sobretot per l'activitat del transportador *Nramp1* que es troba a la membrana de la SCV (Wyllie *et al.*, 2002). El pH també és àcid i hi ha una limitació de nutrients important. Totes aquestes condicions s'han descrit com a favorables per a l'activació de la classe Ib (Monje-Casas *et al.*, 2001; Tao *et al.*, 1999).

El macròfag però, presenta sistemes de defensa davant la infecció per *S. Typhimurium*. Un dels més importants i que es produeix a les 2-4 h post-infecció és l'explosió oxidativa (Buchmeier *et al.*, 1993; Shiloh *et al.*, 1999; Vazquez-Torres *et al.*, 2000a). El macròfag és capaç de crear espècies

Discussió Final

reactives de l'oxigen, entre les quals destaquen el superòxid, el peròxid d'hidrogen i el radical hidroxil, totes elles capaces de produir danys a estructures cel·lulars i al DNA (Miller and Britigan, 1997).

Els danys al DNA produïts per aquestes espècies tòxiques requereixen mecanismes de reparació i per tant, un augment de la síntesi de dNTPs. El peròxid d'hidrogen també és capaç de (1) oxidar el Fe^{2+} i generar Fe^{3+} , desplaçant d'aquesta manera la forma activa de Fur- Fe^{2+} a la forma inactiva Fur- Fe^{3+} (Park *et al.*, 2005; Varghese *et al.*, 2007). La incapacitat de Fur d'unir-se als promotors dels gens que regula fa que *nrdHIEF* activi la seva transcripció i sintetitzi més dNTPs necessaris per a la reparació del DNA; (2) també es poden oxidar els cluster (4Fe-4S) de moltes proteïnes que passen a la forma (3Fe-4S), de manera que el ferro queda lliure i pot actuar via la reacció de Fenton danyant encara més el DNA (Jang and Imlay, 2007; Keyer and Imlay, 1996).

L'expressió de l'operó *nrdHIEF* augmenta per la desrepressió deguda a la inactivació de Fur, però encara hi ha NrdR unit que també en reprimeix l'expressió. Però com que la demanda de dNTPs és molt gran, NrdR podria actuar de sensor de l'estat de la concentració de dNTPs a la cèl·lula i passaria a la forma NrdR-ATP, es desuniria del promotor de *nrdHIEF* i s'activaria la seva transcripció. D'aquesta manera, l'expressió de *nrdHIEF* seria màxima i permetria aportar els dNTPs necessaris per la reparació del DNA en aquests moments d'estrès oxidatiu.

Evidentment, d'aquesta hipòtesi només tenim dades experimentals del fet que Fur i NrdR regulen l'operó *nrdHIEF* i que la classe Ib és capaç de mantenir la viabilitat de *S. Typhimurium* a l'interior dels macròfags durant les primeres hores d'infecció, però al cap d'unes hores, probablement quan l'explosió oxidativa ha deixat de fer el seu efecte, és necessària l'expressió de l'operó *nrdAB* per a subministrar dNTPs a la cèl·lula, sinó, aquesta no pot proliferar (tal i com s'ha vist en totes les combinacions de mutants de l'operó *nrdAB*). És cert, però, que encara manca molta informació sobre el funcionament de NrdR.

Per aquest motiu, les perspectives de futur que ens plantejem són aprofundir en el mecanisme de funcionament de la regulació de NrdR, i sobretot tornar a centrar l'atenció en el paper de l'operó *nrdHIEF* en la resposta a l'explosió oxidativa que té lloc a l'interior dels macròfags. Redissenyariem l'experiment utilitzant macròfags activats i potser fins i tot ens plantejaríem realitzar assajos d'infecció *in vivo* en un model animal.

Inicialment, aquest treball s'havia dissenyat per a esbrinar si la classe Ib era la responsable de la síntesi de dNTPs durant el procés d'infecció i, en cas afirmatiu, caracteritzar-la com a possible diana per a fàrmacs antimicrobians específics. El fet que els enterobacteris presentin tant la classe Ib com la classe Ia i que en les cèl·lules eucariotes només hi hagi la classe Ia fa que l'enzim codificat en l'operó *nrdHIEF* esdevingui una excel·lent diana per a un possible fàrmac que afecti exclusivament a les cèl·lules bacterianes. Malauradament, en aquest treball no hem trobat indicis que justifiquin la cerca d'aquests fàrmacs específics, ja que els nostres resultats més aviat indiquen que és la classe Ia

la responsable de la síntesi de dNTPs durant la infecció i que la classe Ib només intervé com a reductasa de suport en determinades condicions com per exemple l'estrès oxidatiu.

6. Conclusions

1. NrdR actúa com a repressor global de l'expressió dels operons *nrdAB*, *nrdHIEF* i *nrdDG* de *S. Typhimurium*. Aquesta repressió és més pronunciada sobre l'operó *nrdHIEF* (un augment de fins a 12 vegades) probablement degut a l'arquitectura del seu promotor.
2. L'efecte que produeix la hidroxidreurea sobre l'expressió de l'operó *nrdAB* i *nrdHIEF* és l'equivalent al que s'observa en la soca mutant $\Delta nrdR$ independentment de si aquesta ha estat tractada amb hidroxidreurea. Per tant, NrdR podria ser el responsable de l'augment de l'expressió d'aquests promotors quan hi ha un dèficit de dNTPs, situació equivalent a la que s'observaria amb l'efecte de la hidroxidreurea que provoca la inactivació del radical tirosil de la subunitat R2 de tant la classe Ia com la classe Ib.
3. La mutació de les caixes NrdR1 i NrdR2 de cada un dels promotors de les tres classes de RNRs presents en *S. Typhimurium* produeixen una desrepressió de la seva expressió equivalent a l'absència de NrdR.
4. Sorprenentment, la mutació de la caixa NrdR2 de la regió promotora de l'operó *nrdHIEF* no dóna lloc a una desrepressió de l'operó. O bé aquesta seqüència no és una caixa de reconeixement de NrdR o bé podria ser reconeguda per un altre regulador tenint en compte la complexa regulació que semblen tenir les RNRs.
5. Els residus 65, 53 i 59 de l'ATP-cone present en NrdR de *S. Typhimurium* participen en la funcionalitat de la proteïna *in vivo*. Mutacions en aquests residus fan que NrdR no sigui capaç de complementar la mutació $\Delta nrdR$.
6. La proteïna Fur és un repressor de l'expressió de l'operó *nrdHIEF*. L'obtenció d'un mutant Δfur provoca un augment de 5 vegades l'expressió de l'operó *nrdHIEF*.
7. S'ha detectat una caixa d'unió de Fur a la regió promotora de l'operó *nrdHIEF*. La mutació de la qual provoca un augment de l'expressió d'aquest operó equivalent a l'eliminació de *fur*.
8. La proteïna Fur s'uneix directament al promotor de l'operó *nrdHIEF* i al promotor de *fur*. Si es muta la seqüència de reconeixement de Fur de la regió promotora de l'operó *nrdHIEF*, la proteïna deixa d'unir-se al DNA.
9. L'efecte de Fur i NrdR sobre l'expressió de l'operó *nrdHIEF* és independent. L'augment de la seva expressió és màxima quan els dos reguladors estan mutats o quan la soca mutant en *fur* es tracta amb hidroxidreurea.

Conclusions

10. La mutació de *nrdR* o *fur* permeten que el mutant *nrdAB* sigui capaç de créixer en condicions d'aerobiosi amb una única còpia de l'operó *nrdHIEF*.
11. L'essencialitat de l'operó *nrdAB* es fa pal·lesa en la dificultat de créixer d'aquestes soques mutants en condicions aeròbiques, en l'increment de la fase lag i en la formació de filaments.
12. La classe Ia de les RNRs és essencial per a la proliferació de *S. Typhimurium* SL1344 en macròfags de ratolí i per a la invasió i la proliferació en cèl·lules epitelials humanes.
13. La classe Ib i la classe III no semblen ser essencials per a la proliferació en macròfags ni en cèl·lules epitelials. No obstant això, la classe Ib sembla que podria mantenir el creixement del mutant *nrdAB* en els primers estadis d'infecció dels macròfags, possiblement degut a la seva inducció provocada per l'estrès oxidatiu que es produeix durant l'explosió oxidativa a l'interior dels macròfags.

7. Materials i Mètodes

7.1. Soques bacterianes, plasmidis i oligonucleòtids

7.1.1. Condicions de creixement i conservació de soques

Els cultius de les diferents soques d'*E. coli* i *S. enterica* sv. Typhimurium s'obtenien en medi líquid LB, mentre que els cultius de nit per a realitzar extraccions plasmídiques s'obtenien en medi líquid ric TB. S'afegia antibiòtic quan era necessari segons les concentracions descrites a la **Taula IV**.

En el cas dels cultius en anaerobiosi, per a aconseguir l'anaerobiosi estricta en cultius líquids es va utilitzar LB + sulfat de sodi (3,2 mM) o bé LB + nitrats (KNO_3 0,04 M + molibdat sòdic 10^{-3} mM). Els tubs s'omplien fins dalt per aconseguir una anaerobiosi total. En el cas del creixement en placa, el medi utilitzat era LB + nitrats i es creixia dins les bosses d'anaerobiosi amb Anaerocult® (Merck) amb un indicador de l'anaerobiosi (Anaerotest®, Merck).

A la **Taula V** hi apareixen totes les soques utilitzades en aquest treball i a la **Taula VI** els plasmidis.

7.1.2. Oligonucleòtids

Els principals oligonucleòtids utilitzats en aquest treball es troben descrits a la **Taula VII**.

7.2. Mètodes microbiològics

7.2.1. Medis de cultiu, antibiòtics i altres solucions

7.2.1.1. Medis de cultiu

Medi LB (Luria Bertani) (Miller, 1972)

Triptona	10 g
----------	------

Materials i Mètodes

Extracte de llevat	5 g
NaCl	10 g
Agar	17 g (només en cas de medis sòlids)

Afegir un litre d'aigua destil·lada i esterilitzar a l'autoclau durant 15 minuts a 121°C. Dispensar en plaques de petri, esperar a que s'hagin solidificat i emmagatzemar-les a 4°C. En el cas de preparar medi líquid (sense agar), dispensar en ampolles abans d'autoclavar.

Medi TB (Terrific broth) (Tartof, 1987)

Triptona	12 g
Extracte de llevat	24 g
Glicerol	4 mL

Afegir 900 mL d'aigua destil·lada i esterilitzar a l'autoclau 15 minuts a 121°C. Deixar refredar fins a 50-60°C i afegir 100 mL de la següent solució salina prèviament autoclavada:

KH ₂ PO ₄	0,17 M
K ₂ HPO ₄	0,72 M

Dispensar en ampolles en condicions d'esterilitat. Incubar-les a 37°C durant 24 h per tal de comprovar que no s'ha contaminat el medi. Descartar les ampolles en les que s'hi observi creixement i emmagatzemar la resta a temperatura ambient.

7.2.1.2. Antibiótics

La majoria d'antibiòtics es preparaven dissolent-los en aigua destil·lada, excepte el cloramfenicol que es dissolia en etanol absolut, la rifampicina en metanol i la tetraciclina en etanol al 50%. Posteriorment s'esterilitzaven per filtració mitjançant filtres de 0,22 µm. Es van preparar solucions *stock* dels antibiòtics 1000 vegades concentrades que s'emmagatzemaven a -20°C i que s'afegien directament als medis sòlids just abans de plaquejar-los i un cop refredats fins a 50-60°C. Aquestes solucions es diluïen 10 vegades per obtenir una solució *stock* de treball (100 vegades concentrada) que es conservava a 4°C i que s'afegeia directament als medis líquids.

Les concentracions dels antibiòtics utilitzats en aquest treball es troben detallats en la **Taula IV**.

Antibiòtic	Concentració stock	Concentració final ($\mu\text{g/mL}$)	
	mg/ mL	<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i> sv. Typhimurium
Ampicilina (Ap)	50	50	50
Kanamicina monosulfat (Km)	50	50	50
Espectinomicina (Spc)	100	100	200
Cloramfenicol (Cm)	34	34	34
Tetraciclina (Tc)	17	17	17
Rifampicina (Rif)	75	75	75

Taula IV. Concentracions d'antibiòtics utilitzades en aquest treball.

7.2.1.3. Altres solucions

Solució salina de NaCl 0,9% (Ringer)

NaCl 9 g

Dissoldre en 1 L d'aigua destil·lada, dispensar en ampolles i esterilitzar a l'autoclau durant 15 minuts a 121°C

5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosid (X-gal)

Producte que s'ha utilitzat dissolt en N,N dimetil formamida per suplementar plaques de LB a una concentració final de 40 $\mu\text{g/mL}$ a partir d'una solució *stock* a 40 mg/mL.

7.2.1.4. Càlcul de la concentració de cèl·lules viables

El recompte de cèl·lules viables s'obté realitzant un banc de dilucions amb NaCl 0,9% d'un cultiu crescut en les condicions desitjades, del qual se sembraven mostres de 0,1 mL de les dilucions adients en plaques suplementades amb els antibiòtics corresponents. Per a calcular el nombre de viables només es consideren aquelles plaques que contenen entre 30 i 300 colònies. El resultat s'expressa en nombre de colònies per mil·lilitre (cfu/ml) segons la fórmula següent:

$$\text{Nombre de viables} = \frac{\text{Nombre de colònies}}{\text{volum sembrat} \times \text{factor de dilució}}$$

7.3. Mètodes genètics

7.3.1. Transformació

El procés de transformació es basa en la incorporació de DNA forani per part d'una cèl·lula bacteriana. Aquest procés es pot dur a terme bàsicament emprant dues metodologies: una de química en la que s'utilitza una solució de CaCl_2 100mM, i una de física, també anomenada electrotransformació, mitjançant l'aplicació d'un pols elèctric.

El procés de transformació amb CaCl_2 s'ha utilitzat per a introduir DNA plasmídic a *E. coli*, mentre que l'electrotransformació ha estat el mètode emprat per a introduir DNA plasmídic o lineal a *S. enterica* sv. Typhimurium degut a que amb l'altre mètode l'eficiència és molt baixa.

7.3.1.1. Preparació de cèl·lules competents per a la transformació amb CaCl_2

Aquest procés consta d'una sèrie de rentats de les cèl·lules amb una solució de clorur de calci. Els ions de calci s'uneixen a la paret bacteriana i, el DNA, gràcies a la seva càrrega negativa, forma uns complexos DNA- Ca^{2+} a la paret que poden desfer-se per mitjà d'un xoc tèrmic que també permetrà la formació d'uns porus a la membrana per on s'introduirà el DNA cap a l'interior de la cèl·lula.

Les cèl·lules es recuperen en medi ric i es deixen incubant un temps suficient per a permetre la seva recuperació i l'expressió fenotípica dels gens marcadors. Posteriorment se sembren en medi ric selectiu.

- Es fa una resembra 1/100 en un recipient de 100 mL d'un cultiu de nit i s'incuba a 37°C en agitació fins a una OD₅₅₀ de 0,5-0,6.
- Es manté el cultiu en gel durant 10 min.
- Centrifugar el cultiu en tubs estèrils durant 10 min a 3000 g i a 4°C.
- Descartar el sobrenadant i resuspendre les cèl·lules en 20 mL de CaCl₂ 100 mM fred.
- Mantenir la suspensió de cèl·lules en gel durant 30 min.
- Centrifugar a 3000 g durant 10 min a 4°C.
- Descartar el sobrenadant i resuspendre cuidadosament el botó de cèl·lules en 4 mL de CaCl₂ 100 mM fred.
- Afegir 1,5 mL de glicerol al 50% (v/v) estèril. Fer alíquotes de 100, 200 i 300 µL. Congelar-les en neu carbònica i guardar-les a -80°C.

7.3.1.2. Transformació

- Barrejar en un tub eppendorf 100 µL de cèl·lules competents i entre 10- 100 ng de DNA plasmídic, i incubar-ho durant 30 min en gel.
- Realitzar un xoc tèrmic a 42°C durant 90 s.
- Afegir 800 µL de medi LB i incubar a 37°C durant 1 h 15 min.
- Sembrar les cèl·lules en les plaques selectives adequades i incubar durant 12-18 h a 37°C.

Solucions

CaCl₂ 100 mM

CaCl₂ 1,47 g

Dissoldre en 80 mL d'aigua destil·lada. Ajustar el volum a 100 mL i esterilitzar a l'autoclau durant 15 min a 121°C. Emmagatzemar a temperatura ambient.

7.3.1.3. Preparació d'electrocompetents de *S. Typhimurium*

El mètode de l'electotransformació és una bona alternativa a la transformació pel mètode de CaCl_2 ja que ofereix una major eficiència de transformació. Aquest mètode utilitza un impuls elèctric que despolaritza la membrana plasmàtica i hi crea uns porus transitoris per on pot entrar-hi el DNA.

L'impuls elèctric el genera un electroporador GenePulser XCell de BioRad i les condicions emprades dependran del microorganisme que s'electropori.

Per tal d'obtenir una bona freqüència de transformants és imprescindible que les cèl·lules estiguin en un bon estat fisiològic i ben exemptes de sals, així com l'utilització de DNA en una solució de baixa força iònica.

Les electrocompetents s'han de realitzar sempre en gel i en condicions d'esterilitat.

- A partir d'un cultiu de nit crescut en medi 2X YT i amb l'antibiòtic corresponent, es realitza una sembra 1/100 en una ampolla amb 100 mL de medi 2X YT.
- Controlar el creixement del cultiu mirant-ne l'absorbància a 550 nm. Quan aquest arribi a una absorbància de 0,5 s'atura el creixement dipositant el recipient en gel durant 10 min.
- Centrifugar el cultiu a 3000 x g durant 10 min a 4°C.
- Eliminar el sobrenadant i resuspendre en 10 mL d'aigua Milli-Q® estèril.
- Passar 1 mL de la suspensió de cèl·lules en tubs eppendorfs i centrifugar de nou a 3000 x g durant 5 min en una centrífuga de sobretaula.
- Eliminar el sobrenadant i repetir els rentats amb aigua Milli-Q® tres vegades més.
- Un cop fet l'últim rentat, es resuspèn el botó de cèl·lules amb 1 mL de glicerol 10% i es centrifuga a 3000 x g durant 3 min.
- S'elimina el sobrenadant i es resuspèn el botó de cèl·lules amb 80 µL de glicerol 50% i es congelen les alíquotes en neu carbònica i s'emmagatzemen al congelador de -80°C.

7.3.1.4. Electroporació de *S. Typhimurium*

- Barrejar les cèl·lules electrocompetents amb 5 µL de DNA a introduir i deixar-ho en gel 10 min.
- Transferir les cèl·lules amb el DNA a la cubeta d'electroporació de 0,2 cm i procedir a l'electroporació mitjançant l'electroporador GenePulser XCell™ de BioRad segons el protocol descrit per *Salmonella* sp.:

Potencial elèctric: 2,5 kV

Resistència: 180 Ω

Capacitància: 25 µF

- Resuspendre les cèl·lules en 1 mL de 2X YT, transferir-les a un tub ependorff i incubar-les a la temperatura adequada durant 1h.
- Sembrar en plaques selectives i incubar tota la nit a temperatura adequada en funció del plasmidi introduït.

Solucions

Medi 2X YT

NaCl	5 g
Extracte de llevat	10 g
Triptona	16 g

Afegir un litre d'aigua destil·lada i dispensar en ampolles. Esterilitzar a l'autoclau durant 15 minuts a 121°C.

7.3.2. Transducció de *S. Typhimurium* amb el bacteriòfag P22

El procés de transducció es basa en la introducció de DNA forani en una cèl·lula bacteriana mitjançant un bacteriòfag. En el cas de *Salmonella*, el fag P22 és el més caracteritzat per a la transducció generalitzada. La transducció generalitzada és un procés a través del qual el bacteriòfag empaqueta per error part del DNA de la cèl·lula bacteriana a la que infecta. Més endavant, aquesta partícula transducció pot infectar una altra cèl·lula i, mitjançant processos de recombinació homòloga, introduir aquest fragment de DNA forani a la nova cèl·lula.

7.3.2.1. Obtenció de lisats fàgics de P22

Lisat en líquid

- Realitzar un cultiu de nit de la soca donadora.
- Resembra del cultiu de nit: 0,5 mL de cultiu de nit + 10 mL LB i incubar a 37°C en agitació fins a assolir una $OD_{550} = 0,2$
- Afegir 0,2 mL de lisat del bacteriòfag que es troba aproximadament a un títol de 10^{10} pfu/mL.
- Incubar 3 hores fins a la lisi del cultiu.
- Afegir 2 mL de cloroform i agitar en el vòrtex.
- Deixar reposar a 37°C de 15 a 30 minuts.
- Centrifugar la suspensió a 3000 g durant 15 minuts.
- Recuperar el sobrenadant i afegir-hi unes gotes de cloroform. Guardar a 4°C i procedir a fer una titolació per conèixer la concentració de partícules víriques.

7.3.2.2. Titulat de lisats fàgics de P22

El titolat d'un lisat fàgic es pot dur a terme mitjançant dos mètodes: el test de la gota, mètode quantitatiu però amb el que s'obté una quantificació aproximada, i la titolació exacta, un mètode força més acurat que s'utilitza quan ja coneixem l'interval en què es pot trobar la suspensió de fags. (Miller, 1972).

Test de la gota

- Fondre els tubs de BBL tou al bany maria i mantenir-los a 45°C.
- Preparar un banc de dilucions del bacteriòfag en $MgSO_4$ 10 mM (per exemple, realitzar les dilucions 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} i 10^{-9}). En el cas de que l'antibiòtic utilitzat sigui la tetraciclina, caldrà fer el banc de dilucions amb NaCl 0,9%.
- Afegir 0,2 mL del cultiu de nit bacterià en un tub de BBL tou (2 mL). Barrejar bé i abocar sobre una placa de BBL tot movent-la de manera que el medi es reparteixi homogèniament sobre la placa. Deixar solidificar l'agar.

- Un cop seca la placa, dividir la placa en diferents parts. A cada una s'hi afegirà una gota de 20 µL corresponent a una de les dilucions del banc.
- Deixar assecar les gotes i incubar la placa a 37°C durant tota la nit.
- L'endemà calcular la concentració de bacteriòfags segons la fórmula següent:

$$\text{Pfu/mL} = \frac{\text{Nombre de calves}}{\text{volum en mL de la mostra de fags inoculada} \times \text{factor de dilució}}$$

Titulació exacta

- Fondre els tubs de BBL tou al bany maria i mantenir-los a 45°C.
- Preparar un banc de dilucions de 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-7} i 10^{-8} del lisat en MgSO_4 .
- Afegir 0,2 mL del cultiu de nit bacterià a cada tub de BBL tou.
- Afegir 0,1 mL de la dilució del fag a cada tub de BBL tou prèviament inoculat amb el cultiu bacterià.
- Agitar suaument el tub i abocar-lo sobre una placa de BBL i distribuir-ne el contingut homogèniament a sobre la placa. Deixar-ho solidificar.
- Incubar les plaques a temperatura òptima i al cap de 8-12 hores ja comencen a aparèixer calves.
- A partir del nombre de calves i el volum de suspensió de fags sembrada ja es podrà calcular la concentració de fags que hi ha en la suspensió.

7.3.2.3. Transducció

Protocol adaptat de S.R. Maloy (Maloy, 1990).

- Realitzar un cultiu de nit de la soca receptora en 10 mL de LB.
- L'endemà, fer la mescla de transducció barrejant 0,5 mL de les cèl·lules receptores amb 0,5 mL de suspensió de fags diluïts en funció de la MOI que es vulgui utilitzar. Normalment es fa una dilució del lisat 1/50, tot i que si el títol del lisat és inusualment baix o alt caldrà utilitzar una dilució diferent.
- Caldrà fer també un control de les cèl·lules i un control del fags.
- Deixar 20 min a 37°C.
- Sembrar la barreja en plaques de LB o de medi mínim amb els antibiòtics adients.

- En qualsevol cas, les colònies que s'obtinguin s'hauran de purificar del fag en plaques verdes.

7.3.2.4. Sensibilitat de *S. Typhimurium* al fag P22

Les cèl·lules transductants poden haver incorporat un nou fragment de DNA en el seu genoma però algunes d'elles poden haver integrat en els seu cromosoma el genoma del fag. Aquestes cèl·lules, anomenades lisògens, poden patir dos successos: el fag pot replicarse i produir la lisis de la cèl·lula donant lloc a noves partícules víriques, o bé el fag es pot mantenir com a un plasmidi de baix nombre de còpies que tal vegada pot tornar-se a integrar al cromosoma bacterià o bé pot iniciar el procés lític. Les cèl·lules que contenen el fag en forma de plasmidi s'anomenen pseudolisògens.

Per tal de descartar els pseudolisògens dels no lisògens i dels veraders lisògens és necessari sembrar els transductants en plaques verdes. Aquestes plaques contenen uns indicadors de pH que permeten que les plaques siguin verdes a pH neutre mentre que si el pH s'acidifica es tornen de color verd-blau fosc. Si fem una estria de la colònia transductant les cèl·lules que són lisògens veraders o no lisògens formaran colònies verd clar. Mentre que si es tracta de pseudolisògens, les colònies seran de color fosc. Això és degut a que en els pseudolisògens, moltes cèl·lules estàn patint processos de lisi que provoca la baixada de pH del medi resultant en un enfosquiment de les colònies.

