



**Universitat Autònoma de Barcelona**

Departament de Genètica i Microbiologia

Facultat de Biociències

**Implicación del sistema SOS y de la proteína  
RecA en el proceso infectivo de  
*Salmonella enterica* sv. Typhimurium**

Laura Medina Ruiz

Bellaterra, 2012





**Universitat Autònoma de Barcelona**

Departament de Genètica i Microbiologia

Facultat de Biociències

**Implicación del sistema SOS y de la proteína  
RecA en el proceso infectivo de  
*Salmonella enterica* sv. Typhimurium**

Tesis Doctoral presentada por Laura Medina Ruiz  
para optar al Grado de Doctor en Microbiología  
por la *Universitat Autònoma de Barcelona*.

Con el visto bueno de los directores de la Tesis Doctoral,

Dr. Jordi Barbé García

Dra. Susana Campoy Sánchez



*Despertar es un lapsus de los sueños*

**Carlos Chaouen**



El presente trabajo fue financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, Gobierno de España) enmarcado dentro del proyecto con referencia BFU2008-01078. Laura Medina Ruiz ha sido beneficiaria de una beca predoctoral del Programa de Formación de Profesorado Universitario (AP2007-02857) del MICINN.



# Resumen

---



El sistema de reparación de emergencia o sistema SOS es una respuesta génica global muy extendida dentro del dominio Bacteria. Esta respuesta se induce en presencia de lesiones en el DNA y permite la reparación del material genético y la supervivencia celular. El sistema SOS está constituido por más de 40 genes, entre los cuales se encuentran los genes que codifican las proteínas reguladoras del sistema, LexA (represor transcripcional) y RecA (proteína activadora). En condiciones no lesivas para el DNA, LexA se encuentra unido al promotor de los genes del sistema SOS inhibiendo su expresión. Sin embargo, la presencia de lesiones en el DNA da lugar a la aparición de DNA de cadena sencilla (ssDNA), el cual es reconocido por la proteína RecA. La interacción entre RecA y el ssDNA genera un cambio conformacional en esta proteína, de tal modo que adquiere su conformación activada, RecA\*. En este estado, RecA\* promueve la autohidrólisis de LexA y, por lo tanto, la inducción del sistema SOS, permitiendo la expresión de los genes del regulón. Muchos de estos genes participan en procesos de reparación, recombinación y control de la división celular, asociados a la superación de las lesiones y la supervivencia de la célula. Sin embargo, otros muchos procesos celulares están asociados a la activación de la respuesta SOS, entre los cuales se encuentran la inducción del ciclo lítico de profagos residentes, la expresión de toxinas, la expresión y diseminación de resistencias a antibióticos y la transferencia horizontal de islas de patogenicidad y elementos conjugativos. Todo ello sugiere la implicación del sistema SOS en el desarrollo del proceso infeccioso. Asimismo, mutantes defectivos en el gen *recA* de diversos patógenos bacterianos son atenuados, demostrando la importancia de la proteína activadora del sistema en la virulencia. Sin embargo, además de actuar como activadora del sistema SOS, RecA es la principal responsable de los procesos de recombinación homóloga. Esta doble función de la proteína RecA ha impedido establecer si es la incapacidad para inducir la respuesta SOS o la incapacidad para realizar recombinación homóloga la responsable de la atenuación de los mutantes defectivos en *recA*. Por este motivo, el objetivo principal de este trabajo ha sido determinar el papel del sistema SOS y de la proteína RecA en el proceso infeccioso de *Salmonella enterica* sv. Typhimurium (*S. Typhimurium*), uno de los principales agentes causales de toxiinfección alimentaria a nivel mundial.

Con este fin, se determinó la capacidad infectiva en el modelo murino de distintas cepas mutantes de *S. Typhimurium*: i) un mutante *lexA3*(Ind<sup>-</sup>) incapaz de inducir la respuesta SOS, ii) un mutante *recA06869* con un nivel de expresión de *recA* equivalente al de la cepa salvaje con el sistema SOS inducido, y iii) un doble mutante *recA06869 lexA3*(Ind<sup>-</sup>) incapaz de inducir la respuesta SOS pero con un nivel de expresión de *recA* equivalente al de la cepa salvaje con el sistema SOS inducido. Los resultados obtenidos demuestran que, cuando la inoculación se realiza por vía intraperitoneal, ninguno de los mutantes sufre defectos en su capacidad infectiva. Sin embargo, cuando la inoculación se realiza por vía oral, los mutantes que sobreexpresan el gen *recA* presentan una capacidad infectiva significativamente inferior a la de la cepa salvaje. Estos datos demuestran que, durante la etapa gastrointestinal de la infección por *S. Typhimurium*, es necesario el mantenimiento de unos niveles basales de expresión de

*recA*, ya que la sobreexpresión de dicho gen y, por lo tanto, el incremento en la concentración intracelular de proteína RecA alteran la capacidad infectiva de este microorganismo.

La sobreexpresión de *recA* debida a la presencia de la construcción *recAo6869* en el cromosoma de *S. Typhimurium* no comporta alteraciones en la inducción del resto de genes del sistema SOS ni deficiencias en el crecimiento. Tampoco origina un incremento en la sensibilidad frente a las lesiones causadas por las sales biliares, los entornos ácidos o la luz ultravioleta. Sin embargo, en concordancia con los resultados obtenidos en los ensayos de virulencia por vía oral, los mutantes portadores de la mutación *recAo6869* presentan un descenso en su capacidad para invadir células epiteliales y una menor capacidad para traspasar el epitelio intestinal. Asimismo, estos mutantes son incapaces de desplazarse mediante movimiento en enjambre (o *swarming*), un movimiento poblacional sobre superficies semisólidas asociado a la capacidad de numerosos patógenos, entre ellos *S. enterica*, para invadir tejido epitelial. Todos estos datos justifican el defecto en la capacidad infectiva observado en los mutantes *recAo6869*.

Los resultados obtenidos en este trabajo a partir del estudio de la relación existente entre la sobreexpresión de *recA* y el movimiento en enjambre demuestran también que la inducción de la respuesta SOS inhibe el *swarming* en *S. Typhimurium* a través de la expresión masiva de *recA*. Asimismo, se ha determinado que, en este patógeno, la proteína RecA interacciona con la proteína CheW, uno de los componentes del sistema de quimiotaxis asociado a la regulación del movimiento en enjambre. Del mismo modo, los datos obtenidos también demuestran que la capacidad de los mutantes *recAo6869* para desplazarse mediante *swarming* sólo se recupera mediante la sobreexpresión de *cheW*, lo que indica la necesidad de un equilibrio entre las concentraciones intracelulares de las proteínas RecA y CheW, esencial para el movimiento en enjambre en *S. Typhimurium*.

En consecuencia, los resultados expuestos en este trabajo incrementan la lista de procesos celulares conocidos que se asocian al sistema SOS y confieren una nueva función a este sistema y a la proteína RecA como reguladores del movimiento poblacional en *S. Typhimurium*. De este modo, la inducción de la respuesta SOS en entornos lesivos para el DNA inhibe el movimiento en enjambre de este patógeno e impide el acercamiento de las células a entornos con concentraciones mayores de compuestos lesivos. Se demuestra así que el sistema SOS no participa únicamente en procesos de reparación de las lesiones en el DNA, sino que también previene la producción de dichas lesiones mediante el control del desplazamiento celular poblacional.

**Resum**

---



El sistema de reparació d'emergència o sistema SOS és una resposta gènica global àmpliament distribuïda dins del domini Bacteria. Aquesta resposta s'indueix en presència de lesions en el DNA i permet la reparació del material genètic i la supervivència cel·lular. El sistema SOS està constituït per més de 40 gens, dins dels quals es troben els gens que codifiquen les proteïnes reguladores del sistema, LexA (repressor transcripcional) i RecA (proteïna activadora). En condicions no lesives per al DNA, LexA es troba unit al promotor dels gens del sistema SOS, inhibint-ne l'expressió. La presència de lesions en el DNA provoca l'aparició de DNA de cadena senzilla (ssDNA), el qual és reconegut per la proteïna RecA. La interacció entre RecA i el ssDNA genera un canvi conformacional en aquesta proteïna, de tal manera que adopta la seva conformació activada, RecA\*. En aquesta conformació, RecA\* promou l'autohidròlisi de LexA i, per tant, la inducció del sistema SOS, donant lloc a l'expressió dels gens del reguló. Molts d'aquests gens participen en processos de reparació, recombinació i control de la divisió cel·lular, associats a la superació de les lesions i a la supervivència de la cèl·lula. No obstant, molts altres processos cel·lulars estan associats a l'activació de la resposta SOS, dins dels quals es troben la inducció del cicle lític de profags residents, l'expressió de toxines, l'expressió i disseminació de resistències a antibiòtics i la transferència horitzontal d'illes de patogenicitat i elements conjugatius. Tot això suggereix la implicació del sistema SOS en el desenvolupament del procés infectiu. Així mateix, mutants defectius en el gen *recA* de diversos patògens bacterians són atenuats, demostrant la importància de la proteïna activadora del sistema en la virulència. Tot i així, a banda d'actuar com a activadora del sistema SOS, RecA és la principal responsable dels processos de recombinació homòloga. Aquesta doble funció de la proteïna RecA ha impedit establir si és la incapacitat per induir la resposta SOS o la incapacitat per realitzar recombinació homòloga la responsable de l'atenuació dels mutants defectius en *recA*. Per aquest motiu, l'objectiu principal d'aquest treball ha estat determinar el paper del sistema SOS i de la proteïna RecA en el procés infectiu de *Salmonella enterica* sv. Typhimurium (*S. Typhimurium*), un dels principals agents causals de toxiinfecció alimentària a nivell mundial.

Amb aquesta finalitat, es va determinar la capacitat infectiva en el model murí de diferents soques mutants de *S. Typhimurium*: i) un mutant *lexA3*(Ind<sup>-</sup>) incapaç d'induir la resposta SOS, ii) un mutant *recA<sub>o6869</sub>* amb un nivell d'expressió de *recA* equivalent al de la soca salvatge amb el sistema SOS induït, i iii) un doble mutant *recA<sub>o6869</sub> lexA3*(Ind<sup>-</sup>) incapaç d'induir la resposta SOS però amb un nivell d'expressió de *recA* equivalent al de la soca salvatge amb el sistema SOS induït. Els resultats obtinguts demostren que, quan la inoculació es realitza per via intraperitoneal, cap dels mutants presenta defectes en la seva capacitat infectiva. No obstant, quan la inoculació es realitza per via oral, els mutants que sobreexpressen el gen *recA* presenten una capacitat infectiva significativament inferior a la de la soca salvatge. Aquestes dades demostren que, durant l'etapa gastrointestinal de la infecció per *S. Typhimurium*, és necessari el manteniment d'uns nivells basals d'expressió de *recA*, donat que la sobreexpressió d'aquest gen i, per tant, l'increment en la concentració intracel·lular de la proteïna RecA alteren la capacitat infectiva d'aquest microorganisme.

La sobreexpressió de *recA* deguda a la presència de la construcció *recAo6869* en el cromosoma de *S. Typhimurium* no comporta alteracions en la inducció de la resta de gens del sistema SOS ni deficiències en el creixement. Tampoc origina un increment en la sensibilitat davant les lesions causades per les sals biliars, els entorns àcids o la llum ultraviolada. No obstant, en concordança amb els resultats obtinguts en els assajos de virulència per via oral, els mutants portadors de la construcció *recAo6869* presenten un descens en la seva capacitat per envair cèl·lules epitelials i una menor capacitat per traspasar l'epiteli intestinal. Així mateix, aquests mutants no es poden desplaçar mitjançant el moviment en eixam (o *swarming*), un moviment poblacional sobre superfícies semisòlides associat a la capacitat de nombrosos patògens, entre ells *S. enterica*, per envair el teixit epitelial. Totes aquestes dades justifiquen el defecte en la capacitat infectiva observat en els mutants *recAo6869*.

Els resultats obtinguts en aquest treball a partir de l'estudi de la relació existent entre la sobreexpressió de *recA* i el moviment en eixam demostren també que la inducció de la resposta SOS inhibeix el *swarming* en *S. Typhimurium* a través de l'expressió massiva de *recA*. Així mateix, s'ha determinat que, en aquest patògen, la proteïna RecA interacciona amb la proteïna CheW, un dels components del sistema de quimiotaxi associat a la regulació del moviment en eixam. De la mateixa manera, les dades obtingudes també demostren que la capacitat dels mutants *recAo6869* per desplaçar-se mitjançant *swarming* només es recupera mitjançant la sobreexpressió de *cheW*, la qual cosa indica la necessitat d'un equilibri entre les concentracions intracel·lulars de les proteïnes RecA i CheW, que és essencial per al moviment en eixam de *S. Typhimurium*.

En conseqüència, els resultats exposats en aquest treball incrementen la llista de processos cel·lulars coneguts que s'associen al sistema SOS i atorguen una nova funció a aquest sistema i a la proteïna RecA com a reguladors del moviment poblacional en *S. Typhimurium*. D'aquesta manera, la inducció de la resposta SOS en entorns lesionats per al DNA inhibeix el moviment en eixam d'aquest patògen i impedeix l'apropament de les cèl·lules a entorns amb concentracions superiors de compostos lesionats. Es demostra així que el sistema SOS no participa únicament en processos de reparació de les lesions en el DNA, sinó que també prevé la producció d'aquestes lesions mitjançant el control del desplaçament cel·lular poblacional.

# Summary

---



The SOS response is a wide-spread regulatory network in the Bacteria domain. Induction of this response occurs in the presence of DNA lesions and it is targeted to address DNA damage and to allow cell survival. The SOS regulatory network involves more than 40 genes, including those encoding for the system regulatory proteins, LexA (the transcriptional repressor) and RecA (the activator protein). In an uninduced cell, LexA represses the expression of each SOS gene by binding to its promoter. When DNA lesions occur, they induce the formation of single stranded DNA (ssDNA). The RecA protein binds to the ssDNA and, thereafter, acquires its activated state, RecA\*. In this state, RecA\* promotes the autocatalytic cleavage of LexA, thereby inducing the SOS response. Many SOS genes are involved in DNA repair processes, homologous recombination and inhibition of cell division, thus addressing DNA damage and allowing cell survival. But the SOS response is also involved in other cellular processes, such as the induction of the lytic cycle of resident prophages, the expression of toxins, the expression and horizontal dissemination of antibiotic resistances, and the horizontal dissemination of pathogenicity islands and integrating conjugative elements. These data suggest that the SOS system plays a key role during the infection process. Moreover, *recA* mutants of several pathogenic bacteria are avirulent. This demonstrates that the SOS activator is involved in virulence. However, besides acting as the activator of the SOS system, RecA is primarily responsible for the homologous recombination processes. Due to the dual role of the RecA protein, the decrease in virulence of the *recA* mutants may be attributed either to the reduction of the recombination frequency, or to the inhibition of the SOS system induction, or to both processes. The aim of this work is to elucidate the role developed by the SOS system and by the RecA protein during the infection process of *Salmonella enterica* sv. Typhimurium (*S. Typhimurium*), one of the most important pathogens causing foodborne outbreaks in the world.

For this purpose, the virulence of several *S. Typhimurium* mutants was determined in the murine model: i) a *lexA3*(Ind<sup>-</sup>) mutant unable to induce the SOS response, ii) a *recA06869* mutant with an expression level of *recA* equivalent to that observed in the wild type strain when the SOS response is induced, and iii) a *recA06869 lexA3*(Ind<sup>-</sup>) mutant unable to induce the SOS response but with an expression level of *recA* equivalent to that observed in the wild type strain when the SOS response is induced. The results obtained in these assays show that none of the mutations has any effect upon the virulence of *S. Typhimurium* when the cells are inoculated intraperitoneally. However, the mutants overexpressing the *recA* gene show a dramatic decrease in their fitness when the cells are inoculated through the oral route. These data demonstrate that the overexpression of this gene and, therefore, the increase in the intracellular concentration of RecA protein have a negative effect on the oral fitness of *S. Typhimurium*. Thus the expression of the *recA* gene must remain at its basal level during the oral stage of the infection developed by this pathogen.

The SOS response is induced normally in the *recA06869* mutants and they show the same growth rates as the wild type strain. Moreover, these mutants do not show any increase in their sensitivity towards DNA damaging agents, bile salts or low pH. Nevertheless, the *recA06869* mutants have a decreased ability to invade epithelial cells and to pass through the intestinal epithelium, in concordance with the results obtained in the virulence assays after oral inoculation. Moreover, these mutants are unable to swarm. Swarming is a multicellular movement over semisolid surfaces associated with the ability of several pathogens, including *S. enterica*, to invade epithelial cells. All these data explain the decrease in the fitness observed in the *recA06869* mutants after oral inoculation.

The results obtained in this work show that the induction of the SOS response inhibits swarming motility in *S. Typhimurium* through the overexpression of the *recA* gene. Moreover, in this pathogen, the RecA protein interacts with the CheW protein. This protein is a member of the chemotaxis system, which is associated to the control of swarming motility. The data obtained in this work also demonstrate that the overexpression of *cheW* restores the swarming ability of the *recA06869* mutant. This indicates that an equilibrium between the intracellular concentrations of RecA and CheW is required for swarming motility in *S. Typhimurium*.

The results exposed in this work increase the number of known cellular processes that are associated to the SOS response, conferring a new role on this system and on the RecA protein as regulators of swarming motility in *S. Typhimurium*. In this context, the induction of the SOS response in the presence of DNA damaging compounds inhibits this kind of motility, avoiding the exposure of the cells to even higher concentrations of such compounds. This indicates that the SOS system is not only involved in DNA repair processes, but it also prevents DNA damaging by controlling swarming motility.

# Índice

---





1.3.2.3. Compuestos secretados durante el desplazamiento mediante <i>swarming</i> .....	39
1.3.2.4. Patrones coloniales desarrollados durante el desplazamiento mediante <i>swarming</i> .....	40
1.3.2.5. Estímulos externos inductores del <i>swarming</i> .....	41
1.3.2.6. Mecanismos moleculares de regulación del <i>swarming</i> .....	43
1.3.2.6.1. El sistema de flagelación .....	43
1.3.2.6.2. Los sistemas de <i>quorum sensing</i> .....	44
1.3.2.6.3. El sistema de quimiotaxis.....	46
1.3.3. El <i>swarming</i> y la virulencia bacteriana .....	49
1.3.4. Relación entre el <i>swarming</i> y el sistema SOS .....	51
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>53</b>
<b>3. Material y métodos .....</b>	<b>57</b>
3.1. Cepas, plásmidos y bacteriófagos empleados en el estudio .....	59
3.2. Métodos microbiológicos .....	60
3.2.1. Medios y condiciones de cultivo.....	60
3.2.2. Cinéticas de crecimiento en medio líquido .....	62
3.2.3. Índices de competitividad <i>in vitro</i> .....	62
3.2.4. Ensayos de supervivencia .....	62
3.2.5. Ensayos de movilidad por <i>swarming</i> .....	63
3.2.6. Ensayos de movilidad por <i>swimming</i> .....	64
3.2.7. Cambio de fase flagelar .....	64
3.2.8. Ensayos de invasividad sobre células de la línea Caco-2 .....	64
3.3. Técnicas de manipulación de DNA y RNA .....	65
3.3.1. Oligonucleótidos utilizados en el estudio.....	65
3.3.2. Extracción de DNA y RNA.....	69
3.3.3. Electroforesis en geles de agarosa .....	69
3.3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	70
3.3.5. Clonación de fragmentos de DNA en vectores plasmídicos .....	70
3.3.6. Obtención de células competentes .....	71
3.3.7. Electrotransformación .....	71
3.3.8. Obtención de mutantes de <i>S. Typhimurium</i> .....	72
3.3.9. Transducción generalizada .....	75
3.3.10. Análisis de la activación del sistema SOS.....	76
3.4. Técnicas de manipulación de proteínas.....	77
3.4.1. Lisis celular mediante sonicación y electroforesis desnaturizante en geles de SDS-poliacrilamida.....	77
3.4.2. Cuantificación de los niveles intracelulares de proteína RecA.....	77

3.4.3. Sobreexpresión de los genes <i>recA</i> y <i>cheW</i> bajo control del promotor <i>P<sub>tac</sub></i> .....	78
3.4.3.1. Construcción del vector pUA1108.....	78
3.4.3.2. Clonación de los genes <i>recA</i> y <i>cheW</i> en pUA1108 .....	78
3.4.3.3. Sobreexpresión de los genes <i>recA</i> y <i>cheW</i> .....	79
3.4.4. Ensayos de doble híbrido .....	80
3.4.4.1. Clonación de los genes que codifican las proteínas de interés en pB2H $\Delta\alpha$ y pB2H $\Delta\omega$ .....	80
3.4.4.2. Control de la expresión de las proteínas de fusión .....	81
3.4.4.3. Ensayo de doble híbrido .....	82
3.5. Técnicas de microscopía .....	84
3.6. Experimentación animal .....	84
3.6.1. Modelo animal.....	84
3.6.2. Índices de competitividad <i>in vivo</i> .....	85
3.6.3. Ensayos de coinfección de asas intestinales .....	86
3.7. Métodos bioinformáticos .....	88
<b>4. Resultados.....</b>	<b>89</b>
4.1. Construcción de los mutantes en la regulación del sistema SOS de <i>S.</i> <i>Typhimurium</i> ATCC 14028 .....	91
4.2. Caracterización de los mutantes <i>recA</i> 06869, <i>lexA3</i> (Ind <sup>-</sup> ) y <i>recA</i> 06869 <i>lexA3</i> (Ind <sup>-</sup> ).....	93
4.2.1. Cuantificación de la proteína RecA intracelular .....	93
4.2.2. Inducción del sistema SOS y supervivencia frente a factores lesivos para el DNA .....	94
4.2.3. Cinéticas de crecimiento de los mutantes .....	96
4.3. Capacidad infectiva de los mutantes <i>recA</i> 06869, <i>lexA3</i> (Ind <sup>-</sup> ) y <i>recA</i> 06869 <i>lexA3</i> (Ind <sup>-</sup> ).....	98
4.4. Papel de RecA durante el proceso infectivo.....	99
4.4.1. Estabilidad del profago Gifsy-2 de <i>S. Typhimurium</i> en los mutantes <i>recA</i> 06869 y <i>recA</i> 06869 <i>lexA3</i> (Ind <sup>-</sup> ) .....	99
4.4.2. Desarrollo de la fase gastrointestinal del proceso infectivo por los mutantes <i>recA</i> 06869 y <i>recA</i> 06869 <i>lexA3</i> (Ind <sup>-</sup> ).....	100
4.4.2.1. Comportamiento de los mutantes <i>recA</i> 06869 y <i>recA</i> 06869 <i>lexA3</i> (Ind <sup>-</sup> ) frente a los mecanismos de defensa presentes en el tracto gastrointestinal.....	100
4.4.2.2. Capacidad invasiva de los mutantes <i>recA</i> 06869 y <i>recA</i> 06869 <i>lexA3</i> (Ind <sup>-</sup> ) .....	102
4.4.2.3. Capacidad de los mutantes <i>recA</i> 06869 y <i>recA</i> 06869 <i>lexA3</i> (Ind <sup>-</sup> ) para desplazarse mediante <i>swarming</i> .....	104

4.5. Regulación del <i>swarming</i> mediada por el sistema SOS en <i>S. Typhimurium</i> .....	105
4.6. Implicación de la proteína RecA en la regulación del <i>swarming</i> en <i>S. Typhimurium</i> .....	106
4.7. Diferenciación en células <i>swarmers</i> en <i>S. Typhimurium</i> .....	109
4.8. Interacción entre RecA y CheW en <i>S. Typhimurium</i> .....	111
4.8.1. Importancia del equilibrio entre RecA y CheW para el desplazamiento mediante <i>swarming</i> en <i>S. Typhimurium</i> .....	111
4.8.2. Análisis de la interacción entre las proteínas RecA y CheW de <i>S. Typhimurium</i> .....	113
<b>5. Discusión.....</b>	<b>117</b>
5.1. El proceso infectivo de <i>S. Typhimurium</i> no requiere la inducción de la respuesta SOS .....	119
5.2. La sobreexpresión de <i>recA</i> interfiere la fase gastrointestinal del proceso infectivo desarrollado por <i>S. Typhimurium</i> .....	121
5.3. El exceso de proteína RecA inhibe el desplazamiento poblacional mediante <i>swarming</i> en <i>S. Typhimurium</i> .....	122
5.4. El sistema SOS controla el desplazamiento mediante <i>swarming</i> en <i>S. Typhimurium</i> .....	125
5.5. La interacción entre RecA y CheW regula el desplazamiento mediante <i>swarming</i> en <i>S. Typhimurium</i> .....	127
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>131</b>
<b>7. Bibliografía.....</b>	<b>135</b>
<b>Anexo A .....</b>	<b>163</b>
<b>Anexo B.....</b>	<b>175</b>
<b>Agradecimientos .....</b>	<b>187</b>

<b>Figura 1.1.</b> Distribución de los brotes de origen alimentario y de las infecciones alimentarias reportados en el año 2009 en la Unión Europea según su agente causal .....	5
<b>Figura 1.2.</b> Desarrollo de una infección sistémica por <i>Salmonella enterica</i> en el modelo murino .....	10
<b>Figura 1.3.</b> Génesis de lesiones patológicas en los órganos diana de ratones infectados por <i>Salmonella enterica</i> .....	12
<b>Figura 1.4.</b> Estructura tridimensional de un monómero de la proteína RecA.....	16
<b>Figura 1.5.</b> Esquema del proceso de reparación por recombinación en el caso de roturas de cadena sencilla o roturas de doble cadena en el DNA .....	18
<b>Figura 1.6.</b> Estructura de la proteína LexA.....	19
<b>Figura 1.7.</b> Modelo de interacción entre la proteína LexA y la caja SOS de los genes bajo su control. ....	20
<b>Figura 1.8.</b> Estructura tridimensional de la proteína LexA en su estado hidrolizable superpuesta a la estructura en el estado no hidrolizable.....	21
<b>Figura 1.9.</b> Modelo de inducción del sistema SOS.....	23
<b>Figura 1.10.</b> Esquema del modelo de reparación por escisión de nucleótido.....	26
<b>Figura 1.11.</b> Modelo esquemático del proceso de síntesis de DNA por translesión .....	28
<b>Figura 1.12.</b> Factores endógenos y exógenos inductores de la respuesta SOS.....	30
<b>Figura 1.13.</b> Esquema representativo de los dos tipos de movimiento natatorio descritos en <i>E. coli</i> en función del sentido de rotación de los flagelos .....	35
<b>Figura 1.14.</b> Esquema de los cinco tipos de desplazamiento celular descritos en bacterias.....	36
<b>Figura 1.15.</b> Esquema representativo de la diferenciación en célula <i>swarmer</i> y la agrupación en <i>rafts</i> típicos del movimiento en enjambre.....	39
<b>Figura 1.16.</b> Patrones coloniales desarrollados durante el desplazamiento por <i>swarming</i> .....	41
<b>Figura 1.17.</b> Esquema de la formación de los clusters de quimiorreceptores en los polos de la célula.....	47

<b>Figura 1.18.</b> Esquema del funcionamiento del sistema de quimiotaxis en presencia de compuestos atrayentes o repelentes para la célula .....	48
<b>Figura 1.19.</b> Esquema del proceso de inhibición de la formación de los trímeros de dímeros de quimiorreceptores por efecto de un exceso de CheW intracelular.....	52
<b>Figura 3.1.</b> Esquema de las regiones que contienen los casetes de resistencia antibiótica en los plásmidos pKD3 y pKD4 .....	72
<b>Figura 3.2.</b> Esquema del proceso de mutagénesis en un solo paso de la caja SOS del gen <i>recA</i> de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 .....	73
<b>Figura 4.1.</b> Comprobación del mutante <i>recAo6869</i> de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 .....	92
<b>Figura 4.2.</b> Resultado de la PCR para comprobar la incorporación del casete de resistencia a Km en la región promotora del gen <i>recA</i> de la cepa control de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028.....	93
<b>Figura 4.3.</b> Cuantificación mediante Western blot de los niveles intracelulares de proteína RecA en las diferentes cepas de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 .....	94
<b>Figura 4.4.</b> Ensayos de RT-PCR cuantitativa a tiempo real para determinar la inducción de la expresión del regulón SOS en las diferentes cepas de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028.....	95
<b>Figura 4.5.</b> Curvas de supervivencia frente a la irradiación con luz UV .....	96
<b>Figura 4.6.</b> Crecimiento de los diferentes mutantes y la cepa salvaje de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 en medio rico (LB), medio mínimo (AB) suplementado con glucosa (0,2%) y medio mínimo (AB) suplementado con glicerol (0,2%).....	97
<b>Figura 4.7.</b> Resultado de la PCR para comprobar la presencia de <i>sodC</i> en el DNA cromosómico de los distintos mutantes de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 .....	100
<b>Figura 4.8.</b> Supervivencia de las cepas salvaje, <i>recAo6869</i> y <i>recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)</i> de <i>S. Typhimurium</i> frente a pH ácido (3,3) y la presencia de coleato sódico (extracto de bilis de buey) a una concentración del 30% .....	101
<b>Figura 4.9.</b> Capacidad invasiva de las cepas salvaje, <i>recAo6869</i> y <i>recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)</i> de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 sobre la línea celular Caco-2.....	103
<b>Figura 4.10.</b> Capacidad para desplazarse mediante <i>swarming</i> de las cepas salvaje, salvaje resistente a Km, <i>recAo6869</i> , <i>lexA3(Ind<sup>-</sup>)</i> y <i>recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)</i> de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028.....	104

---

<b>Figura 4.11.</b> Patrones de desplazamiento mediante <i>swarming</i> de las cepas salvaje y <i>recAo6869</i> de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 en presencia de un agente inductor de la respuesta SOS.....	106
<b>Figura 4.12.</b> Comprobación de los mutantes <i>recX</i> y <i>recAo6869 recX</i> de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 .....	107
<b>Figura 4.13.</b> Capacidad para desplazarse mediante <i>swarming</i> de las cepas salvaje, <i>recX</i> , <i>recAo6869 recX</i> y <i>recA</i> de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028.....	107
<b>Figura 4.14.</b> Sobreexpresión de <i>recA</i> en el vector pUA1109 .....	108
<b>Figura 4.15.</b> Capacidad de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 para desplazarse mediante <i>swarming</i> en respuesta a la sobreexpresión de <i>recA</i> .....	109
<b>Figura 4.16.</b> Incremento en el tamaño celular asociado a la diferenciación en célula <i>swarmer</i> .....	110
<b>Figura 4.17.</b> Efecto de la mutación <i>recAo6869</i> sobre el desplazamiento mediante <i>swimming</i> en <i>S. Typhimurium</i> .....	111
<b>Figura 4.18.</b> Sobreexpresión de <i>cheW</i> en el vector pUA1110 .....	112
<b>Figura 4.19.</b> Recuperación de la capacidad para desplazarse mediante <i>swarming</i> del mutante <i>recAo6869</i> de <i>S. Typhimurium</i> en respuesta a la sobreexpresión de <i>cheW</i> .....	113
<b>Figura 4.20.</b> Comprobación mediante Western blot de la expresión de las proteínas de fusión en la cepa MC1061 de <i>E. coli</i> .....	114
<b>Figura 4.21.</b> Ensayo de doble híbrido entre las proteínas RecA y CheW de <i>S. Typhimurium</i> .....	115



---

<b>Tabla 1.1.</b> Nomenclatura del género <i>Salmonella</i> .....	3
<b>Tabla 1.2.</b> Principales serovariedades de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> causantes de enfermedades en humanos y animales de sangre caliente.....	4
<b>Tabla 1.3.</b> Genes pertenecientes al sistema SOS de <i>E. coli</i> .....	24
<b>Tabla 1.4.</b> Genes predichos y confirmados del sistema SOS de <i>S. Typhimurium</i> .....	32
<b>Tabla 3.1.</b> Cepas, plásmidos y bacteriófagos utilizados en este trabajo .....	59
<b>Tabla 3.2.</b> Parejas de oligonucleótidos empleadas en este trabajo .....	66
<b>Tabla 3.3.</b> Protocolo de supervisión del estado de los animales.....	86
<b>Tabla 4.1.</b> Índices de competitividad <i>in vitro</i> de los diferentes mutantes de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 en cocultivos con la cepa salvaje .....	96
<b>Tabla 4.2.</b> Índices de competitividad de los diferentes mutantes de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 en el modelo murino.....	99
<b>Tabla 4.3.</b> Índices de competitividad <i>in vitro</i> en anerobiosis de los mutantes <i>recA06869</i> y <i>recA06869 lexA3(Ind<sup>r</sup>)</i> de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 en cocultivos con la cepa salvaje .....	102
<b>Tabla 4.4.</b> Índices de competitividad de los mutantes <i>recA06869</i> y <i>recA06869 lexA3(Ind<sup>r</sup>)</i> de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 en asas intestinales de origen murino .....	103
<b>Tabla 4.5.</b> Longitud de las células de la cepa salvaje y del mutante <i>recA06869</i> de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 crecidas en medio LB sólido o en medio LB <i>swarming</i> .....	110



# 1. Introducción

---



## 1.1. EL GÉNERO *Salmonella*

### 1.1.1. CLASIFICACIÓN

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, englobada dentro de la clase de las proteobacterias Gamma. Está formado por bacterias Gram-negativas de morfología bacilar que miden entre 1 y 2  $\mu\text{m}$ , son anaerobias facultativas y, en su mayoría, son móviles, presentando flagelación peritrica.

Su nomenclatura es a menudo fuente de confusión, ya que ha sufrido constantes modificaciones a lo largo de los años (Tindall *et al.*, 2005; Su and Chiu, 2007). Actualmente, basándose en sus características moleculares, se acepta la existencia de tres únicas especies dentro de este género: *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori* y *Salmonella subterranea* (Tabla 1.1) (Reeves *et al.*, 1989; Shelobolina *et al.*, 2004; ICSP, 2005). La especie *S. enterica* se divide, a su vez, en seis subespecies (Tabla 1.1).

**Tabla 1.1.** Nomenclatura del género *Salmonella*.

Especie	Subespecie	Nomenclatura aceptada
<i>Salmonella enterica</i>	I	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>
	II	<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i>
	IIIa	<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>
	IIIb	<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>
	IV	<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i>
	VI	<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i>
<i>Salmonella bongori</i>	V	<i>S. bongori</i>
<i>Salmonella subterranea</i>		<i>S. subterranea</i>

Clasificadas dentro de cada una de estas subespecies, se encuentran numerosas serovariedades, que se diferencian según su antígeno O (antígeno del lipopolisacárido), su antígeno H (antígeno flagelar) y, si está presente, su antígeno Vi (antígeno capsular). Según esta clasificación, recogida en el esquema Kauffmann-White, se considera que existen más de 2500 serovariedades dentro del género *Salmonella* (Grimont y Weill, 2007; Guibourdenche *et al.*, 2010), las cuales se dividen en tres grupos en función de su especificidad de huésped. Las hay restringidas a un huésped (únicamente son capaces de infectar a una especie animal), adaptadas a varios huéspedes (tienen preferencia por una especie concreta, pero se han aislado también en otros animales) y generalistas (infectan a una gran variedad de especies animales) (Edwards *et al.*, 2002).

La gran mayoría de estas serovariedades pertenece a la subespecie I de *Salmonella enterica*, la cual es responsable del 99% de las infecciones en humanos y animales de sangre caliente (Tabla 1.2) (Brenner *et al.*, 2000).

**Tabla 1.2.** Principales serovariedades de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* causantes de enfermedades en humanos y animales de sangre caliente.

Huésped	Serovariedad	Referencia
Humanos	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sv. Enteritidis	EFSA* (2011)
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sv. Typhimurium	EFSA (2011)
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sv. Infantis	EFSA (2011)
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sv. Typhi	Bäumler <i>et al.</i> (1998)
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sv. Paratyphi A, B, C	Bäumler <i>et al.</i> (1998)
Aves de corral	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sv. Enteritidis	EFSA (2011)
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sv. Typhimurium	EFSA (2011)
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sv. Infantis	EFSA (2011)
Cerdos	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sv. Typhimurium	EFSA (2011)
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sv. Cholerasuis	EFSA (2011)
Vacas	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sv. Typhimurium	EFSA (2011)
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sv. Dublin	EFSA (2011)
Ovejas	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sv. Typhimurium	Bäumler <i>et al.</i> (1998)
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sv. Abortusovis	Bäumler <i>et al.</i> (1998)

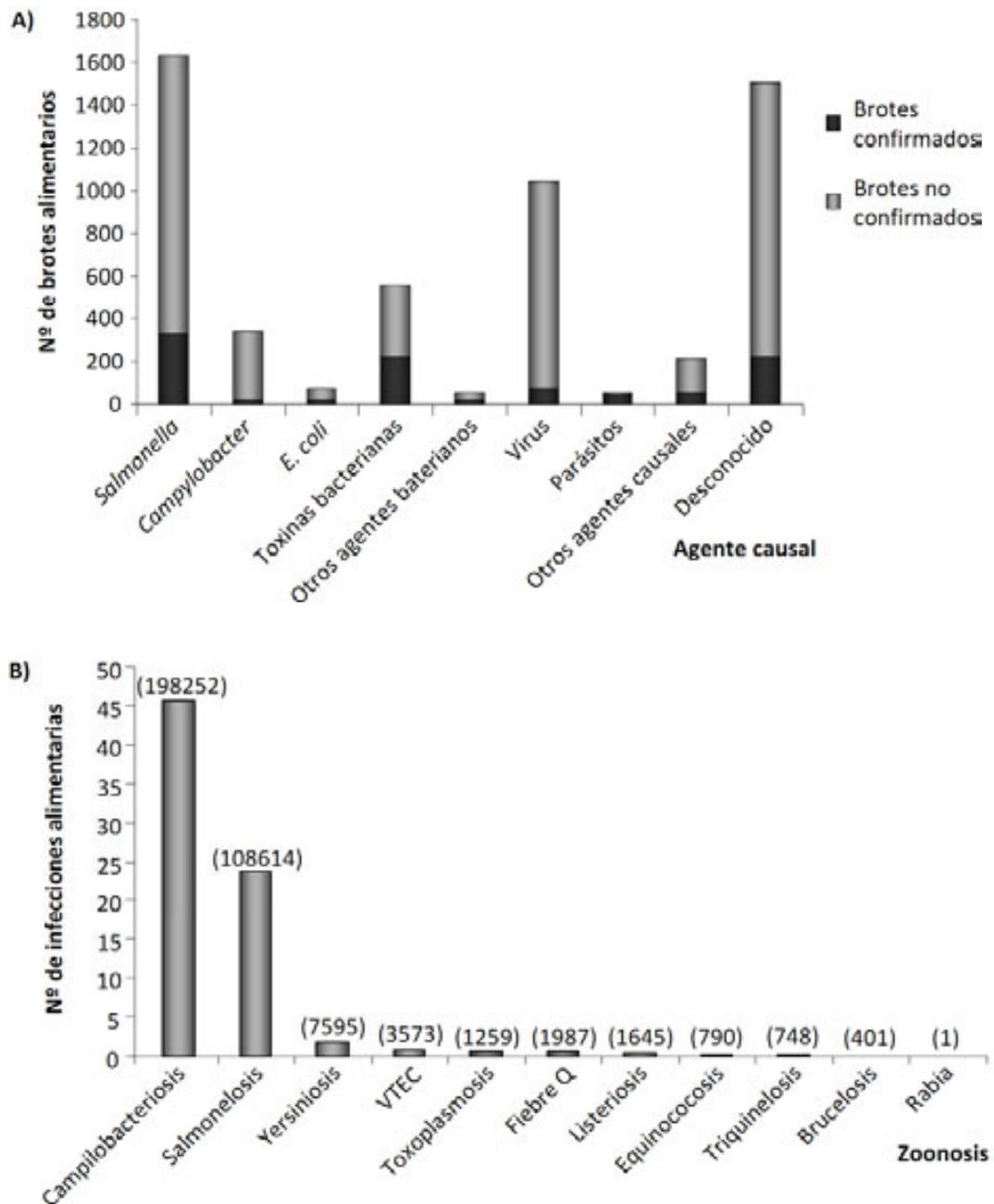
\*European Food Safety Authority.

### 1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA

Los miembros del género *Salmonella* habitan principalmente en el tracto intestinal de los animales y han sido aislados de especies como aves, ovejas, cabras, cerdos o reptiles. (Woodward *et al.*, 1997; Berends *et al.*, 1998; Dione *et al.*, 2011). Además, son capaces de sobrevivir en aguas y en heces, siendo éstas una fuente de contaminación para vegetales a través del agua de riego y de los fertilizantes (Tauxe, 1997; Winfield y Groisman, 2003). Por este motivo, la principal fuente de infección por *Salmonella* en humanos es la ingesta de alimentos contaminados (Berends *et al.*, 1998; Greig y Ravel, 2009; Mody *et al.*, 2011), aunque el contacto con animales portadores también es una importante vía de transmisión del patógeno (Woodward *et al.*, 1997).

*Salmonella* es hoy en día uno de los principales patógenos que afectan al ser humano. La EFSA (European Food Safety Authority), en el informe que analiza las enfermedades por ingesta de alimentos contaminados diagnosticadas en el año 2009 en la Unión Europea, muestra que el número de infecciones por este patógeno presenta una tendencia descendente gracias a las

medidas de control establecidas (EFSA, 2011). Pero a pesar de ello, *Salmonella* sigue siendo el principal agente causal de los brotes diagnosticados (Fig. 1.1 A) y el responsable del segundo mayor número de infecciones, únicamente superado por *Campylobacter* (Fig. 1.1 B). *S. enterica* subsp. *enterica* sv. Enteritidis (*S. Enteritidis*) y *S. enterica* subsp. *enterica* sv. Typhimurium (*S. Typhimurium*) son las principales serovariedades diagnosticadas. Los brotes de *S. Enteritidis* están especialmente ligados al consumo de huevos y carne de ave contaminados, mientras que los ocasionados por *S. Typhimurium* se asocian, principalmente, al consumo de carne de vacuno, cerdo y ave.



**Figura 1.1.** Distribución de los brotes de origen alimentario (A) y de las infecciones alimentarias (B) reportados en el año 2009 en la Unión Europea según su agente causal. Adaptado de EFSA (2011).

Las infecciones alimentarias por *Salmonella* presentan una clara tendencia estacional, dándose el mayor número de casos en los meses cálidos (Olsen *et al.*, 2001). Aunque la sintomatología habitual es una gastroenteritis autolimitada cuya duración está determinada por el propio patrón de infección de *Salmonella* y que no requiere tratamiento para su curación, la enfermedad puede complicarse y generar cuadros más severos (Helms *et al.*, 2006).

Son también muy importantes para la salud pública las serovariedades *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sv. Typhi y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sv. Paratyphi (*S. Typhi* y *S. Paratyphi*, respectivamente). Estas serovariedades son específicas de un huésped, infectando únicamente al ser humano. Sus infecciones generan un cuadro clínico más severo que el anterior, incluyendo fiebre alta, dolor abdominal y mialgias (Parry, 2006), y su transmisión se da vía fecal-oral o como consecuencia del contacto cercano con personas portadoras. Las áreas más afectadas por estas serovariedades se encuentran en África y Asia, aunque también persisten en algunos países de Europa, Oriente Medio, Centroamérica y Sudamérica (Parry, 2006). Se calcula que cada año hay aproximadamente 21 millones de infecciones por *S. Typhi* y 5 millones por *S. Paratyphi* en todo el mundo (Crump *et al.*, 2004), afectando principalmente a los niños menores de 9 años (Brooks *et al.*, 2005; Parry, 2006).

### **1.1.3. PATOGENIA**

En función de la especie causante de la enfermedad y del estado del huésped, los diversos miembros del género *Salmonella* dan lugar a diferentes tipos de procesos infecciosos (Galán y Sansonetti, 1996). Las especies restringidas a un huésped, como *S. Typhi* o *S. Paratyphi* (restringidas al ser humano), y las especies adaptadas a varios huéspedes suelen generar infecciones sistémicas graves, y los huéspedes, al recuperarse, se convierten con frecuencia en portadores asintomáticos (Ellermeier y Schlauch, 2006). Por el contrario, las especies generalistas, como *S. Typhimurium* o *S. Enteritidis*, suelen causar en humanos infecciones con cuadros clínicos menos severos, típicamente gastroenteritis autolimitadas (Uzzau *et al.*, 2000).

#### **1.1.3.1. El proceso infeccioso de *Salmonella enterica***

Tal como se explica en el apartado anterior, la infección por *Salmonella* en el ser humano se da principalmente por el consumo de agua o alimentos contaminados (Berends *et al.*, 1998; Greig y Ravel, 2009; Mody *et al.*, 2011). En este caso, los microorganismos llegan al epitelio intestinal y lo atraviesan para alcanzar la lámina propia, donde pueden generar una infección local o diseminarse a tejidos extraintestinales generando una infección sistémica (Galán y Sansonetti, 1996). La infección por *S. enterica* se establece según los siguientes pasos:

## i) Estadios iniciales

En los estadios iniciales del proceso infeccioso, las células de *S. enterica* deben superar los mecanismos de defensa existentes en el tracto gastrointestinal. Uno de los más importantes es el pH ácido existente en el estómago. Para enfrentarse a ello, *S. enterica* posee diversos mecanismos de respuesta.

En primer lugar, este patógeno dispone de dos sistemas de tolerancia a la acidez. Uno de ellos, asociado a la fase de crecimiento exponencial, está regulado por diferentes proteínas, como el regulador Fur, el sistema de dos componentes PhoP/Q y el factor sigma RpoS (Foster, 1995; Hall y Foster, 1996; Bearson *et al.*, 1998). El otro sistema de tolerancia a la acidez, que se induce durante la fase estacionaria, está regulado por OmpR/EnvZ (Bang *et al.*, 2000; Bang *et al.*, 2002). Cuando la célula se encuentra en un entorno a bajo pH, la inducción de estos sistemas promueve la expresión de una serie de proteínas, llamadas ASP (por *Acid Shock Proteins*), que permiten la adaptación del patógeno a estos entornos y la supervivencia celular frente a la exposición a niveles aún mayores de acidez (Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2011). Mutantes de *S. enterica* defectivos en los genes *fur*, *rpoS*, *phoP*, *phoQ* y *ompR* presentan defectos en la virulencia (Miller *et al.*, 1989; Fang *et al.*, 1992; Karasova *et al.*, 2009). Asimismo, se ha demostrado la inducción del regulón PhoP en macrófagos y en el tracto gastrointestinal de ratones BALB/c infectados con este patógeno (Merighi *et al.*, 2005). Todo ello indica que la expresión de estos sistemas de tolerancia a la acidez es esencial para el desarrollo del proceso infeccioso de *S. enterica*.

En segundo lugar, *S. enterica* posee mecanismos homeostáticos para mantener un nivel de pH de 7,6-7,8 en el interior celular. Uno de estos mecanismos es el sistema de la lisina descarboxilasa, en el cual participan las proteínas codificadas por el gen *cadC* y el operón *cadBA*. Mediante este sistema, en entornos ácidos y en presencia de lisina extracelular, la proteína CadC induce la síntesis de CadA, una lisina descarboxilasa que transforma la lisina intracelular en cadaverina con el consumo de un protón, incrementando el pH de la célula. Posteriormente, cada molécula de cadaverina es intercambiada por una molécula de lisina extracelular mediante el antitransportador CadB, continuando así con el proceso (Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2011). Los genes *cadB* y *cadC* se expresan durante el desarrollo del proceso infeccioso por *S. enterica* (Heithoff *et al.*, 1997; Eriksson *et al.*, 2003), lo cual indica la importancia de este sistema para la supervivencia de este patógeno frente a la acidez del estómago.

Otro de los mecanismos de defensa más importantes del tracto gastrointestinal son las sales biliares. *S. enterica* presenta unos niveles de tolerancia a estos compuestos muy elevados (van Velkinburgh y Gunn, 1999), lo cual supone una ventaja para este microorganismo durante la colonización del tracto gastrointestinal. Numerosos mecanismos están implicados en la

supervivencia de este patógeno frente a estas elevadas concentraciones de sales biliares. Entre ellos se encuentran bombas de flujo, como la bomba AcrAB (Lacroix *et al.*, 1996), el lipopolisacárido (LPS) (Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2011), genes regulados por el sistema PhoP/Q (van Velkinburgh y Gunn, 1999) o sistemas de reparación del DNA, como los mecanismos de reparación por recombinación o el sistema SOS de reparación de emergencia (Prieto *et al.*, 2004; Prieto *et al.*, 2006).

Otros elementos, como la microbiota intestinal, la elevada osmolaridad y el entorno anaeróbico del tracto gastrointestinal o los péptidos antimicrobianos, actúan también de barrera innata de protección frente a patógenos intestinales como *S. enterica*, reduciendo así el número de células que consiguen alcanzar el intestino y desarrollar la infección.

## ii) Invasión del epitelio intestinal

Para desarrollar la infección, *Salmonella* debe traspasar el epitelio intestinal, para lo cual dispone de diferentes mecanismos. Puede atravesar la barrera epitelial a través de las placas de Peyer, a través de células no fagocíticas del epitelio y a través de células dendríticas.

La vía principal de internalización de *Salmonella* es su paso a través de las **placas de Peyer**. Éstas se localizan en la parte distal del intestino delgado y en ellas se encuentran las células M, especializadas en fagocitar antígenos del lumen intestinal para presentarlos al sistema inmune. *Salmonella* es fagocitada por estas células e introducida en vacuolas endocíticas para su paso al tejido submucoso y su presentación a dicho sistema. Pero la capacidad de este patógeno para sobrevivir en el interior celular convierte a las células M en una vía para el traspaso de la barrera epitelial (Fig. 1.2) (Takeuchi, 1967; Jones *et al.*, 1994).

*Salmonella* también puede superar la barrera epitelial invadiendo **células no fagocíticas** (Gahring *et al.*, 1990; McCormick *et al.*, 1993). Para ello recurre a la maquinaria codificada en su isla de patogenicidad 1 (SPI-1), en la que están codificados tanto un sistema de secreción tipo III como una serie de proteínas efectoras. Esta clase de proteínas se introduce en las células del huésped a través de dicho sistema de secreción e induce en ellas distintas respuestas, como reestructuraciones citoesqueléticas y cambios morfológicos, que permiten la fagocitosis de *Salmonella* (Fig. 1.2) (Finlay *et al.*, 1991; Hardt *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1999; Wallis y Galyov, 2000; Zhou *et al.*, 2001). Por ello, la expresión de la SPI-1 se induce en respuesta a factores ambientales como una alta osmolaridad, una baja concentración de oxígeno y la presencia de hierro en su forma reducida ( $Fe^{2+}$ ) (Schechter *et al.*, 1999; Teixidó *et al.*, 2011), todos ellos señales que indican al patógeno su localización en el intestino.

Por último, otros estudios demuestran que *Salmonella* puede interactuar también con **células dendríticas** en el intestino (Hopkins *et al.*, 2000; Rescigno *et al.*, 2001). Estas células se

abren paso entre las uniones estrechas que unen a los enterocitos y fagocitan a las bacterias directamente de la mucosa intestinal, pudiendo también transportarlas hasta los nódulos linfáticos (Rescigno *et al.*, 2001; Voedisch *et al.*, 2009)

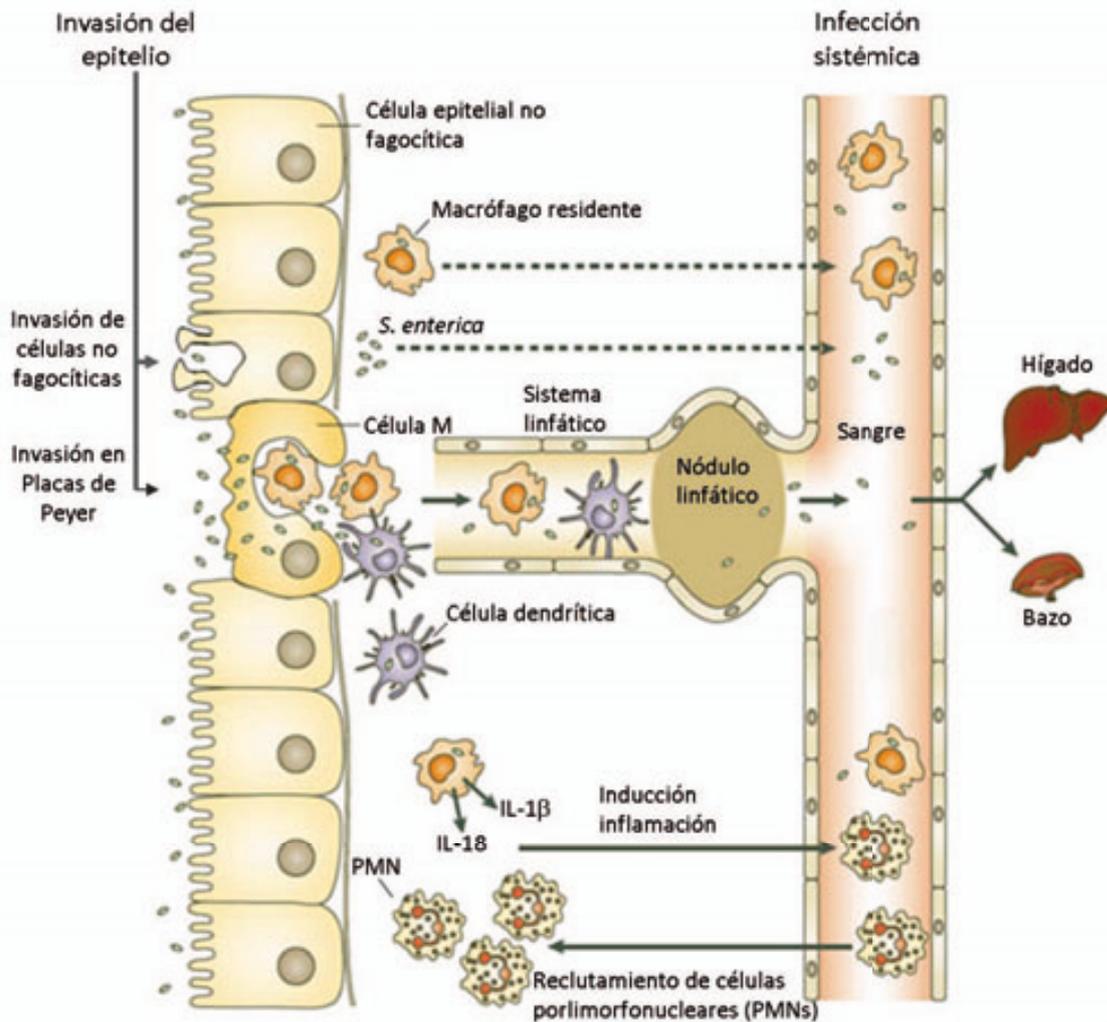
Mediante cualquiera de estos procesos, *Salmonella* es capaz de atravesar el epitelio intestinal, alcanzando así el tejido submucoso, donde puede desarrollar una infección local y, si no se controla antes la infección, diseminarse para generar una infección sistémica.

### **iii) Infección local: gastroenteritis**

Durante la infección local, el huésped sufre gastroenteritis. La gastroenteritis por *Salmonella* se define como una diarrea secretora acompañada de inflamación del epitelio intestinal, y se caracteriza, entre otras, por la acumulación de fluidos secretados por las células epiteliales, la presencia de infiltrados inflamatorios formados principalmente por células polimorfonucleares en el tejido submucoso y la pérdida de células epiteliales que reduce la superficie de absorción (Boyd, 1985; McCormick *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2003).

La enteritis generada por *S. enterica* está causada, entre otros motivos, por las proteínas efectoras inyectadas en las células epiteliales a través del sistema de secreción tipo III codificado en la SPI-1. Estas proteínas, además de inducir cambios en el citoesqueleto de los enterocitos, inducen la producción de interleuquinas y otros efectores del sistema inmune en células no polarizadas del intestino, dando lugar así a la respuesta inflamatoria (Chen *et al.*, 1996; Hobbie *et al.*, 1997; Hardt *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2001). Además, otros estudios sugieren que la presencia de flagelina en la membrana basolateral de las células epiteliales polarizadas también genera una cascada de señales que induce dicha respuesta, amplificando así el efecto (Gewirtz *et al.*, 2001a; Gewirtz *et al.*, 2001b).

La respuesta inflamatoria está mediada principalmente por leucocitos polimorfonucleares (Fig. 1.2) que se desplazan hasta la lámina propia y, desde allí, a través de las uniones estrechas que unen las células epiteliales, hasta el lumen intestinal (McCormick *et al.*, 1998). Esto permite la captación de células de *Salmonella* para su paso al tejido submucoso y su posterior reconocimiento por receptores tipo Toll, que inducen la respuesta innata. Pero la inducción de la respuesta inflamatoria produce efectos adversos para el individuo infectado, dando lugar a la muerte celular o la liberación de especies reactivas del oxígeno generada por el desplazamiento de las células polimorfonucleares entre los enterocitos. Todo ello favorece la invasión del tejido submucoso por *Salmonella* (Libby *et al.*, 2004).



**Figura 1.2.** Desarrollo de una infección sistémica por *Salmonella enterica* en el modelo murino. Modificado de Mastroeni *et al.* (2009).

#### iv) Invasión sistémica

Una vez traspasada la barrera epitelial, *Salmonella* es capaz de invadir tejidos extraintestinales, bien viajando a través del torrente sanguíneo de forma extracelular (Voedisch *et al.*, 2009), o bien siendo reconocida y fagocitada por células dendríticas o por macrófagos residentes en el intestino (Fig. 1.2). En este último caso, *Salmonella* puede sobrevivir en el interior de las células dendríticas y puede sobrevivir y proliferar en el interior de macrófagos (Sheppard *et al.*, 2003; Jantsch *et al.*, 2003; Bueno *et al.*, 2008). De esta forma, estos tipos celulares se convierten en una vía de transporte hacia otros tejidos, ya sea directamente a través del torrente sanguíneo, o pasando antes por los nódulos linfáticos (Vazquez-Torres *et al.*, 1999; Voedisch *et al.*, 2009). Los macrófagos transportan a *S. enterica* hasta órganos diana como hígado o bazo, mientras que las células dendríticas parecen estar implicadas únicamente en su paso hasta nódulos linfáticos (Voedisch *et al.*, 2009).

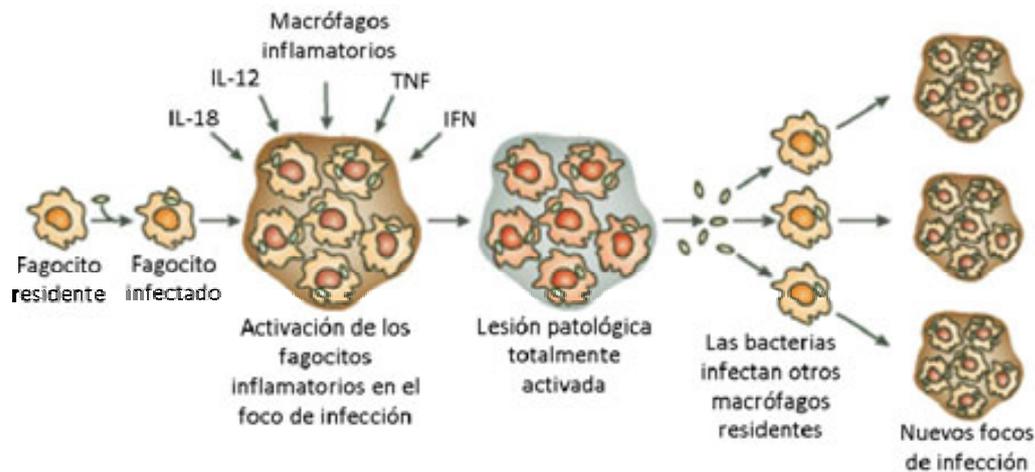
La supervivencia de *S. enterica* en el interior celular es posible gracias a que, cuando es fagocitada, permanece en el interior de un fagosoma modificado que recibe el nombre de vacuola que contiene *Salmonella* (SCV, por *Salmonella Containing Vacuole*) (Takeuchi, 1967; Steele-Mortimer, 2008; Bakowski *et al.*, 2008). Diversos mecanismos, tanto dependientes como independientes de estrés oxidativo, promueven la lisis bacteriana en las SCV. Sin embargo, *Salmonella* ha desarrollado diversos sistemas de defensa para enfrentarse a ellos y permitir su supervivencia.

Entre los mecanismos de lisis **independientes de estrés oxidativo** se describen el pH bajo existente en las SCV, la presencia de péptidos antimicrobianos y la falta de nutrientes (Libby *et al.*, 2004). Para enfrentarse a ellos, *Salmonella* dispone de diferentes sistemas de defensa, como por ejemplo, el sistema PhoP/Q. Este sistema regula la síntesis de un gran número de proteínas implicadas en la inducción de modificaciones en la membrana externa y el LPS, las cuales comportan la disminución de la permeabilidad a péptidos antimicrobianos y favorecen así la supervivencia en el interior de las SCV (Guo *et al.*, 1998).

Por otro lado, los mecanismos de lisis **dependientes de especies reactivas del oxígeno o del nitrógeno** dependen de la formación del anión superóxido, el cual puede reaccionar con otros compuestos generando peroxinitrito (a través de su reacción con el óxido nítrico) o peróxido de hidrógeno (el cual es permeable a las membranas y puede reaccionar con lípidos, DNA y proteínas). Además, éste último puede generar a su vez peroxinitrito (a través de su reacción con el óxido nítrico) o el radical hidroxilo (a través de la reacción de Fenton) (Libby *et al.*, 2004). En *Salmonella* existen más de 60 genes que participan en la respuesta al estrés oxidativo, de los cuales sólo unos pocos son importantes para la supervivencia en el interior celular y para la virulencia (Libby *et al.*, 2004). Entre ellos, se encuentran algunos de los genes pertenecientes a su isla de patogenicidad 2 (SPI-2). Las proteínas codificadas por estos genes impiden la llegada de las especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno al interior de las SCV (Vazquez-Torres *et al.*, 2000; Chakravortty *et al.*, 2002). El sistema PhoP/Q también participa en este proceso, impidiendo la fusión de lisosomas con la membrana de las SCV (Garvis *et al.*, 2001). Asimismo, *Salmonella* posee diferentes genes que codifican superóxido dismutasas, las cuales ayudan a eliminar especies reactivas del oxígeno, protegiendo así a las bacterias en el entorno intracelular (De Groote *et al.*, 1997).

Otro mecanismo importante para la supervivencia de *Salmonella* en el interior de macrófagos es la inducción de la muerte celular mediada por proteínas codificadas en la SPI-1 y en la SPI-2. Las primeras generan una inducción rápida de la muerte celular, mientras *Salmonella* se encuentra en el tracto intestinal, y las segundas generan una inducción tardía, durante la invasión sistémica (Monack *et al.*, 2001).

Todos estos sistemas permiten la supervivencia intracelular de *Salmonella*, posibilitando así su diseminación por el organismo.



**Figura 1.3.** Génesis de lesiones patológicas en los órganos diana de ratones infectados por *Salmonella enterica*. Modificado de Mastroeni *et al.* (2009).

Esta diseminación tiene lugar gracias a que las células de *Salmonella* son vehiculadas por macrófagos hacia los órganos diana, principalmente el hígado y el bazo, comenzando así su colonización. En estos órganos, *Salmonella* puede causar lesiones patológicas (Fig. 1.3). Estas lesiones se producen cuando una única célula de *Salmonella* infecta un fagocito residente en el órgano diana (Richter-Dahlfors *et al.*, 1997; Sheppard *et al.*, 2003). Esto atrae a otros fagocitos inflamatorios a este punto y, además, activa a los fagocitos residentes mediante señales del sistema inmune (Richter-Dahlfors *et al.*, 1997). De este modo se genera un foco de infección en dicho órgano, denominado lesión patológica, en el que el cúmulo de fagocitos activados tiene como finalidad aislar a la bacteria (Richter-Dahlfors *et al.*, 1997). Sin embargo, dado que *Salmonella* es capaz de sobrevivir en el interior de los macrófagos, no es eliminada durante este proceso, sino que puede multiplicarse (aunque a bajos niveles) e infectar otros fagocitos del mismo foco de infección (Richter-Dahlfors *et al.*, 1997; Sheppard *et al.*, 2003). Finalmente, las células de *Salmonella* escapan de la lesión e infectan otros fagocitos residentes en el órgano diana, generando nuevos focos de infección (Richter-Dahlfors *et al.*, 1997; Sheppard *et al.*, 2003). Cada lesión es independiente del resto y originada por la multiplicación de un único clon bacteriano. Es decir, *Salmonella* no migra de un foco de infección a otro ya desarrollado, sino que invade macrófagos no infectados para generar una nueva lesión (Sheppard *et al.*, 2003).

Para la proliferación sistémica, *Salmonella* necesita diversos factores de virulencia, entre los cuales se encuentran el sistema de secreción tipo III y las proteínas efectoras codificadas en la SPI-2 o los factores de virulencia codificados en el operón *spv* (Wallis *et al.*, 1995; Shea *et al.*, 1996; Bispham *et al.*, 2001; McLaughlin *et al.*, 2009). Determinadas proteínas codificadas en la

SPI-2 permiten, además de lo explicado anteriormente, mantener la infección por *Salmonella* de forma crónica a través de la inhibición de la migración normal de células del sistema inmune (McLaughlin *et al.*, 2009). Los factores codificados en el operón *spv* inducen lesiones en macrófagos y favorecen la proliferación de *Salmonella* en el interior de este tipo celular (Libby *et al.*, 2000).

#### 1.1.4. PREVENCIÓN DE LAS CONTAMINACIONES POR *Salmonella*

Debido a la gran importancia que esta especie tiene para la salud pública, los organismos encargados de su control han desarrollado diferentes estrategias para prevenir las contaminaciones por *Salmonella* en las granjas de producción de alimentos, principalmente granjas avícolas.

A nivel europeo, la EFSA recomienda la aplicación de una serie de medidas de control entre las cuales se encuentran la aplicación de **medidas de bioseguridad** (medidas tomadas por la granja productora para evitar el acceso de agentes patógenos o portadores de patógenos a los animales de producción), el **tratamiento del agua y el alimento de los animales de producción** (para asegurar que no estén contaminados con *Salmonella*), el uso de **productos de exclusión competitiva** (introducción, en el entorno de los animales, de microorganismos intestinales que conformarán su microbiota y los protegerán de posibles infecciones), el uso de **probióticos** (diferentes especies microbianas propias de la microbiota intestinal de aves que se usan como aditivos en la dieta), el uso de **prebióticos** (nutrientes que influyen en la microbiota intestinal y que también pueden utilizarse como aditivos en la dieta) y, por último, la **vacunación** (utilizando tanto vacunas vivas y atenuadas como vacunas inactivadas) (EFSA, 2004).

Sin embargo, a pesar de que estas son las indicaciones de la EFSA, cada país miembro de la Unión Europea ha de establecer su propia normativa. Así, en España, las principales estrategias de control se centran en las medidas de bioseguridad, el tratamiento del agua y los alimentos de los animales y la vacunación (MARM, 2011a; MARM, 2011b; MARM, 2011c; MARM, 2011d).

No obstante, a pesar de los esfuerzos que realizan las administraciones públicas, *Salmonella* sigue causando un gran número de infecciones alimentarias cada año en todo el mundo, tal como se indica en apartados anteriores. Por este motivo, el estudio de los procesos implicados en su virulencia es esencial para el desarrollo y la mejora de las estrategias de control sobre este patógeno bacteriano.

## 1.2. EL SISTEMA SOS DE REPARACIÓN DEL DNA

Un gran número de factores, tanto endógenos como exógenos, pueden ser lesivos para el DNA. Por este motivo, los microorganismos han desarrollado diferentes estrategias para reparar y superar estas lesiones. El sistema de reparación de emergencia, también conocido como sistema SOS, constituye una de estas estrategias.

