



## Agradecimientos

Concluido este trabajo fin de máster, me gustaría dar las gracias a todas aquellas personas que de una u otra manera han hecho posible que esta elaboración sea factible.

En primer lugar, agradecer a Iñigo Lasa y a Cristina Solano esta oportunidad, su dirección y todo el apoyo prestado, sin los cuales este trabajo no hubiese sido posible.

A Maite Echeverz, por todo su tiempo invertido, su paciencia, su apoyo, pero sobre todo por todos los buenos momentos que hemos pasados durante estos meses. Gracias “jefa” por estar al pie del cañón en todo momento.

A mi compañera Amaia Sabalza, has sido la mejor compañera que podía tener, siempre disponible y atenta, con la sonrisa puesta en su sitio. Después de todas las horas que hemos pasado juntas me voy con la sensación de que te conozco de toda la vida, pero aparte de todo lo que hemos aprendido en este “mano a mano”, sé que de este trabajo, me llevo también una amiga genial.

A todos los biofilm, y a Victor, por cómo me habéis acogido en vuestro grupo, por toda esa paciencia que habéis demostrado tener para todas las mil y una dudas que han ido surgiendo, por esos ánimos y empatía en momentos de desesperación, y por todos los momentos de desconexión y horas “biofilm” que he vivido aquí. Sois geniales. También, una mención especial a Saioa Burgui, nuestra compañera de poyata, gracias por toda tu paciencia y todos esos consejos para los distintos experimentos.

Por último, y no por ello menos importante, a mis amigas y mi familia. Gracias por estar ahí, por escucharme aunque no supieses lo que estaba diciendo incluso llegando a dudar de mi cordura, por todos los ánimos que me habéis dado a lo largo de todo el master y por estar siempre ahí para todo. Gracias.

# Índice

Índice de Figuras .....	3
Índice de tablas .....	3
Resumen .....	4
Abstract.....	5
1.Introducción.....	6
I. <i>Salmonella</i> .....	6
II. Biofilms .....	7
III. El sistema de transducción de señal mediado por c-di-GMP .....	8
IV. Riboswitches regulados por su unión a c-di-GMP .....	10
2.Objetivo .....	12
3.Material y métodos .....	14
I. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.....	14
II. Plásmidos .....	15
III. Oligonucleótidos .....	17
IV. Enzimas utilizadas y amplificación de ADN.....	17
V. Transformación de bacterias .....	18
VI. Purificación de ADN .....	18
VII. Electroforesis .....	19
VIII. Obtención de extractos de proteínas.....	19
IX. Cuantificación de proteínas.....	19
X. Ensayo $\beta$ -galactosidasa .....	20
XI. Construcción de los plásmidos pXG10:: $P_{LtetO-1}$ Vc2 y pXG10:: $P_{Vc2}$ Vc2.....	20
XII. Cuantificación de la proteína GFP .....	21
XIII. Construcción del plásmido pGEX 6P-2:: $Vc2$ .....	22
XIV. Cuantificación de la expresión de la proteína GST.....	22
4.Resultados y discusión .....	23

I. Cuantificación de los niveles intracelulares de c-di-GMP mediante el plásmido pRS414::P <sub>Vc2</sub> Vc2 .....	23
II. Cuantificación de los niveles intracelulares de c-di-GMP utilizando el gen reporter <i>gfp</i> .....	24
III. Desarrollo de un sistema reporter que funcione como un interruptor en “ON” en presencia de c-di-GMP .....	29
5.Conclusiones.....	33
6.Bibliografía.....	34

## Índice de Figuras

Figura 1. Biofilms bacterianos y el sistema de transducción mediado por c-di-GMP (Krasteva et al., 2012).....	9
Figura 2. Riboswitch Vc2 de Vibrio Cholerae (Sudarsan et al., 2008).....	11
Figura 3. Análisis de la expresión de un gen reporter fusionado traduccionalmente al riboswitch VC2 WT o a sus derivados mutantes (Sudarsan <i>et al.</i> , 2008)..	12
Figura 4. Mapas de plásmidos comerciales o donados.....	16
Figura 5. Ensayo de la actividad $\beta$ -galactosidasa en extractos de cepas de <i>Salmonella</i> con el plásmido pRS414::P <sub>Vc2</sub> Vc2, que contiene el gen <i>lacZ</i> fusionado traduccionalmente al riboswitch Vc2 .....	24
Figura 6 Cuantificación de la expresión del gen <i>gfp</i> fusionado con el riboswitch Vc2 en los plásmidos pXG-10:: P <sub>LtetO-1</sub> Vc2 y pXG10::P <sub>Vc2</sub> Vc2..	26
Figura 7. Imágenes representativas de tres cepas transformadas con los plásmidos pXG10::P <sub>LtetO-1</sub> Vc2 y pXG10::P <sub>Vc2</sub> Vc2 observadas al microscopio.....	28
Figura 8. Funcionamiento del riboswitch Vc2 en presencia o ausencia de c-di-GMP.....	29
Figura 9. Funcionamiento del sistema reporte basado en el plásmido pGEX6P-2:Vc2. ....	30
Figura 10. 6 Cuantificación de la expresión del gen <i>gst</i> fusionado con el riboswitch Vc2 en el plásmido pGEX 6P-2::P <sub>Vc2</sub> Vc2.....	31

## Índice de tablas

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio .....	14
Tabla 2. Plásmidos utilizados en este estudio.....	15
Tabla 3. Oligonucleótidos .....	17

## Resumen

El c-di-GMP es un mensajero secundario bacteriano involucrado en la regulación de numerosos procesos biológicos. Además, ejerce un papel esencial en la regulación de la transición de un modo de vida planctónico a biofilm. Para llevar a cabo su función, el c-di-GMP se une específicamente a moléculas efectoras, que traducen esta señal en una respuesta celular específica. Entre dichos efectores se encuentran proteínas con dominios de unión a c-di-GMP (PilZ), reguladores transcripcionales y riboswitches. Los riboswitches son moléculas de ARN no codificantes. Están localizados, generalmente, en la región 5'UTR de un ARNm y regulan la expresión génica mediante la unión a un ligando (como c-di-GMP). Los niveles de c-di-GMP en el citoplasma de una bacteria son muy bajos y su cuantificación resulta difícil.