Degut a que els pseudolisògens contenen el fag en forma de plasmidi de baix nombre de còpies, és possible obtenir segregants lliures de fag fent una estria per obtenir colònies aïllades en plaques verdes. Les colònies aïllades de color clar estaran lliures de fag i només caldrà comprovar que no són lisògens.

Per a descartar que no es tracta de lisògens veraders cal comprovar que són sensibles al fag P22 H5, un P22 mutant en el gen *c2*, que codifica un repressor equivalent al *cI* del fag lambda. Les cèl·lules que estiguin lliures de fag seran sensibles a la infecció per H5 mentre que les cèl·lules que són lisògenes pel fag P22 seran resistents a la infecció per H5. La prova de sensibilitat a H5 es fa segons el següent protocol:

- En una placa de LB es fa una estria vertical amb uns 200 μ L d'una dilució 1/50 de la suspensió de fag H5. Es deixa assecar.
- Amb escuradents estèrils, es piquen colònies clares de les plaques verdes i es fa una estria perpendicular a l'estria d'H5. Com a control hi posarem una estria de LT2.
- Deixar incubar de 6 a 8 hores a l'estufa a 37°C o bé tota la nit a T^a ambient.

- En les estries de les colònies no lisogèniques no hi haurà creixement després de l'estria d'H5, mentre que en aquelles resistents, i per tant, lisògens, hi haurà creixement. En el control de la LT2 no hi ha d'haver creixement.

Medis i solucions

Medi BBL

Triptona	10 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Aigua destil·lada	1000 mL

Esterilitzar a 121°C durant 15 minuts.

Agar tou

Agar	6 g
NaCl	5 g
Aigua destil·lada	1000 mL

S'escalfa el medi fins a la total dissolució dels seus components. S'autoclava i es reparteix en tubs estèrils (3-4 mL per tub).

MgSO₄ 10 mM

MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2,46 g
Aigua destil·lada	1000 mL

Dissoldre el MgSO₄ en l'aigua destil·lada i dispensar en ampolles de 100 mL i autoclavar 15 minuts a 121°C.

Medi mínim E (50X)

Stock de solució salina E 50x:

MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1 g
Àcid cítric x 1 H ₂ O	10 g

Materials i Mètodes

$K_2HPO_4 \times 3 H_2O$ 65,5 g

$NaNH_4HPO_4 \times 4 H_2O$ 17,5 g

Dissoldre d'una en una les sals en 50 mL d'aigua destil·lada aplicant-li calor. No ha d'arribar a bullir. Enrasar a 100 mL i refredar a la nevera. Afegir 2,5 mL de cloroform i emmagatzemar a temperatura ambient.

A partir de la solució salina es prepara el medi mínim amb glucosa que consta de:

Medi E 50x 20 mL

Glucosa 20% 10 mL

Agar 1 5 g

Aigua destil·lada 970 mL

L'aigua i l'agar s'autoclaven conjuntament i la glucosa s'afegeix un cop aquesta mescla s'ha refredat fins aproximadament a 55°C. En aquest moment també s'hi afegirà la solució salina i es procedirà a dispensar-ho en plaques de petri estèrils.

Plaques verdes

Triptona 8 g

Extracte de llevat 1 g

NaCl 15 g

Agar 15 g

Dissoldre en 1000 mL d'aigua destil·lada i autoclavar. Un cop s'hagi refredat fins aproximadament uns 55°C s'afegeix estèrilment les següents solucions:

Glucosa 40% 34 mL

Alizarin Yellow 2,5% 25 mL

Aniline Blue 2% 6,6 mL

Es barreja bé, es reparteix en plaques de petri i es deixa solidificar abans d'emmagatzemar-ho a 4°C.

7.3.3. Conjugació

Es coneix com a conjugació el procés a través del qual una cèl·lula bacteriana és capaç de transferir plasmidis o altres elements de DNA a una altra cèl·lula. Aquesta cèl·lula amb capacitat de transferir material genètic se l'anomena donadora i la cèl·lula que rep aquest material és un transconjugant.

La conjugació és un procés natural en bacteris, hi ha plasmidis que són autotransferibles, és a dir, que tenen una regió on es troben tots els gens necessaris per a premetre'n la seva transferència (gens *tra*). Per altra banda, també existeixen plasmidis anomenats mobilitzables que, a diferència dels autotransferibles, no contenen els gens que permeten la síntesi del pilus sexual. Per tant, per a poder ser transferits, és necessari que utilitzin el pilus d'un plasmidi autotransferible. Aquests tipus de plasmidis tenen aplicacions biotecnològiques degut al seu petit tamany i que, per tant, permeten clonar-hi fragments de DNA que seran eficientment mobilitzats cap a una altra soca bacteriana.

En aquest treball, la conjugació ha estat el mètode utilitzat per a transferir material genètic entre *E. coli* i *S. Typhimurium* per a obtenir-ne mutants gràcies a l'ús de vectors suïcides que contenien transposons, i també per a l'obtenció de fusions gèniques.

7.3.3.1. Conjugació biparental

- Fer un cultiu de nit de la soca donadora portadora del plasmidi mobilitzable, i un altre de la soca receptora en 10 mL de LB amb els antibiòtics adients. Deixar incubant tota la nit a la temperatura òptima de creixement.
- Realitzar una resembra 1:10 de la soca donadora en medi fresc i deixar incubant sense agitació a la temperatura òptima durant 1-2h fins assegurar-se que el cultiu es troba en fase exponencial.
- Mesclar 100 µL de cada cultiu en un tub eppendorf estèril i centrifugar durant 20 segons.
- Eliminar el sobrenadant i resuspendre la mescla de cèl·lules en 100 µL de MgSO₄ 10 mM estèril.
- Dipositar un filtre de nitrocel·lulosa (de 0,45 µm d porus) sobre una placa de LB seca. Extendre els 100 µL de la mescla de cèl·lules sobre el filtre i deixar assecar durant uns minuts.
- Incubar la placa amb el filtre a l'estufa a la temperatura adequada per la soca receptora durant 6-10 hores.

Materials i Mètodes

- Resuspendre el filtre en 3 mL de MgSO₄ 10 mM estèril o en NaCl 0,9%.
- Sembrar 0,2 de la suspensió en plaques de medi suplementat amb els antibiòtics adients.
- Incubar les plques a la temperatura adequada a l'estufa durant tota la nit.

7.4. Mètodes de manipulació del DNA

Molts d'aquests mètodes descrits en aquest apartat es basen en *Molecular Cloning: a laboratory manual* (Sambrook, 1989), tot i que en alguns hi ha certes modificacions.

7.4.1. Miniextracció de DNA plasmídic d'*E. coli*

Aquesta tècnica es basa en el protocol de lisi alcalina descrit per (Birboim, 1979).

Procediment

- Realitzar un cultiu de nit en medi TB suplementat amb els antibiòtics que facin falta i incubar-lo a 37°C o a la temperatura adequada durant tota la nit.
- Centrifugar 1,5 mL del cultiu a 13 000 rpm durant 5 min.
- Eliminar el sobrenadant amb l'ajuda d'una bomba de buit.
- Resuspendre el botó de cèl·lules en 100 µL de solució I freda, afegir 1 µL de RNasa i deixar incubant a temperatura ambient durant 5 min.
- Afegir 200 µL de solució II, barrejar per inversió i mantenir en gel fins a obtenir una solució viscosa provocada per la lisi cel·lular.
- Afegir 150 µL de solució III, barrejar per inversió i mantenir en gel fins a observar un precipitat blanc.
- Centrifugar durant 5 min a 13 000 rpm.
- Transferir la fase aquosa a un eppendorf i afegir 1 mL de solució de terra de diatomees.
- Incubar durant 10 min a temperatura ambient barrejant de tant en tant per inversió per evitar que la terra precipiti.
- Transferir la mostra en una xeringa prèviament muntada sobre una columna *Wizard[®] Minicolumn* (Promega) i passar la mostra a través del filtre amb l'ajuda de l'èmbol.
- Separar la xeringa de la columna, treure'n l'èmbol, tornar a muntar la xeringa a la columna i afegir-hi 2 mL d'etanol 70% i passar-ho altre cop pel filtre.

- Separar la xeringa de la columna i passar la columna a un tub eppendorf. Centrifugar 20 s a 13 000 rpm per tal d'eliminar les restes d'etanol. Deixar assecar la columna a temperatura ambient durant 10 min.
- Afegir de 20 a 50 µL d'aigua desionitzada estèril preescalfada a 42°C al filtre de la columna i incubar durant 10 min a temperatura ambient.
- Passar la columna a un tub eppendorf nou i centrifugar durant 1 min a 13 000 rpm per tal de recollir el DNA eluït.

Solucions

Per a preparar les solucions de l'extracció plasmídica i de la terra de diatomees prèviament s'han de preparar les solucions següents:

- Tris HCl 1 M pH 7,5: Dissoldre 60,55 g de TrisBase en 300 mL d'aigua destil·lada. Afegir àcid clorhídric fins assolir un pH de 7,5. Ajustar el volum a 500 mL amb aigua destil·lada.
- Àcid etilendiaminotetraacètic (EDTA) 0,5 M pH 8: Dissoldre 46,35 g d'EDTA i 5 g de NaOH en 200 mL d'aigua destil·lada. Afegir NaOH fins a assolir un pH de 8 i ajustar el volum a 250 mL amb aigua destil·lada. Remenar bé fins a aconseguir una completa dissolució. Esterilitzar a l'autoclau durant 15 min a 121°C.

Solució I

TrisHCl 1 M pH 7,5	0,625 mL
EDTA 0,5 M pH 8	0,5 mL
Glucosa 20% estèril	1,135 mL
Aigua desionitzada	22,74 mL

Es barregen els components i es manté a 4°C

RNasa A

Concentracions finals:

RNasa A (Roche)	10 mg/mL
TrisHCl	10 mM
NaCl	15 mM

Materials i Mètodes

Barrejar 10 µL de Tris HCl 1 M pH 7,5 , 3 µL de NaCl 5 M i 987 µL d'aigua deionitzada estèril. Afegir 10 mg de RNasa A i homogenitzar. Incubar durant 15 min a 100°C. Deixar refredar a temperatura ambient, fer-ne alíquotes de 50 µL i emmagatzemar-les a -20°C.

Solució II

SDS 10%	2,5 mL
NaOH 10 N (40 g/100 mL)	0,5 mL
Aigua desionitzada	22 mL

Es barregen els components i es manté a temperatura ambient. És important que la solució sigui recent.

Solució III

Acetat potàsic 5 M (49,075 g/100 mL)	15 mL
Àcid acètic glacial	2,875 mL
Aigua desionitzada	7,125 mL

Es barregen els components i es manté a temperatura ambient.

Terra de diatomees

Terra de diatomees (Sigma)	3,5 g
Hidroclorur de guanidina	100 g
TrisHCl 1 M pH 7,5	8,75 mL
EDTA 0,5 M pH 8	14 mL

- Diluir la terra de diatomees en 50 mL d'aigua desionitzada estèril en un vas de precipitats estèril. Deixar precipitar mínim 3 h. Protegir de la llum en tot moment.
- Pesar l'hidroclorur de guanidina en un vas de precipitats estèril, afegir 50 mL d'aigua desionitzada estèril, el TrisHCl i l'EDTA. Dissoldre completament i ajustar el volum a 175 mL amb aigua desionitzada.
- Amb l'ajuda d'una bomba de buit, eliminar la fase aquosa de la terra de diatomees i afegir la solució de guanidina.

- Homogenitzar completament la solució i dispensar-la en ampolles de 100 mL estèrils i protegides de la llum.
- Guardar a temperatura ambient i en un ambient fosc. Homogenitzar abans d'utilitzar.

7.4.2. Electroforesi de DNA en gels d'agarosa

Aquesta tècnica permet separar, identificar i aïllar fragments de DNA que migren en una matriu d'agarosa gràcies a l'aplicació d'un camp elèctric. Els fragments de DNA migraran cap al pol positiu degut a la càrrega negativa del DNA i ho faran a una determinada velocitat que vindrà determinada per la longitud del fragment, la conformació del DNA, la concentració d'agarosa del gel i pel camp elèctric aplicat.

En la visualització de fragments de DNA s'han utilitzat diferents concentracions d'agarosa en funció del tamany del fragment que es volia aïllar. Així, per a tamanyos inferiors a 1,5 kb s'han utilitzat gels d'agarosa al 2%, per a tamanyos d'entre 1 kb i 4 kb s'han utilitzat gels a l'1% i per a tamanyos superiors a 4 kb o per a visualitzar plasmidis s'han utilitzat gels d'agarosa al 0,7%.

Per a obtenir aquests gels d'agarosa s'han utilitzat agaroses de dos tipus: l'agarosa de baix punt de fusió LM-sieve (Pronadisa) per als gels al 2% i l'agarosa per a biologia molecular (Roche) per a la resta de gels.

En funció del percentatge d'agarosa i dels tamanyos dels fragments de DNA volem visualitzar s'han emprat diferents marcadors de pes molecular:

Marcador de pes molecular	Característiques
λ <i>BstEII</i>	Fragments de 14,1 kb, 8,4 kb, 7,2 kb, 6,4 kb 5,7 kb, 4,8 kb, 4,3 kb, 3,7 kb, 2,3 kb, 1,9 kb, 1,4 kb, 1,3 kb 0,7 kb. Obtingut per digestió amb <i>BstEII</i> del DNA del fag λ .
MWM X (Roche)	Fragments de 12,2 kb, 11,2 kb, 10,2 kb, 9,2 kb, 8,1 kb, 7,1 kb, 6,1 kb, 5,1 kb, 4,1 kb, 3 kb, 2 kb, 1,6 kb, 1 kb, 0,5 kb i altres fragments més petits difícilment visibles.
MWM XIV (Roche)	Fragments entre 100 i 1500 pb que es diferencien en 100 pb. A més conté una banda adicional de 2642 pb.

Materials i Mètodes

Per a poder visualitzar els fragments de DNA, els gels es tenyien amb bromur d'etidi, un agent intercalant entre les bases del DNA que emet fluorescència quan s'irradia amb llum ultravioleta.

Procediment

- Pesar la quantitat adequada d'agarosa segons la concentració del gel que es vulgui preparar. Afegir 50 mL de tampó d'electroforesi (TAE 1X preparat a partir d'una solució 10X, Roche).
- Escalfar fins a fondre l'agarosa i assegurar-se que no queden partícules en suspensió.
- Atempter la solució a uns 50°C i afegir bromur d'etidi a una concentració final de 0,5 µg/mL a partir d'una solució stock de 625 µg/mL (CLP).
- Abocar la solució en el suport del gel amb els extrems segellats prèviament amb cinta adhesiva. Colocar les pintes en funció de quantes mostres es vulguin carregar i esperar a que se solidifiqui.
- Treure les pintes i la cinta adhesiva del suport del gel i submergir-lo a la cubeta d'electroforesi plena de tampó TAE 1X.
- Carregar les mostres de DNA en els pous del gel. Les mostres es preparen en tampó de càrrega 1X per a mostres de fins a 4 µL de DNA, és a dir, 5 µL de tampó per cada µL de DNA. Per a volums de DNA superiors a 4 µL s'utilitza el tampó de càrrega 6X.
- Aplicar-hi un voltatge constant d'entre 40-70 V depenent del gel durant un temps que dependrà del tamany del fragment de DNA que volem identificar.
- Visualitzar el DNA amb un transil·luminador de radiació ultravioleta (302 nm de longitud d'ona).
- En cas necessari, es fotografa el gel amb un digitalitzador d'imatges (GelDoc 2000, BIO-RAD).

Solucions

TAE 1X

Es barregen 250 mL de TAE 5X (Roche) en 2, 25 L d'aigua destil·lada.

Tampó de càrrega 6X

Ficoll 400	1,2 g
EDTA 0,5 M pH 8 (46,35 g /250 mL)	1,2 mL
SDS 10% (p/v)	0,6 mL

Blau de bromofenol	15 mg
Xilencianol	15 mg

Dissoldre el Ficoll 400 en 5 mL d'aigua destil·lada escalfant-ho per a premetre'n la bona dissolució. Afegir el SDS i l'EDTA. Enrasar a 10 mL i afegir-hi els colorants. Dispensar en alíquotes d'1 mL i emmagatzemar.

7.4.3. Purificació de fragments de DNA de gels d'agarosa

Per a poder recuperar fragments de DNA que provenen d'una PCR, o d'una restricció, és necessari recuperar-los a partir d'un gel d'agarosa. Un cop els fragments s'han separat bé en el gel d'agarosa, el fragment de DNA que interessa es talla amb l'ajuda d'un cúter. El mètode emprat per separar el DNA de l'agarosa es basa en la utilització d'una solució de NaI 6 M que dissoldrà l'agarosa i més tard s'hi afegeix terra de diatomees que permetrà recuperar el DNA i separar-lo dels possibles contaminants presents en l'agarosa.

Procediment

- Tallar la banda que correspon al fragment de DNA d'interès amb l'ajuda d'un cúter prèviament flamejat per eliminar-ne cap possible traça d'altres fragments de DNA. Col·locar el tros de gel en un tub eppendorf.
- Afegir NaI 6 M de manera que la banda quedi recoberta d'aquesta solució (o bé l'equivalent a 2-3 vegades el pes de la banda). Cal tenir en compte que un excés de NaI podria desnaturalitzar el DNA.
- Incubar a 55°C fins que la banda d'agarosa s'hagi dissolt completament.
- Afegir 1 mL de terra de diatomees i incubar 10 min a temperatura ambient, remenant per inversió la mostra regularment.
- Transferir la mostra en una xeringa colocada sobre una columna *Wizard[®] Minicolumn* (Promega) i passar la mostra a través del filtre amb l'ajuda de l'èmbol.
- Extreure la xeringa, treure l'èmbol i tornar a col·locar la xeringa sobre la columna. Afegir 2 mL d'etanol 70% i passar-lo a través del filtre amb l'ajuda de l'èmbol.
- Treure la xeringa de la columna i col·locar la columna en un tub eppendorf. Centrifugar 20 s a 13 000 rpm per eliminar la resta d'etanol. Transferir la columna en un tub eppendorf nou i deixar assecar la columna durant 10 min a temperatura ambient.
- Afegir de 15-25 µL d'aigua desionitzada estèril a 42°C al filtre de la columna i incubar 10 min més a temperatura ambient.

Un cop lligats el fragment i el vector es procedia a la transformació en cèl·lules competents d'*E. coli* per posteriorment sembrar-ne els transformants en medi selectiu. Els transformants es comprovaren per PCR i quan era necessari, per seqüenciació.

7.4.5.1. Obtenció d'extrems roms

Mitjançant la T4 DNA polimerasa que presenta activitat 5'-3' polimerasa en presència de dNTPs i activitat DNA exonucleasa 3'-5', s'obtenien extrems roms en aquells vectors que presentaven extrems cohesius incompatibles amb el fragment de DNA que es volia clonar.

Procediment

- Barrejar en un tub eppendorf:
 - 2-3 µg de DNA
 - 5 µL de tampó de la T4 DNA polimerasa 10X (Roche)
 - 5 µL de T4 DNA polimerasa (1U/µL) (Roche)
 - 10 µL de mescla de dNTPs 0,5 mM (Roche)
 - aigua desionitzada fins a 50 µL
- Incubar durant 15 min a 37°C.
- Inactivar per temperatura a 70°C durant 10 min.
- Afegir 200 µL d'aigua desionitzada i 500 µL de terra de diatomees.
- Recuperar el DNA d'una manera anàloga al protocol de miniextracció plasmídica amb la columna *Wizard® Minicolumn* (Promega), netejant el DNA amb etanol al 70% i eluint-lo amb aigua desionitzada preescalfada a 42°C.

7.4.5.2. Desfosforilació

S'utilitza el mètode de desfosforilació per d'eliminar els extrems 5'-fosfat dels vectors per tal d'evitar possibles recircularitzacions. El procediment es realitza en un volum final de 50 µL.

Procediment

- Barrejar en un tub eppendorf:
 - 20 µL de DNA plasmídic digerit

Materials i Mètodes

- 25 µL d'aigua desionitzada
- 5 µL de tampó de la fosfatasa alcalina 10X (Roche)
- 0,5 µL de fosfatasa alcalina (1U/µL) (Roche)
- Incubar durant 1 hora a 37°C.
- Inactivar la fosfatasa alcalina incubant-ho a 70°C durant 10 min.
- Afegir 200 µL d'aigua desionitzada i 500 µL de terra de diatomees.
- Recuperar el DNA d'una manera anàloga al protocol de miniextracció plasmídica amb la columna *Wizard® Minicolumn* (Promega), netejant el DNA amb etanol al 70% i eluint-lo amb aigua desionitzada preescalfada a 42°C.

7.4.5.3. Lligació

La lligació de fragments de DNA productes d'una restricció en vectors linealitzats ja sigui amb extrems roms o cohesius es va dur a terme mitjançant la T4 DNA lligasa (New England BioLabs) que catalitza la formació de l'enllaç fosfodiéster entre els extrems 5'-fosfat i els extrems 3'-hidroxil del DNA de doble cadena (dsDNA).

Per a calcular la quantitat necessària de vector i insert es pot utilitzar la següent fórmula:

$$\text{ng insert} = \left(\frac{\text{ng de vector} \times \text{kb insert}}{\text{kb vector}} \right) \times \text{relació molar} \frac{\text{insert}}{\text{vector}}$$

Així doncs, les condicions òptimes d'una lligació depenen de molts factors, per exemple, la longitud de l'insert, el tamany del vector, si els extrems són cohesius o roms, i si són compatibles. La relació molar d'insert/vector és important ja que un excés d'insert podria generar construccions amb més d'un insert. Relacions molars per sota de 2:1 provoquen una baixa eficiència de lligació, mentre que relacions molars superiors a 6:1 promouen la lligació de múltiples inserts. En aquest treball per a lligacions d'extrems cohesius s'ha utilitzat una relació molar insert/vector de 3:1, mentre que per a extrems roms ha estat de 1:1.

Procediment

- Barrejar en un tub eppendorf:
 - 2 µL de tampó 10X de la T4 DNA lligasa (New England BioLabs)
 - 1 µL de T4 DNA lligasa (1 U/µL) (New England BioLabs)
 - Quantitat necessària de vector

- Quantitat necessària d'insert
- Ajustar a 10 µL amb aigua desionitzada.
- Incubar 10 min a temperatura ambient en el cas que la lligació sigui d'extrems cohesius, i 2 h si la lligació és d'extrems roms.
- Transformar en 100 µL de cèl·lules competents d'*E. coli* i sembrar en el medi selectiu adequat.

Els fragments de PCR es lligaven directament en el vector pGEM[®]-t easy (Promega). Aquest vector es comercialitza linealitzat a partir d'una digestió amb *EcoRV*. Posteriorment, s'afegeix una timina en cada un dels extrems 3'-lliures. Aquestes timines augmenten considerablement l'eficiència de lligació d'un producte de PCR i també n'eviten la recircularització. Existeixen determinades polimerases termostables que afegeixen una adenina en 3' de manera que permetrà l'unió amb els extrems 3'-T del vector. A més, aquest vector conté un MCS on hi són presents un gran nombre de dianes de restricció que ens permetran alliberar l'insert si és necessari.

Una característica important d'aquest vector és que el MCS es troba situat dins de la regió codificant de l' α -pèptid de l'enzim β -galactosidasa. La inserció provoca una inactivació de l' α -pèptid i permet identificar els clons recombinants directament gràcies a l'aparència de color blanc en plaques amb X-gal (substrat de la β -galactosidasa que al ser hidrolitzat forma un compost de color blau). A més, a banda i banda del MCS es troben els oligonucleòtids directe i revers que ens permetran seqüenciar els productes de PCR.

7.4.6. Amplificació i seqüenciació de DNA

7.4.6.1. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

La PCR, reacció en cadena de la polimerasa, és un mètode bàsic de la biologia molecular i que té moltes aplicacions en moltes àrees: seqüenciació de DNA, mutagènesi, clonació, etc... que permet que a partir d'una sola o varies còpies d'un fragment de DNA es generin milions de còpies de manera exponencial. El principi bàsic de la PCR es basa en les propietats de determinades DNA polimerases termostables que sintetitzaran les noves molècules de DNA a partir d'uns cebadors que delimitaran la zona a amplificar.

Materials i Mètodes

En aquest treball s'ha utilitzat la EcoTaq DNA polimerasa (Ecogen), derivada de *Thermus aquaticus* YT-1 seguint les especificacions del fabricant. Els cebadors s'han dissenyat segons el programa Oligo i s'han sintetitzat per TipMolBiol (Roche).