El sistema SOS fue descrito por primera vez como una respuesta genética de las células bacterianas frente a la irradiación con luz ultravioleta (UV). Los primeros indicios de su existencia se derivan de estudios llevados a cabo en la década de 1950, en los que se demostró que la inducción del ciclo lítico del bacteriófago  $\lambda$  tiene lugar cuando se expone a las células bacterianas a radiación UV (Weigle, 1953; Borek y Ryan, 1958). Posteriormente, un estudio llevado a cabo en *Escherichia coli* permitió relacionar la inducción del ciclo lítico de este bacteriófago con el control de la división celular (Witkin, 1967). En este estudio se describe cómo la luz UV induce la filamentación en *E. coli*, y se formula la hipótesis de la existencia, en este microorganismo, de un represor celular inactivado en respuesta a la luz UV, del mismo modo que ocurre para el represor del bacteriófago  $\lambda$ . Según esta hipótesis, la inactivación tiene lugar en respuesta a lesiones en el DNA que producen el bloqueo de la replicación y permite la expresión de una proteína inhibidora de la división celular, la cual vuelve a reprimirse al superarse las lesiones. No es hasta 1970, cuando Miroslav Radman postula la hipótesis de la existencia de un sistema de replicación tendente al error, regulado por los genes *recA* y *lexA*, cuyo objetivo es superar las lesiones inducidas por diferentes agentes mutágenos en el DNA y, por lo tanto, permitir la supervivencia celular (Bridges, 2005).

Estudios llevados a cabo con posterioridad confirman esta hipótesis (Witkin, 1976; Little y Mount, 1982) y demuestran que el sistema SOS es, en realidad, un regulón compuesto por más de 40 genes (Fernández de Henestrosa *et al.*, 2000; Courcelle *et al.*, 2001), presente en la mayoría de filos bacterianos (Erill *et al.*, 2007) y que está regulado por las proteínas RecA (proteína activadora) y LexA (represor transcripcional), las cuales, a su vez, forman parte del regulón. La finalidad principal de esta respuesta es la de actuar globalmente frente a las lesiones en el DNA que no pueden ser reparadas por otras vías, permitiendo así la viabilidad celular (Little y Mount, 1982). Sin embargo, algunos de los genes asociados a este sistema demuestran su implicación en otros procesos celulares, como la inducción de islas de patogenicidad, la expresión de resistencias antibióticas o la transferencia horizontal de elementos móviles (Zhang *et al.*, 2000; Beaber *et al.*, 2004; Úbeda *et al.*, 2005; Maiqués *et al.*, 2006; Guerin *et al.*, 2009). Todo ello indica que el sistema SOS es una respuesta global al estrés que permite cambiar los patrones de expresión génica para que las células puedan adaptarse a las condiciones del entorno.

## 1.2.1. EL SISTEMA SOS EN *Escherichia coli*

### 1.2.1.1. La proteína RecA

La proteína RecA tiene un papel muy importante en la supervivencia celular, ya que está implicada en diferentes procesos de reparación del material genético. En primer lugar, participa en procesos de recombinación homóloga del DNA, lo que permite a la célula superar problemas durante la replicación celular o incorporar DNA exógeno mediante fenómenos de transferencia horizontal de material genético (Kuzminov, 1999). En segundo lugar, la proteína RecA actúa como activadora de la respuesta SOS (Little y Mount, 1982; Lusetti y Cox, 2002). Para llevar a cabo esta última función, es necesario que la proteína RecA se encuentre en su forma activada (RecA\*), conformación que adquiere cuando interacciona con DNA de cadena sencilla (ssDNA), el cual se origina, principalmente, por el bloqueo de la horquilla de replicación debido a la presencia de lesiones en el DNA o durante el proceso de reparación de dichas lesiones (Sassanfar y Roberts, 1990; Walker, 1984; Walker, 1995).

#### 1.2.1.1.1. Estructura de la proteína RecA

La forma funcional de la proteína RecA está constituida por un polímero de 6 unidades que se unen helicoidalmente alrededor del ssDNA formando un nucleofilamento (Story *et al.*, 1992).

Cada monómero de RecA consta de un núcleo principal, en la parte central de la proteína, flanqueado por dos dominios de menor tamaño en los extremos amino-terminal y carboxi-terminal (N-terminal y C-terminal, respectivamente) (Story *et al.*, 1992). En este núcleo central se encuentran la región de unión a nucleótidos y dos regiones de baja densidad electrónica, el "bucle 1" y el "bucle 2" (L1 y L2 respectivamente, por *Loop 1* y *Loop 2*), implicadas en la interacción con el DNA (Fig. 1.4) (Story *et al.*, 1992; Rehrauer y Kowalczykowski, 1996).

Los dominios funcionales de la proteína RecA son:

- **Dominio de unión a nucleótidos e hidrólisis.** La presencia de ATP es necesaria para la estabilización y la desestabilización de la interacción entre RecA y el ssDNA y, por lo tanto, para la activación de la proteína (Barbé *et al.*, 1986; Rehrauer y Kowalczykowski, 1996). La región de unión al ATP se encuentra localizada entre los aminoácidos 66 y 74 (dominio de unión) y presenta una secuencia de aminoácidos conservada en proteínas de unión a nucleótidos, llamada caja A (Rehrauer y Kowalczykowski, 1996; Karlin y Brocchieri, 1996; Lusetti y Cox, 2002). También son importantes para la interacción los aminoácidos 140-149 (dominio de hidrólisis), los cuales presentan 6 residuos

conservados y un segundo motivo de unión a nucleótidos, llamado caja B (Karlin y Brocchieri, 1996; Lusetti y Cox, 2002).

- **Dominio de unión a DNA.** Este dominio está localizado entre los bucles L1 y L2 de la región central de la proteína (residuos 157-164 y 195-209, respectivamente) (Story *et al.*, 1992), aunque las regiones comprendidas entre los residuos 61-72, 178-183 y 233-243 tienen también importancia para la interacción (Rehrauer y Kowalczykowski, 1996).
- **Dominio de interacción monómero-monómero y entre filamentos.** La interacción entre monómeros de la proteína RecA es posible gracias a interacciones por carga e hidrofóbicas entre determinados residuos. Éstos se encuentran en los dominios C-terminal y N-terminal de la proteína (Karlin y Brocchieri, 1996).
- **Dominio de unión a LexA y otras proteínas.** En esta región destacan el aminoácido 243, posición por la que compiten LexA y el DNA, y el aminoácido 229, siendo ambos residuos esenciales para la interacción con otras proteínas (Karlin y Brocchieri, 1996).



**Figura 1.4.** Estructura tridimensional de un monómero de la proteína RecA. Las cadenas  $\beta$  se han numerado de la 1 a la 8 y se señalan los bucles L1 (aminoácidos 157-164) y L2 (aminoácidos 195-209). La posición que ocupa el ADP se señala en blanco. Modificado de Rehrauer y Kowalczykowski (1996).

#### 1.2.1.1.2. Funciones de la proteína RecA

La proteína RecA es capaz de llevar a cabo diferentes funciones que permiten su participación en la respuesta SOS y en el proceso de recombinación homóloga (Little y Mount, 1982; Lusetti y Cox 2002).

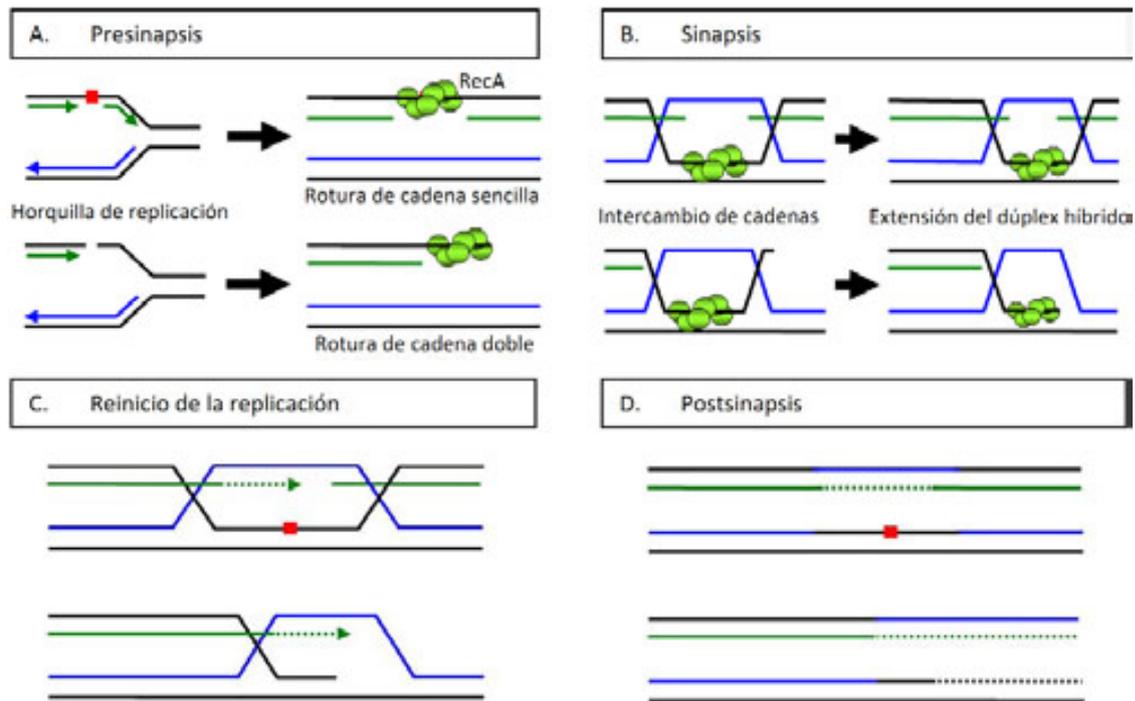
En primer lugar, la proteína RecA\* actúa como una **coproteasa**, promoviendo la autohidrólisis de proteínas como LexA, UmuD o el represor fágico CI. Es esta actividad la que le permite operar como activadora de la respuesta SOS, ya que RecA\* induce la autohidrólisis de la proteína LexA, permitiendo la expresión del regulón SOS (Walker, 1984; Little, 1991).

En segundo lugar, RecA forma parte de **la DNA polimerasa V**, una polimerasa específica de la respuesta SOS. La unión entre RecA y la DNA polimerasa V activa a esta última para que pueda llevar a cabo su función en la síntesis de DNA por translesión específica de la respuesta SOS, explicada con detalle en próximos apartados (Jiang *et al.*, 2009).

Por último, RecA cumple una función muy importante durante el proceso de recombinación homóloga, promoviendo el **apareamiento entre cadenas complementarias y el intercambio de bases** (Kuzminov, 1999). Los procesos de recombinación homóloga tienen como objetivo la reparación de, entre otras lesiones, las roturas de doble cadena, los enlaces intercatenarios o las horquillas de replicación estancadas por la presencia de roturas en el DNA. En este último caso, las roturas pueden ser de cadena sencilla, ocasionadas por el salto de la DNA polimerasa al encontrarse con una lesión en la cadena molde, o de cadena doble, ocasionadas por el salto de la DNA polimerasa al encontrar una discontinuidad en la cadena molde. En esta situación, ninguna de las dos hebras que constituyen el dúplex formado por la cadena molde y la cadena que se está sintetizando está intacta, lo cual impide la actuación de otros sistemas de reparación para superar la lesión. Los procesos de recombinación están encaminados a aportar esta cadena intacta para que actúe como molde y permita continuar con la replicación y llevar a cabo la reparación del DNA (Kuzminov, 1999; Cox, 2001).

El proceso de recombinación homóloga puede dividirse en las siguientes fases (Fig. 1.5) (Kuzminov, 1999):

1. **Presinapsis.** Tras la formación del ssDNA, RecA nucleofilamenta a su alrededor.
2. **Sinapsis.** El complejo formado por RecA y el ssDNA busca, en el dúplex intacto de la horquilla de replicación, la región homóloga a este ssDNA. Una vez localizada esta región, RecA cataliza el intercambio de cadenas entre los dos dúplex. En el intercambio, la cadena de ssDNA forma puentes de hidrógeno con la cadena complementaria del dúplex intacto, mientras que la cadena idéntica al ssDNA es desplazada. Este intercambio de cadenas no requiere la hidrólisis de ATP, pero la extensión del dúplex híbrido, mediada también por RecA, sí la necesita.
3. **Reinicio de la replicación.** La cadena de ssDNA puede continuar con la replicación, utilizando como molde la cadena de DNA aportada tras el intercambio de cadenas con el dúplex intacto de la horquilla de replicación.
4. **Postsinapsis.** Las estructuras originadas como consecuencia del intercambio de cadenas se resuelven.



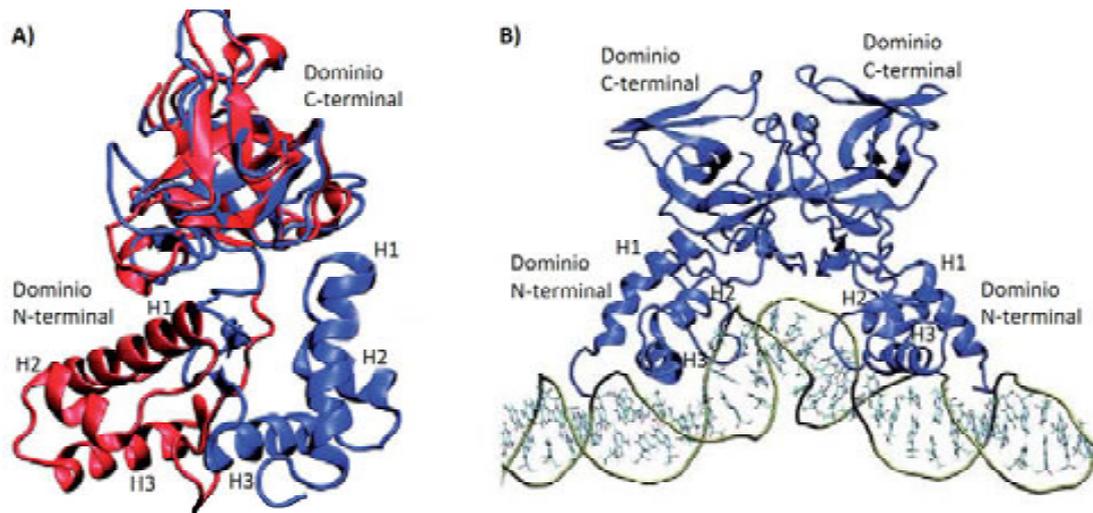
**Figura 1.5.** Esquema del proceso de reparación por recombinación en el caso de roturas de cadena sencilla o roturas de doble cadena en el DNA (parte superior o inferior de cada esquema, respectivamente). A) RecA nucleofilamenta alrededor del ssDNA. B) El complejo RecA-ssDNA busca en el dúplex intacto de la horquilla de replicación la región homóloga al ssDNA, y RecA cataliza el intercambio de cadenas entre ambos dúplex, de tal modo que el ssDNA forma puentes de hidrógeno con la cadena complementaria del dúplex intacto. C) La cadena intacta de DNA aportada durante el intercambio de cadenas entre los dúplex sirve como molde para que pueda comenzar de nuevo la replicación. D) Las estructuras originadas a consecuencia del intercambio de cadenas se resuelven y la lesión en el DNA se reparará usando como molde la cadena complementaria intacta.

## 1.2.1.2. La proteína LexA

### 1.2.1.2.1. Estructura de la proteína LexA

LexA es el represor del sistema SOS (Little y Mount, 1982). La forma funcional de esta proteína es un dímero, el cual interacciona con una secuencia específica del promotor de los genes pertenecientes al regulón SOS llamada caja SOS (Little y Mount, 1982; Mohana-Borges *et al.*, 2000). A través de esta interacción, LexA puede llevar a cabo su función represora.

Cada uno de los monómeros de LexA está formado por dos dominios estructurales diferentes unidos entre sí por una región conectora (Luo *et al.*, 2001). Esta región conectora mantiene a los dos monómeros a una distancia tal, que la forma dimérica de la proteína sólo puede interaccionar con un número limitado de pares de bases del promotor de los genes SOS, que se corresponde con el tamaño de la caja SOS (Fig. 1.6) (Oertel-Buchheit *et al.*, 1993).



**Figura 1.6.** Estructura de la proteína LexA. A) Se muestra la estructura tridimensional de un monómero de la proteína LexA (en rojo) y, superpuesta, la estructura de un monómero unido al DNA (en azul). Se señalan los dominios N y C-terminal, así como las hélices I, II y III del dominio N-terminal (H1, H2 y H3, respectivamente). B) Modelo de un dímero de LexA unido al operador del gen *cka* de *E. coli*. Modificado de Butala *et al.* (2007) y Butala *et al.* (2009).

Cada uno de los dominios de la proteína LexA presenta una estructura y función características:

- **Dominio N-terminal.** Este dominio, que comprende los residuos 1-69, contiene tres hélices  $\alpha$  situadas entre los aminoácidos 6-21 (hélice I), 28-35 (hélice II) y 41-52 (hélice III), las cuales están seguidas por dos cadenas  $\beta$  antiparalelas entre los residuos 50-58 y 66-68 (Fig. 1.6 A) (Fogh *et al.*, 1994; Luo *et al.*, 2001). Este es el dominio que permite la interacción con el DNA y, por lo tanto, la interacción con la caja SOS para el control de los genes del sistema. Las hélices  $\alpha$  II y III forman entre ellas un motivo hélice-giro-hélice (HTH, por *Helix-Turn-Helix*) responsable de dicha unión (Fogh *et al.*, 1994). Es la hélice III la que tiene mayor importancia en la interacción con el DNA, por lo que es también la que presenta mayor variabilidad entre especies, debido a las diferencias en la secuencia de la caja SOS entre ellas (Thliveris y Mount, 1992; Garriga *et al.*, 1992).
- **Dominio C-terminal.** Este dominio, que comprende los aminoácidos 75-202, está compuesto por hojas  $\beta$  y permite la dimerización de la proteína LexA y la autohidrólisis mediada por RecA\* (Fig. 1.6). En la interacción entre los dos monómeros de LexA están implicadas la hoja  $\beta$  b11 y las regiones comprendidas entre los residuos Gln<sub>99</sub>-Asp<sub>110</sub> y Ser<sub>116</sub>-Gly<sub>128</sub>, pudiéndose formar así la estructura dimérica funcional (Schnarr *et al.*, 1988; Luo *et al.*, 2001). Para la autohidrólisis de la proteína son importantes tres regiones de este dominio. En primer lugar, en él se sitúa el punto de interacción con la proteína RecA\* (Little, 1984). En segundo lugar, también está situado en este dominio el punto de rotura de la proteína LexA, entre los residuos Ala<sub>84</sub> y Gly<sub>85</sub> (Fig. 1.8) (Horii

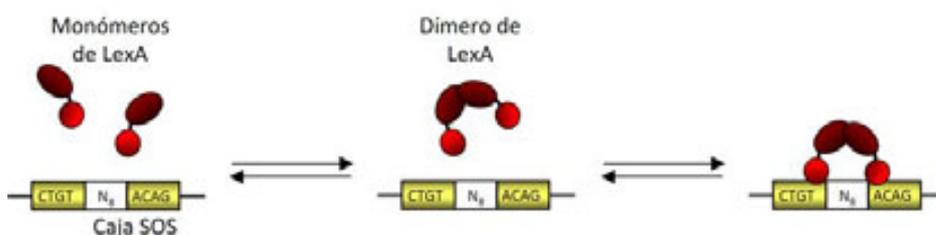
*et al.*, 1981; Luo *et al.*, 2001). Por último, se encuentra también en esta región el centro catalítico de la reacción, constituido por los aminoácidos Ser<sub>119</sub> y Lys<sub>156</sub> (Fig. 1.8) (Luo *et al.*, 2001).

#### 1.2.1.2.2. Unión de la proteína LexA a la caja SOS

Para que los dímeros de LexA lleven a cabo su función represora, han de interactuar con la caja SOS localizada en la región promotora de los genes bajo su control. Esta caja SOS es una secuencia palindrómica de 16 pares de bases cuyo motivo consenso es CTGT-N<sub>8</sub>-ACAG y que se encuentra situada en la región -10 del promotor o cerca de ella, de forma que la unión de LexA bloquea el acceso de la RNA polimerasa al DNA, inhibiendo la expresión génica (Walker, 1984; Kuzminov, 1999). Los motivos CTGT y ACAG son los más conservados y, por tanto, son los esenciales para el reconocimiento de la proteína LexA. Sin embargo, el resto de nucleótidos están menos conservados y son los responsables de determinar la estabilidad con la que LexA se unirá al promotor. Por lo tanto, también determinarán el tiempo que tardarán los genes en expresarse tras la inducción de la respuesta SOS (Kuzminov, 1999).

Inicialmente se estableció que la unión de los dímeros de LexA a la caja SOS se daba de forma secuencial, uniéndose primero uno de los monómeros al motivo CTGT de la caja y, posteriormente, el segundo monómero al motivo ACAG y al monómero ya unido (Kim y Little, 1992).

Sin embargo, trabajos más recientes han demostrado que, a la concentración intracelular, la proteína LexA en solución se encuentra principalmente en forma dimérica (Mohana-Borges *et al.*, 2000; Giese *et al.*, 2008). Esto demuestra que, en realidad, la unión a la caja SOS no se da de forma secuencial, sino que LexA se une, ya en forma dimérica, al DNA (Fig. 1.7) (Mohana-Borges *et al.*, 2000).

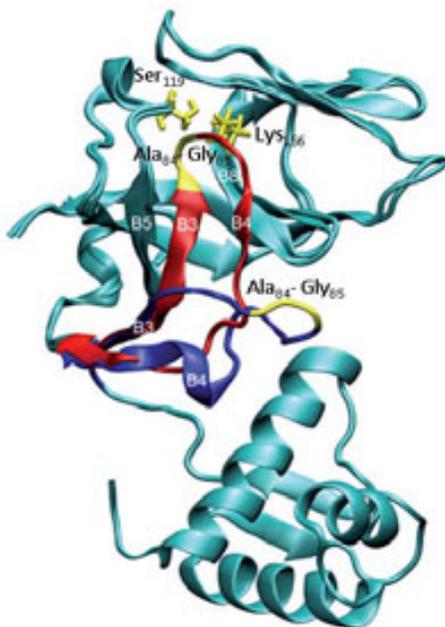


**Figura 1.7.** Modelo de interacción entre la proteína LexA y la caja SOS de los genes bajo su control. En el interior celular, la proteína LexA en solución se encuentra principalmente en forma dimérica, uniéndose en esta forma a la caja SOS de los genes que regula.

### 1.2.1.2.3. Autohidrólisis de la proteína LexA

La interacción de LexA con RecA\* es la señal que induce la autohidrólisis del represor, gracias a la actividad coproteasa de RecA\* (Little y Mount, 1982).

El punto de autohidrólisis de LexA, que corresponde al enlace peptídico entre los aminoácidos Ala<sub>84</sub> y Gly<sub>85</sub> (Horii *et al.*, 1981), puede adoptar dos conformaciones distintas (Fig. 1.8). En la primera, este punto queda separado del centro catalítico de la reacción, la región hidrofóbica situada entre los aminoácidos Ser<sub>119</sub> y Lys<sub>156</sub>. Es por ello que en esta conformación LexA no puede autohidrolizarse. Sin embargo, en la segunda conformación, el punto de autohidrólisis queda situado en el centro activo, en contacto con los aminoácidos Ser<sub>119</sub> y Lys<sub>156</sub>, permitiéndose así la autohidrólisis de la proteína (Luo *et al.*, 2001).



**Figura 1.8.** Estructura tridimensional de la proteína LexA en su estado hidrolizable superpuesta a la estructura en el estado no hidrolizable. En la región catalítica están señalados los aminoácidos Ser<sub>119</sub> y Lys<sub>156</sub>. El punto de hidrólisis, entre los aminoácidos Ala<sub>84</sub> y Gly<sub>85</sub>, está indicado en amarillo. En la forma no hidrolizable (región de hidrólisis coloreada en azul oscuro), este punto queda lejos del centro catalítico de la reacción, mientras que en la forma hidrolizable (región de hidrólisis coloreada en rojo), este enlace queda en contacto con la Ser<sub>119</sub>. Modificado de Butala *et al.* (2009).

El mecanismo de hidrólisis de LexA recuerda al descrito para las serín proteasas (Luo *et al.*, 2001). En el proceso, la interacción con RecA\* induce un cambio conformacional en LexA y la desprotonización del grupo amino de la Lys<sub>156</sub>, la cual lleva a cabo un ataque nucleofílico sobre la Ser<sub>119</sub>, a la que sustrae un protón de su grupo hidroxilo. Por ello, la Ser<sub>119</sub> ataca finalmente al enlace peptídico entre la Ala<sub>84</sub> y la Gly<sub>85</sub>, produciéndose la autohidrólisis de LexA (Slilaty y Little, 1987).

Estudios recientes demuestran que la interacción entre LexA y RecA\* se da cuando el represor se encuentra en forma dimérica, pero únicamente si no se encuentra unido a DNA (Giese *et al.*, 2008; Butala *et al.*, 2011), hecho ya sugerido previamente (Barbé *et al.*, 1986). La interacción y la hidrólisis se dan de forma secuencial, primero en uno de los monómeros y luego en el otro (Giese *et al.*, 2008; Butala *et al.*, 2011). Por tanto, cuando la célula presenta lesiones en su

DNA, RecA\* induce la autohidrólisis del LexA no unido a DNA, haciendo descender sus niveles intracelulares. Esto provoca que los dímeros de LexA que sí se encuentran unidos a DNA se separen de él, liberando los promotores de los genes del sistema SOS e induciendo la respuesta (Butala *et al.*, 2011).

Los dominios N y C-terminal de la proteína LexA intacta presentan unos motivos de reconocimiento de la proteasa ClpXP ocultos. Sin embargo, tras la autohidrólisis, estos motivos quedan expuestos, de forma que la proteasa ataca ambos dominios y los degrada (Neher *et al.*, 2003). Esto es especialmente importante en el caso del dominio N-terminal (dominio de unión al DNA), ya que su acumulación es deletérea para la célula tras sufrir lesiones en el DNA, mientras que su degradación por la proteasa ClpXP favorece la supervivencia celular (Neher *et al.*, 2003).

### **1.2.1.3. Mecanismo molecular de inducción del sistema SOS**

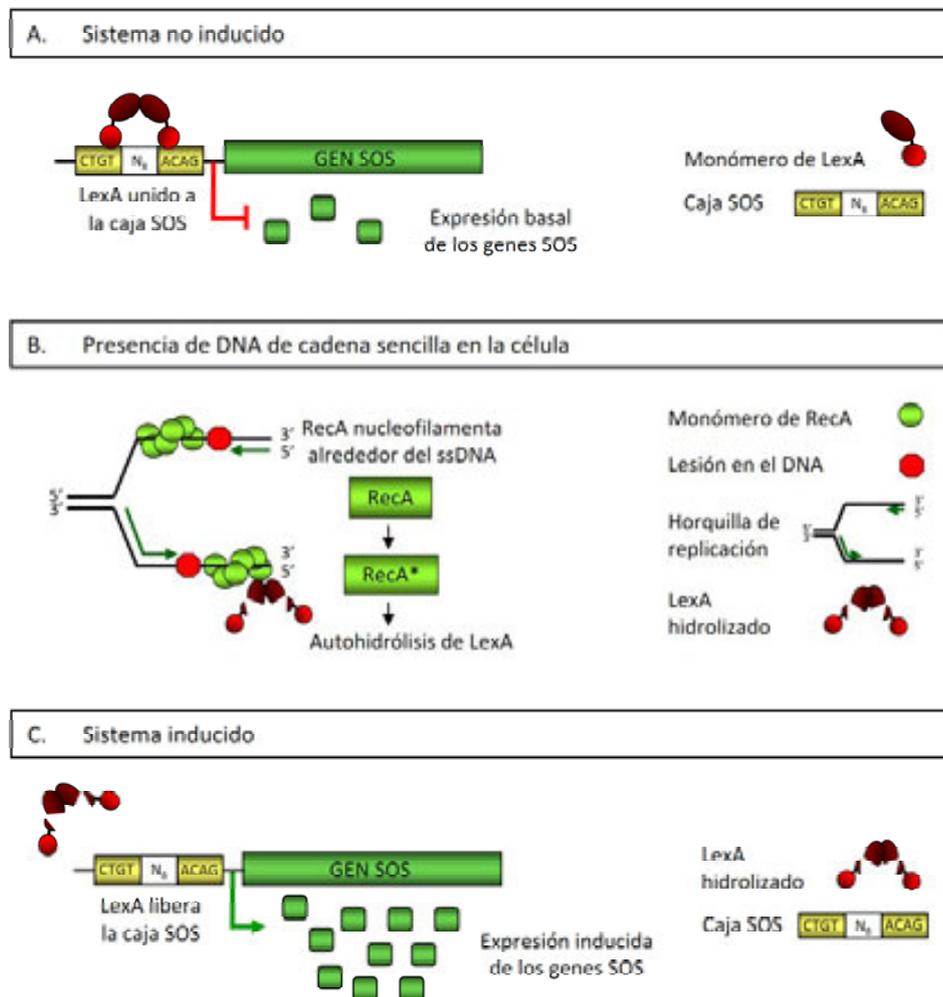
LexA y RecA son el represor y el activador del sistema SOS respectivamente, tal y como se indica en apartados anteriores (Little y Mount, 1982). Sin embargo, cabe destacar que los genes que las codifican forman parte del regulón SOS, es decir, están regulados por ellas mismas (Fernández de Henestrosa *et al.*, 2000).

En condiciones no lesivas para la célula, cuando el DNA no presenta un nivel elevado de lesiones, la forma dimérica de la proteína LexA se encuentra unida a su propio promotor, al de *recA* y al del resto de genes que forman parte del regulón SOS, reprimiendo su expresión (Fig. 1.9 A) (Little y Mount, 1982; Mohana-Borges *et al.*, 2000).

Sin embargo, cuando la presencia de un agente lesivo en el entorno produce lesiones en el DNA que superan la capacidad de los sistemas de reparación, se produce un bloqueo de la replicación y/o la generación masiva de ssDNA en la célula. En estas condiciones, la proteína RecA se une a este ssDNA y adquiere su forma activada RecA\* (Fig. 1.9 B) (Walker, 1984; Sassanfar y Roberts, 1990; Walker, 1995). Gracias a su actividad coproteasa, RecA\* induce la autohidrólisis de LexA, de tal modo que este último no puede unirse a los promotores de los genes que controla, induciéndose así la expresión del regulón SOS (Fig. 1.9 C) (Walker, 1984; Little, 1991).

El incremento en la expresión de los genes del sistema SOS facilita la superación de las lesiones, lo que produce un descenso en los niveles de ssDNA en la célula. Como consecuencia, disminuye también la concentración de RecA\* intracelular y, por lo tanto, la autohidrólisis de LexA. De este modo, el represor puede unirse de nuevo a los genes del sistema SOS y éste vuelve a su nivel basal de inducción (Crowley y Courcelle, 2002). En *E. coli*, otras proteínas, como DinI o RecX, modulan la capacidad de interacción entre RecA y el ssDNA durante la

respuesta SOS, facilitando el retorno del sistema a este nivel basal de inducción (Renzette *et al.*, 2007). Sin embargo, estas proteínas no están presentes en todas las especies bacterianas que presentan sistema SOS, lo que indica que no son indispensables para regular el sistema.



**Figura 1.9.** Modelo de inducción del sistema SOS. A) Cuando la célula no presenta una elevada cantidad de lesiones en el DNA, LexA se encuentra unida a la caja SOS de los genes bajo su control inhibiendo su expresión. B) En entornos lesivos para la célula, cuando ésta presenta lesiones en el DNA que superan la capacidad de los sistemas de reparación, se genera ssDNA en la célula. RecA se une a este ssDNA y adquiere su forma activada (RecA\*), la cual induce la autohidrólisis de LexA. C) La proteína LexA autohidrolizada no puede unirse a los promotores de los genes bajo su control. Se induce así el sistema SOS.

#### 1.2.1.4. Genes del sistema SOS

La finalidad última del sistema SOS es superar las lesiones en el DNA y permitir la viabilidad celular, aunque ello suponga un descenso en la fidelidad de copia del DNA y un incremento en la tasa de mutagénesis. Por este motivo, muchos de los más de 40 genes que constituyen el

regulón SOS (Fernández de Henestrosa *et al.*, 2000; Courcelle *et al.*, 2001) participan en funciones celulares asociadas a la reparación del DNA y la superación de las lesiones, como por ejemplo, los mecanismos de reparación por escisión de nucleótido, la síntesis de DNA por translesión o la inhibición de la división celular (Tabla 1.3) (Walker, 1984; Crowley y Courcelle, 2002; Napolitano *et al.*, 2000; Jarosz *et al.*, 2007; Trusca *et al.*, 1998).

**Tabla 1.3.** Genes pertenecientes al sistema SOS de *E. coli*.

Gen	Función
Cromosómicos	
<i>polB (dinA)</i>	DNA polimerasa II
<i>dinB (dinP)</i>	DNA polimerasa IV
<i>dinD (pcsA)</i>	Desconocida
<i>dinF</i>	Desconocida. Está en el mismo operón que <i>lexA</i>
<i>dinG</i>	Desconocida
<i>dinI</i>	Inhibición de la proteína UmuD. Estabilizador de los filamentos de RecA
<i>dinL (yjiW, sosC)</i>	Desconocida
<i>dinM (ydjQ, sosD)</i>	Posible homólogo a <i>uvrC</i>
<i>dinO (molR, sosF)</i>	Desconocida
<i>dinQ</i>	Desconocida
<i>dinS</i>	Posible transposasa
<i>ftsK (dinH)</i>	División celular y segregación cromosómica
<i>hokE</i>	Posible proteína tóxica para la célula
<i>lexA</i>	Represor del sistema SOS
<i>recA</i>	Recombinación, coproteasa, activador del sistema SOS, mutagénesis SOS
<i>recN</i>	Recombinación por la vía RecF, reparación de roturas de cadena doble y sencilla
<i>recX</i>	Modulador del sistema SOS. Inhibidor de las funciones de RecA
<i>ruvAB</i>	Recombinación por la vía RecF
<i>sbmC</i>	Resistencia a la microcina B17
<i>ssb</i>	Unión a ssDNA.
<i>sulA</i>	Inhibición de la división celular
<i>umuDC</i>	DNA polimerasa V. Mutagénesis SOS
<i>uvrA</i>	Reparación por escisión de nucleótido
<i>uvrB</i>	Reparación por escisión de nucleótido
<i>uvrD</i>	Helicasa II
<i>ybfE</i>	Desconocida
<i>ydjM</i>	Desconocida
<i>yebG</i>	Desconocida
<i>ysdAB</i>	Desconocida
Extracromosómicos	
<i>caa</i>	Producción de colicina ColA
<i>ckA</i>	Producción de colicina ColK
<i>cea</i>	Producción de colicina Col E1
<i>impAB</i>	Homólogo a <i>umuDC</i> . Mutagénesis SOS
<i>mucAB</i>	Homólogo a <i>umuDC</i> . Mutagénesis SOS
<i>samAB</i>	Homólogo a <i>umuDC</i> . Mutagénesis SOS
<i>cl*</i>	Represor del ciclo lítico
<i>tum</i>	Antirepresor del ciclo lítico (fago $\phi$ 186)
Represores fágicos*	

\*No están regulados por LexA, pero tienen un mecanismo análogo de hidrólisis.

Modificado de Friedberg *et al.* (1995); Walker (1996); Koch y Woodgate (1998); Fernández de Henestrosa *et al.* (2000); Courcelle *et al.* (2001); Erill *et al.* (2007).

Cabe destacar que no todos los genes vinculados al sistema SOS son cromosómicos, sino que existen genes en elementos extracromosómicos, como fagos o plásmidos, cuya expresión también está regulada por LexA (Tabla 1.3).

#### **1.2.1.4.1. Genes del sistema SOS asociados a la reparación por recombinación**

En *E. coli* existen dos sistemas principales de reparación por recombinación, el sistema RecFOR y el sistema RecBCD (Kuzminov, 1999).

El sistema de recombinación **RecFOR** recibe este nombre por las primeras proteínas identificadas en él (RecF, RecO y RecR). Sin embargo, además de los genes *recF*, *recO* y *recR*, los genes *recN*, *recJ*, *recQ* y *recA* también están implicados en él. El sistema RecFOR entra en acción cuando, durante la replicación, una lesión en la cadena molde provoca el salto de la DNA polimerasa. Esto genera una discontinuidad en la cadena recién sintetizada y, por lo tanto, una región de ssDNA, a la cual se unen las proteínas Ssb (Kuzminov, 1999). Las proteínas RecF, RecO y RecR se unen a este ssDNA y atraen a RecA para que se una a él, desplazando a las proteínas Ssb (Clark y Sandler, 1994; Kuzminov, 1999).

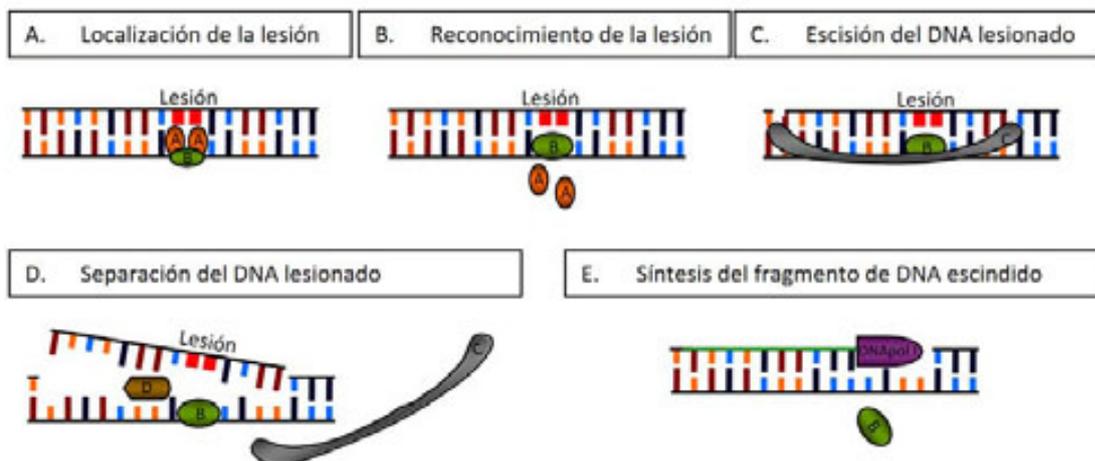
El sistema **RecBCD** es el encargado de reparar las roturas de doble cadena en el DNA (Anderson y Kowalczykowski, 1998). Para ello, el complejo formado por las proteínas RecB, RecC y RecD se une al extremo donde se ha producido la rotura y lo degrada mediante su actividad exonucleasa. En una primera etapa, el complejo degrada ambas cadenas, pero cuando encuentra una secuencia  $\chi$  (5'-GCTGGTGG-3') adquiere actividad recombinasa (RecBCD\*). En este estado, degrada únicamente la cadena del extremo 5', dejando así un extremo protuberante 3' de ssDNA. A este extremo se unen en primer lugar las proteínas Ssb, pero éstas son desplazadas posteriormente por la unión de la proteína RecA (Anderson y Kowalczykowski, 1998; Kuzminov, 1999).

En ambos casos, la unión de RecA al ssDNA promueve la reparación por recombinación siguiendo el proceso descrito en apartados anteriores (Fig. 1.5).

#### **1.2.1.4.2. Genes del sistema SOS asociados a la reparación por escisión de nucleótido**

El sistema de reparación por escisión de nucleótido o sistema NER (por *Nucleotide Excision Repair*) participa en la reparación de una gran variedad de lesiones producidas por diferentes factores lesivos para la célula, como la luz UV o agentes químicos. Está formado por las proteínas codificadas por los genes *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* y *uvrD*, de los que únicamente *uvrC* no forma parte del regulón SOS en *E. coli* (Fernández de Henestrosa *et al.*, 2000; Courcelle *et al.*, 2001). Estas proteínas reconocen las lesiones en el DNA y eliminan las bases incorrectas, permitiendo el uso de la cadena complementaria como molde para sustituirlas.

Durante el proceso de reparación, el complejo formado por UvrA y UvrB (Orren y Sancar, 1989) recorre el DNA desde su extremo 5' en busca de posibles lesiones (Moolenaar *et al.*, 2000). Cuando localiza una lesión, UvrB la confirma y queda unido al DNA formando el complejo UvrB-DNA, mientras que UvrA se libera (Fig. 1.10 A y B) (Moolenaar *et al.*, 2001). El anclaje de UvrB al DNA permite la incorporación al complejo de UvrC (Orren y Sancar, 1989), el cual realiza dos incisiones, una a cada lado de la lesión, permitiendo la escisión del fragmento de DNA dañado (Fig. 1.10 C) (Verhoeven *et al.*, 2000). Posteriormente, UvrD (helicasa II) separa a UvrC y al trozo de DNA escindido por ella del complejo UvrB-DNA (Fig. 1.10 D) (Orren *et al.*, 1992). Finalmente, la DNA polimerasa I disocia a UvrB de la cadena intacta del DNA y se encarga de la polimerización del fragmento de DNA eliminado, utilizando como molde dicha cadena intacta (Fig. 1.10 E). Por último, la DNA ligasa genera el enlace fosfodiéster que unirá el extremo 3' del DNA recién sintetizado, dando continuidad a la molécula (Orren *et al.*, 1992).



**Figura 1.10.** Esquema del modelo de reparación por escisión de nucleótido. A) El complejo formado por UvrA (círculos naranjas) y UvrB (óvalo verde) recorre el DNA hasta localizar una lesión. B) UvrB confirma la lesión y queda unido al DNA. C) UvrC (representado en gris) acude al punto de lesión y realiza dos incisiones a cada lado de la lesión. D) UvrD (representado en marrón) separa a UvrC y al fragmento de DNA lesionado. E) La DNA polimerasa I (representada en lila) separa a UvrB del DNA y sintetiza de nuevo el fragmento de DNA escindido.

Este proceso de reparación, conocido como *short patch repair*, elimina fragmentos de un máximo de 12 nucleótidos. Sin embargo, cuando la lesión no puede ser reparada por este sistema, interviene el mecanismo conocido como *long patch repair*, que elimina fragmentos mucho mayores, de hasta 9000 bp (Smith, 2004). Mediante este sistema, las proteínas UvrA, UvrB y UvrC son las encargadas de llevar a cabo la escisión de las lesiones, pero la reparación posterior del DNA tiene lugar mediante procesos de recombinación homóloga mediados por RecA y RecF (Cooper y Hanawalt, 1972; Courcelle *et al.*, 1999; Bichara *et al.*, 2011). El mecanismo que permite la eliminación de fragmentos de DNA de tan elevado tamaño no ha sido descrito, pero la hipótesis más aceptada sugiere que es consecuencia del reinicio de la replicación tras la eliminación de la lesión por UvrA, UvrB y UvrC (Courcelle *et al.*, 1999).

### 1.2.1.4.3. Genes del sistema SOS asociados a la síntesis de DNA por translesión

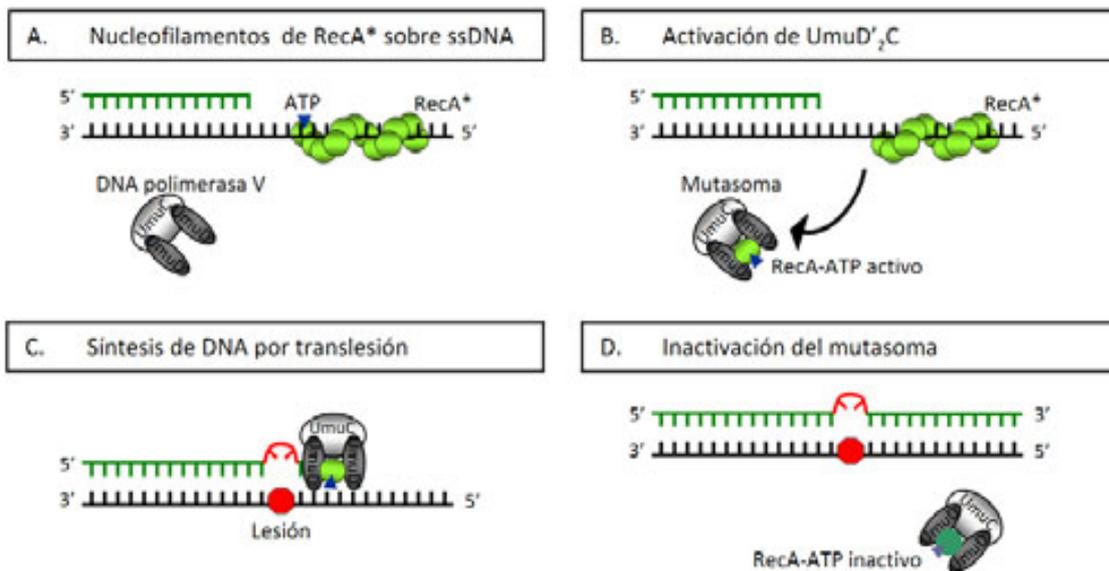
La síntesis de DNA por translesión es el último recurso que tiene la célula para superar las lesiones en el DNA y permitir la viabilidad celular. Este sistema, que forma parte del regulón SOS, actúa cuando los mecanismos de reparación del material genético no han podido resolver dichas lesiones y la célula continúa sin poder replicar (Courcelle *et al.*, 2006). Mediante la síntesis de DNA por translesión, la célula copia una cadena de DNA dañada introduciendo nucleótidos al azar en los puntos donde se localizan las lesiones (Kuzminov, 1999), de tal modo que la célula consigue replicar su material genético y sobrevivir. Sin embargo, este mecanismo de replicación supone un descenso en la fidelidad de copia del DNA, ya que la introducción de nucleótidos al azar produce un aumento en el número de mutaciones. Por este motivo, este proceso se conoce también como replicación tendente al error o mutagénesis SOS (Kuzminov, 1999) y se induce en las fases finales de la respuesta SOS, cuando la célula no es capaz de sobrevivir mediante ninguna otra vía.

Existen diferentes polimerasas implicadas en la síntesis de DNA por translesión, entre ellas la DNA polimerasa V, complejo proteico formado por las proteínas codificadas en los genes *umuC* y *umuD*, ambos pertenecientes al regulón SOS (Sommer *et al.*, 1998; Kuzminov, 1999). La DNA polimerasa V tiene como peculiaridad que, tanto para su formación como para su activación, es necesaria la actividad de la proteína RecA\* (Bruck *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1999; Mustard y Little, 2000; Jiang *et al.*, 2009).

En una primera etapa, RecA\* promueve la autohidrólisis de la proteína UmuD en un mecanismo análogo al de LexA (Mustard y Little, 2000). De esta manera, UmuD adquiere su forma funcional UmuD', la cual es capaz de formar un complejo heterólogo con UmuC, UmuD'<sub>2</sub>C (Bruck *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1999). Este complejo es el que se conoce como DNA polimerasa V (Tang *et al.*, 1999).

Una vez se forma el complejo UmuD'<sub>2</sub>C, éste ha de actuar sobre el DNA lesionado. Para ello, se necesita de nuevo la participación de RecA. En este caso, RecA se encuentra en su forma activada, formando nucleofilamentos sobre el ssDNA producido por la presencia de lesiones que no han podido ser reparadas (Fig. 1.11 A). La DNA polimerasa V acude a uno de estos nucleofilamentos de RecA\*, desde el cual le es transferido un monómero de RecA unido a ATP. Se forma así el complejo DNA polimerasa V-RecA-ATP, que constituye el mutasoma, la forma activa de la DNA polimerasa V (Fig. 1.11 B) (Jiang *et al.*, 2009). Este mutasoma acude entonces en busca de una región en la que la horquilla de replicación haya quedado estancada por la presencia de una lesión. Cuando la localiza, se une a dicha región y procede con la síntesis del DNA (Fig. 1.11 C) (Jiang *et al.*, 2009), incorporando nucleótidos al azar frente a la lesión (Kuzminov, 1999). Tras una ronda de síntesis de DNA, el mutasoma se inactiva, pero puede ser

reactivado mediante la interacción con un nuevo nucleofilamento de RecA\* que sustituya el monómero de RecA unido a ATP ahora inactivo por otro activo (Fig. 1.11 D) (Jiang *et al.*, 2009).



**Figura 1.11.** Modelo esquemático del proceso de síntesis de DNA por translesión. A) RecA\* se encuentra en forma de nucleofilamentos alrededor del ssDNA. B) Un monómero de RecA unido a ATP es transferido a la DNA polimerasa V, activándola y constituyendo el mutasoma. C) El mutasoma acude a una horquilla de replicación estancada por una lesión y sintetiza el DNA, incorporando nucleótidos al azar frente a la lesión. D) Tras una ronda de síntesis de DNA, el mutasoma se inactiva.

Las DNA polimerasas II y IV, están implicadas también en la síntesis de DNA por translesión y se inducen como parte del sistema SOS (Goodman, 2002). Sin embargo, aunque el mecanismo de replicación tendente al error es equivalente al anterior, en estos casos la proteína RecA no está directamente implicada en su función (Schlachter *et al.*, 2006).

#### 1.2.1.4.4. Otras funciones del sistema SOS

Además de las funciones de reparación del material genético, el sistema SOS está asociado a otros procesos. Uno de los más importantes es la inhibición de la división celular, mediada por la proteína SulA (Huisman y D'Ari, 1981). Esta proteína impide la formación del anillo FtsZ, induciendo la filamentación reversible de la célula durante el proceso de reparación (Bi y Lutkenhaus, 1993). De esta manera, se impide la división celular hasta que el material genético es reparado.

Otra de las consecuencias de la activación del sistema SOS es la inducción de profagos residentes en la célula (Sauer *et al.*, 1982). El represor del ciclo lítico de algunos bacteriófagos, como el fago  $\lambda$  o el P22, presenta un sistema de autohidrólisis análogo al de las proteínas LexA o UmuD, de modo que RecA\* induce su autohidrólisis y, por tanto, el ciclo lítico del bacteriófago (Sauer *et al.*, 1982). En otros casos, es un inhibidor del represor del ciclo lítico,

codificado por el gen *tum*, el que está regulado por la proteína LexA (Shearwin *et al.*, 1998). Por tanto, cuando se induce el sistema SOS y la proteína LexA se autohidroliza, este inhibidor Tum se expresa, bloqueando la acción del represor del ciclo lítico. Como consecuencia, se induce la escisión del genoma vírico y la producción de nuevos viriones.

La activación de la respuesta SOS está implicada también en la expresión y la transferencia horizontal de determinados factores de virulencia. En la especie *Staphylococcus aureus*, esta activación induce la transferencia horizontal de islas de patogenicidad contenidas en su cromosoma (Úbeda *et al.*, 2005; Maiqués *et al.*, 2006). En el caso de *Vibrio cholerae* o de *E. coli* enterohemorrágica, la activación de la respuesta induce la expresión de toxinas codificadas en profagos residentes (toxina colérica y toxina Shiga, respectivamente), favoreciendo el desarrollo de la infección (Quinones *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2000).

Por último, la inducción de la respuesta SOS promueve también la expresión y la transferencia horizontal de resistencias antibióticas codificadas en elementos móviles. En primer lugar, estudios recientes demuestran que la proteína LexA inhibe la expresión del gen plasmídico *qnrB2*, el cual codifica un factor de resistencia a fluoroquinolonas (Da Re *et al.*, 2009). Por lo tanto, la inducción del sistema SOS promueve la expresión de este factor de resistencia. En segundo lugar, la activación de la respuesta SOS induce la transferencia horizontal del elemento conjugativo SXT de *E. coli* y *V. cholerae* (Beaber *et al.*, 2004). La proteína SetR, codificada en este mismo elemento, es un represor del proceso de transferencia. Su inactivación, por un sistema análogo al de LexA, permite la transferencia horizontal del elemento SXT y, en consecuencia, la de los genes de resistencia antibiótica codificados en él. Por último, se ha observado también que LexA inhibe la expresión de la integrasa de los integrones, de modo que la inducción del sistema SOS facilita la transferencia horizontal de los casetes génicos asociados a estos elementos, entre los cuales se encuentran codificados, no sólo resistencias antibióticas, sino también otros muchos factores (Guerin *et al.*, 2009).

### 1.2.1.5. Agentes inductores del sistema SOS

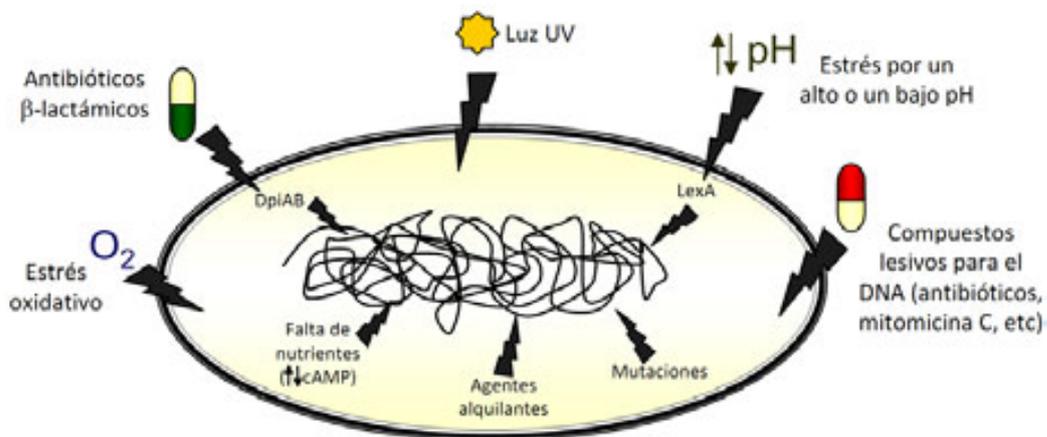
Entre los agentes inductores del sistema SOS encontramos factores tanto endógenos como exógenos (Fig. 1.12).

El sistema se describe por primera vez como una respuesta génica a las lesiones en el DNA causadas por la irradiación con luz UV (Witkin, 1967; Witkin, 1976). Sin embargo, estudios posteriores demuestran la existencia de otros muchos **factores exógenos** capaces de inducir la respuesta SOS, como, por ejemplo, agentes mutágenos como la mitomicina C (Kenyon y Walker, 1980), antibióticos como los pertenecientes al grupo de las quinolonas (Piddock *et al.*, 1990) o el estrés oxidativo (Imlay y Linn, 1987). Trabajos más recientes muestran, no obstante, que algunos factores exógenos pueden inducir el sistema SOS sin causar lesiones de forma

directa en el DNA. Así, por ejemplo, en presencia de bajos niveles de pH, la proteína LexA tiende a formar agregados incapaces de unirse al DNA o tetrámeros con una mayor afinidad por regiones inespecíficas en el DNA, liberando por ambas vías los promotores de los genes del sistema SOS, lo que conlleva su inducción (Sousa *et al.*, 2006). Sin embargo, en presencia de altos niveles de pH, LexA tiende a autohidrolizarse de forma independiente a la señal vía RecA\*, induciendo de nuevo el sistema SOS (Smith *et al.*, 1991b). De forma similar, la presencia de antibióticos bactericidas en el entorno induce el sistema SOS debido a que se generan daños por estrés oxidativo en la célula (Kohanski *et al.*, 2007), mientras que la acción de los antibióticos betalactámicos sobre la pared celular induce un sistema de dos componentes que impide la replicación celular, siendo ésta, en última instancia, la señal que induce el sistema SOS (Miller *et al.*, 2004).

Asimismo, el sistema SOS se puede activar debido a la presencia de **agentes endógenos**, como metabolitos con capacidad alquilante (Volkert *et al.*, 1989), mutaciones que afectan a procesos de replicación o reparación (O'Reilly y Kreuzer, 2004) o la falta de nutrientes (Taddei *et al.*, 1995; Janion, 2001).

Todo ello pone de manifiesto la importancia del sistema SOS como una respuesta génica global implicada en la reparación del material genético y en la adaptación a las condiciones del entorno.



**Figura 1.12.** Factores endógenos y exógenos inductores de la respuesta SOS. Modificado de Erill *et al.* (2007).

### 1.2.2. EL SISTEMA SOS EN *S. Typhimurium*

LexA y RecA son dos proteínas altamente conservadas en el Dominio Bacteria. En *S. Typhimurium* también existe una red génica regulada por estas dos proteínas y que se induce en respuesta a agentes lesivos para el DNA.

Los primeros indicios al respecto se derivan de estudios realizados en la década de 1980. En ellos se observó que *S. Typhimurium* presenta un sistema de mutagénesis inducible ante la irradiación con luz UV (Orrego y Eisenstadt, 1987) y que, además, la expresión de la proteína LexA de *E. coli* en ella produce un descenso en la expresión de su gen *recA* (Sedgwick y Goodwin, 1985). Posteriormente, Smith *et al.* (1991a) corroboraron la existencia en *S. Typhimurium* de una red de genes *din* (por *Damage Inducible*), de los cuales una parte son susceptibles a la represión por la proteína LexA de *E. coli*, confirmando de este modo la existencia del sistema SOS en *S. Typhimurium*.

Posteriormente, la secuenciación del gen *lexA* de *S. Typhimurium* y de su región promotora permitieron establecer su homología con el gen *lexA* de *E. coli* (Garriga *et al.*, 1992; Mustard *et al.*, 1992). En la región codificante existen algunos cambios respecto a la secuencia descrita para *E. coli*, que suponen diferencias sólo en 6 aminoácidos, ninguno de ellos situado en las regiones de importancia funcional (regiones de unión a DNA, dimerización o autohidrólisis). Asimismo, en la región promotora del gen *lexA* de *S. Typhimurium* existen dos cajas homólogas a la caja SOS de *E. coli*, de modo que el gen *lexA* en *S. Typhimurium* está regulado de igual manera que en *E. coli* (Garriga *et al.*, 1992). Estas observaciones, unidas al hecho de que la proteína LexA de *S. Typhimurium* es capaz de reprimir los genes *recA* y *sulA* de *E. coli* (Calero *et al.*, 1991; Mustard *et al.*, 1992), confirman la existencia de un sistema SOS en *S. Typhimurium*, regulado por las proteínas LexA y RecA, que actúan como represor y activador del sistema respectivamente.

Desde la década de 1990, numerosos estudios llevados a cabo, no sólo en *S. Typhimurium* o *E. coli*, sino también en muchas otras especies bacterianas, han permitido determinar que el sistema SOS es una respuesta ampliamente distribuida en el dominio Bacteria (Erill *et al.*, 2007), además de confirmar la similitud del regulón LexA de *S. Typhimurium* con el de *E. coli*, los cuales comparten tanto un gran número de genes regulados (Tabla 1.4), como la secuencia consenso de la caja SOS, siendo en ambos casos CTGT-N<sub>8</sub>-ACAG (Erill *et al.*, 2003).

Sin embargo, cabe destacar que una de las diferencias más significativas que se dan entre *S. Typhimurium* y *E. coli* es la letalidad de una mutación deficiente en el gen *lexA* de *S. Typhimurium*. Esto es debido, entre otros motivos, a que, además del gen *sulA*, presente también en *E. coli*, *S. Typhimurium* es portadora en su genoma de una serie de profagos, de los cuales Fels-2, Gifsy-1 y Gifsy-2 presentan la proteína Tum como reguladora del ciclo lítico. Por tanto, este ciclo se induce con la respuesta SOS. De este modo, en una cepa deficiente en el gen *lexA*, que presenta una inducción constitutiva de esta respuesta, no sólo se produce la inhibición de la división celular, sino que también se induce el ciclo lítico de los profagos mencionados, lo que lleva a la lisis celular y la muerte, aun cuando la cepa es *sulA* deficiente (Bunny *et al.*, 2002).

**Tabla 1.4.** Genes predichos y confirmados del sistema SOS de *S. Typhimurium*.

Gen	Función
<b>Cromosómicos</b>	
<i>polB (dinA)</i>	DNA polimerasa II
<i>dinB (dinP)</i>	DNA polimerasa IV
<i>dinF</i>	Desconocida. Está en el mismo operón que <i>lexA</i>
<i>dinG</i>	Desconocida
<i>dinI</i>	Inhibición de la proteína UmuD. Estabilizador de los filamentos de RecA
<i>dinL (yjiW, sosC)</i>	Desconocida
<i>dinO (molR, sosF)</i>	Desconocida
<i>ftsK (dinH)</i>	División celular y segregación cromosómica
<i>lexA</i>	Represor del sistema SOS
<i>recA</i>	Recombinación, coproteasa, activador del sistema SOS, mutagénesis SOS
<i>recN</i>	Recombinación por la vía RecF. Reparación de roturas de cadena doble y sencilla
<i>recX</i>	Modulador del sistema SOS. Inhibidor de las funciones de RecA
<i>ruvAB</i>	Recombinación por la vía RecF
<i>sbmC</i>	Resistencia a la microcina B17
<i>ssb</i>	Unión a ssDNA.
<i>sulA</i>	Inhibición de la división celular
<i>umuDC</i>	DNA polimerasa V. Mutagénesis SOS
<i>uvrA</i>	Reparación por escisión de nucleótido
<i>uvrB</i>	Reparación por escisión de nucleótido
<i>uvrD</i>	Helicasa II
<i>ydjM</i>	Desconocida
<i>yebG</i>	Desconocida
<i>msgA</i>	Proteína de supervivencia en macrófago
STM1019	Desconocida. Perteneciente a Gifsy-2
STM2621	Proteína homóloga a la proteína 15 de replicación
STM0925	Desconocida
STM2727	Desconocida
<b>Extracromosómicos</b>	
<i>cl*</i>	Represor del ciclo lítico
<i>tum</i>	Antirepresor del ciclo lítico (fago $\phi$ 186)
<b>Represores fágicos*</b>	

\*No están regulados por LexA, pero tienen un mecanismo análogo de hidrólisis.

Modificado de Erill *et al.* (2003).

### 1.2.3. EL SISTEMA SOS Y LA VIRULENCIA BACTERIANA

Diversos estudios relacionan el sistema SOS con la virulencia de diferentes especies bacterianas. Por una parte, el sistema SOS está implicado en la expresión y la transferencia horizontal de toxinas y resistencias antibióticas, fenómenos importantes para el desarrollo del proceso infectivo. Por otra parte, el sistema SOS se relaciona también con los procesos de supervivencia frente a los sistemas de defensa del huésped.

### 1.2.3.1. Expresión y diseminación de genes asociados a virulencia

Recientemente, el sistema SOS ha sido objeto de estudio por su implicación en la expresión y la transferencia horizontal de genes codificados en elementos móviles. Diversos estudios demuestran que la utilización de determinados antibióticos durante el tratamiento de infecciones puede inducir el sistema SOS (Zhang *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2004; Úbeda *et al.*, 2005; Maiqués *et al.*, 2006). Esto conlleva, tal y como se explica en apartados anteriores, la expresión de toxinas codificadas en profagos (Quinones *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2000), la expresión de resistencias antibióticas codificadas en plásmidos (Da Re *et al.*, 2009) y la transferencia horizontal de islas de patogenicidad (Úbeda *et al.*, 2005; Maiqués *et al.*, 2006), integrones (Guerin *et al.*, 2009) o elementos conjugativos (Beaber *et al.*, 2004). Esto implica que el tratamiento de las infecciones bacterianas con determinados antibióticos puede suponer, no sólo el empeoramiento de la enfermedad (debido a la inducción de las toxinas), sino también el aislamiento de clones resistentes al antibiótico en uso y la diseminación de genes implicados en la virulencia de los patógenos (Ver apartado 1.2.1.4.4).

Sin embargo, estos no son los únicos fenómenos importantes para el desarrollo del proceso infeccioso. Cabe destacar también la importancia de la expresión de polimerasas tendentes al error en las fases más tardías de la inducción de la respuesta SOS. Estas polimerasas introducen mutaciones en la secuencia del DNA, lo cual puede suponer la aparición de resistentes espontáneos a antibióticos diferentes a los aplicados durante el tratamiento (Thi *et al.*, 2011). Es decir, que el uso de un antibiótico para el tratamiento de una infección puede inducir la aparición de resistencias espontáneas.

Por todos estos motivos, varios estudios proponen el desarrollo de terapias que impidan la expresión del sistema SOS durante el tratamiento con antibióticos con el fin de evitar la aparición de complicaciones durante el desarrollo de la enfermedad y la diseminación de factores de virulencia (Cirz *et al.*, 2005; Cirz y Romesberg, 2007).

### 1.2.3.2. Supervivencia durante el proceso infeccioso

El sistema SOS es un mecanismo de defensa global frente a las lesiones en el DNA. Es por ello que, desde su descubrimiento, se ha intentado establecer cuál es su papel en el proceso infeccioso y en la supervivencia frente a los mecanismos de defensa propios del huésped. Varios estudios aportan información muy importante al respecto, aunque las implicaciones exactas están aún por determinar.

Para que los patógenos gastrointestinales puedan alcanzar el epitelio intestinal y desarrollar una infección han de superar los mecanismos de defensa del huésped. Entre estos sistemas de

defensa encontramos el bajo pH existente en el estómago y las sales biliares presentes en el intestino. Van der Veen y Abee (2011), en un estudio llevado a cabo con un mutante deficiente en el gen *recA* del patógeno *Listeria monocytogenes*, demuestran que la expresión de este gen es esencial para sobrevivir a los niveles de acidez presentes en el estómago, señalando la importancia de la respuesta SOS en esta fase de la infección. Por otro lado, trabajos con *S. Typhimurium* demuestran también que la presencia de sales biliares en el entorno induce la respuesta SOS (Prieto *et al.*, 2004). Esto sugiere la importancia del regulón LexA para superar esta barrera del tracto gastrointestinal, pero también lo relaciona con las infecciones crónicas por este patógeno, ya que, en la vesícula biliar, la expresión del sistema SOS podría causar mutaciones que favoreciesen este tipo de infección.

Por otro lado, una de las características más importantes de los patógenos intracelulares como *S. Typhimurium* es su capacidad para sobrevivir en el interior de macrófagos. Trabajos llevados a cabo con este patógeno demuestran que un mutante deficiente en el gen *recA* presenta una dosis letal 50 (LD<sub>50</sub>) 5 veces superior a la de la cepa salvaje y es incapaz de sobrevivir en el interior de macrófagos. Sin embargo, sí puede sobrevivir en el interior de macrófagos que no producen especies reactivas del oxígeno (Buchmeier *et al.*, 1993). Se confirma, de este modo, la importancia de esta proteína para la supervivencia intracelular, más concretamente, para la superación de las lesiones causadas por estrés oxidativo. Estudios de transcriptómica llevados a cabo posteriormente en *S. Typhimurium* y en *E. coli* demuestran la inducción del sistema SOS en la fase intracelular del proceso infeccioso, señalando de nuevo su relevancia (Eriksson *et al.*, 2003; Poirier *et al.*, 2008).

Otros trabajos realizados con mutantes deficientes en el gen *recA* de microorganismos como *S. aureus* o *V. cholerae* corroboran la importancia de esta proteína en la virulencia de estos patógenos (Mei *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 1994).

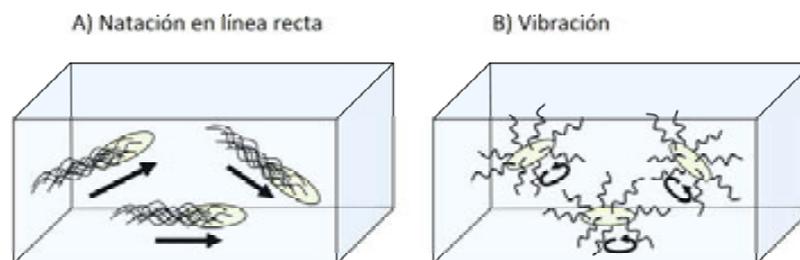
En conclusión, los datos expuestos en los párrafos anteriores sugieren que la expresión del sistema SOS es necesaria en diferentes fases del proceso infeccioso de determinados patógenos. Sin embargo, todos los estudios de virulencia han sido realizados a través de mutantes deficientes en el gen *recA*, el cual no sólo participa en la reparación del DNA mediante la inducción del sistema SOS, sino que también lo hace mediante procesos asociados a la recombinación homóloga. Este hecho impide distinguir entre ambas funciones de RecA a la hora de establecer su importancia durante el desarrollo del proceso infeccioso, por lo que el papel desarrollado exclusivamente por el sistema SOS aún está por determinar.