En este trabajo, se han diseñado tres sistemas “reporter” de los niveles intracelulares de c-di-GMP *in vivo* de aplicación general. Estos sistemas están basados en la utilización de un riboswitch, capaz de controlar la expresión de genes fusionados al mismo en función de los niveles de c-di-GMP. En dos de estos sistemas, la fusión es con genes “reporter”, así, dependiendo de los niveles intracelulares de c-di-GMP, los niveles de proteína reporter varían de forma inversamente proporcional a la cantidad de c-di-GMP. En el último de los sistemas, el riboswitch está fusionado con *lac I* y el gen reporter está bajo un promotor reprimible por *lac I*, controlando así la cantidad de proteína reporter de forma directamente proporcional al nivel de c-di-GMP. Para valorar la utilidad de estos sistemas se han utilizado cepas de *Salmonella* con diferentes cantidades de c-di-GMP.

## Abstract

Cyclic di-GMP is a bacterial second messenger that regulates a myriad of biological processes and also plays a key role in the regulation of lifestyle changes, including transition from the motile state to biofilms communities. There are many c-di-GMP specific receptors which translate a specific environmental signal into a specific cellular answer, carrying out c-di-GMP functions. These effectors are proteins with c-di-GMP binding domains (PilZ), transcriptional regulators or riboswitches. Riboswitches are noncoding RNA molecules that are located in the 5'UTR region of an mRNA and regulate the expression of downstream genes by ligand binding (like c-di-GMP). Intracellular levels of c-di-GMP in bacteria are very low and their quantification becomes difficult.

In this project, three reporter systems for in vivo measurement of intracellular levels of c-di-GMP in bacteria have been designed. These systems are based on the use of a c-di-GMP riboswitch that regulates the expression of a gene fused with it. In two of these systems, the riboswitch is directly fused with reporter genes, hence high levels of c-di-GMP cause a decrease in levels of the reporter proteins. In the third system, the riboswitch is fused with the *lac I* gene, and the reporter gene is controlled by a promoter repressible by *lac I*. In this case, the amount of reporter protein is proportional to the c-di-GMP concentration. In order to validate these systems, three different *Salmonella* strains with diverse levels of c-di-GMP were used.

# 1. Introducción

## I. *Salmonella*

El género *Salmonella*, que está estrechamente emparentado con el género *Escherichia*, está compuesto por bacterias bacilares, Gram-negativas, no esporulantes, que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacterias anaerobias facultativas y peritricas, es decir, muestran capacidad de movimiento en todas las direcciones, gracias a la presencia de flagelos distribuidos uniformemente por su superficie.

Este género se divide en tres especies, *S. enterica*, *S. bongori* y *S. subterranea*. Además, *S. enterica* puede dividirse en seis subespecies:

- (1) *S. enterica* subsp. *enterica*,
- (2) *S. enterica* subsp. *salamae*,
- (3) *S. enterica* subsp. *arizonae*,
- (4) *S. enterica* subsp. *diarizonae*,
- (5) *S. enterica* subsp. *houtenae*
- (6) *S. enterica* subsp. *indica*

Estas subespecies incluyen a su vez más de 2500 serovares diferentes dependiendo del tipo de cadena O presente en el lipopolisacárido y su antígeno flagelar (H) (Popoff *et al.*, 2003). Más del 50% de estos serovares pertenecen a *S. enterica* ssp. *enterica* (1) y son responsables del 99% de los casos de salmonelosis en humanos y animales de sangre caliente. *S. bongori* y *S. subterranea* junto con el resto de las subespecies de *S. enterica* han sido aisladas de animales de sangre fría y del ambiente (Brenner *et al.*, 2000).

En este trabajo fin de máster se va a trabajar con cepas de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* ser. *Enteritidis*.

El estudio de *Salmonella* es de gran interés, ya que es una bacteria que es capaz de infectar huéspedes de un amplio rango de especies de mamíferos, aves y reptiles. Las dos principales enfermedades causadas por *Salmonella* son las fiebres tifoideas o entéricas y las colitis o diarreas debidas a la ingestión de agua o alimentos contaminados.

Uno de los factores responsables de la capacidad infectiva de *Salmonella* es el hecho de que puede formar biofilms, tanto en superficies bióticas (como cálculos



biliaries, tejidos vegetales, semillas, células epiteliales, etc.) como en abióticas (como por ejemplo sobre vidrio, plásticos y aceros inoxidables de establos, instalaciones industriales, etc.). La capacidad de formación de biofilm de *Salmonella* y la adaptación a distintas condiciones ambientales le permiten transitar durante su ciclo de vida desde el ambiente al huésped animal y viceversa (Solano *et al.*, 2009, Fabrega & Vila, 2013, Robijns *et al.*, 2014, Steenackers *et al.*, 2012).