Procediment

- Les PCRs es realitzen en un ambient controlat que s'irradia amb llum UV abans de procedir a preparar els tubs de la reacció. També s'irradiarà tot el material que s'utilitzarà (micropipetes, puntes, aigua ultrapura, tubs...).
- Es descongelen els dNTPs, els cebadors, el tampó de l'EcoTaq, el MgCl₂ i es mantenen en gel fins al moment d'utilitzar-los.
- En un tub eppendorf de 0,2 mL hi barregem:
 - 0,5 µL de DNA motlle (400 ng/µL)
 - 2,5 µL de tampó 10X (Ecogen)
 - 2,5 µL de dNTPs 2 mM (Roche)
 - 1 µL MgCl₂ 50 mM (Ecogen)
 - 0,5 µL de cada oligonucleòtid 25 pmols/µL (Roche)
 - 0,2 µL d'EcoTaq 5 U/µL
 - Aigua desionitzada fins a obtenir el volum de 25 µL
- Les mostres s'introdueixen al termociclador MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (BIO-RAD) i se sotmeten als següents cicles:
 - Desnaturalització inicial: 94°C durant 4 min.
 - Amplificació durant 30 cicles:
 - Desnaturalització: 30 s a 94°C
 - Hibridació: 30 s a la temperatura que correspongui segons els oligonucleòtids (serà uns graus superior a la temperatura de l'oligonucleòtid amb temperatura de fusió més baixa)
 - Extensió: 1 min per cada kb amplificada a 72°C
 - Extensió final: 7 min a 72°C.

En determinades comprovacions de clons, la PCR es va realitzar a partir de la suspensió d'un clon en aigua desionitzada que es bullia durant 10 min. En funció de si es tractava d'una PCR en un volum final de 25 o 50 µL el clon es resuspensia en 50 o 100 µL d'aigua desionitzada respectivament.

El DNA motlle que s'afegeix al tub de la reacció representa la meitat del volum total de reacció que equival a una quarta part de la suspensió cel·lular inicial.

7.4.6.2. Seqüenciació

El mètode de seqüenciació emprat és el descrit per Sanger (Sanger *et al.*, 1977) però modificat per a la utilització del marcatge i amplificació mitjançant el BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). La seqüenciació de les mostres d'aquest treball l'ha dut a terme el Servei Veterinari de Genètica Molecular de la UAB per electroforesi en l'ABI 3730x (Applied Biosystems).

La reacció de seqüenciació la duiem a terme al nostre laboratori utilitzant la mescla de reacció del BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit que conté la DNA polimerasa, els 4 dNTPs i una quantitat limitant dels anàlegs 2'-3'-didesoxi dels dNTPs cada un marcat amb un fluorocrom diferent. La incorporació d'aquests anàlegs en la cadena creixent de DNA impedeix que pugui continuar la síntesi de la nova cadena, de manera que es produeixen fragments de longituds diferents amb el didesoxinucleòtid en l'extrem 3'. Aquests fragments després es carreguen en un gel desnaturant d'alta resolució i el seqüenciador ABI 3730x recull i digitalitza les senyals fluorescents que detecta i ens permet veure'n la seqüència.

Procediment

- Les PCRs es realitzen en un ambient controlat que s'irradia amb llum UV abans de procedir a preparar els tubs de la reacció. També s'irradia tot el material que s'utilitza (micropipetes, puntes, aigua ultrapura, tubs...).
- Es descongelen els cebadors, el tampó i la premix i es mantenen en gel fins al moment d'utilitzar-los.
- En un tub eppendorf de 0,2 µL es barregen:
 - 0,5 µL de premix BigDie™ (Applied Biosystems)
 - 1,75 µL de tampó 5X (Applied Biosystems)
 - 0,65 µL de l'oligonucleòtid 5 pmol/µL (Roche)
 - 1 µL de DNA motlle (DNA plasmídic)
 - aigua desionitzada fins a 10 µL
- Les mostres s'introdueixen al termociclador MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (BIO-RAD) i se sotmeten als següents cicles:

Materials i Mètodes

- Desnaturalització inicial: 94°C durant 3 min.
- Amplificació durant 25 cicles:
 - Desnaturalització: 30 s a 96°C
 - Hibridació: 15 s a la temperatura que correspongui segons els oligonucleòtids
 - Extensió: 4 min a 60°C
- Una vegada ha finalitzat el marcatge, es precipita la reacció:
 - Afegir 1 µL d'EDTA 125 mM, 1 µL d'acetat sòdic 3 M i 25 µL d'etanol 100%.
 - Barrejar i incubar 15 min a temperatura ambient.
 - Centrifugar 15 min a velocitat màxima.
 - Aspirar el sobrenadant i afegir 35 µL d'etanol 70%.
 - Centrifugar 5 min a velocitat màxima.
 - Aspirar el sobrenadant i assecar els botons que correspondran al DNA precipitat.
- Les mostres es resuspenen en 10 µL de formamida i s'analitzen amb l'ABI 3730x.

7.4.7. Marcatge amb DIG-ddUTP a l'extrem 3' de sondes mitjançant la transferasa terminal

La transferasa terminal catalitza l'addició de deoxi- i dideoxinucleòtids trifosfats a l'extrem 3'OH de fragments de dsDNA i ssDNA sense necessitat d'haver-hi un motlle.

Procediment:

- Primer cal calcular la concentració que es té d'oligonucleòtid per a poder saber la quantitat d'extrems 3' presents, ja que a la reacció hi han d'anar aproximadament 100 pmols d'extrems 3'. El càlcul és el següent:

$$\text{pmols 3'-ends} = \frac{2 \times 10^6 \times \text{ug de dsDNA}}{\text{N}^\circ \text{ pb} \times 660}$$

- En un tub eppendorf posar:

5x TdT Reaction buffer	4 µL
Oligonucleòtid (100 pmols d'extrems 3')	X µL
DIG-ddUTP solution (1 mM)	1 µL

CoCl₂ 25 mM 4 µL

Transferasa terminal 1 µL

Aigua MQ fins a un volum final de 20 µL

- Barrejar i fer un pols de centrífuga.
- Incubar a 37°C durant 15 min, després col·locar-ho en gel.
- Aturar la reacció afegint 2 µL de EDTA 0,2 M (pH 8).

Solucions:

- DIG-ddUTP:
 - [treball]= 1 mM
 - [final] = 0,05 mM
- CoCl₂:
 - [treball]= 25 mM
 - [final] = 5 mM
- Transferasa terminal
 - [treball]= 400 U/µL
 - [final] = 400 U/reacció

7.4.8. Mutagènesi

7.4.8.1. Mutagènesi dirigida per *nested* PCR

Aquest mètode de mutagènesi s'ha utilitzat per a realitzar mutacions en les caixes d'unió de diferents reguladors. S'ha utilitzat per a mutar les caixes de reconeixement del regulador NrdR en els promotors dels operons *nrdAB*, *nrdHIEF*, i *nrdDG*, així com també la caixa de reconeixement del regulador Fur del promotor de l'operó *nrdHIEF*.

El mecanisme general de mutagènesi es basa en la utilització d'una sèrie de parelles d'oligonucleòtids. La parella d'oligonucleòtids A i B (veure **Fig. 34**) són complementaris als extrems de la regió on es troba la seqüència de reconeixement de la proteïna reguladora que es vol mutagenitzar. La parella d'oligonucleòtids C i D són els que contenen les corresponents mutacions i són complementaris entre ells. El següent pas implica realitzar varies PCRs. Primer de tot la PCR usant els oligonucleòtids A+D i B+C. Aquests amplicons que s'obtinguin seràn el DNA mottle per a la

següent PCR utilitzant els oligonucleòtids A+B. Aquest últim amplicó obtingut contindrà la seqüència de reconeixement ja mutagenitzada.

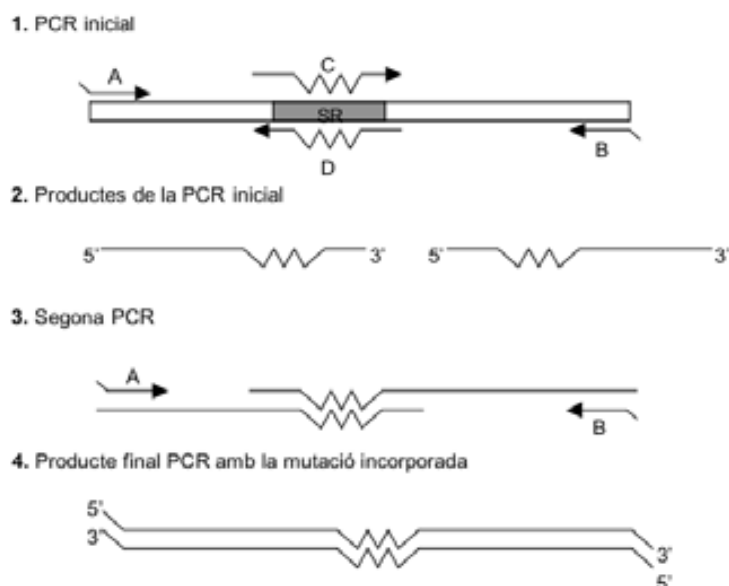


Figura 34. Diferents etapes del procediment de mutagènesi per *nested* PCR.

A partir d'aquest punt, aquest fragment amb la seqüència mutagenitzada es clona en el vector pGEM-t easy i es procedeix a la seva seqüenciació per tal de comprovar que hi ha hagut la mutació. Des d'aquest mateix plasmidi es podran obtenir sondes marcades per a fer gels de retardament electroforètic utilitzant aquestes seqüències mutades, o bé es procedirà amb la clonació per a obtenir fusions gèniques.

7.4.8.2. Mutagènesi per productes de PCR (Mètode de Wanner & Datsenko)

Aquest sistema de mutagènesi es basa en el mètode descrit per Datsenko i Wanner (Datsenko and Wanner, 2000) i que permet la inactivació de gens cromosòmics utilitzant productes de PCR. El mètode comporta l'ús de la recombinasa Red del fag λ que es troba sota el control d'un promotor induïble en un plasmidi de baix nombre de còpies i fàcilment curable.

És un sistema molt útil per a obtenir deleccions de part d'un gen o fins i tot de la totalitat d'un gen i té la particularitat que es poden obtenir aquests mutants sense cap marcador associat. En aquest treball s'ha utilitzat per a obtenir els mutants nuls dels gens *nrdHIEF*, *nrdDG*, *fur* i *nrdR*.

A la **Figura 35** es pot observar un esquema dels diferents passos a realitzar per a obtenir un mutant nul sense cap resistència a antibiòtic associada. El primer pas consisteix en realitzar una PCR utilitzant uns oligonucleòtids que contenen part d'homologia amb les regions adjacents del gen que es vol inactivar i també amb part dels plasmidis que contenen els gens de resistència a antibiòtics flanquejats pels llocs FRT de reconeixement de la recombinasa FLP. El fragment lineal obtingut, de 1600 pb en el cas de si s'ha utilitzat el plasmidi motlle pKD4 (resistència a Km, **Fig. 35**) o de 1100 pb si s'ha utilitzat el plasmidi motlle pKD3 (resistència a Cm, **Fig. 35**), es digereix amb *DpnI* per tal d'eliminar el DNA motlle metilat que no s'havia amplificat i s'electropora a la soca que es vol mutagenitzar i que prèviament conté el plasmidi pKD46 amb la recombinasa (**Fig. 35**).

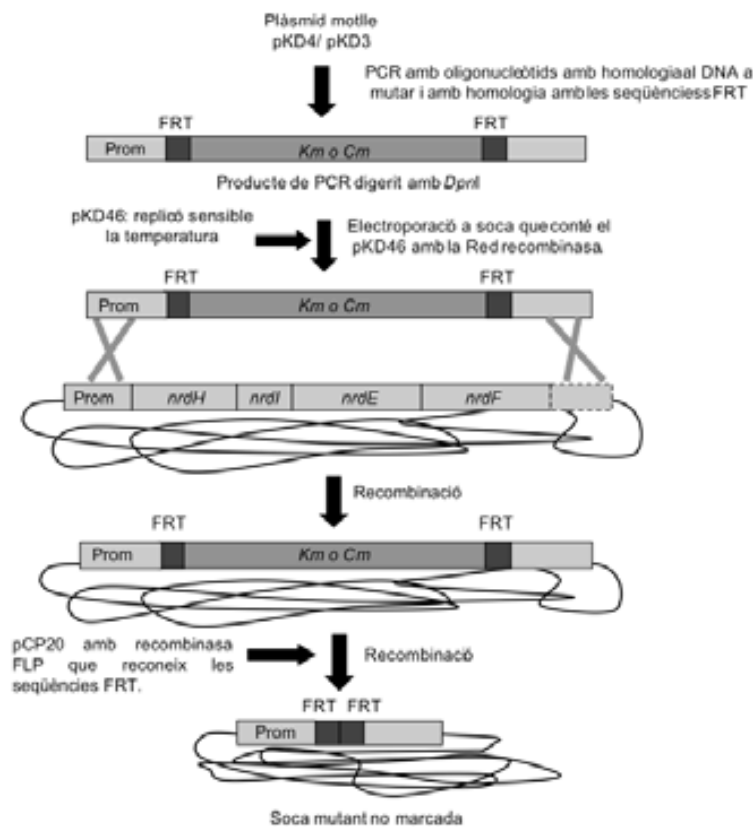


Figura 35. Esquema del sistema de mutagènesi de Wannier & Datsenko.

El plasmidi pKD46 conté la recombinasa Red del fag λ sota el promotor induïble per arabinosa P_{araB} i també es tracta d'un plasmidi amb origen de replicació sensible a la temperatura que permetrà la seva posterior eliminació.

Així doncs, el fragment lineal de DNA s'electropora en cèl·lules electrocompetents de *S. Typhimurium* crescudes amb arabinosa per tal d'activar la producció de la recombinasa λ Red. Les cèl·lules un cop electroporades se sembren en plaques que continguin l'antibiòtic adient i s'incuben a

37°C. Els clons obtinguts es repiquen en noves plaques amb antibiòtic i també en plaques amb Ap. Si hi ha creixement en Ap, els clons es tornen a repicar a 43°C per tal d'assegurar-nos que el plasmidi pKD46 s'ha eliminat.

Els clons mutants s'han de comprovar per PCR utilitzant els oligonucleòtids interns complementaris a la resistència a antibiòtic (k1 i k2 en el cas de pKD4 o c1 i c2 en el cas de pKD3) i amb els oligonucleòtids complementaris a les regions flanquejants del gen que es volia inactivar. Un cop comprovats i curats del plasmidi pKD46, a aquests mutants se'ls transformava el plasmidi pCP20 que conté la recombinasa FLP que reconeix les regions FRT que es troben flanquejant la resistència a antibiòtic. Aquesta recombinasa s'indueix la seva expressió mitjançant l'increment de la temperatura (43°C). El plasmidi pCP20 també conté un origen de replicació sensible a la temperatura, de manera que les cèl·lules transformades se sembren a 30°C i se selecciona amb Ap. Els clons obtinguts es resembren en plaques sense antibiòtic a 43°C i posteriorment es comprova que hagin perdut tant la resistència a Ap (perquè han perdut el plasmidi sensible a temperatura) com la resistència a Km o Cm (perquè la recombinasa s'haurà expressat i haurà eliminat el casset de resistència a antibiòtic).

Els clons mutants es comproven també per PCR utilitzant els oligonucleòtids que reconeixen les regions flanquejants del gen a inactivar, de manera que només s'amplificarà el fragment de DNA que haurà quedat després de la recombinació que correspon a les regions FRT, un fragment d'aproximadament 180 nt.

7.4.9. Construcció de fusions transcripcionals amb el gen indicador *lacZ*

S'han construït fusions transcripcionals de les regions promotores de l'operó *nrdAB* amb les caixes NrdR mutades (per separat i doble mutant), també de l'operó *nrdDG*, i de l'operó *nrdDG* amb les caixes NrdR mutades (per separat i doble mutant), i finalment de l'operó *nrdHIEF* amb les caixes NrdR mutades (per separat i doble mutant) i amb la caixa Fur mutada.

Per a construir les fusions de les diferents regions promotores dels gens *nrd* amb el gen indicador *lacZ* s'amplifiquen les regions promotores amb els oligonucleòtids corresponents (veure l'apartat de Resultats corresponent), i es lliquen al plasmidi pUJ8 (de Lorenzo *et al.*, 1990) dins les dianes *EcoRI* i *BamHI* per a construir la fusió transcripcional entre aquests fragments i el gen *lacZ*. A continuació, les fusions es van transferir al plasmidi pUTminiTn5Km-2 (de Lorenzo, 1990) digerit amb *NotI* i es va introduir a la soca *E. coli* MC1061 λ -pir. Els plasmidis es van extreure i transformar a la soca conjugativa S17 λ -pir i es va procedir a la conjugació biparental entre la soca S17 λ -pir i *S. Typhimurium* LT2 Rif^R o SL1344 Rif^R. Totes les construccions es van confirmar per PCR i per seqüenciació del DNA.

7.5. Mètodes de manipulació de proteïnes

7.5.1. Sobreproducció de proteïnes recombinants en *E. coli*

Les diferents proteïnes recombinants que s'han generat en aquest treball (NrdR i Fur) s'han produït en *E. coli* com a sistema d'expressió, mitjançant vectors d'expressió de la sèrie pET (Novagen). Aquests vectors es caracteritzen per a presentar un promotor fort com és el promotor del fag T7. Per tal de que es pugui expressar la proteïna, és necessari transformar el plasmidi en una soca portadora de la T7 RNA polimerasa que es troba sota el control del promotor *lac* i que s'indueix per IPTG. En aquest treball s'han utilitzat les cèl·lules d'*E. coli* BL21 (DE3) (porten el λ DE3 lisògen que conté el gen de la T7 RNA polimerasa).

Aquest sistema de vectors d'expressió també permet generar fusions entre la proteïna d'interès i varis tipus de cues peptídiques (His-Tag[®], S-Tag[™], T7-Tag[™], HSV-Tag[™]) per a facilitar-ne la posterior detecció o purificació.

En aquest treball s'han produït dues proteïnes reguladores: Fur i NrdR. La primera s'ha produït utilitzant el pET22b que genera una fusió entre una cua de 6xHis en l'extrem C-terminal de la proteïna, i la segona utilitzant el vector pET15b que genera la fusió amb la cua d'histidines en l'extrem N-terminal.

Procediment

- Sembrar un cultiu de nit de la soca BL21 (DE3) portadora del vector d'expressió pET-proteïna recombinant que es fa créixer en presència de glucosa (0,5%) i ampicil·lina (100 μ g/ml). Deixar incubant amb agitació a 37°C durant tota la nit.
- Centrifugar el cultiu de nit 5 min a 3000 x g i eliminar-ne el sobrenadant.
- Resuspendre el botó en 10 mL d'LB fresc i resembrar-ho en un litre de LB amb Ap 100 μ g/ml.
- Controlar l'absorbància del cultiu a 600 nm i quan aquesta arribi a 0,5, induir el cultiu amb IPTG a una concentració final de 0,5 mM. Agafar una mostra d'1 mL abans d'induir amb IPTG.
- Deixar induït durant 4 hores.
- Recuperar les cèl·lules per centrifugació a 3000 x g durant 10 min a 4°C. Guardar-ne una mostra d'1 mL per tal de poder carregar-la en un gel de proteïnes.
- Congelar les cèl·lules o procedir a fer la purificació de la proteïna.

7.5.2. Purificació de proteïnes per cromatografia d'afinitat

La cromatografia d'afinitat separa les proteïnes en funció d'una interacció reversible entre la proteïna d'interès i un lligand específic acoblat a la matriu cromatogràfica. En aquest treball s'han utilitzat columnes de sefarosa acoblada a níquel, que té elevada afinitat per a les histidines. Concretament s'han utilitzat les columnes d'afinitat HisTrap HP d'1 o 5 mL (Amersham Biosciences).

Un cop la proteïna d'interès es troba retinguda a la matriu, per a recuperar-la és necessari variar les condicions de manera que es desestabilitzi la unió entre la proteïna i el níquel de la matriu. Un augment d'imidazol (l'anell d'imidazol és part de l'estructura de la histidina) en el tampó, produeix aquest efecte, ja que provoca un desplaçament de la proteïna unida de manera que s'aniran eluint les proteïnes progressivament en funció de l'afinitat amb que s'uneixen al níquel. A una concentració determinada d'imidazol, s'eluirà la proteïna d'interès.

7.5.2.1. Purificació de NrdR

Preparació de la mostra:

- Resuspènere les cèl·lules de la sobreproducció de la proteïna recombinant en tampó A (20 mM imidazol + PBS 1X). Aproximadament amb 4 mL de tampó A per cada mig litre de cultiu inicial.
- Sonicar la suspensió cel·lular fins aconseguir la lisi de gran part de les cèl·lules (4 torns de 2 min a una freqüència de 0,5 seg).
- Centrifugar la mostra a 38.000 x g en l'ultracentrífuga Beckman L8-70M per a obtenir-ne la fracció soluble i insoluble.
- Carregar una mostra de fracció soluble i una d'insoluble en un gel SDS-PAGE (veure apartat 7.5.4) per a verificar la presència de la proteïna recombinant en la fracció soluble (**Fig. 36**).
- Filtrar la fracció soluble en filtres Millex[®] HV (Millipore) de 0,45 µm de diàmetre.

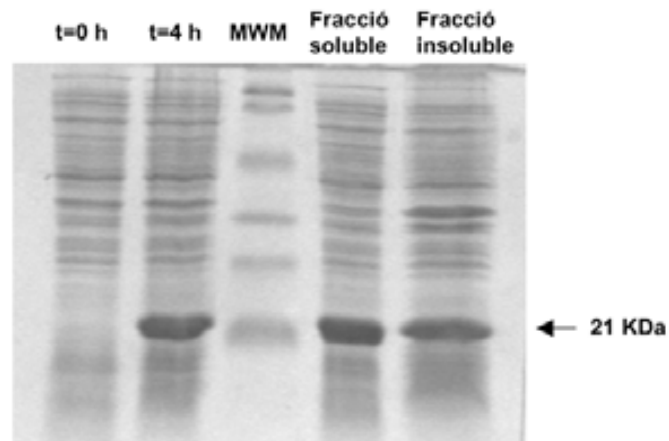


Figura 36. Gel SDS-PAGE al 12% tenyit amb blau de Coomassie de la sobreproducció de la proteïna NrdR. Primer carril: sobreproducció a temps d'inducció 0; segon carril: sobreproducció a temps d'inducció 4 h; tercer carril: marcador de pesos moleculars; quart carril: fracció soluble; cinquè carril: fracció insoluble.

Purificació en la columna d'afinitat

- Equilibrar a columna HisTrap amb 5 volums de tampó A.
- Aplicar la mostra, prèviament filtrada, a la columna de cromatografia.
- Recollir fraccions per tal de carregar-les posteriorment en un gel SDS-PAGE per tal de monitoritzar la purificació.
- Afegir 5-10 volums de tampó A per acabar d'eluir les proteïnes que no s'hagin quedat unides a la columna.
- Afegir 5-8 volums de PBS 1x + 350 mM d'imidazol. Aquesta és la concentració en la que s'elueix la proteïna NrdR.
- Recollir les fraccions per a carregar-les a un gel SDS-PAGE (**Fig. 37**).
- Afegir 5 volums de PBS 1x + 450 mM d'imidazol per a eluir finalment totes les proteïnes que puguin restar unides a la columna.
- Rentar la columna amb 10 volums d'aigua Milli-Q®.
- Rentar la columna amb 5 volums d'etanol al 20% i emmagatzemar a 4°C per a un posterior ús.

Materials i Mètodes

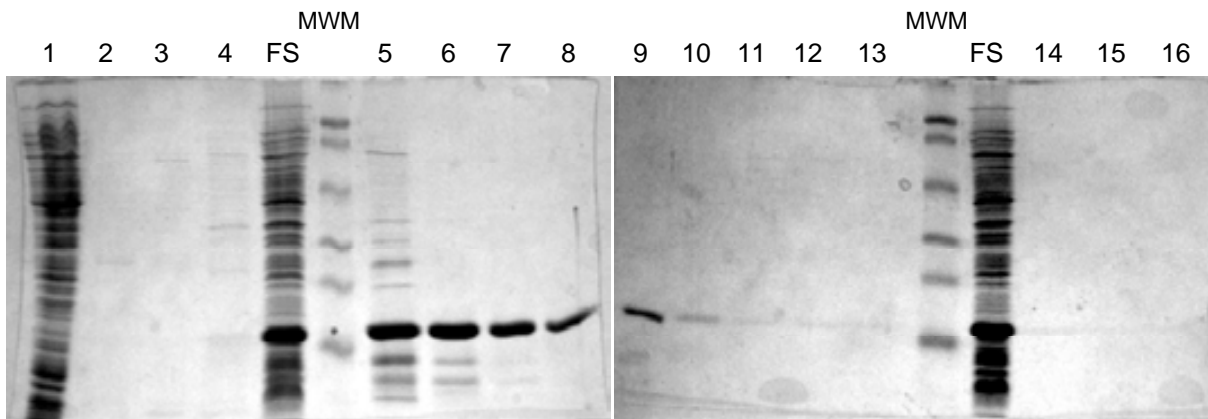


Figura 37. SDS-PAGE al 12% tenyit amb blau de Comassie del procés de purificació per columna d'afinitat de la proteïna NrdR. Carrils 1-3: flow through; carrils 4-10: elució a 350 mM d'imidazol; carrils 11-16: elució a 450 mM d'imidazol. FS: fracció soluble. MWM: marcador de pesos moleculars.