## 1.3. DESPLAZAMIENTO CELULAR EN BACTERIAS

### 1.3.1. TIPOS DE DESPLAZAMIENTO CELULAR

Los microorganismos son capaces de colonizar el medio en el que se encuentran desplazándose en él mediante mecanismos muy diversos. Actualmente se conocen cinco tipos de desplazamiento celular en bacterias. Algunos de ellos son el resultado de movimientos independientes entre células, de modo que éstas se desplazan de forma individual. Sin embargo, otros desplazamientos son el resultado de movimientos coordinados entre células, es decir, éstas se desplazan de forma poblacional (Henrichsen, 1972; Harshey, 2003).

El **movimiento de natación o *swimming*** se define como un movimiento celular individual en medio líquido impulsado por la rotación flagelar (Fig. 1.14 A) (Henrichsen, 1972; Harshey, 2003). En *E. coli* existen dos tipos de movimiento natatorio en función del sentido de rotación de los flagelos, la natación en línea recta o *smooth swimming* y el movimiento de vibración o *tumbling*. Mediante el movimiento de natación en línea recta, la célula se desplaza siguiendo trayectorias relativamente lineales (Fig. 1.13 A). Sin embargo, cuando el movimiento es de vibración, la célula oscila alrededor de un punto y se reorienta al azar para reanudar posteriormente el movimiento de natación en línea recta en una nueva dirección (Fig. 1.13 B). De esta manera, el desplazamiento mediante *swimming* en medios líquidos es el resultado de la alternancia entre estos dos tipos de movimiento natatorio (Baker *et al.*, 2006).



**Figura 1.13.** Esquema representativo de los dos tipos de movimiento natatorio descritos en *E. coli* en función del sentido de rotación de los flagelos. A) Movimiento de natación en línea recta o *smooth swimming*. B) Movimiento de vibración o *tumbling*.

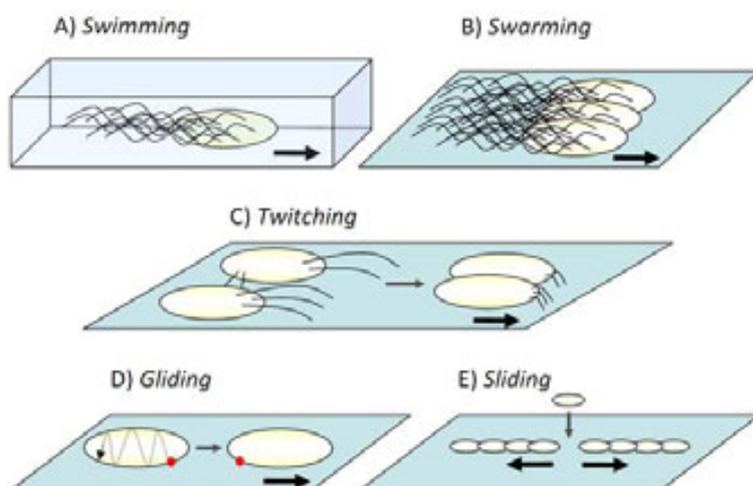
El **movimiento por contracciones o *twitching*** es un movimiento sobre superficies en el cual las células se desplazan lentamente recorriendo pequeños tramos de forma intermitente, por lo que tienen la apariencia de dar “pasos cortos” (Fig.1.14 C) (Harshey, 2003; Kearns, 2010). En este tipo de movimiento, característico de especies como *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae* o *Myxococcus xanthus*, las células se desplazan principalmente de forma poblacional, aunque en ocasiones pueden hacerlo de forma individual (Mattick, 2002). La fuerza motriz del movimiento es la retracción de los pili tipo IV. Las células anclan sus pili a la

superficie del medio en el que se encuentran y su retracción las arrastra, permitiendo el desplazamiento (Merz *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2000; Skerker y Berg, 2001). Del mismo modo, también anclan sus pili a otras células para atraerlas y coordinar el movimiento conjunto de todas ellas, dando lugar al desplazamiento poblacional (Merz *et al.*, 2000; Mattick, 2002).

El **movimiento por deslizamiento o *gliding*** es un desplazamiento lento sobre superficies en el que las células se mueven de forma poblacional, siguiendo la dirección de su eje longitudinal (Fig. 1.14 D) (Henrichsen, 1972; Kearns, 2010). En este movimiento, característico de especies como *M. xanthus*, no están involucrados ni flagelos ni pili (Mignot, 2007). Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios al respecto, el mecanismo exacto que lo permite aún no ha sido descrito. La hipótesis más aceptada sugiere que el movimiento es consecuencia de adhesiones focales entre el sustrato y la célula, que se forman en uno de los polos y recorren toda la célula hasta el polo opuesto, permitiendo el desplazamiento (Mignot, 2007).

El **movimiento por crecimiento o *sliding*** es un tipo de desplazamiento poblacional pasivo sobre superficies en el que las células utilizan surfactantes para reducir la tensión superficial del medio en el que se encuentran y poder así desplazarse hacia el exterior de la colonia, impulsadas únicamente por la presión que ejercen las propias células en crecimiento (Fig. 1.14 E) (Harshey, 2003; Kearns, 2010). Este movimiento ha sido observado en numerosas especies de géneros como *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Serratia* o *Streptococcus* (Henrichsen, 1972; Harshey, 2003).

Por último, el **movimiento en enjambre o *swarming*** se define como un movimiento poblacional rápido sobre superficies impulsado por la rotación flagelar (Fig. 1.14 B) (Kearns, 2010). Este tipo de movimiento, observado también en numerosas especies bacterianas, requiere un cambio en la morfología celular y la coordinación de un gran número de procesos celulares que se detallan en los próximos apartados (Alberti y Harshey, 1990; Harshey y Matsuyama 1994; Senesi *et al.*, 2002; Kearns y Losick, 2003; Rather, 2005).



**Figura 1.14.** Esquema de los cinco tipos de desplazamiento celular descritos en bacterias (Ver texto, apartado 1.3.1). El sentido del movimiento se indica mediante una flecha negra en todos los casos. Modificado de Kearns (2010).

### 1.3.2. EL MOVIMIENTO EN ENJAMBRE O SWARMING

El movimiento en enjambre es un tipo de desplazamiento que permite a una población bacteriana avanzar rápidamente sobre superficies semisólidas. Descrito por primera vez en *Proteus mirabilis*, este movimiento poblacional se observa también en muchas otras especies bacterianas, estando ampliamente distribuido en el dominio Bacteria (Wenner y Rettger, 1919; Stuart *et al.*, 1946; Lominski y Lendrum, 1947; Murray y Elder, 1949; Willis y Williams, 1972; Müller y Lenz, 1975).

#### 1.3.2.1. Diferenciación celular: células *swarmers*

Una de las características principales del movimiento en enjambre es que va acompañado de una diferenciación celular que permite el paso de las células al estado de *swarmers*. Este hecho se describe por primera vez en estudios llevados a cabo con el microorganismo *P. mirabilis*, el microorganismo modelo para el desplazamiento por *swarming*. Cuando *P. mirabilis* crece sobre superficies, las células incrementan su tamaño hasta 40 veces, formando células filamentosas con múltiples nucleoides (Fig. 1.15) (Henrichsen, 1972; Rather, 2005; Kearns, 2010). Trabajos posteriores determinan que muchas otras especies bacterianas sufren también un incremento en su tamaño celular cuando se desplazan mediante *swarming*, confirmando que la formación de células filamentosas es una característica común a todas aquellas especies que presentan este tipo de motilidad (Alberti y Harshey, 1990; Harshey y Matsuyama, 1994; Senesi *et al.*, 2002; Kearns y Losick, 2003).

No obstante, la diferenciación celular no sólo promueve el incremento en el tamaño de las células, sino también cambios en la flagelación. Como se ha indicado anteriormente, el desplazamiento mediante *swarming* es posible gracias a la rotación flagelar. Sin embargo, al tratarse de un desplazamiento sobre superficies, es necesaria la fuerza generada por un número de flagelos mayor que el que se necesita para permitir el desplazamiento por *swimming* en medios líquidos. Por este motivo, las células *swarmers* presentan un incremento en el número de flagelos existentes en su superficie (Fig. 1.15). En el caso de especies como *E. coli*, que tiene entre 5 y 8 flagelos peritricos cuando crece en medio líquido, este número se duplica durante el desplazamiento por *swarming* (Harshey y Matsuyama, 1994). En el caso de otras especies, como *Vibrio parahaemolyticus*, existen dos sistemas de flagelación alternativos en función del tipo de movimiento que realizan. Cuando crece en medio líquido, *V. parahaemolyticus* presenta un único flagelo polar para desplazarse mediante *swimming*. Sin embargo, cuando se desplaza sobre superficies semisólidas mediante *swarming*, sintetiza una serie de flagelos peritricos, denominados flagelos laterales, codificados por genes distintos a los que codifican el flagelo polar y regulados por vías específicas para este sistema de flagelación lateral (Shinoda y Okamoto, 1977).

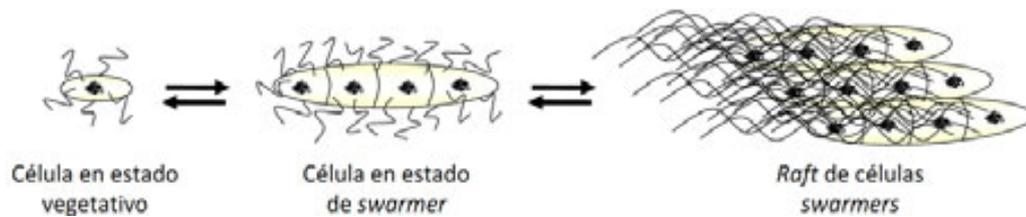
*S. Typhimurium*, igual que el resto de serovariedades del género *Salmonella*, es capaz de desplazarse mediante *swarming* sobre superficies semisólidas (Kim y Surette, 2005). En la década de 1990, Harshey y Matsuyama llevaron a cabo un estudio muy detallado del *swarming* en este patógeno, el cual demuestra que el paso de las células al estado de *swarmers* implica un cambio morfológico muy acusado en esta especie (Harshey y Matsuyama, 1994). Sin embargo, no lo es tanto como el observado en especies como *P. mirabilis* o *V. parahaemolyticus*.

El incremento en el tamaño de las células *swarmers* de *S. Typhimurium* como consecuencia de la filamentación les permite alcanzar longitudes de entre 5 y 20  $\mu\text{m}$ . Del mismo modo, los *swarmers* de este patógeno presentan hasta el doble de flagelos por unidad de superficie que las células en estado vegetativo. Estos flagelos no constituyen un sistema de flagelación específico para el *swarming*, sino que forman parte del mismo sistema que permite el desplazamiento mediante *swimming* (Harshey y Matsuyama, 1994). Sin embargo, durante el movimiento en enjambre sólo se observa la sobreexpresión de los genes implicados en la síntesis del filamento del flagelo, pero no se sobreexpresan ni los que codifican proteínas que forman parte de otras estructuras del flagelo, ni el operón regulador *flhDC*. Esto sugiere que el incremento en la síntesis flagelar es consecuencia de procesos de regulación postranscripcional (Wang *et al.*, 2004).

### 1.3.2.2. Movimiento poblacional: los *rafts*

El movimiento en enjambre es un desplazamiento poblacional, de manera que las células no avanzan de forma individual, sino que lo hacen de forma colectiva (Henrichsen, 1972). Tras diferenciarse en *swarmers*, las células se desplazan unidas unas a otras, formando grupos conocidos como *rafts* (Fig. 1.15) (Alberti y Harshey, 1990; Eberl *et al.*, 1999; Senesi *et al.*, 2002; Kearns y Losick, 2003; Jones *et al.*, 2004). Estas agrupaciones son dinámicas, de manera que cuando una célula se incorpora a ellas, se mueve de forma coordinada con el resto del grupo, mientras que si se separa, pierde su fenotipo *swarmer* rápidamente (Fig. 1.15) (Kearns y Losick, 2003; Kearns, 2010). Los *rafts* se observan principalmente en los márgenes de la colonia, es decir, en la periferia, mientras que las células del interior de la colonia son menos móviles y presentan una morfología menos marcada (Alberti y Harshey, 1990; Harshey y Matsuyama, 1994; Senesi *et al.*, 2002).

El mecanismo que mantiene unidos a los *swarmers* en los *rafts* no ha sido descrito, pero Jones *et al.* (2004), a través de un estudio realizado con la especie *P. mirabilis*, sugieren que, en este patógeno, los flagelos pueden ser los responsables de la unión entre las células. Según este estudio, la agrupación organizada de los flagelos de células adyacentes permite la unión entre ellas, del mismo modo que el movimiento acompasado de todos ellos aporta la fuerza suficiente para el desplazamiento sobre la superficie.



**Figura 1.15.** Esquema representativo de la diferenciación en célula *swarmer* y la agrupación en *rafts* típicos del movimiento en enjambre. La separación de una célula del *raft* induce el paso de nuevo a su estado vegetativo.

### 1.3.2.3. Compuestos secretados durante el desplazamiento mediante *swarming*

El movimiento en enjambre está asociado a la producción de una matriz viscosa compuesta, entre otras moléculas, por proteínas, péptidos y polisacáridos. Esta matriz envuelve a las células y acondiciona el medio, permitiendo el desplazamiento sobre la superficie (Verstraeten *et al.*, 2008).

La composición exacta de la matriz varía entre especies. Algunos microorganismos sintetizan y excretan en ella moléculas surfactantes, compuestos que reducen la tensión superficial e incrementan la humedad del medio, permitiendo a las células desplazarse con más facilidad sobre la superficie. Es el caso de especies como *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Bacillus subtilis*. Mutantes de estas especies defectivos en la síntesis de surfactantes son incapaces de desplazarse mediante *swarming*, demostrando la importancia de estas moléculas para el movimiento (Matsuyama *et al.*, 1992; Lindum *et al.*, 1998; Köhler *et al.*, 2000; Kearns y Losick, 2003). En otros casos, como el de *E. coli*, no se ha descrito la naturaleza de los compuestos secretados en la matriz extracelular y no se ha demostrado la capacidad de las células para sintetizar y excretar surfactantes en ella (Harshey y Matsuyama, 1994).

La composición de la matriz viscosa que envuelve a los *rafts* de *S. Typhimurium* no ha sido descrita en la literatura. Estudios recientes demuestran la presencia en ella de moléculas surfactantes, aunque descartan la posibilidad de que estas moléculas sean las responsables del aumento en la humedad del entorno que permite el desplazamiento (Chen *et al.*, 2007). Por lo tanto, el compuesto o los compuestos que permiten el *swarming* en *S. Typhimurium* están aún por determinar. Toguchi *et al.* (2000) sugieren que el lipopolisacárido (LPS) puede ser uno de estos compuestos y actuar como surfactante, siendo el encargado de extraer la humedad del medio. Asimismo, Mariconda *et al.* (2006) proponen que el cambio en el sentido de rotación de los flagelos durante el *swarming*, especialmente necesario cuando hay poca humedad en el

entorno, es el que permite la distribución del LPS en el medio, facilitando su actividad como molécula surfactiva.

#### **1.3.2.4. Patrones coloniales desarrollados durante el desplazamiento mediante *swarming***

El desplazamiento mediante *swarming* genera unos patrones coloniales característicos para cada especie.

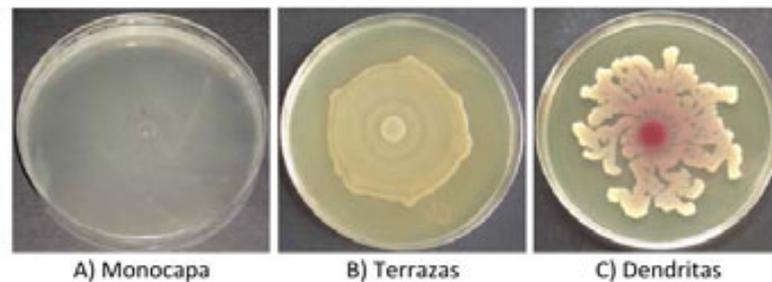
Algunas especies, como *B. subtilis*, se desplazan de forma continua sobre la superficie, formando una monocapa celular sobre el medio (Kearns y Losick, 2003).

Otras especies presentan patrones coloniales más complejos. *P. mirabilis*, por ejemplo, forma una serie de anillos concéntricos, conocidos como terrazas, cuando se desplaza mediante *swarming* en una placa de Petri (Fig. 1.16 B). Estas terrazas se forman debido a que, durante el crecimiento, se produce una alternancia entre períodos de desplazamiento, en los que las células se encuentran en estado de *swarmers*, y períodos de consolidación, en los que se encuentran en forma vegetativa, creciendo sin desplazarse. Por lo tanto, la sucesión de anillos concéntricos se corresponde con la sucesión de ciclos de desplazamiento y consolidación (Rauprich *et al.*, 1996; Matsuyama *et al.*, 2000).

Otro patrón colonial frecuente es el que presentan especies como *P. aeruginosa* o *S. marcescens*, en cuyo caso las células se desplazan formando dendritas o ramificaciones desde el punto de inoculación (Fig. 1.16 C) (Alberti y Harshey, 1990; Caiazza *et al.*, 2005).

Asimismo, existen especies que forman espirales o vórtices sobre el medio a medida que se desplazan, como es el caso de *Paenibacillus vortex* cuando es cultivado en medios con elevadas concentraciones de agar (Ingham y Ben Jacob, 2008).

En el caso de *S. Typhimurium*, las células de este patógeno se desplazan sobre la superficie de forma continua y uniforme, de modo que, sobre una placa de Petri, se observa una colonia de aspecto mucoso en la que no hay terrazas ni zonas de consolidación (Fig. 1.16 A) (Harshey y Matsuyama, 1994).



**Figura 1.16.** Patrones coloniales desarrollados durante el desplazamiento mediante *swarming*. A) Monocapa celular formada por *S. Typhimurium*. B) Terrazas formadas por *P. mirabilis*. C) Dendritas formadas por *S. marcescens*.

### 1.3.2.5. Estímulos externos inductores del *swarming*

Cuando los microorganismos detectan una serie de señales externas, indicativas de que las condiciones del entorno son las adecuadas para el movimiento en enjambre, se induce el paso de las células al estado de *swarmers*.

Una de estas señales es la existencia de una **elevada densidad celular**, la cual es necesaria para el desplazamiento por *swarming*. Se cree que este requisito puede estar relacionado, entre otros motivos, con la producción de surfactantes, un proceso costoso para la célula que requiere una alta inversión energética. El acondicionamiento del medio para el movimiento en enjambre requiere la producción de grandes cantidades de estas moléculas, para lo cual es necesaria la presencia de una elevada densidad poblacional. Por este motivo, el *swarming* de muchas especies está ligado a mecanismos de *quorum sensing*, los cuales regulan estrechamente la producción de este tipo de compuestos en función de la concentración celular (Ochsner y Reiser, 1995; Lindum *et al.*, 1998). Asimismo, se postula también que la presencia de una elevada densidad celular es necesaria para la formación de los *rafts* en el frente de avance de la colonia, ya que, como se ha mencionado anteriormente, los flagelos mantienen unidas a las células y permiten el desplazamiento sobre el medio (Jones *et al.*, 2004).

El movimiento de *swarming* también depende de las condiciones de **humedad en el medio**. Este hecho es muy evidente en el caso de especies como *E. coli*, la cual sólo puede desplazarse mediante *swarming* en medios con un porcentaje de agar de entre el 0,5 y el 0,7% (Harshey y Matsuyama, 1994). Por este motivo, el movimiento en enjambre está ligado a la formación de la matriz viscosa que envuelve a las células y a la presencia de surfactantes en el entorno (Harshey, 2003).

La **presencia de nutrientes** en el medio es también un factor importante. La mayoría de especies no puede desplazarse mediante *swarming* en medios mínimos debido al elevado coste energético derivado del paso al estado de célula *swarmer* (mayor síntesis flagelar), de la producción y la excreción de surfactantes y del movimiento (Harshey, 2003).

La **presencia o ausencia de determinados ácidos grasos** afecta al *swarming* de especies como *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* o *S. marcescens* (Liaw *et al.*, 2004; Lai *et al.*, 2005; Inoue *et al.*, 2008). El motivo de este fenómeno no ha sido establecido, pero se postula que puede deberse a un mecanismo de control de la fluidez de la membrana plasmática (Lai *et al.*, 2005) o a un mecanismo de señalización intercelular (Liaw *et al.*, 2004).

Por último, **la temperatura** también afecta de forma directa al movimiento en enjambre, pero lo hace de forma específica para cada especie bacteriana, de tal modo que cada microorganismo presenta una temperatura óptima para el desplazamiento determinada (Alberti y Harshey, 1990; Harshey y Matsuyama 1994; Senesi *et al.*, 2002; Kearns y Losick, 2003; Rather, 2005).

Al igual que el resto de microorganismos, el movimiento en enjambre de *S. Typhimurium* depende de diversos factores externos. En primer lugar, este patógeno sólo puede desplazarse mediante *swarming* sobre medios solidificados con un porcentaje de agar de entre el 0,5 y el 0,8%, lo que indica que es necesaria una elevada humedad en el entorno para permitir este movimiento (Harshey y Matsuyama, 1994). En segundo lugar, también es necesaria la presencia de glucosa en el medio, aunque ésta puede ser sustituida por otros azúcares como manosa, manitol, N-acetilglucosamina, fructosa, galactosa o arabinosa (Harshey y Matsuyama, 1994). En tercer lugar, *S. Typhimurium* también requiere la presencia de los 20 aminoácidos que forman parte de las proteínas para desplazarse mediante *swarming*, motivo por el cual sólo puede hacerlo sobre medios ricos o sobre medios mínimos suplementados con todos ellos (Toguchi *et al.*, 2000). Por último, otros factores ambientales también afectan al desplazamiento en enjambre de *S. Typhimurium*, aunque no lo hacen de forma tan estricta como los descritos anteriormente. Entre otros, destacan la temperatura, el pH y la concentración de oxígeno. La temperatura debe estar por encima de 24°C, aunque la óptima para el movimiento en enjambre de este microorganismo es de 37°C (Harshey y Matsuyama, 1994). De forma similar, el pH óptimo para este movimiento es de 6, aunque *S. Typhimurium* puede desplazarse mediante *swarming* en medios con valores de pH comprendidos entre 5 y 8,7 (Toguchi *et al.*, 2000). Por último, la presencia de oxígeno también estimula el *swarming*, ya que, aunque *S. Typhimurium* puede moverse en enjambre tanto en condiciones aeróbicas como en condiciones anaeróbicas, la presencia de este elemento promueve un mayor aumento en la biomasa celular final y una mayor velocidad de desplazamiento (Toguchi *et al.*, 2000).

### 1.3.2.6. Mecanismos moleculares de regulación del *swarming*

Si bien los estímulos externos son los inductores de los cambios morfológicos que llevan a las células a su estado de *swarmers* y al desplazamiento en enjambre, para que dichos cambios tengan lugar es necesario que existan mecanismos moleculares de captación y transducción de estas señales en la célula. En la actualidad se conocen tres sistemas implicados en el movimiento mediante *swarming*, aunque las vías de señalización exactas están aún por determinar. Estos sistemas son el de flagelación, el de *quorum sensing* y el de quimiotaxis.

#### 1.3.2.6.1. El sistema de flagelación

Los flagelos son las estructuras responsables del movimiento mediante *swarming*. La biosíntesis de estas estructuras es un proceso muy complejo que implica a más de 50 genes, los cuales están regulados de forma jerárquica, con un operón principal controlando la expresión del resto. En el caso de las enterobacterias, el operón principal es el *flhDC* (Chilcott y Hughes, 2000).

En la superficie de la célula, cada uno de los flagelos sintetizados está dirigido por un motor flagelar anclado en la pared celular. Estos motores utilizan energía electroquímica (intercambio de protones) para impulsar el movimiento de rotación del flagelo, el cual puede darse en dos sentidos distintos, en el de las agujas del reloj (CW, por *clockwise*) o en sentido contrario (CCW, por *counterclockwise*) (Berg, 2003). La rotación CCW permite que los flagelos se agrupen de forma organizada a lo largo del eje longitudinal de la célula, formando un penacho y actuando cooperativamente para impulsar a la célula mediante natación en línea recta o *smooth swimming* (Fig. 1.13 A). Sin embargo, si uno o más de los motores impulsan el giro del flagelo en sentido CW, éstos se desorganizan y generan el movimiento de vibración o *tumbling* (Fig. 1.13 B) (Baker *et al.*, 2006).

La rotación flagelar es la fuerza motriz que permite el movimiento en enjambre. Sin embargo, además de ser esenciales para el desplazamiento, los flagelos también están implicados en la transmisión de las señales que inducen la diferenciación a célula *swarmer*. Para este fin, actúan a dos niveles distintos. En primer lugar, actúan como mecanosensores, detectando estímulos externos. En segundo lugar, pueden ejercer de reguladores globales, integrando estas señales extracelulares, y otras intracelulares, y respondiendo a ellas para inducir la diferenciación.

El papel de los flagelos como **mecanosensores** se ha observado en especies como *P. mirabilis* o *V. parahaemolyticus*. En ellas, la inhibición de la rotación flagelar por el aumento en la viscosidad del medio o por la presencia de anticuerpos anti-flagelina induce la diferenciación en células *swarmers* (McCarter *et al.*, 1988; Belas y Sivanasuthi, 2005). El mecanismo por el

cual la inhibición en la rotación del flagelo promueve la diferenciación celular no ha sido establecido aún, pero estudios llevados a cabo en *P. mirabilis* sugieren que la proteína FlhL, perteneciente al cuerpo basal flagelar, puede participar en la detección de los cambios en la rotación y en la transmisión de la información (Belas y Suvanasuthi, 2005).

El desarrollo de su función como **reguladores globales** tiene lugar a través del operón *flhDC*. Se ha observado que, durante el desplazamiento por *swarming*, *P. mirabilis* sobreexpresa este operón hasta 30 veces por encima de los niveles detectados en células en estado vegetativo (Furness *et al.*, 1997). La sobreexpresión del operón *flhDC* durante el desplazamiento induce en este microorganismo un incremento en la síntesis flagelar, pero también inhibe la división celular, promoviendo la filamentación que caracteriza a las células *swarmers* (Furness *et al.*, 1997). Su papel como inhibidor de la división celular ha sido observado también en *E. coli* (Prüß y Matsumura, 1996). De este modo, los datos expuestos en estos trabajos sugieren que el operón *flhDC* puede actuar como regulador global de la diferenciación en célula *swarmer*.

En el caso de *S. Typhimurium*, los flagelos actúan como mecanosensores y se encargan de detectar las condiciones de humedad del entorno e inducir el *swarming* si éstas son las adecuadas. Sin embargo, en este microorganismo, es la proteína FlgM la encargada de llevar a cabo esta función. Esta proteína es un regulador de la síntesis flagelar que, unido al factor  $\sigma^{28}$ , reprime la expresión de genes que codifican proteínas del codo, el filamento y el motor flagelar, las cuales están implicadas en las últimas etapas de la síntesis del flagelo. Cuando el cuerpo basal del flagelo se ha formado y se ha anclado a la membrana, FlgM es excretada a través del mismo, separándose del factor  $\sigma^{28}$  y liberando los promotores bajo su control. Así se induce la expresión de estos genes y puede finalizar la síntesis del flagelo (Chilcott y Hughes, 2000). Pero estudios recientes demuestran que FlgM también actúa como sensor de la humedad del entorno, de modo que, cuando las condiciones son las adecuadas, esta proteína es excretada en mayor medida. Esto supone una mayor inducción de los genes bajo su control, lo cual produce un incremento en la síntesis flagelar (Wang *et al.*, 2005).

#### **1.3.2.6.2. Los sistemas de *quorum sensing***

Los sistemas de *quorum sensing* son mecanismos que permiten a los microorganismos detectar sus niveles de densidad poblacional y regular, en respuesta a estos niveles, diferentes procesos celulares. Estos sistemas se basan en la síntesis y la secreción de una o diversas moléculas que actúan como señal y cuya concentración en el entorno depende de la densidad celular. La regulación de los distintos procesos celulares tiene lugar en función de la concentración detectada de estas moléculas señal, permitiendo a las células inducir estos procesos de forma coordinada cuando se alcanza un determinado nivel de estas moléculas, que se corresponde con un nivel concreto de densidad poblacional (Daniels *et al.*, 2004).

Los sistemas de *quorum sensing* tienen importancia en la cadena de transmisión de señales que lleva al desplazamiento por *swarming*. En *E. coli*, el sistema LuxI/LuxR participa en la inducción del operón *flhDC*. Para ello, induce la expresión de LuxS, una proteína encargada de sintetizar el autoinductor 3 (AI-3) (Sperandio *et al.*, 2003). Este AI-3 es un regulador positivo del sistema de dos componentes QseB/C (Sperandio *et al.*, 2003), el cual es, a su vez, un inductor del operón *flhDC* (Sperandio *et al.*, 2002). De esta manera, en *E. coli*, el sistema LuxI/LuxR de *quorum sensing* está asociado a la regulación de funciones implicadas en el desplazamiento por *swarming* a través del control que ejerce sobre el operón *flhDC*.

Sin embargo, la función más estudiada de los sistemas de *quorum sensing* en relación al *swarming* es la que los asocia con la síntesis de surfactantes. Uno de los casos más conocidos es la síntesis de serrawetina por *S. liquefaciens*, la cual está regulada por el sistema de *quorum sensing* SwrI/SwrR. La proteína SwrI es una N-acil-homoserinlactona (AHL) sintasa que produce C<sub>4</sub>-HSL. En presencia de una elevada densidad celular, la acumulación de C<sub>4</sub>-HSL estimula al regulador transcripcional SwrR, y el complejo C<sub>4</sub>-HSL-SwrR induce la expresión del gen *swrA*, responsable de la síntesis de serrawetina (Eberl *et al.*, 1996; Lindum *et al.*, 1998; Daniels *et al.*, 2004). De un modo similar, la síntesis de ramnolípidos por *P. aeruginosa* está regulada por los sistemas de *quorum sensing* LasI/LasR (sistema Las) y RhII/RhIR (sistema Rhl). La organización de estos dos sistemas es jerárquica, de manera que el sistema Las regula al sistema Rhl (Latifi *et al.*, 1996), y éste último regula la expresión de los ramnolípidos. El sistema Rhl induce, por un lado, el operón *rhlAB* (Pearson *et al.*, 1997), responsable de la síntesis de mono-ramnolípidos a partir de ácidos alcanóicos (HAAs), siendo ambos compuestos potentes surfactantes (Rahim *et al.*, 2001; Deziel *et al.*, 2003). Por otro lado, el sistema Rhl también induce la expresión del gen *rhlC*, cuyo producto génico transforma los mono-ramnolípidos en di-ramnolípidos, los cuales actúan también como surfactantes (Rahim *et al.*, 2001).

En el caso de *S. Typhimurium*, la regulación del movimiento en enjambre a través de sistemas de *quorum sensing* no ha sido demostrada. Mutantes de *S. Typhimurium* defectivos en el gen *luxS* no presentan alteraciones en el *swarming*, lo cual indica que el sistema LuxI/LuxR no está vinculado al control del movimiento en esta especie (Toguchi *et al.*, 2000), a diferencia de lo que ocurre en el caso de *E. coli* (Sperandio *et al.*, 2002; Sperandio *et al.*, 2003). No obstante, Kim y Surette (2006) demuestran que dos sistemas de *quorum sensing* independientes se inducen cuando *S. Typhimurium* se desplaza mediante *swarming*. En primer lugar, se induce la síntesis del autoinductor 2 (AI-2) por LuxS. En segundo lugar, se induce la expresión del gen *sdiA*, que codifica una proteína homóloga a LuxR que interacciona con AHLs producidas por otros microorganismos para regular la expresión génica. Por este motivo, este trabajo sugiere que estos dos sistemas de *quorum sensing* pueden regular algunos de los cambios metabólicos asociados al desplazamiento por *swarming*, aunque no inducir el movimiento.

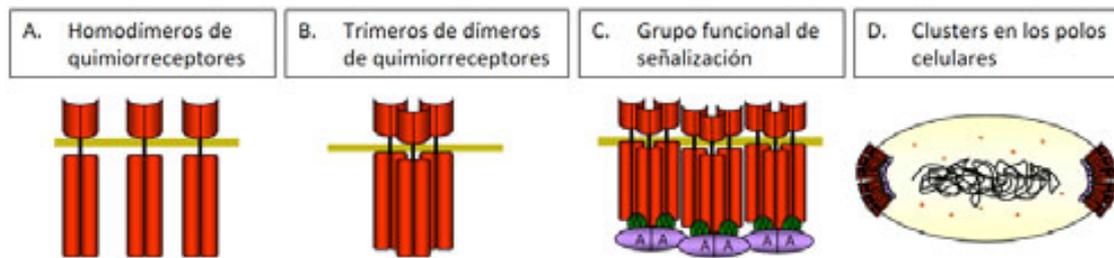
### 1.3.2.6.3. El sistema de quimiotaxis

El sistema de quimiotaxis tiene también una función destacada en la cadena de transmisión de señales que lleva al desplazamiento por *swarming*.

En *E. coli*, el sistema de quimiotaxis está constituido por cinco tipos de quimiorreceptores expuestos en la membrana celular y seis proteínas intracelulares (Baker *et al.*, 2006). Los quimiorreceptores son proteínas transmembranaceptoras de metilos (MCP, por *methyl accepting proteins*) encargadas de la captación de la señal quimiotáctica. Para ello, interactúan con compuestos químicos del entorno, los cuales actúan como atrayentes o repelentes para la célula (Baker *et al.*, 2006). Esta interacción genera cambios conformacionales en los quimiorreceptores, que son transmitidos a las proteínas intracelulares del sistema (Milburn *et al.*, 1991; Gegner *et al.*, 1992). Estas proteínas son CheA, CheW, CheY, CheB, CheR y CheZ, y son las encargadas de la transmisión de la señal quimiotáctica en el interior de la célula y del control del movimiento celular a través de la regulación del sentido de rotación de los flagelos (Baker *et al.*, 2006).

Para que sea posible la transmisión de la señal quimiotáctica, CheA se encuentra unida a los quimiorreceptores transmembrana gracias a CheW. Estos tres elementos, CheA, CheW y los quimiorreceptores, forman los complejos receptores de la señal, que en *E. coli* se encuentran situados en los polos de la célula formando dos enormes clusters y se encargan de integrar los estímulos captados desde el exterior (Gegner *et al.*, 1992; Maddock y Shapiro, 1993; Lybarger y Maddock, 2000).

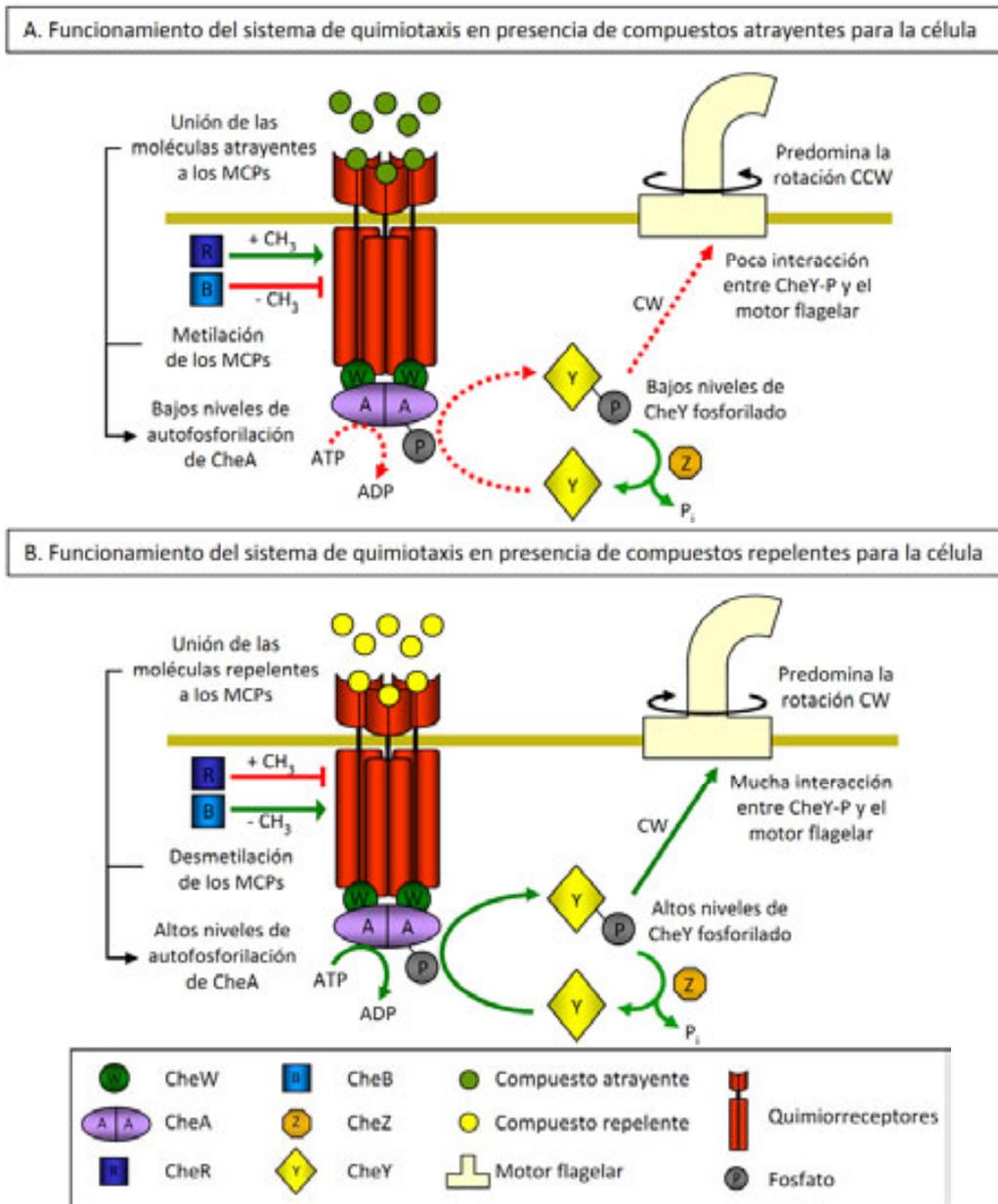
La formación de estos clusters es un proceso complejo que requiere la organización de miles de quimiorreceptores (Li y Hazelbauer, 2004; Sourjik, 2004). En un primer nivel de estructuración, los quimiorreceptores se organizan en homodímeros (Fig. 1.17 A) (Yeh *et al.*, 1993), los cuales han de unirse para formar trímeros de dímeros (Fig. 1.17 B) (Kim *et al.*, 1999; Studdert y Parkinson, 2004). En el siguiente nivel de estructuración, estos trímeros de dímeros interactúan con CheA y CheW formando grupos funcionales de señalización (Ames *et al.*, 2002; Studdert y Parkinson, 2004). La ordenación de cada uno de los componentes en estos grupos funcionales de señalización no ha sido descrita, pero algunos estudios sugieren que es necesario que se unan dos o más trímeros de dímeros para formar un grupo funcional (Sourjik y Berg, 2004; Endres *et al.*, 2008) y que su estequiometría es 1 trímero de dímeros por cada dos moléculas de CheW y un dímero de CheA, actuando este último como puente entre los trímeros de dímeros (Fig. 1.17 C) (Li y Hazelbauer, 2004). Por último, los grupos funcionales de señalización se unen entre sí para formar los clusters en los polos celulares (Fig. 1.17 D).



**Figura 1.17.** Esquema de la formación de los clusters de quimiorreceptores en los polos de la célula. A) Estructuración de los quimiorreceptores en homodímeros. B) Agrupación de los homodímeros de quimiorreceptores en trímeros de dímeros. C) Agrupación de los trímeros de dímeros en grupos funcionales de señalización junto a CheW y CheA. D) Unión de los grupos funcionales de señalización en dos enormes clusters en los polos de la célula. Los quimiorreceptores se representan en rojo, cada monómero de CheW se representa con un círculo verde y cada dímero de CheA se esquematiza con un óvalo lila.

La transmisión de las señales captadas por los quimiorreceptores en estos clusters tiene lugar a través de un sistema típico de transmisión de señal de dos componentes. La proteína CheA es una histidina quinasa capaz de transferir un grupo fosfato desde el ATP hasta una de sus histidinas, de manera que constituye el primer elemento en este sistema de dos componentes. El segundo elemento, la proteína reguladora de la respuesta, es CheY, la cual cataliza el paso del grupo fosfato desde CheA hasta uno de sus residuos aspartato (Hess *et al.*, 1988; Borkovich *et al.*, 1989). En esta forma fosforilada, CheY es capaz de interaccionar con el motor flagelar para regular la rotación del flagelo, induciendo la rotación en sentido CW y, por lo tanto, el movimiento de *tumbling* (Parkinson *et al.*, 1983). De este modo, la quimiotaxis es posible gracias a la regulación de la cantidad de CheY fosforilado en el interior celular. La unión de moléculas atrayentes para la célula a los quimiorreceptores transmembrana genera un cambio conformacional en ellos que lleva a la inhibición de la actividad quinasa de CheA. Esto provoca una disminución en la cantidad de CheY fosforilado, lo cual favorece la rotación de los flagelos en sentido CCW, es decir, el movimiento de *smooth swimming* (Fig. 1.18 A) (Borkovich *et al.*, 1989; Lupas y Stock, 1989; Ninfa *et al.*, 1991). La unión de moléculas repelentes induce la respuesta contraria, favoreciendo el movimiento de *tumbling* (Fig. 1.18 B) (Lupas y Stock, 1989). Sin embargo, la cantidad de CheY fosforilado en el interior celular también está regulada por las otras tres proteínas del sistema, CheZ, CheB y CheR. La proteína CheZ es una fosfatasa que interacciona directamente con CheY para desfosforilarla (Fig. 1.18) (Zhao *et al.*, 2002). Por el contrario, las proteínas CheB y CheR actúan sobre los quimiorreceptores para regular la actividad de CheA. CheR es una metiltransferasa que metila los quimiorreceptores (Springer y Koshland, 1977), lo cual estimula la actividad quinasa de CheA (Ninfa *et al.*, 1991). En cambio, CheB es una esterasa que se induce, al igual que CheY, mediante la fosforilación vía CheA (Hess *et al.*, 1988; Lupas y Stock, 1989), y cuya función es eliminar los grupos metilo introducidos por CheR en los quimiorreceptores (Stock y Koshland, 1978), inhibiendo la actividad quinasa de CheA (Lupas y Stock, J., 1989) y restableciendo el sistema sensor para

poder detectar de nuevo los compuestos externos. La unión de moléculas atrayentes a los quimiorreceptores induce la actividad de CheR y reprime la de CheB, promoviendo la metilación de los quimiorreceptores para contrarrestar el efecto producido por el cambio conformacional y evitar un descenso demasiado acusado en los niveles intracelulares de CheY fosforilado (Fig. 1.18 A). Por el contrario, las sustancias repelentes disminuyen la metilación de los receptores para evitar la acumulación excesiva de CheY fosforilado en la célula (Fig. 1.18 B) (Lupas y Stock, 1989; Ninfa *et al.*, 1991).



**Figura 1.18.** Esquema del funcionamiento del sistema de quimiotaxis en presencia de compuestos atrayentes o repelentes para la célula. Las flechas verdes indican vías altamente inducidas. Las flechas rojas discontinuas indican vías con bajos niveles de inducción. A) La unión de moléculas atrayentes para la célula inhibe el sistema de quimiotaxis, favoreciendo el giro de los flagelos en sentido CCW. B) La unión de moléculas repelentes induce el sistema de quimiotaxis y, por lo tanto, la rotación CW de los flagelos. Ver texto (apartado 1.3.2.6.3).

Estudios llevados a cabo en la década de 1990 con los microorganismos *V. parahaemolyticus*, *P. mirabilis* y *S. marcescens* demuestran que mutantes defectivos en distintos genes del sistema de quimiotaxis son incapaces de desplazarse mediante *swarming*, lo que sugiere la importancia de este sistema para el desarrollo del movimiento en enjambre (Sar *et al.*, 1990; Belas *et al.*, 1991; O'Rear *et al.*, 1992). Trabajos posteriores llevados a cabo con *E. coli* y *S. Typhimurium* demuestran que el sistema de quimiotaxis, pero no la respuesta quimiotáctica, es necesario para el desplazamiento por *swarming* (Burkart *et al.*, 1998; Mariconda *et al.*, 2006). Los trabajos realizados con *E. coli* demuestran que ni la eliminación ni la saturación de los quimiorreceptores de la membrana inhiben el *swarming* (Burkart *et al.*, 1998). Los trabajos realizados con *S. Typhimurium* demuestran que una forma siempre activa de la proteína CheY (CheY\*\*) puede suprimir los defectos en el *swarming* debidos a la mutación de otras proteínas Che (Mariconda *et al.*, 2006). Por lo tanto, estos datos indican que sólo el sistema de quimiotaxis, pero no la respuesta quimiotáctica, es necesario para el *swarming* y que la regulación del movimiento por este sistema tiene lugar a través de la proteína CheY fosforilada. Asimismo, estos trabajos demuestran también que mutantes en el gen *cheY* que no pueden inducir la rotación CW de los flagelos no pueden moverse mediante *swarming*, de la misma manera que tampoco pueden hacerlo mutantes en los que la rotación CCW está inhibida. Esto significa que la capacidad para alternar entre ambos sentidos de giro es esencial para el desplazamiento por *swarming* (Mariconda *et al.*, 2006). Por último, la búsqueda de mutaciones supresoras de los defectos en CheY llevó a demostrar que mutaciones en la proteína FliM, perteneciente al motor flagelar, recuperan el *swarming* de mutantes deficientes en la proteína CheY. Esto significa que la regulación del *swarming* mediante el sistema de quimiotaxis tiene lugar de la misma manera que la regulación del *swimming*, a través de la interacción de CheY fosforilado con el motor flagelar (Mariconda *et al.*, 2006).

Las vías que conectan entre sí los sistemas de flagelación, *quorum sensing* y quimiotaxis para permitir la transmisión de las señales que controlan el movimiento en enjambre están aún por determinar. Asimismo, la enorme cantidad de procesos celulares que deben coordinarse para permitir este movimiento indican que estos tres sistemas no son los únicos implicados en la regulación. Por este motivo, es muy importante el estudio de éstos y otros mecanismos moleculares que puedan participar en el control del desplazamiento por *swarming*.

### 1.3.3. EL SWARMING Y LA VIRULENCIA BACTERIANA

Desde principios de la década de 1990 son muchos los estudios que relacionan los mecanismos de motilidad bacteriana con la virulencia. Mutantes de *S. Typhimurium* defectivos en los genes *cheW* o *cheB* presentan un descenso en su capacidad para invadir células epiteliales en presencia de bajas concentraciones de oxígeno (Jones *et al.*, 1992). Del mismo modo, mutantes deficientes en quimiotaxis de *S. Typhi* no son capaces de invadir células epiteliales (Liu *et al.*, 1988) y mutantes de *Campylobacter jejuni* deficientes en este mismo sistema

tampoco son capaces de colonizar el tracto intestinal de ratones inoculados oralmente (Takata *et al.*, 1992).

Sin embargo, la importancia del *swarming* en la virulencia bacteriana se confirma finalmente en el caso de *P. mirabilis*. Trabajos realizados con este patógeno demuestran que la invasión de tejido uroepitelial por las células de *P. mirabilis* tiene lugar cuando éstas se encuentran en estado de *swarmers* y que, además, es en este estado cuando las células expresan de forma específica determinados factores de virulencia como la hemolisina, la ureasa o la metaloproteasa (Allison *et al.*, 1992a; Allison *et al.*, 1992b).

Este mismo fenómeno tiene lugar en otras especies bacterianas, como *P. aeruginosa*. En el caso de este patógeno, un gran número de genes implicados en la invasión y la diseminación del microorganismo en el huésped se induce cuando las células se desplazan mediante *swarming*. Entre otros, se inducen genes que codifican sistemas de secreción tipo III, factores de virulencia transportados por estos sistemas o proteasas extracelulares. Todo ello indica que la diferenciación en células *swarmers* favorece la virulencia de *P. aeruginosa* (Overhage *et al.*, 2008).

En el caso de *S. Typhimurium*, son varios los estudios que relacionan el *swarming* con la virulencia. En primer lugar, cuando las células se desplazan mediante este mecanismo, se observa un incremento en la expresión de genes implicados en el metabolismo del hierro, en la síntesis del LPS (importante factor de virulencia) y en la SPI-1 y la SPI-2 (se inducen tanto los genes que codifican los sistemas de secreción tipo III como los que codifican las proteínas efectoras secretadas por ellos) (Wang *et al.*, 2004). En segundo lugar, durante el desplazamiento en enjambre aumenta la expresión del operón *rck* en respuesta a AHLs sintetizadas por otros microorganismos presentes en el entorno. Este operón codifica una proteína de membrana que confiere resistencia a la lisis por el sistema del complemento durante la infección en humanos (Kim y Surette, 2006). Por último, se ha observado también que el *swarming* induce en *S. Typhimurium* la expresión de diferentes mecanismos de resistencia frente a un gran número de antibióticos (Kim *et al.*, 2003; Kim y Surette, 2003). Asimismo, estudios comparativos entre diferentes serovariedades de *S. enterica* han demostrado que aquellas cepas que no son capaces de invadir el tracto gastrointestinal de ratones inoculados oralmente tampoco son capaces de desplazarse mediante *swarming* (Katribe *et al.*, 2009).

Todos estos estudios demuestran que, durante el proceso infectivo, la diferenciación en célula *swarmer* es esencial para la virulencia de muchos patógenos. Sin embargo, las vías de señalización entre los mecanismos moleculares que regulan esta diferenciación no se han descrito, lo que no ha permitido establecer el modo en que las células detectan su localización en el huésped y responden mediante la inducción del *swarming*.

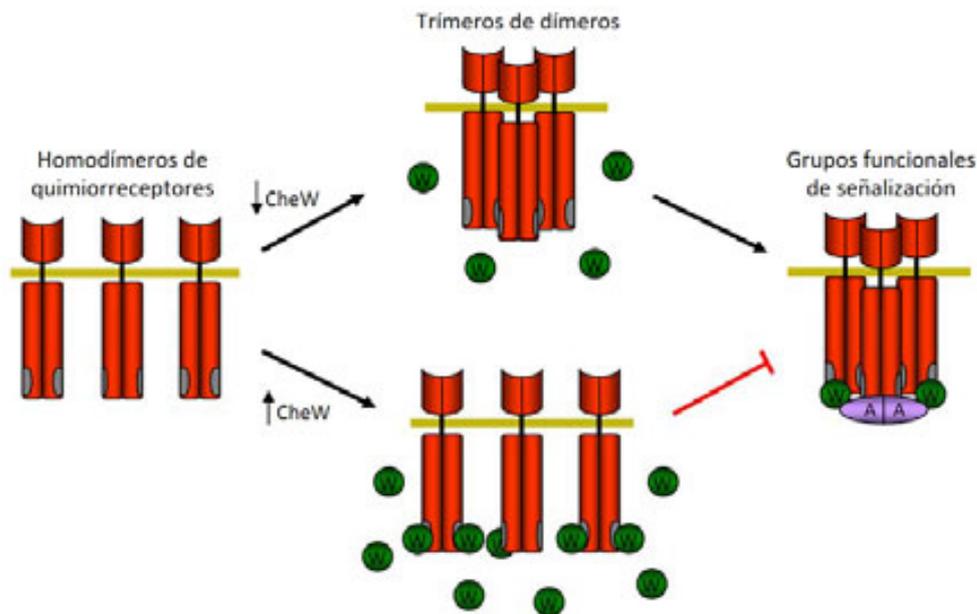
### 1.3.4. RELACIÓN ENTRE EL SWARMING Y EL SISTEMA SOS

Son pocos los estudios que relacionan la respuesta SOS con el desplazamiento mediante *swarming*. Los primeros indicios al respecto derivan de estudios masivos de copurificación proteica en *E. coli*, los cuales demuestran la interacción entre la proteína RecA y la proteína CheW en esta especie (Arifuzzaman *et al.*, 2006).

La proteína CheW es esencial para el sistema de quimiotaxis y, por lo tanto, para el movimiento en enjambre. Como se ha explicado en apartados anteriores, la estructuración de los complejos receptores de señal en los polos celulares requiere la presencia de CheW (Gegner *et al.*, 1992; Maddock y Shapiro, 1993). Asimismo, la activación de CheA en respuesta a las señales de los quimiorreceptores requiere un cambio conformacional en CheA que permite que el dominio donde se encuentra la histidina sujeta a la autofosforilación quede en contacto con el ATP, cambio que sólo puede darse en presencia de CheW (Levit *et al.*, 1999).

Sin embargo, tanto la sobreexpresión de CheW como la ausencia de esta proteína en el interior celular inhiben el sistema de quimiotaxis (Sanders *et al.*, 1989), lo cual indica que la regulación de los niveles intracelulares de CheW es importante para el correcto funcionamiento de este sistema y, por lo tanto, para el movimiento.

Cardozo *et al.* (2010), mediante un estudio realizado con *E. coli*, sugieren que la inhibición del sistema de quimiotaxis debida a la sobreexpresión de CheW es consecuencia de que los dímeros de quimiorreceptores presentan dos regiones de unión a CheW, las cuales se superponen a las regiones de unión entre ellos mismos para formar los trímeros de dímeros. En presencia de bajos niveles de CheW, muchos de los dímeros presentan, al menos, una de estas regiones libre, lo que permite la interacción entre ellos para formar los trímeros. Sin embargo, en presencia de altos niveles de CheW, ambas regiones quedan saturadas, siendo imposible la formación de los trímeros de dímeros de quimiorreceptores y, por tanto, la quimiotaxis (Fig. 1.19).



**Figura 1.19.** Esquema del proceso de inhibición de la formación de los trímeros de dímeros de quimiorreceptores por efecto de un exceso de CheW intracelular. CheA, CheW y los quimiorreceptores se representan tal y como se indica en la figura 1.18. Las zonas de interacción entre dímeros de quimiorreceptores se superponen con las zonas de interacción con la proteína CheW, indicadas mediante óvalos grises. Cuando CheW se encuentra en elevadas concentraciones en el interior de la célula, las regiones de interacción entre dímeros de quimiorreceptores quedan saturadas, impidiendo la formación de los trímeros de dímeros (conector rojo en la parte inferior del esquema). Por el contrario, en presencia de los niveles basales de la proteína CheW en la célula, al menos una de las regiones de interacción entre dímeros de quimiorreceptores queda libre, siendo posible la estructuración en trímeros de dímeros (parte superior del esquema). Modificado de Cardozo *et al.* (2010).

Tras haber sido demostrada la interacción entre RecA y CheW en *E. coli* (Arifuzzaman *et al.*, 2006), Gómez-Gómez *et al.* (2007) demuestran la participación de la proteína RecA en la inducción del *swarming* en esta misma especie. Este estudio demuestra que mutantes deficientes en el gen *recA* no pueden desplazarse sobre superficies semisólidas, mientras que la introducción de un plásmido portador de RecA en estos mutantes complementa el defecto en el *swarming*. Además, la complementación a través de un plásmido portador de una fusión proteica RecA-GFP (fusión entre RecA y la proteína verde fluorescente *Green Fluorescent Protein*) que no conserva la capacidad de interactuar con el ssDNA también suprime el fenotipo defectivo en el *swarming*. Esto indica que RecA no necesita activarse mediante la interacción con el ssDNA para ejercer su función reguladora sobre el desplazamiento en enjambre.

## **2. Objetivos**

---



Los conceptos recogidos en la introducción ponen de manifiesto que el sistema SOS tiene un papel crucial en el desarrollo del proceso infectivo de *S. Typhimurium*. Sin embargo, su importancia relativa no ha sido establecida de forma directa, ya que todos los trabajos que versan sobre este tema se han llevado a cabo a través del estudio de mutantes deficientes en el gen *recA*. Por este motivo, el objetivo principal del presente trabajo es determinar la importancia del sistema SOS durante el proceso infectivo de *S. Typhimurium*.

Con este fin se ha abordado el análisis de la capacidad infectiva de distintos mutantes en la regulación de la respuesta SOS. Estos mutantes son:

- i. Un mutante incapaz de inducir la respuesta SOS.
- ii. Un doble mutante incapaz de inducir la respuesta SOS, pero con una expresión constitutiva de *recA*. La imposibilidad de activar la respuesta SOS comporta la inhibición del aumento en la concentración intracelular de RecA asociado a dicha respuesta. Dada la importancia que esta proteína tiene para otros procesos de reparación del material genético independientes de la respuesta SOS, con este mutante se pretende poder distinguir entre el papel de la respuesta SOS y el papel de RecA durante el proceso infectivo.
- iii. Un mutante con una expresión constitutiva de *recA* que no presente alteraciones en la inducción de la respuesta SOS. Esta cepa será empleada a modo de control, con el fin de comprobar si la sobreexpresión de *recA* afecta de algún modo al proceso infectivo de *S. Typhimurium*. Esto permitirá enmarcar los resultados obtenidos mediante el estudio de las dos cepas explicadas anteriormente.



## **3. Material y Métodos**

---



### 3.1. CEPAS, PLÁSMIDOS Y BACTERIÓFAGOS EMPLEADOS EN EL ESTUDIO

Las cepas bacterianas, los plásmidos y los bacteriófagos empleados en este trabajo se enumeran en la Tabla 3.1. La conservación de las cepas bacterianas se realizó mediante congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  en viales de criopreservación *Protect* (Ferrer Farma). La conservación de los bacteriófagos se realizó mediante el almacenamiento de los lisados fágicos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

**Tabla 3.1.** Cepas, plásmidos y bacteriófagos utilizados en este trabajo.

Cepa, plásmido o bacteriófago	Características	Origen
<b>S. Typhimurium</b>		
ATCC 14028	Cepa salvaje de referencia	ATCC
UA1826	ATCC 14028, pKOBEGA, Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
UA1876	ATCC 14028 <i>recAo6869</i> , Km <sup>R</sup>	Este trabajo
UA1822	ATCC 14028 <i>lexA3</i> (Ind <sup>-</sup> ), Cm <sup>R</sup>	Campoy <i>et al.</i> (2006)
UA1877	ATCC 14028 <i>recAo6869 lexA3</i> (Ind <sup>-</sup> ), Km <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
UA1885	ATCC 14028 Km <sup>R</sup>	Este trabajo
UA1878	ATCC 14028 $\Delta$ <i>recX::cat</i> , Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
UA1879	ATCC 14028 <i>recAo6869</i> $\Delta$ <i>recX::cat</i> , Km <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
UA1821	ATCC 14028 $\Delta$ <i>recA::Km</i> , Km <sup>R</sup>	Campoy <i>et al.</i> (2006)
UA1895	ATCC 14028 <i>recAo6869</i> , pKOBEGA, Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	Este trabajo
UA1896	ATCC 14028, pUA1109, Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
UA1897	ATCC 14028 <i>recAo6869</i> , pUA1110, Km <sup>R</sup> Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
UA1898	ATCC 14028, pUA1108, Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
UA1899	ATCC 14028 <i>recAo6869</i> , pUA1108, Km <sup>R</sup> Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
<b>E. coli</b>		
DH5 $\alpha$	<i>supE4</i> $\Delta$ <i>lacU169</i> ( $\phi$ 80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Clontech
MC1061 $\lambda$ pir	$\Delta$ <i>lacX74</i> <i>hsdR2</i> <i>mcrB</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>araABC-leu</i> )769 <i>galU</i> <i>galk</i> <i>rpsL</i> <i>thi</i> , Str <sup>R</sup>	Casadaban y Cohen (1979)
<b>Plásmidos</b>		
pKOBEGA	Ap <sup>R</sup> Ts	Chaverocche <i>et al.</i> (2000)
pKD3	Ap <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup>	Datsenko y Wanner (2000)
pKD4	Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	Datsenko y Wanner (2000)
pGEM-T	Vector de clonación, Ap <sup>R</sup>	Promega
pGEX 4T-1	Vector de fusión génica, <i>Ptac</i> , <i>lacI<sup>q</sup></i> , Ap <sup>R</sup>	Amersham Biosciences

**Tabla 3.1.** Continuación.

Cepa, plásmido o bacteriófago	Características	Origen
<b>Plásmidos</b>		
pUA1108	Derivado del pGEX 4T-1, <i>Ptac</i> , <i>lacI<sup>q</sup></i> , Ap <sup>R</sup>	Este estudio
pUA1109	Derivado del pUA1108, <i>recA</i> de <i>S. Typhimurium</i> bajo control del promotor <i>Ptac</i> , Ap <sup>R</sup>	Este estudio
pUA1110	Derivado del pUA1108, <i>cheW</i> de <i>S. Typhimurium</i> bajo control del promotor <i>Ptac</i> , Ap <sup>R</sup>	Este estudio
pB2HΔα	<i>Ptac</i> , Δ <i>αlacZ</i> (presenta deletados los aminoácidos 11-41), Cm <sup>R</sup>	BCCM/LMBP
pB2HΔω	<i>Ptac</i> , Δ <i>ωlacZ</i> (presenta deletados los aminoácidos 789-1023), Ap <sup>R</sup>	BCCM/LMBP
pUA1114	Derivado del pB2HΔα, fusión génica entre los genes <i>recA</i> de <i>S. Typhimurium</i> y Δ <i>αlacZ</i> bajo control del promotor <i>Ptac</i> , Cm <sup>R</sup>	Este estudio
pUA1115	Derivado del pB2HΔω, fusión génica entre los genes <i>recA</i> de <i>S. Typhimurium</i> y Δ <i>ωlacZ</i> bajo control del promotor <i>Ptac</i> , Ap <sup>R</sup>	Este estudio
pUA1116	Derivado del pB2HΔα, fusión génica entre los genes <i>cheW</i> de <i>S. Typhimurium</i> y Δ <i>αlacZ</i> bajo control del promotor <i>Ptac</i> , Cm <sup>R</sup>	Este estudio
pUA1117	Derivado del pB2HΔω, fusión génica entre los genes <i>cheW</i> de <i>S. Typhimurium</i> y Δ <i>ωlacZ</i> bajo control del promotor <i>Ptac</i> , Ap <sup>R</sup>	Este estudio
pUA1118	Derivado del pB2HΔα, fusión génica entre los genes <i>amyA</i> de <i>S. Typhimurium</i> y Δ <i>αlacZ</i> bajo control del promotor <i>Ptac</i> , Cm <sup>R</sup>	Este estudio
pUA1119	Derivado del pB2HΔω, fusión génica entre los genes <i>dnaE</i> de <i>S. Typhimurium</i> y Δ <i>ωlacZ</i> bajo control del promotor <i>Ptac</i> , Ap <sup>R</sup>	Este estudio
<b>Bacteriófagos</b>		
P22H <i>int7</i>	<i>Int</i> <sup>+</sup> , alta eficiencia de transducción	J. L. Ingraham

ATCC, *American Type Culture Collection*; BCCM/LMBP, *Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms Plasmid and DNA Library Collection*; Km, kanamicina; Cm, cloranfenicol; Ap, ampicilina; Ts, termosensible.

## 3.2. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

### 3.2.1. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Salvo en los casos especificados a continuación, *S. Typhimurium* y *E. coli* fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (LB) (Miller, 1992). Cuando fue necesario, se suplementó el medio con los

antibióticos ampicilina (Ap; 100 µg/mL para *S. Typhimurium* y 50 µg/mL para *E. coli*), kanamicina (Km; 150 µg/mL para *S. Typhimurium* y 100 µg/mL para *E. coli*) o cloranfenicol (Cm; 34 µg/mL en ambos casos).

Las cepas portadoras del plásmido pKOBEGA fueron cultivadas en medio SOB (Datsenko y Wanner, 2000), suplementado con Ap (100 µg/mL) y, cuando fue necesario, con arabinosa (20 mM). El medio de cultivo empleado para la obtención de células electrocompetentes fue el medio LB-Lennox (Lennox, 1955). Para el estudio de las cinéticas de crecimiento bacteriano y para la realización de los ensayos de supervivencia frente a la irradiación con luz UV se empleó el medio mínimo AB (Clark and Maaløe, 1967) suplementado con glucosa o glicerol a una concentración final del 0,2% (p/v). Para los ensayos de movilidad se emplearon placas de medio LB *swarming* o de medio LB *swimming*, ambas modificaciones del medio LB-Lennox.

La composición de todos los medios de cultivo y soluciones empleadas en este estudio se detalla en el Anexo B.

Todos los medios de cultivo se esterilizaron mediante calor húmedo en un autoclave a 121°C durante 15 minutos. Los antibióticos y otros suplementos sujetos a inactivación por calor se esterilizaron mediante filtración con membranas estériles de 0,45 µm de diámetro de poro (Millipore). Los medios de cultivo sólidos, tras ser autoclavados, se dejaron enfriar hasta alcanzar una temperatura de 50°C, momento en el que se añadieron los suplementos necesarios, se dispensaron en placas de Petri (Sterilin) y, una vez solidificados, se almacenaron a 4°C hasta su uso.

La inoculación de los microorganismos en medios líquidos se realizó a partir de cultivos de noche (ON, por *Over-Night*) crecidos durante 16 horas (dilución 1/100 o 1/50 en función del estudio). La incubación de los cultivos se realizó a 37°C y con una agitación de 150 rpm (agitador *Excella*® E5, New Brunswick Scientific), excepto en los casos en los que la cepa incubada era portadora de un plásmido termosensible (Ts), en los cuales la temperatura de incubación fue de 30°C para el mantenimiento del plásmido y de 43°C para su eliminación. Cuando fue necesario mantener los cultivos en una atmósfera anaeróbica, se empleó el sistema de aislamiento BD GasPak™ EZ (Becton, Dickinson and Company) y se evitó la agitación.

Las medidas de crecimiento bacteriano se determinaron mediante el recuento de células viables en medio sólido (cfu, por *Colony Forming Units*) y mediante la determinación espectrofotométrica de la densidad óptica (DO) de los cultivos líquidos a una longitud de onda de 550 nm para los cultivos crecidos en medio LB, 600 nm para los crecidos en medio SOB y 450 nm para los crecidos en medio AB (espectrofotómetro *GENESYS 10S UV-Vis*, Thermo Scientific).

### **3.2.2. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO EN MEDIO LÍQUIDO**

Para el estudio de las cinéticas de crecimiento de las diferentes cepas bacterianas se realizó una resiembra, desde un cultivo ON de la cepa deseada, en medio LB o en medio AB suplementado con glucosa o con glicerol, ajustando la DO inicial a 0,05. Tras la inoculación, se incubaron las resiembras a 37°C con agitación y se evaluó la DO del cultivo cada 30 minutos hasta su entrada en la fase estacionaria.

### **3.2.3. ÍNDICES DE COMPETITIVIDAD *IN VITRO***

La determinación de los índices de competitividad (IC) *in vitro* de los diferentes mutantes de *S. Typhimurium* se realizó mediante el estudio comparativo del crecimiento de cada uno de los mutantes en cocultivos con la cepa salvaje de *S. Typhimurium* ATCC 14028.