## II. Biofilms

Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz extracelular que ellos mismos producen y adheridos a una superficie inerte o a un tejido vivo. El crecimiento en biofilms representa la forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza. La capacidad de formación del mismo no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos, y parece que bajo las condiciones ambientales adecuadas, todos los microorganismos son capaces de formar biofilms.

Aunque la composición del biofilm es variable en función del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario del biofilm es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz del biofilm es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, ADN y productos diversos procedentes de la lisis de las bacterias (I. Lasa, 2005).

En *Salmonella*, tres componentes de la matriz extracelular juegan un papel esencial en la formación del biofilm: el exopolisacárido celulosa, las fimbrias de tipo curli y la proteína BapA (Zogaj *et al.*, 2001, Solano *et al.*, 2002, Latasa *et al.*, 2005). La síntesis de celulosa depende de las proteínas codificadas en los dos operones de expresión constitutiva, *bcsABZC* y *bcsEFG*. La información para la producción, biosíntesis y el ensamblaje de las fimbrias curli está codificada en los operones *csgBAC* y *csgDEFG*. Por otra parte, la adhesión mediada por fimbrias tipo 1, Lpf y Pef, también contribuyen a la formación de biofilms en diferentes modelos *in vivo* e *in vitro* (Steenackers *et al.*, 2012).

La matriz del biofilm no presenta una arquitectura sólida, sino que posee canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno, incluso hasta las zonas más

profundas del biofilm. Sin embargo, la existencia de estos canales no evita que dentro del biofilm se puedan encontrar ambientes diferentes, en los que la concentración de nutrientes, oxígeno o el pH es diferente. Esta circunstancia aumenta la heterogeneidad respecto al estado fisiológico en el que se encuentra la bacteria dentro del biofilm y dificulta su estudio (Okako Omadjela & Zimmer, 2013, I. Lasa, 2005).

Las bacterias del biofilm están protegidas por la matriz extracelular y muestran mayor tolerancia a factores ambientales de estrés, como la desecación, antibióticos, desinfectantes y el sistema inmune de los huéspedes. Como consecuencia de esto, la erradicación de los biofilms es extremadamente difícil y su presencia está asociada a numerosas infecciones de tipo crónico (Steenackers *et al.*, 2012).

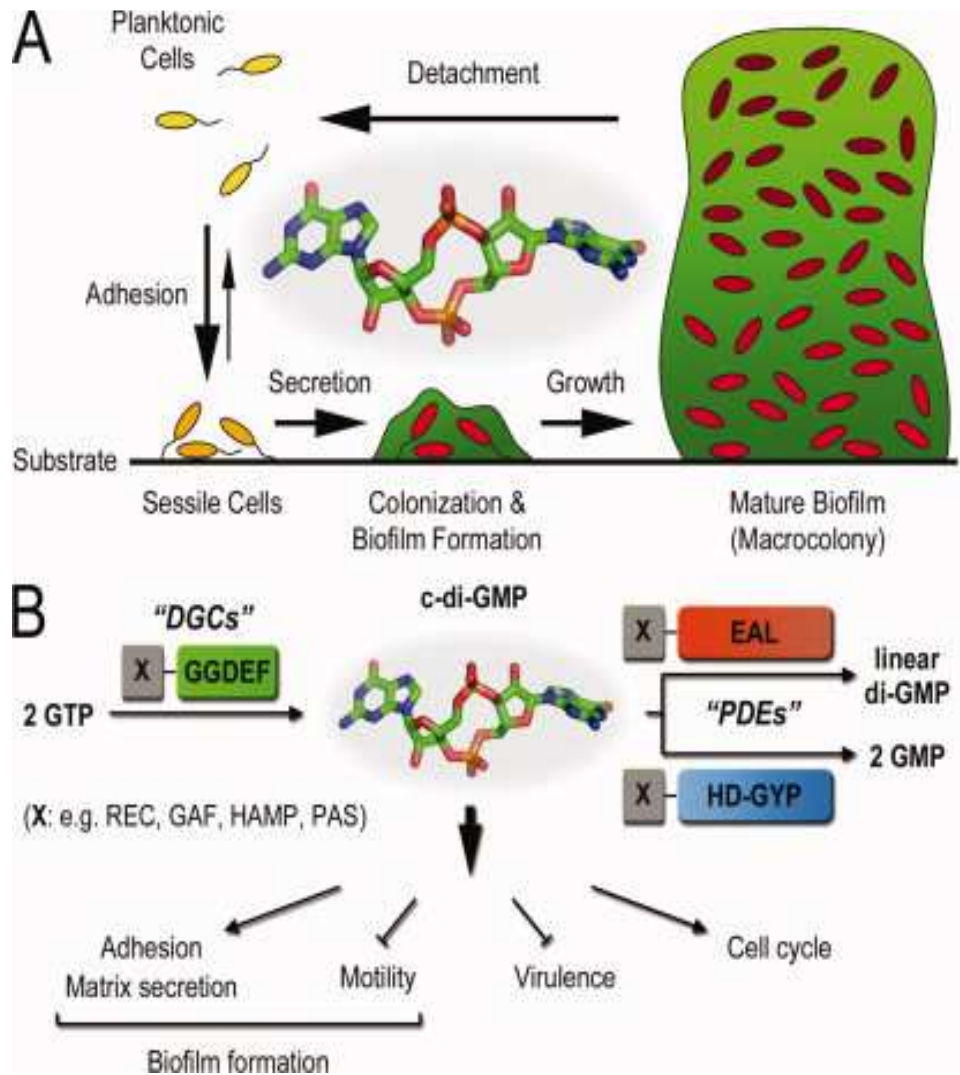
El proceso de formación del biofilm consta de tres etapas. La etapa inicial es la de adherencia sobre la superficie donde se va a formar esta película. Posteriormente la bacteria comienza a secretar exopolisacáridos y otras moléculas, constituyendo la matriz del biofilm. Finalmente, algunas bacterias de la matriz del biofilm se liberan del mismo para poder colonizar nuevas superficies, cerrando así el proceso (Fig. 1).