Diàlisi de la proteïna purificada

- Dialitzar la proteïna tota la nit en tampó de diàlisi i l'endemà fer un canvi de tampó i deixar-ho dialitzant durant dues hores més.
- Fer un Bradford per a mesurar la concentració de la proteïna i concentrar-la si cal.
- Es va concentrar amb Centriplus® RC YM-10 (límit d'exclusió de 10 Kda) (Amicon, Inc, Beverly, Mass.) a 3000 x g i 4°C.

Solucions:

Tampó A

PBS	1x
Imidazol	20 mM

Tampó de diàlisi

Tris-HCl pH 7,5	20 mM
NaCl	300 mM
DTT	1 mM
Glicerol	10 %

EDTA

1 mM

7.5.2.2. Purificació de la proteïna Fur

El mètode de purificació de la proteïna Fur s'ha realitzat basant-se en el descrit per de Lorenzo, *et al.* (De Lorenzo *et al.*, 1988).

Preparació de la mostra:

- Resuspendre les cèl·lules de la sobreproducció de la proteïna recombinant en tampó A (20 mM imidazol + PBS 1X). Aproximadament entre 8-10 mL de tampó A per cada litre de cultiu inicial.
- Sonicar la suspensió cel·lular fins aconseguir la lisi de gran part de les cèl·lules (4 torns de 5 min a una freqüència de 0,5 seg).
- Centrifugar la mostra a 38.000 x g en l'ultracentrífuga Beckman L8-70M per a obtenir-ne la fracció soluble i insoluble.
- Carregar una mostra de fracció soluble i una d'insoluble en un gel SDS-PAGE (veure apartat 7.5.4) per a verificar la presència de la proteïna recombinant en la fracció soluble (**Fig. 38**).
- Filtrar la fracció soluble en filtres Millex[®] HV (Millipore) de 0,45 µm de diàmetre.

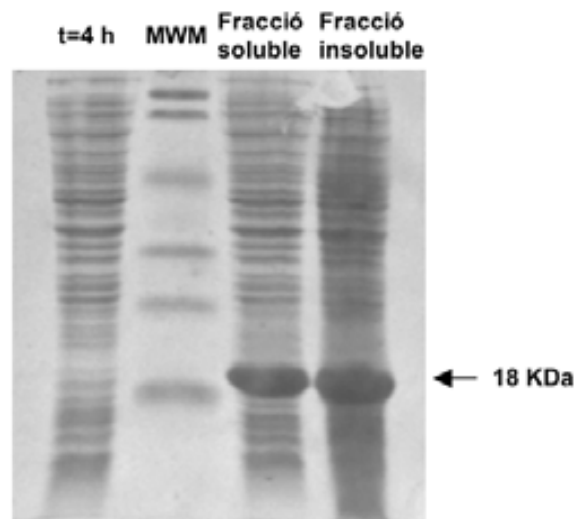


Figura 38. Gel SDS-PAGE al 15% tenyit amb blau de Comassie de la sobreproducció de la proteïna Fur. Primer carril: sobreproducció a temps d'inducció 4 h; segon carril: marcador de pesos molecular; tercer carril: fracció soluble; quart carril: fracció insoluble.

Materials i Mètodes

Purificació en la columna d'afinitat

- Equilibrar a columna HisTrap amb 5 volums de tampó A.
- Aplicar la mostra, prèviament filtrada, a la columna de cromatografia.
- Recollir fraccions per tal de carregar-les posteriorment en un gel SDS-PAGE per tal de monitoritzar la purificació.
- Afegir 5-10 volums de tampó A per acabar d'eluir les proteïnes que no s'hagin quedat unides a la columna.
- Afegir 5 volums de PBS 1x + 140 mM d'imidazol
- Recollir fraccions d'un mL.
- Afegir 5-8 volums de PBS 1x + 330 mM d'imidazol. Aquesta és la concentració en la que s'elueix la proteïna Fur.
- Recollir les fraccions per a carregar-les a un gel SDS-PAGE (**Fig. 39**).
- Afegir 5 volums de PBS 1x + 450 mM d'imidazol per a eluir finalment totes les proteïnes que puguin restar unides a la columna.
- Rentar la columna amb 10 volums d'aigua Milli-Q®.
- Rentar la columna amb 5 volums d'etanol al 20% i emmagatzemar a 4°C per a un posterior ús.

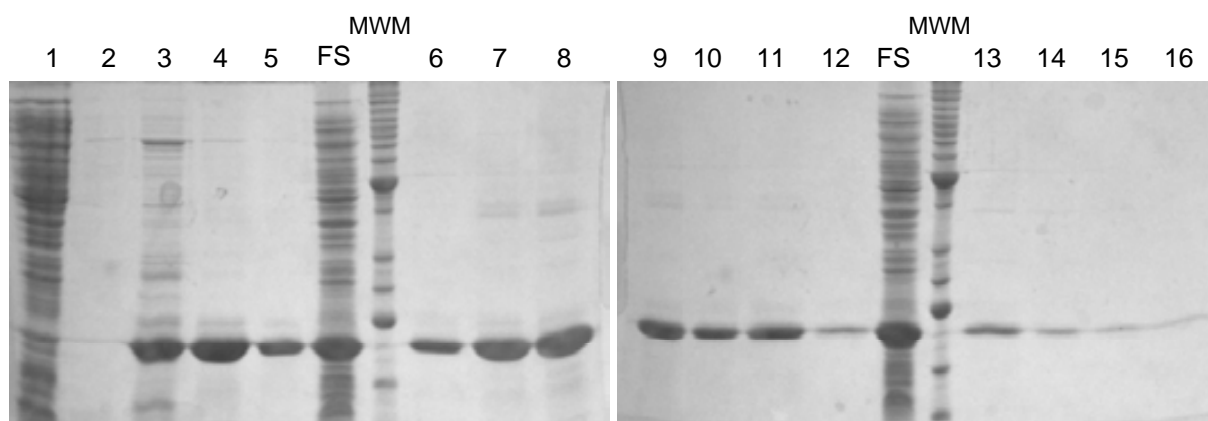


Figura 39. SDS-PAGE al 15% tenyit amb blau de Comassie del procés de purificació per columna d'afinitat de la proteïna Fur. Carrils 1-2: flow through; carrils 3-6: elució a 140 mM d'imidazol; carrils 7-12: elució a 330 mM d'imidazol; carrils 13-16: elució a 450 mM d'imidazol. FS: fracció soluble. MWM: marcador de pesos moleculars.

Diàlisis de la proteïna purificada

- Dialitzar la proteïna tota la nit en tampó de diàlisis i l'endemà fer un canvi de tampó i deixar-ho dialitzant durant dues hores més.
- Fer un Bradford per a mesurar la concentració de la proteïna i concentrar-la si cal.
- Es va concentrar amb Centriplus® RC YM-10 (límit d'exclusió de 10 Kda) (Amicon, Inc, Beverly, Mass.) a 3000 x g i 4°C.

Solucions:**Tampó A**

PBS	1x
Imidazol	20 mM

Tampó de diàlisis

Tris-HCl	50 mM
NaCl	300 mM
Glicerol	15 %

7.5.3. Determinació de la concentració de proteïnes

La quantificació de proteïnes s'ha realitzat amb el Coomassie® Protein Assay Reagent Kit (Pierce) que es basa en el mètode colorimètric descrit per Bradford (Bradford, 1976). Quan el colorant Coomassie® s'uneix a les proteïnes en un medi àcid, pateix un canvi de color de marró a blau, i el seu màxim d'absorbància es desplaça de 465 nm a 595 nm. La concentració de proteïnes es calcula fent una estima en una corba patró de l'absorbància a 595 nm obtinguda de concentracions conegudes d'una proteïna com és la BSA.

Procediment

- Separar en un vas de precipitats a resguard de la llum la quantitat necessària del reactiu i atemperar-lo a temperatura ambient.
- Preparar la recta patró barrejant 1 mL de reactiu amb quantitats creixents de BSA (2 mg/mL) fins a 10 µg/mL.

- Barrejar 1 μL de la mostra o la quantitat necessària perquè l'absorbància entri dins els valors de la recta patró, en 1 mL de reactiu. Barrejar bé i esperar uns minuts abans de fer-ne la lectura a 595 nm a l'espectofotòmetre. Si cal, diluir la mostra per a obtenir valors dins de la corba patró.
- Calcular la recta de regressió amb els valors de la recta patró i determinar la concentració de proteïnes de la mostra.

7.5.4. Electroforesi de proteïnes

Els extractes proteics se separen mitjançant gels de poliacrilamida i SDS (SDS-PAGE). És una tècnica bàsica per a separar les proteïnes en funció del seu pes molecular descrita per Laemmli (Laemmli, 1970). Les proteïnes es desnaturalitzen a 100°C en presència de SDS i β -mercaptoetanol. El detergent aniònic SDS permet que les proteïnes adquireixin una càrrega superficial negativa que fa que migrin cap a l'ànode en presència d'un camp elèctric, i el β -mercaptoetanol és un agent reductor que trenca els ponts disulfur. D'aquesta manera, les proteïnes migren en funció del seu pes molecular.

El gel d'electroforesi consta de dues parts. La part superior del gel, o *stacking*, conté una proporció d'acrilamida més baixa i es prepara amb un tampó de baixa força iònica i de pH diferent. La funció d'aquest gel és afavorir la migració ràpida de les proteïnes que es concentren a la part inferior per tal d'entrar a la vegada en la part inferior del gel, o gel separador, que és de molta més resolució. La visualització dels gels s'obtenia mitjançant la tinció amb el colorant blau de Commassie.

En aquest treball s'han realitzat gels SDS-PAGE del 12% tant per a la proteïna Fur com per la proteïna NrdR. L'aparell d'electroforesi que s'ha emprat ha estat el Mini-Protean II (BIO-RAD) i la font d'electroforesi POWER-PAC 300 (BIO-RAD).

Procediment

- Netejar els vidres, els suports i els separadors amb etanol. Assecar-los i muntar-los seguint les instruccions del fabricant.
- Preparar el gel de separació a la concentració d'acrilamida que es desitgi, barrejant les següents solucions en un matrau Kitasatos:
 - Quantitat necessària d'acrilamida 30%-bisacrilamida 0,8% per a assolir la concentració d'acrilamida desitjada
 - 1,875 μL de 4X Tris-HCl/SDS, pH 8,8
 - aigua desionitzada estèril fins a un volum de 7,5 mL

- Desgasificar la barreja connectant el matrau Kitasatos en una bomba de buit durant 10 min.
- Afegir 25 µL de persulfat amònic al 10% i 5 µL de TEMED.
- Barrejar amb l'ajuda de la micropipeta i ràpidament introduir la dissolució entre els dos vidres situats al suport fins a omplir-ne unes $\frac{3}{4}$ parts del total.
- Afegir unes gotes de *n*-butanol i deixar polimeritzar.
- Un cop polimeritzat, eliminar l'*n*-butanol amb aigua destil·lada. Assecar l'excés d'aigua.
- Preparar el gel superior (*stacking*) en el matrau Kitasato:
 - 0,325 mL de solució d'acrilamida 30%-bisacrilamida 0,8%
 - 0,625 mL 4X Tris-HCl/SDS, pH 6,8
 - 3,05 mL d'aigua desionitzada
- Desgasificar la barreja connectant el matrau Kitasatos en una bomba de buit durant 10 min.
- Afegir 12,5 µL d'amoní persulfat i 2,5 µL de TEMED.
- Barrejar amb l'ajuda de la micropipeta i ràpidament introduir la dissolució entre els dos vidres i per sobre del gel separador. Col·locar la pinta i deixar polimeritzar.
- Barrejar les mostres amb el tampó de càrrega 5X.
- Bullir les mostres i el marcador de pes molecular [SDS-PAGE Molecular Weight Marker Standard Low Range (BIO-RAD)] a 100°C durant 10 min.
- Centrifugar breument i disposar les mostres i el marcador en gel.
- Treure la pinta del gel superior i col·locar el gel a la cubeta d'electroforesi . Afegir 300 mL de tampó d'electroforesi 1X, omplint primer el dipòsit interior.
- Carregar les mostres i el marcador en els pouets.
- Connectar la cubeta a la font d'alimentació i engegar l'electroforesi fixant el voltatge constant a 130 V.
- Un cop hagi finalitzat l'electroforesi, treure el gel cuidadosament del seu suport.
- Col·locar el gel en una cubeta amb la solució de Coomassie i mantenir-lo amb agitació lenta durant 20 min.
- Eliminar el colorant i afegir la solució de destenyir. Mantenir el gel en agitació durant 1 h o fins que les diferents bandes de les proteïnes es vegin correctament.
- Aturar la reacció rentant el gel amb aigua destil·lada.

Materials i Mètodes

Solucions

Solució d'acrilamida 30%-bisacrilamida 0,8%

Acrilamida	30 g
Bisacrilamida	0,8 g

Atenció! El monòmer d'acrilamida és neurotòxic. És necessari portar guants i mascareta a l'hora de preparar la solució.

Dissoldre en 70 mL d'aigua desionitzada i enrasar a un volum final 100 mL. Esterilitzar per filtració amb filtres de 0,45 µm de diàmetre de porus. Protegir de la llum i mantenir a 4°C.

Tris-HCl/SDS 4X pH 8,8

TrisBase	91 g
SDS	2 g

Dissoldre en 300 mL d'aigua destil·lada. Ajustar el pH a 8,8 amb HCl 1 N. Afegir aigua destil·lada fins a un volum final de 500 mL. Filtrar la solució amb filtres de 0,45 µm de diàmetre de porus i guardar a 4°C.

Tris-HCl/SDS 4X pH 6,5

TrisBase	6,05 g
SDS	0,4 g

Dissoldre en 40 mL d'aigua destil·lada . Ajustar el pH a 6,5 amb HCl 1 N. Afegir aigua destil·lada i enrasar fins a un volum final de 100 mL. Filtrar la solució amb filtres de 0,45 µm de diàmetre de porus i guardar a 4°C.

Persulfat amònic 10%

Dissoldre 1 g de persulfat amònic en 10 mL d'aigua destil·lada. Fer alíquotes de 500 µL i congelar-les a -20°C. Quan es vagi a usar, descongelar-lo lentament i mantenir-lo sempre en gel.

Tampó de càrrega 5X

Afegir a 3,8 mL d'aigua desionitzada estèril els següents productes:

TrisHCl 0,5 M pH 6,8	1 mL
Glicerol	0,8 mL
SDS 10% (p/v)	1,6 mL
Blau de bromofenol	0,4 mL
β -mercaptoetanol	0,4 mL

Fer alíquotes de 500 μ L i congelar a -20°C.

Tampó d'electroforesi 5X

TrisBase	15,1 g
Glicina	72 g
SDS	5 g

Dissoldre en aigua destil·lada ajustant el volum final a 1 L. Diluir la solució 5 vegades per a obtenir la solució de treball. Conservar a 4°C.

Solució de blau de Comassie

Comassie Brilliant Blue	2,5 g
Metanol	500 mL
Àcid acètic glacial	100 mL

Dissoldre en 400 mL d'aigua destil·lada. Guardar a temperatura ambient protegit de la llum.

Solució decolorant

Metanol	150 mL
Àcid acètic glacial	50 mL
Aigua destil·lada	300 mL

Barrejar bé i guardar a temperatura ambient.

7.5.5. Western-blot

Aquesta tècnica que es va desenvolupar al laboratori de George Stark (Stanford University) i que va ser descrita per W. Neal Burnette (Burnette, 1981) permet detectar una proteïna específica en una determinada mostra.

El primer pas a seguir requereix la separació de les proteïnes de la mostra en un gel de SDS-PAGE. Aquest gel serà transferit a una membrana on després seran detectats per un anticòs específic de la proteïna que s'està estudiant. A continuació s'incuba amb un anticòs secundari que reconeix el primer anticòs i que a la vegada porta conjugat un enzim que permetrà detectar la proteïna per mitjà d'una senyal colorimètrica, quimioluminiscent o fluorescent.

En aquest treball, aquesta tècnica s'ha utilitzat per a detectar les proteïnes sobreexpressades, Fur i NrdR, com a control de la purificació. L'anticòs primari utilitzat és un anticòs monoclonal de ratolí (IgG2a) que reacciona amb polipèptids que inclouen una cua de 6x His (Anti-His Antibody, Amersham Biosciences). Pel que fa a l'anticòs secundari es tracta d'un anticòs anti-IgG de ratolí conjugat amb la fosfatasa alcalina (Sigma) que ens permetrà detectar la proteïna tant pel mètode quimioluminiscent com pel mètode colorimètric.

Procediment

Preparació de les mostres

S'utilitzen els extractes proteics obtinguts durant la sobreproducció en *E. coli* de l'apartat 7.5.1.

SDS-PAGE

El procediment a seguir és el mateix que el que s'explica a l'apartat 7.5.4. Es preparaven les mostres per a carregar-les a un gel de SDS-PAGE. Segons l'experiment, es feien córrer dos gels en paral·lel, un que s'utilitzaria per a tenyir-lo amb Commassie i l'altre s'utilitzaria per a fer-ne la posterior transferència.

Com a marcador s'utilitzava el SDS-PAGE Molecular Standards Low Range (BIO-RAD) pretenyit. D'aquesta manera era possible visualitzar-lo un cop transferit a la membrana.

Transferència

- Preparar el mòdul de transferència Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BIO-RAD). Netejar-lo amb aigua destil·lada i assecar-lo.
- Tallar la membrana de nitrocel·lulosa (BIO-RAD) i 6 papers de filtre del tamany del gel. Manipular la membrana sempre amb guants. Marcar una cantonada de la membrana.

- Equilibrar les esponges i els papers de filtre amb el tampó de transferència.
- Preparar el sandvitx en una cubeta amb tampó de transferència segons aquest ordre: càtode (-), placa negra de l'aparell de transferència, esponja, tres papers de filtre, membrana, de nitrocel·lulosa, tres papers de filtre, esponja, placa vermella de l'aparell de transferència, ànode (+). És molt important que no quedin bombolles ni entre els filtres i el gel, ni entre el gel i la membrana, ni entre la membrana i els filtres.
- Tancar l'aparell de transferència amb compte de no moure el gel ni la membrana.
- Posar l'aparell en el mòdul de transferència i, aquest, a la cubeta. Col·locar el dipòsit de gel a la cubeta i omplir-la de tampó de transferència. Mantenir a 4°C durant tota la transferència. La transferència es du a terme a 100 V duran 1 hora.
- Després de la transferència, transferir la membrana a una safata amb tampó TBS per procedir al bloqueig de la membrana.

Bloqueig

- Mantenir la membrana en agitació en tampó TBS durant 5 min.
- Eliminar el tampó TBS i afegir 25 mL de la solució bloquejant (tampó TBST). La solució bloquejant permet que els possibles llocs que podrien donar una unió inespecífica dels anticossos.
- Deixar la membrana en la solució bloquejant durant 2 hores o durant tota la nit a 4°C.

Incubació amb l'anticòs específic per la proteïna d'estudi

- Llençar la solució bloquejant.
- Afegir 10 mL de solució bloquejant que contingui l'anticòs específic a la dilució adequada.
- Incubar d'una a dues hores en agitació a temperatura ambient. Un cop feta la incubació, la solució es pot guardar per una posterior reutilització.
- Fer tres rentats de 5 min a la membrana amb TBST.

Incubació amb l'anticòs secundari

- Afegir 10 mL de la solució bloquejant que conté una dilució 1/3000 de l'anticòs Anti-IgG de ratolí conjugat amb la PA (Sigma) i incubar-ho en agitació a temperatura ambient durant 1-2 hores.
- Rentar la membrana amb TBST 3 cops durant 5 min cada rentat.

Materials i Mètodes

Detecció

- La detecció es du a terme utilitzant els substrats de la fosfatasa alcalina que emeten llum (detecció quimioluminiscent) o bé color (detecció colorimètrica). En aquest treball s'ha utilitzat la detecció colorimètrica ja que ofereix més bons resultats i és més senzilla.
 - Incubar la membrana amb 15 mL de tampó 3 durant 5 min.
 - Eliminar el tamó 3 i afegir 10 mL de tampó dels substrats de la fosfatasa alcalina (NBT i BCIP).
 - Incubar a la foscor sense agitació fins que apareguin les bandes.
 - Aturar la reacció amb aigua destil·lada.

Solucions

Tampó de transferència

Glicina	2,9 g
TrisHCl 1 M pH 7,5	48 mL
SDS 10% (p/v)	3,7 mL
Metanol	200 mL

Dissoldre en 500 mL d'aigua destil·lada i ajustar el volum a 1 L. Guardar a 4°C.

TBS

TrisHCl 1 M	10 mL (concentració final 10 mM)
NaCl	8,76 g (concentració final 150 mM)

Dissoldre-ho en aigua destil·lada i enrasar-ho a 1 L de volum final. Guardar a 4°C.

TBST

Tampó TBS amb un 2% de llet en pols (DIFCO). Dissoldre bé perquè no hi quedin grumolls. Preparar al moment d'utilitzar i guardar a 4°C no més d'una setmana.

Tampó 3

NaCl	0,58 g (concentració final 100 mM)
TrisHCl 1 M pH 9,5	10 mL (concentració final 100 mM)

MgCl₂ x 6H₂O 1,01 g (concentració final 50 mM)

Dissoldre les sals en 70 mL d'aigua destil·lada. Afegir els 10 mL de TrisHCl i enrasar a un volum final de 100 mL amb aigua destil·lada.

Tampó dels substrats de la fosfatasa alcalina

Tampó 3	10 mL
NBT (75 mg/mL en dimetilformamida al 70%)	45 µL
BCIP (50 mg/mL en dimetilformamida al 100%)	35 µL

7.5.6. Gels de retardament electroforètic

La interacció de les proteïnes amb el DNA és un aspecte central de la regulació i control de molts processos, i una de les tècniques més importants per a l'estudi d'aquestes interaccions són els gels de retardament electroforètic.

La tècnica, descrita per primer cop per Fried & Crothers i Garner & Revzin (Fried and Crothers, 1981; Garner and Revzin, 1981) es basa en l'observació en un gel de poliacrilamida no desnaturalitzant de la migració del complex DNA:Proteïna i de les molècules de DNA lliures. A mesura que la proteïna es va unint al DNA, apareix una banda que migra més lentament i que queda retardada respecte la banda de DNA lliure.

7.5.6.1. NrdR

Després de la purificació per columna d'afinitat de níquel i de la diàlisi, la proteïna NrdR es troba en un tampó que conté: Tris-HCl pH 7,5 20 mM, NaCl 300 mM, DTT 1 mM i glicerol 10 %.

Caldrà incubar la proteïna en un tampó d'unió adequat amb el DNA d'interès per tal de que es produeixi l'interacció. Aquesta interacció es visualitzarà en un gel de poliacrilamida no desnaturalitzant que es transferirà posteriorment a una membrana de niló i es revelarà.

Procediment

Incubació de la proteïna amb el DNA

- Tampó d'unió: 20 mM Tris-HCl (pH 8) + 5% glicerol + 0,1 µg/µl de BSA + 1 mM MgCl₂ + 75 mM NaCl + 1 mM DTT. En un volum final de 20 µl.

Materials i Mètodes

- Es barrejaran diferents concentracions creixents de proteïna (0 µg, 1,2 µg, 1,4 µg, 1,6 µg i 2 µg) amb 20 pg de DNA per reacció. S'incuba durant 20 min. a 0°C.

Gel de poliacrilamida no desnaturalitzant

- El dia anterior a realitzar el gel de retardament es prepara un gel de poliacrilamida no desnaturalitzant al 5% (5% d'acrilamida/bisacrilamida 30:0,8; amb TBE 0,5x, glicerol al 2,5%, 33,33% APS i 0,066 % de TEMED) i es guarda a 4°C.
- L'endemà es realitza un pre-run per eliminar les possibles traces d'amoni persulfat a 200 V durant 1 h.
- Es carreguen les mostres al gel i es fa córrer durant 1,5 h a 220V a 4°C. L'amperatge oscil·larà entre els 10-2 mA.

Transferència a membrana de niló

- Preparar el sandvitx, en una safata amb tampó de transferència, en el següent ordre:
 - càtode (-)
 - placa negra del "sandvitx"
 - scotch
 - paper de filtre (x3)
 - gel
 - filtre de niló carregat positivament
 - paper de filtre (x3)
 - scotch
 - placa blanca del sandvitx
 - ànode (+)
- És molt important que no quedin bombolles entre el gel i els papers de filtre, ni entre el gel i la membrana, ni entre la membrana i els filtres.
- Tancar el casset vigilant de no moure el gel i el filtre.
- Posar el casset en el mòdul. Posar el mòdul a la cubeta.
- Afegir el Bio-Ice congelat al tanc, omplir-lo amb buffer de transferència fred.
- Afegir una mosca per ajudar a mantenir la temperatura i la distribució de ions al tanc. Mantenir-ho a màxima velocitat.