Para la realización del estudio se preparó un cultivo ON de cada uno de los mutantes y de la cepa salvaje y, a partir de ellos, se realizaron las mezclas microbianas deseadas en un ratio aproximado 1:1. Cada una de las mezclas fue inoculada en medio líquido LB a una concentración aproximada de  $2 \times 10^7$  cfu/mL (dilución 1/100) y se tomaron muestras para el recuento celular y el cálculo del ratio inicial entre el mutante y la cepa salvaje. A continuación, cada uno de los cocultivos se incubó a 37°C durante 16 horas en condiciones de aerobiosis o anaerobiosis y, tras este tiempo, se tomaron muestras de nuevo para el recuento celular y el cálculo del ratio entre ambas cepas.

Los recuentos celulares se llevaron a cabo mediante la siembra de diluciones seriadas de cada cocultivo en placas de LB. Para la determinación del ratio entre el mutante y la cepa salvaje se realizaron réplicas de las colonias crecidas en estas placas en medio LB suplementado con el antibiótico adecuado en función del mutante. El IC *in vitro* se define como el ratio entre la cepa mutante y la cepa salvaje obtenido tras la incubación de los cultivos durante 16 horas dividido por el ratio inicial.

### **3.2.4. ENSAYOS DE SUPERVIVENCIA**

Para la realización de los ensayos de supervivencia en las condiciones detalladas a continuación se partió de un cultivo ON de cada una de las cepas de *S. Typhimurium* a estudiar. A partir de él se realizó una resiembra en medio LB y en presencia de las condiciones lesivas deseadas, ajustándola a una concentración aproximada de  $3 \times 10^7$  cfu/mL (dilución 1/100).

Para los **ensayos de supervivencia en presencia de sales biliares**, la resiembra de cada una de las cepas a estudiar se realizó en medio LB suplementado con coleato sódico (extracto de bilis de buey, Sigma) a una concentración final del 30% (p/v) (van Velkinburg y Gunn, 1999). Las resiembras fueron incubadas a 37°C durante 300 minutos y se tomaron muestras para el recuento celular y el cálculo del porcentaje de supervivencia en los tiempos 0, 180, 240 y 300 minutos.

Para los **ensayos de supervivencia frente a pH ácido**, la resiembra de cada una de las cepas se realizó, sin adaptación previa (Tiganitas *et al.*, 2009), en medio LB a un pH de 3,3. Las resiembras se incubaron a 37°C durante 300 minutos y se tomaron muestras para el recuento celular y el cálculo del porcentaje de supervivencia en los tiempos 0, 30, 60, 120, 180 y 240 minutos.

Los **ensayos de supervivencia frente a la irradiación con luz UV** se llevaron a cabo según se ha descrito previamente (Barbé *et al.*, 1986). Las resiembras de cada una de las cepas fueron realizadas en medio LB e incubadas hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial. Posteriormente, los cultivos fueron lavados por centrifugación (dos veces) y resuspendidos en medio AB a una concentración final de  $2 \times 10^8$  cfu/mL. Seguidamente, se dispensó una fina capa de cada una de las suspensiones sobre placas de Petri de cristal y se irradiaron con una lámpara germicida GY1578. Las dosis de luz UV aplicadas fueron 0, 6, 12, 18, 24 y 30 J/m<sup>2</sup>, en una constante de 0,2 J/m<sup>2</sup>/s determinada con un dosímetro *UVX Digital Radiometer* (UVP). Se tomaron muestras de cada una de las dosis para el recuento celular y el cálculo del porcentaje de supervivencia. Las células irradiadas fueron manipuladas en ausencia de luz para evitar la reparación del DNA por fotorreactivación.

En todos los casos, los recuentos celulares se realizaron mediante la siembra de diluciones seriadas de los cultivos en placas de LB. La supervivencia se define como el ratio entre el recuento celular obtenido en cada tiempo del tratamiento y el recuento celular inicial.

### **3.2.5. ENSAYOS DE MOVILIDAD POR SWARMING**

Para los ensayos de movilidad por *swarming*, las distintas cepas de *S. Typhimurium* fueron cultivadas en placas de LB durante 16 horas. Posteriormente, se realizó la resiembra de cada una de las cepas en placas de LB *swarming* que se incubaron a 37°C durante 16 horas, momento en que fueron fotografiadas (cámara fotográfica *Optio S4*, Pentax).

El medio de cultivo para estos ensayos fue preparado y dispensado sobre las placas de Petri el mismo día de su utilización, tras ser suplementado, en caso necesario, con mitomicina C o IPTG. Asimismo, las placas se secaron durante 15 minutos en una cabina de flujo laminar vertical (AV-100, TELSTAR Industrial S. L.) antes de la inoculación.

### 3.2.6. ENSAYOS DE MOVILIDAD POR *SWIMMING*

Para los ensayos de movilidad por *swimming*, se inocularon 10 µL de un cultivo ON de la cepa deseada de *S. Typhimurium* en una placa de LB *swimming*. Posteriormente, la placa se incubó a 37°C durante 16 horas y, transcurrido este tiempo, fue fotografiada.

Al igual que se ha especificado para el medio LB *swarming*, el medio LB *swimming* fue preparado y dispensado sobre las placas de Petri el mismo día de su utilización.

### 3.2.7. CAMBIO DE FASE FLAGELAR

Para el proceso de cambio de la fase flagelar se empleó el método de Sven Gard (Chiou *et al.*, 2006). Para ello, la cepa deseada de *S. Typhimurium* fue inoculada en el centro de una placa de LB *swimming* suplementada con antisuero contra la fase flagelar detectada en dicha cepa. El antisuero inmoviliza a las células que presentan esta fase flagelar, permitiendo únicamente el desplazamiento de aquellas que expresan la fase flagelar alternativa. Las placas fueron incubadas durante 16 horas a 37°C y las células localizadas en el margen del área de crecimiento fueron seleccionadas para futuros estudios.

### 3.2.8. ENSAYOS DE INVASIVIDAD SOBRE CÉLULAS DE LA LÍNEA Caco-2

Para determinar la capacidad invasiva de los mutantes portadores de la construcción *recA*6969 y de la cepa salvaje de *S. Typhimurium* ATCC 14028 se realizaron ensayos de invasividad *in vitro* sobre células de origen humano de la línea Caco-2. Estos estudios se llevaron a cabo en colaboración con el grupo de investigación de Biofilms Microbianos del Instituto de Agrobiotecnología (CSIC-UPNA-Gobierno de Navarra), dirigido por el Dr. Lasa.

El protocolo empleado en estos ensayos se basa en el descrito por Kim y Wei (2007) con algunas modificaciones. Las células de la línea Caco-2 fueron incubadas en el medio de cultivo *DMEM-GlutaMAX<sup>TM</sup> I medium* (Difco) suplementado con suero fetal bovino (SFB, Difco) a una concentración final del 20% (v/v). La incubación se realizó a 37°C y en presencia de un 5% de CO<sub>2</sub> hasta la formación de una monocapa celular. Una vez formada esta monocapa, las células Caco-2 fueron tripsinizadas y la suspensión obtenida fue inoculada sobre placas de 6 pocillos (*Tissue Culture Treated 6-well plates*, Corning Incorporated) en una concentración final aproximada de 10<sup>6</sup> células/mL, incubándose en las condiciones indicadas anteriormente hasta la obtención de una monocapa confluyente de células Caco-2 en cada pocillo.

Para la preparación de las suspensiones bacterianas con las que infectar a las células Caco-2 se centrifugó un cultivo ON de cada una de las cepas de *S. Typhimurium* deseadas durante 10

minutos a 5000 x *g*. Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces consecutivas con tampón PBS 1X (Anexo B) mediante centrifugación en las mismas condiciones. Tras la última centrifugación, las células fueron resuspendidas en tampón PBS 1X hasta alcanzar una  $DO_{600}$  aproximada de 0,4.

Para el desarrollo del ensayo, las suspensiones bacterianas fueron inoculadas de forma independiente sobre las monocapas celulares de la línea Caco-2 crecidas en las placas de 6 pocillos a una concentración final aproximada de  $10^6$  cfu/mL. Las placas fueron incubadas durante 1 hora a 37°C y en presencia de un 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, las células Caco-2 fueron lavadas con 1 mL de DMEM (Gibco) e incubadas durante 2 horas a 37°C y en presencia de un 5% de CO<sub>2</sub> en 1 mL de *DMEM-GlutaMAX™ I medium* suplementado con SFB (20%) y gentamicina (100 µg/mL), esta última utilizada para eliminar las células de *S. Typhimurium* localizadas extracelularmente. Tras las 2 horas de incubación, las células Caco-2 fueron lavadas 3 veces con tampón PBS 1X y lisadas durante 10 minutos a temperatura ambiente con una solución de Triton™ X-100 en PBS 1X a una concentración final del 0,1% (v/v).

El recuento de las células de *S. Typhimurium* localizadas en el interior de las células Caco-2 se realizó mediante la siembra de diluciones seriadas del homogeneizado obtenido tras la lisis de las células Caco-2 sobre placas de LB debidamente suplementadas e incubadas a 37°C hasta la aparición de los clones.

### 3.3. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE DNA Y RNA

#### 3.3.1. OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO

Los oligonucleótidos empleados en las distintas técnicas de manipulación del DNA o el RNA (Invitrogen o Roche, respectivamente) se detallan en la Tabla 3.2.

**Tabla 3.2.** Parejas de oligonucleótidos empleadas en este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Aplicación
<b>Oligonucleótidos empleados para la construcción y la comprobación de los mutantes de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028<sup>a</sup></b>		
P1-RecA	<u>GGGACCGTGAATCGGTGCGTCGACAGGCGGACGACATACGGCTACAAAACC</u> <u>CTGGGCAACAATTTCTACAAAACACTTGGAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</u>	Construcción del mutante <i>recA</i> 06869 (cepa UA1876)
P2-RecA	<u>GGTATTGAACCGGATAGTGAATTCGTACTGTTGAAGCAATTATACCATATG</u> <u>CTCATAcAGTATCAAGTGTGGTGTAGAAAATGGGAATTAGCCATGGTCC</u>	
P1-RecA	<u>GGGACCGTGAATCGGTGCGTCGACAGGCGGACGACATACGGCTACAAAACC</u> <u>CTGGGCAACAATTTCTACAAAACACTTGGAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</u>	Inserción del casete de resistencia a Km en la cepa isogénica salvaje Km <sup>R</sup> (cepa UA1885)
P2-Km	<u>GGTATTGAACCGGATAGTGAATTCGTACTGTTGAAGCAATTATACCTGTATG</u> <u>CTCATAcAGTATCAAGTGTGGTGTAGAAAATGGGAATTAGCCATGGTCC</u>	
RecAext up	CAGTGGAGAAAGGGATTACGC	Comprobación de la inserción del casete de resistencia a Km en el mutante <i>recA</i> 06869 y en la cepa isogénica salvaje Km <sup>R</sup>
RecAext dw	TGGAGCCTTTACAAAATTGC	
P1-OraA	<u>TTAAGGTTTTTATGAGTGAACCCACATCGCGCCGTCGCCCTTATGCTCGTCT</u> <u>CCTTGATCGTGGGTACGTATCTTGGCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</u>	Construcción de los mutantes <i>recX</i> (cepa UA1878) y <i>recA</i> 06869 <i>recX</i> (cepa UA1879)
P2-OraA	<u>AATTCACATTCGTCATCGCTTTTCAGTCGATTCACGGGAAATGCCCTTCTG</u> <u>ATTCAACTCCTGGCGAATAGCGCCGATGGGAATTAGCCATGGTCC</u>	
OraAint up	CCTTTTGGCATTCTCCCTG	Comprobación de la inserción del casete de resistencia a Cm en los mutantes <i>recX</i> y <i>recA</i> 06869 <i>recX</i>
OraAint dw	CGTGCCATTTCACTCCAGTC	
<b>Oligonucleótidos empleados para comprobar la presencia del bacteriófago Gifsy-2 en las distintas cepas de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028</b>		
sodC gf2 up	TCATCTCAAAAATCCTGTACC	Comprobación de la presencia de <i>sodC</i> en el DNA cromosómico de <i>S. Typhimurium</i>
sodC gf2 dw	TTATTTCTCAATGACACCAC	
<b>Oligonucleótidos empleados para RT-PCR cuantitativa a tiempo real</b>		
recAupSalm	TGGCTATCGACGAAAAAACAACA	Cuantificación de la inducción del gen <i>recA</i> de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028
recAdwSalm	TTCCGCATCGATAAACGCACAG	

Tabla 3.2. Continuación.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Aplicación
<b>Oligonucleótidos empleados para RT-PCR cuantitativa a tiempo real</b>		
uvrASTMup	GTCGCTGGCGGAACACTAT	Cuantificación de la inducción del gen <i>uvrA</i> de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028
uvrASTMdw	AGGGGCGATTACTGATGAACTT	
sulAupSalm	GCTTTGCCTTACTCCGTCAG	Cuantificación de la inducción del gen <i>sulA</i> de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028
sulAdwSalm	CCCTACCGCATTACCTACCTTC	
hisGupSal	CCGGGTCTGGTAATGGATGG	Cuantificación de la inducción del gen <i>hisG</i> de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028
hisGdwSal	TTCTGGTCGAGGTAGCGTTTGA	
<b>Oligonucleótidos empleados para la clonación de los genes <i>recA</i> y <i>cheW</i> de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 en pUA1108 bajo control del promotor <i>P<sub>tac</sub></i><sup>b</sup></b>		
pGEX up	CGGGATCCCGCATAIGTACTGTTTCTCTGTGAA	Construcción del vector pUA1108
pGEX dw	CGGGATCCCGGAAATCCCG	
RecA F	<u>CATAIGGCTATCGACGAAAACAA</u>	Clonación del gen <i>recA</i> en pUA1108
RecA R	<u>GGATCCTTAAAAATCTCGTTGGTTT</u>	
CheW F	<u>CATAIGACCGGTATGAGTAATGT</u>	Clonación del gen <i>cheW</i> en pUA1108
CheW R	<u>GGATCCTTACGGACGTGTGATGCTG</u>	
-108 pNAS	CCGACATCATAACGGTTC	Comprobación y secuenciación de los insertos clonados en pUA1108
+128 pNAS	AGACAAGCTGTGACCGTC	
<b>Oligonucleótidos empleados con el vector plasmídico pGEM-T</b>		
M13F pUC	GTTTTCCAGTCACGAC	Comprobación y secuenciación de los insertos clonados en pGEM-T
M13R pUC	CAGGAACAGCTATGAC	

**Tabla 3.2.** Continuación.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Aplicación
<b>Oligonucleótidos empleados para la clonación de los genes <i>recA</i>, <i>cheW</i>, <i>dnaE</i> y <i>amyA</i> de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 en pB2HΔα y pB2HΔω<sup>c</sup></b>		
RecA-SphI	<u>GCA</u> TGCATGGCTATCGACGAAAACAA	Clonación del gen <i>recA</i> en pB2HΔα y pB2HΔω
RecA-BamHI	<u>GGATC</u> CAAAATCTTCGTTGGTTCTG	
CheW-SphI	<u>GCA</u> TGCATGACCGGTATGAGTAATGT	Clonación del gen <i>cheW</i> en pB2HΔα y pB2HΔω
CheW-BamHI	GGATCCCGGACGTGTGATGCTGCGA	
DnaE-SphIb	<u>ACATG</u> CATGCATGTCTGAACCCACGTTTCGT	Clonación del gen <i>dnaE</i> en pB2HΔω
DnaE-BamHlb	<u>CGG</u> GATCCGTCAAAACCTCCAGTTCACCT	
AmyA-SphI	<u>GCA</u> TGCATGAAAAACCCACGTTTATT	Clonación del gen <i>amyA</i> en pB2HΔα
AmyA-BamHI	GGATCCCACGTCCTCAATGACCCACA	
pB2H F	ATTCAGGCTGCGCAACTGTT	Comprobación y secuenciación de los insertos clonados en pB2HΔα y pB2HΔω
pB2H R	TACTCAAGCTTACTCCCAT	

<sup>a</sup> Las regiones subrayadas en negro en estos oligonucleótidos indican las zonas de homología con el DNA cromosómico de *S. Typhimurium* ATCC 14028. Las regiones señaladas en negrita indican la caja SOS del promotor del gen *recA*. Las regiones subrayadas en rojo indican los nucleótidos cambiados en el mutante *recA*06869 (UA1876) y conservados en la cepa isogénica salvaje Km<sup>r</sup> (UA1885). Km, kanamicina.

<sup>b</sup> Las regiones subrayadas en estos oligonucleótidos indican las dianas de restricción incorporadas. La diana *Bam*HI presenta un subrayado simple, mientras que la diana *Sph*I presenta doble subrayado.

<sup>c</sup> Las regiones subrayadas en estos oligonucleótidos indican las dianas de restricción incorporadas. La diana *Bam*HI presenta un subrayado simple, mientras que la diana *Sph*I presenta doble subrayado. Los nucleótidos extra presentes en el extremo 5' para permitir la digestión directa del producto de PCR se indican en negrita.

### 3.3.2. EXTRACCIÓN DE DNA Y RNA

Las extracciones de DNA cromosómico bacteriano se realizaron mediante el kit comercial *Easy-DNA<sup>TM</sup>* (Invitrogen), mientras que las extracciones de DNA plasmídico se realizaron con el kit *GeneJet<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas), siguiendo en ambos casos las instrucciones del fabricante.

Las extracciones de RNA total se realizaron mediante el kit comercial *RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit* (Qiagen). Posteriormente, se trató el RNA extraído con el kit *Turbo DNA-free<sup>TM</sup>* (Ambion) para eliminar los restos de DNA que hubiesen podido quedar y se purificó de nuevo el RNA siguiendo el protocolo de *Clean up* del kit *RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit* (Qiagen). En todos los casos se siguieron las instrucciones del fabricante.

Tras las extracciones, se determinaron la concentración y la pureza de las muestras de DNA y RNA mediante espectrofotometría (*GeneQuant<sup>TM</sup>*, Amersham Biosciences) y se comprobó su integridad mediante electroforesis en geles de agarosa. El DNA se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso, mientras que el RNA se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.3. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Las electroforesis para la observación del DNA se realizaron en geles de agarosa (D1 Low EEO, Pronadisa) disuelta en tampón TAE 1X a concentraciones comprendidas entre el 0,4 y el 2% (p/v), en función del tamaño de los fragmentos de DNA esperados. Las electroforesis para la recuperación de fragmentos de DNA se realizaron en geles preparados del mismo modo, pero la agarosa total añadida fue una mezcla de agarosa de bajo punto de fusión (LM-SIEVE, Laboratorios Conda) y de agarosa convencional (D1 Low EEO, Pronadisa) en proporción 3:1. Las electroforesis para la observación del RNA se realizaron en geles de agarosa a una concentración del 1,5% preparados con tampón TAE 1X tratado con dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma) para la eliminación de las RNAsas. En ambos casos, la visualización de los fragmentos de DNA o RNA se realizó con radiación UV, por lo que se añadió bromuro de etidio a los geles a una concentración final de  $0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ .

A las muestras se les añadió una solución transportadora (Anexo B) en un ratio 1:6 respecto al volumen final antes de ser cargadas en el gel. Las electroforesis se realizaron en tampón TAE 1X, tratado con DEPC en caso necesario, a un voltaje comprendido entre 80 y 120 V en una cubeta horizontal (*Mini-Sub Cell GT CELL*, Bio-Rad). El sistema de transiluminación y captación de imagen utilizado para la visualización del DNA mediante irradiación con luz UV fue el *E-box-1000/20 M* (Vilber Loumat).

### 3.3.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La amplificación del DNA mediante PCR se realizó con el kit *Expand™ High Fidelity PCR System* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos cebadores se utilizaron a una concentración final de 0,5  $\mu$ M cada uno. Los dNTPs (Thermo Scientific) se utilizaron a una concentración final de 0,2 mM cada uno. El DNA se añadió a una concentración de 50 ng por cada reacción, cuyo volumen final fue de 25  $\mu$ L con excepción de los casos en los que fue necesario obtener una mayor cantidad de producto amplificado, en los cuales el volumen fue de 100  $\mu$ L, manteniéndose la proporción de cada uno de los componentes.

Las condiciones de amplificación (*Melting Temperature* [T<sub>m</sub>] y tiempo de extensión) se determinaron en función de los oligonucleótidos cebadores empleados, en el primer caso, y del tamaño del fragmento de DNA a amplificar, en el segundo caso.

### 3.3.5. CLONACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA EN VECTORES PLASMÍDICOS

Para la clonación de fragmentos de DNA en vectores plasmídicos se emplearon las técnicas descritas a continuación.

La recuperación y **purificación de los fragmentos de DNA** desde solución o desde geles de agarosa se realizó con el kit *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para la **digestión del DNA** se emplearon endonucleasas obtenidas de Roche o de New England Biolabs, siguiendo en cada caso las instrucciones del proveedor.

Para la **desfosforilación de fragmentos de DNA** se empleó el enzima Fosfatasa Alcalina (1 U/ $\mu$ L, Roche) siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante.

La clonación de fragmentos de DNA en vectores plasmídicos previamente linearizados mediante restricción se realizó mediante **ligación** con la ligasa del bacteriófago T4 (Promega), siguiendo las instrucciones del proveedor. Cuando ambos fragmentos de DNA presentaban extremos romos, la relación molar inserto:vector aplicada fue 1:1. En los casos en que presentaban extremos cohesivos, la relación fue 2:1. La clonación de fragmentos de DNA en el vector pGEM-T se realizó empleando el kit comercial *pGEM®-T Vector System I* (Promega) siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante.

La **secuenciación** de fragmentos de DNA fue realizada por la empresa Macrogen (<http://dna.macrogen.com>).

### 3.3.6. OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Para la obtención de células competentes se empleó el sistema descrito por Dower *et al.* (1988) con pequeñas modificaciones. Se realizó una resiembra 1/100 de un cultivo ON de la cepa deseada en 1 L de medio LB-Lennox y se incubó a 37°C y con agitación hasta alcanzar una DO<sub>550</sub> de 0,5 (fase de crecimiento exponencial). Una vez alcanzada esta DO<sub>550</sub>, el cultivo fue sedimentado y lavado dos veces consecutivas con 1 volumen de agua Milli-Q (MQ; *Ultra-pure water system Milli-Q<sub>plus</sub> 185*, Millipore) estéril mediante centrifugación a 5000 x *g* durante 10 minutos a 4°C (Centrífuga *5810R*, Eppendorf). A continuación, las células fueron lavadas una única vez con 20 mL de glicerol frío al 10% (v/v) y resuspendidas finalmente en 1 mL de esta misma solución. Posteriormente, las células fueron alicuotadas y conservadas a -80°C hasta su uso.

Para la obtención de células competentes de las cepas UA1826 y UA1895 se siguió el proceso descrito por Datsenko y Wanner (2000). Para ello, se realizó una resiembra 1/100 desde un cultivo ON de la cepa deseada en 50 mL de medio SOB suplementado con arabinosa (20 mM) y Ap (100 µg/mL). La resiembra se incubó a 30°C y con agitación hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,5. Una vez alcanzada esta DO<sub>600</sub>, el cultivo fue sedimentado y lavado tres veces consecutivas con 20, 10 y 5 mL de glicerol al 10% (v/v) mediante centrifugación a 4000 x *g* durante 15 minutos a 4°C. Finalmente, las células fueron resuspendidas en 300 µL de glicerol al 10% y alicuotadas para su conservación a -80°C.

### 3.3.7. ELECTROTRANSFORMACIÓN

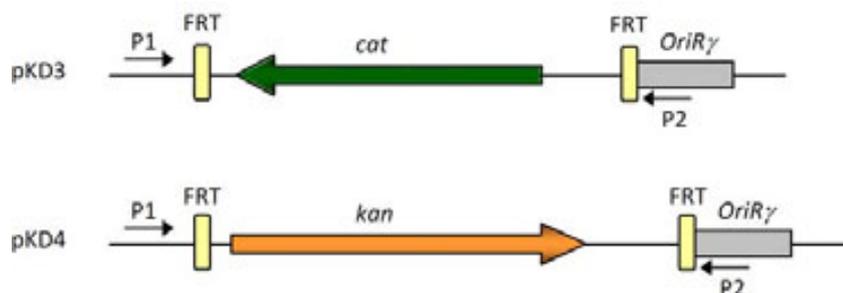
Para la electrotransformación, un vial de células competentes de la cepa receptora deseada se puso en contacto con el DNA a transformar (200 ng en el caso de DNA plasmídico o 1 µg en el caso de DNA lineal). Tras incubar la mezcla durante 15 minutos en hielo, se incorporó en una cubeta de electroporación (2 mm *electrode gap cuvettes*, Biolabs) y se sometió a las células a un pulso eléctrico de 2,5 kV/cm<sup>2</sup> a 25 µF de capacitancia y 200 Ω de resistencia (*Bio-Rad Gene Pulser*, Bio-Rad) en el caso de *S. Typhimurium*, o de 2 kV/cm<sup>2</sup> a 25 µF de capacitancia y 200 Ω de resistencia en el caso de *E. coli*.

Tras la electroporación, las células fueron resuspendidas en 1 mL de BHI, o en 1 mL de SOC en caso de haber sido transformadas con DNA lineal para el proceso de inactivación génica en un solo paso (Apartado 3.3.8). Posteriormente fueron transferidas a un tubo de vidrio e incubadas durante 90 minutos a temperatura no restrictiva (30 o 37°C, en función de si la cepa receptora

es portadora de un plásmido Ts). Tras este período de incubación, las células fueron sembradas en placas selectivas e incubadas a temperatura no restrictiva hasta el crecimiento de los clones resistentes.

### 3.3.8. OBTENCIÓN DE MUTANTES DE *S. Typhimurium*

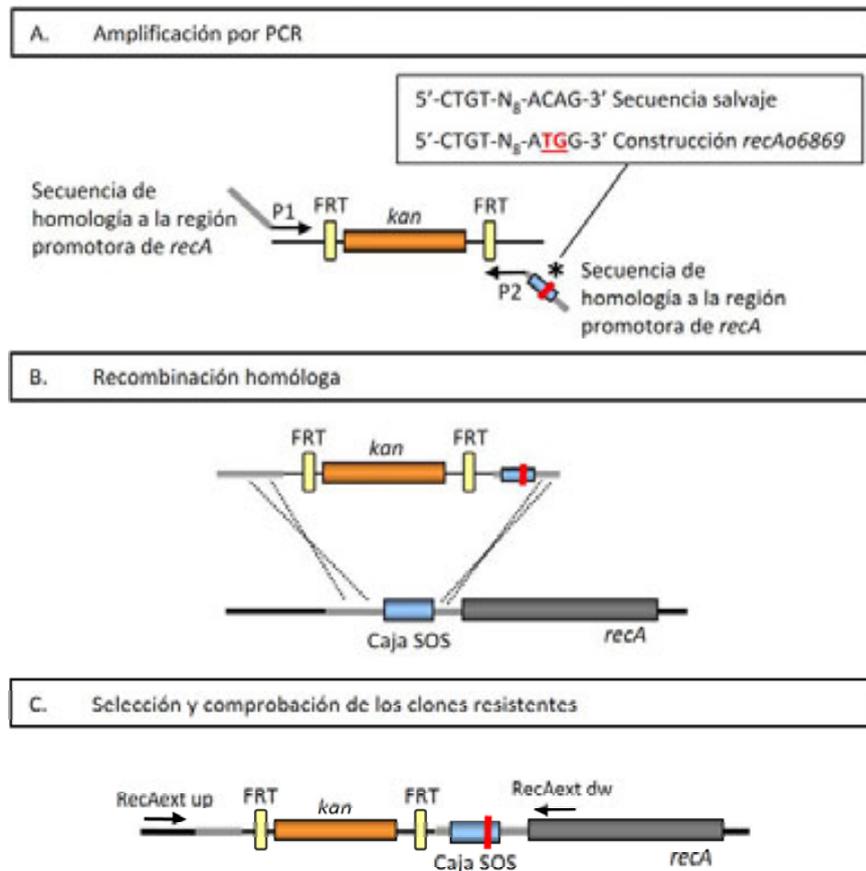
Para la obtención del mutante *recA*<sub>06869</sub> de *S. Typhimurium* (cepa UA1876) se empleó el método de inactivación génica en un solo paso descrito por Datsenko y Wanner (2000). Para ello, fue necesario introducir el plásmido pKOBEGA (Chaverroche *et al.*, 2000) en la cepa salvaje de *S. Typhimurium* ATCC 14028 mediante electrotransformación, obteniendo así la cepa UA1826.



**Figura 3.1.** Esquema de las regiones que contienen los casetes de resistencia antibiótica en los plásmidos pKD3 y pKD4. El plásmido pKD3 es portador del gen *cat*, que confiere resistencia a Cm. El plásmido pKD4 es portador del gen *kan*, que confiere resistencia a Km. En ambos casos se muestran las regiones de unión de los oligonucleótidos cebadores P1 y P2, empleados para la amplificación de dichos casetes tras la adición de las colas de homología al DNA cromosómico de *S. Typhimurium*. Modificado de Datsenko y Wanner (2000).

Posteriormente, se amplificó mediante PCR el casete de resistencia a Km procedente del plásmido pKD4 (Fig. 3.1) (Datsenko y Wanner, 2000), empleando para ello los oligonucleótidos cebadores P1-RecA y P2-RecA (Tabla 3.2), cada uno de los cuales incorpora una región de homología con la secuencia promotora del gen *recA* de *S. Typhimurium* (Fig. 3.2). El oligonucleótido P2-RecA contiene en esta región la caja SOS que regula la expresión de dicho gen, en la cual se introdujeron dos cambios puntuales que impiden la unión de LexA a la caja. Una vez finalizada la PCR, el fragmento de DNA obtenido fue visualizado y purificado desde un gel de agarosa. A continuación, el producto recuperado fue digerido con el enzima de restricción *DpnI* con el fin de eliminar los restos de DNA molde y, por último, el casete de resistencia a Km con las colas de homología al DNA cromosómico de *S. Typhimurium* fue purificado de nuevo y empleado para la mutagénesis de la caja SOS del gen *recA*.

Para tal fin, este fragmento de DNA lineal portador de la resistencia a Km fue introducido mediante electrotransformación en células competentes de la cepa UA1826, las cuales fueron sembradas a continuación en placas selectivas. Tras el aislamiento de los clones resistentes, se procedió a la curación del plásmido pKOBEGA mediante el protocolo descrito por Datsenko y Wanner (2000), haciendo uso de su termosensibilidad. La presencia del casete de resistencia a Km en la región deseada se comprobó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos RecAext up y RecAext dw (Tabla 3.2; Fig. 3.2) y la presencia de la mutación en la caja SOS se verificó mediante secuenciación con estos mismos oligonucleótidos.



**Figura 3.2.** Esquema del proceso de mutagénesis en un solo paso de la caja SOS del gen *recA* de *S. Typhimurium* ATCC 14028. A) La resistencia a Km se amplificó desde el plásmido pKD4 con los oligonucleótidos P1-RecA y P2-RecA, los cuales incorporan las regiones de homología al DNA cromosómico de *S. Typhimurium* y la mutación en la caja SOS del gen *recA*. B) La construcción amplificada se electrotransformó sobre la cepa UA1826 y el fragmento de DNA lineal portador del casete de resistencia a Km y de la caja SOS mutada se incorporó en el DNA cromosómico de *S. Typhimurium* mediante recombinação homóloga. C) Se seleccionaron los clones resistentes a Km crecidos en las placas y se comprobó la inserción del casete de resistencia a Km y la presencia de la mutación en la caja SOS mediante PCR y secuenciación con los oligonucleótidos cebadores RecAext up y RecAext dw.

Una vez confirmada la presencia de la mutación en la caja SOS del gen *recA*, esta construcción fue transducida desde la cepa UA1826 hasta la cepa salvaje de *S. Typhimurium* ATCC 14028 mediante el bacteriófago P22HTint7 (Apartado 3.3.9). Se obtuvo así la cepa UA1876.

La construcción de la cepa salvaje de *S. Typhimurium* ATCC 14028 isogénica con el mutante *recAo6869* (cepa UA1885) se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento que se ha descrito para dicho mutante. Sin embargo, en este caso, la amplificación del casete de resistencia a Km desde el plásmido pKD4 se realizó con los oligonucleótidos P1-RecA y P2-Km, los cuales incorporan las regiones de homología con la secuencia promotora del gen *recA* de *S. Typhimurium*, pero no los cambios puntuales en la caja SOS que regula la expresión de dicho gen (Tabla 3.2). De nuevo, se confirmó la presencia del casete de resistencia a Km en la región deseada mediante PCR con los oligonucleótidos RecAext up y RecAext dw (Tabla 3.2) y la ausencia de mutaciones en la caja SOS del gen *recA* se verificó mediante secuenciación con estos mismos oligonucleótidos.

Para la construcción del doble mutante *recAo6869 lexA3(Ind<sup>r</sup>)* de *S. Typhimurium* ATCC 14028 (cepa UA1877), la mutación en la caja SOS del gen *recA* fue transducida desde el mutante *recAo6869* (cepa UA1876) hasta el mutante *lexA3(Ind<sup>r</sup>)* de *S. Typhimurium* ATCC 14028 (cepa UA1822) construido previamente (Campoy *et al.*, 2006). Se empleó para ello el bacteriófago P22HTint7 (Apartado 3.3.9). Al igual que en los casos anteriores, se determinó la presencia del casete de resistencia a Km mediante PCR con los oligonucleótidos RecAext up y RecAext dw (Tabla 3.2) y se confirmó la mutación en la caja SOS del gen *recA* mediante secuenciación con dichos oligonucleótidos.

Para la obtención del mutante *recX* (cepa UA1878) se empleó de nuevo el sistema de inactivación génica en un solo paso (Datsenko y Wanner, 2000) sobre la cepa UA1826. Para la obtención del doble mutante *recAo6869 recX* (cepa UA1879) se empleó este mismo sistema sobre la cepa UA1895 (obtenida tras electrotransformar el plásmido pKOBEGA en el mutante *recAo6869*). En ambos casos, se utilizaron los oligonucleótidos P1-OraA y P2-OraA (Tabla 3.2) para amplificar mediante PCR el casete de resistencia a Cm procedente del plásmido pKD3 (Fig. 3.1). Estos oligonucleótidos incorporan a cada extremo del casete de resistencia una región de homología con el gen *recX* de *S. Typhimurium* ATCC 14028. Una vez obtenido el producto de la PCR, se siguió el proceso de mutagénesis tal y como se ha descrito para el mutante *recAo6869* con el fin de sustituir un fragmento interno del gen *recX* por el casete de resistencia a Cm. Finalmente, la inserción de dicho casete en la región cromosómica deseada se comprobó mediante PCR empleando los oligonucleótidos cebadores OraAint up y OraAint dw (Tabla 3.2) y se verificó mediante secuenciación con estos mismos oligonucleótidos. Una vez confirmados los mutantes, estas construcciones se transdujeron a la cepa salvaje de *S. Typhimurium* ATCC 14028 empleando el bacteriófago P22HTint7 (Apartado 3.3.9).

### 3.3.9. TRANSDUCCIÓN GENERALIZADA

Durante el proceso de transducción generalizada es necesario obtener, en primer lugar, un lisado fágico a partir de la cepa portadora de la mutación de interés (cepa donadora). Para ello, se realizó una resiembra 1/50 desde un cultivo ON de la cepa donadora en medio LB, incubándose a 37°C y con agitación hasta alcanzar una  $DO_{550}$  de 0,5. Una vez alcanzada esta  $DO_{550}$ , se infectó el cultivo con la cantidad necesaria de un lisado del bacteriófago P22HTint7 obtenido previamente para conseguir una multiplicidad de infección (MOI) de 1. El cultivo infectado se incubó durante 5 horas a 37°C y, pasado este tiempo, se centrifugó durante 10 minutos a 8000 x g (Centrífuga J2-21, Beckman). El sobrenadante se filtró a través de un filtro de membrana de PVDF de 0,45 µm de diámetro de poro y el lisado obtenido se tituló y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Para la titulación de los lisados fágicos se realizaron diluciones seriadas de dichos lisados en  $MgSO_4$  10 mM. Posteriormente, se mezclaron 100 µL de cada dilución con 100 µL de una suspensión bacteriana de la cepa donadora (concentración aproximada de  $2 \times 10^8$  cfu/mL) en tubos con 3 mL de LB semisólido. Las mezclas se extendieron sobre placas de LB y éstas se incubaron a 37°C durante 16 horas. Transcurrido este tiempo, se procedió al recuento de las calvas observadas en las placas y se calculó el título del lisado fágico, expresándose en pfu/mL (por *Plaque Forming Units*).

Una vez obtenido el lisado fágico, se infectó con él a la cepa a la cual se quería incorporar la mutación (cepa receptora). Para ello, se realizó una resiembra 1/50 desde un cultivo ON de la cepa receptora en medio LB, incubándose a 37°C y con agitación hasta alcanzar una  $DO_{550}$  de 0,5. Una vez alcanzada esta  $DO_{550}$ , se separaron 2 alícuotas del cultivo y se infectaron con la cantidad necesaria de lisado fágico para conseguir una MOI de 1 en la primera y una MOI de 10 en la segunda. Ambas alícuotas se incubaron durante 3 horas a 37°C y se sembraron posteriormente en placas de LB suplementadas con el antibiótico adecuado. Las placas se incubaron a 37°C durante 24-48 horas hasta la aparición de colonias resistentes.

Algunos de los clones transductantes obtenidos mediante este proceso pueden ser lisógenos para el bacteriófago P22HTint7 a consecuencia de la sobreinfección. Para descartar dichos clones se realizaron siembras seriadas en placas verdes (Davis *et al.*, 1980).

Los clones mutantes obtenidos mediante transducción generalizada se comprobaron mediante PCR y secuenciación con los oligonucleótidos adecuados.

### 3.3.10. ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN DEL SISTEMA SOS

La presencia o la ausencia de activación del sistema SOS en las diferentes cepas de *S. Typhimurium* se determinó mediante la cuantificación del nivel de inducción de los genes *recA*, *uvrA* y *sulA* por efecto de la mitomicina C. Para ello, se estudió su expresión en presencia y en ausencia de este compuesto mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Esta técnica permite cuantificar la concentración relativa del RNA mensajero (mRNA) de cada gen en las condiciones mencionadas, haciendo posible establecer su nivel de inducción.

Para la obtención del RNA total de las distintas cepas de *S. Typhimurium* se realizó una resiembra, desde una placa de LB de la cepa deseada crecida durante 16 horas, en medio LB líquido, ajustando la DO<sub>550</sub> de la resiembra a 0,04-0,05. Esta resiembra se incubó a 37°C y con agitación hasta alcanzar una DO<sub>550</sub> de 0,2. Una vez alcanzada esta DO<sub>550</sub>, el cultivo fue dividido en dos muestras, una de las cuales se trató con mitomicina C (80 ng/mL; Sigma) mientras que la otra se mantuvo como control no tratado. Ambas muestras se incubaron durante 30 minutos a 37°C y con agitación. Transcurrido este tiempo, se procedió a la extracción del RNA total de cada una de las muestras siguiendo el protocolo ya descrito (Apartado 3.3.2).

A continuación se determinó el nivel de expresión de los genes *recA*, *sulA* y *uvrA* en las diferentes condiciones mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real, siguiendo el procedimiento descrito por Campoy *et al.* (2003). Se empleó el kit comercial *LightCycler® RNA Master SYBR Green I* (Roche) y el equipo *LightCycler® Instrument* (Roche) para la realización de las RT-PCR cuantitativas y el soporte informático *LightCycler® Software* (Roche) para el análisis de los datos obtenidos. En todos los casos, se siguieron las instrucciones del proveedor. Con el fin de obtener resultados comparables, la cantidad de RNA total añadida a la mezcla de reacción de la RT-PCR cuantitativa fue la misma tanto en las pruebas realizadas con las muestras tratadas con mitomicina C como en las realizadas con las muestras no tratadas con este compuesto. Asimismo, se analizó simultáneamente la expresión del gen *hisG*, gen *housekeeping* no perteneciente al sistema SOS (Erill *et al.*, 2003) con una expresión constitutiva. De este modo, el nivel de expresión de dicho gen fue utilizado para normalizar los resultados obtenidos para los genes *recA*, *sulA* y *uvrA*. Los oligonucleótidos utilizados en las distintas RT-PCR cuantitativas se detallan en la Tabla 3.2.

El factor de inducción (FI) de cada gen en respuesta a la presencia de mitomicina C en el entorno se define como el ratio entre la concentración relativa del mRNA de dicho gen en presencia de dicho compuesto y la concentración relativa de su mRNA en ausencia de él.

### 3.4. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

#### 3.4.1. LISIS CELULAR MEDIANTE SONICACIÓN Y ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA

En los diferentes procesos de obtención de extractos proteicos crudos llevados a cabo en este trabajo las células fueron lisadas mediante sonicación a 50 W en pulsos de 0,7 segundos, empleando un homogenizador ultrasónico *Braun Labsonic U* (B. Biotech). El tiempo de sonicación aplicado fue determinado en función del tipo y el volumen del cultivo.

La separación y visualización de las proteínas en los extractos crudos se realizó mediante electroforesis desnaturante en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%, al 12% o al 15%, en función del tamaño de las proteínas a separar. Para la preparación de los geles de electroforesis se empleó Acrilamida 30% p/v-Bisacrilamida 0,8% p/v (Pronadisa) (Anexo B).

Las electroforesis verticales se realizaron durante 90 minutos a 150 V en tampón Tris-Glicina-SDS (TGS, Laboratorios Conda), empleando para ello el soporte de electroforesis *MiniVE Vertical Electrophoresis System* (GE Healthcare). Una vez finalizadas, los geles se tiñeron con *Brilliant Blue G-colloidal* (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 3.4.2. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE PROTEÍNA RecA

La cuantificación de los niveles intracelulares de la proteína RecA en las distintas cepas de *S. Typhimurium* se llevó a cabo en colaboración con el laboratorio de Estabilidad Genética del departamento de Biotecnología Microbiana del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), dirigido por el Dr. Alonso.

Para la obtención de los extractos proteicos crudos de las distintas cepas de *S. Typhimurium* se realizó una resiembra 1/100 desde un cultivo ON de la cepa deseada en medio LB, incubándose a 37°C y con agitación hasta alcanzar una  $DO_{550}$  de 0,4. Una vez alcanzada esta  $DO_{550}$ , el cultivo se dividió en dos muestras, una de las cuales se trató con mitomicina C (0,8 µg/mL) mientras que la otra se tomó como control no tratado. Ambos cultivos se incubaron a 37°C y con agitación durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, se realizó el recuento celular de cada muestra mediante la siembra de diluciones seriadas en placas de LB y se sedimentaron las células de 4 mL de cada muestra por centrifugación a 8000 x *g* durante 10 minutos (Centrífuga *J2-21*, Beckman), resuspendiéndolas posteriormente en 200 µL de tampón A (Anexo B). A continuación, las células fueron lisadas mediante sonicación durante 2 minutos y,

una vez lisadas, los restos celulares fueron eliminados por centrifugación a 12000 x *g* durante 10 minutos (Centrífuga *MiniSpin*<sup>®</sup>, Eppendorf). Por último, se añadieron 100 µL de tampón B (Anexo B) a las proteínas y se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

Los extractos proteicos obtenidos mediante este proceso se separaron mediante SDS-PAGE en un gel de SDS-poliacrilamida al 10%, junto a un estándar de diferentes concentraciones de proteína RecA purificada (10-500 ng). Tras la separación electroforética de las proteínas, se detectó la presencia de RecA mediante Western Blot según se ha descrito previamente (Carrasco *et al.*, 2009). Las bandas obtenidas en el Western Blot se cuantificaron mediante densitometría y se estableció la cantidad de RecA intracelular existente en el extracto crudo mediante la curva patrón obtenida a partir del estándar de proteína RecA purificada.

### **3.4.3. SOBREENPRESIÓN DE LOS GENES *recA* Y *cheW* BAJO CONTROL DEL PROMOTOR *Ptac***

#### **3.4.3.1. Construcción del vector pUA1108**

Para la construcción del vector de sobreexpresión pUA1108, el vector plasmídico pGEX 4T-1 fue amplificado mediante PCR inversa empleando los oligonucleótidos cebadores pGEX up y pGEX dw (Tabla 3.2). La amplificación con estos oligonucleótidos generó la delección de la región que codifica la glutatión S-transferasa (GST), la cual fue sustituida por las dianas de restricción *NdeI* y *BamHI*, incorporadas con los oligonucleótidos. El fragmento de DNA obtenido en la PCR fue visualizado en un gel de agarosa y purificado desde él para ser religado, obteniendo así el vector pUA1108 (Tabla 3.1). El producto de la religación se electrotransformó sobre células competentes de *E. coli* DH5α y las células se sembraron en placas selectivas. Una vez crecidos los clones transformantes, portadores del plásmido pUA1108, se comprobó la eliminación del gen que codifica la GST y la incorporación en su lugar de las dianas *NdeI* y *BamHI* mediante PCR y secuenciación con oligonucleótidos -108 pNAS y +128 pNAS (Tabla 3.2).

#### **3.4.3.2. Clonación de los genes *recA* y *cheW* en pUA1108**

Para la clonación de los genes *recA* y *cheW* de *S. Typhimurium* en el vector pUA1108 se emplearon las dianas de restricción *NdeI* y *BamHI* incorporadas en él. Para tal fin, ambos genes fueron amplificados mediante PCR empleando los oligonucleótidos indicados en la Tabla 3.2, incorporando la diana de restricción *NdeI* en el oligonucleótido directo y la diana de restricción *BamHI* en el oligonucleótido reverso. Los fragmentos de DNA amplificados se ligaron al vector de clonación pGEM-T y el producto de cada una de las ligaciones se electrotransformó sobre células competentes de *E. coli* DH5α. Una vez crecidos los clones transformantes, se

determinó la inserción del gen deseado en cada caso en el plásmido pGEM-T mediante PCR y secuenciación con los oligonucleótidos M13F pUC y M13R pUC (Tabla 3.2).

Posteriormente, los genes *recA* y *cheW* se extrajeron del vector pGEM-T mediante digestión con los enzimas *NdeI* y *BamHI* y los productos obtenidos se visualizaron y purificaron a partir de un gel de agarosa. A continuación, ambos genes se ligaron al vector pUA1108 previamente digerido con estos mismos enzimas y el producto de cada una de las ligaciones se electrotransformó sobre células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Tras el crecimiento de los clones transformantes, se verificó la incorporación de los genes *recA* y *cheW* en el plásmido pUA1108 bajo control del promotor *Ptac* mediante PCR y secuenciación con los oligonucleótidos -108 pNAS y +128 pNAS (Tabla 3.2). Se obtuvieron así los vectores pUA1109 y pUA1110, respectivamente (Tabla 3.1).

Finalmente, los vectores pUA1109 y pUA1110 fueron electrotransformados sobre células competentes de la cepa salvaje y del mutante *recA*06869 de *S. Typhimurium* ATCC 14028, respectivamente. La incorporación del plásmido deseado en cada caso se verificó de nuevo mediante PCR y secuenciación con los oligonucleótidos -108 pNAS y +128 pNAS (Tabla 3.2).

### 3.4.3.3. Sobreexpresión de los genes *recA* y *cheW*

Antes de realizar los experimentos de movilidad fue necesario verificar que los genes *recA* y *cheW*, clonados en los vectores pUA1109 y pUA1110 respectivamente, se sobreexpresaban en *S. Typhimurium* en respuesta a la inducción del promotor *Ptac* con IPTG.

Para tal fin, se realizó una resiembra 1/50 desde un cultivo ON de cada una de las cepas deseadas en medio LB líquido y se incubó a 37°C y con agitación hasta alcanzar una DO<sub>550</sub> de 0,6. Una vez alcanzada esta DO<sub>550</sub>, el cultivo se separó en dos muestras. Una de ellas se indujo con IPTG a una concentración final de 1 mM, mientras que la otra se tomó como control negativo no inducido. Ambas muestras se incubaron a 37°C y con agitación durante 3 horas para permitir la sobreexpresión génica. Transcurrido este tiempo, se centrifugó 1 mL de cada una de las muestras a 12000 x *g* durante 2 minutos (Centrífuga *MiniSpin*<sup>®</sup>, Eppendorf) y las células fueron resuspendidas en 90  $\mu$ L de agua MQ. A continuación se añadieron 30  $\mu$ L de solución transportadora de proteínas 4x (Anexo B) y se sometió a las células a 3 ciclos consecutivos de 5 minutos a -80°C y 5 minutos a 100°C, para permitir la lisis total de las células. Se obtuvo así el extracto proteico crudo de las cepas estudiadas.

Seguidamente, 10  $\mu$ L de los extractos proteicos obtenidos se separaron mediante SDS-PAGE en geles de SDS-poliacrilamida al 12% para el estudio de la sobreexpresión de RecA, o al 15% para el estudio de la sobreexpresión de CheW. Tras finalizar la electroforesis, los geles se tiñeron

para confirmar la sobreexpresión de ambas proteínas y, una vez verificada dicha sobreexpresión, se realizaron los ensayos de movilidad deseados tal y como se describe en el apartado 3.2.5.

### 3.4.4. ENSAYOS DE DOBLE HÍBRIDO

Para el estudio de la interacción entre las proteínas RecA y CheW de *S. Typhimurium* se empleó el ensayo de doble híbrido descrito por Borloo *et al.* (2007). En este ensayo, las proteínas de interés son clonadas en los vectores pB2H $\Delta\alpha$  y pB2H $\Delta\omega$  (Tabla 3.1) formando una fusión traduccional con el gen que codifica la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*. En el primer vector, la proteína  $\beta$ -galactosidasa es portadora de una delección en su subunidad  $\alpha$  (mutación  $\Delta\alpha$ ), mientras que en el segundo vector es portadora de una delección en su subunidad  $\omega$  (mutación  $\Delta\omega$ ). En ambos casos, la expresión de la proteína de fusión está regulada por el promotor *P<sub>tac</sub>*. Ninguna de las dos formas mutadas de la  $\beta$ -galactosidasa da lugar a un enzima funcional. Sin embargo, cuando ambas formas interactúan entre sí, se complementan y se obtiene actividad  $\beta$ -galactosidasa. Esta situación sólo tiene lugar como consecuencia de la interacción entre las proteínas a las que están fusionadas. De este modo, una vez construidas las fusiones génicas, el ensayo de doble híbrido se lleva a cabo mediante la introducción de la pareja de plásmidos complementaria en *E. coli* MC1061, cepa que presenta delecionado el operón lactosa. Cada uno de los vectores de esta pareja será portador de la fusión génica entre una de las proteínas de interés y una de las subunidades mutadas de la  $\beta$ -galactosidasa. El estudio de la capacidad que presenta la cepa portadora de ambos plásmidos para degradar lactosa u otros compuestos análogos permite confirmar o descartar la interacción entre las proteínas de interés. En este trabajo, a modo de control negativo, se estudió la interacción entre las proteínas DnaE y AmyA (Borloo *et al.*, 2007).

#### 3.4.4.1 Clonación de los genes que codifican las proteínas de interés en pB2H $\Delta\alpha$ y pB2H $\Delta\omega$

Los genes *recA*, *cheW*, *dnaE* y *amyA* de *S. Typhimurium* se amplificaron mediante PCR empleando los oligonucleótidos detallados en la Tabla 3.2. En todos los casos, se incorporó la diana de restricción *SphI* en el oligonucleótido directo y la diana *BamHI* en el oligonucleótido reverso para permitir la posterior clonación de los insertos, orientada y en fase con el gen *lacZ* de *E. coli*, en los plásmidos pB2H $\Delta\alpha$  y pB2H $\Delta\omega$ . Asimismo, se delecionó el codón de terminación de todos los genes para permitir la formación de la fusión traduccional entre cada uno de ellos y el gen *lacZ*. Una vez obtenidos los productos de PCR, los genes *recA*, *cheW* y *amyA* se clonaron en el vector pGEM-T y se extrajeron de él mediante digestión con las enzimas *SphI* y *BamHI* tal y como se ha descrito previamente (Apartado 3.4.3.2). Por el contrario, dada la dificultad para clonar el gen *dnaE* en este vector debido a su tamaño, los

oligonucleótidos empleados para su amplificación permitieron digerir directamente el producto de PCR purificado.

Tras la obtención de todos los genes mediante digestión con los enzimas *SphI* y *BamHI*, se realizó la ligación a los vectores pB2HΔ $\alpha$  y pB2HΔ $\omega$  previamente digeridos con estos mismos enzimas de restricción. El producto de cada una de las ligaciones fue electrotransformado sobre células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , sembradas a continuación en placas selectivas. Una vez crecidos los clones transformantes, se comprobó la incorporación del vector y el inserto deseados en cada caso mediante PCR y secuenciación con los oligonucleótidos pB2HF y pB2HR (Tabla 3.2), obteniéndose así los plásmidos pUA1114, pUA1115, pUA1116, pUA1117, pUA1118 y pUA1119 (Tabla 3.1).

Por último, cada uno de estos vectores se electrotransformó sobre células competentes de *E. coli* MC1061 con el fin de verificar en esta cepa la expresión de la proteína de fusión deseada mediante Western blot. De nuevo, la incorporación del vector deseado en cada transformación se comprobó mediante PCR y secuenciación con los oligonucleótidos pB2HF y pB2HR (Tabla 3.2).

#### **3.4.4.2 Control de la expresión de las proteínas de fusión**

Con el fin de confirmar la expresión de la proteína de fusión deseada en cada plásmido se realizaron ensayos de Western Blot. Mediante estos ensayos se determinó la presencia de la proteína  $\beta$ -galactosidasa en el extracto proteico de las cepas portadoras de cada uno de los plásmidos y se verificó que el tamaño observado de la proteína era el esperado para las proteínas de fusión.

Para la obtención de los extractos proteicos crudos se realizó una resiembra 1/100, desde un cultivo ON de la cepa deseada, en medio LB suplementado con Ap (50  $\mu$ g/mL), Cm (34  $\mu$ g/mL) e IPTG (20 mM). La resiembra se incubó a 37°C y con agitación hasta alcanzar una DO<sub>550</sub> de 0,8. Una vez alcanzada esta DO<sub>550</sub>, las células de 5 mL del cultivo se sedimentaron mediante centrifugación a 8000 x *g* durante 10 minutos (Centrífuga J2-21, Beckman) y se resuspendieron en 1 mL de tampón PBS 1X (Anexo B). A continuación, las células fueron lisadas mediante sonicación durante 2 minutos y los restos celulares fueron eliminados por centrifugación a 12000 x *g* durante 10 minutos (Centrífuga *MiniSpin*<sup>®</sup>, Eppendorf), obteniéndose así el extracto proteico crudo. Finalmente, se añadió glicerol (Panreac) a dicho extracto a una concentración final del 12% (v/v) y se conservó a -20°C hasta su uso.

Los extractos proteicos obtenidos mediante este procedimiento se cuantificaron mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), empleando para ello el reactivo *Protein Assay Dye*

*Reagent Concentrate* (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del proveedor. Como estándar, se realizó una recta patrón con la proteína BSA (*Bovine Serum Albumin*, Roche).

Para la realización de los ensayos de Western blot, 20 µg de proteína total de los extractos crudos se separaron mediante SDS-PAGE en un gel de SDS-poliacrilamida al 10%, empleando como marcador de peso molecular el kit *Precision Plus Protein™ Western C™ Standards* (Bio-Rad). Tras finalizar el SDS-PAGE, se realizó la transferencia electroforética de las proteínas a una membrana *Immobilon P* de PVDF de 0,45 µm de diámetro de poro (Millipore). Para ello, el gel de poliacrilamida se trató durante 10 minutos con agua destilada y durante 20 minutos con tampón de transferencia (Anexo B), mientras que la membrana se trató durante 10 minutos con metanol (Panreac), se lavó con agua destilada, se trató durante 10 minutos más con una solución de metanol al 25% (v/v) en agua destilada y finalmente se incubó durante 20 minutos en tampón de transferencia. A continuación, se realizó la electrotransferencia de las proteínas a 4°C de temperatura y 350 mA durante 1 hora y 30 minutos, empleando para ello el soporte *Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad).

Una vez finalizada la electrotransferencia, la membrana de PVDF se bloqueó durante toda la noche a 4°C con tampón de bloqueo (Anexo B). Transcurrido este tiempo, la membrana se sumergió en una solución del anticuerpo primario (IgG de conejo anti-β-galactosidasa de *E. coli*; *β-galactosidase Tag Antibody*, Acris Antibodies) diluido en tampón de bloqueo (dilución 1/10000), y se incubó a temperatura ambiente y con agitación lenta durante 1 hora. Posteriormente, se realizaron tres lavados consecutivos de 10 minutos con tampón PBS 1X y se sumergió de nuevo la membrana en una solución del anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa; *Rabbit IgG [H+L chain]*, Acris Antibodies) diluido en tampón de bloqueo (dilución 1/10000). La membrana se incubó con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación lenta y, de nuevo, se lavó tres veces consecutivas con tampón PBS 1X durante 10 minutos.

Finalmente, las proteínas reactivas fueron visualizadas empleando el kit comercial *Luminata™ Forte Western HRP substrate* (Millipore) siguiendo las instrucciones del proveedor. El sistema de captación de imágenes empleado para tal fin fue el *ChemiDoc™ XRS+ System* (Bio-Rad).

### **3.4.4.3 Ensayo de doble híbrido**

Para determinar la interacción entre las proteínas RecA y CheW de *S. Typhimurium* se cotransformaron, mediante electroporación, las parejas de plásmidos pUA1114-pUA1117 (fusiones *recA-ΔalacZ* y *cheW-ΔωlacZ*, respectivamente) y pUA1115-pUA1116 (fusiones *recA-ΔωlacZ* y *cheW-ΔalacZ*, respectivamente) en células competentes de *E. coli* MC1061. Asimismo, a modo de control negativo, se estudió la interacción entre las proteínas DnaE y

AmyA (Borloo *et al.*, 2007), de tal modo que se cotransformó la pareja de plásmidos PUA1118-pUA1119 (fusiones *amyA-ΔαlacZ* y *dnaE-ΔωlacZ*, respectivamente) en esta misma cepa de *E. coli*. Una vez crecidos los clones transformantes, la incorporación de la pareja de plásmidos deseada en cada caso se comprobó mediante el fenotipo de resistencias antibióticas y mediante PCR con los oligonucleótidos específicos para cada gen (Tabla 3.2).

En cada una de las cotransformaciones se seleccionó un clon con el fin de cuantificar su actividad β-galactosidasa y confirmar o descartar la interacción entre las proteínas clonadas en la pareja de plásmidos incorporada en él. Para ello, se realizó una resiembra 1/50 desde un cultivo ON de cada uno de los clones en medio LB líquido debidamente suplementado con Ap (50 μg/mL) y Cm (34 μg/mL). Esta resiembra se incubó a 37°C y con agitación hasta alcanzar una DO<sub>550</sub> de 0,2. Una vez alcanzada esta DO<sub>550</sub>, se indujo el cultivo con IPTG a una concentración final de 20 mM (Borloo *et al.*, 2007) y se incubó en las mismas condiciones durante 3 horas, tomándose muestras a las 0, 1, 2 y 3 horas de incubación.

La cuantificación de la actividad β-galactosidasa en cada uno de estos tiempos se llevó a cabo mediante un ensayo enzimático, empleando el compuesto ONPG (orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosido) como reactivo cromogénico análogo a la lactosa, el cual, al ser degradado por la β-galactosidasa, induce la liberación de o-nitrofenol, compuesto indicador de color amarillo. Para la realización de este ensayo, en cada uno de los tiempos indicados se tomaron dos muestras del cultivo. En primer lugar, 0,8 mL de dicho cultivo se añadieron a un tubo de vidrio con 0,2 mL de formol al 10% (Panreac). Con esta muestra (tubo de DO) se cuantificó la DO<sub>550</sub> del cultivo. En segundo lugar, 0,2 mL del cultivo se añadieron a un tubo de vidrio con 0,8 mL de tampón Z (Anexo B). Con esta muestra (tubo β) se analizó la capacidad de las células para degradar ONPG.

Para tal fin, las células del tubo β se lisaron mediante la adición de 10 μL de tolueno. A continuación, se añadieron al tubo 0,2 mL de ONPG (4 mg/mL; Sigma) diluido en tampón fosfato 0,1 M y se incubó a 28°C para permitir la actividad de la β-galactosidasa. Una vez aparecido el color amarillo, la reacción se paró añadiendo 0,5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M (Panreac). Por último, se cuantificaron la DO<sub>550</sub> y la DO<sub>420</sub> del tubo β y se calcularon las unidades enzimáticas de β-galactosidasa presentes en el cultivo según la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades enzimáticas (UE)} = \frac{\text{DO}_{420} \text{ tubo } \beta - (1,75 \times \text{DO}_{550} \text{ tubo } \beta)}{T_{\text{ensayo}} \times V_{\text{cultivo}} \text{ tubo } \beta \times \text{DO}_{550} \text{ tubo DO}} \times 1000$$

donde T<sub>ensayo</sub> es el tiempo de incubación del cultivo a 28°C con la solución de ONPG y V<sub>cultivo</sub> es el volumen del cultivo incorporado en el tubo β para la realización del ensayo.

Una vez calculadas las unidades de  $\beta$ -galactosidasa presentes en el cultivo, el factor de inducción (FI) de la actividad  $\beta$ -galactosidasa se calcula como el incremento en las unidades enzimáticas de  $\beta$ -galactosidasa en cada tiempo (respecto al tiempo 0) dividido por el incremento en el control negativo (cepa portadora de la pareja formada por DnaE y AmyA).

### 3.5. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

Para la toma de las muestras empleadas en las observaciones microscópicas, se realizó una siembra de la cepa deseada de *S. Typhimurium* en una placa de LB o de LB *swarming* y se incubó durante 16 horas a 37°C. Una vez crecidos los clones, una colonia celular o una pequeña cantidad de biomasa (equivalente a una colonia) del margen del área de desplazamiento se depositaron sobre un portaobjetos y se prepararon para la observación mediante tinción de Gram.

Las observaciones microscópicas y la toma de imágenes se realizaron con el microscopio *Axio Imager M2* (Carl Zeiss) acoplado al sistema de imagen *AxioCam MRm* (Carl Zeiss). El procesamiento de las imágenes y el cálculo de la longitud celular se realizaron con el programa informático *AxioVision Release 4.8.2*, perteneciente al soporte informático *AxioVision Digital Image Processing Software* (Carl Zeiss).

### 3.6. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

#### 3.6.1. MODELO ANIMAL

El modelo animal empleado en los diferentes estudios llevados a cabo en este trabajo fue el modelo murino. Se utilizaron ratones hembra BALB/cAnNHsd (Harlan Iberica, Barcelona) de entre 4 y 6 semanas de edad. Los animales fueron estabulados en grupos de 6 animales por jaula, en un entorno libre de patógenos gracias a que las jaulas contaban con un sistema de ventilación artificial limitado por filtros HEPA. La sala en la que se estabularon los animales se mantuvo a una temperatura de entre 19 y 21°C, con ciclos artificiales de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y una humedad relativa del 50-60%. Para la alimentación de los ratones, se administró una dieta de ingredientes naturales peletizada y libre de antibióticos bajo un régimen alimenticio *ad libitum*. El agua se administró de forma estéril y los animales tuvieron acceso ilimitado a ella. Antes de ser utilizados para los ensayos experimentales, los ratones pasaron por una semana de cuarentena. Los animales fueron estabulados en el *Servei d'Estabulari* de la *Universitat Autònoma de Barcelona* (UAB) o en el Animalario del Instituto de Agrobiotecnología (CSIC-UPNA-Gobierno de Navarra).

### 3.6.2. ÍNDICES DE COMPETITIVIDAD *IN VIVO*

Para estudiar la virulencia de los diferentes mutantes de *S. Typhimurium* se realizaron ensayos de competitividad *in vivo* en el modelo murino según se ha descrito (Beuzón y Holden, 2001). En estos ensayos, se inocularon en el modelo animal cantidades equivalentes del mutante deseado y de la cepa salvaje de *S. Typhimurium* y se monitorizó el desarrollo del proceso infeccioso. Los estudios fueron aprobados por la *Comissió d'Ètica en l'Experimentació Animal i Humana* (CEEAH) de la UAB.

Para la preparación de la mezcla de inoculación, se sembraron por separado el mutante deseado y la cepa salvaje de *S. Typhimurium* en placas de LB y se dejaron crecer durante 16 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, se preparó una suspensión celular de cada una de las cepas en medio LB a una concentración final aproximada de  $2 \times 10^9$  cfu/mL, sembrándose diluciones seriadas de cada una de las suspensiones en placas de LB con el fin de obtener el título exacto. A continuación, se mezclaron las suspensiones de la cepa salvaje y de la cepa mutante en cantidades iguales y se obtuvo así la mezcla de inoculación. El recuento celular realizado previamente permitió determinar el ratio real entre ellas en esta mezcla.

Para la realización de los experimentos se inoculó a 6 o 12 ratones con un volumen de mezcla bacteriana correspondiente a 100 veces la dosis letal 50 ( $DL_{50}$ ) de *S. Typhimurium* ATCC 14028, la cepa utilizada en este estudio. Se aseguró así que todos los animales desarrollasen la enfermedad. La  $DL_{50}$  para este patógeno es de aproximadamente  $10^5$ - $10^6$  cfu/animal cuando es inoculado por vía oral y de aproximadamente 10 cfu/animal cuando es inoculado por vía intraperitoneal (ip). Por lo tanto, se inocularon 0,1 mL de la mezcla bacteriana en cada ratón en el primer caso y 0,1 mL de una dilución  $10^{-5}$  de la mezcla bacteriana en el segundo caso. En todos los casos se emplearon jeringuillas estériles de 1 mL (Icogamma® plus). Para las inoculaciones intraperitoneales, las jeringuillas se utilizaron acopladas a la aguja 25 G 0,5 mm x 16 mm suministrada junto a ellas, mientras que para las inoculaciones orales las jeringuillas se acoplaron a una cánula recta modelo 7.7.1 de 38 mm y 22G (Harvard Apparatus).

Una vez inoculados los ratones, la morbilidad y la mortalidad se monitorizaron diariamente siguiendo el protocolo de supervisión aprobado por la CEEAH (Tabla 3.3). Cuando los animales alcanzaron la puntuación que determina el criterio de punto final, se sacrificaron por dislocación cervical. Los animales que sobrevivieron a los 30 días de duración del experimento fueron sacrificados de la misma manera.

**Tabla 3.3.** Protocolo de supervisión del estado de los animales.

Parámetro	Valoración
Peso	Normal <sup>1</sup> : 0 puntos
	Pérdida de peso inferior al 10%: 1 punto
	Pérdida de peso entre el 10% y el 20%: 2 puntos
	Pérdida de peso superior al 20%: 3 puntos
Aspecto	Normal: 0 puntos
	Pelaje en mal estado: 1 punto
	Pelaje en mal estado y secreciones oculares y/o nasales: 2 puntos
	Postura anormal, automutilaciones o vocalización indicativa de dolor: 3 puntos
Respiración	Ausencia de disnea: 0 puntos
	Disnea leve: 1 punto
	Disnea moderada: 2 puntos
	Disnea severa: 3 puntos
Conducta	Normal: 0 puntos
	Agresivo y/o comatoso: 3 puntos

<sup>1</sup>No hay pérdida de peso o el animal crece con normalidad

Cuando un animal obtuvo una puntuación de 3 en dos o más parámetros, los 3 se contabilizaron como 4. Se estableció como criterio de punto final una puntuación igual o superior a 8 (50% de la máxima puntuación posible).

Una vez muertos, se realizó la necropsia de los animales y se tomaron muestras de sangre del corazón sobre placas de LB. Posteriormente, se realizó una siembra por agotamiento a partir de las muestras tomadas y se incubaron las placas a 37°C durante 16 horas. Finalmente, para determinar el ratio existente entre la cepa mutante y la cepa salvaje recuperado tras la infección, se realizaron réplicas en placas de LB y de LB suplementado con los antibióticos correspondientes.