Numerosos estudios han demostrado que el proceso de formación de biofilm está regulado por una compleja cascada de reguladores. Existe regulación a nivel transcripcional y postranscripcional del proceso. En el caso de *Salmonella*, la matriz del biofilm está compuesta mayoritariamente por celulosa, cuya síntesis se activa por el activador alostérico bis-(3'-5')- monofosfato de guanosina cíclico (al que a partir de ahora se nombrará como c-di-GMP) (I. Lasa, 2005).

### **III. El sistema de transducción de señal mediado por c-di-GMP**

El nucleótido c-di-GMP fue descubierto en 1987 como un activador alostérico de la celulosa sintetasa bacteriana. Es una molécula pequeña cíclica, formada por dos bases nitrogenadas púricas, guanina, unidas por ribosa y fosfato. El número de funciones celulares a las que se ha asociado y cuya regulación depende de la presencia de c-di-GMP intracelular ha ido aumentando durante los últimos años, incluyendo la regulación del ciclo celular, la diferenciación, la comunicación intercelular, la movilidad y la virulencia de patógenos animales y de plantas. Además, ejerce un papel esencial en la regulación de la transición de un modo de vida planctónico o libre a un modo de vida sésil o en biofilm. Niveles altos de c-di-GMP activan por una parte la biosíntesis de

adhesinas y polisacáridos que forman parte de la matriz extracelular de los biofilms y por otra inhiben la movilidad bacteriana, asegurando así el modo de vida en comunidad (Fig. 1) (Romling *et al.*, 2013).



**Figura 1. Biofilms bacterianos y el sistema de transducción mediado por c-di-GMP (Krasteva *et al.*, 2012).** (A) Etapas del proceso de formación del biofilm. (B) El c-di-GMP como mensajero secundario. Las actividades enzimáticas opuestas diguanilato ciclasa (DGC), presentada por proteínas con dominios GGDEF, y fosfodiesterasa (PDE), presentada por proteínas con dominios EAL o HD-GYP, controlan el nivel celular de c-di-GMP. Generalmente, estas proteínas contienen además dominios sensores, los cuales controlan su actividad enzimática. Niveles altos de c-di-GMP en bacterias están asociados con la adhesión, la secreción de matriz extracelular y la formación de biofilm.

El c-di-GMP es sintetizado por enzimas con actividad diguanilato ciclasa (DGC), que contienen el dominio GGDEF, a partir de dos moléculas de guanosina trifosfato (GTP), en una reacción en dos etapas, en donde se genera 5'-pppGpG como metabolito intermedio de la reacción. Dos moléculas de pirofosfato reaccionan como subproductos. Por otro lado, el c-di-GMP es degradado a la forma 5'-fosfoguanil-(3'-5')-guanósina

(pGpG) o a dos moléculas de GMP por una familia específica de fosfodiesterasas (PDEs), las cuales contienen dominios proteicos EAL o HD-GYP, respectivamente. Por tanto, se puede decir que enzimas DGCs y PDEs regulan los niveles intracelulares de c-di-GMP (Fig. 1).

El hecho de que, en todos los principales *phyla* bacterianos se haya demostrado la presencia de enzimas de síntesis y degradación de c-di-GMP, ha promovido el estudio del c-di-GMP y su reconocimiento como un mensajero secundario universal.

Normalmente, una bacteria tiene muchas proteínas GGDEF y EAL o HY-GYP, sin embargo el número de receptores para el c-di-GMP es mucho menor. Los receptores del c-di-GMP participan en la regulación de las funciones específicas asociadas a la presencia de c-di-GMP en la bacteria. Se han identificado como receptores del c-di-GMP a proteínas que contienen el dominio PilZ, diversos factores transcripcionales e incluso riboswitches, entre otros.

El c-di-GMP difunde libremente por el citoplasma de la bacteria como una pequeña molécula hidrófila. Se ha realizado un gran esfuerzo por medir los niveles intracelulares de c-di-GMP en numerosas especies bacterianas, y se ha observado que su concentración es del rango micromolar o menor, sin tener en cuenta las posibles fluctuaciones locales y puntuales. Concentraciones tan pequeñas hacen que su cuantificación resulte metodológicamente muy difícil, siendo necesario recurrir a técnicas de espectrometría de masas de última generación para lograr su detección. En cuanto a la cuantificación *in vivo* se ha desarrollado, por una parte, un método basado en la técnica FRET (transferencia de energía de resonancia fluorescente) cuya aplicación requiere de instrumental muy sofisticado (Christen *et al.*, 2010) y por otra, un sistema “reporter” basado en la fusión de un promotor que responde a niveles de c-di-GMP fusionado a la proteína GFP, que es específico para *Pseudomonas aeruginosa* (Rybtke *et al.*, 2012).