- Tancar-ho amb la tapa fent coincidir els colors que indiquen la polaritat de la corrent a aplicar, i connectar-ho a la font d'electroforesi a 350mA durant 2 hores.
- Un cop s'hagi transferit, treure la membrana del sandvitx i equilibrar-la durant 20 min amb tampó 1 en agitació suau.
- Retirar el tampó 1 i afegir 60 ml de tampó 2 (Tampó 1 + 1% molico). Deixar agitar suaument 30 min o + (Es pot deixar O/N i continuar amb els rentats i la detecció l'endemà). En aquest pas el filtre queda saturat.
- Retirar el tampó 2 i afegir 40ml de solució de l'anticòs anti-digoxigenina (8 µl d'anticòs en 40ml) en Tampó 2. Incubar 30 min - 1 hora.
- Eliminar l'anticòs amb 3 rentats amb tampó 1 de 10min cada un.
- Equilibrar la membrana amb 20 ml de tampó 3 durant 2 min.

Detecció colorimètrica

- Tampó dels substrats de la fosfatasa alcalina:
 - 10 ml de tampó 3
 - 45 µl NBT 75 mg/ml en dimetilformamida al 70%
 - 35 µl BCIP 50 mg/ml en dimetilformamida al 100%
- Fer la barreja i afegir-li a la membrana.
- Deixar a les fosques (ATENCIÓ: és fotosensible) fins que es vegin les bandes.

Solucions

Tampó d'electroforesi i tampó de transferència

TBE	0,5X
-----	------

Tampó 1

Àcid maleic	100 mM
NaCl	150 mM
NaOH	200 mM

Tampó 2

Tampó 1

Materials i Mètodes

Molico	2 %
--------	-----

Tampó 3

NaCl	100 mM
MgCl ₂	50 mM
TrisHCl	100 mM

7.5.6.2. Fur

Els assajos de retardament electroforètic per a la proteïna Fur s'han realitzat de manera anàloga a la proteïna NrdR. Només hi ha hagut alguns canvis pel que fa al tampó d'unió.

Procediment

Incubació de la proteïna amb el DNA

- Tampó d'unió: 10 mM Tris-HCl (pH 8) + 5% glicerol + 0,1 µg/µl de BSA + 100 µM MnCl₂ + 1 mM MgCl₂ + 40 mM KCl. En un volum final de 20 µl.
- Es barrejaran diferents concentracions creixents de proteïna (0 µg, 0,2 µg, 0,4 µg, 0,8 µg i 1,2 µg i 1,5 µg) amb 20 pg de DNA per reacció. S'incuba durant 20 min. a 37°C.

Gel de poliacrilamida no desnaturalitzant

- El dia anterior a realitzar el gel de retardament es prepara un gel de poliacrilamida no desnaturalitzant al 5% (5% d'acrilamida/bisacrilamida 30:0,8; amb TBE 0,5x, glicerol al 2,5%, 33,33% APS i 0,066 % de TEMED) i es guarda a 4°C.
- L'endemà es realitza un pre-run per eliminar les possibles traces d'amoni persulfat a 200 V durant 1 h.
- Es carreguen les mostres al gel i es fa córrer durant 1,5 h a 220V a 4°C. L'amperatge oscil·larà entre els 10-2 mA.

La transferència a la membrana de niló, i la detecció colorimètrica es va realitzar de la mateixa manera que s'ha descrit per a la proteïna NrdR. Els tampons utilitzats també són els mateixos que s'han descrit a l'apartat 7.5.6.1.

7.5.7. Assaig d'unió a ATP/dATP

En aquest assaig es pretén calcular l'afinitat d'una proteïna purificada (NrdR, en el nostre cas) per un determinat lligand (ATP/dATP). Per tal d'aconseguir-ho s'incuba un concentració fixa de proteïna amb concentracions creixents del lligand marcat radioactivament i, a continuació, es filtra la mescla a través d'una membrana de nitrocel·lulosa. D'aquesta manera la proteïna i el lligand que s'hi hagi unit quedaran retinguts a la membrana mentre que el lligand lliure passarà lliurement a través del filtre. Si es mesura la radioactivitat retinguda en el filtre i se sustrau de la radioactivitat total afegida a la mostra, podem calcular la concentració de lligand que s'ha unit. D'aquesta manera es construeix una corba de saturació que ens permetrà calcular les constants d'afinitat.

Procediment

- Barrejar la proteïna a estudiar (5-10 µg) amb concentracions creixents de ATP-³H (27,8 Ci/mmol) en un volum final de 1 ml amb tampó d'unió (Tampó U).
- Incubar durant 15 minuts a 0° C.
- Filtrar amb una membrana de nitrocel·lulosa de 0,22 µm de diàmetre prèviament empapada en tampó U.
- Rentar amb 20 ml de tampó U.
- Deixar assecar el filtre.
- Introduir el filtre en un vial de centelleig.
- Afegir 3 ml de líquid de centelleig.
- Mesurar els nivells de radioactivitat (DPM)
- Per a cada concentració de ATP-³H, incloure sempre un tub sense proteïna que s'usarà per a determinar el grau d'unió inespecífica al filtre.

Incloure també un tub on se substitueixi la proteïna a estudiar per BSA, per a tal de posar de manifest l'especificitat de l'unió entre el lligand i la proteïna d'interès.

7.6. Anàlisi de l'expressió gènica

7.6.1. Assaig de l'activitat de la β -galactosidasa

L'assaig de l'activitat β -galactosidasa és un sistema indirecte per a calcular l'expressió gènica. Es basa en el mètode descrit per Miller (Miller, 1972).

És un mètode quantitatiu en el que es mesura indirectament la quantitat de β -galactosidasa expressada sota el control del promotor del gen d'interès. L'activitat de l'enzim β -galactosidasa (codificada pel gen *lacZ*) es mesura detectant la producció d'un producte de color groc (*o*-nitrofenol) a partir de la hidròlisi del compost incolor *o*-nitrofenil- β -D-galactòsid (ONPG) a 28°C i pH 7. El compost *o*-nitrofenol pot ser detectat espectrofotomètricament.

Mitjançant la següent fórmula es poden calcular les Unitats Miller (UM) que són un valor indirecte del grau d'expressió del gen d'interès:

$$\text{Unitats Miller} = 1000 \times \left(\frac{(\text{Absorbància Beta } 420 \text{ nm} - (1,75 \times \text{Absorbància Beta } 550 \text{ nm}))}{(t \times 0,2 \times \text{OD}_{550 \text{ nm}})} \right)$$

Procediment

- Realitzar un cultiu de nit de 10 mL de la soca portadora de la fusió del promotor del gen d'interès amb el gen *lacZ* a 37°C en agitació.
- Fer una resembra 1/100 en LB amb l'antibiòtic necessari.
- Incubar 1,5 hores a 37°C o fins que la OD₅₅₀ sigui 0,2-0,3, o bé prendre mostres a diferents temps si es tracta d'analitzar la cinètica de l'expressió.
- Presa de mostres:
 - Tub de cèl·lules: Prendre 0,8 ml de cultiu i afegir-hi 0,1 mL de formol 10%. Fer un tub de control on es barrejaran 0,8 mL de LB + 0,1 mL de formol 10%. Barrejar vigorosament la mostra amb el vòrtex. Mesurar la OD a 550 nm.
 - Tub de l'assaig β -galactosidasa: Prendre 0,2 mL de cultiu i afegir-hi 0,8 mL de Tampó Z i 5 μ L de toluè. Preparar un tub com a blanc utilitzant LB. Seguir els següents passos:
 - Barrejar vigorosament les mostres amb el vòrtex.
 - Evaporar el toluè durant 1h a 37°C en agitació.

- Incubar les mostres a 28°C per atemperar-les.
 - Afegir 0,2 mL de ONPG (4 mg/mL, es prepara dissolent-lo en tampó fosfat 0,1 M pH 7). Comptar el temps que triga la mostra a tornar-se de color groc.
 - Aturar la reacció afegint 0,5 mL de Na₂CO₃ 1 M.
 - Agitar i guardar en la foscor.
 - Mesurar-ne la OD a 550 nm i a 420 nm.
- Fer el càlcul de les Unitats Miller amb la fórmula descrita més amunt.

Solucions

Tampó Z

Na ₂ HPO ₄	4,26 g (concentració final 60 mM)
NaH ₂ O ₄ x H ₂ O	2,76 g (concentració final 40 mM)
KCl	0,372 g (concentració final 10 mM)
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,123 g (concentració final 1 mM)
β-mercaptoetanol	1,75 mL (concentració final 50 mM)

Dissoldre en aigua destil·lada, enrasar a un volum final de 500 mL i ajustar el pH a 7.

Tampó fosfat 0,1 M pH 7

NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	1,42 g (concentració final 0,1 M)
Na ₂ HPO ₄	1,38 g (concentració final 0,1 M)

Dissoldre en aigua destil·lada i ajustar el pH a 7. Enrasar a un volum final de 100 mL. Guardar a 4°C.

ONPG

Es pesa a una concentració de 4 mg/mL i es dissol en tampó fosfat 0,1 M a pH 7. Es prepara de nou cada cop que s'ha d'utilitzar i es manté protegit del contacte amb la llum.

Na₂CO₃ 1 M

Na ₂ CO ₃ x H ₂ O	6,2 g
--	-------

Es dissol en 50 mL d'aigua destil·lada i es prepara de nou per a cada experiment.

7.7. Mètodes de manipulació de cultius cel·lulars

7.7.1. Manteniment i manipulació de línies cel·lulars

El manteniment i la manipulació de les línies cel·lulars que s'han utilitzat en aquest treball es va realitzar al Servei de Cultius Cel·lulars de l'Institut de Biotecnologia i de Biomedicina de la Universitat Autònoma de Barcelona.

7.7.1.1. Manteniment i línies cel·lulars

Les línies cel·lulars que s'han utilitzat en aquest treball es detallen en la Taula VIII. Són línies cel·lulars de macròfag de ratolí i també una línia de cèl·lules epitelials humanes.

Els macròfags s'han cultivat en medi D-MEM + 4500 mg/L de glucosa +GlutaMax™ I + piruvat (GIBCO™) amb 10 % de sèrum fetal boví (FBS) (GIBCO™) i s'han cultivat en una atmòsfera controlada a 37°C amb un 10% de CO₂. En canvi, la línia cel·lular epitelial s'ha cultivat en medi MEM- α suplementat amb glutamina i 10% de FBS (GIBCO™) i s'ha cultivat en les mateixes condicions que les línies cel·lulars de macròfags.

Línia cel·lular	Característiques	Font
RAW264.7	Línia cel·lular de macròfags de ratolí. Conté la mutació <i>Nramp1</i> ^{Asp169}	ATCC # TIB-71™
RAW264.7 Nramp1	Línia cel·lular de macròfags de ratolí transfectada amb l'al·lel salvatge <i>Nramp1</i> ^{Gly169}	Phillipe Gros
HeLa	Línia cel·lular de cèl·lules epitelials humanes	ATCC # CCL-2™

Taula VIII. Línies cel·lulars utilitzades en aquest treball.

7.7.1.2. Congelació de línies cel·lulars

- Descongelar el FBS a 37°C.
- Barrejar 9 mL de FBS amb 1 mL de DMSO estèril (DMSO al 10%) i posar-ho a 4°C (en un tub de 15 mL en gel).
- Fer un recompte de les cèl·lules i resuspendre-les a una concentració de $6-10 \times 10^6$ cèl·lules/mL.
- Posar 500 µL de les cèl·lules en un criotub i afegir-hi 500 µL del medi de congelació. La concentració final de DMSO serà del 5%.
- Congelar el criotub 1 h a -20°C, 24 h a -80°C i finalment en nitrògen líquid.

7.7.1.3. Descongelació de línies cel·lulars

Consideracions: El DMSO és tòxic a 37°C. Mentre hi hagi DMSO en el medi, es treballarà a 4°C. Un cop eliminat el DMSO, ja es podrà procedir a treballar a 37°C.

El DMSO es difón passivament a través de la membrana, depenent de si la concentració de DMSO en el medi és més gran o més baixa que la intracel·lular, aquest entrarà o sortirà de la cèl·lula.

- Atemperar el medi de cultiu i tenir medi fred a 4°C.
- Agafar el criotub i posar-lo a bany maria durant 1 min aproximadament. Quan comenci a desfer-se, s'afegeix medi a 4°C i es transfereix a un tub amb 10 mL de medi a 4°C (per a diluir el DMSO).
- Es centrifuga a la cambra freda, s'aspira el sobrenadant i es resuspèn en un volum de medi atemperat segons la quantitat de cèl·lules.
- Es dipositen les cèl·lules en el flascó de cultiu amb medi atemperat.

7.8. Anàlisi de la virulència de *S. Typhimurium* SL1344

7.8.1. Assaig de supervivència i proliferació de *S. Typhimurium* SL1344 en macròfags de ratolí (*gentamicin protection assay*)

Dia 1:

- Sembrar els macròfags en una placa amb 24 pous. Se sembren en una concentració de $2-5 \times 10^5$ cèl·lules/mL en 0,5 mL de DMEM + 10% FBS (Gibco). Cal fer triplicats.
- Es col·loca la placa en un atmòsfera humidificada amb 10% de CO₂ fins l'endemà, en que es trobaran aproximadament a una confluència del 80%.
- Es preparen els cultius de nit de la soca bacteriana que s'utilitzarà per a la infecció en LB amb els antibiòtics corresponents. S'incuben a 37°C sense agitació fins el dia següent. Els cultius s'han de trobar en fase d'inici d'estacionària.

Dia 2:

- Aspirar el medi i fer un rentat amb PBS (pH 7,4) prèviament atemperat a 37°C.
- Fer les dilucions dels cultius de nit de manera que s'obtingui la concentració adequada per infectar les cèl·lules a una MOI de 10 (10 bacteris per cada macròfag), en un volum final de 200 µL de medi atemperat. Caldrà fer un recompte de viables del cultiu de bacteris que s'ha utilitzat, per saber-ne l'input real.
- Incubar a 37°C i a una atmòsfera humidificada del 10% de CO₂ durant 20 min.
- Aspirar el medi, però guardar-ne una alíquota per calcular les cfu/mL dels bacteris que no han penetrat a l'interior dels macròfags. Rentar les cèl·lules 3 cops amb PBS.
- Afegir 500 µL de DMEM amb 100 µg/mL de gentamicina (Sigma) en cada pouet. Incubar 1 h 30 min a 37°C amb 10% CO₂.
- Rentar les cèl·lules 2 cops amb PBS.
- En aquest punt o bé es lisen les monocapes de cèl·lules per a procedir a fer-ne el recompte de viables de bacteris intracel·lulars o bé s'afegeixen 500 µL de DMEM amb 10 µg/mL de gentamicina, per continuar amb l'incubació durant els temps post-infecció que es vulguin determinar.

- Calcular el nombre de viables a diferents temps post-infecció: 2 h, 4 h, 8h, 24 h. Es tracten les monocapes de cèl·lules amb Tritó X-100 (Sigma) 1% durant 10 min a 37°C. Un cop incubat, s'afegeix 0,8 mL de medi fresc.
- Se sembren viables de cada pouet i es calcula l'índex d'invasivitat i l'índex de proliferació.
- Calcular l'índex de proliferació:

$$\text{Índex proliferació (IP)} = \frac{\text{cfu/mL 24 h}}{\text{cfu/mL 2 h}}$$

- Calcular l'índex d'invasivitat:

$$\text{Índex invasivitat} = \frac{\text{cfu/mL 2h}}{\text{cfu/mL input}}$$

$$\text{Índex invasivitat} = 100 \times \frac{\text{Índex invasivitat mutant}}{\text{Índex invasivitat wt}}$$

7.8.2. Assaig d'invasió de cèl·lules epitelials amb *S. Typhimurium* SL1344

El procediment a seguir és similar al descrit en l'apartat 7.8.1 però amb lleugeres diferències.

Dia 1:

- Sembrar les cèl·lules epitelials en una placa de 24 pouets a una concentració de l'ordre de 4×10^4 - 5×10^4 cèl·lules per pouet. L'endemà les cèl·lules han de trobar-se a un 80% de confluència aproximadament.
- Les condicions de creixement són les mateixes que les emprades per als cultius de macròfags.
- Realitzar els cultius de nit de les soques a estudiar sense agitació a 37°C per tal de que l'endemà els cultius es trobin a la fase d'inici d'estacionària.

Dia 2:

- Fer les dilucions adequades dels cultius de nit per tal d'obtenir una concentració de cèl·lules viables adient per a infectar les cèl·lules epitelials a una MOI d'entre 50-100.
- A partir d'aquest punt el protocol a seguir és el mateix que en el cas dels assajos d'infecció de macròfags. Els temps de post-infecció emprats en els assajos d'infecció de cèl·lules epitelials han estat 2h i 24h. El recompte de viables en aquests punts ens ha permès obtenir els índexs

Materials i Mètodes

d'invasivitat i els índexs de proliferació en cèl·lules epitelials per cada mutant estudiat. Els valors d'aquests índexs s'obtenen a partir de les fórmules descrites en l'apartat 7.8.1.

- Els valors obtinguts en aquest treball són la mitjana de 3 experiments independents en els quals s'han realitzat triplicats per cada soca bacteriana.

Taula V. Soques utilitzades en aquest treball

Soques	Genotip/Característiques	Font
S. Typhimurium LT2	ATTC#700720	ATTC
S. Typhimurium SL1344		
E. coli DH5α	<i>recA1 endA1 hsdR17 gyrA96 supE44 thi-1 relA1 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR Φ80dlacZΔM15</i>	Clontech
E. coli BL21 (DE3)	F- <i>ompT gal [dmc] [lon] hsdSB (rB-mB-)</i> amb el λDE3	Novagen
E. coli MC1061λpir	F- <i>araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 Δ(lac)X74 rpsL(StrR) hsdR2 (rK-mK+) mcrA mcrB1 λpir</i>	Socari Laboratori
E. coli S17-1λpir	TcR SmR <i>recA thi pro hsdR-M+RP4:2-Tc:Mu:Km Tn7, λpir</i>	De Lorenzo et al., 1990
BT340	DH5α pCP20 <i>Δ(argF-lac)169 φ80dlacZ58(M15) glnV44(AS) λ- rfbD1 gyrA96(NalR) recA1 endA1 spoT1 thi-1 hsdR17</i>	B.L. Wanner (2000)
BW25141 pKD3	pKD3 <i>Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3) lacIp4000(lacIQ) Δ(phoB-phoR)580 λ- galU95 ΔuidA3::pir+ recA1 endA9(del-ins)::FRT rph- Δ(rhaD-rhaB)568, rrnB-3 hsdR514</i>	B.L. Wanner (2000)
BW25141 pKD3	pKD4 <i>Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3) lacIp4000(lacIQ) Δ(phoB-phoR)580 λ- galU95 ΔuidA3::pir+ recA1 endA9(del-ins)::FRT rph- Δ(rhaD-rhaB)568, rrnB-3 hsdR514</i>	B.L. Wanner (2000)
BW25113 pKD46	pKD46 <i>Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(::rrnB-3) lacIp4000(lacIQ) λ- rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 rrnB-3 hsdR514</i>	B.L. Wanner (2000)
S. Typhimurium LT2 Rif^R	Rif ^R	Socari laboratoris

Soques	Genotip/Característiques	Font
S. Typhimurium SL1344 Rif^R	Rif ^R	Aquest treball
IG1 pIG8	S. Typhimurium LT2 <i>nrdA::ΩCm::nrdB pIG8</i>	Socari laboratori
S. Typhimurium EA445.1	<i>nrdEF-lacZminiTn5-Km2</i>	Socari laboratori
S. Typhimurium LT2 <i>nrdAB::lacZ</i>	<i>nrdAB-lacZminiTn5-Spc</i>	Socari laboratori
S. Typhimurium LT2 <i>nrdDG::lacZ</i>	<i>nrdDG-lacZ::Tn5Km-2</i>	Aquest treball
IG102	S. Typhimurium LT2 <i>ΔnrdR::km</i>	Aquest treball
IG103	S. Typhimurium LT2 <i>ΔnrdR</i>	Aquest treball
IG104	S. Typhimurium LT2 <i>ΔnrdR nrdAB-lacZminiTn5-Spc</i>	Aquest treball
IG105	S. Typhimurium LT2 <i>ΔnrdR nrdEF-lacZminiTn5-Km2</i>	Aquest treball
IG106	S. Typhimurium LT2 <i>ΔnrdR nrdDG-lacZminiTn5-Km2</i>	Aquest treball
IG107	S. Typhimurium LT2 <i>ΔnrdR nrdAB-lacZminiTn5-Spc</i> <i>pBAD33NrdR</i>	Aquest treball
IG108	S. Typhimurium LT2 <i>ΔnrdR nrdEF-lacZminiTn5-Km2</i> <i>pBAD33NrdR</i>	Aquest treball
IG109	S. Typhimurium LT2 <i>ΔnrdR nrdDG-lacZminiTn5-Km2</i> <i>pBAD33NrdR</i>	Aquest treball
IG110	S. Typhimurium LT2 <i>RBoxAB1-lacZminiTn5-Km2</i>	Aquest treball
IG111	S. Typhimurium LT2 <i>RBoxAB2-lacZminiTn5-Km2</i>	Aquest treball
IG112	S. Typhimurium LT2 <i>RBoxAB1AB2-lacZminiTn5-Km2</i>	Aquest treball

Soques	Genotip/Característiques	Font
IG113	<i>S. Typhimurium</i> LT2 <i>RBoxEF1-lacZminiTn5-Km2</i>	Aquest treball
IG114	<i>S. Typhimurium</i> LT2 <i>RBoxEF2-lacZminiTn5-Km2</i>	Aquest treball
IG115	<i>S. Typhimurium</i> LT2 <i>RBoxEF1EF2-lacZminiTn5-Km2</i>	Aquest treball
IG116	<i>S. Typhimurium</i> LT2 <i>RBoxDG1-lacZminiTn5-Km2</i>	Aquest treball
IG117	<i>S. Typhimurium</i> LT2 <i>RBoxDG2-lacZminiTn5-Km2</i>	Aquest treball
IG118	<i>S. Typhimurium</i> LT2 <i>RBoxDG1DG2-lacZminiTn5-Km2</i>	Aquest treball
IG119	<i>S. Typhimurium</i> LT2 Δ <i>nrdR nrdAB-lacZminiTn5-Spc</i> pBAD33NrdR5359	Aquest treball
IG120	<i>S. Typhimurium</i> LT2 Δ <i>nrdR nrdAB-lacZminiTn5-Spc</i> pBAD33NrdR6265	Aquest treball
IG121	<i>S. Typhimurium</i> LT2 Δ <i>nrdR nrdAB-lacZminiTn5-Spc</i> pBAD33NrdR6266	Aquest treball
IG122	<i>S. Typhimurium</i> LT2 Δ <i>nrdR nrdEF-lacZminiTn5-Km2</i> pBAD33NrdR5359	Aquest treball
IG123	<i>S. Typhimurium</i> LT2 Δ <i>nrdR nrdEF-lacZminiTn5-Km2</i> pBAD33NrdR6265	Aquest treball
IG124	<i>S. Typhimurium</i> LT2 Δ <i>nrdR nrdEF-lacZminiTn5-Km2</i> pBAD33NrdR6266	Aquest treball
IG125	<i>S. Typhimurium</i> LT2 Δ <i>nrdR nrdDG-lacZminiTn5-Km2</i> pBAD33NrdR5359	Aquest treball
IG126	<i>S. Typhimurium</i> LT2 Δ <i>nrdR nrdDG-lacZminiTn5-Km2</i> pBAD33NrdR6265	Aquest treball
IG127	<i>S. Typhimurium</i> LT2 Δ <i>nrdR nrdDG-lacZminiTn5-Km2</i> pBAD33NrdR6266	Aquest treball

Soques	Genotip/Característiques	Font
IG128	<i>S. Typhimurium</i> LT2 $\Delta fur::km$	Aquest treball
IG129	<i>S. Typhimurium</i> LT2 $\Delta fur::cm$	Aquest treball
IG130	<i>S. Typhimurium</i> LT2 Δfur	Aquest treball
IG131	<i>S. Typhimurium</i> LT2 $\Delta fur nrdEF-lacZminiTn5-Km2$	Aquest treball
IG132	<i>S. Typhimurium</i> LT2 $\Delta fur nrdEF-lacZminiTn5-Km2$ pBAD33Fur	Aquest treball
IG133	<i>S. Typhimurium</i> LT2 $MutFurBoxEF-lacZminiTn5-Km2$	Aquest treball
IG134	<i>S. Typhimurium</i> LT2 $\Delta fur \Delta nrdR$	Aquest treball
IG135	<i>S. Typhimurium</i> LT2 $\Delta nrdR \Delta fur nrdEF::lacZ$	Aquest treball
S. Typhimurium LT2 mutant <i>nrdAB</i> merodiploid <i>nrdEF</i>	<i>S. Typhimurium</i> LT2 $nrdA':::\Omega Spc'nrdB$ merodiploid $nrdEF::Km$	Socari laboratori
IG136	<i>S. Typhimurium</i> SL1344 $nrdA':::\Omega Spc'nrdB$ merodiploid $nrdEF::Km$	Aquest treball
IG137	<i>S. Typhimurium</i> SL1344 $nrdA':::\Omega Cm'nrdB$ (anaerobiosi)	Aquest treball
IG138	<i>S. Typhimurium</i> SL1344 $\Delta nrdEF$	Aquest treball
IG139	<i>S. Typhimurium</i> SL1344 $\Delta nrdDG$	Aquest treball
IG140	<i>S. Typhimurium</i> SL1344 $\Delta nrdEF \Delta nrdDG$	Aquest treball
IG141	<i>S. Typhimurium</i> SL1344 $\Delta nrdR$	Aquest treball
IG142	<i>S. Typhimurium</i> SL1344 Δfur	Aquest treball
IG143	<i>S. Typhimurium</i> SL1344 $nrdA':::\Omega Cm'nrdB \Delta nrdR$	Aquest treball
IG144	<i>S. Typhimurium</i> SL1344 $nrdA':::\Omega Cm'nrdB \Delta fur$	Aquest treball
IG145	<i>S. Typhimurium</i> SL1344 $nrdA':::\Omega Cm'nrdB \Delta nrdDG \Delta nrdR$	Aquest treball

Soques	Genotip/Característiques	Font
IG146	<i>S. Typhimurium</i> SL1344 <i>nrdA</i> :: Ω <i>Cm</i> ' <i>nrdB</i> Δ <i>nrdDG</i> <i>Δfur</i>	Aquest treball

Taula VI. Plasmidis utilitzats en aquest treball.