El IC de cada mutante respecto a la cepa salvaje de *S. Typhimurium* se calcula como el ratio entre la cepa mutante y la cepa salvaje obtenido en las muestras extraídas del animal tras el desarrollo de la infección dividido por el ratio en el inóculo inicial. En función del número de ratones empleado en estos estudios y de la variabilidad de los datos se establece que un IC inferior a 0,25 indica que la cepa mutante presenta una menor capacidad infectiva que la cepa salvaje. En cambio, un IC superior a 4 permite determinar una mayor virulencia de la cepa mutante. El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos fue realizado por el *Servei d'Estadística* de la UAB empleando la prueba t de Student y la prueba de los signos de Wilcoxon.

### 3.6.3. ENSAYOS DE COINFECCIÓN DE ASAS INTESTINALES

Con el fin de determinar el IC de los mutantes *recA06869* y *recA06869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)* frente a la cepa salvaje de *S. Typhimurium* durante el proceso de invasión del epitelio intestinal se

realizaron ensayos de coinfección de asas intestinales en el modelo murino. Estos estudios se llevaron a cabo en colaboración con el grupo de investigación de Biofilms Microbianos del Instituto de Agrobiotecnología (CSIC-UPNA-Gobierno de Navarra), dirigido por el Dr. Lasa.

Para la preparación de la mezcla microbiana a inocular en las asas intestinales, se resuspendió cada una de las cepas deseadas (la cepa salvaje de *S. Typhimurium* ATCC 14028 y el mutante objeto del estudio) en tampón PBS 1X (Anexo B) hasta alcanzar una concentración final de  $10^7$  cfu/mL, sembrándose diluciones seriadas de cada una de las suspensiones en placas de LB con el fin de obtener el título exacto. A continuación, se mezclaron ambas suspensiones en cantidades equivalentes, obteniendo así la mezcla de inoculación.

Para la obtención de las asas intestinales, se trabajó con ratones BALB/c de 6 semanas de edad según se ha descrito previamente (Jones *et al.*, 1994). Los animales se mantuvieron en ayunas durante 24 horas antes de realizar los experimentos con el fin de eliminar todo el contenido intestinal. Transcurrido este tiempo, se anestesió a los ratones con una mezcla de Ketamina (100 mg/Kg) y Xilacina (10 mg/Kg) mediante una inyección ip y se procedió a realizar una pequeña incisión en el abdomen con el fin de exponer el intestino delgado. Posteriormente, se ligó una sección del intestino delgado que contuviese una placa de Peyer, sin impedir el riego sanguíneo hasta esta región, formando así un asa intestinal.

Una vez obtenida el asa intestinal, se inocularon en ella 0,2 mL de la mezcla microbiana deseada empleando para ello una aguja 25 G. Posteriormente, el intestino delgado fue devuelto a la cavidad abdominal y la incisión en el abdomen fue suturada para mantener al animal vivo durante 60 minutos. Transcurrido este tiempo, se sacrificó al animal y se escindió el asa intestinal íntegra del intestino delgado, se abrió el asa intestinal mediante un corte longitudinal y se resuspendió en PBS 1X. Las células de *S. Typhimurium* que no consiguieron penetrar en el epitelio intestinal y permanecieron extracelulares se eliminaron mediante tres lavados consecutivos con PBS 1X y una incubación posterior de 90 minutos en PBS 1X suplementado con gentamicina (100 µg/mL). Transcurrido este tiempo, el asa intestinal fue lavada de nuevo con PBS 1X para eliminar los restos de gentamicina y suspendida finalmente en 1 mL de PBS 1X para su procesamiento en un homogeneizador *Stomacher*<sup>®</sup> (Seward Medical). Finalmente, se sembraron diluciones seriadas del homogeneizado en placas de LB y en placas de LB suplementadas con el antibiótico adecuado para determinar la concentración de cada cepa en el interior de las células del epitelio intestinal.

El IC de cada mutante se calcula como el ratio entre la cepa mutante y la cepa salvaje obtenido del interior de las células epiteliales del asa intestinal tras su incubación durante 60 minutos en el interior abdominal dividido por el ratio inoculado. En función del número de asas intestinales inoculadas y de la variabilidad de los datos obtenidos se establece que un IC inferior a 0,4 indica que la cepa mutante presenta una menor capacidad invasiva que la cepa

salvaje. En cambio, un IC superior a 2,5 permite determinar una mayor invasividad. El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos fue realizado por el *Servei d'Estadística* de la UAB empleando la prueba de t de Student.

### 3.7. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS

Para el análisis de las secuencias genómicas de los microorganismos manipulados en este trabajo se utilizó la base de datos *Comprehensive Microbial Resource* (CMR) del *J. Craig Venter<sup>TM</sup> Institute* (JCVI) (<http://cmr.jcvi.org>) y la base de datos *Genebank* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih>).

Para la manipulación de los datos se empleó el paquete de programas *DNASTAR* (DNASTAR Inc.). El programa *EditSeq* se utilizó para la edición de secuencias de DNA. El programa *MapDraw* se empleó para el análisis de los mapas de restricción de secuencias determinadas de DNA. El programa *SeqMan* se utilizó para la búsqueda y el análisis de regiones de homología en el DNA. Por último, el programa *PrimerSelect* se utilizó para el diseño de oligonucleótidos cebadores para RT-PCR.

Para el alineamiento de múltiples secuencias de DNA se empleó el programa *ClustalW2* del *European Bioinformatics Institute* (EBI) (<http://www.ebi.ac.uk>).

## **4. Resultados**

---



## 4.1. CONSTRUCCIÓN DE LOS MUTANTES EN LA REGULACIÓN DEL SISTEMA SOS DE *S. Typhimurium* ATCC 14028

Para poder determinar el papel del sistema SOS en la virulencia de *S. Typhimurium*, en el presente trabajo se planteó el estudio de la virulencia de diferentes mutantes de este patógeno que incorporan cambios en las proteínas reguladoras del sistema SOS, RecA y LexA.

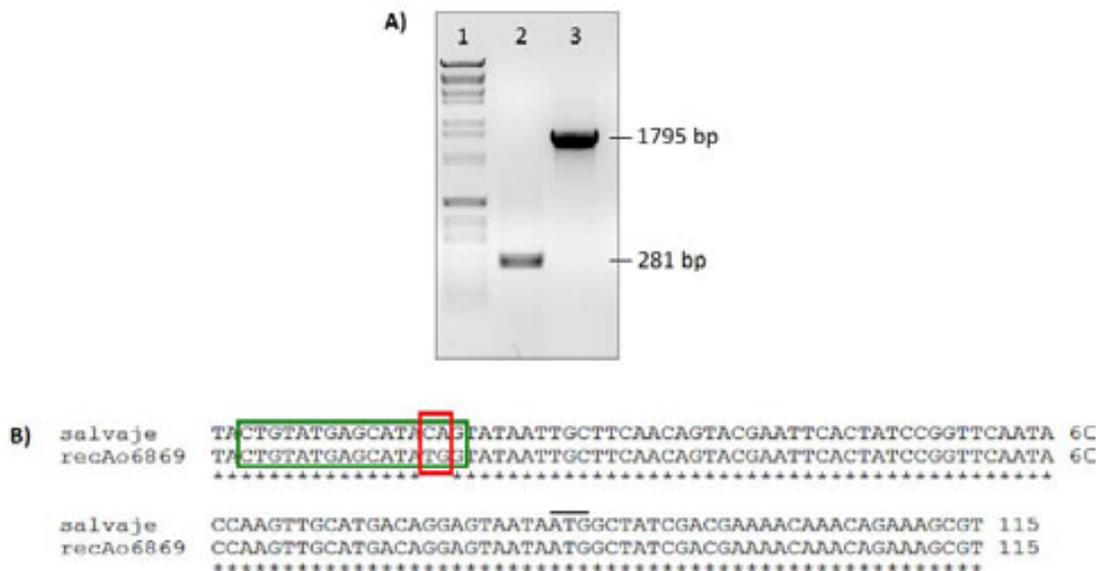
En primer lugar, se decidió trabajar con un mutante *lexA3*(Ind<sup>-</sup>) de *S. Typhimurium* (UA1822) construido previamente (Campoy *et al.*, 2006). Éste presenta una mutación en la Gly<sub>85</sub> de la proteína LexA, la cual ha sido sustituida por una Ala. De este modo se elimina el enlace Ala<sub>84</sub>-Gly<sub>85</sub> y, por lo tanto, la posibilidad de que se dé la autohidrólisis de la proteína. Como consecuencia, esta cepa es incapaz de inducir la respuesta SOS debido a que el represor LexA se encuentra siempre en su forma activa, unido a los promotores de los genes que regula, inhibiendo su expresión.

Dado que el gen *recA* pertenece al sistema SOS, las concentraciones intracelulares de RecA esperadas en la cepa *lexA3*(Ind<sup>-</sup>) son siempre basales, hecho que podría afectar al papel de esta proteína durante los procesos de reparación por recombinación cuando el nivel de lesiones es lo suficientemente elevado para inducir la respuesta SOS. Por este motivo, se decidió estudiar también la virulencia del doble mutante *recA<sub>o6869</sub> lexA3*(Ind<sup>-</sup>) de *S. Typhimurium* (UA1877). Esta cepa, además de ser incapaz de inducir la respuesta SOS, presenta una segunda mutación localizada en la caja SOS del promotor del gen *recA*. Esta segunda mutación impide la unión de la proteína LexA a dicho promotor y, como consecuencia, desvincula su expresión de la respuesta SOS. Así, en este mutante, el gen *recA* se expresa de forma constitutiva, asegurando que los niveles de la proteína RecA sintetizados no sean limitantes para los procesos de reparación por recombinación a pesar de su incapacidad para inducir la respuesta SOS.

Por último, se decidió estudiar, a modo de control, la capacidad infectiva de un mutante simple *recA<sub>o6869</sub>* de *S. Typhimurium* (UA1876), el cual incorpora únicamente la mutación en la caja SOS del promotor del gen *recA*, por lo que presenta una expresión constitutiva de este gen. Sin embargo, no incorpora cambio alguno en el gen *lexA* que pueda afectar a la inducción del resto de genes del sistema SOS.

Para la construcción del mutante *recA<sub>o6869</sub>* de *S. Typhimurium* se introdujeron dos cambios puntuales en el motivo ACAG de la caja SOS que regula el gen *recA* (Fig. 4.1 B). La introducción de estos cambios fue acompañada de la incorporación del casete de resistencia a kanamicina (Km) procedente del plásmido pKD4 en la región anterior a la caja SOS. La incorporación del casete de resistencia en este punto se comprobó mediante PCR (Fig. 4.1 A) y la incorporación

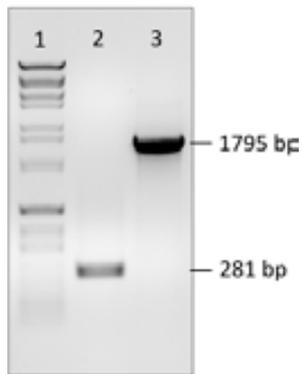
de los dos cambios puntuales en la caja SOS se confirmó posteriormente por secuenciación (Fig. 4.1 B).



**Figura 4.1.** Comprobación del mutante *recAo6869* de *S. Typhimurium* ATCC 14028. A) Resultado de la PCR para comprobar la incorporación del casete de resistencia a Km tras la mutagénesis de la región promotora del gen *recA*. Se muestra la banda de 281 bp obtenida tras la amplificación de dicha región promotora en la cepa salvaje de *S. Typhimurium* (carril 2), así como la banda de 1795 bp obtenida tras la amplificación de esta región en la cepa *recAo6869* (carril 3). B) Comparación de secuencias entre la región promotora del gen *recA* en el mutante *recAo6869* y la región promotora del gen *recA* en la cepa salvaje de *S. Typhimurium*. El inicio del gen (ATG) se señala con una línea superior en gris. La caja SOS se señala con un recuadro verde y los dos nucleótidos cambiados en esta región se indican con un recuadro rojo.

Para la obtención del doble mutante *recAo6869 lexA3(Ind<sup>r</sup>)* de *S. Typhimurium*, la construcción *recAo6869* fue transducida desde la cepa descrita en el párrafo anterior hasta la cepa *lexA3(Ind<sup>r</sup>)* construida previamente (Campoy *et al.*, 2006). La incorporación de la resistencia a Km en el doble mutante y la mutación en la caja SOS del gen *recA* fueron verificadas tal y como se ha descrito para el mutante simple *recAo6869*, obteniéndose idénticos resultados.

Como control para determinados estudios, y para determinar que la incorporación del casete de resistencia a Km no tiene ningún efecto sobre el fenotipo observado en dichos estudios, se construyó una cepa de *S. Typhimurium* ATCC 14028 isogénica con el mutante *recAo6869*, pero salvaje para la expresión del gen *recA* (UA1885). Para ello, se introdujo el casete de resistencia a Km en la cepa salvaje de *S. Typhimurium* en la misma posición que en la cepa *recAo6869*, pero sin incorporar ningún cambio en la caja SOS del gen *recA* durante el proceso. La incorporación de la resistencia a Km sin cambios en la caja SOS del promotor de *recA* fue comprobada de nuevo por PCR (Fig. 4.2) y secuenciación.



**Figura 4.2.** Resultado de la PCR para comprobar la incorporación del casete de resistencia a Km en la región promotora del gen *recA* de la cepa control de *S. Typhimurium* ATCC 14028. Se muestra la banda de 281 bp obtenida tras la amplificación de dicha región en la cepa salvaje (carril 2), así como la banda de 1795 bp obtenida tras la amplificación de esta región en la cepa control resistente a Km (carril 3).

## 4.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS MUTANTES *recAo6869*, *lexA3(Ind<sup>r</sup>)* y *recAo6869 lexA3(Ind<sup>r</sup>)*

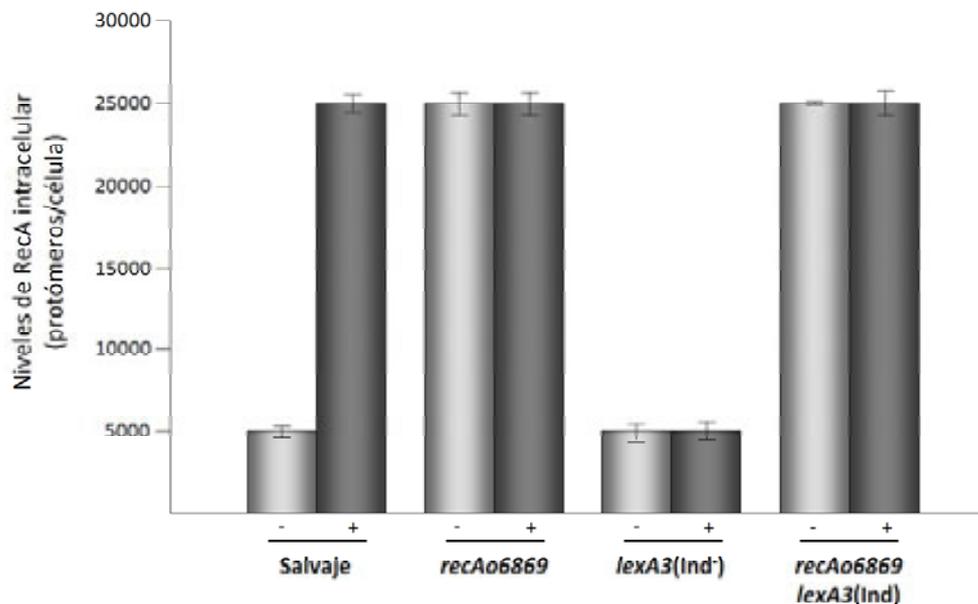
### 4.2.1. CUANTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RecA INTRACELULAR

Los niveles intracelulares de la proteína RecA presentes en los diferentes mutantes fueron calculados con la colaboración del laboratorio de Estabilidad Genética del departamento de Biotecnología Microbiana del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), dirigido por el Dr. Alonso. La Figura 4.3 muestra que los niveles basales de RecA cuantificados en el mutante *recAo6869* de *S. Typhimurium* son aproximadamente 5 veces superiores a los niveles observados en la cepa salvaje. Asimismo, tras el tratamiento con mitomicina C, un agente inductor del sistema SOS, los niveles de RecA en dicho mutante no se alteran, siendo iguales a los observados en ausencia de este compuesto. Sin embargo, en la cepa salvaje, la concentración de RecA aumenta tras la inducción del sistema SOS con este mismo inductor, alcanzando niveles equivalentes a los cuantificados en el mutante *recAo6869*. Estos datos confirman que, en *S. Typhimurium recAo6869*, la proteína LexA es incapaz de unirse a la caja SOS mutada del gen *recA*, lo cual permite la expresión constitutiva de dicho gen a unos niveles equivalentes a los alcanzados en la cepa salvaje cuando el sistema SOS está inducido. Es decir, en este mutante, la expresión del gen *recA* está totalmente desregulada (Fig. 4.3).

De acuerdo con los resultados observados anteriormente, el nivel basal de RecA intracelular existente en el mutante *lexA3(Ind<sup>r</sup>)* es equivalente al de la cepa salvaje. Sin embargo, tras el tratamiento con mitomicina C, no se produce ningún aumento en la concentración intracelular de dicha proteína, confirmándose de este modo la represión permanente del gen *recA* en este mutante por la proteína LexA no autohidrolizable y, por lo tanto, la incapacidad de esta cepa para inducir el sistema SOS (Fig. 4.3).

Del mismo modo, en la cepa *recAo6869 lexA3(Ind<sup>r</sup>)*, la cantidad de RecA intracelular en todas las condiciones es equivalente a la observada en la cepa *recAo6869*, confirmando que la

mutación en la caja SOS del promotor del gen *recA* impide también la regulación por la proteína LexA no autohidrolizable en este mutante (Fig. 4.3).



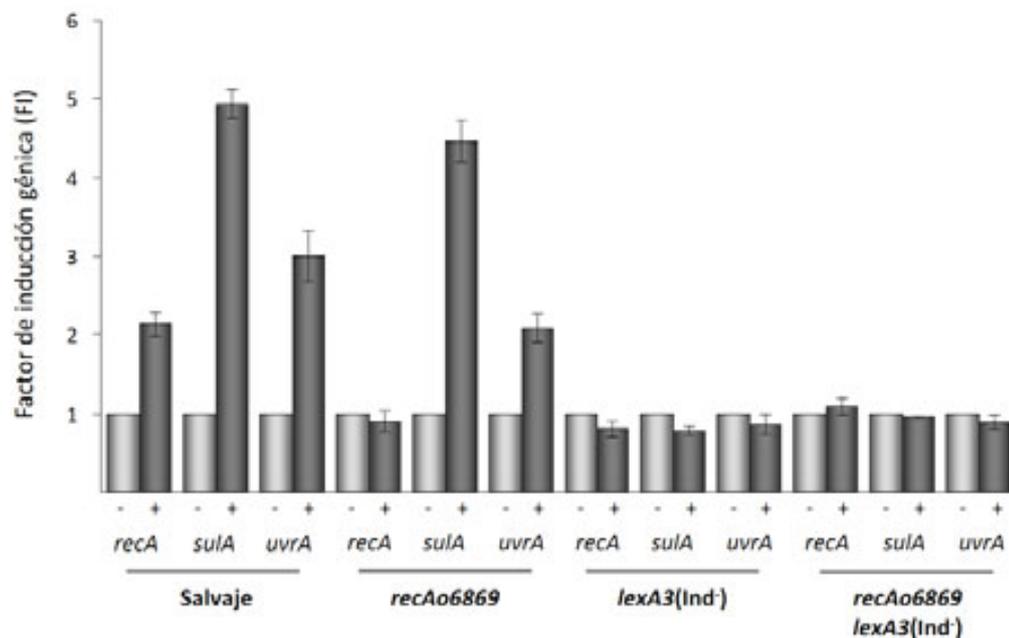
**Figura 4.3.** Cuantificación mediante Western blot de los niveles intracelulares de proteína RecA en las diferentes cepas de *S. Typhimurium* ATCC 14028 en presencia (+) y ausencia (-) de mitomicina C. Los resultados mostrados son la media de tres réplicas independientes del estudio.

#### 4.2.2. INDUCCIÓN DEL SISTEMA SOS Y SUPERVIVENCIA FRENTE FACTORES LESIVOS PARA EL DNA

La inducción del sistema SOS en respuesta a mitomicina C fue cuantificada en la cepa salvaje y en los mutantes *recA06869*, *lexA3(Ind<sup>-</sup>)* y *recA06869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)* de *S. Typhimurium* con el fin de confirmar el fenotipo esperado para ellos a este respecto. Esta cuantificación se llevó a cabo mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real, determinando los niveles de inducción de los genes *sulA*, *uvrA* y *recA*, pertenecientes todos al regulón SOS (Fernández de Henestrosa *et al.*, 2000).

En la Figura 4.4 se observa que, de acuerdo con lo explicado en el apartado anterior, en el mutante *recA06869* la inducción de los genes estudiados en respuesta a mitomicina C tiene lugar de forma equivalente a la cepa salvaje, con la única excepción del gen *recA*. Este hecho demuestra que la expresión constitutiva de este gen y la acumulación de proteína RecA a nivel intracelular no modifican el patrón de inducción de la respuesta SOS. Por el contrario, en los mutantes *lexA3(Ind<sup>-</sup>)* y *recA06869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)* no se activa la respuesta SOS, por lo que no se observa inducción en la expresión de los genes *sulA*, *uvrA* o *recA* en respuesta a mitomicina C

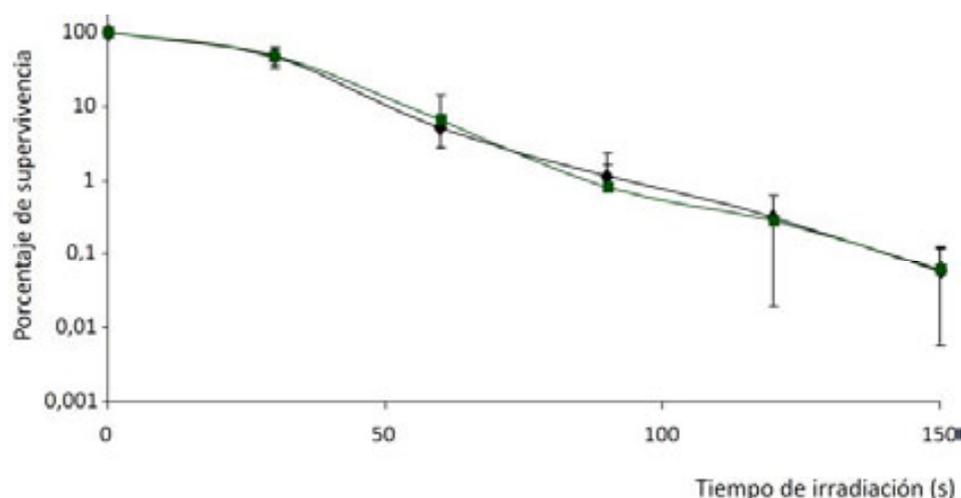
(Fig. 4.4). Este hecho confirma la represión permanente de los genes que forman parte del regulón SOS por la forma no autohidrolizable de la proteína LexA.



**Figura 4.4.** Ensayos de RT-PCR cuantitativa a tiempo real para determinar la inducción de la expresión del regulón SOS en las diferentes cepas de *S. Typhimurium* ATCC 14028. Se muestran los factores de inducción (FI) de los genes *recA*, *sulA* y *uvrA* en la cepa salvaje y en cada uno de los mutantes de *S. Typhimurium*, en presencia (+) o ausencia (-) de mitomicina C. El FI de cada gen se define como el ratio entre la concentración relativa de su mRNA en las condiciones objeto de estudio y la concentración relativa de su mRNA en ausencia de mitomicina C. Los resultados son la media de dos experimentos independientes, cada uno llevado a cabo por triplicado.

Con el fin de verificar que la expresión constitutiva de *recA* y, por lo tanto, la acumulación de proteína RecA a nivel intracelular no suponen una desventaja para la supervivencia frente a agentes lesivos para el DNA, se determinó la supervivencia de la cepa *recA06869* de *S. Typhimurium* frente a la irradiación con diferentes dosis de luz UV, y se comparó con la supervivencia de la cepa salvaje de este patógeno en las mismas condiciones.

Los resultados de este estudio demuestran que el mutante *recA06869* presenta la misma tasa de supervivencia a este agente lesivo que la cepa salvaje (Fig. 4.5), lo cual indica que la sobreexpresión de *recA* no supone una desventaja para la supervivencia a las lesiones en el DNA en *S. Typhimurium*.



**Figura 4.5.** Curvas de supervivencia frente a la irradiación con luz UV. La cepa salvaje de *S. Typhimurium* ATCC 14028 (◆) y la cepa *recAo6869* (■) fueron irradiadas con diferentes dosis de luz UV y el porcentaje de células supervivientes fue cuantificado. Los resultados mostrados son la media de tres ensayos independientes entre sí.

### 4.2.3. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE LOS MUTANTES

Las cinéticas de crecimiento de las cepas *recAo6869*, *lexA3(Ind<sup>-</sup>)* y *recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)* de *S. Typhimurium* fueron estudiadas mediante diferentes ensayos con el objetivo de determinar si existían diferencias respecto a la cepa salvaje de este patógeno.

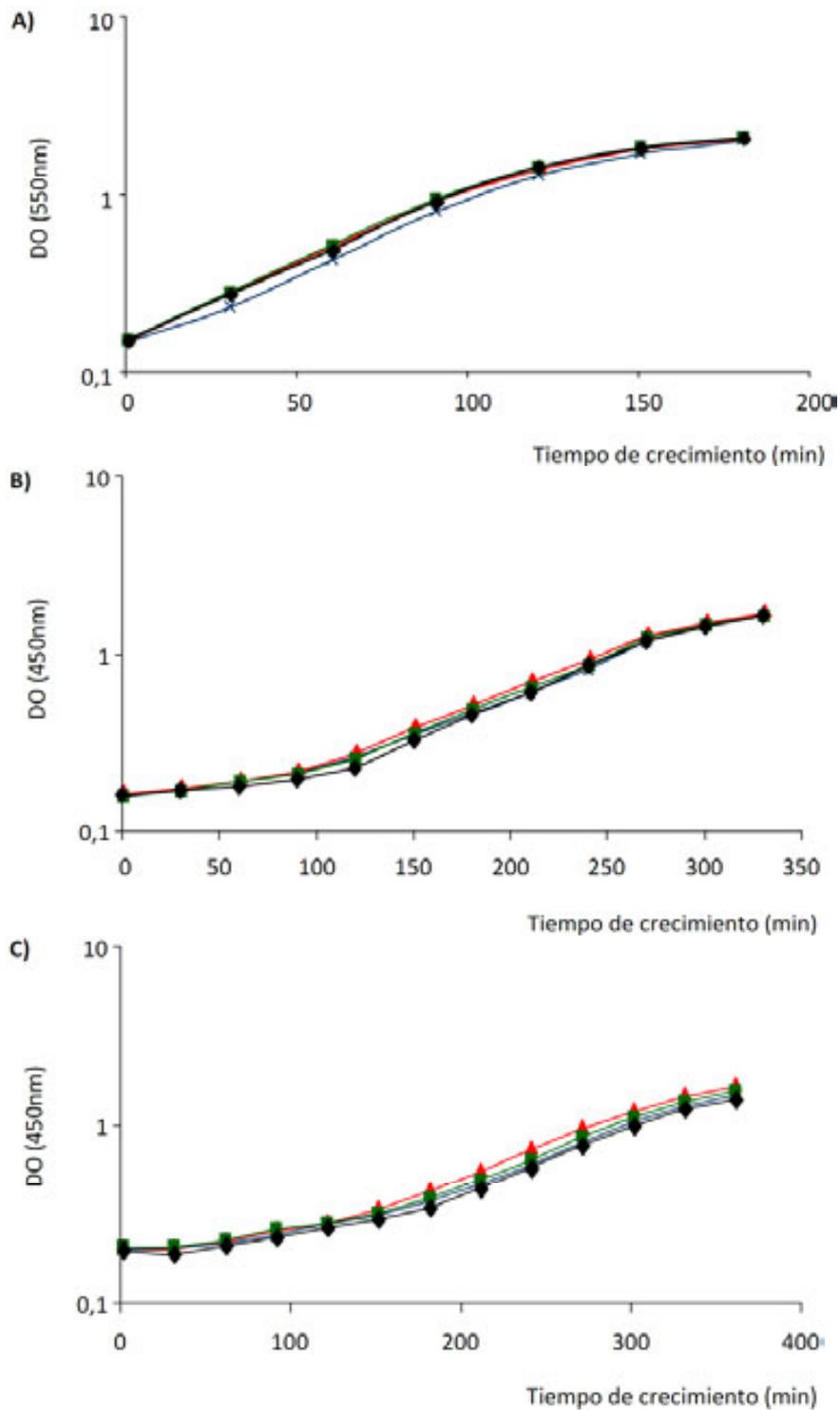
**Tabla 4.1.** Índices de competitividad *in vitro* de los diferentes mutantes de *S. Typhimurium* ATCC 14028 en cocultivos con la cepa salvaje.

Cepa estudiada	Índice de competitividad (IC) <sup>a</sup>
<i>recAo6869</i>	1.006
<i>lexA3(Ind<sup>-</sup>)</i>	0.61
<i>recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)</i>	1.04

<sup>a</sup>El IC se define como el ratio entre la cepa mutante y la cepa salvaje obtenido tras la incubación de los cultivos durante 16 horas dividido por el ratio inicial.

Un IC inferior a 0,25 indica que el mutante presenta defectos en su cinética de crecimiento. Un IC superior a 4 indica una ventaja en el crecimiento de la cepa mutante respecto a la cepa salvaje.

En primer lugar, se realizaron estudios de competitividad *in vitro* en los que se comparó el crecimiento de cada uno de los mutantes mencionados con el de la cepa salvaje de *S. Typhimurium* en cocultivos inoculados con concentraciones equivalentes de la cepa salvaje y del mutante objeto del estudio. Las pruebas realizadas no revelaron diferencias significativas entre la cepa salvaje y los diferentes mutantes (Tabla 4.1), indicando que ninguna de las mutaciones introducidas tiene efectos negativos sobre la cinética de crecimiento *in vitro* de *S. Typhimurium*.



**Figura 4.6.** Crecimiento de los diferentes mutantes y de la cepa salvaje de *S. Typhimurium* ATCC 14028 en A) medio rico (LB), B) medio mínimo (AB) suplementado con glucosa (0,2%) y C) medio mínimo (AB) suplementado con glicerol (0,2%). Se muestran las cinéticas de crecimiento de las cepas salvaje ( $\blacklozenge$ ), *recA*06869 ( $\blacksquare$ ), *lexA3*(Ind<sup>-</sup>) ( $\blacktriangle$ ) y *recA*06869 *lexA3*(Ind<sup>-</sup>) ( $\blacktimes$ ) de *S. Typhimurium* tras hacerlas crecer a 37°C de temperatura y con agitación en cada uno de los medios indicados. Se tomaron muestras en los tiempos señalados para la determinación de la densidad óptica (DO) del cultivo.

En segundo lugar, se estudiaron las cinéticas de crecimiento de cada uno de los mutantes y de la cepa salvaje de *S. Typhimurium*, tanto en medio rico, como en medio mínimo suplementado con diferentes fuentes de carbono (glucosa o glicerol). Las pruebas llevadas a cabo tampoco revelaron diferencias significativas entre ellas, demostrando finalmente que, ni la sobreexpresión de *recA*, ni la imposibilidad de inducir la respuesta SOS tienen efectos sobre el crecimiento *in vitro* de los mutantes en las condiciones ensayadas (Fig. 4.6).

### 4.3. CAPACIDAD INFECTIVA DE LOS MUTANTES *recAo6869*, *lexA3(Ind<sup>-</sup>)* y *recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)*

Para esclarecer si la función de RecA como proteína activadora del sistema SOS es importante para el desarrollo de la infección por *S. Typhimurium* se estudió la virulencia de los mutantes *recAo6869*, *lexA3(Ind<sup>-</sup>)* y *recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)*.

Para la realización de estos estudios se llevaron a cabo ensayos de competitividad en el modelo murino, tanto por vía oral como por vía intraperitoneal. En este tipo de ensayos, se inocula en el animal una cantidad equivalente de la cepa salvaje de *S. Typhimurium* y del mutante objeto del estudio. Tras el desarrollo de la infección, se obtienen muestras de sangre del animal y se compara el ratio entre células mutantes y salvajes recuperado en estas muestras con el del inóculo inicial, lo que permite el cálculo del índice de competitividad de dicho mutante respecto a la cepa salvaje de *S. Typhimurium*. En función del número de ratones empleado en estos estudios y de la variabilidad de los datos obtenidos se estableció que índices de competitividad inferiores a 0,25 indican que la cepa mutante presenta una menor capacidad infectiva que la cepa salvaje. En cambio, índices de competitividad superiores a 4 permiten afirmar que existe una mayor virulencia.

Los ensayos de competitividad intraperitoneal no revelaron diferencias significativas en la capacidad infectiva de ninguno de los mutantes respecto a la cepa salvaje de *S. Typhimurium* (Tabla 4.2). Estos resultados, en concordancia con un trabajo llevado a cabo con un mutante *lexA3(Ind<sup>-</sup>)* de este patógeno y publicado de forma paralela a la realización de estos experimentos (Craig y Slauch, 2009), indican que ni la inhibición de la respuesta SOS ni la sobreexpresión de *recA* tienen efectos negativos para la virulencia de *S. Typhimurium* cuando es inoculada por esta vía.

Asimismo, los ensayos realizados por vía oral demuestran que el mutante *lexA3(Ind<sup>-</sup>)* tampoco presenta defectos en la virulencia respecto a la cepa salvaje cuando es inoculado por esta vía (Tabla 4.2). Por el contrario, los mutantes *recAo6869* y *recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)* ven reducida su capacidad infectiva de forma drástica respecto a la cepa salvaje (Tabla 4.2). Estos resultados

indican que la sobreexpresión de *recA* tiene importantes efectos negativos sobre la virulencia de *S. Typhimurium* cuando ésta es inoculada por vía oral en el animal.

**Tabla 4.2.** Índices de competitividad de los diferentes mutantes de *S. Typhimurium* ATCC 14028 en el modelo murino.

Cepa estudiada	Ensayo	Índice de competitividad (IC) <sup>a</sup>
<i>recAo6869</i>	intraperitoneal	0.42
<i>lexA3(Ind<sup>-</sup>)</i>	intraperitoneal	0.42
<i>recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)</i>	intraperitoneal	0.48
<i>recAo6869</i>	Oral	0.00027*
<i>lexA3(Ind<sup>-</sup>)</i>	Oral	2.73
<i>recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)</i>	Oral	0.0054*

<sup>a</sup>El IC es el ratio entre la cepa mutante y la cepa salvaje obtenido en las muestras extraídas al animal tras el desarrollo de la infección dividido por el ratio en el inóculo inicial.

\*Indica que la virulencia del mutante es significativamente menor que la de la cepa salvaje ( $p \leq 0,05$ ).

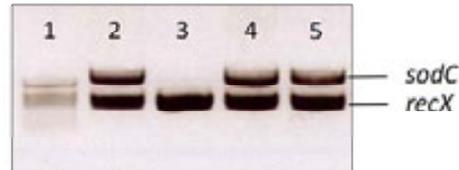
## 4.4. PAPEL DE RecA DURANTE EL PROCESO INFECTIVO

Con el fin de esclarecer qué papel desempeña RecA durante el proceso infeccioso de *S. Typhimurium*, se realizaron diferentes pruebas para determinar en qué fases de dicho proceso se encuentran diferencias entre los mutantes portadores de la construcción *recAo6869* en su cromosoma y la cepa salvaje de *S. Typhimurium*.

### 4.4.1. ESTABILIDAD DEL PROFAGO GIFSY-2 DE *S. Typhimurium* EN LOS MUTANTES *recAo6869* y *recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)*

*S. Typhimurium* posee diferentes bacteriófagos residentes en su cromosoma, algunos de los cuales contienen factores de virulencia necesarios para el desarrollo del proceso infeccioso. El bacteriófago Gifsy-2, cuyo ciclo lítico está regulado por la proteína Tum (Bunny *et al.*, 2002), pertenece a este tipo de profagos. Este bacteriófago contiene, entre otros, el gen *sodC*, que codifica una superóxido-dismutasa cuya ausencia supone un descenso drástico en la capacidad infectiva de *S. Typhimurium* (Figueroa-Bossi y Bossi, 1999).

Con el fin de descartar que el descenso en la capacidad infectiva de las cepas portadoras de la construcción *recAo6869* pudiese deberse a la pérdida de este bacteriófago, se comprobó mediante PCR la presencia del gen *sodC* en su DNA cromosómico, utilizando para ello una pareja de oligonucleótidos cebadores específicos para este gen. Los resultados de esta prueba demostraron la presencia del gen *sodC* en los mutantes estudiados, de tal modo que el descenso en su capacidad infectiva no puede ser atribuido a la escisión del profago Gifsy-2 de su genoma (Fig. 4.7).



**Figura 4.7.** Resultado de la PCR para comprobar la presencia de *sodC* en el DNA cromosómico de los distintos mutantes de *S. Typhimurium* ATCC 14028. Se muestran las bandas obtenidas tras la amplificación del DNA de las cepas *recAo6869* (carril 4) y *recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)* (carril 5) de *S. Typhimurium* con oligonucleótidos específicos para el gen *sodC*. Como control, se muestran las bandas obtenidas a partir del DNA de las cepas salvaje (carril 2) y MA5975 (carril 3). La cepa salvaje posee Gifsy-2, mientras que la cepa MA5975 carece de este profago. A modo de control positivo del DNA, se muestra en todos los casos la amplificación del gen *recX*.

#### 4.4.2. DESARROLLO DE LA FASE GASTROINTESTINAL DEL PROCESO INFECCIOSO POR LOS MUTANTES *recAo6869* y *recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)*

Una vez superada la barrera epitelial, el patrón de infección de las células de *S. Typhimurium* inoculadas por vía oral es el mismo que el de las células administradas por vía intraperitoneal. Esto sugiere que la sobreexpresión de *recA* puede tener efectos negativos sobre la fase gastrointestinal del proceso infeccioso.

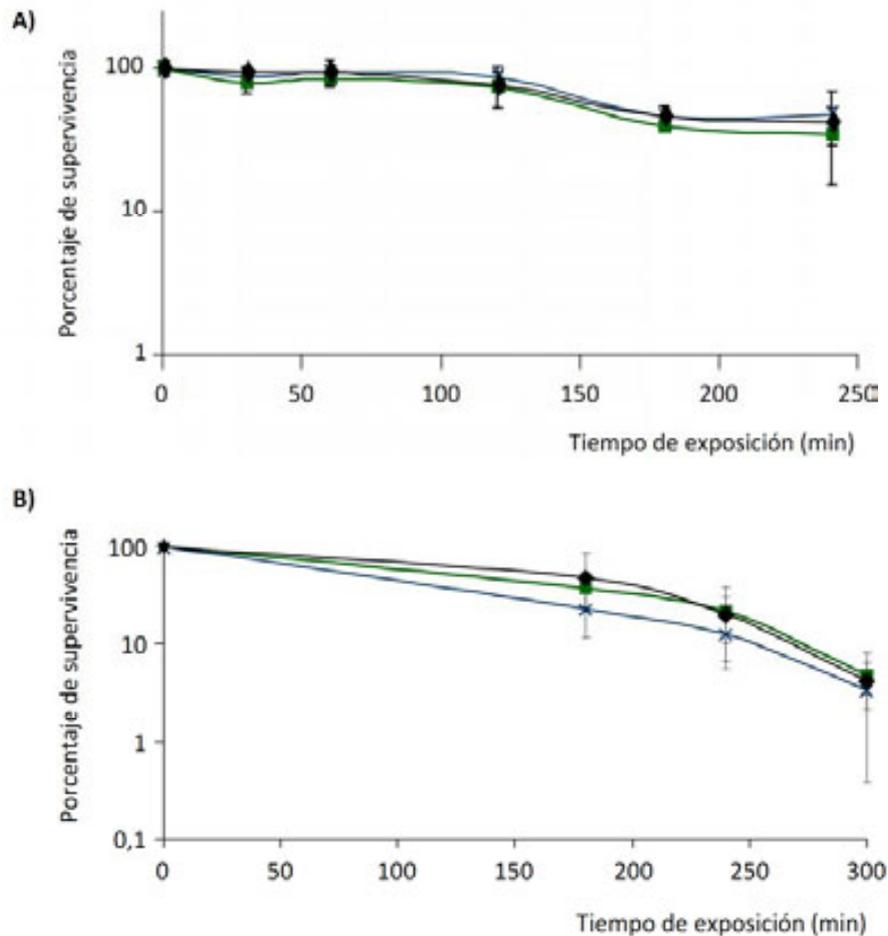
Durante esta fase, las células de *S. Typhimurium* deben alcanzar el intestino del organismo infectado, para lo cual se han de enfrentar a las diferentes barreras del tracto gastrointestinal, entre las cuales se encuentran las condiciones de anaerobiosis, la acidez del estómago o las sales biliares presentes en el intestino. Una vez han alcanzado el intestino delgado, las células de dicho patógeno deben atravesar la barrera epitelial para poder generar la infección local y, posteriormente, diseminarse por el organismo y generar la infección sistémica.

Con tal de determinar si la sobreexpresión de *recA* entorpece alguno de estos procesos, se llevaron a cabo las pruebas que se describen a continuación.

##### 4.4.2.1. Comportamiento de los mutantes *recAo6869* y *recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)* frente a los mecanismos de defensa presentes en el tracto gastrointestinal

En primer lugar, se estudió la sensibilidad de la cepa salvaje de *S. Typhimurium* y de los mutantes *recAo6869* y *recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)* frente a entornos con elevada acidez, entornos

con altas concentraciones de sales biliares o entornos anaeróbicos. Para los estudios de sensibilidad a pH ácido y sales biliares se realizaron ensayos de supervivencia con cada una de estas cepas en medios con las condiciones indicadas, mientras que para el estudio de la sensibilidad a entornos anaeróbicos se realizaron ensayos de competitividad *in vitro* de cada uno de los mutantes frente a la cepa salvaje.



**Figura 4.8.** Supervivencia de las cepas salvaje (◆), *recA06869* (■) y *recA06869 lexA3(Ind)* (×) de *S. Typhimurium* frente a A) pH ácido (3,3) y B) la presencia de coleato sódico (extracto de bilis de buey) a una concentración del 30% (p/v). Se muestran los porcentajes de supervivencia de las cepas mencionadas tras ser cultivadas en medio LB con las condiciones indicadas, a 37°C de temperatura y con agitación. En los tiempos señalados se tomaron muestras para el recuento celular y el cálculo del porcentaje de supervivencia. Los resultados mostrados son la media de tres experimentos llevados a cabo de forma independiente.

Los ensayos de supervivencia frente a pH ácido no revelaron diferencias significativas entre la cepa salvaje de *S. Typhimurium* y los mutantes estudiados, indicando que la sobreexpresión de *recA* no impide la supervivencia de *S. Typhimurium* durante su paso a través del estómago del huésped (Fig. 4.8 A).

Los estudios para determinar la sensibilidad frente a sales biliares tampoco mostraron diferencias significativas entre los mutantes y la cepa salvaje de *S. Typhimurium*, poniendo de manifiesto que la desregulación de *recA* tampoco tiene efectos negativos para este patógeno a este nivel (Fig. 4.8 B).

Por último, los ensayos de competitividad *in vitro* en condiciones de anaerobiosis tampoco mostraron diferencias significativas entre los mutantes y la cepa salvaje de *S. Typhimurium*, indicando que la sobreexpresión de *recA* no afecta a la supervivencia de este patógeno en las condiciones de baja concentración de oxígeno presentes en el tracto gastrointestinal (Tabla 4.3).

**Tabla 4.3.** Índices de competitividad *in vitro* en anaerobiosis de los mutantes *recAo6869* y *recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)* de *S. Typhimurium* ATCC 14028 en cocultivos con la cepa salvaje.

Cepa estudiada	Índice de competitividad (IC) <sup>a</sup>
<i>recAo6869</i>	0.85
<i>recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)</i>	0.82

<sup>a</sup>El IC se define como el ratio entre la cepa mutante y la cepa salvaje obtenido tras la incubación de los cultivos durante 16 horas dividido por el ratio inicial.

#### **4.4.2.2. Capacidad invasiva de los mutantes *recAo6869* y *recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)***

En vista de los resultados obtenidos anteriormente, se llevaron a cabo estudios para comprobar la capacidad de los mutantes *recAo6869* y *recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)* para invadir células epiteliales intestinales, con el fin de poder establecer si la sobreexpresión de *recA* obstaculiza el paso a través de la barrera epitelial en el intestino. Estos estudios se realizaron en colaboración con el grupo de investigación de Biofilms Microbianos del Instituto de Agrobiotecnología (CSIC-UPNA-Gobierno de Navarra), dirigido por el Dr. Lasa.

En primer lugar, se realizaron estudios *in vivo* para determinar el índice de competitividad de los mutantes *recAo6869* y *recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)* frente a la cepa salvaje de *S. Typhimurium* durante la invasión de células epiteliales de origen murino. Para estos estudios, se realizaron ensayos de coinfección de asas intestinales, los cuales demostraron que los mutantes *recAo6869* y *recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)* presentan una desventaja significativa en la invasión de este tipo celular frente a la cepa salvaje (Tabla 4.4). Esto indica que la sobreexpresión de *recA* afecta negativamente a la invasión y el traspaso del epitelio intestinal.

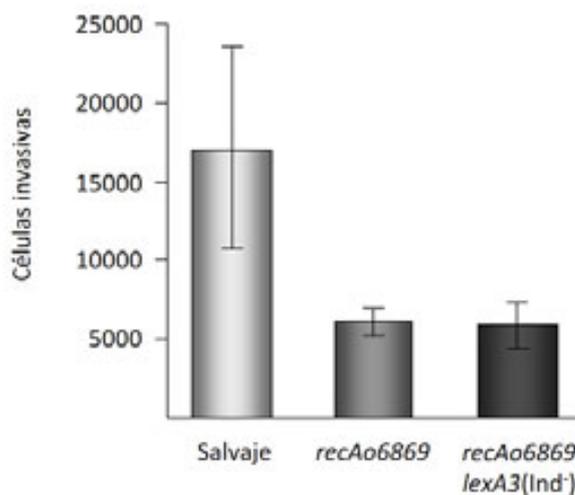
**Tabla 4.4.** Índices de competitividad de los mutantes *recAo6869* y *recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)* de *S. Typhimurium* ATCC 14028 en asas intestinales de origen murino.

Cepa estudiada	Ensayo	Índice de competitividad (IC) <sup>a</sup>
<i>recAo6869</i>	Asa intestinal	0.25*
<i>recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)</i>	Asa intestinal	0.35*

<sup>a</sup>El IC se calcula como el ratio entre la cepa mutante y la cepa salvaje obtenido del interior de las células epiteliales del asa intestinal tras su incubación durante 60 minutos en el interior abdominal dividido por el ratio inoculado. Un IC inferior a 0,4 indica que la cepa mutante presenta una menor capacidad invasiva que la cepa salvaje. En cambio, un IC superior a 2,5 permite determinar una mayor invasividad.

\*Indica que la capacidad invasiva del mutante es significativamente menor que la de la cepa salvaje ( $p \leq 0,05$ ).

En segundo lugar, y con el fin de confirmar los resultados anteriores, se llevaron a cabo estudios de invasividad *in vitro* sobre células epiteliales humanas. En estos ensayos se estudió, de forma independiente, la capacidad invasiva de la cepa salvaje de *S. Typhimurium* y la de los mutantes *recAo6869* y *recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)* sobre cultivos en monocapa de la línea celular Caco-2. De nuevo, los mutantes *recAo6869* y *recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)* fueron recuperados en números significativamente inferiores a los de la cepa salvaje (Fig. 4.9), confirmando que la sobreexpresión de *recA* tiene efectos inhibitorios sobre la capacidad invasiva de *S. Typhimurium*.



**Figura 4.9.** Capacidad invasiva de las cepas salvaje, *recAo6869* y *recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)* de *S. Typhimurium* ATCC 14028 sobre la línea celular Caco-2. Se muestra el número de células invasivas de cada cepa cuantificado tras la incubación de cada una de ellas sobre un cultivo en monocapa de la línea celular Caco-2 durante 1 hora. Los resultados son la media de tres ensayos independientes entre sí.

#### 4.4.2.3. Capacidad de los mutantes *recAo6869* y *recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)* para desplazarse mediante *swarming*

Los datos expuestos anteriormente relacionan el descenso en la capacidad infectiva de los mutantes *recAo6869* y *recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)* de *S. Typhimurium* con el descenso en su capacidad invasiva, el cual debe dificultar el traspaso del epitelio intestinal.

Tal y como se ha explicado en la introducción, el *swarming* o movimiento en enjambre es un tipo de desplazamiento celular poblacional asociado a la capacidad de diversos microorganismos, entre ellos *S. enterica*, para adherirse e invadir tejidos durante el proceso infectivo (Allison *et al.*, 1992a; Allison *et al.*, 1992b; Overhage *et al.*, 2008; Katribe *et al.*, 2009). Asimismo, un estudio llevado a cabo con mutantes deficientes en el gen *recA* de *E. coli* demuestra que la ausencia de la proteína RecA impide el desplazamiento sobre superficies mediante *swarming* en estos mutantes (Gómez-Gómez *et al.*, 2007).

Por este motivo se decidió determinar si la sobreexpresión de *recA* también afecta al movimiento en enjambre. Para tal fin, se estableció la capacidad para desplazarse mediante *swarming* de los mutantes *recAo6869* y *recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)* de *S. Typhimurium*. A modo de control, se utilizaron la cepa *lexA3(Ind<sup>-</sup>)*, la cepa salvaje y la cepa salvaje portadora de la resistencia a Km. Las pruebas realizadas demostraron que las cepas portadoras de la mutación *recAo6869* no son capaces de desplazarse mediante *swarming*, mientras que el resto de cepas estudiadas sí pueden hacerlo (Fig. 4.10). Se confirma así que la sobreexpresión de *recA*, y no la inhibición de la respuesta SOS, tiene un efecto inhibitorio sobre el movimiento en enjambre en *S. Typhimurium*.



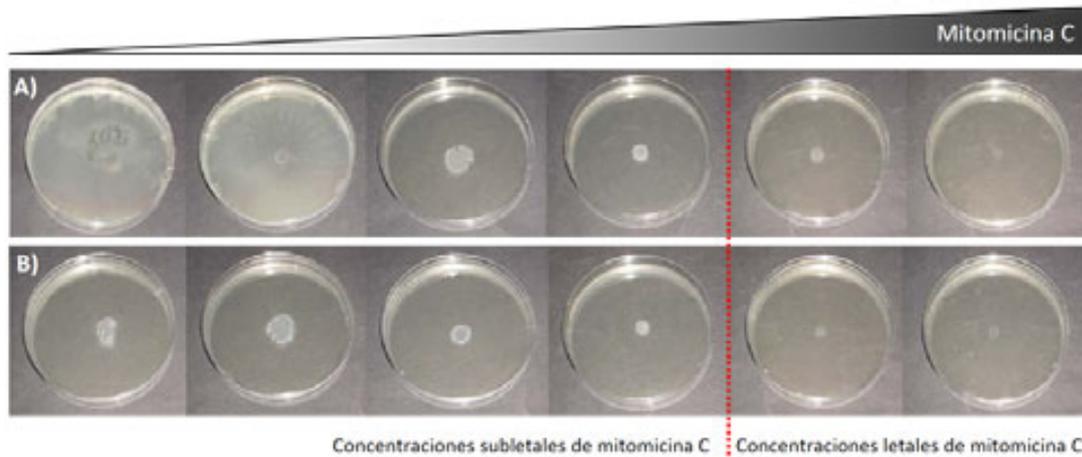
**Figura 4.10.** Capacidad para desplazarse mediante *swarming* de las cepas salvaje, salvaje resistente a Km, *recAo6869*, *lexA3(Ind<sup>-</sup>)* y *recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)* de *S. Typhimurium* ATCC 14028. Se muestran los patrones de desplazamiento desarrollados por estas cepas sobre el medio de cultivo específico para el desplazamiento por *swarming* de *S. Typhimurium*.

## 4.5. REGULACIÓN DEL SWARMING MEDIADA POR EL SISTEMA SOS EN *S. Typhimurium*

Los resultados obtenidos en las pruebas realizadas en este trabajo demuestran que la sobreexpresión de *recA* en los mutantes de *S. Typhimurium* portadores de la construcción *recAo6869* en su cromosoma inhibe el movimiento en enjambre. En condiciones fisiológicas, sólo la inducción de la respuesta SOS produce tan altos niveles de expresión de este gen como los existentes en dichos mutantes, lo cual sugiere que el sistema SOS participa en la regulación del *swarming* en este microorganismo a través del control de la proteína RecA. Sin embargo, la inducción de la respuesta SOS no sólo promueve la sobreexpresión de *recA*, sino también la de otros genes pertenecientes al regulón SOS, uno de los cuales forma parte de la misma unidad transcripcional que *recA*. Este hecho impide asignar el fenotipo defectivo en *swarming* únicamente a la presencia de elevadas concentraciones intracelulares de la proteína RecA. Por todo ello, se decidió determinar si, efectivamente, la respuesta SOS regula el desplazamiento por *swarming* en *S. Typhimurium* y si exclusivamente la desregulación de los niveles intracelulares de RecA es responsable de la inhibición del *swarming* en este patógeno. Asimismo, se decidió estudiar también las bases moleculares de la relación entre RecA y el *swarming* en *S. Typhimurium*.

Con el fin de determinar si la inducción del sistema SOS inhibe el *swarming* en este patógeno, se trató a la cepa salvaje de *S. Typhimurium* ATCC 14028 con concentraciones crecientes de mitomicina C, compuesto inductor del sistema SOS, y se estudió su capacidad para desplazarse mediante *swarming* en estas condiciones. A modo de control, y para determinar que la concentración de mitomicina C utilizada no tenía un efecto letal sobre las células, se realizaron estos ensayos de forma paralela con el mutante *recAo6869*.

Los resultados mostrados en la Fig. 4.11 demuestran que, en presencia de concentraciones crecientes de mitomicina C que inducen la respuesta SOS pero permiten la viabilidad celular (0, 8, 80 y 200 ng/mL), la cepa salvaje de *S. Typhimurium* ATCC 14028 ve inhibida su capacidad para desplazarse mediante *swarming*, mostrando el mismo patrón de movimiento que la cepa *recAo6869*. Con el fin de verificar la toxicidad de la mitomicina C y determinar que las concentraciones anteriores, aun siendo inductoras del sistema SOS, no son letales para la célula, se trató a ambas cepas con concentraciones mayores de este compuesto (800 y 1600 ng/mL), observándose, en este caso, la letalidad en las placas (Fig. 4.11). Por lo tanto, los resultados obtenidos en este ensayo demuestran que la inducción de la respuesta SOS debida a la presencia de agentes lesivos en el entorno inhibe el *swarming* en *S. Typhimurium*.

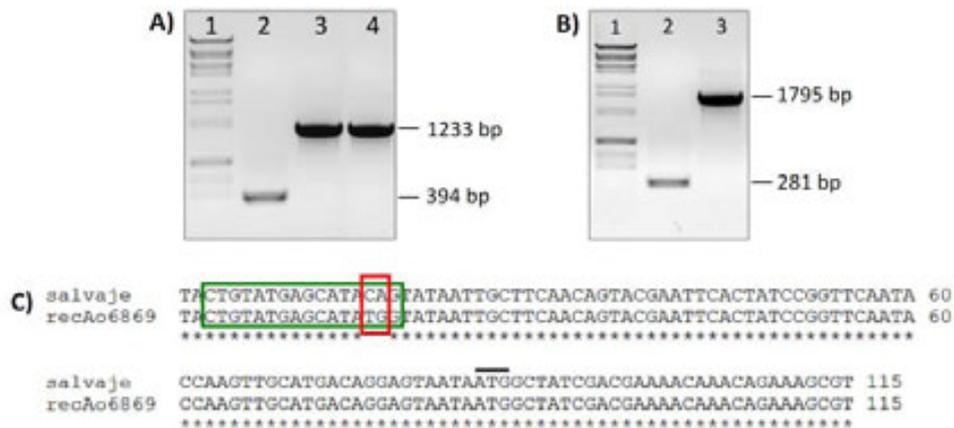


**Figura 4.11.** Patrones de desplazamiento mediante *swarming* de las cepas salvaje (A) y *recA06869* (B) de *S. Typhimurium* ATCC 14028 en presencia de un agente inductor de la respuesta SOS. Se muestra el patrón de movimiento en enjambre desarrollado por ambas cepas en presencia de concentraciones crecientes de mitomicina C (0, 8, 80, 200, 800 y 1600 ng/mL).

#### 4.6. IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA RecA EN LA REGULACIÓN DEL SWARMING EN *S. Typhimurium*

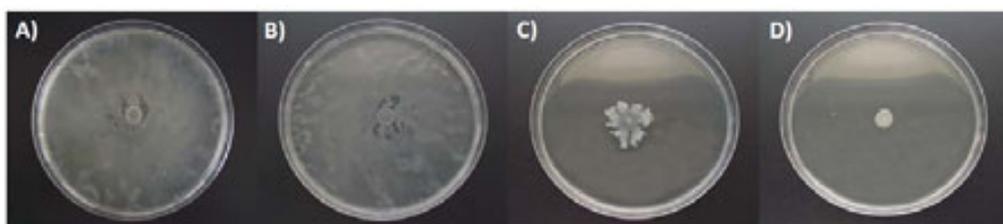
Los datos expuestos en los apartados 4.4 y 4.5 demuestran que el sistema SOS regula el *swarming* en *S. Typhimurium* a través de la inducción de *recA*. Sin embargo, en este patógeno, los genes *recA* y *recX* forman una unidad transcripcional policistrónica, por lo que la activación de la respuesta SOS o la presencia de la mutación *recA06869* en el promotor de dicha unidad provocan un incremento en la expresión de ambos genes. Por este motivo, se decidió verificar si la inhibición del desplazamiento mediante *swarming* en *S. Typhimurium* mediada por el sistema SOS se debe únicamente al incremento en los niveles intracelulares de RecA tras la inducción de la respuesta o si, por el contrario, RecX participa en el proceso de regulación del movimiento. Para ello se construyeron dos nuevos mutantes de este patógeno, un mutante simple *recX* y un mutante doble *recA06869 recX*, y se estudió su capacidad para desplazarse mediante *swarming*. Además, a modo de control, se estudió también el comportamiento de la cepa UA1821 de *S. Typhimurium*, deficiente en el gen *recA* (Campoy *et al.*, 2006).

Para la construcción de los mutantes *recX* y *recA06869 recX* se empleó el proceso de mutagénesis en un solo paso (Datsenko y Wanner, 2000) sobre las cepas salvaje y *recA06869* de *S. Typhimurium* ATCC 14028 respectivamente. Mediante este proceso, se deletó un fragmento interno del gen *recX*, el cual fue sustituido por el casete de resistencia a cloranfenicol (Cm) procedente del plásmido pKD3. Las construcciones obtenidas mediante este sistema se transdujeron a la cepa salvaje de *S. Typhimurium* ATCC 14028 y la comprobación de los mutantes se llevó a cabo mediante PCR y secuenciación (Fig. 4.12).



**Figura 4.12.** Comprobación de los mutantes *recX* y *recAo6869 recX* de *S. Typhimurium* ATCC 14028. A) Resultados de la PCR realizada para comprobar la incorporación del casete de resistencia a Cm tras la mutagénesis del gen *recX*. Se observan las bandas obtenidas tras amplificar la región cromosómica que alberga dicho gen en las cepas salvaje (carril 2; 394 bp), *recX* (carril 3; 1233 bp) y *recAo6869 recX* (carril 4; 1233 bp). B) Resultados de la PCR realizada para comprobar la presencia del casete de resistencia a Km en la región promotora del gen *recA*. Se muestran las bandas obtenidas tras amplificar dicha región en las cepas salvaje (carril 2; 281 bp) y *recAo6869 recX* (carril 3; 1795 bp). C) Comparación entre las secuencias de la región promotora del gen *recA* de las cepas salvaje y *recAo6869 recX*. El inicio del gen (ATG) se señala con una línea superior gris. La caja SOS se resalta con un recuadro verde y los dos nucleótidos cambiados en esta región se indican con un recuadro rojo.

Los resultados obtenidos en las pruebas para el estudio del movimiento en enjambre de estas cepas demuestran que el mutante *recX* se desplaza mediante *swarming* del mismo modo que lo hace la cepa salvaje. Por el contrario, la cepa *recAo6869 recX* presenta un fenotipo defectivo en *swarming*, al igual que la cepa control *recA* y que la cepa *recAo6869* (Fig. 4.13). Todos estos resultados indican que la inhibición del *swarming* observada en el mutante *recAo6869* de *S. Typhimurium* ATCC 14028 es únicamente consecuencia de la sobreexpresión del gen *recA* y que la proteína RecX no tiene ningún efecto sobre este movimiento en dicho patógeno.



**Figura 4.13.** Capacidad para desplazarse mediante *swarming* de las cepas salvaje (A), *recX* (B), *recAo6869 recX* (C) y *recA* (D) de *S. Typhimurium* ATCC 14028. Se muestran los patrones coloniales desarrollados por estas cepas cuando son cultivadas sobre placas de medio LB *swarming*.

Con el fin de verificar estos resultados y demostrar que los elevados niveles de RecA intracelular son los únicos causantes de la inhibición del *swarming*, se estudió la capacidad de la cepa salvaje de *S. Typhimurium* ATCC 14028 para desplazarse mediante este movimiento cuando sobreexpresa de forma exclusiva la proteína RecA.

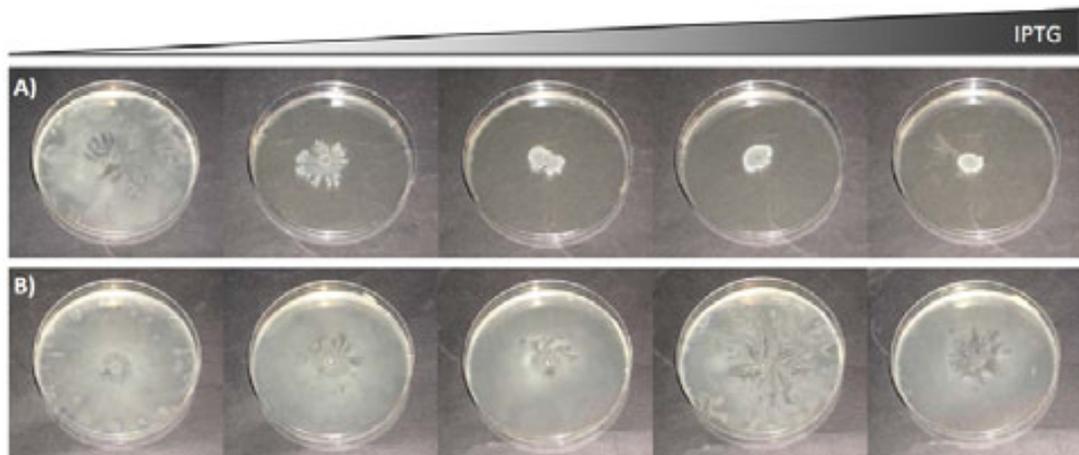
Estos estudios se llevaron a cabo mediante la clonación del gen *recA* de dicho patógeno en el plásmido pUA1108 (Apartado 3.4.3.1) bajo control del promotor *Ptac* (inducible por IPTG), dando como resultado el plásmido pUA1109. Este plásmido se introdujo en la cepa salvaje de *S. Typhimurium* ATCC 14028 mediante electrotransformación, obteniendo así la cepa UA1896.

A continuación, se confirmó la sobreexpresión de la proteína RecA en esta cepa en respuesta a la inducción del promotor *Ptac* con IPTG. Para ello se realizó una electroforesis desnaturalizante de su extracto proteico crudo tras hacerla crecer en presencia de dicho compuesto, observándose la existencia de una banda de sobreexpresión correspondiente a la proteína RecA en dicho extracto crudo (Fig. 4.14).



**Figura 4.14.** Sobreexpresión de *recA* en el vector pUA1109. Se muestra la banda correspondiente a la proteína RecA (38 kDa) en el extracto proteico crudo de la cepa UA1896 crecida en ausencia (carril 1) o presencia (carril 2) de IPTG.

Una vez confirmada la sobreexpresión de *recA* mediada por IPTG en la cepa UA1896, se estudió su capacidad para desplazarse mediante *swarming* en presencia de concentraciones crecientes de dicho compuesto. Los resultados obtenidos en estos ensayos se presentan en la Figura 4.15. La inducción de la expresión de *recA* mediada por IPTG inhibe el desplazamiento por *swarming* de la cepa UA1896, confirmando que el incremento en la concentración de RecA en el interior de la célula es el único responsable de la inhibición de este movimiento en *S. Typhimurium*.



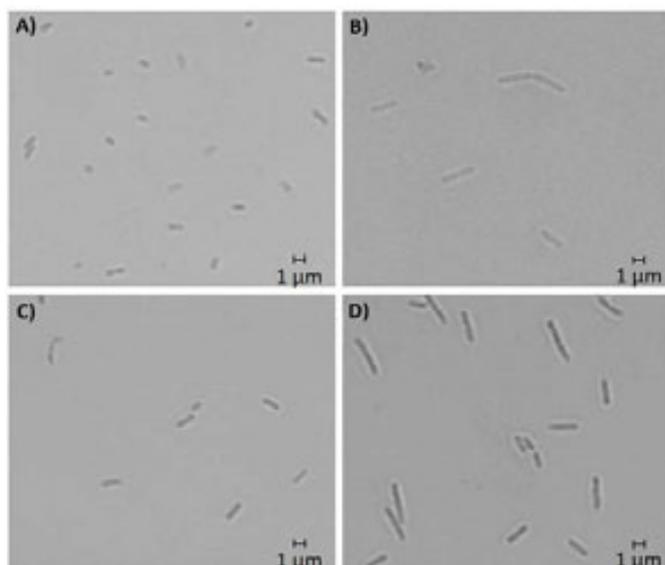
**Figura 4.15.** Capacidad de *S. Typhimurium* ATCC 14028 para desplazarse mediante *swarming* en respuesta a la sobreexpresión de *recA*. Se muestran los patrones de desplazamiento en enjambre desarrollados por la cepa UA1896 de *S. Typhimurium* (contiene el plásmido pUA1109, portador del gen *recA* bajo control del promotor *Ptac*) (A) en presencia de concentraciones crecientes de IPTG (0, 5, 10, 20 y 30  $\mu$ M). A modo de control, se muestran los patrones de desplazamiento mediante *swarming* desarrollados por la cepa UA1898 (contiene el plásmido vacío pUA1108) (B).

## 4.7. DIFERENCIACIÓN EN CÉLULAS SWARMERS EN *S. Typhimurium*

Una de las características principales del movimiento en enjambre es que las células sufren una diferenciación que comporta una serie de cambios morfológicos muy acusados, los cuales permiten el paso al estado de célula *swarmer* y hacen posible el movimiento (Harshey y Matsuyama, 1994). Con el fin de comprobar si la sobreexpresión de *recA* impide el movimiento en enjambre en *S. Typhimurium* a través de la inhibición de este proceso de diferenciación, se estudió el fenotipo de los mutantes portadores de la construcción *recAo6869* cuando son cultivados sobre el medio de cultivo específico para el desplazamiento en enjambre de *S. Typhimurium* (LB *swarming*).