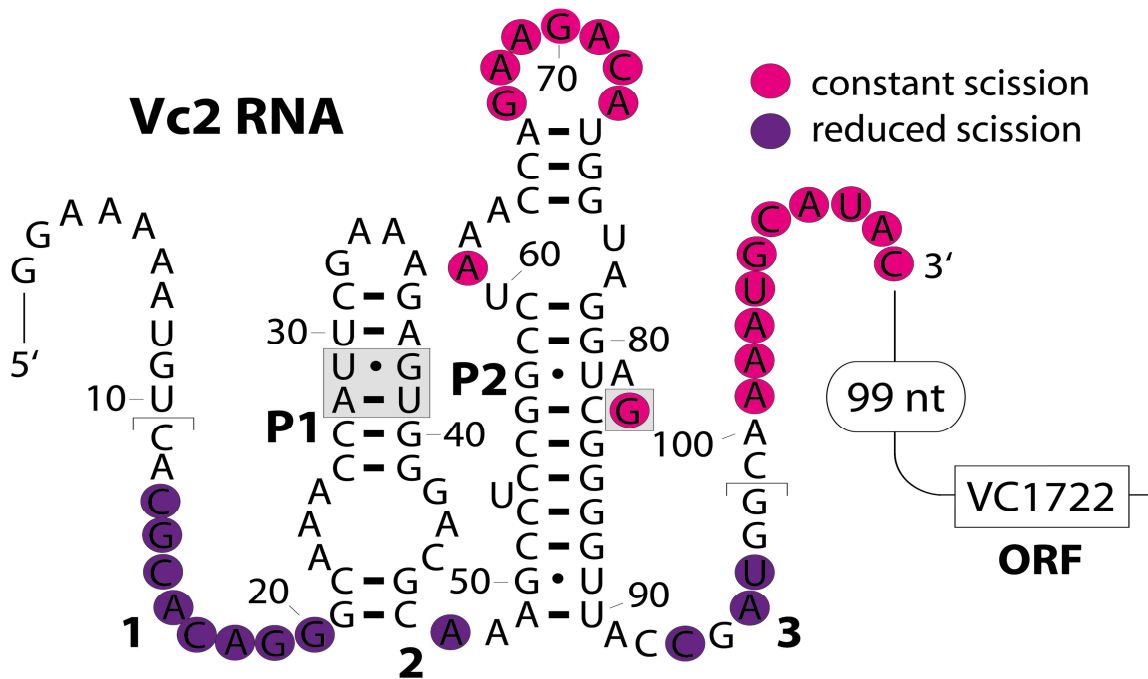
#### **IV. Riboswitches regulados por su unión a c-di-GMP**

Los microorganismos experimentan una amplia variedad de condiciones ambientales fluctuantes causadas por los cambios en el entorno o por la variación de las demandas metabólicas. Las células deben ser capaces de cuantificar estos cambios y alterar la expresión de subconjuntos de genes de forma exacta. Existen una gran variedad de mecanismos que permiten a los microorganismos controlar la expresión

génica en respuestas a condiciones extracelulares e intracelulares. Uno de estos mecanismos se basa en ARNs no codificantes, denominados riboswitches, que están localizados generalmente en la región 5'UTR de un ARNm y que regulan la expresión génica mediante la unión a una pequeña molécula o ligando. Estos ARNs están formados por un dominio muy conservado denominado aptámero y por una plataforma de expresión. El aptámero reconoce al ligando con una alta afinidad y especificidad. Dicha unión produce cambios en la estructura de la plataforma de expresión del riboswitch, dando lugar a cambios en la transcripción, la estabilidad del ARN mensajero o en la traducción del ARNm. En las bacterias existen numerosas clases de riboswitches, constituyendo, un sistema muy robusto y común de detección de metabolitos (Breaker, 2005).

Recientemente se ha descubierto la existencia de riboswitches que unen c-di-GMP, siendo su afinidad sustancialmente mayor a la de los receptores proteicos que se han descrito hasta el momento. Los riboswitches que unen c-di-GMP se dividen en dos tipos, los de clase I (c-di-GMP-I) y los de clase II (c-di-GMP-II) (Sudarsan *et al.*, 2008).

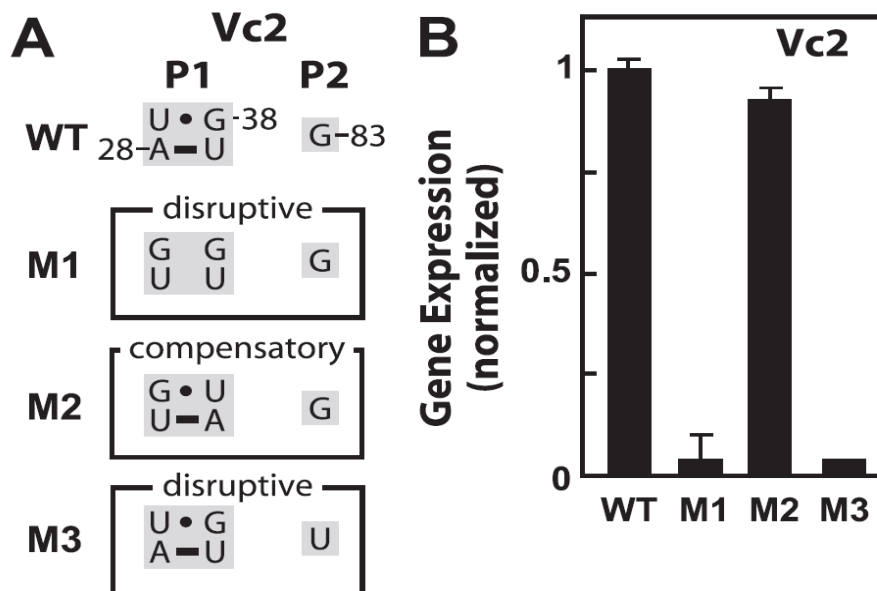
En este trabajo fin de máster se ha trabajado con el riboswitch Vc2 (Fig. 2) de la clase I, procedente de *Vibrio cholerae* y que se encuentra en la región 5'UTR del gen VC1722, homólogo a *tfoX*.