Plasmidi	Genotip/Característiques	Font
pGEM®-T easy	Vector de clonació A/T	Promega
pUJ8	Vector plasmídic per a promotors Trp'-lacZ per a realitzar fusions amb lacZ de tipus I	de Lorenzo (1990)
pUT mini-Tn5Km-2	Plasmidi per alliberar el mini-Tn5 al cromosoma. KmR	de Lorenzo (1990)
pUT mini-Tn5-Spc	Plasmidi per alliberar el mini-Tn5 al cromosoma. SpcR	de Lorenzo (1990)
pKD3	<i>oriR6Kγ bla</i> (ApR) <i>cat rgnB</i> (Ter)	B. L. Wanner (2000)
pKD4	<i>oriR6Kγ bla</i> (ApR) <i>kan rgnB</i> (Ter)	B. L. Wanner (2000)
pKD46	<i>araBp-gam-bet-exo bla</i> (ApR) <i>repA101(ts) oriR101</i>	B. L. Wanner (2000)
pCP20	<i>ts-rep [FLP] [cI857](lambda)(ts)</i> <i>bla</i> (ApR) <i>cat</i>	B. L. Wanner (2000)
pET22b(+)	Plasmidi d'expressió de proteïnes induïble per IPTG	Novagen
pBAD33Cm	Plasmidi d'expressió de proteïnes modulats per l'arabinos/glucosa. Cm ^R	Guzman <i>et al.</i> (1995)

Plasmidi	Genotip/Característiques	Font
pBAD18Km	Plasmidi d'expressió de proteïnes modulats per l'arabinos/glucosa. KmR	Guzman <i>et al.</i> (1995)
pIG8	pBAD33- <i>nrdHIEF</i>	Estoc laboratori
pIG85	pBAD33-RBSnrdR	Aquest treball
pIG86	pBAD33-NrdR5359	Aquest treball
pIG87	pBAD33-NrdR6265	Aquest treball
pIG88	pBAD33-NrdR6266	Aquest treball
pIG89	pBAD33-RBSFur	Aquest treball

Taula VII. Oligonucleòtids utilitzats en aquest treball.

#	Oligonucleòtid	Seqüència (5'→3')	Aplicacions
1	SalDproUp	GAATTCATCTGGTGGTTACAACG	Construcció de les fusions amb <i>lacZ</i>
2	SalDproLw	GGATCCCTTAATGCGCTCTG	Construcció de les fusions amb <i>lacZ</i>
3	MutYbaDU _p	CCTAAATCATCTGGTCAGGACGCCGTATGCATTGCCGTGT AGGCTGGAGCTGCTTC	Mutació <i>nrdR</i> Wanner & Datsenko
4	MutYbaDL _w	GCTCGCGCCATGTAAAACCTCATCCTGCATGGCTTAGCATA TGAATATCCTCCTTA	Mutació <i>nrdR</i> Wanner & Datsenko
5	RBSUpnrdR	GAGCTCAAGGAGAACGCCGTATGCATTGC	Complementació mutació <i>nrdR</i>
6	RBSLwnrdR	TCTAGAATGGCTTAGTCTGTAGGCGAGC	Complementació mutació <i>nrdR</i>

#	Oligonucleòtid	Seqüència (5'→3')	Aplicacions
7	pnrdABUp	GAATTCCTTAAGCTGGGTAG	Mutació caixes d'unió de NrdR i fusions
8	pnrdABLw	GGATCCTGTGGTTTTCTACC	Mutació caixes d'unió de NrdR i fusions
9	RBoxAB1Up	CTAGAATACTAATACCACCTCGGCTCAC	Mutació caixes d'unió NrdR
10	RBoxAB1Lw	GTGAGCCGAGGTGGTATTAGTATTCTAG	Mutació caixes d'unió NrdR
11	RBoxAB2Up	GATTACCCCTTGCGGACCATAGGTATCC	Mutació caixes d'unió NrdR
12	RBoxAB2Lw	GGATACCTATGGTCCGCAAGGGTAATC	Mutació caixes d'unió NrdR
13	pnrdEFUp	GAATTCCTGGCAGGATGGC	Mutació caixes d'unió de NrdR i fusions
14	pnrdEFLw	GGATCCTCATGATTCGTATT	Mutació caixes d'unió de NrdR i fusions
15	RMutEF1Up	CGAAAATTCACGGCCCGTACATGGTTG	Mutació caixes d'unió NrdR
16	RMutEF1Lw	CAACCATGTACGGGCCGTGAATTTTCG	Mutació caixes d'unió NrdR
17	RBoxEF2Up	CTTAATTCAATTCACCCTAGTATCTCCTG	Mutació caixes d'unió NrdR
18	RBoxEF2Lw	CAGGAGATACTAGGGTGAATTGAATTAAG	Mutació caixes d'unió NrdR
19	pnrdDGUp	GAATTCCTTATGGGAGGTC	Mutació caixes d'unió de NrdR i fusions
20	pnrdDGLw	GGATCCTCATGATCACTCC	Mutació caixes d'unió de

Materials i Mètodes

#	Oligonucleòtid	Seqüència (5'→3')	Aplicacions
			NrdR i fusions
21	RMutDG1Up	CAAATCACCGAGTATAGACCTTAAAATG	Mutació caixes d'unió NrdR
22	RMutDG1Lw	CAATTAATGTGGCATATTTGTTCCGGTG	Mutació caixes d'unió NrdR
23	RBoxDG2Up	CCGACCTAATATGCGATAGCAATTGAC	Mutació caixes d'unió NrdR
24	RBoxDG2Lw	GTCAATTGCTATCGCATATTAGGTCGG	Mutació caixes d'unió NrdR
25	NrdR5359Up	GTGATAGCAAGCAACGATGTGCGCGCACC	Mutació ATP-cone NrdR
26	NrdR 5359Lw	GGTGC GCGCACATCGTTGCTTGCTATCAC	Mutació ATP-cone NrdR
27	NrdR6265Up	CCCTTTGCTGAGGATGCGCTGCGTAGCGG	Mutació ATP-cone NrdR
28	NrdR6265Lw	CCGCTACGCAGCGCATCCTCAGCAAAGGG	Mutació ATP-cone NrdR
29	NrdR6266Up	CCCTTTGCTGAGGATAAGGCGCGTAGCGG	Mutació ATP-cone NrdR
30	NrdR6266Lw	CCGCTACGCGCCTTATCCTCAGCAAAGGG	Mutació ATP-cone NrdR
31	MutFurWDown	GAATCGTTTAGCAACAGGACAGATTCCGCATGACTGGTGT AGGCTGGAGCTGCTTC	Mutació <i>fur</i> Wanner & Datsenko
32	MutFurWDLw	GGCTCTTCGAAAGATTTACACTTATTTAGTCGCGTCATATG AATATCCTCCTTA	Mutació <i>fur</i> Wanner & Datsenko
33	RBSFurUp	GAGCTCAAGGAGAATTCCGCATGACTG	Complementació mutació <i>fur</i>
34	RBSFurLw	TCTAGAACAACCTTATTTAGTCGCGTC	Complementació mutació <i>fur</i>
35	pEFFurBoxMutUp	GAATTCGTAAGTCACCATTTTCAGCGA	Mutació caixa d'unió Fur
36	pEFFurBoxMutLw	GGATCCGCTCATGATTCGTATTTC	Mutació caixa d'unió Fur

#	Oligonucleòtid	Seqüència (5'→3')	Aplicacions
37	FurBoxMutEFUp	CCCACGCCGCATCGAATATGGACCTGCCG	Mutació caixa d'unió Fur
38	FurBoxMutEFLw	CGGCAGGTCCATATTCGATGCGGGCTGGG	Mutació caixa d'unió Fur
39	SondaFURUp	CGATTGTGGGTCACTGGCC	Sondes EMSA Fur
40	SondaFURLw	GTCATGCGGAATCTGTCCTG	Sonda EMSA Fur
41	SondaEFUp	GTAAGTCACCATTTCAGCG	Sonda EMSA Fur
42	SondaEFLw	GCTCATGATTCGTATTTCC	Sonda EMSA Fur
43	UpABFusSal	GAATTCTACATGTTGCATACC	Mutants <i>nrd</i>
44	LT2ABinter Lw	CTGCTGGAAGACTACACGG	Mutants <i>nrd</i>
45	<i>nrd</i> BintLw	CGCCTGCATACGAATATTAG	Mutants <i>nrd</i>
46	MutSalEFLw	GAAATGTAACGTTATTTCCCATGCCCGTAAGGTAAAAATC ATATGAATATCCTCCTTA	Mutants <i>nrd</i>
47	MutSalEFUp	CATCGATAATGTCCGAAAAGGAGTAAATGAATTTTGGTGT AGGCTGGAGCTGCTTC	Mutants <i>nrd</i>
48	MutSalDGUp	GATAACCTGTTCTTACAAATATGGAGTGATCATGACGTGTA GGCTGGAGCTGCTTC	Mutants <i>nrd</i>
49	MutSalDGLw	CTATCACGATGCAAACAAACGGCTTTAGCGATCAACCATA TGAATATCCTCCTTA	Mutants <i>nrd</i>

8. Bibliografia

- Ahmer, B.M., van Reeuwijk, J., Watson, P.R., Wallis, T.S., and Heffron, F. (1999) *Salmonella* SirA is a global regulator of genes mediating enteropathogenesis. *Mol Microbiol* **31**: 971-982.
- Alphen, W.V., and Lugtenberg, B. (1977) Influence of osmolarity of the growth medium on the outer membrane protein pattern of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **131**: 623-630.
- Alpuche-Aranda, C.M., Racoosin, E.L., Swanson, J.A., and Miller, S.I. (1994) *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J Exp Med* **179**: 601-608.
- Altier, C. (2005) Genetic and environmental control of salmonella invasion. *J Microbiol* **43 Spec No**: 85-92.
- Aravind, L., Wolf, Y.I., and Koonin, E.V. (2000) The ATP-cone: an evolutionarily mobile, ATP-binding regulatory domain. *J Mol Microbiol Biotechnol* **2**: 191-194.
- Augustin, L.B., Jacobson, B.A., and Fuchs, J.A. (1994) *Escherichia coli* Fis and DnaA proteins bind specifically to the *nrd* promoter region and affect expression of an *nrd-lac* fusion. *J Bacteriol* **176**: 378-387.
- Auner, H., Buckle, M., Deufel, A., Kutateladze, T., Lazarus, L., Mavathur, R., Muskhelishvili, G., Pemberton, I., Schneider, R., and Travers, A. (2003) Mechanism of transcriptional activation by FIS: role of core promoter structure and DNA topology. *J Mol Biol* **331**: 331-344.
- Bagg, A., and Neilands, J.B. (1987) Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **26**: 5471-5477.
- Bajaj, V., Hwang, C., and Lee, C.A. (1995) *hilA* is a novel *ompR/toxR* family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. *Mol Microbiol* **18**: 715-727.
- Bajaj, V., Lucas, R.L., Hwang, C., and Lee, C.A. (1996) Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Mol Microbiol* **22**: 703-714.
- Balbontin, R., Rowley, G., Pucciarelli, M.G., Lopez-Garrido, J., Wormstone, Y., Lucchini, S., Garcia-Del Portillo, F., Hinton, J.C., and Casadesus, J. (2006) DNA adenine methylation regulates virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **188**: 8160-8168.
- Barlow, T., Eliasson, R., Platz, A., Reichard, P., and Sjoberg, B.M. (1983) Enzymic modification of a tyrosine residue to a stable free radical in ribonucleotide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 1492-1495.
- Barnard, A., Wolfe, A., and Busby, S. (2004) Regulation at complex bacterial promoters: how bacteria use different promoter organizations to produce different regulatory outcomes. *Curr Opin Microbiol* **7**: 102-108.
- Baumler, A.J., Tsois, R.M., and Heffron, F. (1996) Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* **64**: 1862-1865.

Bibliografia

- Baxter, M.A., and Jones, B.D.** (2005) The *fimYZ* genes regulate *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium invasion in addition to type 1 fimbrial expression and bacterial motility. *Infect Immun* **73**: 1377-1385.
- Bearson, B.L., Wilson, L., and Foster, J.W.** (1998) A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress. *J Bacteriol* **180**: 2409-2417.
- Beier, D., and Gross, R.** (2006) Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr Opin Microbiol* **9**: 143-152.
- Beuzon, C.R., Meresse, S., Unsworth, K.E., Ruiz-Albert, J., Garvis, S., Waterman, S.R., Ryder, T.A., Boucrot, E., and Holden, D.W.** (2000) *Salmonella* maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of SifA. *Embo J* **19**: 3235-3249.
- Birboim, H.C., and Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Bjorklund, S., Skog, S., Tribukait, B., and Thelander, L.** (1990) S-phase-specific expression of mammalian ribonucleotide reductase R1 and R2 subunit mRNAs. *Biochemistry* **29**: 5452-5458.
- Blanchard, J.L., Wholey, W.Y., Conlon, E.M., and Pomposiello, P.J.** (2007) Rapid changes in gene expression dynamics in response to superoxide reveal SoxRS-dependent and independent transcriptional networks. *PLoS ONE* **2**: e1186.
- Booker, S., Licht, S., Broderick, J., and Stubbe, J.** (1994) Coenzyme B12-dependent ribonucleotide reductase: evidence for the participation of five cysteine residues in ribonucleotide reduction. *Biochemistry* **33**: 12676-12685.
- Borovok, I., Kreisberg-Zakarin, R., Yanko, M., Schreiber, R., Myslovati, M., Aslund, F., Holmgren, A., Cohen, G., and Aharonowitz, Y.** (2002) *Streptomyces* spp. contain class Ia and class II ribonucleotide reductases: expression analysis of the genes in vegetative growth. *Microbiology* **148**: 391-404.
- Borovok, I., Gorovitz, B., Yanku, M., Schreiber, R., Gust, B., Chater, K., Aharonowitz, Y., and Cohen, G.** (2004) Alternative oxygen-dependent and oxygen-independent ribonucleotide reductases in *Streptomyces*: cross-regulation and physiological role in response to oxygen limitation. *Mol Microbiol* **54**: 1022-1035.
- Borovok, I., Gorovitz, B., Schreiber, R., Aharonowitz, Y., and Cohen, G.** (2006) Coenzyme B12 controls transcription of the *Streptomyces* class Ia ribonucleotide reductase *nrdABS* operon via a riboswitch mechanism. *J Bacteriol* **188**: 2512-2520.
- Boston, T., and Atlung, T.** (2003) FNR-mediated oxygen-responsive regulation of the *nrdDG* operon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**: 5310-5313.
- Boyle, E.C., Bishop, J.L., Grassl, G.A., and Finlay, B.B.** (2007) *Salmonella*: from pathogenesis to therapeutics. *J Bacteriol* **189**: 1489-1495.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brown, N.C., and Reichard, P.** (1969) Role of effector binding in allosteric control of ribonucleoside diphosphate reductase. *J Mol Biol* **46**: 39-55.

- Brumell, J.H., and Grinstein, S.** (2004) *Salmonella* redirects phagosomal maturation. *Curr Opin Microbiol* **7**: 78-84.
- Buchmeier, N.A., and Heffron, F.** (1989) Intracellular survival of wild-type *Salmonella typhimurium* and macrophage-sensitive mutants in diverse populations of macrophages. *Infect Immun* **57**: 1-7.
- Buchmeier, N.A., Lipps, C.J., So, M.Y., and Heffron, F.** (1993) Recombination-deficient mutants of *Salmonella typhimurium* are avirulent and sensitive to the oxidative burst of macrophages. *Mol Microbiol* **7**: 933-936.
- 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. *Anal Biochem* **112**: 195-203.
- Camacho, E.M., and Casadesus, J.** (2002) Conjugal transfer of the virulence plasmid of *Salmonella enterica* is regulated by the leucine-responsive regulatory protein and DNA adenine methylation. *Mol Microbiol* **44**: 1589-1598.
- Cano, D.A., Martinez-Moya, M., Pucciarelli, M.G., Groisman, E.A., Casadesus, J., and Garcia-Del Portillo, F.** (2001) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium response involved in attenuation of pathogen intracellular proliferation. *Infect Immun* **69**: 6463-6474.
- Chabes, A., Domkin, V., and Thelander, L.** (1999) Yeast Sml1, a protein inhibitor of ribonucleotide reductase. *J Biol Chem* **274**: 36679-36683.
- Chabes, A., Domkin, V., Larsson, G., Liu, A., Graslund, A., Wijmenga, S., and Thelander, L.** (2000) Yeast ribonucleotide reductase has a heterodimeric iron-radical-containing subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 2474-2479.
- Chabes, A.L., Pflieger, C.M., Kirschner, M.W., and Thelander, L.** (2003) Mouse ribonucleotide reductase R2 protein: a new target for anaphase-promoting complex-Cdh1-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3925-3929.
- Chabes, A.L., Bjorklund, S., and Thelander, L.** (2004) S Phase-specific transcription of the mouse ribonucleotide reductase R2 gene requires both a proximal repressive E2F-binding site and an upstream promoter activating region. *J Biol Chem* **279**: 10796-10807.
- Chakravorty, D., Hansen-Wester, I., and Hensel, M.** (2002) *Salmonella* pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular *Salmonella* from reactive nitrogen intermediates. *J Exp Med* **195**: 1155-1166.
- Cheek, J., and Broderick, J.B.** (2001) Adenosylmethionine-dependent iron-sulfur enzymes: versatile clusters in a radical new role. *J Biol Inorg Chem* **6**: 209-226.
- Chen, C.Y., Buchmeier, N.A., Libby, S., Fang, F.C., Krause, M., and Guiney, D.G.** (1995) Central regulatory role for the RpoS sigma factor in expression of *Salmonella dublin* plasmid virulence genes. *J Bacteriol* **177**: 5303-5309.
- Cirillo, D.M., Valdivia, R.H., Monack, D.M., and Falkow, S.** (1998) Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol Microbiol* **30**: 175-188.
- Clark, M.A., Jepson, M.A., Simmons, N.L., and Hirst, B.H.** (1994) Preferential interaction of *Salmonella typhimurium* with mouse Peyer's patch M cells. *Res Microbiol* **145**: 543-552.

Bibliografia

- Cooperman, B.S., and Kashlan, O.B.** (2003) A comprehensive model for the allosteric regulation of Class Ia ribonucleotide reductases. *Adv Enzyme Regul* **43**: 167-182.
- Cotruvo, J.A., Jr., and Stubbe, J.** (2008) NrdI, a flavodoxin involved in maintenance of the diferric-tyrosyl radical cofactor in *Escherichia coli* class Ib ribonucleotide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 14383-14388.
- Coynault, C., Robbe-Saule, V., and Norel, F.** (1996) Virulence and vaccine potential of *Salmonella typhimurium* mutants deficient in the expression of the RpoS (sigma S) regulon. *Mol Microbiol* **22**: 149-160.
- Darwin, K.H., and Miller, V.L.** (1999a) Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin Microbiol Rev* **12**: 405-428.
- Darwin, K.H., and Miller, V.L.** (1999b) InvF is required for expression of genes encoding proteins secreted by the SPI1 type III secretion apparatus in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **181**: 4949-4954.
- Datsenko, K.A., and Wanner, B.L.** (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6640-6645.
- Dawes, S.S., Warner, D.F., Tsenova, L., Timm, J., McKinney, J.D., Kaplan, G., Rubin, H., and Mizrahi, V.** (2003) Ribonucleotide reduction in *Mycobacterium tuberculosis*: function and expression of genes encoding class Ib and class II ribonucleotide reductases. *Infect Immun* **71**: 6124-6131.
- De Groote, M.A., Ochsner, U.A., Shiloh, M.U., Nathan, C., McCord, J.M., Dinauer, M.C., Libby, S.J., Vazquez-Torres, A., Xu, Y., and Fang, F.C.** (1997) Periplasmic superoxide dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 13997-14001.
- De Lorenzo, V., Herrero, M., Giovannini, F., and Neilands, J.B.** (1988) Fur (ferric uptake regulation) protein and CAP (catabolite-activator protein) modulate transcription of *fur* gene in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **173**: 537-546.
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U., and Timmis, K.N.** (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* **172**: 6568-6572.
- Delany, I., Ieva, R., Alaimo, C., Rappuoli, R., and Scarlato, V.** (2003) The iron-responsive regulator *fur* is transcriptionally autoregulated and not essential in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* **185**: 6032-6041.
- Detweiler, C.S., Cunanan, D.B., and Falkow, S.** (2001) Host microarray analysis reveals a role for the *Salmonella* response regulator *phoP* in human macrophage cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 5850-5855.
- Dominguez-Bernal, G., Pucciarelli, M.G., Ramos-Morales, F., Garcia-Quintanilla, M., Cano, D.A., Casadesus, J., and Garcia-del Portillo, F.** (2004) Repression of the RcsC-YojN-RcsB phosphorelay by the IgaA protein is a requisite for *Salmonella* virulence. *Mol Microbiol* **53**: 1437-1449.
- Drecktrah, D., Knodler, L.A., Ireland, R., and Steele-Mortimer, O.** (2006) The mechanism of *Salmonella* entry determines the vacuolar environment and intracellular gene expression. *Traffic* **7**: 39-51.

- Eichelberg, K., and Galan, J.E. (1999) Differential regulation of *Salmonella typhimurium* type III secreted proteins by pathogenicity island 1 (SPI-1)-encoded transcriptional activators InvF and hilA. *Infect Immun* **67**: 4099-4105.
- Eliasson, R., Fontecave, M., Jornvall, H., Krook, M., Pontis, E., and Reichard, P. (1990) The anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase from *Escherichia coli* requires S-adenosylmethionine as a cofactor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 3314-3318.
- Eliasson, R., Pontis, E., Sun, X., and Reichard, P. (1994) Allosteric control of the substrate specificity of the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **269**: 26052-26057.
- Eliasson, R., Pontis, E., Jordan, A., and Reichard, P. (1996) Allosteric regulation of the third ribonucleotide reductase (NrdEF enzyme) from enterobacteriaceae. *J Biol Chem* **271**: 26582-26587.
- Elledge, S.J., and Davis, R.W. (1990) Two genes differentially regulated in the cell cycle and by DNA-damaging agents encode alternative regulatory subunits of ribonucleotide reductase. *Genes Dev* **4**: 740-751.
- Ellermeier, C.D., Ellermeier, J.R., and Slauch, J.M. (2005) HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator *hilA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **57**: 691-705.
- Ellermeier, J.R., and Slauch, J.M. (2008) Fur regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system through HilD. *J Bacteriol* **190**: 476-486.
- Elsinghorst, E.A. (1994) Measurement of invasion by gentamicin resistance. *Methods Enzymol* **236**: 405-420.
- Engstrom, Y., Eriksson, S., Jildevik, I., Skog, S., Thelander, L., and Tribukait, B. (1985) Cell cycle-dependent expression of mammalian ribonucleotide reductase. Differential regulation of the two subunits. *J Biol Chem* **260**: 9114-9116.
- Eriksson, M., Uhlin, U., Ramaswamy, S., Ekberg, M., Regnstrom, K., Sjoberg, B.M., and Eklund, H. (1997) Binding of allosteric effectors to ribonucleotide reductase protein R1: reduction of active-site cysteines promotes substrate binding. *Structure* **5**: 1077-1092.
- Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M., and Hinton, J.C. (2003) Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **47**: 103-118.
- Escobar, L., Perez-Martin, J., and de Lorenzo, V. (1998) Binding of the *fur* (ferric uptake regulator) repressor of *Escherichia coli* to arrays of the GATAAT sequence. *J Mol Biol* **283**: 537-547.
- Escobar, L., Perez-Martin, J., and de Lorenzo, V. (1999) Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* **181**: 6223-6229.
- Escobar, L., Perez-Martin, J., and de Lorenzo, V. (2000) Evidence of an unusually long operator for the *fur* repressor in the aerobactin promoter of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**: 24709-24714.
- Esposito, D., and Gerard, G.F. (2003) The *Escherichia coli* Fis protein stimulates bacteriophage lambda integrative recombination *in vitro*. *J Bacteriol* **185**: 3076-3080.