Uno de los cambios morfológicos asociados a la diferenciación en célula *swarmer* es el incremento en el tamaño celular. En el caso de *S. Typhimurium*, las células duplican aproximadamente su tamaño cuando se encuentran en este estado (Harshey y Matsuyama, 1994). Por este motivo, y con el fin de establecer si la sobreexpresión de *recA* impide este proceso, se analizó, tanto cualitativa como cuantitativamente, el tamaño de las células del mutante *recAo6869* de *S. Typhimurium* ATCC 14028 crecido en medio LB *swarming*. Las observaciones microscópicas demostraron que las células del mutante *recAo6869* crecidas sobre este medio son de mayor tamaño que las células crecidas en medio LB sólido (Fig. 4.16). Asimismo, la cuantificación de la longitud celular confirmó que el tamaño de las células de dicho mutante crecidas en medio LB *swarming* es aproximadamente el doble respecto al de las

células crecidas en medio LB sólido, al igual que ocurre en el caso de la cepa salvaje. Por lo tanto, las proporciones de las células *recAo6869* crecidas en medio LB *swarming* son similares a las de las células *swarmers* de la cepa salvaje (Tabla 4.5).



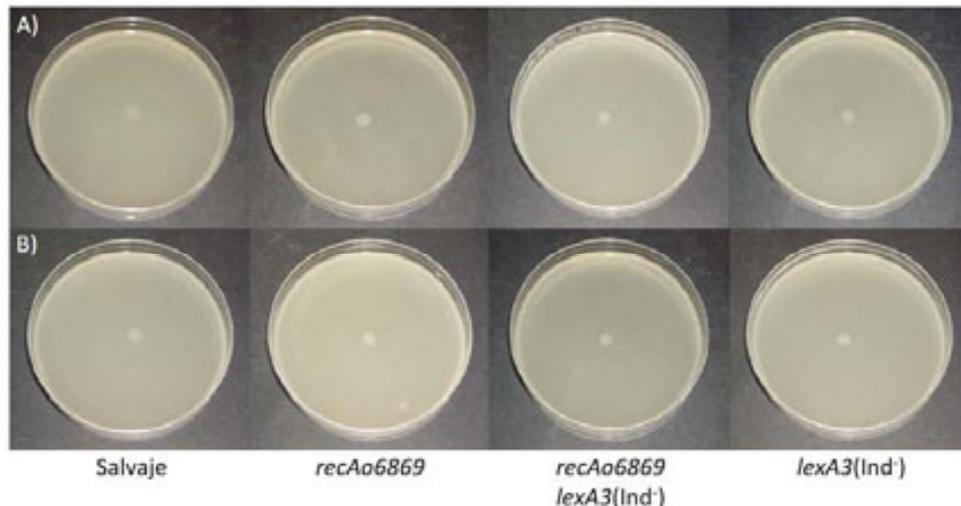
**Figura 4.16.** Incremento en el tamaño celular asociado a la diferenciación en célula *swarmer*. Se muestra el tamaño celular de las cepas salvaje (A y B) y *recAo6869* (C y D) de *S. Typhimurium* ATCC 14028 cuando son cultivadas en medio LB *swarming* (B y D) o en medio LB sólido (A y C).

**Tabla 4.5.** Longitud de las células de la cepa salvaje y del mutante *recAo6869* de *S. Typhimurium* ATCC 14028 crecidas en medio LB sólido o en medio LB *swarming*.

Cepa	Tamaño celular en medio LB sólido <sup>a</sup>	Tamaño celular en medio LB <i>swarming</i> <sup>a</sup>
Salvaje	1,3 ± 0,3	2,5 ± 0,5
<i>recAo6869</i>	1,5 ± 0,3	2,6 ± 0,8

<sup>a</sup>Los datos son el promedio de la longitud cuantificada en 100 células de cada una de las cepas estudiadas.

Otro de los cambios morfológicos asociados a la diferenciación en célula *swarmer* es el incremento en la síntesis flagelar (Harshey y Matuyama, 1994), ya que éstas son las estructuras que permiten el movimiento en enjambre. Con el fin de comprobar si los mutantes de *S. Typhimurium* portadores de la construcción *recAo6869* en su cromosoma presentan algún defecto en la síntesis flagelar, se estudió su capacidad para desplazarse mediante *swimming*, movimiento también impulsado por la rotación de los flagelos. Los resultados obtenidos demuestran que la presencia de dicha construcción no implica ningún defecto en el desplazamiento mediante *swimming*, ya expresen los mutantes la fase flagelar *fliC* o la fase *fliB* (Fig. 4.17). Estos datos indican que las células portadoras de la construcción *recAo6869* en su cromosoma tampoco presentan ningún defecto en el proceso de síntesis de los flagelos.



**Figura 4.17.** Efecto de la mutación *recAo6869* sobre el desplazamiento mediante *swimming* en *S. Typhimurium*. Se muestran los patrones de desplazamiento mediante *swimming* desarrollados por las cepas *recAo6869* y *recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)* de *S. Typhimurium* ATCC 14028 cuando presentan las fases flagelares *fliC* (A) o *fljB* (B). A modo de control, se muestran los patrones de desplazamiento por *swimming* desarrollados por las cepas salvaje y *lexA3(Ind<sup>-</sup>)* de esta especie, las cuales no presentan defectos en el movimiento en enjambre.

Todos estos resultados sugieren que las células *recAo6869* sí presentan una diferenciación en células *swarmers* cuando son cultivadas sobre superficies semisólidas, pero esta diferenciación no es suficiente para permitir el movimiento en enjambre.

## 4.8. INTERACCIÓN ENTRE RecA Y CheW EN *S. Typhimurium*

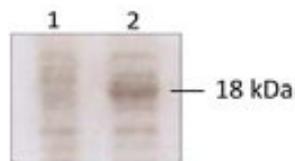
### 4.8.1. IMPORTANCIA DEL EQUILIBRIO ENTRE RecA Y CheW PARA EL DESPLAZAMIENTO MEDIANTE SWARMING EN *S. Typhimurium*

Los resultados descritos en el presente trabajo demuestran que, en *S. Typhimurium*, tanto la ausencia de proteína RecA en el interior de la célula como la presencia de elevadas concentraciones de la misma inhiben el movimiento en enjambre.

Como se ha explicado en la introducción de este trabajo, Arifuzzaman *et al.* (2006), mediante un estudio de copurificación masiva de proteínas, sugieren que RecA y CheW, proteína integrante del sistema de quimiotaxis, interaccionan entre sí en *E. coli*. Asimismo, Sanders *et al.* (1989) demuestran que, en esta especie, la presencia de una elevada concentración intracelular de CheW tiene los mismos efectos que la ausencia de dicha proteína, inhibiendo el movimiento en enjambre, tal y como ocurre en el caso de la proteína RecA. Estos datos sugieren que existe un equilibrio entre las proteínas RecA y CheW en el interior de la célula y

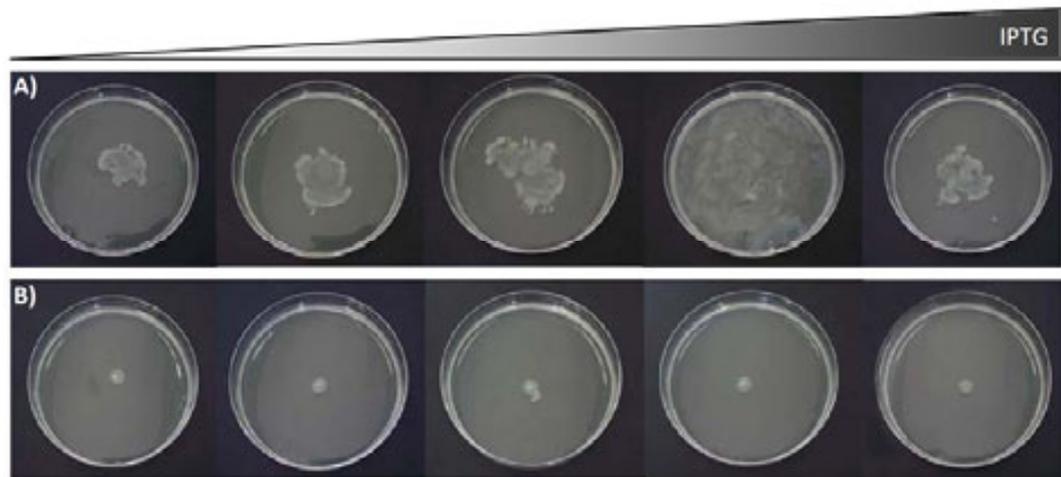
que alteraciones de dicho equilibrio, por la ausencia o el exceso de cualquiera de las dos proteínas, tienen efectos inhibitorios sobre el desplazamiento mediante *swarming*. Por lo tanto, los defectos en el movimiento en enjambre observados en los mutantes *recA*06869 de *S. Typhimurium* pueden ser debidos a los desequilibrios producidos como consecuencia de la sobreexpresión del gen *recA*.

Con el fin de comprobar esta hipótesis, se estudió si la sobreexpresión de *cheW* en el mutante *recA*06869 recupera la capacidad de esta cepa para desplazarse mediante *swarming*. Para ello, el gen *cheW* fue clonado en el vector de sobreexpresión pUA1108 bajo control del promotor *Ptac*, dando como resultado el plásmido pUA1110. Este plásmido fue introducido mediante electrotransformación en el mutante *recA*06869, obteniendo así la cepa UA1897. En esta cepa, se verificó la sobreexpresión del gen *cheW* en respuesta a la inducción del promotor *Ptac* con IPTG. Para ello, las células se incubaron en presencia de dicho compuesto y se realizó una electroforesis desnaturizante de su extracto proteico, observándose una banda de sobreexpresión correspondiente a la proteína CheW en dicho extracto (Fig. 4.18).



**Figura 4.18.** Sobreexpresión de *cheW* en el vector pUA1110. Se muestra la banda correspondiente a la proteína CheW (18 kDa) en el extracto proteico crudo de la cepa UA1897 crecida en ausencia (carril 1) o presencia (carril 2) de IPTG.

Una vez confirmada la sobreexpresión del gen *cheW* mediada por IPTG en la cepa UA1897, se analizó su capacidad para desplazarse mediante *swarming* en presencia de concentraciones crecientes de este compuesto. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.19. El incremento en la expresión de *cheW* por efecto de la inducción del promotor *Ptac* con concentraciones crecientes de IPTG (0, 5, 10 y 20  $\mu$ M) recupera el movimiento mediante *swarming* en esta cepa. Sin embargo, en concordancia con los estudios realizados por Sanders *et al.* (1989), la producción masiva de CheW en presencia de concentraciones más elevadas de IPTG (30  $\mu$ M) inhibe de nuevo el movimiento en enjambre, lo que indica que tales cantidades de CheW alteran nuevamente el equilibrio entre esta proteína y RecA, fenómeno responsable de la inhibición del *swarming*. Por lo tanto, los datos obtenidos en este ensayo confirman la hipótesis planteada y demuestran que, en *S. Typhimurium*, existe un equilibrio entre las concentraciones intracelulares de las proteínas RecA y CheW y que la estabilidad de este equilibrio es esencial para el desplazamiento mediante *swarming*.



**Figura 4.19.** Recuperación de la capacidad para desplazarse mediante *swarming* del mutante *recAo6869* de *S. Typhimurium* en respuesta a la sobreexpresión de *cheW*. Se muestran los patrones de desplazamiento en enjambre de la cepa UA1897 (contiene el plásmido pUA1110, portador del gen *cheW* bajo control del promotor *Ptac*) (A) en presencia de concentraciones crecientes de IPTG (0, 5, 10, 20 y 30  $\mu\text{M}$ ). A modo de control, se muestran los patrones de desplazamiento mediante *swarming* desarrollados por la cepa UA1899 (contiene el plásmido vacío pUA1108) (B).

#### 4.8.2. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS RecA Y CheW DE *S. Typhimurium*

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que la relación de equilibrio entre RecA y CheW regula el movimiento en enjambre en *S. Typhimurium*. Como se ha descrito en el apartado anterior, en *E. coli* esta relación se da gracias a la interacción directa entre ambas proteínas (Arifuzzaman *et al.*, 2006). Por este motivo, se decidió determinar si esta interacción tiene lugar también en *S. Typhimurium*. Con este fin, se llevaron a cabo estudios de doble híbrido siguiendo el protocolo descrito por Borloo *et al.* (2007).

Para llevar a cabo estos estudios, las proteínas de interés se han de clonar en los vectores pB2H $\Delta\alpha$  y pB2H $\Delta\omega$ , formando una fusión traduccional con el gen que codifica la proteína  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*. En el primer vector, la proteína  $\beta$ -galactosidasa es portadora de una deleción en su subunidad  $\alpha$  (mutación  $\Delta\alpha$ ), mientras que, en el segundo vector, presenta una deleción en su subunidad  $\omega$  (mutación  $\Delta\omega$ ). En ambos casos, la expresión de la proteína de fusión está regulada por un promotor *Ptac*. Una vez construidas las fusiones génicas, el ensayo de doble híbrido se lleva a cabo mediante la introducción de la pareja de plásmidos complementaria (portador cada uno de los vectores de la fusión entre una de las proteínas de interés y una de las subunidades mutadas de la  $\beta$ -galactosidasa) en la cepa MC1061 de *E. coli*. Esta cepa presenta delecionado el operón lactosa, por lo que es incapaz de degradar dicho disacárido. La interacción de las proteínas de interés entre sí comporta también la interacción

entre las dos formas mutadas de la  $\beta$ -galactosidasa, de modo que se complementan e inducen la degradación de la lactosa y la de otros compuestos análogos en esta cepa de *E. coli*. La detección de la presencia o la ausencia de actividad  $\beta$ -galactosidasa permite, por lo tanto, confirmar o descartar la interacción entre las proteínas de interés.

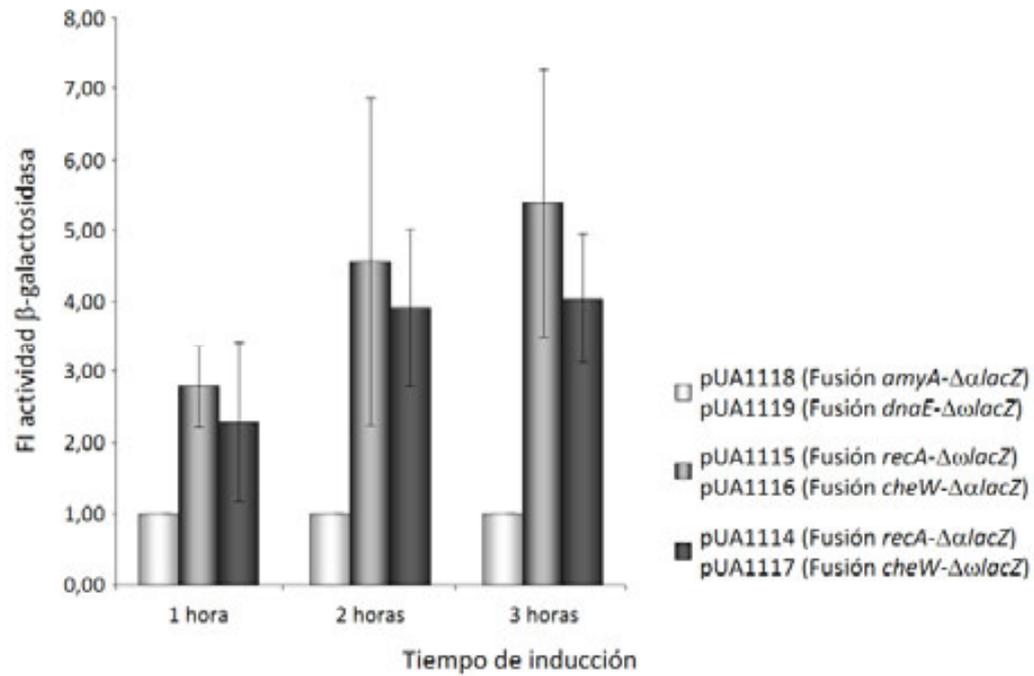
Los genes *recA* y *cheW* de *S. Typhimurium* fueron clonados en los vectores pB2H $\Delta\alpha$  y pB2H $\Delta\omega$  con el fin de llevar a cabo el ensayo de doble híbrido (Borloo *et al.*, 2007). Una vez construidas las fusiones génicas, se introdujo cada uno de los vectores en la cepa MC1061 de *E. coli* con el fin de comprobar la expresión de las proteínas de fusión mediante Western blot. Los resultados obtenidos demuestran que tanto RecA como CheW se expresan en ambos plásmidos fusionados a la subunidad de la  $\beta$ -galactosidasa correspondiente, dando como resultado una proteína híbrida del tamaño esperado en cada caso (Fig. 4.20).



**Figura 4.20.** Comprobación mediante Western blot de la expresión de las proteínas de fusión en la cepa MC1061 de *E. coli*. A) RecA en pB2H $\Delta\omega$  (132 KDa). B) RecA en pB2H $\Delta\alpha$  (156 KDa). C) CheW en pB2H $\Delta\omega$  (112 KDa). D) CheW en pB2H $\Delta\alpha$  (136 KDa). En cada caso, el carril 1 muestra las bandas de hibridación con el anticuerpo anti- $\beta$ -galactosidasa obtenidas tras realizar los ensayos de Western blot con el extracto proteico de la cepa MC1061 de *E. coli* portadora del plásmido con la fusión génica indicada. El carril 2 muestra la ausencia de bandas tras realizar el mismo ensayo con el extracto proteico de la cepa MC1061 de *E. coli* que no contiene ningún plásmido. En los casos B y C, la fusión se indica con una flecha negra.

Tras verificar la expresión de las fusiones génicas, se introdujeron en la cepa MC1061 de *E. coli* las parejas de plásmidos portadores de las fusiones génicas complementarias mediante cotransformación. Posteriormente, se comprobó mediante PCR la incorporación de la pareja de plásmidos deseada en cada una de las cotransformaciones y se seleccionó uno de los clones resultantes en cada caso para llevar a cabo los ensayos de doble híbrido.

Para la realización de estos ensayos se cuantificó la actividad  $\beta$ -galactosidasa de cada uno de los clones a través de su capacidad para degradar el compuesto cromogénico ONPG (orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido), el cual es análogo a la lactosa. Los ensayos de doble híbrido demostraron la actividad  $\beta$ -galactosidasa de los clones portadores de las proteínas de fusión complementarias, hecho que confirma la existencia de una interacción directa entre las proteínas RecA y CheW de *S. Typhimurium* (Fig. 4.21).



**Figura 4.21.** Ensayo de doble híbrido entre las proteínas RecA y CheW de *S. Typhimurium*. En el gráfico se muestra el factor de inducción (FI) de la actividad  $\beta$ -galactosidasa detectada en la cepa MC1061 de *E. coli* en respuesta a la interacción entre las proteínas RecA y CheW de *S. Typhimurium* ATCC 14028. Se tomaron muestras de los cultivos a las 0, 1, 2 y 3 horas posinducción con IPTG (20mM). El FI de la actividad  $\beta$ -galactosidasa se calcula como el incremento en las unidades enzimáticas de  $\beta$ -galactosidasa en cada tiempo (respecto al tiempo inicial) dividido por el incremento en el control negativo. Como control negativo se han utilizado las proteínas DnaE y AmyA de *S. Typhimurium* ATCC 14028 (Borloo *et al.*, 2007). Los resultados mostrados son el promedio de tres ensayos de doble híbrido llevados a cabo de forma independiente.



## **5. Discusión**

---



Numerosos estudios ponen de manifiesto la importancia del sistema SOS en el desarrollo del proceso infectivo de diversos patógenos. En primer lugar, por ser una respuesta global frente a lesiones en el DNA, el sistema SOS se induce cuando la célula se enfrenta a una gran variedad de condiciones estresantes, entre las cuales encontramos bajos niveles de pH o la presencia de sales biliares (Prieto *et al.*, 2004; Prieto *et al.*, 2006). En segundo lugar, la proteína RecA, activadora de este sistema, ha demostrado ser importante para la virulencia de diversos patógenos, como *V. cholerae*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* y también *S. Typhimurium* (Buchmeier *et al.*, 1993; Kumar *et al.*, 1994; Mei *et al.*, 1997; van der Veen y Abee, 2011). En este último caso, se ha demostrado que mutantes deficientes en *recA* resultan ser atenuados e incapaces de sobrevivir en el interior de macrófagos durante la fase intracelular de la infección (Buchmeier *et al.*, 1993). Sin embargo, los trabajos mencionados no establecen de forma directa cuál es el papel desarrollado por el sistema SOS durante la infección, ya que únicamente estudian mutantes deficientes en el activador de este sistema, en los cuales la ausencia de RecA evita la inducción de la respuesta SOS, pero también la reparación por recombinación. Por lo tanto, el papel dual de RecA no permite a estos estudios adjudicar el fenotipo observado de forma exclusiva ni a la ausencia de inducción del sistema SOS, ni a la ausencia de reparación por recombinación. Por este motivo, el presente trabajo tiene como objetivo principal determinar la importancia de la respuesta SOS durante el proceso infectivo de *S. Typhimurium*. Para tal fin, se estudió la capacidad infectiva de diversos mutantes de este patógeno que incorporan las mutaciones *recA $\alpha$ 6869* y *lexA3(Ind<sup>-</sup>)* en su cromosoma.

## 5.1. EL PROCESO INFECTIVO DE *S. Typhimurium* NO REQUIERE LA INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA SOS

Los resultados obtenidos en los ensayos de competitividad en ratón demuestran que la presencia de una forma no autohidrolizable de la proteína LexA no tiene efectos sobre la capacidad infectiva de *S. Typhimurium*, ni durante la etapa gastrointestinal de la infección (inoculación por vía oral), ni durante la etapa sistémica (inoculación por vía intraperitoneal). Estos resultados indican que la inducción de la respuesta SOS no es esencial para el desarrollo del proceso infectivo de este patógeno.

Los trabajos llevados a cabo por Buchmeier y colaboradores señalan la importancia de la proteína RecA para la supervivencia a las lesiones causadas por estrés oxidativo en el interior de macrófagos, es decir, durante la fase sistémica de la infección (Buchmeier *et al.*, 1993). Los resultados obtenidos en el presente trabajo, en concordancia con otro estudio publicado recientemente (Craig y Slauch, 2009), demuestran que su papel como activadora de la respuesta SOS no es esencial para la supervivencia en este tipo celular, ya que el mutante *lexA3(Ind<sup>-</sup>)*, en el cual dicha respuesta no puede ser inducida, se comporta del mismo modo que la cepa salvaje durante la infección en el modelo murino. Debe ser, por tanto, su papel

durante los procesos de reparación por recombinación el que permite superar las lesiones originadas por el estrés oxidativo durante la infección, y la ausencia de este tipo de procesos de reparación la causante de la atenuación en los mutantes deficientes en *recA*. Además, el hecho de que el mutante simple *lexA3(Ind<sup>-</sup>)* no presente una reducción en su virulencia indica que los niveles de RecA sintetizados a partir de la expresión basal del gen que la codifica son suficientes para responder a las lesiones que se producen a nivel intracelular y reparar el DNA mediante los mecanismos de recombinación. Por lo tanto, la inducción del sistema SOS durante la etapa sistémica de la infección, si se produce, no es esencial para la supervivencia celular.

Se ha demostrado también que algunos de los mecanismos de defensa del huésped presentes en el tracto gastrointestinal son lesivos para el DNA. Esto sugiere que la inducción del sistema SOS puede tener un papel importante durante esta fase de la infección. Durante el paso a través del estómago del huésped, *S. Typhimurium* encuentra elevados niveles de acidez. Mutantes deficientes en el gen *recA* de patógenos como *L. monocytogenes* o *E. coli* presentan dificultades para sobrevivir a las lesiones producidas por tan elevados niveles de acidez (van der Veen y Abee, 2011; Jeong *et al.*, 2008). Sin embargo, la aparición de lesiones detectables en el DNA de *E. coli* tiene lugar tras exponer a las células a un entorno con pH 2 por períodos superiores a 120 minutos (Jeong *et al.*, 2008), mientras que durante la infección por *S. Typhimurium*, el paso a través del estómago tiene lugar en unos pocos minutos. De un modo similar, estudios llevados a cabo en *S. Typhimurium* demuestran que las sales biliares pueden generar lesiones en el DNA que llevan a la inducción del sistema SOS (Prieto *et al.*, 2004; Prieto *et al.*, 2006). Sin embargo, las concentraciones de extracto biliar utilizadas para estos estudios son superiores a las que la célula encuentra en el intestino del organismo infectado, del mismo modo que lo es el tiempo de exposición empleado. Todas estas observaciones sugieren que, durante el paso a través del tracto gastrointestinal, la producción de lesiones en el DNA puede ser lo suficientemente baja como para permitir que la reparación tenga lugar por sistemas alternativos a la respuesta SOS, de modo que su inducción no sea necesaria para el desarrollo del proceso infeccioso. Respaldando esta hipótesis, mutantes deficientes en los genes *recB* y *recC* de *S. Typhimurium*, implicados en la reparación por recombinación de las roturas de doble cadena del DNA, son más sensibles a las sales biliares de lo que lo es un mutante *recA* deficiente, relacionando este sistema de reparación con la supervivencia a estos agentes (Prieto *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos en el presente trabajo corroboran estas afirmaciones. No se observaron diferencias de supervivencia entre el mutante *recA*06869 *lexA3(Ind<sup>-</sup>)* y la cepa salvaje de *S. Typhimurium* frente a entornos ácidos o entornos con altas concentraciones de colestato sódico. Asimismo, los resultados obtenidos en los ensayos de virulencia demuestran que no existen diferencias significativas en el índice de competitividad de la cepa *lexA3(Ind<sup>-</sup>)* de *S. Typhimurium* con respecto a la cepa salvaje después de una inoculación oral. Por lo tanto, todos los datos aquí presentados indican que la función de RecA en la reparación por recombinación es la que determina la supervivencia de *S. Typhimurium*

durante el paso a través del tracto gastrointestinal del huésped, siendo suficiente para ello el nivel de RecA sintetizado a partir de la expresión basal del gen *recA*.

## 5.2. LA SOBREEXPRESIÓN DE *recA* INTERFIERE LA FASE GASTROINTESTINAL DEL PROCESO INFECTIVO DESARROLADO POR *S. Typhimurium*

Los resultados obtenidos en los ensayos de competitividad en ratón realizados con los mutantes *recAo6869* y *recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)* demuestran que la sobreexpresión de *recA* tiene un efecto claro sobre la virulencia de *S. Typhimurium*, pero sólo cuando el patógeno es inoculado por vía oral.

Este efecto no se debe a diferencias entre las cinéticas de crecimiento de dichos mutantes y la de la cepa salvaje de *S. Typhimurium*, ya que las pruebas realizadas para la caracterización de los mutantes indican que la presencia de la proteína RecA en elevadas concentraciones intracelulares no perjudica ni al crecimiento *in vitro* de *S. Typhimurium*, ni a su capacidad para sobrevivir frente a la presencia de agentes lesivos como la luz UV. Los efectos sobre la virulencia tampoco pueden atribuirse a una deficiencia en la funcionalidad de la proteína RecA cuando ésta se encuentra en elevadas concentraciones en la célula, ya que los ensayos realizados demuestran que la proteína RecA sintetizada en las cepas portadoras de la construcción *recAo6869* es totalmente funcional y capaz de desempeñar su papel en la reparación del material genético cuando es activada mediante la interacción con ssDNA. Las pruebas para la comprobación de la presencia del bacteriófago Gifsy-2 en el cromosoma de los mutantes también descartan la pérdida de los factores de virulencia codificados en este profago como causa de la atenuación. Asimismo, las pruebas de supervivencia realizadas en entornos ácidos, en presencia de sales biliares o en condiciones anaeróbicas demuestran que todos estos factores afectan por igual a las cepas salvaje, *recAo6869* y *recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)* de *S. Typhimurium*, lo cual indica que estos mecanismos tampoco son los responsables del descenso en la virulencia de las células *recAo6869*.

Sin embargo, los resultados obtenidos en los estudios de invasividad realizados *in vivo* e *in vitro* con los mutantes *recAo6869* y *recAo6869 lexA3(Ind<sup>-</sup>)* de *S. Typhimurium* demuestran que la expresión constitutiva de *recA* afecta gravemente a la capacidad de este patógeno para penetrar en las células epiteliales, lo cual implica una mayor dificultad para dichos mutantes, respecto a la cepa salvaje, a la hora de traspasar la barrera epitelial. Estos datos corroboran los resultados de atenuación obtenidos en los ensayos de competitividad llevados a cabo por vía oral con los mutantes portadores de la construcción *recAo6869*, ya que en estos ensayos el traspaso de la barrera epitelial es necesario para que *S. Typhimurium* pueda establecerse en el

intestino, generando una infección local, y diseminarse posteriormente por el organismo para desarrollar la infección sistémica. De igual modo, los resultados obtenidos en las pruebas de invasividad de células epiteliales corroboran los datos obtenidos en los ensayos de competitividad llevados a cabo por vía intraperitoneal, en los cuales no se obtuvieron diferencias entre la cepa salvaje de *S. Typhimurium* y los mutantes *recAo6869* y *recAo6869 lexA3(Ind<sup>r</sup>)*, ya que la inoculación intraperitoneal sitúa el proceso infectivo en etapas posteriores al traspaso de la barrera epitelial, por lo que la dificultad para invadir células epiteliales no supone una desventaja para dichos mutantes frente a la cepa salvaje de *S. Typhimurium*. En consecuencia, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el descenso en la capacidad infectiva de los mutantes portadores de la construcción *recAo6869* es debido al descenso en su capacidad para invadir el epitelio intestinal.

### 5.3. EL EXCESO DE PROTEÍNA RecA INHIBE EL DESPLAZAMIENTO POBLACIONAL MEDIANTE SWARMING EN *S. Typhimurium*

Son muchos los factores implicados en los procesos de adhesión e invasión de células epiteliales. Entre estos factores se encuentran los mecanismos de motilidad, los cuales son muy importantes para diferentes serovariedades de *S. enterica*. En el caso de *S. Typhimurium*, estudios llevados a cabo en la década de 1980 demuestran que la motilidad celular facilita la interacción con las células epiteliales para que, posteriormente, éstas internalicen a las bacterias. De este modo, mutantes inmóviles de dicho patógeno presentan una menor capacidad invasiva que la cepa salvaje y necesitan pasar por un proceso de centrifugación sobre las células epiteliales *in vitro* para poder ser internalizados (Jones *et al.*, 1981). De un modo similar, mutantes de *S. Typhi* que presentan alteraciones en la síntesis flagelar (no sintetizan flagelos o los sintetizan inmóviles) o mutantes afectados en el sistema de quimiotaxis presentan una menor capacidad invasiva que la cepa salvaje de este patógeno, aunque en este caso no se obtiene ninguna mejora mediante procesos de centrifugación *in vitro* (Liu *et al.*, 1988). Más recientemente, estudios llevados a cabo en *S. Enteritidis* demuestran que mutantes de esta serovariedad aflagelados o con flagelos inmóviles también presentan defectos en su capacidad invasiva cuando son puestos en contacto con células epiteliales del tipo Caco-2 (van Asten *et al.*, 2004). Sin embargo, en este mismo trabajo se demuestra que, tras tres horas de infección, los niveles de internalización de los dos tipos de mutantes se equiparan a los niveles conseguidos en sólo una hora por la cepa salvaje de *S. Enteritidis*. Es decir, los resultados obtenidos permiten determinar que el problema que presentan los mutantes inmóviles de esta serovariedad es un retraso en la invasión de las células epiteliales.

En concordancia con los datos expuestos en el párrafo anterior, los mutantes *recAo6869* de *S. Typhimurium* estudiados en este trabajo no presentan una incapacidad total para invadir las

células epiteliales, ya que, aunque en menor medida que la cepa salvaje, sí fueron recuperados del interior del epitelio, tanto en los ensayos mediante asas intestinales, como en los ensayos de invasión de monocapas celulares. Este hecho sugiere que el descenso en la capacidad invasiva de las cepas portadoras de la construcción *recAo6869* puede estar relacionado con problemas de motilidad.

Estudios llevados a cabo en mutantes deficientes en el gen *recA* de *E. coli* demuestran que la ausencia de proteína RecA en la célula inhibe un tipo de desplazamiento poblacional sobre superficies semisólidas llamado movimiento en enjambre o *swarming* (Gómez-Gómez *et al.*, 2007). Este tipo de desplazamiento es importante para la virulencia de patógenos como *P. mirabilis* o *P. aeruginosa*, ya que la invasión del tejido epitelial por estas células tiene lugar cuando se mueven mediante *swarming* y, además, dicho movimiento está asociado a la expresión de determinados factores de virulencia (Allison *et al.*, 1992a; Allison *et al.*, 1992b; Overhage *et al.*, 2008). Asimismo, estudios comparativos entre diferentes serovariedades de *S. enterica* han demostrado que aquellas cepas que no son capaces de invadir el tracto gastrointestinal de ratones inoculados oralmente tampoco son capaces de desplazarse mediante *swarming* (Katribe *et al.*, 2009). Todos estos datos sugieren una relación entre RecA y el movimiento de *swarming*, la cual podría ser responsable de los defectos en la infectividad de los mutantes *recAo6869* de *S. Typhimurium*.

Los resultados obtenidos en los ensayos de desplazamiento realizados en este trabajo demuestran que, efectivamente, los mutantes portadores de la construcción *recAo6869* en su cromosoma son incapaces de desplazarse mediante *swarming*, confirmando que la expresión constitutiva de *recA* inhibe este tipo de movimiento.

De este modo, los datos expuestos en el presente trabajo permiten establecer un nuevo modelo para *S. Typhimurium* en el que la sobreexpresión de *recA* durante el desarrollo del proceso infeccioso inhibe el desplazamiento mediante *swarming*. Este hecho dificulta la invasión de células epiteliales y, por lo tanto, el establecimiento de la infección por este patógeno, dando como resultado un descenso en la capacidad virulenta de los mutantes *recAo6869*. El papel desempeñado por el sistema SOS durante el proceso infeccioso de *S. Typhimurium* es, por consiguiente, el de regular la cantidad de proteína RecA existente en la célula para mantenerla en sus niveles basales. Esto permite tanto la reparación del material genético a través de los procesos de recombinación homóloga, como el desplazamiento mediante *swarming*, posibilitando todas las etapas de la infección.

Este modelo deja abiertas varias cuestiones, como la determinación del mecanismo molecular que relaciona la sobreexpresión de *recA* con el desplazamiento mediante *swarming* en *S. Typhimurium*, la exclusividad de la proteína RecA como responsable de la inhibición del *swarming* en los mutantes *recAo6869* de este patógeno, o la implicación del sistema SOS como

regulador del desplazamiento poblacional en *S. Typhimurium* a través del control de las concentraciones intracelulares de la proteína RecA. Por este motivo, se realizaron diferentes pruebas con el fin de esclarecer algunos de estos interrogantes.

Los mutantes *recAo6869* de *S. Typhimurium* presentan grandes cantidades de la proteína RecA en el interior celular como consecuencia de la expresión constitutiva del gen *recA* originada por la mutación en la caja SOS de su promotor. Sin embargo, en este patógeno, dicho gen forma una unidad transcripcional policistrónica junto al gen *recX*, por lo que la mutación en el promotor que regula el gen *recA* no sólo promueve su sobreexpresión, sino también la de este segundo gen. Por este motivo se llevaron a cabo diferentes ensayos para determinar si la inhibición del movimiento en enjambre observada en los mutantes *recAo6869* de *S. Typhimurium* se debe únicamente al incremento en los niveles intracelulares de RecA. Las pruebas de desplazamiento llevadas a cabo con el mutante *recX* y con el mutante *recAo6869* *recX* confirman esta hipótesis, ya que la ausencia de *recX* no altera el fenotipo de la cepa salvaje de este patógeno ni el del mutante *recAo6869*. Asimismo, los datos obtenidos tras la sobreexpresión exclusiva de *recA* en la cepa salvaje de *S. Typhimurium*, mediante su clonación en un vector de sobreexpresión bajo control del promotor *Ptac*, demuestran que dicha sobreexpresión es la única responsable de la inhibición del *swarming*, ya que genera un fenotipo defectivo en este movimiento igual al observado en los mutantes portadores de la construcción *recAo6869* en su cromosoma. Todo ello permite afirmar que un incremento en la concentración intracelular de la proteína RecA es suficiente para originar la inhibición del movimiento en enjambre en *S. Typhimurium*.

Estudios realizados en *E. coli* también demuestran el papel desarrollado por la proteína RecA en la regulación del movimiento en enjambre en este patógeno (Gómez-Gómez *et al.*, 2007). En estos estudios, mutantes deficientes en el gen *recA* son incapaces de desplazarse mediante *swarming*. Sin embargo, la complementación de la mutación con una forma de la proteína RecA incapaz de interactuar con el ssDNA recupera el *swarming*. Este hecho relaciona la forma no activada de RecA con el movimiento en enjambre en *E. coli*. Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman estos datos para *S. Typhimurium* y demuestran que no sólo la ausencia de RecA, sino también su presencia en elevadas concentraciones en la célula, inhiben el desplazamiento en enjambre. Asimismo, los mutantes *recAo6869* son incapaces de desplazarse incluso en entornos no lesivos para las células, es decir, sin que se produzca la activación de la proteína RecA, lo cual indica que la regulación del *swarming* mediada por esta proteína en *S. Typhimurium* también tiene lugar a través de la forma no activada de RecA.

## 5.4. EL SISTEMA SOS CONTROLA EL DESPLAZAMIENTO MEDIANTE *SWARMING* EN *S. Typhimurium*

En una cepa salvaje de *S. Typhimurium*, unos niveles de expresión de *recA* equivalentes a los que existen en los mutantes portadores de la construcción *recA $\alpha$ 6869* sólo tienen lugar como consecuencia de la inducción de la respuesta SOS debida a la presencia de compuestos lesivos para la célula en el entorno. Esto sugiere que el sistema SOS es el responsable de regular este tipo de desplazamiento poblacional a través del control que ejerce sobre la proteína RecA.

Las pruebas realizadas para estudiar el movimiento en enjambre de la cepa salvaje de *S. Typhimurium* ATCC 14028 demuestran que, efectivamente, en presencia de un agente inductor del sistema SOS, este patógeno pierde su capacidad para desplazarse mediante *swarming*. Estos resultados confirman que la inducción de la respuesta SOS inhibe este tipo de movimiento poblacional en *S. Typhimurium* y demuestran que el sistema SOS es el encargado de regular el desplazamiento mediante *swarming* en este patógeno a través de la regulación de la concentración intracelular de la proteína RecA.

Estos datos permiten plantear un modelo según el cual, en condiciones naturales, la presencia de agentes lesivos para la célula en el entorno induce la respuesta SOS y, con ella, unos elevados niveles de síntesis de RecA. Esta proteína participa entonces en distintos procesos celulares. En primer lugar, en su forma no activada, puede inhibir el *swarming* y, por lo tanto, evitar el acercamiento de las células a entornos con concentraciones aún mayores de compuestos lesivos para ellas. En segundo lugar, puede interactuar con el ssDNA originado a consecuencia de las lesiones y pasar a su forma activada, participando entonces en procesos de reparación del material genético (reparación por recombinación o síntesis de DNA por translesión) y actuando como activador de la respuesta SOS, lo cual mantiene sus niveles intracelulares elevados hasta que cesa la producción de lesiones en el DNA por efecto de los agentes lesivos del entorno. Por lo tanto, el sistema SOS y, más concretamente, la proteína RecA, actúan como sensores de las condiciones externas, de modo que las células se desplazan únicamente en entornos no lesivos.

Esta función puede jugar un papel muy importante durante el proceso infectivo. Para desarrollar la infección, las células de *S. Typhimurium* han de invadir el epitelio intestinal, para lo cual han de alcanzar la zona distal del intestino delgado (Takeuchi, 1967; Jones *et al.*, 1994). Durante el recorrido a lo largo del tracto gastrointestinal, antes de alcanzar esta región del intestino, las células se han de enfrentar a los diferentes mecanismos de defensa del huésped, tales como la acidez estomacal o las sales biliares (Libby *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos en diversos trabajos sugieren una función para estos mecanismos como indicadores de la localización del patógeno en el huésped. En primer lugar, estudios realizados para analizar los

efectos producidos por la presencia de bajos niveles de pH en el entorno (pH 3 o inferior) demuestran que tales niveles de acidez reprimen la expresión de los genes *fliC* y *fliB* en *S. Typhimurium*, inhibiendo la motilidad celular (Adams *et al.*, 2001). En este estudio se postula que la inhibición de estos genes tiene como fin evitar el gasto energético derivado de la síntesis flagelar en estas condiciones adversas. En segundo lugar, estudios de invasividad realizados con *S. Typhimurium* demuestran que la presencia de sales biliares en el entorno disminuye la capacidad invasiva de este patógeno, debido a que estos compuestos inhiben la expresión de genes codificados en la SPI-1, implicados en la invasión de células epiteliales (Prouty y Gunn, 2000). Asimismo, trabajos posteriores realizados con este mismo patógeno demuestran que las sales biliares también inhiben la expresión de genes implicados en la síntesis flagelar, disminuyendo la motilidad celular (Prouty *et al.*, 2004). Por todo ello, estos estudios sugieren una función para las sales biliares como compuestos indicadores de la localización de las células en el intestino, de modo que cuando las células de *S. Typhimurium* abandonan el estómago para alcanzar el intestino delgado, la presencia de elevadas concentraciones de sales biliares en la zona proximal de éste inhibe la expresión de genes implicados en los procesos de invasión de células epiteliales y en la síntesis flagelar, evitando el gasto energético asociado a ambos. Sin embargo, una vez las células alcanzan la región distal del intestino delgado, la concentración de sales biliares disminuye, permitiendo la expresión de los genes anteriormente reprimidos y la invasión del tejido epitelial (Prouty y Gunn, 2000; Prouty *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos en este trabajo, que demuestran que la capacidad infectiva de la cepa *lexA3(Ind<sup>-</sup>)* de *S. Typhimurium* es equivalente a la de la cepa salvaje, indican que la inducción del sistema SOS no es necesaria para la supervivencia de este patógeno frente a las lesiones causadas por el bajo pH estomacal o las sales biliares. Sin embargo, en caso de producirse, la inducción del sistema SOS permitiría a las células detectar su localización en el huésped en respuesta a estos factores e inhibir el desplazamiento mediante *swarming* hasta su llegada a la zona distal del intestino delgado. Reforzando esta hipótesis, los resultados obtenidos en los ensayos de virulencia realizados con los mutantes portadores de la construcción *recA<sub>o6869</sub>* en su cromosoma y los resultados descritos en estudios realizados con cepas deficientes en el gen *recA* (Buchmeier *et al.*, 1993) indican que, tanto la presencia de elevadas concentraciones de RecA en el interior celular, como la ausencia de dicha proteína, generan defectos en el proceso infectivo de *S. Typhimurium*, los cuales pueden estar asociados a la incapacidad de estas cepas para desplazarse mediante *swarming*. Estos datos indican que las células sólo pueden desplazarse mediante este movimiento poblacional en entornos en los que la respuesta SOS no está inducida y los niveles de RecA se mantienen en su nivel basal, como la región distal del intestino delgado.

## 5.5. LA INTERACCIÓN ENTRE RecA Y CheW REGULA EL DESPLAZAMIENTO MEDIANTE SWARMING EN *S. Typhimurium*

Para que el sistema SOS pueda ejercer su función reguladora sobre el *swarming*, RecA debe intervenir, directa o indirectamente, en alguno de los procesos moleculares implicados en este movimiento.

Los datos obtenidos a partir de las observaciones microscópicas demuestran que, cuando el mutante *recAo6869* de *S. Typhimurium* es cultivado en las condiciones idóneas para el desplazamiento mediante *swarming*, sus células son capaces de diferenciarse en *swarmers* del mismo modo que lo hacen las células de la cepa salvaje. Estos resultados indican que la sobreexpresión de *recA* no inhibe el proceso de diferenciación celular asociado al movimiento en enjambre, sino que inhibe únicamente el avance de la colonia sobre la superficie.

El avance sobre la superficie tiene lugar gracias al impulso generado por la rotación de los flagelos (Jones *et al.*, 2004). Este movimiento de rotación está regulado por el sistema de quimiotaxis (Baker *et al.*, 2006), el cual es necesario para el movimiento en enjambre de numerosos microorganismos, entre ellos *S. Typhimurium* (Sar *et al.*, 1990; Belas *et al.*, 1991; O'Rear *et al.*, 1992; Burkart *et al.*, 1998; Mariconda *et al.*, 2006). Estudios realizados con *E. coli* demuestran que la proteína CheW, componente esencial del sistema de quimiotaxis (Gegner *et al.*, 1992; Maddock y Shapiro, 1993), interacciona con RecA en este patógeno (Arifuzzaman *et al.*, 2006). Todos estos trabajos sugieren que el sistema SOS, a través de la proteína RecA, ejerce su función reguladora sobre el movimiento en enjambre a través del sistema de quimiotaxis. Reforzando esta hipótesis, estudios realizados con *E. coli* demuestran que tanto la ausencia de CheW en el interior de la célula, como su presencia en elevadas concentraciones, inhiben el desplazamiento mediante *swarming* de este patógeno (Sanders *et al.*, 1989), al igual que ocurre en el caso de la proteína RecA en *S. Typhimurium*. Estos datos sugieren que un equilibrio entre ambas proteínas es el responsable del control del movimiento en enjambre en *S. Typhimurium*.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman esta hipótesis. En primer lugar, los ensayos de doble híbrido demuestran la existencia de una interacción directa entre las proteínas RecA y CheW en *S. Typhimurium*. En segundo lugar, la sobreexpresión regulada de *cheW* en la cepa *recAo6869* demuestra que el incremento en la concentración intracelular de la proteína CheW recupera progresivamente el desplazamiento mediante *swarming* en esta cepa. Sin embargo, una producción demasiado elevada de dicha proteína inhibe de nuevo el desplazamiento, confirmando que el equilibrio entre las concentraciones intracelulares de RecA y de CheW es necesario para el movimiento en enjambre en *S. Typhimurium*. Por lo

tanto, en este patógeno, la regulación del *swarming* mediada por el sistema SOS tiene lugar gracias a la alteración del equilibrio existente entre las proteínas RecA y CheW.

Los procesos celulares afectados por el desequilibrio entre RecA y CheW, que en última instancia causan la inhibición del desplazamiento mediante *swarming*, están aún por elucidar debido a que la función que desempeña el sistema de quimiotaxis en el movimiento en enjambre no ha sido descrita. Para que las células puedan desplazarse en enjambre es necesaria la interacción entre la forma fosforilada de la proteína CheY y el motor flagelar (Mariconda *et al.*, 2006). Estudios llevados a cabo en la década de 1980 con *V. parahaemolyticus* postulan que esta interacción es necesaria para que el flagelo pueda llevar a cabo su función mecanosensora (McCarter *et al.*, 1988). Según este modelo, los cambios en la rotación flagelar producidos por alteraciones en la viscosidad del medio son detectados y transmitidos por el sistema de quimiotaxis con el fin de inducir la expresión de los genes *laf*, los cuales codifican los flagelos laterales responsables de *swarming* en este patógeno (McCarter *et al.*, 1988). Estudios posteriores realizados con *S. Typhimurium* demuestran que la capacidad para alternar entre los dos sentidos de rotación flagelar (CW y CCW) es importante para generar la humedad necesaria para el movimiento en enjambre en los entornos menos húmedos, por lo que estos estudios proponen que la interacción entre la forma fosforilada de CheY y el motor flagelar es esencial para promover esta alternancia (Mariconda *et al.*, 2006). En cualquiera de estas dos situaciones, la estructuración y el correcto funcionamiento del sistema de quimiotaxis son necesarios para mantener los niveles basales de CheY fosforilado en el interior celular. La proteína CheW es un componente esencial de este sistema, ya que sin ella no pueden formarse los clusters de quimiorreceptores en los polos celulares (Gegner *et al.*, 1992; Maddock y Shapiro, 1993; Cardozo *et al.*, 2010), hecho que imposibilita la estructuración del sistema de quimiotaxis y, por lo tanto, el desplazamiento mediante *swarming*. Esto sugiere que la función de RecA como reguladora del movimiento en enjambre en *S. Typhimurium* tiene lugar mediante el control del funcionamiento del sistema de quimiotaxis gracias a la interacción existente entre RecA y CheW.

Diversos modelos pueden explicar cómo la proteína RecA, y su interacción con CheW, modulan el *swarming* a través del sistema de quimiotaxis. En primer lugar, RecA podría ejercer su efecto regulador mediante el control de la disponibilidad de CheW en el interior de la célula. Según este modelo, el incremento en la concentración de RecA que tiene lugar en entornos lesivos para la célula a consecuencia de la inducción del sistema SOS produce una interacción masiva con CheW, secuestrándola y evitando su estructuración en los clusters de quimiorreceptores. De este modo, se inhibe la formación de dichos clusters y su distribución en los polos de la célula. En segundo lugar, RecA podría formar parte, al igual que CheW, de los clusters de quimiorreceptores. Según este modelo, la unión masiva entre RecA y CheW, debida al incremento en la concentración de RecA, altera la ordenación de los distintos componentes en los clusters de quimiorreceptores, impidiendo a éstos su correcta estructuración. En ambos

modelos, la imposibilidad de formar los clusters de quimiorreceptores en los polos de la célula impide la organización del resto de componentes del sistema de quimiotaxis y, por lo tanto, el funcionamiento de dicho sistema, haciendo descender los niveles intracelulares de CheY fosforilado. Este fenómeno, en última instancia, sería el responsable de la inhibición del *swarming*, evitando la dispersión de la colonia en aquellos entornos dañinos para las células en los que el sistema SOS está inducido.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo ponen de manifiesto la gran importancia del sistema SOS como una respuesta génica global implicada, no sólo en la reparación del material genético o la adaptación a las condiciones del entorno, sino también en el movimiento celular. Por lo tanto, se demuestra que el sistema SOS no sólo actúa como un mecanismo de reparación genética, permitiendo la superación de las lesiones producidas en el DNA, sino que también actúa como un mecanismo de prevención de dichas lesiones, evitando la propagación de la colonia en aquellos entornos lesivos en los que la supervivencia está comprometida.



## **6. Conclusiones**

---



1. La incapacidad para inducir la respuesta SOS generada por la presencia de la mutación *lexA3(Ind<sup>r</sup>)* en el cromosoma de *S. Typhimurium*, que da lugar a una proteína LexA no autohidrolizable, no tiene ningún efecto sobre la capacidad infectiva de este patógeno, ni durante la etapa gastrointestinal de la infección, ni durante la etapa sistémica.
2. La introducción de la mutación *recAo6869* en el promotor de *recA*, que provoca la sobreexpresión de dicho gen, origina un descenso en la capacidad infectiva de *S. Typhimurium* cuando ésta es inoculada por vía oral, pero no cuando es inoculada por vía intraperitoneal.
3. El descenso en la capacidad infectiva de los mutantes *recAo6869* de *S. Typhimurium* no se debe a un aumento en la sensibilidad frente a las lesiones producidas por el pH ácido o las sales biliares, ni a defectos en el crecimiento en condiciones anaeróbicas o a la pérdida del profago Gifsy-2, residente en su cromosoma.
4. Los mutantes *recAo6869* de *S. Typhimurium* presentan una menor capacidad que la cepa salvaje de este patógeno para invadir las células del epitelio intestinal en el modelo murino y las células de origen humano de la línea Caco-2.
5. Los mutantes *recAo6869* de *S. Typhimurium* son incapaces de desplazarse sobre superficies semisólidas mediante el movimiento en enjambre (o *swarming*). Este tipo de movimiento poblacional es importante para el potencial invasivo de *S. Typhimurium*, lo cual sugiere que el descenso en la capacidad infectiva observado en los mutantes *recAo6869* puede ser atribuido a esta deficiencia.
6. La sobreexpresión del gen *recX* derivada de la presencia de la mutación *recAo6869* en el cromosoma de *S. Typhimurium* no tiene ningún efecto sobre el movimiento en enjambre. El incremento en los niveles intracelulares de RecA en los mutantes *recAo6869* es el único responsable de la inhibición de este movimiento.
7. La inducción de la respuesta SOS en presencia de agentes lesivos para la célula promueve la inhibición del movimiento poblacional en enjambre en *S. Typhimurium*.
8. Las proteínas RecA y CheW interactúan entre sí en *S. Typhimurium*. Esta interacción y, por lo tanto, la relación existente entre la proteína RecA y la ruta de señalización de la quimiotaxis, es el vínculo que une al sistema SOS con el movimiento poblacional en enjambre en *S. Typhimurium*.

9. La existencia de un equilibrio entre las concentraciones intracelulares de las proteínas RecA y CheW es esencial para el desplazamiento mediante *swarming* en *S. Typhimurium*. Alteraciones en este equilibrio debidas al exceso o al defecto de cualquiera de las dos proteínas inhiben el movimiento en enjambre, que sólo se recupera cuando se restaura el equilibrio entre ambas.
  
10. El papel que ejerce el sistema SOS como regulador del movimiento poblacional en *S. Typhimurium* permite la inhibición del desplazamiento en enjambre cuando éste supone el acercamiento de la colonia a entornos con concentraciones elevadas de compuestos lesivos para el material genético de las células. Esta inhibición tiene lugar a través de la proteína RecA, cuyos niveles en el interior celular son indicadores de la presencia de estos compuestos lesivos en el medio y regulan el movimiento poblacional en *S. Typhimurium*.

## **7. Bibliografía**

---



- Adams, P., Fowler, R., Kinsella, N., Howell, G., Farris, M., Coote, P., & O'Connor, C. D.** 2001. Proteomic detection of PhoPQ- and acid-mediated repression of *Salmonella* motility. *Proteomics*, 1(4): 597-607.
- Alberti, L., & Harshey, R. M.** 1990. Differentiation of *Serratia marcescens* 274 into swimmer and swarmer cells. *Journal of Bacteriology*, 172(8): 4322-4328.
- Álvarez-Ordóñez, A., Begley, M., Prieto, M., Messens, W., López, M., Bernardo, A., & Hill, C.** 2011. *Salmonella* spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract. *Microbiology*, 157(Pt 12): 3268-3281.
- Allison, C., Coleman, N., Jones, P. L., & Hughes, C.** 1992a. Ability of *Proteus mirabilis* to invade human urothelial cells is coupled to motility and swarming differentiation. *Infection and Immunity*, 60(11): 4740-4746.
- Allison, C., Lai, H. C., & Hughes, C.** 1992b. Co-ordinate expression of virulence genes during swarm-cell differentiation and population migration of *Proteus mirabilis*. *Molecular Microbiology*, 6(12): 1583-1591.
- Ames, P., Studdert, C. A., Reiser, R. H., & Parkinson, J. S.** 2002. Collaborative signaling by mixed chemoreceptor teams in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(10): 7060-7065.
- Anderson, D. G., & Kowalczykowski, S. C.** 1998. Reconstitution of an SOS response pathway: derepression of transcription in response to DNA breaks. *Cell*, 95(7): 975-979.
- Arifuzzaman, M., Maeda, M., Itoh, A., Nishikata, K., Takita, C., Saito, R., Ara, T., Nakahigashi, K., Huang, H. C., Hirai, A., Tsuzuki, K., Nakamura, S., Altaf-Ul-Amin, M., Oshima, T., Baba, T., Yamamoto, N., Kawamura, T., Ioka-Nakamichi, T., Kitagawa, M., Tomita, M., Kanaya, S., Wada, C., & Mori, H.** 2006. Large-scale identification of protein-protein interaction of *Escherichia coli* K-12. *Genome Research*, 16(5): 686-691.
- Baker, M. D., Wolanin, P. M., & Stock, J. B.** 2006. Signal transduction in bacterial chemotaxis. *Bioessays*, 28(1): 9-22.
- Bakowski, M. A., Braun, V., & Brumell, J. H.** 2008. *Salmonella*-containing vacuoles: directing traffic and nesting to grow. *Traffic*, 9(12): 2022-2031.
- Bang, I. S., Kim, B. H., Foster, J. W., & Park, Y. K.** 2000. OmpR regulates the stationary-phase acid tolerance response of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 182(8): 2245-2252.
- Bang, I. S., Audia, J. P., Park, Y. K., & Foster, J. W.** 2002. Autoinduction of the *ompR* response regulator by acid shock and control of the *Salmonella enterica* acid tolerance response. *Molecular Microbiology*, 44(5): 1235-1250.
- Barbé, J., Villaverde, A., Cairo, J., & Guerrero, R.** 1986. ATP hydrolysis during SOS induction in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 167(3): 1055-1057.

**Bäumler, A. J., Tsois, R. M., Ficht, T. A., & Adams, L. G.** 1998. Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infection and Immunity*, 66(10): 4579-4587.

**Beaber, J. W., Hochhut, B., & Waldor, M. K.** 2004. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*, 427(6969): 72-74.

**Bearson, B. L., Wilson, L., & Foster, J. W.** 1998. A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress. *Journal of Bacteriology*, 180(9): 2409-2417.

**Belas, R., Erskine, D., & Flaherty, D.** 1991. *Proteus mirabilis* mutants defective in swarmer cell differentiation and multicellular behavior. *Journal of Bacteriology*, 173(19): 6279-6288.

**Belas, R., & Suvanasuthi, R.** 2005. The ability of *Proteus mirabilis* to sense surfaces and regulate virulence gene expression involves FliL, a flagellar basal body protein. *Journal of Bacteriology*, 187(19): 6789-6803.

**Berends, B. R., Van Knapen, F., Mossel, D. A., Burt, S. A., & Snijders, J. M.** 1998. Impact on human health of *Salmonella* spp. on pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. *International Journal of Food Microbiology*, 44(3): 219-229.

**Berg, H. C.** 2003. The rotary motor of bacterial flagella. *Annual Review of Biochemistry*, 72: 19-54.

**Beuzón, C. R., & Holden, D. W.** 2001. Use of mixed infections with *Salmonella* strains to study virulence genes and their interactions in vivo. *Microbes and Infection*, 3(14-15): 1345-1352.

**Bi, E., & Lutkenhaus, J.** 1993. Cell division inhibitors SulaA and MinCD prevent formation of the FtsZ ring. *Journal of Bacteriology*, 175(4): 1118-1125.

**Bichara, M., Meier, M., Wagner, J., Cordonnier, A., & Lambert, I. B.** 2011. Postreplication repair mechanisms in the presence of DNA adducts in *Escherichia coli*. *Mutation Research*, 727(3): 104-122.

**Bispham, J., Tripathi, B. N., Watson, P. R., & Wallis, T. S.** 2001. *Salmonella* pathogenicity island 2 influences both systemic salmonellosis and *Salmonella*-induced enteritis in calves. *Infection and Immunity*, 69(1): 367-377.

**Borek, E., & Ryan, A.** 1958. The transfer of irradiation-elicited induction in a lysogenic organism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 44(5): 374-377.

**Borkovich, K. A., Kaplan, N., Hess, J. F., & Simon, M. I.** 1989. Transmembrane signal transduction in bacterial chemotaxis involves ligand-dependent activation of phosphate group transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(4): 1208-1212.

- Borloo, J., De Smet, L., Vergauwen, B., Van Beeumen, J. J., & Devreese, B.** 2007. A  $\beta$ -galactosidase-based bacterial two-hybrid system to assess protein-protein interactions in the correct cellular environment. *Journal of Proteome Research*, 6(7): 2587-2595.
- Boyd, J. F.** 1985. Pathology of the alimentary tract in *Salmonella typhimurium* food poisoning. *Gut*, 26(9): 935-944.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., & Swaminathan, B.** 2000. *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7): 2465-2467.
- Bridges, B. A.** 2005. Error-prone DNA repair and translesion DNA synthesis. II: The inducible SOS hypothesis. *DNA Repair*, 4(6): 725-726, 739.
- Brooks, W. A., Hossain, A., Goswami, D., Nahar, K., Alam, K., Ahmed, N., Naheed, A., Nair, G. B., Luby, S., & Breiman, R. F.** 2005. Bacteremic typhoid fever in children in an urban slum, Bangladesh. *Emerging Infectious Diseases*, 11(2): 326-329.
- Bruck, I., Woodgate, R., McEntee, K., & Goodman, M. F.** 1996. Purification of a soluble UmuD'C complex from *Escherichia coli*. Cooperative binding of UmuD'C to single-stranded DNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(18): 10767-10774.
- Buchmeier, N. A., Lipps, C. J., So, M. Y., & Heffron, F.** 1993. Recombination-deficient mutants of *Salmonella typhimurium* are avirulent and sensitive to the oxidative burst of macrophages. *Molecular Microbiology*, 7(6): 933-936.
- Bueno, S. M., González, P. A., Carreño, L. J., Tobar, J. A., Mora, G. C., Pereda, C. J., Salazar-Onfray, F., & Kalergis, A. M.** 2008. The capacity of *Salmonella* to survive inside dendritic cells and prevent antigen presentation to T cells is host specific. *Immunology*, 124(4): 522-533.
- Bunny, K., Liu, J., & Roth, J.** 2002. Phenotypes of *lexA* mutations in *Salmonella enterica*: evidence for a lethal *lexA* null phenotype due to the Fels-2 prophage. *Journal of Bacteriology*, 184(22): 6235-6249.
- Burkart, M., Toguchi, A., & Harshey, R. M.** 1998. The chemotaxis system, but not chemotaxis, is essential for swarming motility in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5): 2568-2573.
- Butala, M., Hodoscek, M., Anderluh, G., Podlesek, Z., & Zgur-Bertok, D.** 2007. Intradomain LexA rotation is a prerequisite for DNA binding specificity. *FEBS Letters*, 581(25): 4816-4820.
- Butala, M., Zgur-Bertok, D., & Busby, S. J.** 2009. The bacterial LexA transcriptional repressor. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(1): 82-93.

**Butala, M., Klose, D., Hodnik, V., Rems, A., Podlessek, Z., Klare, J. P., Anderluh, G., Busby, S. J., Steinhoff, H. J., & Zgur-Bertok, D.** 2011. Interconversion between bound and free conformations of LexA orchestrates the bacterial SOS response. *Nucleic Acids Research*, 39(15): 6546-6557.

**Caiazza, N. C., Shanks, R. M., & O'Toole, G. A.** 2005. Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 187(21): 7351-7361.

**Calero, S., Garriga, X., & Barbé, J.** 1991. One-step cloning system for isolation of bacterial *lexA*-like genes. *Journal of Bacteriology*, 173(22): 7345-7350.

**Campoy, S., Fontes, M., Padmanabhan, S., Cortés, P., Llagostera, M., & Barbé, J.** 2003. LexA-independent DNA damage-mediated induction of gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, 49(3): 769-781.

**Campoy, S., Hervàs, A., Busquets, N., Erill, I., Teixidó, L., & Barbé, J.** 2006. Induction of the SOS response by bacteriophage lytic development in *Salmonella enterica*. *Virology*, 351(2): 360-367.

**Cardozo, M. J., Massazza, D. A., Parkinson, J. S., & Studdert, C. A.** 2010. Disruption of chemoreceptor signalling arrays by high levels of CheW, the receptor-kinase coupling protein. *Molecular Microbiology*, 75(5): 1171-1181.

**Carrasco, B., Cañas, C., Sharples, G. J., Alonso, J. C., & Ayora, S.** 2009. The N-terminal region of the RecU holliday junction resolvase is essential for homologous recombination. *Journal of Molecular Biology*, 390(1): 1-9.

**Casadaban, M. J., & Cohen, S. N.** 1979. Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a *Mu-lac* bacteriophage: *in vivo* probe for transcriptional control sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9): 4530-4533.

**Cirz, R. T., Chin, J. K., Andes, D. R., de Crecy-Lagard, V., Craig, W. A., & Romesberg, F. E.** 2005. Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. *PLoS Biology*, 3(6): e176.

**Cirz, R. T., & Romesberg, F. E.** 2007. Controlling mutation: intervening in evolution as a therapeutic strategy. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 42(5): 341-354.

**Clark, A. J., & Sandler, S. J.** 1994. Homologous genetic recombination: the pieces begin to fall into place. *Critical Reviews in Microbiology*, 20(2): 125-142.

**Clark, D. J., & Maaløe, O.** 1967. DNA replication and the division cycle in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 23(1): 99-112.

**Cooper, P. K., & Hanawalt, P. C.** 1972. Role of DNA polymerase I and the *rec* system in excision-repair in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(5): 1156-1160.

- Courcelle, C. T., Chow, K. H., Casey, A., & Courcelle, J.** 2006. Nascent DNA processing by RecJ favors lesion repair over translesion synthesis at arrested replication forks in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(24): 9154-9159.
- Courcelle, J., Crowley, D. J., & Hanawalt, P. C.** 1999. Recovery of DNA replication in UV-irradiated *Escherichia coli* requires both excision repair and RecF protein function. *Journal of Bacteriology*, 181(3): 916-922.
- Courcelle, J., Khodursky, A., Peter, B., Brown, P. O., & Hanawalt, P. C.** 2001. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics*, 158(1): 41-64.
- Cox, M. M.** 2001. Recombinational DNA repair of damaged replication forks in *Escherichia coli*: questions. *Annual Review of Genetics*, 35: 53-82.
- Craig, M., & Slauch, J. M.** 2009. Phagocytic superoxide specifically damages an extracytoplasmic target to inhibit or kill *Salmonella*. *PLoS One*, 4(3): e4975.
- Crowley, D. J., & Courcelle, J.** 2002. Answering the Call: Coping with DNA Damage at the Most Inopportune Time. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2(2): 66-74.
- Crump, J. A., Luby, S. P., & Mintz, E. D.** 2004. The global burden of typhoid fever. *Bulletin of the World Health Organization*, 82(5): 346-353.
- Chakravorty, D., Hansen-Wester, I., & Hensel, M.** 2002. *Salmonella* pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular *Salmonella* from reactive nitrogen intermediates. *The Journal of Experimental Medicine*, 195(9): 1155-1166.
- Chaveroche, M. K., Ghigo, J. M., & d'Enfert, C.** 2000. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Research*, 28(22): E97.
- Chen, B. G., Turner, L., & Berg, H. C.** 2007. The wetting agent required for swarming in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is not a surfactant. *Journal of Bacteriology*, 189(23): 8750-8753.
- Chen, L. M., Hobbie, S., & Galán, J. E.** 1996. Requirement of CDC42 for *Salmonella*-induced cytoskeletal and nuclear responses. *Science*, 274(5295): 2115-2118.
- Chilcott, G. S., & Hughes, K. T.** 2000. Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4): 694-708.
- Chiou, C. S., Huang, J. F., Tsai, L. H., Hsu, K. M., Liao, C. S., & Chang, H. L.** 2006. A simple and low-cost paper-bridged method for *Salmonella* phase reversal. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 54(4): 315-317.

**Da Re, S., Garnier, F., Guerin, E., Campoy, S., Denis, F., & Ploy, M. C.** 2009. The SOS response promotes *qnrB* quinolone-resistance determinant expression. *EMBO Reports*, 10(8): 929-933.

**Daniels, R., Vanderleyden, J., & Michiels, J.** 2004. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(3): 261-289.

**Datsenko, K. A., & Wanner, B. L.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12): 6640-6645.

**Davis, R. W., Botstein, D., & Roth, J. R.** 1980. *Advanced Bacterial Genetics. A Manual for Genetic Engineering.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**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., & Fang, F. C.** 1997. Periplasmic superoxide dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(25): 13997-14001.

**Deziel, E., Lepine, F., Milot, S., & Villemur, R.** 2003. *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology*, 149(Pt 8): 2005-2013.

**Dione, M. M., Ikumapayi, U. N., Saha, D., Mohammed, N. I., Geerts, S., Ieven, M., Adegbola, R. A., & Antonio, M.** 2011. Clonal differences between Non-Typhoidal *Salmonella* (NTS) recovered from children and animals living in close contact in the Gambia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(5): e1148.

**Dower, W. J., Miller, J. F., & Ragsdale, C. W.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, 16(13): 6127-6145.