**Figura 2. Riboswitch Vc2 de Vibrio Cholerae (Sudarsan *et al.*, 2008).** Secuencia y estructura del aptámero de c-di-GMP VC2 de *V. cholerae*. P1 y P2 son regiones de emparejamiento de bases. Los números 1, 2 y 3 se corresponden con regiones cuya estructura se modula mediante la unión al ligando.

En este riboswitch se ha descrito una región de gran importancia para la unión con el ligando c-di-GMP (zona comprendida entre el número 1 y el número 3 mostrados en la Figura 2), pudiéndose destacar dos regiones altamente conservadas P1 y P2 que forman parte del aptámero del riboswitch Vc2 (Sudarsan *et al.*, 2008).

Para analizar la función del riboswitch Vc2, Sudarsan et al. (Sudarsan *et al.*, 2008) construyeron una fusión traduccional del riboswitch con un gen que codifica la proteína  $\beta$ -galactosidasa. Además, construyeron fusiones traduccionales con derivados mutantes del riboswitch en la región P1 (mutantes M1, M2 o M3) tal y como se muestra en la Figura 3. El análisis de la expresión del gen reportero en cepas de *E. coli* transformadas con los diferentes plásmidos sugirió que el riboswitch Vc2 funciona como un interruptor traduccional en “ON” en presencia de c-di-GMP.



**Figura 3. Análisis de la expresión de un gen reportero fusionado traduccionalmente al riboswitch VC2 WT o a sus derivados mutantes (Sudarsan *et al.*, 2008).** (A) Secuencia de RNA de las regiones P1 y P2 de las distintas formas WT y mutantes (M1, M2 y M3) del riboswitch. (B) Ensayo de actividad  $\beta$ -galactosidasa de extractos de una cepa de *E. coli* transformada con los diferentes plásmidos que contienen el gen *lac Z* fusionado traduccionalmente a las distintas formas del riboswitch descritas en la parte A de la figura.

## 2. Objetivo

Teniendo en cuenta todo lo anterior, en este trabajo fin de máster, se pretende diseñar un sistema “reporter” para la cuantificación de los niveles intracelulares de c-di-GMP en el citoplasma de las bacterias. Este sistema estará basado en la utilización de un riboswitch que reconoce c-di-GMP y que controlaría la expresión de genes reportero ( $\beta$ -

galactosidasa, GFP) dependiendo de los niveles de c-di-GMP presentes en el citoplasma de la bacteria. La idea es que los niveles de proteína reporter sean proporcionales a los niveles de c-di-GMP intracelulares. El plásmido conteniendo el cassette del riboswitch y el gen reporter se introducirá en cepas de *Salmonella* que presentan diferentes cantidades intracelulares de c-di-GMP para poder así valorar la utilidad del sistema para cuantificar los niveles de c-di-GMP en una bacteria viva.

### 3. Material y métodos

#### I. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas que se han utilizado en este trabajo fin de máster se recogen en la tabla 1.

**Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio**

Cepas	Características relevantes	Fuente o referencia
<b><i>Salmonella Enteritidis</i></b>		
3934	Aislado clínico; cepa salvaje (WT)	MIC 54 (Solano <i>et al.</i> , 2002)
ΔXII	3934 Δ <i>adrA</i> Δ <i>sen1023</i> Δ <i>yeaJ</i> Δ <i>yciR</i> Δ <i>yegE</i> Δ <i>yfiN</i> Δ <i>yhda</i> Δ <i>sen3222</i> Δ <i>yhjK</i> Δ <i>sen4316</i> Δ <i>yfeA</i> Δ <i>sen2484</i> Derivado de cepa 3934, mutante múltiple en los doce genes que codifican proteínas con dominio GGDEF. Incapaz de producir c-di-GMP.	MIC 1324 (Solano <i>et al.</i> , 2009, Zorraquino <i>et al.</i> , 2013)
ΔXII PcL rbs <i>adrA</i> 3xFlag	3934 <i>kmPcLrbsadrA</i> 3xFlag Δ <i>sen1023</i> Δ <i>yeaJ</i> Δ <i>yciR</i> Δ <i>yegE</i> Δ <i>yfiN</i> Δ <i>yhda</i> Δ <i>sen3222</i> Δ <i>yhjK</i> Δ <i>sen4316</i> Δ <i>yfeA</i> Δ <i>sen2484</i> Derivado de ΔXII en el que el gen <i>adrA</i> está bajo el control, del cassette <i>kmPcLrbs</i> (Da Re <i>et al.</i> , 2007), de manera que se expresa constitutivamente. Esta cepa contiene niveles muy altos, constitutivos, de c-di-GMP.	Laboratorio de Biofilms Microbianos
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
XL1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI</i> <sup>Z</sup> Δ <i>M15</i> Tn10(Tet <sup>r</sup> )]	Stratagene

El medio de cultivo general utilizado fue Luria-Bertani (LB) (Pronadisa) al que se añadió, según las necesidades, agar bacteriológico como agente gelificante (VWR) e IPTG (40 μg/ml) (Bioline). En algunos casos, los medios se suplementaron con antibióticos a las siguientes concentraciones finales: ampicilina (100 μg/ml), cloranfenicol (20 μg/ml) y kanamicina (50 μg/ml) (Sigma (St. Louis, USA)).