Bibliografia

- Fahlen, T.F., Mathur, N., and Jones, B.D.** (2000) Identification and characterization of mutants with increased expression of *hilA*, the invasion gene transcriptional activator of *Salmonella typhimurium*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **28**: 25-35.
- Fahlen, T.F., Wilson, R.L., Boddicker, J.D., and Jones, B.D.** (2001) Hha is a negative modulator of transcription of *hilA*, the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion gene transcriptional activator. *J Bacteriol* **183**: 6620-6629.
- Fang, F.C., Libby, S.J., Buchmeier, N.A., Loewen, P.C., Switala, J., Harwood, J., and Guiney, D.G.** (1992) The alternative sigma factor KatF (RpoS) regulates *Salmonella* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 11978-11982.
- Fang, F.C., DeGroot, M.A., Foster, J.W., Baumler, A.J., Ochsner, U., Testerman, T., Bearson, S., Giard, J.C., Xu, Y., Campbell, G., and Laessig, T.** (1999) Virulent *Salmonella typhimurium* has two periplasmic Cu, Zn-superoxide dismutases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 7502-7507.
- Fields, P.I., Swanson, R.V., Haidaris, C.G., and Heffron, F.** (1986) Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 5189-5193.
- Fields, P.I., Groisman, E.A., and Heffron, F.** (1989) A *Salmonella* locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. *Science* **243**: 1059-1062.
- Fieschi, F., Torrents, E., Touloukhanova, L., Jordan, A., Hellman, U., Barbe, J., Gibert, I., Karlsson, M., and Sjöberg, B.M.** (1998) The manganese-containing ribonucleotide reductase of *Corynebacterium ammoniagenes* is a class Ib enzyme. *J Biol Chem* **273**: 4329-4337.
- Filatov, D., and Thelander, L.** (1995) Role of a proximal NF-Y binding promoter element in S phase-specific expression of mouse ribonucleotide reductase R2 gene. *J Biol Chem* **270**: 25239-25243.
- Filatov, D., Bjorklund, S., Johansson, E., and Thelander, L.** (1996) Induction of the mouse ribonucleotide reductase R1 and R2 genes in response to DNA damage by UV light. *J Biol Chem* **271**: 23698-23704.
- Filpula, D., and Fuchs, J.A.** (1977) Regulation of ribonucleoside diphosphate reductase synthesis in *Escherichia coli*: increased enzyme synthesis as a result of inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis. *J Bacteriol* **130**: 107-113.
- Filpula, D., and Fuchs, J.A.** (1978) Regulation of the synthesis of ribonucleoside diphosphate reductase in *Escherichia coli*: specific activity of the enzyme in relationship to perturbations of DNA replication. *J Bacteriol* **135**: 429-435.
- Fontecave, M.** (1998) Ribonucleotide reductases and radical reactions. *Cell Mol Life Sci* **54**: 684-695.
- Fontecave, M., Mulliez, E., and Logan, D.T.** (2002) Deoxyribonucleotide synthesis in anaerobic microorganisms: the class III ribonucleotide reductase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **72**: 95-127.
- Foster, J.W.** (1993) The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* involves transient synthesis of key acid shock proteins. *J Bacteriol* **175**: 1981-1987.
- Foster, J.W.** (1995) Low pH adaptation and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Crit Rev Microbiol* **21**: 215-237.
- Foster, J.W.** (1999) When protons attack: microbial strategies of acid adaptation. *Curr Opin Microbiol* **2**: 170-174.

- Frey, P.A., and Magnusson, O.T.** (2003) S-Adenosylmethionine: a wolf in sheep's clothing, or a rich man's adenosylcobalamin? *Chem Rev* **103**: 2129-2148.
- Fried, M., and Crothers, D.M.** (1981) Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* **9**: 6505-6525.
- Fu, H.A., Iuchi, S., and Lin, E.C.** (1991) The requirement of ArcA and Fnr for peak expression of the *cyd* operon in *Escherichia coli* under microaerobic conditions. *Mol Gen Genet* **226**: 209-213.
- Galan, J.E., and Curtiss, R., 3rd** (1990) Expression of *Salmonella typhimurium* genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling. *Infect Immun* **58**: 1879-1885.
- Galan, J.E.** (2001) *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 53-86.
- Galan, J.E., and Wolf-Watz, H.** (2006) Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**: 567-573.
- Gallardo-Madueno, R., Leal, J.F., Dorado, G., Holmgren, A., Lopez-Barea, J., and Pueyo, C.** (1998) In vivo transcription of *nrdAB* operon and of *grxA* and *fpg* genes is triggered in *Escherichia coli* lacking both thioredoxin and glutaredoxin 1 or thioredoxin and glutathione, respectively. *J Biol Chem* **273**: 18382-18388.
- Garcia-Calderon, C.B., Garcia-Quintanilla, M., Casadesus, J., and Ramos-Morales, F.** (2005) Virulence attenuation in *Salmonella enterica rcsC* mutants with constitutive activation of the Rcs system. *Microbiology* **151**: 579-588.
- Garcia-del Portillo, F., Foster, J.W., and Finlay, B.B.** (1993) Role of acid tolerance response genes in *Salmonella typhimurium* virulence. *Infect Immun* **61**: 4489-4492.
- Garcia-Del Portillo, F., Pucciarelli, M.G., and Casadesus, J.** (1999) DNA adenine methylase mutants of *Salmonella typhimurium* show defects in protein secretion, cell invasion, and M cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 11578-11583.
- Garcia-del Portillo, F.** (2001) *Salmonella* intracellular proliferation: where, when and how? *Microbes Infect* **3**: 1305-1311.
- Garcia-Del Portillo, F.** (2008) Heterogeneity in tissue culture infection models: a source of novel host-pathogen interactions? *Microbes Infect* **10**: 1063-1066.
- Garmendia, J., Beuzon, C.R., Ruiz-Albert, J., and Holden, D.W.** (2003) The roles of SsrA-SsrB and OmpR-EnvZ in the regulation of genes encoding the *Salmonella typhimurium* SPI-2 type III secretion system. *Microbiology* **149**: 2385-2396.
- Garner, M.M., and Revzin, A.** (1981) A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res* **9**: 3047-3060.
- Garriga, X., Eliasson, R., Torrents, E., Jordan, A., Barbe, J., Gibert, I., and Reichard, P.** (1996) *nrdD* and *nrdG* genes are essential for strict anaerobic growth of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **229**: 189-192.
- Garvis, S.G., Beuzon, C.R., and Holden, D.W.** (2001) A role for the PhoP/Q regulon in inhibition of fusion between lysosomes and *Salmonella*-containing vacuoles in macrophages. *Cell Microbiol* **3**: 731-744.

Bibliografia

- Gerlach, R.G., Jackel, D., Geymeier, N., and Hensel, M.** (2007) *Salmonella* pathogenicity island 4-mediated adhesion is coregulated with invasion genes in *Salmonella enterica*. *Infect Immun* **75**: 4697-4709.
- Gilbert, W.** (1986) Origin of life: The RNA world. *Nature* **319**: 618.
- Gon, S., Camara, J.E., Klungsoyr, H.K., Croke, E., Skarstad, K., and Beckwith, J.** (2006) A novel regulatory mechanism couples deoxyribonucleotide synthesis and DNA replication in *Escherichia coli*. *Embo J* **25**: 1137-1147.
- Goodier, R.I., and Ahmer, B.M.** (2001) SirA orthologs affect both motility and virulence. *J Bacteriol* **183**: 2249-2258.
- Govoni, G., Gauthier, S., Billia, F., Iscove, N.N., and Gros, P.** (1997) Cell-specific and inducible *Nramp1* gene expression in mouse macrophages *in vitro* and *in vivo*. *J Leukoc Biol* **62**: 277-286.
- Grinberg, I., Shteinberg, T., Gorovitz, B., Aharonowitz, Y., Cohen, G., and Borovok, I.** (2006) The *Streptomyces* NrdR transcriptional regulator is a Zn ribbon/ATP cone protein that binds to the promoter regions of class Ia and class II ribonucleotide reductase operons. *J Bacteriol* **188**: 7635-7644.
- Grinberg, I., Shteinberg, T., Hassan, Q., Aharonowitz, Y., Borovok, I., and Cohen, G.** (2008) Functional analysis of the *Streptomyces coelicolor* NrdR ATP-cone domain: Role in nucleotide binding, oligomerization and DNA interactions. *J Bacteriol*.
- Groisman, E.A., Chiao, E., Lipps, C.J., and Heffron, F.** (1989) *Salmonella typhimurium* *phoP* virulence gene is a transcriptional regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 7077-7081.
- Groisman, E.A.** (2001a) *Principles of Bacterial Pathogenesis*. San Diego, CA: Academic Press.
- Groisman, E.A.** (2001b) The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol* **183**: 1835-1842.
- Guiney, D.G., Fang, F.C., Krause, M., Libby, S., Buchmeier, N.A., and Fierer, J.** (1995) Biology and clinical significance of virulence plasmids in *Salmonella* serovars. *Clin Infect Dis* **21 Suppl 2**: S146-151.
- Guiney, D.G.** (1997) Regulation of bacterial virulence gene expression by the host environment. *J Clin Invest* **99**: 565-569.
- Gulig, P.A., Danbara, H., Guiney, D.G., Lax, A.J., Norel, F., and Rhen, M.** (1993) Molecular analysis of *spv* virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. *Mol Microbiol* **7**: 825-830.
- Gulig, P.A., and Doyle, T.J.** (1993) The *Salmonella typhimurium* virulence plasmid increases the growth rate of *Salmonellae* in mice. *Infect Immun* **61**: 504-511.
- Gunn, J.S., Ryan, S.S., Van Velkinburgh, J.C., Ernst, R.K., and Miller, S.I.** (2000) Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect Immun* **68**: 6139-6146.
- Hall, H.K., and Foster, J.W.** (1996) The role of *fur* in the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. *J Bacteriol* **178**: 5683-5691.

- Han, J.S., Kwon, H.S., Yim, J.B., and Hwang, D.S.** (1998) Effect of IciA protein on the expression of the *nrd* gene encoding ribonucleoside diphosphate reductase in *E. coli*. *Mol Gen Genet* **259**: 610-614.
- Hanke, P.D., and Fuchs, J.A.** (1983) Regulation of ribonucleoside diphosphate reductase mRNA synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **154**: 1040-1045.
- Hansen-Wester, I., and Hensel, M.** (2001) *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect* **3**: 549-559.
- Hantke, K.** (1988) Characterization of an iron sensitive Mud1 mutant in *E. coli* lacking the ribonucleotide reductase subunit B2. *Arch Microbiol* **149**: 344-349.
- Hantke, K.** (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**: 172-177.
- Hardt, W.D., Chen, L.M., Schuebel, K.E., Bustelo, X.R., and Galan, J.E.** (1998) *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* **93**: 815-826.
- Hautefort, I., Thompson, A., Eriksson-Ygberg, S., Parker, M.L., Lucchini, S., Danino, V., Bongaerts, R.J., Ahmad, N., Rhen, M., and Hinton, J.C.** (2008) During infection of epithelial cells *Salmonella enterica* serovar Typhimurium undergoes a time-dependent transcriptional adaptation that results in simultaneous expression of three type 3 secretion systems. *Cell Microbiol* **10**: 958-984.
- Hawkins, C.L., and Davies, M.J.** (2001) Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochim Biophys Acta* **1504**: 196-219.
- Hayward, R.D., and Koronakis, V.** (1999) Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive *Salmonella*. *Embo J* **18**: 4926-4934.
- Heithoff, D.M., Sinsheimer, R.L., Low, D.A., and Mahan, M.J.** (1999) An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence. *Science* **284**: 967-970.
- Hengge-Aronis, R.** (2002) Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 373-395, table of contents.
- Hensel, M., Shea, J.E., Gleeson, C., Jones, M.D., Dalton, E., and Holden, D.W.** (1995) Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* **269**: 400-403.
- Hensel, M., Shea, J.E., Waterman, S.R., Mundy, R., Nikolaus, T., Banks, G., Vazquez-Torres, A., Gleeson, C., Fang, F.C., and Holden, D.W.** (1998) Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol Microbiol* **30**: 163-174.
- Hensel, M.** (2000) *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* **36**: 1015-1023.
- Hensel, M.** (2004) Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* **294**: 95-102.
- Herrick, J., and Sclavi, B.** (2007) Ribonucleotide reductase and the regulation of DNA replication: an old story and an ancient heritage. *Mol Microbiol* **63**: 22-34.

Bibliografia

- Hersh, D., Monack, D.M., Smith, M.R., Ghori, N., Falkow, S., and Zychlinsky, A. (1999) The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 2396-2401.
- Hoiseh, S.K., and Stocker, B.A. (1981) Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* **291**: 238-239.
- Humphreys, S., Stevenson, A., Bacon, A., Weinhardt, A.B., and Roberts, M. (1999) The alternative sigma factor, sigmaE, is critically important for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* **67**: 1560-1568.
- Jacobson, B.A., and Fuchs, J.A. (1998) A 45 bp inverted repeat is required for cell cycle regulation of the *Escherichia coli* *nrd* operon. *Mol Microbiol* **28**: 1307-1314.
- Jacques, J.F., Jang, S., Prevost, K., Desnoyers, G., Desmarais, M., Imlay, J., and Masse, E. (2006) RyhB small RNA modulates the free intracellular iron pool and is essential for normal growth during iron limitation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **62**: 1181-1190.
- Jang, S., and Imlay, J.A. (2007) Micromolar intracellular hydrogen peroxide disrupts metabolism by damaging iron-sulfur enzymes. *J Biol Chem* **282**: 929-937.
- Johansson, E., Skogman, E., and Thelander, L. (1995) The TATA-less promoter of mouse ribonucleotide reductase R1 gene contains a TFIID binding initiator element essential for cell cycle-regulated transcription. *J Biol Chem* **270**: 30162-30167.
- Johnson, R.C., Bruist, M.F., and Simon, M.I. (1986) Host protein requirements for in vitro site-specific DNA inversion. *Cell* **46**: 531-539.
- Johnston, C., Pegues, D.A., Hueck, C.J., Lee, A., and Miller, S.I. (1996) Transcriptional activation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by a member of the phosphorylated response-regulator superfamily. *Mol Microbiol* **22**: 715-727.
- Jones, B.D., and Falkow, S. (1996) Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. *Annu Rev Immunol* **14**: 533-561.
- Jordan, A., Gibert, I., and Barbe, J. (1994) Cloning and sequencing of the genes from *Salmonella typhimurium* encoding a new bacterial ribonucleotide reductase. *J Bacteriol* **176**: 3420-3427.
- Jordan, A., Gibert, I., and Barbe, J. (1995) Two different operons for the same function: comparison of the *Salmonella typhimurium* *nrdAB* and *nrdEF* genes. *Gene* **167**: 75-79.
- Jordan, A., Aragall, E., Gibert, I., and Barbe, J. (1996a) Promoter identification and expression analysis of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* *nrdEF* operons encoding one of two class I ribonucleotide reductases present in both bacteria. *Mol Microbiol* **19**: 777-790.
- Jordan, A., Pontis, E., Aslund, F., Hellman, U., Gibert, I., and Reichard, P. (1996b) The ribonucleotide reductase system of *Lactococcus lactis*. Characterization of an NrdEF enzyme and a new electron transport protein. *J Biol Chem* **271**: 8779-8785.
- Jordan, A., Aslund, F., Pontis, E., Reichard, P., and Holmgren, A. (1997) Characterization of *Escherichia coli* NrdH. A glutaredoxin-like protein with a thioredoxin-like activity profile. *J Biol Chem* **272**: 18044-18050.
- Jordan, A., and Reichard, P. (1998) Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem* **67**: 71-98.

- Kalupahana, R.S., Mastroeni, P., Maskell, D., and Blacklaws, B.A.** (2005) Activation of murine dendritic cells and macrophages induced by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Immunology* **115**: 462-472.
- Kashlan, O.B., and Cooperman, B.S.** (2003) Comprehensive model for allosteric regulation of mammalian ribonucleotide reductase: refinements and consequences. *Biochemistry* **42**: 1696-1706.
- Kelly, A., Goldberg, M.D., Carroll, R.K., Danino, V., Hinton, J.C., and Dorman, C.J.** (2004) A global role for Fis in the transcriptional control of metabolism and type III secretion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology* **150**: 2037-2053.
- Keyer, K., and Imlay, J.A.** (1996) Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13635-13640.
- Kiley, P.J., and Beinert, H.** (1998) Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron-sulfur cluster. *FEMS Microbiol Rev* **22**: 341-352.
- King, D.S., and Reichard, P.** (1995) Mass spectrometric determination of the radical scission site in the anaerobic ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **206**: 731-735.
- Kirdis, E., Jonsson, I.M., Kubica, M., Potempa, J., Josefsson, E., Masalha, M., Foster, S.J., and Tarkowski, A.** (2007) Ribonucleotide reductase class III, an essential enzyme for the anaerobic growth of *Staphylococcus aureus*, is a virulence determinant in septic arthritis. *Microb Pathog* **43**: 179-188.
- Knodler, L.A., and Finlay, B.B.** (2001) *Salmonella* and apoptosis: to live or let die? *Microbes Infect* **3**: 1321-1326.
- Knodler, L.A., and Steele-Mortimer, O.** (2003) Taking possession: biogenesis of the *Salmonella*-containing vacuole. *Traffic* **4**: 587-599.
- Kolberg, M., Strand, K.R., Graff, P., and Andersson, K.K.** (2004) Structure, function, and mechanism of ribonucleotide reductases. *Biochim Biophys Acta* **1699**: 1-34.
- Kowarz, L., Coynault, C., Robbe-Saule, V., and Norel, F.** (1994) The *Salmonella typhimurium katF* (*rpoS*) gene: cloning, nucleotide sequence, and regulation of *spvR* and *spvABCD* virulence plasmid genes. *J Bacteriol* **176**: 6852-6860.
- Kox, L.F., Wosten, M.M., and Groisman, E.A.** (2000) A small protein that mediates the activation of a two-component system by another two-component system. *Embo J* **19**: 1861-1872.
- Kunz, B.A., Kohalmi, S.E., Kunkel, T.A., Mathews, C.K., McIntosh, E.M., and Reidy, J.A.** (1994) International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Deoxyribonucleoside triphosphate levels: a critical factor in the maintenance of genetic stability. *Mutat Res* **318**: 1-64.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lange, S.J., and Que, L., Jr.** (1998) Oxygen activating nonheme iron enzymes. *Curr Opin Chem Biol* **2**: 159-172.
- Larsson, A., and Sjoberg, B.M.** (1986) Identification of the stable free radical tyrosine residue in ribonucleotide reductase. *Embo J* **5**: 2037-2040.

Bibliografia

- Larsson, K.M., Jordan, A., Eliasson, R., Reichard, P., Logan, D.T., and Nordlund, P. (2004) Structural mechanism of allosteric substrate specificity regulation in a ribonucleotide reductase. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 1142-1149.
- Lavrrar, J.L., and McIntosh, M.A. (2003) Architecture of a *fur* binding site: a comparative analysis. *J Bacteriol* **185**: 2194-2202.
- Lee, A.K., Detweiler, C.S., and Falkow, S. (2000) OmpR regulates the two-component system SsrA-ssrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J Bacteriol* **182**: 771-781.
- Lee, I.S., Lin, J., Hall, H.K., Bearson, B., and Foster, J.W. (1995) The stationary-phase sigma factor sigma S (RpoS) is required for a sustained acid tolerance response in virulent *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **17**: 155-167.
- Lepoivre, M., Fieschi, F., Coves, J., Thelander, L., and Fontecave, M. (1991) Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* **179**: 442-448.
- Licht, S., Gerfen, G.J., and Stubbe, J. (1996) Thiyl radicals in ribonucleotide reductases. *Science* **271**: 477-481.
- Lin, Z.P., Belcourt, M.F., Cory, J.G., and Sartorelli, A.C. (2004) Stable suppression of the R2 subunit of ribonucleotide reductase by R2-targeted short interference RNA sensitizes p53(-/-) HCT-116 colon cancer cells to DNA-damaging agents and ribonucleotide reductase inhibitors. *J Biol Chem* **279**: 27030-27038.
- Logan, D.T., Andersson, J., Sjoberg, B.M., and Nordlund, P. (1999) A glycy radical site in the crystal structure of a class III ribonucleotide reductase. *Science* **283**: 1499-1504.
- Lucas, R.L., and Lee, C.A. (2001) Roles of *hilC* and *hilD* in regulation of *hilA* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **183**: 2733-2745.
- Lucchini, S., Rowley, G., Goldberg, M.D., Hurd, D., Harrison, M., and Hinton, J.C. (2006) H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria. *PLoS Pathog* **2**: e81.
- Ly, K.T., and Casanova, J.E. (2007) Mechanisms of *Salmonella* entry into host cells. *Cell Microbiol* **9**: 2103-2111.
- Lynch, A.S., and Lin, E.C. (1996) Transcriptional control mediated by the ArcA two-component response regulator protein of *Escherichia coli*: characterization of DNA binding at target promoters. *J Bacteriol* **178**: 6238-6249.
- Main-Hester, K.L., Colpitts, K.M., Thomas, G.A., Fang, F.C., and Libby, S.J. (2008) Coordinate regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1) and SPI4 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **76**: 1024-1035.
- Majdalani, N., and Gottesman, S. (2005) The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu Rev Microbiol* **59**: 379-405.
- Malo, D., Vogan, K., Vidal, S., Hu, J., Cellier, M., Schurr, E., Fuks, A., Bumstead, N., Morgan, K., and Gros, P. (1994) Haplotype mapping and sequence analysis of the mouse *Nramp* gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites. *Genomics* **23**: 51-61.
- Maloy, S.R. (1990) *Experimental Techniques in Bacterial Genetics*. Boston.
- Mangan, M.W., Lucchini, S., Danino, V., Croinin, T.O., Hinton, J.C., and Dorman, C.J. (2006) The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **59**: 1831-1847.

- Marcus, S.L., Brumell, J.H., Pfeifer, C.G., and Finlay, B.B.** (2000) *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect* **2**: 145-156.
- Marsh, E.N.** (1999) Coenzyme B12 (cobalamin)-dependent enzymes. *Essays Biochem* **34**: 139-154.
- Marsh, E.N.** (2000) Review Article Coenzyme-B(12)-Dependent Glutamate Mutase. *Bioorg Chem* **28**: 176-189.
- Marshall, D.G., Sheehan, B.J., and Dorman, C.J.** (1999) A role for the leucine-responsive regulatory protein and integration host factor in the regulation of the *Salmonella* plasmid virulence (*spv*) locus in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **34**: 134-145.
- Marshall, D.G., Bowe, F., Hale, C., Dougan, G., and Dorman, C.J.** (2000) DNA topology and adaptation of *Salmonella typhimurium* to an intracellular environment. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**: 565-574.
- Masse, E., and Gottesman, S.** (2002) A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 4620-4625.
- Masse, E., Vanderpool, C.K., and Gottesman, S.** (2005) Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**: 6962-6971.
- Masse, E., Salvail, H., Desnoyers, G., and Arguin, M.** (2007) Small RNAs controlling iron metabolism. *Curr Opin Microbiol* **10**: 140-145.
- Matthews, R.G.** (2001) Cobalamin-dependent methyltransferases. *Acc Chem Res* **34**: 681-689.
- McFarland, W.C., and Stocker, B.A.** (1987) Effect of different purine auxotrophic mutations on mouse-virulence of a Vi-positive strain of *Salmonella dublin* and of two strains of *Salmonella typhimurium*. *Microb Pathog* **3**: 129-141.
- McHugh, J.P., Rodriguez-Quinones, F., Abdul-Tehrani, H., Svistunenko, D.A., Poole, R.K., Cooper, C.E., and Andrews, S.C.** (2003) Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis. *J Biol Chem* **278**: 29478-29486.
- Miller, J.M.** (1972) *Experiments in Molecular Genetics*: Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Miller, R.A., and Britigan, B.E.** (1997) Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev* **10**: 1-18.
- Miller, S.I., Kukral, A.M., and Mekalanos, J.J.** (1989) A two-component regulatory system (*phoP* *phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 5054-5058.
- Miller, S.I., Pulkkinen, W.S., Selsted, M.E., and Mekalanos, J.J.** (1990) Characterization of defensin resistance phenotypes associated with mutations in the *phoP* virulence regulon of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* **58**: 3706-3710.
- Monack, D.M., Mueller, A., and Falkow, S.** (2004) Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat Rev Microbiol* **2**: 747-765.
- Monje-Casas, F., Jurado, J., Prieto-Alamo, M.J., Holmgren, A., and Pueyo, C.** (2001) Expression analysis of the *nrdHIEF* operon from *Escherichia coli*. Conditions that trigger the transcript level *in vivo*. *J Biol Chem* **276**: 18031-18037.
- Mousslim, C., Delgado, M., and Groisman, E.A.** (2004) Activation of the RcsC/YojN/RcsB phosphorelay system attenuates *Salmonella* virulence. *Mol Microbiol* **54**: 386-395.