**Eberl, L., Winson, M. K., Sternberg, C., Stewart, G. S., Christiansen, G., Chhabra, S. R., Bycroft, B., Williams, P., Molin, S., & Givskov, M.** 1996. Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Molecular Microbiology*, 20(1): 127-136.

**Eberl, L., Molin, S., & Givskov, M.** 1999. Surface motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *Journal of Bacteriology*, 181(6): 1703-1712.

**Edwards, R. A., Olsen, G. J., & Maloy, S. R.** 2002. Comparative genomics of closely related salmonellae. *Trends in Microbiology*, 10(2): 94-99.

**EFSA (European Food Safety Authority).** 2004. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the requests from the Commission related to the use of vaccines for the control of *Salmonella* in poultry. *EFSA Journal*, 114: 1-174.

- EFSA (European Food Safety Authority).** 2011. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. *EFSA Journal*, 9(3).
- Ellermeier, C. D., & Slauch, J. M.** 2006. The Genus *Salmonella*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes*, Vol. 6: 123-158. New York: Springer.
- Endres, R. G., Oleksiuk, O., Hansen, C. H., Meir, Y., Sourjik, V., & Wingreen, N. S.** 2008. Variable sizes of *Escherichia coli* chemoreceptor signaling teams. *Molecular Systems Biology*, 4: 211.
- Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M., & Hinton, J. C.** 2003. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Molecular Microbiology*, 47(1): 103-118.
- Erill, I., Escribano, M., Campoy, S., & Barbé, J.** 2003. In silico analysis reveals substantial variability in the gene contents of the gamma proteobacteria LexA-regulon. *Bioinformatics*, 19(17): 2225-2236.
- Erill, I., Campoy, S., & Barbé, J.** 2007. Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(6): 637-656.
- Fang, F. C., Libby, S. J., Buchmeier, N. A., Loewen, P. C., Switala, J., Harwood, J., & Guiney, D. G.** 1992. The alternative sigma factor KatF (RpoS) regulates *Salmonella* virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(24): 11978-11982.
- Fernández De Henestrosa, A. R., Ogi, T., Aoyagi, S., Chafin, D., Hayes, J. J., Ohmori, H., & Woodgate, R.** 2000. Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 35(6): 1560-1572.
- Figuroa-Bossi, N., & Bossi, L.** 1999. Inducible prophages contribute to *Salmonella* virulence in mice. *Molecular Microbiology*, 33(1): 167-176.
- Finlay, B. B., Ruschkowski, S., & Dedhar, S.** 1991. Cytoskeletal rearrangements accompanying *Salmonella* entry into epithelial cells. *Journal of Cell Science*, 99 ( Pt 2): 283-296.
- Fogh, R. H., Oettleben, G., Ruterjans, H., Schnarr, M., Boelens, R., & Kaptein, R.** 1994. Solution structure of the LexA repressor DNA binding domain determined by 1H NMR spectroscopy. *The EMBO Journal*, 13(17): 3936-3944.
- Foster, J. W.** 1995. Low pH adaptation and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Critical Reviews in Microbiology*, 21(4): 215-237.
- Friedberg, E., Walker, G. C., & Siede, W.** 1995. SOS Responses and DNA Damage Tolerance in Prokaryotes. In E. Friedberg, G. C. Walker, & W. Siede (Eds.), *DNA Repair and Mutagenesis*: 407-464. Washington D. C.: American Society for Microbiology Press.

**Furness, R. B., Fraser, G. M., Hay, N. A., & Hughes, C.** 1997. Negative feedback from a *Proteus* class II flagellum export defect to the *flhDC* master operon controlling cell division and flagellum assembly. *Journal of Bacteriology*, 179(17): 5585-5588.

**Gahring, L. C., Heffron, F., Finlay, B. B., & Falkow, S.** 1990. Invasion and replication of *Salmonella typhimurium* in animal cells. *Infection and Immunity*, 58(2): 443-448.

**Galán, J., & Sansonetti, P. J.** 1996. Molecular and Cellular Bases of *Salmonella* and *Shigella* Interactions In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, & H. E. Umbarger (Eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed., Vol. 2: 2757-2773. Washington D. C.: American Society for Microbiology Press.

**Garriga, X., Calero, S., & Barbé, J.** 1992. Nucleotide sequence analysis and comparison of the *lexA* genes from *Salmonella typhimurium*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *Molecular & General Genetics*, 236(1): 125-134.

**Garvis, S. G., Beuzón, C. R., & Holden, D. W.** 2001. A role for the PhoP/Q regulon in inhibition of fusion between lysosomes and *Salmonella*-containing vacuoles in macrophages. *Cellular Microbiology*, 3(11): 731-744.

**Gegner, J. A., Graham, D. R., Roth, A. F., & Dahlquist, F. W.** 1992. Assembly of an MCP receptor, CheW, and kinase CheA complex in the bacterial chemotaxis signal transduction pathway. *Cell*, 70(6): 975-982.

**Gewirtz, A. T., Navas, T. A., Lyons, S., Godowski, P. J., & Madara, J. L.** 2001a. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *Journal of Immunology*, 167(4): 1882-1885.

**Gewirtz, A. T., Simon, P. O., Jr., Schmitt, C. K., Taylor, L. J., Hagedorn, C. H., O'Brien, A. D., Neish, A. S., & Madara, J. L.** 2001b. *Salmonella typhimurium* translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response. *The Journal of Clinical Investigation*, 107(1): 99-109.

**Giese, K. C., Michalowski, C. B., & Little, J. W.** 2008. RecA-dependent cleavage of LexA dimers. *Journal of Molecular Biology*, 377(1): 148-161.

**Gómez-Gómez, J. M., Manfredi, C., Alonso, J. C., & Blázquez, J.** 2007. A novel role for RecA under non-stress: promotion of swarming motility in *Escherichia coli* K-12. *BMC Biology*, 5: 14.

**Goodman, M. F.** 2002. Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry*, 71: 17-50.

**Greig, J. D., & Ravel, A.** 2009. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. *International Journal of Food Microbiology*, 130(2): 77-87.

- Grimont, P. A. D., & Weill, F. X.** 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/salmoms-index.html>
- Guerin, E., Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Erill, I., Da Re, S., Gonzalez-Zorn, B., Barbé, J., Ploy, M. C., & Mazel, D.** 2009. The SOS response controls integron recombination. *Science*, 324(5930): 1034.
- Guibourdenche, M., Roggentin, P., Mikoleit, M., Fields, P. I., Bockemuhl, J., Grimont, P. A., & Weill, F. X.** 2010. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology*, 161(1): 26-29.
- Guo, L., Lim, K. B., Poduje, C. M., Daniel, M., Gunn, J. S., Hackett, M., & Miller, S. I.** 1998. Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell*, 95(2): 189-198.
- Hall, H. K., & 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. *Journal of Bacteriology*, 178(19): 5683-5691.
- Hardt, W. D., Chen, L. M., Schuebel, K. E., Bustelo, X. R., & Galán, J. E.** 1998. *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell*, 93(5): 815-826.
- Harshey, R. M., & Matsuyama, T.** 1994. Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(18): 8631-8635.
- Harshey, R. M.** 2003. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual Review of Microbiology*, 57: 249-273.
- Heithoff, D. M., Conner, C. P., Hanna, P. C., Julio, S. M., Hentschel, U., & Mahan, M. J.** 1997. Bacterial infection as assessed by *in vivo* gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(3): 934-939.
- Helms, M., Simonsen, J., & Molbak, K.** 2006. Foodborne bacterial infection and hospitalization: a registry-based study. *Clinical Infectious Diseases*, 42(4): 498-506.
- Henrichsen, J.** 1972. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriological Reviews*, 36(4): 478-503.
- Hess, J. F., Oosawa, K., Kaplan, N., & Simon, M. I.** 1988. Phosphorylation of three proteins in the signaling pathway of bacterial chemotaxis. *Cell*, 53(1): 79-87.
- Hobbie, S., Chen, L. M., Davis, R. J., & Galán, J. E.** 1997. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells. *Journal of Immunology*, 159(11): 5550-5559.

**Hopkins, S. A., Niedergang, F., Cortesy-Theulaz, I. E., & Kraehenbuhl, J. P.** 2000. A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain is taken up and survives within murine Peyer's patch dendritic cells. *Cellular Microbiology*, 2(1): 59-68.

**Horii, T., Ogawa, T., Nakatani, T., Hase, T., Matsubara, H., & Ogawa, H.** 1981. Regulation of SOS functions: purification of *E. coli* LexA protein and determination of its specific site cleaved by the RecA protein. *Cell*, 27(3 Pt 2): 515-522.

**Huisman, O., & D'Ari, R.** 1981. An inducible DNA replication-cell division coupling mechanism in *E. coli*. *Nature*, 290(5809): 797-799.

**ICSP (International Committee on Systematics of Prokaryotes).** 2005. The type species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 is *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987, with the type strain LT2<sup>T</sup>, and conservation of the epithet *enterica* in *Salmonella enterica* over all earlier epithets that may be applied to this species. Opinion 80. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(Pt 1): 519-520.

**Imlay, J. A., & Linn, S.** 1987. Mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *Journal of Bacteriology*, 169(7): 2967-2976.

**Ingham, C. J., & Ben Jacob, E.** 2008. Swarming and complex pattern formation in *Paenibacillus vortex* studied by imaging and tracking cells. *BMC Microbiology*, 8: 36.

**Inoue, T., Shingaki, R., & Fukui, K.** 2008. Inhibition of swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* by branched-chain fatty acids. *FEMS Microbiology Letters*, 281(1): 81-86.

**Janion, C.** 2001. Some aspects of the SOS response system-a critical survey. *Acta Biochimica Polonica*, 48(3): 599-610.

**Jantsch, J., Cheminay, C., Chakravorty, D., Lindig, T., Hein, J., & Hensel, M.** 2003. Intracellular activities of *Salmonella enterica* in murine dendritic cells. *Cellular Microbiology*, 5(12): 933-945.

**Jarosz, D. F., Beuning, P. J., Cohen, S. E., & Walker, G. C.** 2007. Y-family DNA polymerases in *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology*, 15(2): 70-77.

**Jeong, K. C., Hung, K. F., Baumler, D. J., Byrd, J. J., & Kaspar, C. W.** 2008. Acid stress damage of DNA is prevented by Dps binding in *Escherichia coli* O157:H7. *BMC Microbiology*, 8: 181.

**Jiang, Q., Karata, K., Woodgate, R., Cox, M. M., & Goodman, M. F.** 2009. The active form of DNA polymerase V is UmuD'<sub>2</sub>C-RecA-ATP. *Nature*, 460(7253): 359-363.

**Jones, B. D., Lee, C. A., & Falkow, S.** 1992. Invasion by *Salmonella typhimurium* is affected by the direction of flagellar rotation. *Infection and Immunity*, 60(6): 2475-2480.

- Jones, B. D., Ghori, N., & Falkow, S.** 1994. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *The Journal of Experimental Medicine*, 180(1): 15-23.
- Jones, B. V., Young, R., Mahenthalingam, E., & Stickler, D. J.** 2004. Ultrastructure of *Proteus mirabilis* swarmer cell rafts and role of swarming in catheter-associated urinary tract infection. *Infection and Immunity*, 72(7): 3941-3950.
- Jones, G. W., Richardson, L. A., & Uhlman, D.** 1981. The invasion of HeLa cells by *Salmonella typhimurium*: reversible and irreversible bacterial attachment and the role of bacterial motility. *Journal of General Microbiology*, 127(2): 351-360.
- Karasova, D., Sebkova, A., Vrbas, V., Havlickova, H., Sisak, F., & Rychlik, I.** 2009. Comparative analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis mutants with a vaccine potential. *Vaccine*, 27(38): 5265-5270.
- Karlin, S., & Brocchieri, L.** 1996. Evolutionary conservation of RecA genes in relation to protein structure and function. *Journal of Bacteriology*, 178(7): 1881-1894.
- Katribe, E., Bogomolnaya, L. M., Wingert, H., & Andrews-Polymenis, H.** 2009. Subspecies IIIa and IIIb *Salmonellae* are defective for colonization of murine models of salmonellosis compared to *Salmonella enterica* subsp. I serovar typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 191(8): 2843-2850.
- Kearns, D. B., & Losick, R.** 2003. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 49(3): 581-590.
- Kearns, D. B.** 2010. A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(9): 634-644.
- Kenyon, C. J., & Walker, G. C.** 1980. DNA-damaging agents stimulate gene expression at specific loci in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(5): 2819-2823.
- Kim, B., & Little, J. W.** 1992. Dimerization of a specific DNA-binding protein on the DNA. *Science*, 255(5041): 203-206.
- Kim, K. K., Yokota, H., & Kim, S. H.** 1999. Four-helical-bundle structure of the cytoplasmic domain of a serine chemotaxis receptor. *Nature*, 400(6746): 787-792.
- Kim, S. H., & Wei, C. I.** 2007. Invasiveness and intracellular growth of multidrug-resistant *Salmonella* and other pathogens in Caco-2 cells. *Journal of Food Science*, 72(2): M72-78.
- Kim, W., Killam, T., Sood, V., & Surette, M. G.** 2003. Swarm-cell differentiation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium results in elevated resistance to multiple antibiotics. *Journal of Bacteriology*, 185(10): 3111-3117.

**Kim, W., & Surette, M. G.** 2003. Swarming populations of *Salmonella* represent a unique physiological state coupled to multiple mechanisms of antibiotic resistance. *Biological Procedures Online*, 5: 189-196.

**Kim, W., & Surette, M. G.** 2005. Prevalence of surface swarming behavior in *Salmonella*. *Journal of Bacteriology*, 187(18): 6580-6583.

**Kim, W., & Surette, M. G.** 2006. Coordinated regulation of two independent cell-cell signaling systems and swarmer differentiation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 188(2): 431-440.

**Koch, W. H., & Woodgate, R.** 1998. The SOS Response. In J. A. Nickoloff, & M. F. Hoekstra (Eds.), *DNA Damage and Repair: DNA Repair in Prokaryotes and Lower Eukaryotes Vol. 1*: 107-134. Totowa, New Jersey: Humana Press.

**Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A., & Collins, J. J.** 2007. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, 130(5): 797-810.

**Köhler, T., Curty, L. K., Barja, F., van Delden, C., & Pechère, J. C.** 2000. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *Journal of Bacteriology*, 182(21): 5990-5996.

**Kumar, K. K., Srivastava, R., Sinha, V. B., Michalski, J., Kaper, J. B., & Srivastava, B. S.** 1994. *recA* mutations reduce adherence and colonization by classical and El Tor strains of *Vibrio cholerae*. *Microbiology*, 140 ( Pt 5): 1217-1222.

**Kuzminov, A.** 1999. Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4): 751-813.

**Lacroix, F. J., Cloeckert, A., Grepinet, O., Pinault, C., Popoff, M. Y., Waxin, H., & Pardon, P.** 1996. *Salmonella typhimurium* *acrB*-like gene: identification and role in resistance to biliary salts and detergents and in murine infection. *FEMS Microbiology Letters*, 135(2-3): 161-167.

**Lai, H. C., Soo, P. C., Wei, J. R., Yi, W. C., Liaw, S. J., Horng, Y. T., Lin, S. M., Ho, S. W., Swift, S., & Williams, P.** 2005. The RssAB two-component signal transduction system in *Serratia marcescens* regulates swarming motility and cell envelope architecture in response to exogenous saturated fatty acids. *Journal of Bacteriology*, 187(10): 3407-3414.

**Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P., & Lazdunski, A.** 1996. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Molecular Microbiology*, 21(6): 1137-1146.

**Lee, C. A., Silva, M., Siber, A. M., Kelly, A. J., Galyov, E., & McCormick, B. A.** 2000. A secreted *Salmonella* protein induces a proinflammatory response in epithelial cells, which promotes neutrophil migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(22): 12283-12288.

- Lennox, E. S.** 1955. Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology*, 1(2): 190-206.
- Levit, M. N., Liu, Y., & Stock, J. B.** 1999. Mechanism of CheA protein kinase activation in receptor signaling complexes. *Biochemistry*, 38(20): 6651-6658.
- Li, M., & Hazelbauer, G. L.** 2004. Cellular stoichiometry of the components of the chemotaxis signaling complex. *Journal of Bacteriology*, 186(12): 3687-3694.
- Liaw, S. J., Lai, H. C., & Wang, W. B.** 2004. Modulation of swarming and virulence by fatty acids through the RsbA protein in *Proteus mirabilis*. *Infection and Immunity*, 72(12): 6836-6845.
- Libby, S. J., Lesnick, M., Hasegawa, P., Weidenhammer, E., & Guiney, D. G.** 2000. The *Salmonella* virulence plasmid *spv* genes are required for cytopathology in human monocyte-derived macrophages. *Cellular Microbiology*, 2(1): 49-58.
- Libby, S. J., Halsey, T. A., Altier, C., Potter, J., & Gyles, C. L.** 2004. *Salmonella*. In C.L. Gyles, J.F. Prescott, J.G. Songer, & C.O Thoen. (Eds.), *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*, 3rd ed.: 143-168. Ames, Iowa, USA.: Blackwell Publishing.
- Lindum, P. W., Anthoni, U., Christophersen, C., Eberl, L., Molin, S., & Givskov, M.** 1998. N-Acyl-L-homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular lipopeptide biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *Journal of Bacteriology*, 180(23): 6384-6388.
- Little, J. W., & Mount, D. W.** 1982. The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell*, 29(1): 11-22.
- Little, J. W.** 1984. Autodigestion of *lexA* and phage lambda repressors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(5): 1375-1379.
- Little, J. W.** 1991. Mechanism of specific LexA cleavage: autodigestion and the role of RecA coprotease. *Biochimie*, 73(4): 411-421.
- Liu, S. L., Ezaki, T., Miura, H., Matsui, K., & Yabuuchi, E.** 1988. Intact motility as a *Salmonella typhi* invasion-related factor. *Infection and Immunity*, 56(8): 1967-1973.
- Lominski, I., & Lendrum, A. C.** 1947. The mechanism of swarming of *Proteus*. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 59(4): 688-691.
- Luo, Y., Pfuetzner, R. A., Mosimann, S., Paetzel, M., Frey, E. A., Cherney, M., Kim, B., Little, J. W., & Strynadka, N. C.** 2001. Crystal structure of LexA: a conformational switch for regulation of self-cleavage. *Cell*, 106(5): 585-594.
- Lupas, A., & Stock, J.** 1989. Phosphorylation of an N-terminal regulatory domain activates the CheB methyltransferase in bacterial chemotaxis. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(29): 17337-17342.

**Lusetti, S. L., & Cox, M. M.** 2002. The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks. *Annual Review of Biochemistry*, 71: 71-100.

**Lybarger, S. R., & Maddock, J. R.** 2000. Differences in the polar clustering of the high- and low-abundance chemoreceptors of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(14): 8057-8062.

**Maddock, J. R., & Shapiro, L.** 1993. Polar location of the chemoreceptor complex in the *Escherichia coli* cell. *Science*, 259(5102): 1717-1723.

**Maiqués, E., Úbeda, C., Campoy, S., Salvador, N., Lasa, I., Novick, R. P., Barbé, J., & Penadés, J. R.** 2006.  $\beta$ -lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 188(7): 2726-2729.

**Mariconda, S., Wang, Q., & Harshey, R. M.** 2006. A mechanical role for the chemotaxis system in swarming motility. *Molecular Microbiology*, 60(6): 1590-1602.

**MARM (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino).** 2011a. Programa Nacional para la vigilancia y control de determinados serotipos de *Salmonella* en gallinas ponedoras de la especie *Gallus gallus*. <http://rasve.mapa.es/>, ES PNSGP 2011: 1-50.

**MARM (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino).** 2011b. Programa Nacional para la vigilancia y control de determinados serotipos de *Salmonella* en manadas de gallinas reproductoras de la especie *Gallus gallus*. <http://rasve.mapa.es/>, PNSR2011: 1-44.

**MARM (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino).** 2011c. Programa Nacional para la vigilancia y control de determinados serotipos de *Salmonella* en pavos. <http://rasve.mapa.es/>, PNCSB2011: 1-45.

**MARM (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino).** 2011d. Programa Nacional para la vigilancia y control de determinados serotipos de *Salmonella* en pollos de carne de la especie *Gallus gallus*. <http://rasve.mapa.es/>, ES PNSGP 2011 1-45.

**Mastroeni, P., Grant, A., Restif, O., & Maskell, D.** 2009. A dynamic view of the spread and intracellular distribution of *Salmonella enterica*. *Nature Reviews. Microbiology*, 7(1): 73-80.

**Matsuyama, T., Kaneda, K., Nakagawa, Y., Isa, K., Hara-Hotta, H., & Yano, I.** 1992. A novel extracellular cyclic lipopeptide which promotes flagellum-dependent and -independent spreading growth of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 174(6): 1769-1776.

**Matsuyama, T., Takagi, Y., Nakagawa, Y., Itoh, H., Wakita, J., & Matsushita, M.** 2000. Dynamic aspects of the structured cell population in a swarming colony of *Proteus mirabilis*. *Journal of Bacteriology*, 182(2): 385-393.

**Mattick, J. S.** 2002. Type IV pili and twitching motility. *Annual Review of Microbiology*, 56: 289-314.

- McCarter, L., Hilmen, M., & Silverman, M.** 1988. Flagellar dynamometer controls swarmer cell differentiation of *V. parahaemolyticus*. *Cell*, 54(3): 345-351.
- McCormick, B. A., Colgan, S. P., Delp-Archer, C., Miller, S. I., & Madara, J. L.** 1993. *Salmonella typhimurium* attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils. *The Journal of Cellular Biology*, 123(4): 895-907.
- McCormick, B. A., Miller, S. I., Carnes, D., & Madara, J. L.** 1995. Transepithelial signaling to neutrophils by Salmonellae: a novel virulence mechanism for gastroenteritis. *Infection and Immunity*, 63(6): 2302-2309.
- McCormick, B. A., Parkos, C. A., Colgan, S. P., Carnes, D. K., & Madara, J. L.** 1998. Apical secretion of a pathogen-elicited epithelial chemoattractant activity in response to surface colonization of intestinal epithelia by *Salmonella typhimurium*. *Journal of Immunology*, 160(1): 455-466.
- McLaughlin, L. M., Govoni, G. R., Gerke, C., Gopinath, S., Peng, K., Laidlaw, G., Chien, Y. H., Jeong, H. W., Li, Z., Brown, M. D., Sacks, D. B., & Monack, D.** 2009. The *Salmonella* SPI2 effector Ssel mediates long-term systemic infection by modulating host cell migration. *PLoS Pathogens*, 5(11): e1000671.
- Mei, J. M., Nourbakhsh, F., Ford, C. W., & Holden, D. W.** 1997. Identification of *Staphylococcus aureus* virulence genes in a murine model of bacteraemia using signature-tagged mutagenesis. *Molecular Microbiology*, 26(2): 399-407.
- Merighi, M., Ellermeier, C. D., Slauch, J. M., & Gunn, J. S.** 2005. Resolvase-in vivo expression technology analysis of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium PhoP and PmrA regulons in BALB/c mice. *Journal of Bacteriology*, 187(21): 7407-7416.
- Merz, A. J., So, M., & Sheetz, M. P.** 2000. Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature*, 407(6800): 98-102.
- Mignot, T.** 2007. The elusive engine in *Myxococcus xanthus* gliding motility. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(21): 2733-2745.
- Milburn, M. V., Prive, G. G., Milligan, D. L., Scott, W. G., Yeh, J., Jancarik, J., Koshland, D. E., Jr., & Kim, S. H.** 1991. Three-dimensional structures of the ligand-binding domain of the bacterial aspartate receptor with and without a ligand. *Science*, 254(5036): 1342-1347.
- Miller, C., Thomsen, L. E., Gaggero, C., Mosseri, R., Ingmer, H., & Cohen, S. N.** 2004. SOS response induction by  $\beta$ -lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science*, 305(5690): 1629-1631.
- Miller, J. H.** 1992. *A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Miller, S. I., Kukral, A. M., & Mekalanos, J. J.** 1989. A two-component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 86(13): 5054-5058.

**Mody, R. K., Greene, S. A., Gaul, L., Sever, A., Pichette, S., Zambrana, I., Dang, T., Gass, A., Wood, R., Herman, K., Cantwell, L. B., Falkenhorst, G., Wannemuehler, K., Hoekstra, R. M., McCullum, I., Cone, A., Franklin, L., Austin, J., Delea, K., Behraves, C. B., Sodha, S. V., Yee, J. C., Emanuel, B., Al-Khalidi, S. F., Jefferson, V., Williams, I. T., Griffin, P. M., & Swerdlow, D. L.** 2011. National outbreak of *Salmonella* serotype saintpaul infections: importance of Texas restaurant investigations in implicating jalapeno peppers. PLoS One, 6(2): e16579.

**Mohana-Borges, R., Pacheco, A. B., Sousa, F. J., Foguel, D., Almeida, D. F., & Silva, J. L.** 2000. LexA repressor forms stable dimers in solution. The role of specific DNA in tightening protein-protein interactions. The Journal of Biological Chemistry, 275(7): 4708-4712.

**Monack, D. M., Detweiler, C. S., & Falkow, S.** 2001. *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent macrophage death is mediated in part by the host cysteine protease caspase-1. Cellular Microbiology, 3(12): 825-837.

**Moolenaar, G. F., Monaco, V., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., Visse, R., & Goosen, N.** 2000. The effect of the DNA flanking the lesion on formation of the UvrB-DNA preincision complex. Mechanism for the UvrA-mediated loading of UvrB onto a DNA damaged site. The Journal of Biological Chemistry, 275(11): 8038-8043.

**Moolenaar, G. F., Hoglund, L., & Goosen, N.** 2001. Clue to damage recognition by UvrB: residues in the  $\beta$ -hairpin structure prevent binding to non-damaged DNA. The EMBO Journal, 20(21): 6140-6149.

**Müller, H. E., & Lenz, W.** 1975. Swarming phenomenon of an *Aeromonas* spec (author's translation). Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische, Mikrobiologie und Parasitologie, 231(4): 451-465.

**Murray, R. G., & Elder, R. H.** 1949. The predominance of counterclockwise rotation during swarming of *Bacillus* species. Journal of Bacteriology, 58(3): 351-359.

**Mustard, J. A., Thliveris, A. T., & Mount, D. W.** 1992. Sequence of the *Salmonella typhimurium* LT2 *lexA* gene and its regulatory region. Nucleic Acids Research, 20(7): 1813.

**Mustard, J. A., & Little, J. W.** 2000. Analysis of *Escherichia coli* RecA interactions with LexA, lambda CI, and UmuD by site-directed mutagenesis of *recA*. Journal of Bacteriology, 182(6): 1659-1670.

**Napolitano, R., Janel-Bintz, R., Wagner, J., & Fuchs, R. P.** 2000. All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis. The EMBO Journal, 19(22): 6259-6265.

- Neher, S. B., Flynn, J. M., Sauer, R. T., & Baker, T. A.** 2003. Latent ClpX-recognition signals ensure LexA destruction after DNA damage. *Genes & Development*, 17(9): 1084-1089.
- Ninfa, E. G., Stock, A., Mowbray, S., & Stock, J.** 1991. Reconstitution of the bacterial chemotaxis signal transduction system from purified components. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(15): 9764-9770.
- O'Rear, J., Alberti, L., & Harshey, R. M.** 1992. Mutations that impair swarming motility in *Serratia marcescens* 274 include but are not limited to those affecting chemotaxis or flagellar function. *Journal of Bacteriology*, 174(19): 6125-6137.
- O'Reilly, E. K., & Kreuzer, K. N.** 2004. Isolation of SOS constitutive mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 186(21): 7149-7160.
- Ochsner, U. A., & Reiser, J.** 1995. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(14): 6424-6428.
- Oertel-Buchheit, P., Schmidt-Dorr, T., Granger-Schnarr, M., & Schnarr, M.** 1993. Spacing requirements between LexA operator half-sites can be relaxed by fusing the LexA DNA binding domain with some alternative dimerization domains. *Journal of Molecular Biology*, 229(1): 1-7.
- Olsen, S. J., Bishop, R., Brenner, F. W., Roels, T. H., Bean, N., Tauxe, R. V., & Slutsker, L.** 2001. The changing epidemiology of *Salmonella*: trends in serotypes isolated from humans in the United States, 1987-1997. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(5): 753-761.
- Orrego, C., & Eisenstadt, E.** 1987. An inducible pathway is required for mutagenesis in *Salmonella typhimurium* LT2. *Journal of Bacteriology*, 169(6): 2885-2888.
- Orren, D. K., & Sancar, A.** 1989. The (A)BC excinuclease of *Escherichia coli* has only the UvrB and UvrC subunits in the incision complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(14): 5237-5241.
- Orren, D. K., Selby, C. P., Hearst, J. E., & Sancar, A.** 1992. Post-incision steps of nucleotide excision repair in *Escherichia coli*. Disassembly of the UvrBC-DNA complex by helicase II and DNA polymerase I. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(2): 780-788.
- Overhage, J., Bains, M., Brazas, M. D., & Hancock, R. E.** 2008. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*, 190(8): 2671-2679.
- Parkinson, J. S., Parker, S. R., Talbert, P. B., & Houts, S. E.** 1983. Interactions between chemotaxis genes and flagellar genes in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 155(1): 265-274.
- Parry, C. M.** 2006. Epidemiological and clinical aspects of human typhoid fever. In P. Mastroeni, & D. Maskell (Eds.), *Salmonella* Infections. Clinical, Immunological and Molecular Aspects: 1-24. Cambridge: Cambridge University Press.

**Pearson, J. P., Pesci, E. C., & Iglewski, B. H.** 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *Journal of Bacteriology*, 179(18): 5756-5767.

**Piddock, L. J., Walters, R. N., & Diver, J. M.** 1990. Correlation of quinolone MIC and inhibition of DNA, RNA, and protein synthesis and induction of the SOS response in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(12): 2331-2336.

**Poirier, K., Faucher, S. P., Beland, M., Brousseau, R., Gannon, V., Martin, C., Harel, J., & Daigle, F.** 2008. *Escherichia coli* O157:H7 survives within human macrophages: global gene expression profile and involvement of the Shiga toxins. *Infection and Immunity*, 76(11): 4814-4822.

**Prieto, A. I., Ramos-Morales, F., & Casadesús, J.** 2004. Bile-induced DNA damage in *Salmonella enterica*. *Genetics*, 168(4): 1787-1794.

**Prieto, A. I., Ramos-Morales, F., & Casadesús, J.** 2006. Repair of DNA damage induced by bile salts in *Salmonella enterica*. *Genetics*, 174(2): 575-584.

**Prouty, A. M., & Gunn, J. S.** 2000. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion is repressed in the presence of bile. *Infection and Immunity*, 68(12): 6763-6769.

**Prouty, A. M., Brodsky, I. E., Manos, J., Belas, R., Falkow, S., & Gunn, J. S.** 2004. Transcriptional regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genes by bile. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 41(2): 177-185.

**Prüß, B. M., & Matsumura, P.** 1996. A regulator of the flagellar regulon of *Escherichia coli*, *flhD*, also affects cell division. *Journal of Bacteriology*, 178(3): 668-674.

**Quinones, M., Kimsey, H. H., & Waldor, M. K.** 2005. LexA cleavage is required for CTX prophage induction. *Molecular Cell*, 17(2): 291-300.

**Rahim, R., Ochsner, U. A., Olvera, C., Graninger, M., Messner, P., Lam, J. S., & Soberón-Chávez, G.** 2001. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa rhIC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Molecular Microbiology*, 40(3): 708-718.

**Rather, P. N.** 2005. Swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. *Environmental Microbiology*, 7(8): 1065-1073.

**Rauprich, O., Matsushita, M., Weijer, C. J., Siegert, F., Esipov, S. E., & Shapiro, J. A.** 1996. Periodic phenomena in *Proteus mirabilis* swarm colony development. *Journal of Bacteriology*, 178(22): 6525-6538.

**Reeves, M. W., Evins, G. M., Heiba, A. A., Plikaytis, B. D., & Farmer, J. J., 3rd.** 1989. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other Salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(2): 313-320.

- Rehrauer, W. M., & Kowalczykowski, S. C.** 1996. The DNA binding site(s) of the *Escherichia coli* RecA protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(20): 11996-12002.
- Renzette, N., Gumlaw, N., & Sandler, S. J.** 2007. DinI and RecX modulate RecA-DNA structures in *Escherichia coli* K-12. *Molecular Microbiology*, 63(1): 103-115.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J. P., & Ricciardi-Castagnoli, P.** 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunology*, 2(4): 361-367.
- Richter-Dahlfors, A., Buchan, A. M., & Finlay, B. B.** 1997. Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella typhimurium* resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 186(4): 569-580.
- Sanders, D. A., Mendez, B., & Koshland, D. E., Jr.** 1989. Role of the CheW protein in bacterial chemotaxis: overexpression is equivalent to absence. *Journal of Bacteriology*, 171(11): 6271-6278.
- Sar, N., McCarter, L., Simon, M., & Silverman, M.** 1990. Chemotactic control of the two flagellar systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*, 172(1): 334-341.
- Sassanfar, M., & Roberts, J. W.** 1990. Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*. The involvement of DNA replication. *Journal of Molecular Biology*, 212(1): 79-96.
- Sauer, R. T., Ross, M. J., & Ptashne, M.** 1982. Cleavage of the  $\lambda$  and P22 repressors by RecA protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(8): 4458-4462.
- Schechter, L. M., Damrauer, S. M., & Lee, C. A.** 1999. Two AraC/XyIS family members can independently counteract the effect of repressing sequences upstream of the *hila* promoter. *Molecular Microbiology*, 32(3): 629-642.
- Schlacher, K., Pham, P., Cox, M. M., & Goodman, M. F.** 2006. Roles of DNA polymerase V and RecA protein in SOS damage-induced mutation. *Chemical Reviews*, 106(2): 406-419.
- Schnarr, M., Granger-Schnarr, M., Hurstel, S., & Pouyet, J.** 1988. The carboxy-terminal domain of the LexA repressor oligomerises essentially as the entire protein. *FEBS Letters*, 234(1): 56-60.
- Sedgwick, S. G., & Goodwin, P. A.** 1985. Interspecies regulation of the SOS response by the *E. coli* *lexA*<sup>+</sup> gene. *Mutation Research*, 145(3): 103-106.
- Senesi, S., Celandroni, F., Salvetti, S., Beecher, D. J., Wong, A. C., & Ghelardi, E.** 2002. Swarming motility in *Bacillus cereus* and characterization of a *fliY* mutant impaired in swarm cell differentiation. *Microbiology*, 148(Pt 6): 1785-1794.

**Shea, J. E., Hensel, M., Gleeson, C., & Holden, D. W.** 1996. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93(6): 2593-2597.

**Shearwin, K. E., Brumby, A. M., & Egan, J. B.** 1998. The Tum protein of coliphage 186 is an antirepressor. The Journal of Biological Chemistry, 273(10): 5708-5715.

**Shelobolina, E. S., Sullivan, S. A., O'Neill, K. R., Nevin, K. P., & Lovley, D. R.** 2004. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. Applied and Environmental Microbiology, 70(5): 2959-2965.

**Sheppard, M., Webb, C., Heath, F., Mallows, V., Emilianus, R., Maskell, D., & Mastroeni, P.** 2003. Dynamics of bacterial growth and distribution within the liver during *Salmonella* infection. Cellular Microbiology, 5(9): 593-600.

**Shinoda, S., & Okamoto, K.** 1977. Formation and function of *Vibrio parahaemolyticus* lateral flagella. Journal of Bacteriology, 129(3): 1266-1271.

**Skerker, J. M., & Berg, H. C.** 2001. Direct observation of extension and retraction of type IV pili. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98(12): 6901-6904.

**Slilaty, S. N., & Little, J. W.** 1987. Lysine-156 and serine-119 are required for LexA repressor cleavage: a possible mechanism. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 84(12): 3987-3991.

**Smith, C. M., Arany, Z., Orrego, C., & Eisenstadt, E.** 1991a. DNA damage-inducible loci in *Salmonella typhimurium*. Journal of Bacteriology, 173(11): 3587-3590.

**Smith, K. C.** 2004. Recombinational DNA repair: the ignored repair systems. Bioessays, 26(12): 1322-1326.

**Smith, M. H., Cavenagh, M. M., & Little, J. W.** 1991b. Mutant LexA proteins with an increased rate of *in vivo* cleavage. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 88(16): 7356-7360.

**Sommer, S., Boudsocq, F., Devoret, R., & Bailone, A.** 1998. Specific RecA amino acid changes affect RecA-UmuD'C interaction. Molecular Microbiology, 28(2): 281-291.

**Sourjik, V.** 2004. Receptor clustering and signal processing in *E. coli* chemotaxis. Trends in Microbiology, 12(12): 569-576.

**Sourjik, V., & Berg, H. C.** 2004. Functional interactions between receptors in bacterial chemotaxis. Nature, 428(6981): 437-441.

- Sousa, F. J., Lima, L. M., Pacheco, A. B., Oliveira, C. L., Torriani, I., Almeida, D. F., Foguel, D., Silva, J. L., & Mohana-Borges, R.** 2006. Tetramerization of the LexA repressor in solution: implications for gene regulation of the *E. coli* SOS system at acidic pH. *Journal of Molecular Biology*, 359(4): 1059-1074.
- Sperandio, V., Torres, A. G., & Kaper, J. B.** 2002. Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. *Molecular Microbiology*, 43(3): 809-821.
- Sperandio, V., Torres, A. G., Jarvis, B., Nataro, J. P., & Kaper, J. B.** 2003. Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(15): 8951-8956.
- Springer, W. R., & Koshland, D. E., Jr.** 1977. Identification of a protein methyltransferase as the *cheR* gene product in the bacterial sensing system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(2): 533-537.
- Steele-Mortimer, O.** 2008. The *Salmonella*-containing vacuole: moving with the times. *Current Opinion in Microbiology*, 11(1): 38-45.
- Stock, J. B., & Koshland, D. E., Jr.** 1978. A protein methylesterase involved in bacterial sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(8): 3659-3663.
- Story, R. M., Weber, I. T., & Steitz, T. A.** 1992. The structure of the *E. coli* RecA protein monomer and polymer. *Nature*, 355(6358): 318-325.
- Stuart, C. A., Wheeler, K. M., McGann, V., & Howard, I.** 1946. Motility and swarming of some Enterobacteriaceae. *Journal of Bacteriology*, 52(5): 519-525.
- Studdert, C. A., & Parkinson, J. S.** 2004. Crosslinking snapshots of bacterial chemoreceptor squads. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7): 2117-2122.
- Su, L. H., & Chiu, C. H.** 2007. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Medical Journal*, 30(3): 210-219.
- Sun, H., Zusman, D. R., & Shi, W.** 2000. Type IV pilus of *Myxococcus xanthus* is a motility apparatus controlled by the *frz* chemosensory system. *Current Biology*, 10(18): 1143-1146.
- Taddei, F., Matic, I., & Radman, M.** 1995. cAMP-dependent SOS induction and mutagenesis in resting bacterial populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(25): 11736-11740.
- Takata, T., Fujimoto, S., & Amako, K.** 1992. Isolation of nonchemotactic mutants of *Campylobacter jejuni* and their colonization of the mouse intestinal tract. *Infection and Immunity*, 60(9): 3596-3600.

**Takeuchi, A.** 1967. Electron microscope studies of experimental *Salmonella* infection. I. Penetration into the intestinal epithelium by *Salmonella typhimurium*. *The American Journal of Pathology*, 50(1): 109-136.

**Tang, M., Shen, X., Frank, E. G., O'Donnell, M., Woodgate, R., & Goodman, M. F.** 1999. UmuD<sup>1</sup>2C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(16): 8919-8924.

**Tauxe, R. V.** 1997. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerging Infectious Diseases*, 3(4): 425-434.

**Teixidó, L., Carrasco, B., Alonso, J. C., Barbé, J., & Campoy, S.** 2011. Fur activates the expression of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 by directly interacting with the *hilD* operator *in vivo* and *in vitro*. *PLoS One*, 6(5): e19711.

**Thi, T. D., López, E., Rodríguez-Rojas, A., Rodríguez-Beltrán, J., Couce, A., Guelfo, J. R., Castaneda-García, A., & Blázquez, J.** 2011. Effect of *recA* inactivation on mutagenesis of *Escherichia coli* exposed to sublethal concentrations of antimicrobials. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(3): 531-538.

**Thliveris, A. T., & Mount, D. W.** 1992. Genetic identification of the DNA binding domain of *Escherichia coli* LexA protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(10): 4500-4504.

**Tiganitas, A., Zeaki, N., Gounadaki, A. S., Drosinos, E. H., & Skandamis, P. N.** 2009. Study of the effect of lethal and sublethal pH and  $a_w$  stresses on the inactivation or growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium. *International Journal of Food Microbiology*, 134(1-2): 104-112.

**Tindall, B. J., Grimont, P. A., Garrity, G. M., & Euzéby, J. P.** 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(Pt 1): 521-524.

**Toguchi, A., Siano, M., Burkart, M., & Harshey, R. M.** 2000. Genetics of swarming motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: critical role for lipopolysaccharide. *Journal of Bacteriology*, 182(22): 6308-6321.

**Trusca, D., Scott, S., Thompson, C., & Bramhill, D.** 1998. Bacterial SOS checkpoint protein SulA inhibits polymerization of purified FtsZ cell division protein. *Journal of Bacteriology*, 180(15): 3946-3953.

**Úbeda, C., Maiqués, E., Knecht, E., Lasa, I., Novick, R. P., & Penadés, J. R.** 2005. Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci. *Molecular Microbiology*, 56(3): 836-844.

**Uzzau, S., Brown, D. J., Wallis, T., Rubino, S., Leori, G., Bernard, S., Casadesús, J., Platt, D. J., & Olsen, J. E.** 2000. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiology and Infection*, 125(2): 229-255.

- van Asten, F. J., Hendriks, H. G., Koninkx, J. F., & van Dijk, J. E.** 2004. Flagella-mediated bacterial motility accelerates but is not required for *Salmonella* serotype Enteritidis invasion of differentiated Caco-2 cells. *International Journal of Medical Microbiology*, 294(6): 395-399.
- van der Veen, S., & Abee, T.** 2011. Contribution of *Listeria monocytogenes* RecA to acid and bile survival and invasion of human intestinal Caco-2 cells. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(4): 334-340.
- van Velkinburgh, J. C., & Gunn, J. S.** 1999. PhoP-PhoQ-regulated loci are required for enhanced bile resistance in *Salmonella* spp. *Infection and Immunity*, 67(4): 1614-1622.
- Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Bäumlner, A. J., Falkow, S., Valdivia, R., Brown, W., Le, M., Berggren, R., Parks, W. T., & Fang, F. C.** 1999. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature*, 401(6755): 804-808.
- Vazquez-Torres, A., Xu, Y., Jones-Carson, J., Holden, D. W., Lucia, S. M., Dinauer, M. C., Mastroeni, P., & Fang, F. C.** 2000. *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science*, 287(5458): 1655-1658.
- Verhoeven, E. E., van Kesteren, M., Moolenaar, G. F., Visse, R., & Goosen, N.** 2000. Catalytic sites for 3' and 5' incision of *Escherichia coli* nucleotide excision repair are both located in UvrC. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(7): 5120-5123.
- Verstraeten, N., Braeken, K., Debkumari, B., Fauvart, M., Fransaer, J., Vermant, J., & Michiels, J.** 2008. Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in Microbiology*, 16(10): 496-506.
- Voedisch, S., Koenecke, C., David, S., Herbrand, H., Forster, R., Rhen, M., & Pabst, O.** 2009. Mesenteric lymph nodes confine dendritic cell-mediated dissemination of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and limit systemic disease in mice. *Infection and Immunity*, 77(8): 3170-3180.
- Volkert, M. R., Gately, F. H., & Hajec, L. I.** 1989. Expression of DNA damage-inducible genes of *Escherichia coli* upon treatment with methylating, ethylating and propylating agents. *Mutation Research*, 217(2): 109-115.
- Walker, G. C.** 1984. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 48(1): 60-93.
- Walker, G. C.** 1995. SOS-regulated proteins in translesion DNA synthesis and mutagenesis. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(10): 416-420.
- Walker, G. C.** 1996. The SOS Response of *Escherichia coli*. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, & H. E. Umbarger (Eds.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, Vol. 1: 1400-1416. Washington D. C.: American Society for Microbiology Press.

**Wallis, T. S., Paulin, S. M., Plested, J. S., Watson, P. R., & Jones, P. W.** 1995. The *Salmonella dublin* virulence plasmid mediates systemic but not enteric phases of salmonellosis in cattle. *Infection and Immunity*, 63(7): 2755-2761.

**Wallis, T. S., & Galyov, E. E.** 2000. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Molecular Microbiology*, 36(5): 997-1005.

**Wang, Q., Frye, J. G., McClelland, M., & Harshey, R. M.** 2004. Gene expression patterns during swarming in *Salmonella typhimurium*: genes specific to surface growth and putative new motility and pathogenicity genes. *Molecular Microbiology*, 52(1): 169-187.

**Wang, Q., Suzuki, A., Mariconda, S., Porwollik, S., & Harshey, R. M.** 2005. Sensing wetness: a new role for the bacterial flagellum. *The EMBO Journal*, 24(11): 2034-2042.

**Weigle, J. J.** 1953. Induction of Mutations in a Bacterial Virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 39(7): 628-636.

**Wenner, J. J., & Rettger, L. F.** 1919. A Systematic Study of the *Proteus* Group of Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 4(4): 331-353.

**Willis, A. T., & Williams, K.** 1972. Prevention of swarming of *Clostridium septicum*. *Journal of Medical Microbiology*, 5(4): 493-496.

**Winfield, M. D., & Groisman, E. A.** 2003. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7): 3687-3694.

**Witkin, E. M.** 1967. The radiation sensitivity of *Escherichia coli* B: a hypothesis relating filament formation and prophage induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 57(5): 1275-1279.

**Witkin, E. M.** 1976. Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriological Reviews*, 40(4): 869-907.

**Woodward, D. L., Khakhria, R., & Johnson, W. M.** 1997. Human salmonellosis associated with exotic pets. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11): 2786-2790.

**Yeh, J. I., Biemann, H. P., Pandit, J., Koshland, D. E., & Kim, S. H.** 1993. The three-dimensional structure of the ligand-binding domain of a wild-type bacterial chemotaxis receptor. Structural comparison to the cross-linked mutant forms and conformational changes upon ligand binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(13): 9787-9792.

**Zhang, S., Adams, L. G., Nunes, J., Khare, S., Tsolis, R. M., & Bäumler, A. J.** 2003. Secreted effector proteins of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium elicit host-specific chemokine profiles in animal models of typhoid fever and enterocolitis. *Infection and Immunity*, 71(8): 4795-4803.

**Zhang, X., McDaniel, A. D., Wolf, L. E., Keusch, G. T., Waldor, M. K., & Acheson, D. W.** 2000. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(2): 664-670.

**Zhao, R., Collins, E. J., Bourret, R. B., & Silversmith, R. E.** 2002. Structure and catalytic mechanism of the *E. coli* chemotaxis phosphatase CheZ. *Nature Structural Biology*, 9(8): 570-575.

**Zhou, D., Mooseker, M. S., & Galán, J. E.** 1999. Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science*, 283(5410): 2092-2095.

**Zhou, D., Chen, L. M., Hernandez, L., Shears, S. B., & Galán, J. E.** 2001. A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. *Molecular Microbiology*, 39(2): 248-259.



# **Anexo A**

---



## Overexpression of the *recA* Gene Decreases Oral but Not Intraperitoneal Fitness of *Salmonella enterica*<sup>∇</sup>

Laura Medina-Ruiz,<sup>1</sup> Susana Campoy,<sup>1</sup> Cristina Latasa,<sup>2</sup> Paula Cardenas,<sup>3</sup>  
Juan Carlos Alonso,<sup>3</sup> and Jordi Barbé<sup>1\*</sup>

Departament de Genètica i Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain<sup>1</sup>;  
Instituto de Agrobiotecnología, Universidad Pública de Navarra-CSIC-Gobierno de Navarra, 31006 Pamplona, Spain<sup>2</sup>; and  
Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Darwin 3, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain<sup>3</sup>

Received 30 November 2009/Returned for modification 1 January 2010/Accepted 27 April 2010

**Transcription of the *Salmonella enterica recA* gene is negatively controlled by the LexA protein, the repressor of the SOS response. The introduction of a mutation (*recA*6869) in the LexA binding site, in the promoter region of the *S. enterica* ATCC 14028 *recA* gene, allowed the analysis of the effect that RecA protein overproduction has on the fitness of this virulent strain. The fitness of orally but not intraperitoneally inoculated *recA*6869 cells decreased dramatically. However, the SOS response of this mutant was induced normally, and there was no increase in the sensitivity of the strain toward DNA-damaging agents, bile salts, or alterations in pH. Nevertheless, *S. enterica recA*6869 cells were unable to swarm and their capacity to cross the intestinal epithelium was significantly reduced. The swarming deficiency in *recA*6869 cells is independent of the flagellar phase. Moreover, swimming activity of the *recA*6869 strain was not diminished with respect to the wild type, indicating that the flagellar synthesis is not affected by RecA protein overproduction. In contrast, swarming was recovered in a *recA*6869 derivative that overproduced CheW, a protein known to be essential for this function. These data demonstrate that an equilibrium between the intracellular concentrations of RecA and CheW is necessary for swarming in *S. enterica*. Our results are the first to point out that the SOS response plays a critical role in the prevention of DNA damage by abolishing bacterial swarming in the presence of a genotoxic compound.**

In bacteria, RecA is a key protein in homologous recombination, enabling the alignment of DNA molecules prior to strand exchange (17). RecA is also the positive regulator of the SOS response, one of the most-well-studied DNA repair systems in bacteria (54). In *Escherichia coli* and other *Enterobacteriaceae*, the cellular SOS network consists of more than 40 genes whose products act together to ensure cell survival after DNA damage (25). The negative regulator of the SOS system, LexA, binds to a specific sequence, the SOS box, which is located in the promoter region of the controlled genes (54). In *Gammaproteobacteria*, the SOS box is an imperfect palindrome, comprising the sequence CTGTN<sub>8</sub>ACAG (54) and varying among the different bacterial phyla (22).

The induction pathway of the SOS response seems to be conserved in all bacteria in which this DNA repair system is found. The RecA protein is activated after binding to single-stranded DNA resulting from inhibition of chromosomal replication (48). In turn, the activated RecA triggers autocatalytic cleavage of the LexA repressor. In *E. coli*, this cleavage occurs in the Ala<sup>84</sup>-Gly<sup>85</sup> bond of the regulator (36) in a process mediated by the residues Ser<sup>119</sup> and Lys<sup>156</sup>. Autocleavage resembles that described for serine proteases (38), and it prevents the binding of LexA to its specific recognition motif in the promoter region of SOS genes.

In addition to DNA repair genes, the SOS response involves lytic-cycle repressors of temperate bacteriophages (54). In some cases, such as in  $\lambda$  or P22 phages, RecA promotes autocleavage of the repressor (45), whereas for another class of temperate bacteriophages, an anti-lytic-cycle repressor protein, encoded by the *tum* gene, is under the direct negative control of LexA (49). For instance, *Salmonella enterica* strains contain at least three prophages (Fels-2, Gifsy-1, and Gifsy-2) whose lytic cycle is regulated by a *tum*-encoded protein (7). In fact, constitutive expression of the LexA regulon is lethal in this bacterial species, as it results in spontaneous induction of the lytic cycle of these three resident phages (7). The loss of these prophages suppresses the lethality of *S. enterica lexA*(Def) (*lexA* defective) cells (7), but it is worth noting that some of these *S. enterica* resident phages harbor genes that are required for bacterial virulence (24), so they are useless for virulence studies.

It is known that high RecA protein levels increase the frequency of DNA recombination (16). Moreover, the virulence of *recA*-defective mutants is significantly decreased in *S. enterica* as well as in other bacterial pathogens (5, 6, 11, 26, 34). However, due to the dual role of RecA (i.e., in recombination and as a positive regulator of the SOS response), the decrease in virulence of *recA*-defective mutants may be attributed to a reduction of the recombination frequency, to the inhibition of the SOS system induction, or both. To further elucidate the relative importance of each of the roles of RecA in the virulence process, two *recA* mutants were constructed: an *S. enterica* ATCC 14028 *recA*6869 mutant that constitutively expressed *recA* and a *recA*6869 *lexA*3(Ind<sup>-</sup>) (*lexA* noninducible)

\* Corresponding author. Mailing address: Departament de Genètica i Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain. Phone: 34-93-581 1837. Fax: 34-93-581 2387. E-mail: jordi.barbe@uab.cat.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 10 May 2010.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this work

<i>S. enterica</i> strain or plasmid	Relevant characteristic(s)	Source or reference
<b>Strains</b>		
ATCC 14028	Wild type	ATCC
UA1876	As ATCC 14028, but <i>recA</i> 06869 Km <sup>r</sup>	This study
UA1822	As ATCC 14028, but <i>lexA3</i> (Ind <sup>-</sup> ) Cm <sup>r</sup>	9
UA1877	As UA1876, but <i>lexA3</i> (Ind <sup>-</sup> ) Km <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	This study
UA1878	As ATCC 14028, but $\Delta$ <i>recX::cat</i> Cm <sup>r</sup>	This study
UA1879	As UA1876, but $\Delta$ <i>recX::cat</i> Km <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	This study
UA1885	As ATCC 14028, but Km <sup>r</sup>	This study
UA1886	As ATCC 14028, but $\Delta$ <i>rvC::cat</i> Cm <sup>r</sup>	This study
UA1887	As UA1876, but $\Delta$ <i>rvC::cat</i> Km <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	This study
<b>Plasmids</b>		
pKOBEGA	Amp <sup>r</sup> , temperature sensitive	14
pKD3	Amp <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	20
pKD4	Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	20
pGEM-T	Cloning vector; Amp <sup>r</sup>	Promega
pGEX 4T-1	Glutathione <i>S</i> -transferase gene fusion vector carrying the <i>Ptac</i> promoter and the <i>lacI<sup>q</sup></i> gene; Amp <sup>r</sup>	Amersham Biosciences
pUA1108	pGEX 4T-1 derivative plasmid carrying the <i>Ptac</i> promoter and the <i>lacI<sup>q</sup></i> gene; Amp <sup>r</sup>	This study
pUA1109	pUA1108 derivative plasmid containing the <i>recA</i> gene under the control of the <i>Ptac</i> promoter	This study
pUA1110	pUA1108 derivative plasmid containing the <i>cheW</i> gene under the control of the <i>Ptac</i> promoter	This study

strain derivative harboring a mutated LexA repressor that was unable to induce the SOS response. The fitness of these mutants in intraperitoneal (i.p.) and oral infection was analyzed compared with that of the wild-type strain.

#### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, plasmids, and growth conditions.** The bacterial strains and plasmids used in this work are listed in Table 1. *S. enterica* was grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) broth or agar plates. When necessary, ampicillin (100 µg ml<sup>-1</sup>), kanamycin (150 µg ml<sup>-1</sup>), or chloramphenicol (34 µg ml<sup>-1</sup>) was added to the bacterial cultures. DNA techniques were performed as described elsewhere (46). For anoxic conditions, the cultures were grown in the appropriate atmosphere by using the GasPak EZ anaerobe container system from Becton Dickinson.

**Construction of *S. enterica* ATCC 14028 mutant derivatives.** The *S. enterica* *recA*06869, *rvC*, and *recX* mutants were constructed using the one-step PCR-based gene replacement method (20). The kanamycin resistance (Km<sup>r</sup>) and chloramphenicol resistance (Cm<sup>r</sup>) cassettes from plasmids pKD4 and pKD3, respectively, were amplified using suitable 100-nucleotide (nt)-long oligonucleotides containing 80-nt stretches homologous to the insertion sites and the point mutation in the SOS box when needed (*S. enterica* *recA*06869 mutant). The PCR product was transformed into *S. enterica* ATCC 14028 (Table 1) containing plasmid pKOBEGA (14). After the transformant clones were selected, pKOBEGA was eliminated by taking advantage of its temperature sensitivity at 42°C. The presence of the deletions or the point mutation in the SOS box was confirmed by PCR and sequencing.

For the construction of the *S. enterica* *recA*06869 *recX* double mutant, the same strategy was used, but the recipient strain of the Cm<sup>r</sup> cassette was the previously constructed *recA*06869 strain harboring pKOBEGA (Table 1).

The *S. enterica* wild-type strain harboring the Km<sup>r</sup> cassette insertion was obtained using the same method. In this case, the 100-nt-long oligonucleotides harboring the 80-nt stretches homologous to the insertion sites contained no point mutations in the SOS box.

In all cases, the construct resulting from this procedure was moved into a clean wild-type strain background by transduction using the P22int7(HT) bacteriophage (10). The absence of the prophage in the transductants was determined by streaking them onto green plates as previously described (21). The obtained strains were verified both by PCR using suitable oligonucleotides and by sequencing.

*S. enterica* *recA*06869 *lexA3*(Ind<sup>-</sup>) and *recA*06869 *rvC* strains were obtained by transduction. The *recA*06869 construct from *S. enterica* UA1876 strain was transduced to the previously described (9) *lexA3*(Ind<sup>-</sup>) strain UA1822, and the

*rvC* deletion from UA1886 was transduced to the *S. enterica* UA1876 strain. The presence of the mutations was confirmed by PCR and sequencing.

For the flagellar phase-reversal process, the Sven Gard method was used (15). Briefly, *Salmonella enterica* was inoculated into the center of swimming plates where sterile antiserum against the identified flagellar phase had been added. The antiserum immobilizes the bacterial cells with the homologous flagella, whereas the cells with the heterologous flagella swim from the center of the plate. After overnight (ON) incubation at 37°C, cells from the edge of the growing area were selected for further studies.

**Real-time quantitative RT-PCR assays.** Reverse transcription (RT)-PCR analyses of gene expression were carried out for all bacterial strains as previously reported (8) and using the primer pairs suitable for each gene. The results were normalized with respect to those obtained for the *hisG* housekeeping gene, since the latter does not belong to the SOS response (23). The induction factor (IF) of each gene for a given strain was defined as the ratio between the studied gene expression level in the presence and in the absence of mitomycin C (80 ng ml<sup>-1</sup>) in the respective culture.

**Quantification of RecA protein.** *S. enterica* wild-type or *recA*06869, *lexA3*(Ind<sup>-</sup>), or *recA*06869 *lexA3*(Ind<sup>-</sup>) mutant cells were grown in LB broth at 37°C to an optical density at 550 nm (OD<sub>550</sub>) of 0.4. Then, 4 ml of the culture was removed and treated as the preinduction control. An equal volume of cells was treated with mitomycin C (0.8 mg ml<sup>-1</sup>) for 2 h. Cells were lysed in buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 300 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10% glycerol), and the samples were stored in buffer B (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 3% β-2-mercaptoethanol, 3% SDS, 30% glycerol, 0.1% bromophenol blue). Samples from each induction experiment were electrophoresed alongside purified RecA protein standard (10 to 500 ng).

Polyclonal rabbit antiserum was raised against purified RecA protein according to standard protocols. The IgG fraction of the sera was purified by affinity chromatography with protein A-Sepharose 4B (Pharmacia Biotech) as described by the suppliers. The protein samples were separated by 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Immunoblots were transferred and probed with anti-RecA antibodies as described previously (13). RecA protein bands on developed immunoblots were quantified with a scanning densitometer. Purified RecA protein standards yielded a linear relationship between antibody signal and the RecA protein concentration. The amount of RecA protein in each induced sample was interpolated from the purified RecA protein standard curve.

***S. enterica* in vivo and in vitro competition assays.** The competitive assays were performed as reported previously (4, 10). Briefly, wild-type and mutant strains were grown separately and then mixed together in a ratio of approximately 1:1. The initial concentration for each strain was checked by plating serial dilutions of the bacterial suspensions onto LB media. For *in vitro* competition assays, the bacterial mixture was inoculated onto fresh LB media at a final concentration

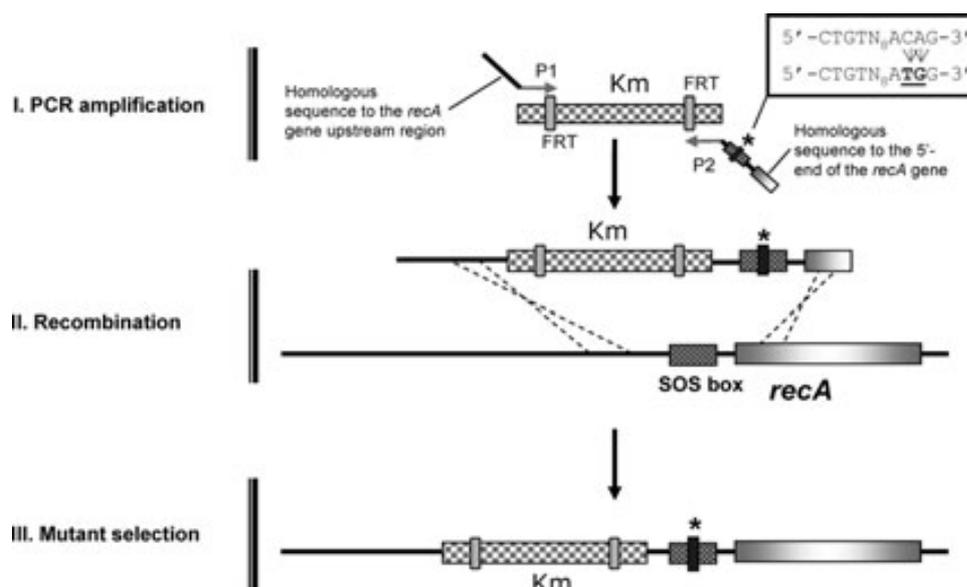


FIG. 1. Construction of the *S. enterica* *recA06869* mutant using a one-step PCR-based gene replacement method. The kanamycin resistance gene (Km) was amplified from plasmid pKD4 using oligonucleotides containing sequences homologous to the chromosomal DNA of *S. enterica* (step I). This construct was used to transform the *S. enterica* ATCC 14028 wild-type strain (step II), and Km<sup>r</sup> colonies were selected (step III). The presence of the mutation in the SOS box was verified by both PCR and sequencing. FRT, FLP recombination target. The asterisk indicates the point mutation in the LexA binding sequence that is boxed in the figure.

of  $2 \times 10^7$  CFU ml<sup>-1</sup> and the culture was grown overnight (ON) at 37°C under aerobic or anaerobic conditions. Afterwards, serial dilutions of the culture were plated onto LB broth. To determine the proportion of each strain, replica platings were performed on appropriate antibiotic-supplemented LB plates. All of the *in vitro* experiments were performed at least in triplicate. For *in vivo* studies, in each experiment 6 or 12 female (4 to 6 weeks old) BALB/c mice were inoculated either orally or intraperitoneally (i.p.) with  $2 \times 10^8$  CFU or  $2 \times 10^3$  CFU, respectively, of the bacterial mixture per animal. Blood samples taken from the heart immediately after the mice died due to septicemia (generally 4 to 5 days after inoculation) were cultured in LB medium. The proportion of each strain appearing in the cultures was determined by replica plating onto appropriate antibiotic-supplemented LB plates. In all cases, the competitive index (CI) was calculated for each mutant as the ratio between the mutant and the wild-type strain in the output (bacteria recovered from the ON cultures in *in vitro* assays or from the host after infection in *in vivo* studies) divided by their ratio in the input (initial inoculum) (4). Statistical analyses consisted of the two-tailed *t* test and the Wilcoxon signed-rank test, with a *P* of  $\leq 0.05$  considered significant.

**pH, bile, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and UV survival assays.** *S. enterica* *recA06869*, *lexA3*(Ind<sup>-</sup>), and *recA06869 lexA3*(Ind<sup>-</sup>) survival assays were performed as previously described (50, 52, 53), but with some modifications. All bacterial strains were grown ON in LB medium, diluted to a final concentration of  $3 \times 10^7$  CFU ml<sup>-1</sup> in the same medium, and then incubated with the appropriate compound. For pH resistance assays, ON cultures were diluted and incubated in pH 3.3 LB broth for 300 min without previous adaptation (52). Survival was assessed in samples withdrawn at 0, 50, 100, 150, 200, 250, and 300 min. For bile salts survival assays, diluted ON cultures were incubated for 300 min in LB broth supplemented with sodium cholate (Sigma) at a final concentration of 30%; survival was assessed in samples withdrawn at 0, 200, 250, and 300 min (53). For H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> survival assays, diluted ON cultures were incubated for 120 min in LB medium containing 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Samples were removed at 0, 15, 30, 60, 90, and 120 min after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition and diluted in LB broth containing catalase (10 μg ml<sup>-1</sup>) to neutralize the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50). The UV resistance assays were performed as described previously (3). Briefly, bacterial cells in the exponential growth phase were washed by centrifugation, suspended in AB medium (3) to a concentration of  $2 \times 10^8$  cells ml<sup>-1</sup>, and then irradiated at several doses of UV (0, 6, 12, 18, 24, and 30 J m<sup>-2</sup>) in a glass petri dish in thin layers, with a General Electric GY1578 germicidal lamp, at a rate of 1 J m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (determined with a Latarjet dosimeter). Afterwards, for each UV dose, samples were taken, diluted and plated in LB media, and grown at 37°C. All experiments with UV-irradiated cells were performed under yellow light or in the darkness to prevent photoreactivation. For all

treatments, cell survival was calculated as the survival ratio of the treated versus the untreated cells.

***S. enterica* invasion assays.** The protocol used to test the invasiveness of several *S. enterica* strains into Caco-2 cells was similar to that used by Kim and Wei (33), with some modifications. Caco-2 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)-GlutaMAX I medium (Difco) supplemented with 20% fetal bovine serum (Difco) at 37°C in 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. Once the monolayer was formed, cells were trypsinized and the suspension was seeded at  $10^6$  cells ml<sup>-1</sup> onto tissue culture-treated 6-well plates (Corning Incorporated, Corning, NY). The plates were incubated at 37°C in 95% air and 5% CO<sub>2</sub> until confluence was reached in every well.

*S. enterica* wild-type and *recA06869* and *recA06869 lexA3*(Ind<sup>-</sup>) mutant strains were inoculated into LB broth and incubated overnight at 37°C. The bacterial cultures were centrifuged at  $5,000 \times g$  for 10 min and washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), and the OD<sub>600</sub> value was adjusted to 0.4. Bacterial suspensions were inoculated to a final concentration of  $10^6$  CFU ml<sup>-1</sup> into the confluent monolayers of Caco-2 cells in the 6-well plates. Plates were incubated for 1 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. The cells were then rinsed once with 1 ml of DMEM (Gibco) and incubated for 2 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> with 1 ml of cell culture medium containing 100 μg of gentamicin ml<sup>-1</sup> to remove extracellular bacteria. The cells were finally rinsed 3 times with PBS and lysed at room temperature for 10 min with 0.1% Triton X-100 in PBS. Viable bacterial counts were determined in duplicate by plating serial dilutions on LB agar. The plates were incubated at 37°C for 24 h. The invasion assay was carried out in triplicate.

***S. enterica* coinfection analysis in murine ileal loops.** To examine the *in vivo* interaction of *S. enterica* wild-type and *recA06869* strains with murine intestinal epithelial cells, the ligated-ileal loop coinfection model was used as described previously (30), with some modifications. Six-week-old BALB/c female mice were starved for 24 h and then anesthetized by i.p. injection of ketamine (100 mg kg<sup>-1</sup>) and xylazine (10 mg kg<sup>-1</sup>) before surgery. A small incision was made to expose the small bowel, and an ileal loop was then created by ligating a section of intestine containing a grossly identifiable Peyer's patch to a site proximal to the cecum. The blood supply to the loop was kept intact. Equal numbers of cells of the parental and *recA06869* mutant strains ( $\sim 10^7$  CFU ml<sup>-1</sup>) in PBS (200 μl) were then injected through a 25-gauge needle, after which the bowel was returned to the abdomen and the incision stapled. The mice were kept alive for 60 min and then killed. The ileal loop was excised intact, opened longitudinally, and placed into a tube containing PBS. Extracellular bacteria were eliminated by three washes with PBS and a further incubation for 90 min in PBS containing gentamicin (100 μg ml<sup>-1</sup>). The samples were then rinsed with PBS to remove

residual gentamicin, and the entire ileal segment was processed in a stomacher (Seward Medical) using 1 ml of PBS. To determine intracellular parental and mutant bacteria, appropriate dilutions of the homogenized samples were spread onto LB and LB-kanamycin plates.