Para recoger las bacterias en diferentes estadios de su crecimiento, y por lo tanto, conteniendo diferentes concentraciones de c-di-GMP, se sembraron 40 μl de un cultivo



en fase estacionaria en placas de LB agar sin sal y éstas se incubaron durante 24 o 48 horas a 28°C.

Para determinar el color y la morfología colonial, se utilizaron placas de LB Agar sin sal conteniendo el colorante rojo congo (Rojo congo 40 mg/l y Comassie brilliant blue 20 mg/l) (Gerstel & Romling, 2001).

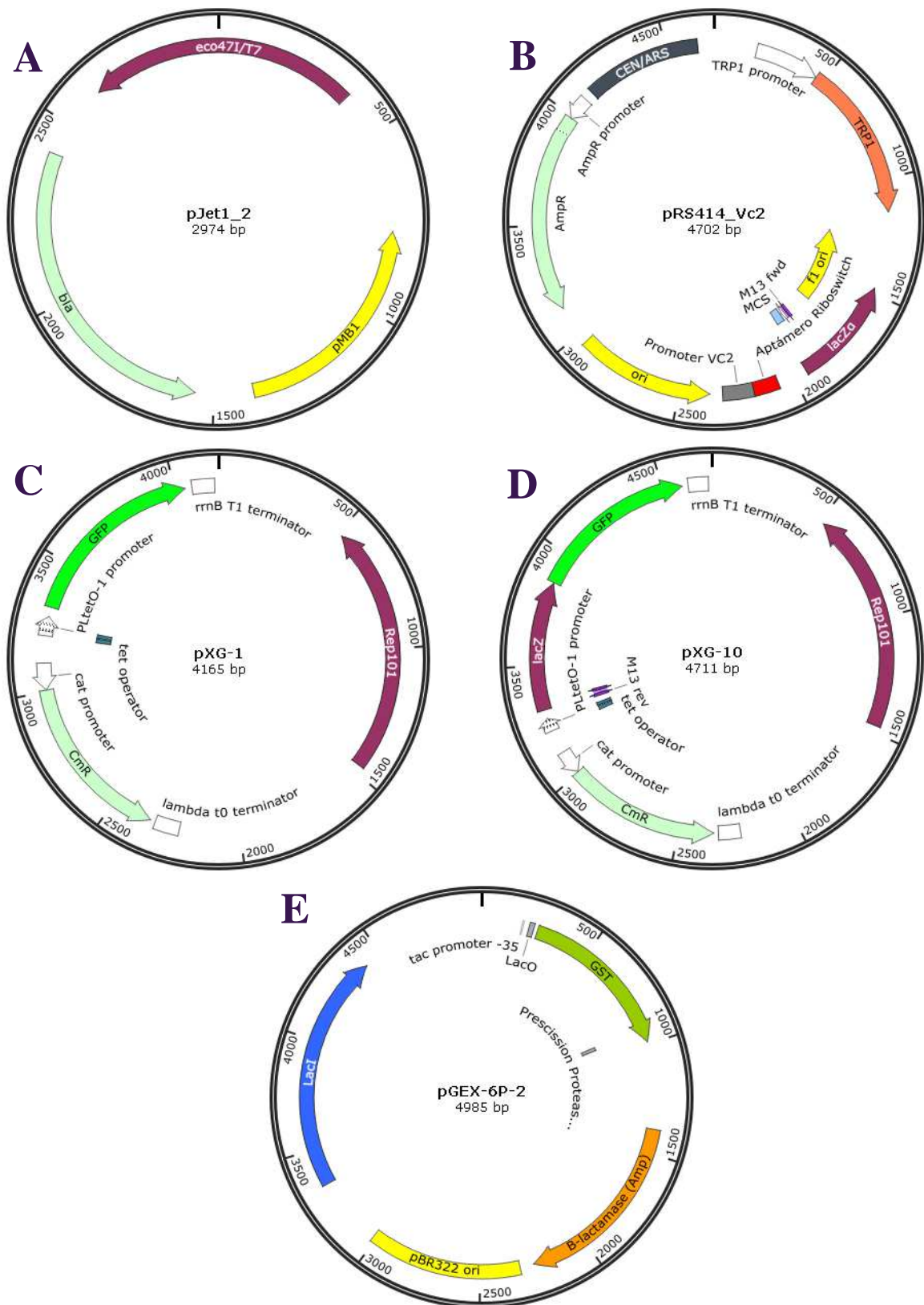
## II. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo fin de máster se describen en la tabla 2.