Bibliografia

- Mowa, M.B., Warner, D.F., Kaplan, G., Kana, B.D., and Mizrahi, V.** (2008) Function and regulation of class I ribonucleotide reductase-encoding genes in mycobacteria. *J Bacteriol.*
- Mulliez, E., Ollagnier, S., Fontecave, M., Eliasson, R., and Reichard, P.** (1995) Formate is the hydrogen donor for the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 8759-8762.
- Munch, R., Hiller, K., Grote, A., Scheer, M., Klein, J., Schobert, M., and Jahn, D.** (2005) Virtual Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes. *Bioinformatics* **21**: 4187-4189.
- Nakano, K., Balint, E., Ashcroft, M., and Vousden, K.H.** (2000) A ribonucleotide reductase gene is a transcriptional target of p53 and p73. *Oncogene* **19**: 4283-4289.
- Navarre, W.W., Porwollik, S., Wang, Y., McClelland, M., Rosen, H., Libby, S.J., and Fang, F.C.** (2006) Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science* **313**: 236-238.
- Neidhardt, F.** (1999) *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. Washington DC: ASM Press.
- Neutra, M.R., Pringault, E., and Kraehenbuhl, J.P.** (1996) Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu Rev Immunol* **14**: 275-300.
- Nickerson, C.A., and Curtiss, R., 3rd** (1997) Role of sigma factor RpoS in initial stages of *Salmonella typhimurium* infection. *Infect Immun* **65**: 1814-1823.
- Nordlund, P., and Eklund, H.** (1995) Di-iron-carboxylate proteins. *Curr Opin Struct Biol* **5**: 758-766.
- Nordlund, P., and Reichard, P.** (2006) Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem* **75**: 681-706.
- O'Byrne, C.P., and Dorman, C.J.** (1994a) Transcription of the *Salmonella typhimurium* *spv* virulence locus is regulated negatively by the nucleoid-associated protein H-NS. *FEMS Microbiol Lett* **121**: 99-105.
- O'Byrne, C.P., and Dorman, C.J.** (1994b) The *spv* virulence operon of *Salmonella typhimurium* LT2 is regulated negatively by the cyclic AMP (cAMP)-cAMP receptor protein system. *J Bacteriol* **176**: 905-912.
- Ochman, H., Soncini, F.C., Solomon, F., and Groisman, E.A.** (1996) Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 7800-7804.
- Ohi, M.E., and Miller, S.I.** (2001) *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annu Rev Med* **52**: 259-274.
- Olekhovich, I.N., and Kadner, R.J.** (2002) DNA-binding activities of the HilC and HilD virulence regulatory proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **184**: 4148-4160.
- OMS** (2000) Typhoid Vaccines. In *Weekly epidemiological record* Geneva: World Health Organization, pp. 257-264.
- OMS** (2005) Drug-Resistant *Salmonella*. In *Fact Sheet n°139*: World Health Organization.
- Ortenberg, R., Gon, S., Porat, A., and Beckwith, J.** (2004) Interactions of glutaredoxins, ribonucleotide reductase, and components of the DNA replication system of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 7439-7444.

- Outten, F.W., Djaman, O., and Storz, G.** (2004) A *suf* operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **52**: 861-872.
- Panagou, D., Orr, M.D., Dunstone, J.R., and Blakley, R.L.** (1972) A monomeric, allosteric enzyme with a single polypeptide chain. Ribonucleotide reductase of *Lactobacillus leichmannii*. *Biochemistry* **11**: 2378-2388.
- Park, S., You, X., and Imlay, J.A.** (2005) Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx- mutants of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 9317-9322.
- Park, S.J., and Gunsalus, R.P.** (1995) Oxygen, iron, carbon, and superoxide control of the fumarase *fumA* and *fumC* genes of *Escherichia coli*: role of the *arcA*, *fnr*, and *soxR* gene products. *J Bacteriol* **177**: 6255-6262.
- Patel, J.C., and Galan, J.E.** (2005) Manipulation of the host actin cytoskeleton by *Salmonella*--all in the name of entry. *Curr Opin Microbiol* **8**: 10-15.
- Patel, J.C., and Galan, J.E.** (2006) Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. *J Cell Biol* **175**: 453-463.
- Perlstein, D.L., Ge, J., Ortigosa, A.D., Robblee, J.H., Zhang, Z., Huang, M., and Stubbe, J.** (2005) The active form of the *Saccharomyces cerevisiae* ribonucleotide reductase small subunit is a heterodimer in vitro and in vivo. *Biochemistry* **44**: 15366-15377.
- Poole, A.M., Logan, D.T., and Sjöberg, B.M.** (2002) The evolution of the ribonucleotide reductases: much ado about oxygen. *J Mol Evol* **55**: 180-196.
- Prieto-Alamo, M.J., Jurado, J., Gallardo-Madueno, R., Monje-Casas, F., Holmgren, A., and Pueyo, C.** (2000) Transcriptional regulation of glutaredoxin and thioredoxin pathways and related enzymes in response to oxidative stress. *J Biol Chem* **275**: 13398-13405.
- Reichard, P.** (1993) From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases? *Science* **260**: 1773-1777.
- Reichard, P.** (1997) The evolution of ribonucleotide reduction. *Trends Biochem Sci* **22**: 81-85.
- Reichard, P.** (2002) Ribonucleotide reductases: the evolution of allosteric regulation. *Arch Biochem Biophys* **397**: 149-155.
- Rhen, M., Riikonen, P., and Taira, S.** (1993) Transcriptional regulation of *Salmonella enterica* virulence plasmid genes in cultured macrophages. *Mol Microbiol* **10**: 45-56.
- Riesenberg-Wilmes, M.R., Bearson, B., Foster, J.W., and Curtis, R., 3rd** (1996) Role of the acid tolerance response in virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* **64**: 1085-1092.
- Roca, I.** (2007) Towards an Understanding of Ribonucleotide Reduction in Bacteria: a comprehensive study in *Streptococcus pyogenes* and *Escherichia coli*. In *Departament de Genètica i Microbiologia*. Vol. PhD Bellaterra (Cerdanyola del Vallès): Universitat Autònoma de Barcelona.
- Roca, I., Ballana, E., Panosa, A., Torrents, E., and Gibert, I.** (2008a) Fumarate and nitrate reduction (FNR) dependent activation of the *Escherichia coli* anaerobic ribonucleotide reductase *nrdDG* promoter. *Int Microbiol* **11**: 49-56.
- Roca, I., Torrents, E., Sahlin, M., Gibert, I., and Sjöberg, B.M.** (2008b) NrdI essentiality for class Ib ribonucleotide reduction in *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* **190**: 4849-4858.

Bibliografia

- Rodionov, D.A., and Gelfand, M.S.** (2005) Identification of a bacterial regulatory system for ribonucleotide reductases by phylogenetic profiling. *Trends Genet* **21**: 385-389.
- Rofougaran, R., Crona, M., Vodnala, M., Sjoberg, B.M., and Hofer, A.** (2008) Oligomerization Status Directs Overall Activity Regulation of the *Escherichia coli* Class Ia Ribonucleotide Reductase. *J Biol Chem* **283**: 35310-35318.
- Roland, K.L., Martin, L.E., Esther, C.R., and Spitznagel, J.K.** (1993) Spontaneous *pmrA* mutants of *Salmonella typhimurium* LT2 define a new two-component regulatory system with a possible role in virulence. *J Bacteriol* **175**: 4154-4164.
- Ryan, V.T., Grimwade, J.E., Camara, J.E., Crooke, E., and Leonard, A.C.** (2004) *Escherichia coli* prereplication complex assembly is regulated by dynamic interplay among Fis, IHF and DnaA. *Mol Microbiol* **51**: 1347-1359.
- Rychlik, I., and Barrow, P.A.** (2005) *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 1021-1040.
- Ryle, M.J., and Hausinger, R.P.** (2002) Non-heme iron oxygenases. *Curr Opin Chem Biol* **6**: 193-201.
- Sahlin, M., Petersson, L., Graslund, A., Ehrenberg, A., Sjoberg, B.M., and Thelander, L.** (1987) Magnetic interaction between the tyrosyl free radical and the antiferromagnetically coupled iron center in ribonucleotide reductase. *Biochemistry* **26**: 5541-5548.
- Sambrook, J.R., D.** (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Schechter, L.M., and Lee, C.A.** (2001) AraC/XylS family members, HilC and HilD, directly bind and derepress the *Salmonella typhimurium* *hilA* promoter. *Mol Microbiol* **40**: 1289-1299.
- Schmidt, H., and Hensel, M.** (2004) Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **17**: 14-56.
- Scotti, C., Valbuzzi, A., Perego, M., Galizzi, A., and Albertini, A.M.** (1996) The *Bacillus subtilis* genes for ribonucleotide reductase are similar to the genes for the second class I NrdE/NrdF enzymes of *Enterobacteriaceae*. *Microbiology* **142 (Pt 11)**: 2995-3004.
- Sekimizu, K., Bramhill, D., and Kornberg, A.** (1987) ATP activates dnaA protein in initiating replication of plasmids bearing the origin of the *E. coli* chromosome. *Cell* **50**: 259-265.
- Shea, J.E., Hensel, M., Gleeson, C., and Holden, D.W.** (1996) Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 2593-2597.
- Shiloh, M.U., MacMicking, J.D., Nicholson, S., Brause, J.E., Potter, S., Marino, M., Fang, F., Dinauer, M., and Nathan, C.** (1999) Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Immunity* **10**: 29-38.
- Slauch, J., Taylor, R., and Maloy, S.** (1997) Survival in a cruel world: how *Vibrio cholerae* and *Salmonella* respond to an unwilling host. *Genes Dev* **11**: 1761-1774.
- Smalley, D., Rocha, E.R., and Smith, C.J.** (2002) Aerobic-type ribonucleotide reductase in the anaerobe *Bacteroides fragilis*. *J Bacteriol* **184**: 895-903.

- Steele-Mortimer, O., Meresse, S., Gorvel, J.P., Toh, B.H., and Finlay, B.B.** (1999) Biogenesis of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway. *Cell Microbiol* **1**: 33-49.
- Steele-Mortimer, O.** (2008) The *Salmonella*-containing vacuole: moving with the times. *Curr Opin Microbiol* **11**: 38-45.
- Stender, S., Friebel, A., Linder, S., Rohde, M., Miold, S., and Hardt, W.D.** (2000) Identification of SopE2 from *Salmonella typhimurium*, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell. *Mol Microbiol* **36**: 1206-1221.
- Stubbe, J., and van Der Donk, W.A.** (1998) Protein Radicals in Enzyme Catalysis. *Chem Rev* **98**: 705-762.
- Stubbe, J., Ge, J., and Yee, C.S.** (2001) The evolution of ribonucleotide reduction revisited. *Trends Biochem Sci* **26**: 93-99.
- Stubbe, J., Nocera, D.G., Yee, C.S., and Chang, M.C.** (2003) Radical initiation in the class I ribonucleotide reductase: long-range proton-coupled electron transfer? *Chem Rev* **103**: 2167-2201.
- Sun, L., and Fuchs, J.A.** (1992) *Escherichia coli* ribonucleotide reductase expression is cell cycle regulated. *Mol Biol Cell* **3**: 1095-1105.
- Sun, L., and Fuchs, J.A.** (1994) Regulation of the *Escherichia coli* *nrd* operon: role of DNA supercoiling. *J Bacteriol* **176**: 4617-4626.
- Sun, L., Jacobson, B.A., Dien, B.S., Srienc, F., and Fuchs, J.A.** (1994) Cell cycle regulation of the *Escherichia coli* *nrd* operon: requirement for a *cis*-acting upstream AT-rich sequence. *J Bacteriol* **176**: 2415-2426.
- Takaya, A., Tomoyasu, T., Tokumitsu, A., Morioka, M., and Yamamoto, T.** (2002) The ATP-dependent *lon* protease of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium regulates invasion and expression of genes carried on *Salmonella* pathogenicity island 1. *J Bacteriol* **184**: 224-232.
- Tanaka, H., Arakawa, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, K., Fukuda, S., Matsui, K., Takei, Y., and Nakamura, Y.** (2000) A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* **404**: 42-49.
- Tao, H., Bausch, C., Richmond, C., Blattner, F.R., and Conway, T.** (1999) Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. *J Bacteriol* **181**: 6425-6440.
- Tao, X., Schiering, N., Zeng, H.Y., Ringe, D., and Murphy, J.R.** (1994) Iron, DtxR, and the regulation of diphtheria toxin expression. *Mol Microbiol* **14**: 191-197.
- Tartof, K.D., and Hobbs, C. A.** (1987) Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Res. Lab. Focus* **9**: 12.
- Teplitski, M., Goodier, R.I., and Ahmer, B.M.** (2003) Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in *Salmonella*. *J Bacteriol* **185**: 7257-7265.
- Teplitski, M., Al-Agely, A., and Ahmer, B.M.** (2006) Contribution of the SirA regulon to biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology* **152**: 3411-3424.
- Tindall, B.J., Grimont, P.A., Garrity, G.M., and Euzéby, J.P.** (2005) Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 521-524.

Bibliografia

- Torrents, E., Eliasson, R., Wolpher, H., Graslund, A., and Reichard, P.** (2001) The anaerobic ribonucleotide reductase from *Lactococcus lactis*. Interactions between the two proteins NrdD and NrdG. *J Biol Chem* **276**: 33488-33494.
- Torrents, E., Aloy, P., Gibert, I., and Rodriguez-Trelles, F.** (2002) Ribonucleotide reductases: divergent evolution of an ancient enzyme. *J Mol Evol* **55**: 138-152.
- Torrents, E., Roca, I., and Gibert, I.** (2003) *Corynebacterium ammoniagenes* class Ib ribonucleotide reductase: transcriptional regulation of an atypical genomic organization in the *nrd* cluster. *Microbiology* **149**: 1011-1020.
- Torrents, E., Poplawski, A., and Sjöberg, B.M.** (2005) Two proteins mediate class II ribonucleotide reductase activity in *Pseudomonas aeruginosa*: expression and transcriptional analysis of the aerobic enzymes. *J Biol Chem* **280**: 16571-16578.
- Torrents, E., Trevisiol, C., Rotte, C., Hellman, U., Martin, W., and Reichard, P.** (2006) *Euglena gracilis* ribonucleotide reductase: the eukaryote class II enzyme and the possible antiquity of eukaryote B12 dependence. *J Biol Chem* **281**: 5604-5611.
- Torrents, E., Grinberg, I., Gorovitz-Harris, B., Lundstrom, H., Borovok, I., Aharonowitz, Y., Sjöberg, B.M., and Cohen, G.** (2007) NrdR controls differential expression of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase genes. *J Bacteriol* **189**: 5012-5021.
- Touati, D., Jacques, M., Tardat, B., Bouchard, L., and Despied, S.** (1995) Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta *fur* mutants of *Escherichia coli*: protective role of superoxide dismutase. *J Bacteriol* **177**: 2305-2314.
- Touati, D.** (2000) Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem Biophys* **373**: 1-6.
- Tuggle, C.K., and Fuchs, J.A.** (1986) Regulation of the operon encoding ribonucleotide reductase in *Escherichia coli*: evidence for both positive and negative control. *Embo J* **5**: 1077-1085.
- Tuggle, C.K., and Fuchs, J.A.** (1990) Regulation of the operon encoding ribonucleotide reductase: role of the negative sites in *nrd* repression. *J Bacteriol* **172**: 1711-1718.
- Uchiya, K., Barbieri, M.A., Funato, K., Shah, A.H., Stahl, P.D., and Groisman, E.A.** (1999) A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. *Embo J* **18**: 3924-3933.
- Uppsten, M., Farnegardh, M., Jordan, A., Eliasson, R., Eklund, H., and Uhlin, U.** (2003) Structure of the large subunit of class Ib ribonucleotide reductase from *Salmonella typhimurium* and its complexes with allosteric effectors. *J Mol Biol* **330**: 87-97.
- Varghese, S., Wu, A., Park, S., Imlay, K.R., and Imlay, J.A.** (2007) Submicromolar hydrogen peroxide disrupts the ability of Fur protein to control free-iron levels in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **64**: 822-830.
- Vassinova, N., and Kozyrev, D.** (2000) A method for direct cloning of *fur*-regulated genes: identification of seven new *fur*-regulated loci in *Escherichia coli*. *Microbiology* **146 Pt 12**: 3171-3182.
- Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Mastroeni, P., Ischiropoulos, H., and Fang, F.C.** (2000a) Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. *J Exp Med* **192**: 227-236.

- Vazquez-Torres, A., Xu, Y., Jones-Carson, J., Holden, D.W., Lucia, S.M., Dinauer, M.C., Mastroeni, P., and Fang, F.C. (2000b) *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* **287**: 1655-1658.
- Vazquez-Torres, A., and Fang, F.C. (2001) Oxygen-dependent anti-*Salmonella* activity of macrophages. *Trends Microbiol* **9**: 29-33.
- Vernikos, G.S., and Parkhill, J. (2006) Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the *Salmonella* pathogenicity islands. *Bioinformatics* **22**: 2196-2203.
- Wallar, B.J., and Lipscomb, J.D. (1996) Dioxygen Activation by Enzymes Containing Binuclear Non-Heme Iron Clusters. *Chem Rev* **96**: 2625-2658.
- Waterman, S.R., and Holden, D.W. (2003) Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell Microbiol* **5**: 501-511.
- Weinreich, M.D., and Reznikoff, W.S. (1992) Fis plays a role in Tn5 and IS50 transposition. *J Bacteriol* **174**: 4530-4537.
- Wick, M.J., Harding, C.V., Twesten, N.J., Normark, S.J., and Pfeifer, J.D. (1995) The *phoP* locus influences processing and presentation of *Salmonella typhimurium* antigens by activated macrophages. *Mol Microbiol* **16**: 465-476.
- Williams, S.M., Wing, H.J., and Busby, S.J. (1998) Repression of transcription initiation by *Escherichia coli* FNR protein: repression by FNR can be simple. *FEMS Microbiol Lett* **163**: 203-208.
- Wilson, R.L., Libby, S.J., Freet, A.M., Boddicker, J.D., Fahlen, T.F., and Jones, B.D. (2001) Fis, a DNA nucleoid-associated protein, is involved in *Salmonella typhimurium* SPI-1 invasion gene expression. *Mol Microbiol* **39**: 79-88.
- Wood, M.W., Jones, M.A., Watson, P.R., Hedges, S., Wallis, T.S., and Galyov, E.E. (1998) Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. *Mol Microbiol* **29**: 883-891.
- Wösten, M.M., Kox, L.F., Chamnongpol, S., Soncini, F.C., and Groisman, E.A. (2000) A signal transduction system that responds to extracellular iron. *Cell* **103**: 113-125.
- Wyllie, S., Seu, P., and Goss, J.A. (2002) The natural resistance-associated macrophage protein 1 Slc11a1 (formerly Nramp1) and iron metabolism in macrophages. *Microbes Infect* **4**: 351-359.
- Yang, F., Lu, G., and Rubin, H. (1994) Isolation of ribonucleotide reductase from *Mycobacterium tuberculosis* and cloning, expression, and purification of the large subunit. *J Bacteriol* **176**: 6738-6743.
- Ygberg, S.E., Clements, M.O., Rytkonen, A., Thompson, A., Holden, D.W., Hinton, J.C., and Rhen, M. (2006) Polynucleotide phosphorylase negatively controls *spv* virulence gene expression in *Salmonella enterica*. *Infect Immun* **74**: 1243-1254.
- Young, P., Ohman, M., and Sjöberg, B.M. (1994) Bacteriophage T4 gene 55.9 encodes an activity required for anaerobic ribonucleotide reduction. *J Biol Chem* **269**: 27815-27818.
- Zhao, G., Ceci, P., Ilari, A., Giangiacomo, L., Laue, T.M., Chiancone, E., and Chasteen, N.D. (2002) Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**: 27689-27696.

Bibliografia

- Zhao, X., Chabes, A., Domkin, V., Thelander, L., and Rothstein, R.** (2001) The ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 is a new target of the Mec1/Rad53 kinase cascade during growth and in response to DNA damage. *Embo J* **20**: 3544-3553.
- Zheng, M., Doan, B., Schneider, T.D., and Storz, G.** (1999) OxyR and SoxRS regulation of *fur*. *J Bacteriol* **181**: 4639-4643.
- Zheng, M., Wang, X., Templeton, L.J., Smulski, D.R., LaRossa, R.A., and Storz, G.** (2001) DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **183**: 4562-4570.
- Zhou, D., Mooseker, M.S., and Galan, J.E.** (1999) Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science* **283**: 2092-2095.

9. Agraïments

Bufff!! No sé per on començar... la llista de persones a qui haig d'agraïr alguna cosa durant tot aquest temps que he estat treballant per aquesta tesi és molt i molt llarga, intentaré recordar-me de tothom, però per si em descuido algú, demano disculpes per avançar.

La tesi és un llarg camí ple de dificultats, mals moments, nervis, pressions, poques vacances i moltes però que moltes hores de feina, però també m'ha ensenyat moltes coses i he conegut a moltes persones i he après a valorar els bons moments i la gent que tinc al voltant. Per això m'agradaria agraïr d'entrada aquells amb qui he compartit tantes hores de "poiata"....

Primer de tot a l'Ignasi, moltes i moltes i moltes gràcies per tot, per ensenyar-me tot el que sé, per ajudar-me en tot moment, per animar-me en els moments difícils, per llegir-te i corregir aquesta tesi, ... en resum, mai t'agrairé prou tot el que has fet per mi, sense tu aquesta tesi potser s'hagués quedat a mig fer. Gràcies per fer-me anar endavant. Ah, i visca el caos!! Gràcies per ensenyar-me a ser ordenada dins el meu caos ;p

Aquests anys també els he compartit amb la Núria, no només al laboratori, sinó també a casa durant una temporada. Gràcies Núria per ser al meu costat, de tu també he après moltes coses: però sobretot has estat un exemple de perseverància i m'has fet veure que si un té clar el que vol, ho pot aconseguir. Tu n'ets un exemple vivent. Et trobo a faltar, sort que internet ens permet seguir en contacte!!

Després, al laboratori han passat vaires persones que també cal anomenar, gràcies a l'Anna, per ajudar-me amb el mutant *fur* i les betes (jejeje); gràcies a la Laura per ser tant xerraire i donar vida al grup, i gràcies a la "Jelen", la benicarlanda més trempada de la terra, com m'agrada fer-te la punyeta!!! I recentment, el Pol i la Paula, que hem coincidit poquet perquè m'he passat més hores a la biblioteca que al labo, però que són molt divertits i simpàtics, vaja, les noves generacions. I finalment, la Celeste, que va arribar de molt lluny i que quan finalment ens hem començat a entendre, doncs me n'haig d'anar... I ara hi ha inquilins nous... el Mario i la Raquel! Gràcies per prendre el relleu, i gràcies per animar-me en aquesta recta final!

No, no me n'oblido! Gràcies a l'Isidre per haver-me donat l'oportunitat de fer la tesi, he après moltes coses i mai ho agraïré prou. Gràcies per animar-me en els moments més delicats i per ajudar-me en tot allò que he demanat. Gràcies per tot de veritat. Ah!! i no pot ser que encara no ens hagi portat amb la teva barca!!! No hi ha dret!!!

Després hi ha tota la gent de l'IBB que fan que vegis que no ets l'únic dins d'aquest món de la recerca, i que comparteixen els mateixos problemes que tu. Amb ells hem passat bons moments a les

Agraïments

fondues, al volei, als asados, a les esquiades, al teatre... Gent que encara està per allà, gent que està a punt de marxar i gent que ja ha marxat. Gràcies a tots ells!

Moltes gràcies també, als meus amics (la Tània, amics de la uni, d'HP, de tota la vida,...), al meu germà (per ser tan empenyador) i la Nur, al Pep (per compartir amb mi una part important d'aquesta tesi) i a qui em pugui deixar. Tots ells han contribuït de manera directa o indirecta en aquesta tesi.

I finalment, gràcies a les persones més importants de la meua vida, els meus pares i l'Edu.

Gràcies als meus pares per fer-me costat en tot moment i entendre que hi ha moments que és millor no preguntar. Sense els vostre suport incondicional ni l'ensenyament que he rebut gràcies a vosaltres, no hagués pogut fer res del que he fet fins ara. Sou els millors pares del món!

Gràcies Edu per ser el meu refugi, sense tu no ho hagués aconseguit. Gràcies pels caps de setmana de desconexió, els bons moments i el dia a dia al teu costat. T'estimo!

Tanco finalment una etapa prou llarga, visca! No sabeu el pes que em trec de sobre! ;)

Anaïs

(la Nissu o el Pollet del laboratori)