**Overexpression of *S. enterica recA* and *cheW*.** The overexpression plasmid was constructed by inverted PCR using the pGEX up (5'-CGGGATCCCGCATATGTACTGTTTCCTGTGTGAA-3') and pGEX dw (5'-CGGGATCCCGGAA TTCCCG-3') primers, containing the NdeI and BamHI restriction sites, together with the pGEX 4T-1 vector as a template. The constructed plasmid (pUA1108), containing the *tac* promoter and the *lacI* gene in pGEX 4T-1, was checked by sequencing. Both the *recA* and the *cheW* coding regions were amplified using suitable oligonucleotides containing the NdeI and BamHI restriction sites. The PCR products were cloned into the pGEM-T vector and confirmed by sequencing. Afterwards, the NdeI-BamHI *recA* and *cheW* fragments were obtained by digestion and cloned into pUA1108, yielding plasmids pUA1109 and pUA1110, respectively. In both cases, *recA* and *cheW* were under the control of the *tac* promoter. Plasmids pUA1109 and pUA1110 were transformed in the *S. enterica* wild-type strain and *recA*6869 mutant derivative, respectively. IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside)-mediated overexpression of either RecA or CheW was confirmed in crude extracts by SDS-PAGE (data not shown). Briefly, the wild-type strain, harboring pUA1109, and the *recA*6869 mutant, containing pUA1110, were grown on LB broth to an OD<sub>550</sub> of 0.5, after which IPTG (1 mM) was added to the cultures followed by 3 h of incubation at 37°C. The crude protein extracts were loaded onto 15% acrylamide gels, and SDS-PAGE was conducted for 2 h. The protein profiles of the wild-type and mutant strains were visualized by Coomassie blue staining of the gels, which in each case confirmed the overexpression of either RecA or CheW.

**Swimming and swarming assays.** Swimming and swarming assays were carried out as described previously (28). In short, the bacterial strains were grown in LB broth at 37°C. Then, 10  $\mu$ l of the stationary cultures was inoculated in the middle of either swimming or swarming plates, supplemented when necessary with IPTG or mitomycin C. The plates were incubated ON at 37°C and then photographed.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Construction of an *S. enterica* mutant constitutively expressing the *recA* gene.** The *S. enterica recA*6869 mutant (UA1876), harboring a mutation in the LexA binding site of the *recA* gene promoter, was obtained using the one-step mutagenesis method (Fig. 1). As expected, this mutant presents a higher amount of RecA protein (~25,000 protomers per cell) than that measured in the wild-type strain (~5,000 protomers per cell) (Fig. 2A). The basal level of the RecA protein was essentially the same in the wild-type and *lexA3*(Ind<sup>-</sup>) strains (Fig. 2A). Likewise, the basal level of RecA protein in the *recA*6869 *lexA3*(Ind<sup>-</sup>) mutant was the same as that in the *recA*6869 strain (Fig. 2A). It is worth noting that the basal number of molecules of *S. enterica* RecA protein per cell was similar to that obtained for *E. coli* (~5,000) and *Bacillus subtilis* cells (~4,500) (37).

Furthermore, in mitomycin C-treated wild-type cells, the rate of RecA protein accumulation increased about 5-fold, whereas no induction was observed in the *lexA3*(Ind<sup>-</sup>) strain (Fig. 2A). Besides, the levels of RecA protein were essentially the same in *recA*6869 and *recA*6869 *lexA3*(Ind<sup>-</sup>) strains and both wild-type and mutant mitomycin C-treated cells (Fig. 2A). This rate probably represents maximum induction of the RecA protein by DNA damage because it was essentially the same as that from the *recA*6869 mutant.

Nonetheless, the behavior of the *S. enterica recA*6869 mutant was the same as that of the wild-type strain with respect to the DNA-damage-mediated induction of other SOS genes, such as *sulA* and *uvrA* (Fig. 2B). In contrast, in the *S. enterica recA*6869 *lexA3*(Ind<sup>-</sup>) strain and the *lexA3*(Ind<sup>-</sup>) strain, these SOS genes were not induced after cellular DNA damage (Fig. 2B). In concordance with these results, and as previously re-

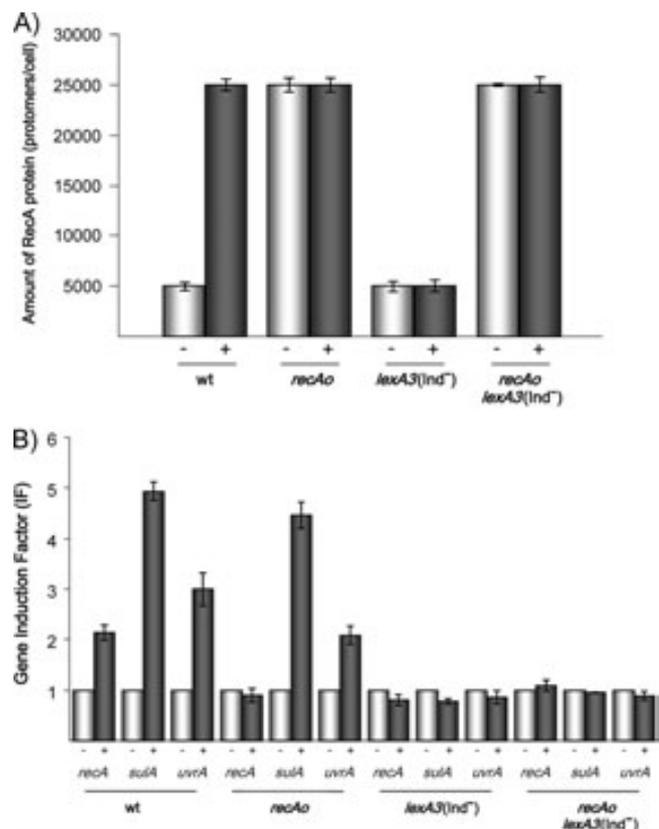


FIG. 2. Mitomycin C-mediated induction of the RecA protein levels and of the expression of several SOS genes in *S. enterica recA*6869 (*recA*), *lexA3*(Ind<sup>-</sup>), and *recA*6869 *lexA3*(Ind<sup>-</sup>) mutants. (A) Levels of RecA protein in the *S. enterica* ATCC 14028 wild type (wt) strain and in each mutant strain treated (+) or untreated (-) with mitomycin C. All determinations were performed at least three times. (B) Expression levels of the *recA*, *uvrA*, and *sulA* SOS genes in the *S. enterica* wild type or in each mutant derivative in the presence (+) or absence (-) of mitomycin C. In this case, the induction factor (IF) was defined as the ratio between the relative mRNA concentration of each gene in cells treated with mitomycin C and in untreated cells. The data are the means of two independent quantitative real-time RT-PCRs (each performed in triplicate), and the standard deviation of any value was never greater than 10%.

ported in an *E. coli recA*98 mutant (27), the survival of UV-irradiated *S. enterica recA*6869 cells was the same as that of wild-type cells (data not shown). Altogether, these data indicated that constitutive expression of the *recA* gene in the *recA*6869 strain affects neither the kinetics of the SOS response nor the resistance of *S. enterica* to DNA-damaging agents. Similar results were reported for *E. coli recA*6869 cells (27).

To further characterize the *S. enterica recA*98, *lexA3*(Ind<sup>-</sup>), and *recA*6869 *lexA3*(Ind<sup>-</sup>) mutants and to determine whether their growth was affected, *in vitro* competitive assays were carried out and growth kinetics were measured in minimal medium and in rich medium. The results showed that neither the overproduction of RecA protein nor the inability to induce the SOS system seems to have an effect on *S. enterica* growth *in vitro* (data not shown). It must be noted that similar results have been reported for both *E. coli recA*98 and *lexA*(Ind<sup>-</sup>) mutants (27, 42).

TABLE 2. Competitive indexes of several *S. enterica* mutants in murine model

Strain comparison (mixed infection)	Challenge route	CI <sup>a</sup>
<i>recAo6869</i> mutant vs wild type	i.p.	0.42
<i>lexA3</i> (Ind <sup>-</sup> ) mutant vs wild type	i.p.	0.42
<i>recAo6869 lexA3</i> (Ind <sup>-</sup> ) mutant vs wild type	i.p.	0.48
<i>recAo6869 ruvC</i> mutant vs wild type	i.p.	0.00019*
<i>recAo6869</i> mutant vs wild type	Oral	0.00027*
<i>lexA3</i> (Ind <sup>-</sup> ) mutant vs wild type	Oral	2.73
<i>recAo6869 lexA3</i> (Ind <sup>-</sup> ) mutant vs wild type	Oral	0.0054*

<sup>a</sup> CI is calculated as the ratio between the mutant and the wild-type strain in the output (bacteria recovered from the host after infection) divided by their ratio in the input. \*, virulence of the mutants was significantly lower than that of the wild-type strain (in all cases with a *P* value of  $\leq 0.05$ ).

**In vivo fitness of the *S. enterica recAo6869* strain.** To elucidate whether RecA-mediated recombination or SOS activation is more important for the infection process, the *S. enterica recAo6869*, *lexA3*(Ind<sup>-</sup>), and *recAo6869 lexA3*(Ind<sup>-</sup>) mutants were examined in competition assays with the wild-type strain. Neither deregulation of the *S. enterica recA* gene nor the inability to induce the SOS response because of the presence of a *lexA3*(Ind<sup>-</sup>) mutation had any effect upon the virulence of intraperitoneally (i.p.) inoculated *S. enterica* (Table 2). Proteins encoded by *ruvABC* genes play an essential role in the late steps of homologous recombination (55), whereas RecA is involved in the early stages of this process (35). For this reason, an *S. enterica recAo6869 ruvC* mutant was constructed and its competitive index (CI) following i.p. inoculation, in comparison with that of the wild-type strain, was analyzed. Table 2 demonstrates that *S. enterica recAo6869 ruvC* cells present a 10<sup>4</sup>-fold decrease in their CI. These results, together with those reported for *recA* mutants of *S. enterica recA* and other bacterial species (5, 6, 11, 26, 34), indicate that all stages of the DNA recombination process are important for a full bacterial infective capacity. Furthermore, and following oral inoculation, the *lexA3*(Ind<sup>-</sup>) strain exhibited the same behavior as the wild-type strain (Table 2), in concordance with results recently published (19) in which no defect in *lexA3*(Ind<sup>-</sup>) mutant is observed when it is i.p. inoculated. On the other hand, the fitness of the *S. enterica recAo6869* and *recAo6869 lexA3*(Ind<sup>-</sup>) mutants was dramatically reduced when orally inoculated (Table 2). These results demonstrated that overexpression of *recA* has a negative effect on the oral fitness of *S. enterica*.

**Overproduction of the RecA protein decreases invasiveness of *S. enterica*.** It should be noted that, following infection via the oral route, the bacterial cells cross the intestinal epithelium, and then the infection process proceeds as if they had been i.p. inoculated (40). Since no differences between the wild type and *recAo6869* and *recAo6869 lexA3*(Ind<sup>-</sup>) mutants were observed in i.p. competition assays, our results suggested that the negative effect of RecA overexpression upon the oral fitness of the *recAo6869* mutant derivatives must have occurred before *S. enterica* entered the bloodstream.

In this context, several factors that could explain the reduced fitness of the *S. enterica recAo6869* mutant derivatives when orally inoculated were analyzed. First, *in vitro* competition assays carried out under anoxic conditions did not reveal any difference between the *recAo6869* mutant and the wild-type

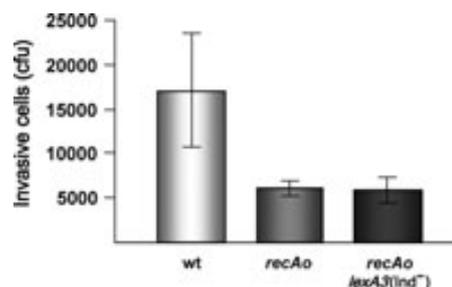


FIG. 3. Invasiveness of *S. enterica* strains in Caco-2 cells. In all cases, a final concentration of 10<sup>6</sup> CFU ml<sup>-1</sup> of either the wild type (wt) or the *recAo6869* (*recAo*) mutant derivatives was inoculated into confluent monolayers of Caco-2 cells. After 1 h of incubation and a gentamicin treatment, Caco-2 cells were lysed; the number of invasive cells is shown. In all cases, the invasion assay was carried out in triplicate.

strain (data not shown). Similar results were reported in *E. coli recAo6869* cells (27). Second, the results of survival assays in which the bacteria were exposed to bile salts, acidic pH, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> likewise suggested that the sensitivity of the *S. enterica recAo6869* cells to the above DNA-damaging agents was similar to that of the wild-type strain (data not shown). Third, as mentioned above, some *S. enterica* prophages have an important role in virulence (24). Accordingly, the maintenance of some resident prophages was examined in the *S. enterica*

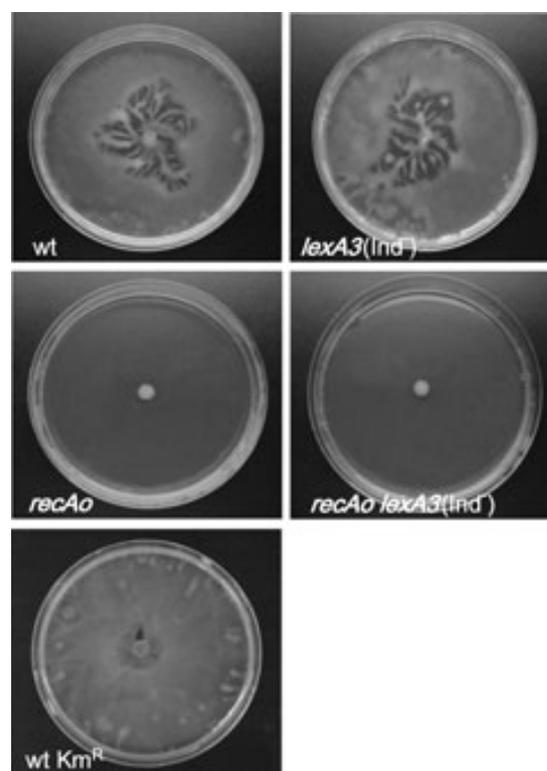


FIG. 4. Swarming ability of the *S. enterica* ATCC 14028 wild-type strain (wt) and the wild-type Km<sup>r</sup> (wt Km<sup>r</sup>), *recAo6869* (*recAo*), *lexA3*(Ind<sup>-</sup>), and *recAo6869 lexA3*(Ind<sup>-</sup>) mutant derivatives. Bacterial colony swarming patterns as they appeared on a semisolid (Difco) agar surface following incubation of the cultures for 24 h at 37°C are shown.

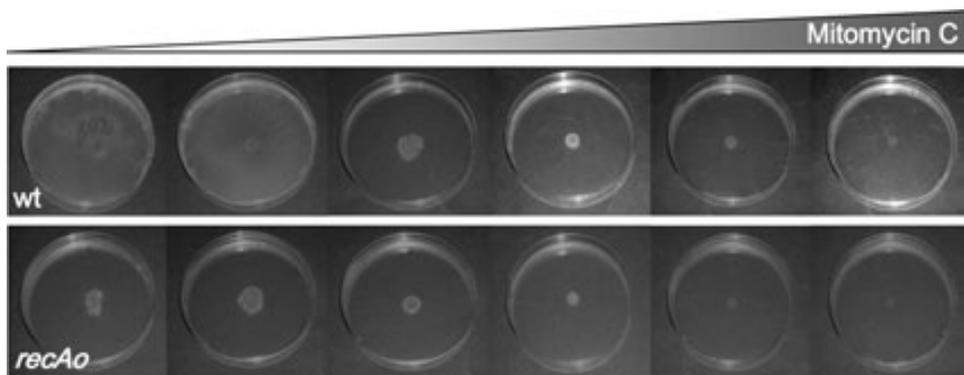


FIG. 5. Swarming ability of the *S. enterica* wild-type (wt) and *recAo6869* (*recAo*) mutant strains in the presence of an SOS inducer. Colony swarming patterns developed on a semisolid agar surface (Difco) in the presence of increasing concentrations of mitomycin C (0, 8, 80, 200, 800, and 1,600 ng ml<sup>-1</sup>) are shown.

*recAo6869* mutants. The results of PCRs showed that the reduced fitness of the *recAo6869* cells could not be attributed to a loss of the prophages Gifsy-1 and Gifsy-2, since both were present in the *recAo6869* mutant strains (data not shown).

Another critical point during infection is the passing of the bacteria through the intestinal epithelium (40). Thus, invasiveness of *S. enterica recAo6869* cells was tested using the human intestinal epithelial cell line Caco-2. Figure 3 indicates that both *S. enterica recAo6869* and *recAo6869 lexA3*(Ind<sup>-</sup>) mutants have a decreased ability to invade Caco-2 cells (statistically significant at  $P = 0.0286$ ). In concordance with this, coinfection studies in murine ileal loops using the *S. enterica* wild-type and *recAo6869* and *recAo6869 lexA3*(Ind<sup>-</sup>) mutant strains show that the competitive indexes for both mutants in the ileal loops were  $0.25 \pm 0.04$  and  $0.376 \pm 0.045$ , respectively. These data clearly indicate that the *S. enterica recAo6869* and *recAo6869 lexA3*(Ind<sup>-</sup>) mutants were less able to reach the systemic compartment. It can therefore be concluded that the reduced fitness of *S. enterica recAo6869* cells was associated with its deficiency in crossing the intestinal epithelium.

***S. enterica recAo6869* mutants do not swarm.** It has been demonstrated that *S. enterica* mutants defective in swarming as a consequence of mutations in either the *cheW* or the *cheB* gene show a lower invasiveness than the wild-type strain under anaerobic conditions (31). Furthermore, through comparative analyses among several *S. enterica* serovars, it has been suggested that a relationship between swarming and intestinal colonization must exist in this bacterial species (32). Likewise, swarming is known to be important for the virulence of other bacterial pathogens, such as *Proteus mirabilis*, *Helicobacter pylori*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Campylobacter jejuni* (43, 44, 51, 57). In addition, it has been reported that the RecA protein is necessary for the swarming motility of *E. coli*, since *recA* mutants of this species do not swarm (28). For all these reasons, the swarming behavior of the *S. enterica recAo6869*, *lexA3*(Ind<sup>-</sup>), and *recAo6869 lexA3*(Ind<sup>-</sup>) mutants was studied (Fig. 4). The data indicated that neither the *S. enterica recAo6869* strain nor the *recAo6869 lexA3*(Ind<sup>-</sup>) strain swarmed, while the swarming capacity of *lexA3*(Ind<sup>-</sup>) cells was similar to that of the wild-type strain (Fig. 4). Thus, and in

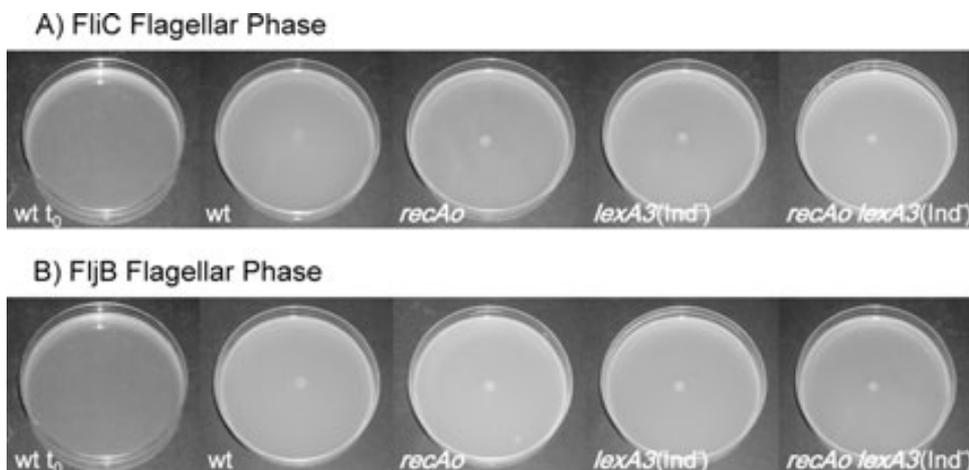


FIG. 6. Swimming ability of *S. enterica* wild-type strain (wt) and its *recAo6869* (*recAo*), *lexA3*(Ind<sup>-</sup>), and *recAo6869 lexA3*(Ind<sup>-</sup>) mutant derivatives. Colony swimming patterns developed by strains presenting either the FliC (A) or the FljB (B) flagellar phase are shown. As a control, the wild-type plate immediately after inoculation (wt  $t_0$ ) is shown.

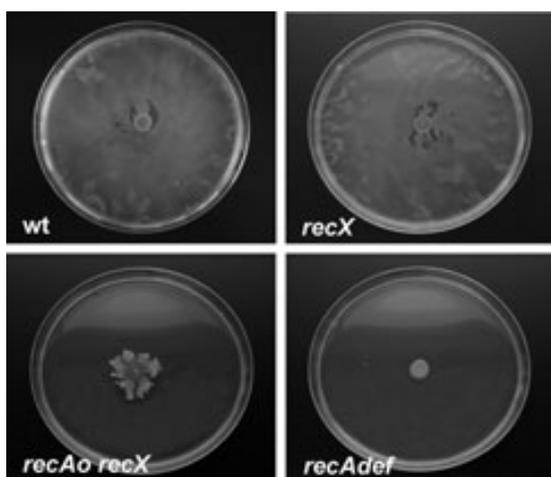


FIG. 7. Swarming ability of *S. enterica* *recX* and *recAo6869* (*recAo*) *recX* mutant derivatives. Colony swarming patterns developed on a semisolid (Difco) agar surface following incubation of the cultures for 24 h at 37°C are shown. As a control, the negative swarming phenotype of the *S. enterica* *recA*-defective mutant (*recAdef*) is also presented.

concordance with the results obtained in the competition assays, the inhibition of swarming was only associated with constitutive levels of *recA* and not with the presence of the *lexA3*(Ind<sup>-</sup>) mutation.

To ensure that the *recAo6869* mutation was the only mutation responsible for this swarming-defective phenotype, a wild-type strain harboring the Km<sup>r</sup> cassette in the same position as the *recAo6869* mutants but without any mutation in the LexA binding site was constructed. This strain presents a swarming pattern identical to that of the *S. enterica* ATCC 14028 wild-type strain with no insertion (Fig. 4). Furthermore, it must be noted that in the wild-type strain, the increase in SOS-mediated *recA* expression following the addition of sublethal concentrations of mitomycin C abolished swarming (Fig. 5).

It is worth noting that the swarming deficiency shown by the *S. enterica* *recAo6869* cells is not dependent upon the flagellar

phase, since strains expressing either *fliC* or *fliB* genes do not swarm (data not shown). Moreover, swimming motility of *S. enterica* *recAo6869* cells is not affected regardless of the flagellar phase which they present (Fig. 6), indicating that this mutant does not display any difficulties in synthesizing flagella.

The *S. enterica* *recA* and *recX* genes form a single transcriptional unit (18, 41). To rule out the possibility that *recX* overexpression was responsible for the swarming defect, knockout mutant derivatives of this gene were constructed and the organism's ability to swarm was tested. The *S. enterica* *recX* mutant was able to swarm, while the *recAo6869* *recX* double mutant was not (Fig. 7). These results again implicated *recA* constitutive expression in the swarming defect. To further confirm that the overexpression of RecA fully accounts for the inability of the mutant strain to swarm, the *recA* gene was cloned into plasmid pUA1108 under the control of an IPTG-inducible promoter (the *tac* promoter), giving rise to pUA1109. The pUA1109 plasmid was used to transform the *S. enterica* wild-type strain. The swarming phenotype of *S. enterica* carrying pUA1109 was then analyzed in the presence of increasing concentrations of IPTG. As expected, the swarming ability decreased in an IPTG-dependent manner (Fig. 8), unequivocally confirming that the overexpression of *recA* suppresses swarming.

**CheW overexpression reestablishes swarming in the *S. enterica* *recAo6869* mutant.** The swarming phenotype has been widely studied in several bacterial species (29, 44). In *Salmonella* species, swarming is under the control of the CheA-CheY two-component signal transduction system (39), and a critical role in this process has been also demonstrated for the CheW protein (2). Specifically, CheW is bound to CheA (a histidine protein kinase) and participates in its autophosphorylation, which leads to swarming activation (2). However, it is also known that the overexpression of CheW inhibits swarming (47) and that a precise quantitative association between the CheW and CheA proteins is required for this kind of cellular motility (12, 56). Furthermore, CheW and RecA have been shown to interact *in vivo* in *E. coli* (1), and, as mentioned above, *E. coli* mutants defective in *recA* do not swarm (28). Since both the

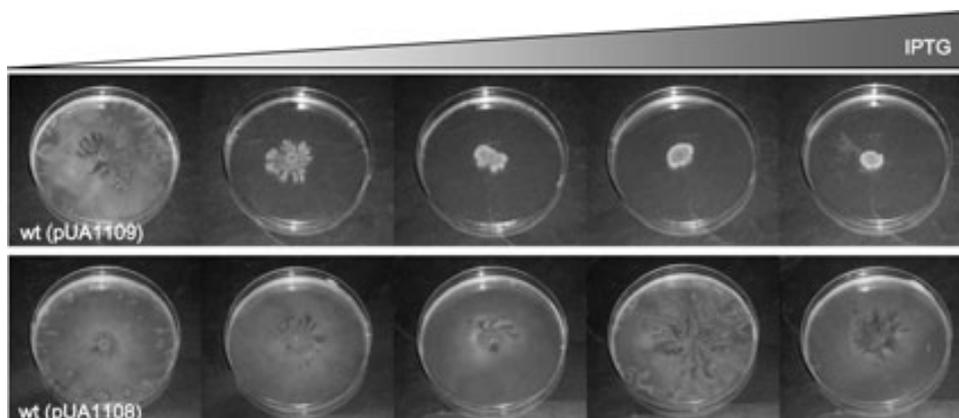


FIG. 8. Swarming ability of the *S. enterica* ATCC 14028 wild-type (wt) strain harboring the *recA*-overexpressing plasmid pUA1109. Colony swarming patterns developed on a semisolid (Difco) agar surface in the presence of increasing concentrations of IPTG (0, 5, 10, 20, and 30  $\mu$ M) after incubation of the cultures for 24 h at 37°C. As a control, the swarming phenotype of the wild-type strain harboring the pUA1108 overexpression vector without the *recA* gene in the presence of IPTG is also presented.

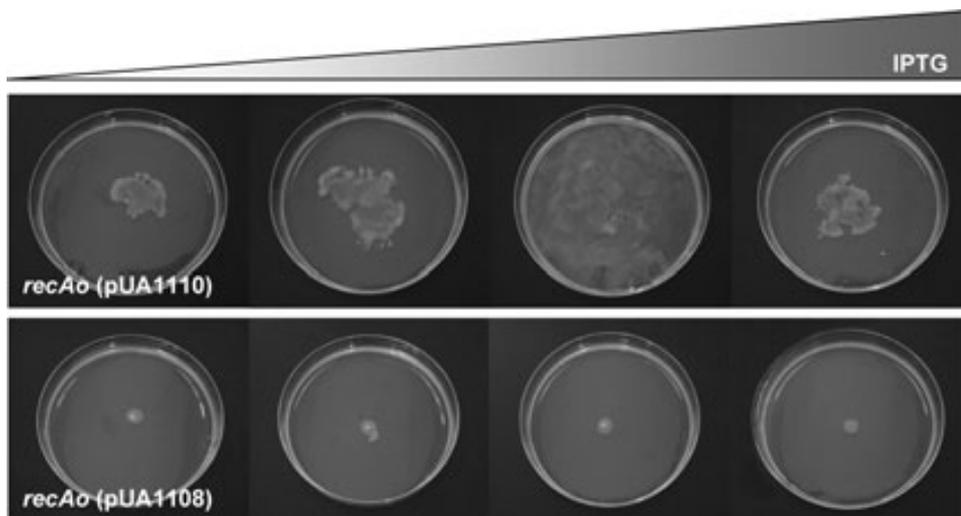


FIG. 9. Swarming ability of the *S. enterica* *recA6869* (*recAo*) mutant harboring the *cheW*-overexpressing plasmid pUA1110. Colony swarming patterns developed on a semisolid (Difco) agar surface in the presence of increasing concentrations of IPTG (0, 10, 20, and 30  $\mu$ M) in cultures incubated for 24 h at 37°C. As a control, the swarming phenotype of the *recA6869* mutant harboring the pUA1108 overexpression vector without the *cheW* gene in the presence of IPTG is also presented.

absence of RecA and the overexpression of RecA result in an inability to swarm, we postulated that an equilibrium between the cellular amounts of RecA and CheW proteins must be critical for bacterial swarming.

To test this hypothesis, the *S. enterica* *cheW* gene was cloned under the control of the *tac* promoter to obtain plasmid pUA1110, which was then transformed in the *S. enterica* *recA6869* mutant. The swarming phenotype of this strain was analyzed in the presence of increasing IPTG concentrations. As shown in Fig. 9, the *S. enterica* *recA6869* (pUA1110) strain recovered the swarming ability in an IPTG-dependent manner. However, when the amounts of CheW were large enough, and in accordance with previously published works (47), swarming was abolished (Fig. 9). These data confirmed that the *in vivo* equilibrium between CheW and RecA is important for bacterial swarming.

In this context, it is tempting to speculate that bacterial colonies use the amplification of intracellular RecA as a tool to sense the presence of DNA-damaging compounds (antibiotics and bacteriocins, among other natural molecules) around them and, consequently, to cease swarming. In this scenario, the presence of a DNA-damaging agent would induce the SOS response, initiating an increase in the amount of RecA protein and thus an alteration of the equilibrium between RecA and CheW, which in turn would abolish the coordinated multicellular surface migration. Accordingly, exposure of the bacterial genetic material to even higher concentrations of the DNA-injuring agent is avoided. Thus, from a bacterial population point of view, the LexA regulon not only would play a fundamental role in DNA damage repair but also could serve to avoid DNA injuries by preventing bacterial colonies from being exposed to high concentrations of genotoxic agents.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by grants BFU2008-01078 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) de España and 2009SGR1106 from the Generalitat de Catalunya to J.B. and BFU2009-07167 from

MICINN to J.C.A. Laura Medina was the recipient of a predoctoral fellowship from the MICINN.

We are deeply indebted to G. M. Ghigo and to Francisco García del Portillo for the generous gift of plasmid pKOBEGA and the Caco-2 cell line, respectively. We are grateful to Montserrat Saco for helping us with the *Salmonella* flagellar phase reversal procedures and to Maria Pilar Cortés and Joan Ruiz for their excellent technical assistance.

#### REFERENCES

- Arifuzzaman, M., M. Maeda, A. Itoh, K. Nishikata, C. Takita, R. Saito, T. Ara, K. Nakahigashi, H. C. Huang, A. Hirai, K. Tsuzuki, S. Nakamura, M. Altaf-Ul-Amin, T. Oshima, T. Baba, N. Yamamoto, T. Kawamura, T. Ioka-Nakamichi, M. Kitagawa, M. Tomita, S. Kanaya, C. Wada, and H. Mori. 2006. Large-scale identification of protein-protein interaction of *Escherichia coli* K-12. *Genome Res.* **16**:686–691.
- Baker, M. D., P. M. Wolanin, and J. B. Stock. 2006. Signal transduction in bacterial chemotaxis. *Bioessays* **28**:9–22.
- Barbe, J., A. Villaverde, J. Cairo, and R. Guerrero. 1986. ATP hydrolysis during SOS induction in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **167**:1055–1057.
- Beuzon, C. R., and D. W. Holden. 2001. Use of mixed infections with *Salmonella* strains to study virulence genes and their interactions in vivo. *Microb. Infect.* **3**:1345–1352.
- Buchmeier, N. A., S. J. Libby, Y. Xu, P. C. Loewen, J. Switala, D. G. Guiney, and F. C. Fang. 1995. DNA repair is more important than catalase for *Salmonella* virulence in mice. *J. Clin. Invest.* **95**:1047–1053.
- Buchmeier, N. A., C. J. Lipps, M. Y. So, and F. Heffron. 1993. Recombination-deficient mutants of *Salmonella typhimurium* are avirulent and sensitive to the oxidative burst of macrophages. *Mol. Microbiol.* **7**:933–936.
- Bunny, K., J. Liu, and J. Roth. 2002. Phenotypes of *lexA* mutations in *Salmonella enterica*: evidence for a lethal *lexA* null phenotype due to the Fels-2 prophage. *J. Bacteriol.* **184**:6235–6249.
- Campoy, S., M. Fontes, S. Padmanabhan, P. Cortes, M. Llagostera, and J. Barbe. 2003. LexA-independent DNA damage-mediated induction of gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **49**:769–781.
- Campoy, S., A. Hervas, N. Busquets, I. Erill, L. Teixido, and J. Barbe. 2006. Induction of the SOS response by bacteriophage lytic development in *Salmonella enterica*. *Virology* **351**:360–367.
- Campoy, S., M. Jara, N. Busquets, A. M. Perez De Rozas, I. Badiola, and J. Barbe. 2002. Role of the high-affinity zinc uptake *znuABC* system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence. *Infect. Immun.* **70**:4721–4725.
- Cardenas, M., A. R. Fernandez de Henestrosa, S. Campoy, A. M. Perez de Rozas, J. Barbe, I. Badiola, and M. Llagostera. 2001. Virulence of *Pasteurella multocida* *recA* mutants. *Vet. Microbiol.* **80**:53–61.
- Cardozo, M. J., D. A. Massazza, J. S. Parkinson, and C. A. Studdert. 5 January 2010, posting date. Disruption of chemoreceptor signaling arrays by high level of CheW, the receptor-kinase coupling protein. *Mol. Microbiol.* [Epub ahead of print.] doi:10.1111/j.1365-2958.2009.07032.x.
- Carrasco, B., C. Cañas, G. J. Sharples, J. C. Alonso, and S. Ayora. 2009. The

- N-terminal region of the RecU Holliday junction resolvase is essential for homologous recombination. *J. Mol. Biol.* **390**:1–9.
14. Chaveroche, M. K., J. M. Ghigo, and C. d'Enfert. 2000. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res.* **28**:E97.
  15. Chiou, C. S., J. F. Huang, L. H. Tsai, K. M. Hsu, C. S. Liao, and H. L. Chang. 2006. A simple and low-cost paper-bridged method for *Salmonella* phase reversal. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **54**:315–317.
  16. Clark, A. J. 1982. *recA* operator mutations and their usefulness. *Biochimie* **64**:669–675.
  17. Cox, M. M. 2007. Motoring along with the bacterial RecA protein. *Nat. Rev.* **8**:127–138.
  18. Cox, M. M. 2007. Regulation of bacterial RecA protein function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **42**:41–63.
  19. Craig, M., and J. M. Slauch. 2009. Phagocytic superoxide specifically damages an extracytoplasmic target to inhibit or kill *Salmonella*. *PLoS One* **4**:e4975.
  20. Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **97**:6640–6645.
  21. Davis, R. W., D. Botstein, and J. R. Roth. 1980. Advanced bacterial genetics. A manual for genetic engineering. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
  22. Erill, I., S. Campoy, and J. Barbe. 2007. Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**:637–656.
  23. Erill, I., M. Escribano, S. Campoy, and J. Barbe. 2003. In silico analysis reveals substantial variability in the gene contents of the gamma proteobacteria LexA-regulon. *Bioinformatics* **19**:2225–2236.
  24. Figueroa-Bossi, N., and L. Bossi. 1999. Inducible prophages contribute to *Salmonella* virulence in mice. *Mol. Microbiol.* **33**:167–176.
  25. Fry, R. C., T. J. Begley, and L. D. Samson. 2005. Genome-wide responses to DNA-damaging agents. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**:357–377.
  26. Fuchs, S., I. Muhldorfer, A. Donohue-Rolfe, M. Kerenyi, L. Emody, R. Alexiev, P. Nenkov, and J. Hacker. 1999. Influence of RecA on in vivo virulence and Shiga toxin 2 production in *Escherichia coli* pathogens. *Microb. Pathog.* **27**:13–23.
  27. Ginsburg, H., S. H. Edmiston, J. Harper, and D. W. Mount. 1982. Isolation and characterization of an operator-constitutive mutation in the *recA* gene of *E. coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **187**:4–11.
  28. Gomez-Gomez, J. M., C. Manfredi, J. C. Alonso, and J. Blazquez. 2007. A novel role for RecA under non-stress: promotion of swarming motility in *Escherichia coli* K-12. *BMC Biol.* **5**:14.
  29. Harshey, R. M., and T. Matsuyama. 1994. Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **91**:8631–8635.
  30. Jones, B. D., N. Ghorri, and S. Falkow. 1994. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J. Exp. Med.* **180**:15–23.
  31. Jones, B. D., C. A. Lee, and S. Falkow. 1992. Invasion by *Salmonella typhimurium* is affected by the direction of flagellar rotation. *Infect. Immun.* **60**:2475–2480.
  32. Katrube, E., L. M. Bogomolnaya, H. Wingert, and H. Andrews-Polymeris. 2009. Subspecies IIIa and IIIb salmonellae are defective for colonization of murine models of salmonellosis compared to *Salmonella enterica* subsp. I serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* **191**:2843–2850.
  33. Kim, S. H., and C. I. Wei. 2007. Invasiveness and intracellular growth of multidrug-resistant *Salmonella* and other pathogens in Caco-2 cells. *J. Food Sci.* **72**:M72–M78.
  34. Kumar, K. K., R. Srivastava, V. B. Sinha, J. Michalski, J. B. Kaper, and B. S. Srivastava. 1994. *recA* mutations reduce adherence and colonization by classical and El Tor strains of *Vibrio cholerae*. *Microbiology* **140**:1217–1222.
  35. Kuzminov, A. 1996. Unraveling the late stages of recombinational repair: metabolism of DNA junctions in *Escherichia coli*. *Bioessays* **18**:757–765.
  36. Little, J. W. 1991. Mechanism of specific LexA cleavage: autodigestion and the role of RecA coprotease. *Biochimie* **73**:411–421.
  37. Lovett, C. M., Jr., P. E. Love, R. E. Yasbin, and J. W. Roberts. 1988. SOS-like induction in *Bacillus subtilis*: induction of the RecA protein analog and a damage-inducible operon by DNA damage in Rec<sup>+</sup> and DNA repair-deficient strains. *J. Bacteriol.* **170**:1467–1474.
  38. Luo, Y., R. A. Pfuetzner, S. Mosimann, M. Paetzel, E. A. Frey, M. Cherney, B. Kim, J. W. Little, and N. C. Strynadka. 2001. Crystal structure of LexA: a conformational switch for regulation of self-cleavage. *Cell* **106**:585–594.
  39. Mariconda, S., Q. Wang, and R. M. Harshey. 2006. A mechanical role for the chemotaxis system in swarming motility. *Mol. Microbiol.* **60**:1590–1602.
  40. Mastroeni, P., A. Grant, O. Restif, and D. Maskell. 2009. A dynamic view of the spread and intracellular distribution of *Salmonella enterica*. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**:73–80.
  41. McClelland, M., K. E. Sanderson, J. Spieth, S. W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston, and R. K. Wilson. 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**:852–856.
  42. Mount, D. W., K. B. Low, and S. J. Edmiston. 1972. Dominant mutations (*lex*) in *Escherichia coli* K-12 which affect radiation sensitivity and frequency of ultraviolet light-induced mutations. *J. Bacteriol.* **112**:886–893.
  43. Nakajima, K., S. Inatsu, T. Mizote, Y. Nagata, K. Aoyama, Y. Fukuda, and K. Nagata. 2008. Possible involvement of *putA* gene in *Helicobacter pylori* colonization in the stomach and motility. *Biomed. Res.* **29**:9–18.
  44. Rather, P. N. 2005. Swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. *Environ. Microbiol.* **7**:1065–1073.
  45. Roberts, J. W., and R. Devoret. 1983. Lysogenic induction, p. 123–144. In R. W. Hendrix, J. W. Roberts, F. W. Stahl, and R. A. Weisberg (ed.), *Lambda II*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
  46. Sambrook, J., and D. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
  47. Sanders, D. A., B. Mendez, and D. E. Koshland, Jr. 1989. Role of the CheW protein in bacterial chemotaxis: overexpression is equivalent to absence. *J. Bacteriol.* **171**:6271–6278.
  48. Sassanfar, M., and J. W. Roberts. 1990. Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*. The involvement of DNA replication. *J. Mol. Biol.* **212**:79–96.
  49. Shearwin, K. E., A. M. Brumby, and J. B. Egan. 1998. The Tum protein of coliphage 186 is an antirepressor. *J. Biol. Chem.* **273**:5708–5715.
  50. Stohl, E. A., A. K. Criss, and H. S. Seifert. 2005. The transcriptome response of *Neisseria gonorrhoeae* to hydrogen peroxide reveals genes with previously uncharacterized roles in oxidative damage protection. *Mol. Microbiol.* **58**:520–532.
  51. Takata, T., S. Fujimoto, and K. Amako. 1992. Isolation of nonchemotactic mutants of *Campylobacter jejuni* and their colonization of the mouse intestinal tract. *Infect. Immun.* **60**:3596–3600.
  52. Tiganitas, A., N. Zeaki, A. S. Gounadaki, E. H. Drosinos, and P. N. Skandamis. 2009. Study of the effect of lethal and sublethal pH and a(w) stresses on the inactivation or growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium. *Int. J. Food Microbiol.* **134**:104–112.
  53. van Velkinburgh, J. C., and J. S. Gunn. 1999. PhoP-PhoQ-regulated loci are required for enhanced bile resistance in *Salmonella* spp. *Infect. Immun.* **67**:1614–1622.
  54. Walker, G. C. 1984. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **48**:60–93.
  55. West, S. C. 1997. Processing of recombination intermediates by the RuvABC proteins. *Annu. Rev. Genet.* **31**:213–244.
  56. Zhang, P., C. M. Khursigara, L. M. Hartnell, and S. Subramaniam. 2007. Direct visualization of *Escherichia coli* chemotaxis receptor arrays using cryo-electron microscopy. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **104**:3777–3781.
  57. Zorrilla, I., S. Arijio, M. Chabrillon, P. Diaz, E. Martinez-Manzanares, M. C. Balebona, and M. A. Morinigo. 2003. *Vibrio* species isolated from diseased farmed sole, *Solea senegalensis* (Kaup), and evaluation of the potential virulence role of their extracellular products. *J. Fish Dis.* **26**:103–108.



# **Anexo B**

---



## 1. MEDIOS DE CULTIVO

Todos los medios de cultivo se prepararon con agua Milli-Q (MQ; *Ultra-pure water system Milli-Q<sub>plus</sub> 185*, Millipore) y se autoclavaron durante 15 minutos a 121°C. Los medios sólidos se dejaron enfriar hasta una temperatura de 50°C, momento en el que se añadieron los suplementos necesarios, se dispensaron sobre placas de Petri (Sterilin) y se conservaron a 4°C hasta su uso.

### 1.1. Medio LB

Medio de cultivo empleado para el crecimiento bacteriano.

<b>LB</b>	
Triptona (Pronadisa)	10 g
Extracto de levadura (Pronadisa)	5 g
NaCl (Panreac)	10 g
Agua Milli-Q (MQ)	Hasta 1 L

Para la obtención de LB sólido se añaden a la mezcla 17 g de agar (Pronadisa). Para la obtención de LB semisólido se añaden a la mezcla 7 g de agar.

### 1.2. Medio LB-Lennox

Medio de cultivo empleado para la obtención de células electrocompetentes.

<b>LB-Lennox</b>	
Triptona (Difco)	10 g
Extracto de levadura (Difco)	5 g
NaCl (Panreac)	5 g
Agua MQ	Hasta 1 L

### 1.3. Medios para el estudio del movimiento celular

Medios de cultivo empleados para el estudio del desplazamiento mediante *swarming* o mediante *swimming*.

---

<b>LB <i>swarming</i></b>	
Triptona (Difco)	1 g
Extracto de levadura (Difco)	0,5 g
NaCl (Panreac)	0,5 g
D-(+)-Glucosa (Merck)	0,5 g
Agar (Difco)	0,5 g
Agua MQ	Hasta 100 mL

---

---

<b>LB <i>swimming</i></b>	
Triptona (Difco)	1 g
Extracto de levadura (Difco)	0,5 g
NaCl (Panreac)	0,5 g
Agar (Difco)	0,3 g
Agua MQ	Hasta 100 mL

---

Ambos medios han de prepararse y dispensarse sobre las placas de Petri el mismo día de su utilización, ya que no pueden conservarse a 4°C. Asimismo, las placas para el estudio del desplazamiento mediante *swarming* han de secarse durante 15 minutos en una cabina de flujo laminar vertical antes de ser inoculadas con los microorganismos.

### 1.4. Medio mínimo AB

Medio de cultivo mínimo empleado para el crecimiento bacteriano.

---

<b>Solución A</b>	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Panreac)	20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck)	55,99 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Panreac)	30 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Panreac)	0,11 g
NaCl (Panreac)	30 g
Agua MQ	Hasta 1 L

---

**Solución B**

Solución de MgCl <sub>2</sub>	
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O (Merck)	16 g
Agua MQ	Hasta 500 mL
Solución de CaCl <sub>2</sub>	
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O (Merck)	0,58 g
Agua MQ	Hasta 250 mL
Solución de FeCl <sub>3</sub>	
FeCl <sub>3</sub> x 6H <sub>2</sub> O (Merck)	0,032 g
Agua MQ	Hasta 250 mL

Preparar las tres soluciones por separado y, una vez esterilizadas y frías, mezclar en esterilidad.

Las soluciones A y B han de prepararse y conservarse por separado. Para la utilización del medio, una vez esterilizadas las soluciones, han de mezclarse 100 mL de la solución A con 25 mL de la solución B y ajustar el volumen final a 1 L con agua MQ. En los casos en que fue necesario, se suplementó el medio con D-(+)-glucosa (Merck) o glicerol (Panreac) a una concentración final del 0,2%.

**1.5. Medio SOB**

Medio de cultivo empleado para la obtención de células competentes de las cepas portadoras del plásmido pKOBEGA (Chaverroche *et al.*, 2000).

**SOB**

Triptona (Difco)	20 g
Extracto de levadura (Difco)	5 g
NaCl (Panreac)	0,5 g
KCl 2,5 M	0,5 mL
Agua MQ	Hasta 1 L

Ajustar el pH del medio a 7, empleando para ello NaOH 10 N si es necesario.

Para la obtención de células competentes de las cepas portadoras del plásmido pKOBEGA, el medio SOB se ha de suplementar con DL-arabinosa (Sigma) a una concentración final de 20 mM. Para la obtención de medio SOC, empleado durante el período de expresión fenotípica tras la electroporación, el medio SOB se ha de suplementar con DL-arabinosa (Sigma) y D-(+)-glucosa (Merck), en ambos casos a una concentración final de 20 mM.

## 1.6. Medio BHI

Medio de cultivo empleado para durante el período de expresión fenotípica de los cultivos transformados por electroporación.

---

<b>BHI</b>	
BHI (Oxoid)	37 g
Extracto de cerebro (12,5 g)	
Extracto de corazón (5 g)	
Proteosa peptona (10 g)	
Glucosa (2 g)	
NaCl (5 g)	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (2,5 g)	
Agua MQ	Hasta 1 L

---

## 1.7. Placas verdes

Placas empleadas para la selección de los clones transductantes libres del bacteriófago tras el proceso de transducción generalizada.

---

<b>Placas verdes</b>	
Triptona (Difco)	8 g
Extracto de levadura (Difco)	1 g
Agar (Difco)	15 g
NaCl (Panreac)	5 g
Amarillo de alizarina R (Panreac)	0,833 g
Azul de anilina (Panreac)	0,132 g
Agua MQ	Hasta 1 L

---

Una vez esterilizado el medio, dejar enfriar hasta 50°C y suplementar con D-(+)-glucosa (Merck) a una concentración final del 1,3% antes de dispensar sobre las placas de Petri.

## 2. SOLUCIONES

### 2.1. EDTA 0,5 M

<b>EDTA 0,5 M pH 8</b>	
EDTA (Sigma)	186,12 g
Agua MQ	Hasta 1 L

Ajustar el pH de la solución a 8, empleando para ello NaOH 10 N si es necesario. Autoclavar 15 minutos a 121°C.

### 2.2. Agua MQ tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC)

Empleada para la preparación de los tampones utilizados en la manipulación del RNA.

<b>Agua MQ tratada con DEPC</b>	
DEPC (Sigma)	1 mL
Agua MQ	Hasta 1 L

Agitar durante al menos 2 horas antes de autoclavar durante 45 minutos a 121°C.

### 2.3. Tampón TAE

<b>TAE 50X</b>	
Trizma Base (Sigma)	242 g
EDTA 0,5 M pH 8	100 mL
Ácido acético glacial (Panreac)	57 mL
Agua MQ	Hasta 1 L

En el caso de emplearse en electroforesis de RNA, el agua MQ ha de estar tratada con DEPC.

### 2.4. Solución transportadora de DNA o RNA

<b>Solución transportadora de DNA o RNA 6X</b>	
Glicerol (Panreac)	30 g
Xilencianol (Clontech)	0,25 g
Azul de bromofenol (Panreac)	0,25 g
EDTA 0,5 M pH 8	2 mL
Agua MQ	Hasta 100 mL

En el caso de tratarse de solución transportadora para RNA, el agua MQ ha de estar tratada con DEPC.

## 2.5. Solución de sulfato magnésico (MgSO<sub>4</sub>)

<b>MgSO<sub>4</sub> 10 mM</b>	
MgSO <sub>4</sub> (Panreac)	1,56 g
Agua MQ	Hasta 1 L

Autoclavar 15 minutos a 121°C.

## 2.6. Tampón PBS

<b>Tampón PBS 10X</b>	
NaCl (Panreac)	80 g
KCl (Panreac)	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O (Panreac)	26,8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Panreac)	2,4 g
Agua MQ	Hasta 1 L

Autoclavar 15 minutos a 121°C.

## 2.7. Geles de SDS-poliacrilamida

Están constituidos por dos regiones, una región separadora y una región compresora.

<b>Región separadora</b>			
	Geles al 10%	Geles al 12%	Geles al 15%
Tampón separador 4X	1,875 mL	1,875 mL	1,875 mL
Acrilamida 30% p/v - Bisacrilamida 0,8% p/v (Pronadisa)	2,5 mL	3 mL	3,75 mL
APS 10% (Amresco)	80 µL	80 µL	80 µL
TEMED (Amresco)	20 µL	20 µL	20 µL
Agua MQ	3,125 mL	2,625 mL	1,875 mL

<b>Región compresora</b>	
Tampón compresor 4X	0,75 mL
Acrilamida 30% p/v - Bisacrilamida 0,8% p/v (Pronadisa)	0,3 mL
APS 10% (Amresco)	40 µL
TEMED (Amresco)	10 µL
Agua MQ	1,83 mL

<b>Tampón separador 4X</b>		<b>Tampón compresor 4X</b>	
Tris base (Sigma)	45,4 g	Tris base (Sigma)	15,1 g
SDS* (Merck)	1 g	SDS* (Merck)	1 g
Agua MQ	Hasta 250 mL	Agua MQ	Hasta 250 mL
*Añadir a la mezcla tras haber ajustado el pH a 8,8 con HCl.		*Añadir a la mezcla tras haber ajustado el pH a 6,8 con HCl.	

Para la elaboración de los geles de SDS-poliacrilamida se ha de preparar la solución separadora en primer lugar y llenar el soporte de vidrio (aproximadamente 3/4 partes) con ella. Una vez ha solidificado esta región, se ha de preparar la solución compresora y llenar el soporte de vidrio en su totalidad, colocando el peine en la parte superior para la formación de los pocillos.

## 2.8. Solución transportadora de proteínas

<b>Solución transportadora de proteínas 4X</b>	
Tampón compresor 4X*	50 mL
Glicerol (Panreac)	40 mL
SDS (Merck)	8 g
Azul de bromofenol (Panreac)	0,4 g
Agua MQ	Hasta 100 mL
*Apartado 2.7.	

## 2.9. Tampón A

<b>Tampón A</b>	
NaCl (Panreac)	1,75 g
Tris-HCl 1M pH 7,4 (AppliChem)	5 mL
EDTA 0,5M pH 8	0,4 mL
Glicerol (Panreac)	10 mL
Agua MQ	Hasta 100 mL

## 2.10. Tampón B

---

<b>Tampón B</b>	
2-β-mercaptotanol (Merck)	3 mL
Tris-HCl 1M pH 6,8	5 mL
SDS (Merck)	3 g
Azul de bromofenol (Panreac)	0,1 g
Glicerol (Panreac)	30 mL
Agua MQ	Hasta 100 mL

---

## 2.11. Solución de transferencia

---

<b>Solución de transferencia</b>	
Tris (Bio-Rad)	3,025 g
Glicina (Roche)	14,41 g
Metanol (Panreac)	200 mL
Agua MQ	Hasta 1 L

---

Ajustar el pH a 8,3.

## 2.12. Solución de bloqueo

---

<b>Solución de bloqueo</b>	
Agente bloqueante (Roche)	1 g
Tween 20 (Panreac)	100 µL
PBS 1X	100 mL

---

Disolver con calor y conservar a 4°C.

## 2.13. Tampón Z

---

<b>Tampón Z</b>	
KCl (Panreac)	0,075 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O (Panreac)	1,61 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O (Panreac)	0,55 g
MgSO <sub>4</sub> (Panreac)	0,0276 g
Agua MQ	Hasta 100 mL

---

## 2.14. Tampón Fosfato

---

### Tampón fosfato 0,1 M

---

Solución A:

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O (Merck)	13,8 g
Agua MQ	Hasta 1 L

Solución B:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck)	14,2 g
Agua MQ	Hasta 1 L

---

Preparar las dos soluciones por separado y, posteriormente, mezclar 423 mL de la solución A con 577 mL de la solución B y ajustar el pH a 7.



# **Agradecimientos**

---



Después de cuatro años de trabajo y de haber escrito una tesis creo que me enfrento a la parte más difícil para mí, que es la de dar las gracias a todos aquellos que han estado a mi lado día a día y han hecho posible mi camino hasta aquí. Y digo que es difícil porque ni siquiera sé cómo expresar lo afortunada que me siento de haber compartido estos años con vosotros, así que sé de antemano que estas palabras no representan ni una milésima parte de lo querría deciros, ¡pero no me lo tengáis en cuenta!

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores de tesis, el Dr. Jordi Barbé y la Dra. Susana Campoy. A Jordi Barbé por darme la oportunidad de entrar a formar parte del grupo de Microbiología Molecular, por haber dirigido este trabajo y por guiarme, a través de su experiencia, para ayudarme a entender este mundillo, que no siempre es fácil. A Susana Campoy por su dedicación y su ayuda en la realización de esta tesis, por tener siempre la respuesta a todas las preguntas y por compaginar su trabajo como directora con sus horas extra como psicóloga en los momentos en los que me encontraba un poco perdida entre tanto mutante.

Quiero hacer extensivos estos agradecimientos a la Dra. Montserrat Llagostera, por haberme acogido en mis primeros meses como colaboradora en este grupo y haber seguido mi trabajo hasta esta última etapa, y a la Dra. Pilar Cortés, por su ayuda y consejos en el día a día y por todas las RTs, las UAs y los pUAs (que más de un lío nos hemos hecho...).

También quiero dar las gracias al grupo de investigación de Biofilms Microbianos del Instituto de Agrobiotecnología, dirigido por el Dr. Iñigo Lasa, y, en especial, a la Dra. Cristina Latasa, por su ayuda en la realización de los ensayos de invasividad con células epiteliales. Asimismo, quiero dar las gracias al laboratorio de Estabilidad Genética del departamento de Biotecnología Microbiana del Centro Nacional de Biotecnología y, en especial, al Dr. Juan Carlos Alonso y a la Dra. Paula Cárdenas, por su ayuda en la realización de los ensayos de cuantificación proteica. Por último, quiero agradecer la colaboración de Montserrat Saco en la realización de los ensayos de cambio de fase flagelar.

Por supuestísimo, quiero dar las gracias a todos mis compañeros de laboratorio, quienes a lo largo de estos años se han convertido en mucho más que eso. Se han convertido en mi apoyo en los momentos más duros en los que el trabajo (y lo que no es trabajo) no es todo lo agradecido que a uno le gustaría y, sobre todo, han compartido conmigo muchas, muchísimas, risas. Todos los ratos que hemos pasado juntos dentro y fuera del laboratorio han sido un placer.

Al equipo del "LAB 1". Teixi, por tu culpa entré en este laboratorio como Medina ¡y ahora hasta se me hace raro que me llamen Laura! Siempre has sido la primera en ponerte las pilas para ayudar a cualquiera, ya sea remangándote para arrimar el hombro en el lab o sacando el pañuelo para tener una charla de desahogo. Así que gracias por eso y por compartir conmigo, entre otras muchas cosas, la manía por el orden, el gusto por la literatura "fantástica" y los esfuerzos por convencer a Andrea para coger las puntas de la micropipeta en orden (aunque las dos sabemos que perdimos esa batalla...). Sólo me ha faltado una cosa por tu parte en estos años, ¡ver como te acabas una manzana entera! Andrea, trabajar contigo ha sido un lujo, no

sólo porque como biotecnóloga no tienes precio, sino también por tu calidad humana. Eres una de las personas más generosas y solidarias que conozco, además de una luchadora infatigable. Y si el refrán es cierto y “todo se pega”, ojalá a todos se nos peguen un poquito tu energía y tus ganas de cambiar las cosas. Eso sí, seguiré cogiendo las puntas en orden eh... Albert, los dos sabemos que tú y yo no empezamos con buen pie, porque cuando no llevabas ni una semana en el laboratorio tuvimos (o más bien tuve) cierto encontronazo con una caja de cartón. Pero, superado este incidente (y algún otro...), ha sido un placer trabajar a tu lado. Sabes que, aunque me queje, agradezco que me chinches, que me intentes enfadar y que me muestres lo que es la “ira” de vez en cuando. Y sé que, aunque te quejes, agradeces que saque a la luz tu faceta sensible (algún día conseguiré que aprendas a darte cuenta de cuándo alguien necesita un abrazo). ¡Eres un cascarrabias muy divertido! Meri (¿eh? ¿qué? ¿qué dices?). Por tu energía y tus ganas de hacer cosas, tu espontaneidad y porque eres un trozo de pan. Por eso da gusto tenerte como compañera día a día. Nunca lo pierdas. ¡Ah! ¡Y coge trozos de papel más grandes para la comida! Fede, nuestra *donna* italiana. Por tu carácter y tu naturalidad, por no tener pelos en la lengua y por hacer de las comidas todo un espectáculo. Contigo nunca faltará el toque de humor en el laboratorio. Eso sí, no te juntes mucho con Albert que la mezcla puede ser explosiva...

Al equipo del “LAB 2”. Carlota, ¡eres una *crack!* Desde primera hora de la mañana hasta última hora de la tarde, y por duro que sea el día, tienes las pilas a tope y la sonrisa en la cara. Así que gracias por compartir y contagiarnos esa alegría a todos. Es una de esas cosas que hacen que ir a trabajar sea mucho más fácil y que tomar unas bravas sea muy divertido (y, desde luego, también viene bien a la hora de enfrentarse a unos niños descontrolados o a una rata malhumorada...). Denis, nuestro *brasileiro* (o eso ha querido hacernos creer). Con ese sigilo que te caracteriza, y que me ha supuesto más de un susto en el *lab*, te has hecho un hueco enorme en todos nuestros corazones. Gracias por saber escuchar tan bien, por enfadarte sin enfadarte y por traer un poquito de tranquilidad a este laboratorio de locos. Espero verte pronto por Brasil, porque por aquí se te echa mucho de menos. ¡Escribano! Venga va, cuéntame la verdad, ¿cómo te las apañas para hacer 30 cosas a la vez, sacar tiempo para ayudarnos a los demás y encima no volverte loca? (bueno, alguna vez sí, pero pocas). ¡Te debo unos mil *fujitsu* de esos! Joan Colom, sabes que fue un placer tenerte como colaborador, eres un solete, un caballero (aunque te chinche, en el fondo me gusta que me sujeten la puerta de vez en cuando para pasar) y siempre estás ahí para ayudar cuando se te necesita. Espero que disfrutes mucho esta etapa que casi acabas de empezar. Y Eva, porque aunque hayamos compartido poquito tiempo en el laboratorio, ha sido suficiente para ver que eres un encanto ¡y que vas a cuidar muy bien de nuestro *pipum!*

Cómo no, quiero dar las gracias también a Joan Ruiz, el hombre que todo lo sabe. Primero porque sin tu ayuda el laboratorio se nos viene abajo (ya sabes que si te vas de vacaciones los aparatos lo saben, ¿no?). Segundo, y más importante, por las charlas que hemos compartido, por confiar en mi, por permitir que confíe en ti y por dejarme sacar ese ladito soñador que con según quién da vergüenza sacar. Y, por supuesto, por ese humor sarcástico que siempre me sacaba una sonrisa. ¡*Miniyo!* ¿Ya pensabas que me olvidaba de mi proveedora oficial de granadas? Gracias por estar ahí, siempre optimista y haciéndome ver el lado bueno de las

cosas, por ayudarme siempre en el laboratorio y en las prácticas cuando estaba un poco perdida y por hacerlo todo mucho más divertido.

También quiero dar las gracias a todos los que ya no estáis. Anna, mi mami en el “LAB 1”, por todo lo que me has enseñado y ayudado y por todas las risas (que han sido muchas). Un beso a ti y a toda la familia. Gerard, el hombre con mejor memoria del mundo. Gracias por estar siempre ahí, has sido un fantástico compañero ¡y un mejor vecino! Jesús, menos mal que no he pasado ningún 28 de diciembre cerca de ti... Gracias por la paciencia en mis primeros días en el laboratorio. Natalia, personas con tanto empeño y ganas de hacer cosas como tú da gusto tenerlas alrededor. Estela, poco te puedo decir que no sepas. Desde que nos conocimos has sido uno de mis mejores apoyos dentro y fuera del laboratorio. Sólo espero haber podido corresponderte un poquito pequeñito. Eres una persona maravillosa (aunque un poco patosilla, eso no se puede negar). Y la que tiene mejor oído para los acentos, por cierto... Ari, *cookieee*, ¿qué te voy a contar a ti también? Desde el primer día nos demostraste que eres todo dulzura, siempre preocupándote por los demás y haciendo lo que haga falta para ayudar. He pasado los mejores ratos contigo en el estabulario (¡esos Swiss no podían con nosotras!) y, desde luego, los mejores fuera de él (aunque a veces me saques los colores...). Y todos los que me faltan, Paula, Neus, Yuli, Montse R., nuestros colaboradores Sergi, Albert, Carla... Ha sido genial trabajar con vosotros.

No puedo olvidarme de “Los Otros”, que siempre están “al otro lado”. Gracias a todos por compartir tantos buenos ratos, alguna que otra centrífuga y las risas en la comida. Era un estrés saltarse los turnos no escritos y estar apretujados en la mesa, ¡pero era cuando mejor lo pasábamos! Y gracias en especial a Laura G. y a Naroa, el *Dream Team* del Micro. Industrial, por hacerlo todo más divertido, por compartir estreses (ya sea organizando vídeos o por el trabajo en el laboratorio) y por preocuparos por mi en esta última etapa en la que a veces los nervios agotan a cualquiera. ¡Ánimo chicas que vosotras podéis con todo!

También quiero dar las gracias a Juan y Oihane. Lo que empezó siendo un grupo de trabajo “por conveniencia” (todos estábamos en el departamento y era fácil organizarse) ¡se ha convertido en el chiste perfecto! Gracias por estar a mi lado todos estos años, por gritar conmigo cuando necesitaba gritar, por contarme un chiste cuando necesitaba reírme, por enfadaros con el mundo cuando yo también lo estaba para no dejarme sola. Pero, por encima de todo, gracias por hacerme partícipe de vuestros gritos, vuestras risas y vuestros enfados, porque son los que de verdad me importan. Y gracias también a Borja y Marina, por ese pedazo corazón que tenéis y porque este chiste no sería perfecto sin vosotros, ya lo sabéis.

Quiero agradecer de forma muy especial el apoyo que he recibido de todos mis amigos estos años. Habiéndonos dedicado todos a mundos tan distintos, sé que no debe ser fácil aguantar las historias de una microbióloga estresada porque le cuesta construir un mutante o porque no le ha ido bien la extracción de RNA. Así que gracias a todos por armaros de paciencia y no volveros locos conmigo. A mis amigos de Barcelona, gracias por hacer que me sienta como en casa tan lejos de casa. Sois mi segunda familia. A mi gente de Zaragoza, gracias por hacerme sentir como a una más desde el primer día y por vuestra naturalidad (no sé si llamarlo brutalidad...). Y a mis amigos de Elche. Vosotros os merecéis un gracias gigante porque, a pesar

de que llevo 8 años viviendo lejos de vosotros, a pesar de que nos vemos una vez cada dos o tres meses (con suerte, porque a los que también vivís fuera de Elche os veo incluso menos) y a pesar de que me niego a hacerme un *facebook* porque ya sabéis que soy una rebelde, a pesar de todo eso seguís estando ahí siempre, incondicionalmente. Gracias de todo corazón.

También quiero dar las GRACIAS, estas sí, en mayúsculas, a toda mi familia, directa o indirecta. Todos me habéis apoyado siempre, habéis estado a mi lado a las duras y a las maduras y, sobre todo, habéis creído y confiado en mí, así que de todos vosotros hay un trocito en este trabajo. Pero quiero agradecer de forma muy especial a algunos de vosotros el apoyo constante (perdonadme el resto, por favor). En primer lugar, a mi abuelita María. Eres un ejemplo de optimismo, de energía y de bondad para todos los que te rodean. Ya lo sabes, porque te lo he dicho un millón de veces, pero te lo repito: ¡yo de mayor quiero ser como tú! En segundo lugar a mi tía (/hermana/compañera de piso/compañera de jarana/paño de lágrimas...) Lucía. Te tendría que agradecer muchas cosas, pero, sobre todo, te agradezco que estés ahí para mi familia cuando yo, porque estoy lejos o porque no sé, no puedo. En tercer lugar, a mi hermano, porque aunque somos la noche y el día y aunque se haga el duro, no puede evitarlo, me quiere. Y por último, a mis padres. Para vosotros necesitaría otra tesis porque en esta no cabe todo lo que os tengo que agradecer. Gracias por educarme e inculcarme los valores necesarios para ser quien soy, por empujarme a llegar siempre un poquito más lejos, por estar a mi lado cuando me caía pero enseñándome siempre que tenía que levantarme yo sola, por “llorarme la mitad” y, sobre todo, por no dejar que me olvide nunca de que donde estéis vosotros está mi casa.

Para acabar, quiero darle las gracias a Ángel. Por un millón de razones que tampoco caben en unas líneas. Por creer en mí y estar siempre ahí para ayudarme, por aguantar mi TOC (y hacerme terapia de choque...), por no quejarte nunca porque con una *quejica* en la pareja ya hay bastante, por sacar la energía que a mí a veces me faltaba, por enfadarte cuando yo no podía y, sobre todo, porque contigo nunca me falta una sonrisa, y esa siempre es la mejor medicina.

Gracias a todos de todo corazón.