**Tabla 2. Plásmidos utilizados en este estudio**

Plásmidos	Características relevantes	Fuente o referencia
pJet 1.2	Plásmido de clonaje. <i>amp<sup>r</sup></i> , <i>eco47IR</i> (El gen letal <i>eco47IR</i> permite una selección positiva de los transformantes).	Thermo Scientific
pJet 1.2:: Vc2	Plásmido de clonaje en el que se ha insertado el riboswitch Vc2.	Este estudio
pJet 1.2::P <sub>Vc2</sub> Vc2	Plásmido de clonaje en el que se ha insertado el riboswitch Vc2 junto con su promotor.	Este estudio
pJet.12::P <sub>Vc2</sub> Vc2 bis	Plásmido de clonaje en el que se ha insertado el riboswitch Vc2 junto con su promotor.	Este estudio
pRS414:: P <sub>Vc2</sub> Vc2 <i>lacZ</i>	Vector para la cuantificación de c-di-GMP <i>amp<sup>r</sup></i> , riboswitch Vc2 bajo su propio promotor y fusionado traduccionalmente al gen <i>lacZ</i> .	(Sudarsan <i>et al.</i> , 2008)
pXG-1	Plásmido control de pXG10. Expresa GFP bajo el control de un promotor y una RBS constitutivos. <i>Cm<sup>r</sup></i>	(Urban & Vogel, 2007)
pXG-10	Vector que permite el clonaje de 5'UTRs fusionadas a GFP bajo el control de P <sub>LtetO-1</sub> , un promotor constitutivo derivado del promotor $\lambda P_L$ . <i>Cm<sup>r</sup></i>	(Urban & Vogel, 2007)
pXG10:: P <sub>LtetO-1</sub> Vc2	<i>Cm<sup>r</sup></i> , riboswitch Vc2 bajo el control de P <sub>LtetO-1</sub> y fusionado traduccionalmente al gen <i>gfp</i>	Este estudio
pXG10::P <sub>Vc2</sub> Vc2	<i>Cm<sup>r</sup></i> , riboswitch Vc2 bajo su propio promotor y fusionado traduccionalmente al gen <i>gfp</i>	Este estudio
pGEX 6P-2	<i>amp<sup>r</sup></i> ; Promotor <i>Ptac</i> ; gen <i>lacI<sup>q</sup></i> .  Vector para la expresión de proteínas recombinantes fusionadas a GST.	VWR
pGEX 6P-2::Vc2	Derivado de pGEX 6p_2. <i>amp<sup>r</sup></i> , riboswitch Vc2 bajo su propio promotor fusionado traduccionalmente al gen <i>lacI</i>	Este estudio

Además, los mapas de los plásmidos comerciales o donados por otros grupos de investigación se presentan en la figura 4.



**Figura 4.** Mapas de plásmidos comerciales o donados. A) pJet 1.2. B) pRS414::P<sub>Vc2</sub>Vc2. C) pXG-1. D) pXG-10. E) pGEX-6P-2.

### III. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados como cebadores en este trabajo fin de máster se recogen en la Tabla 3.

**Tabla 3. Oligonucleótidos**

Oligonucleótido	Secuencia	Tm
3' pGEX sequencing primer	ccgggagctgcatgtgtcagagg	76
5' pGEX sequencing primer	gggctggcaagccacgtttggtg	76
AatII PVC2-vc2 Fw	ggacgtcATAACGCCTATATTTGAAAG	52
NheI VC2 Rv	ggctagcTTTTAATACTGGTTTATCCATGCT	66
pGEX VC2 Rv	gtaattcagctccgcatcg	62
pGEX VC2 Rw	gggaaacgcctggtatcttt	64
pGEX6P2-lacI Fw	ccggaagatcgGAGCTCCCAGTAACGTTATACGATGT	76
pGEX6P2-LacI Rv	ttactaatctCCATGGCAGCTCACTCAAAGGCCGG	78
PstI VC2 Fw	gctgcagGGAAAAATGTCACGCACAGG	60
Ribos VC2 Fw	gCCATGGATAACGCCTATATTTGAAAGC	56
Ribos VC2 Rv	gGAGCTCTTTTAATACTGGTTTATCCATGCT	68

Todos los cebadores fueron diseñados a partir de la secuencia de los distintos plásmidos y proporcionados por la empresa Thermo Scientific.

### IV. Enzimas utilizadas y amplificación de ADN

La amplificación de ADN se ha realizado mediante la reacción en cadena de la enzima polimerasa (PCR). Para ello se han utilizado dos enzimas, ambas de la casa comercial Thermo Scientific:

- i. *Phusion polymerase* es una ADN polimerasa termoestable que presenta una alta fidelidad y se ha utilizado para amplificar ADN para clonaje. Requiere de una concentración alta de desoxinucleótidos (10mM dNTPs). En este caso la PCR se ha realizado en los siguientes pasos:
  - ~ El primer paso de desnaturalización del ADN, de 30 segundos a 98°C.
  - ~ El segundo paso consta de tres etapas: 10 segundos a 98°C; 30 segundos a la menor de las “temperaturas de melting” (Tm), y por último, una etapa de elongación a 72°C cuya duración depende de la longitud del fragmento a amplificar (30 segundos por cada 1.000 bases). Este ciclo se repite 29 veces.

- ~ El último paso de 10 minutos a 72°C.
- ii. Enzima *Dream Taq polimerasa*, se ha utilizado para confirmar si las bacterias contienen la construcción deseada. Esta enzima se ha utilizado con dNTPs a una concentración de 4mM. En este caso los pasos han sido los siguientes:
  - ~ El primer paso de desnaturalización de 3 minutos a 95°C.
  - ~ El segundo paso con las siguientes tres etapas: 30 segundos a 95°C; 30 segundos a T<sub>m</sub>°C y la etapa de elongación, cuya duración depende de la longitud del fragmento a amplificar (1 minuto por cada 1.000 bases), y a una temperatura de 72°C. Este ciclo se repite 29 veces.
  - ~ El último paso de 5 minutos a 72°C.

Para la digestión de ADN se han utilizado enzimas de restricción suministradas por tres casas comerciales (Thermo Scientific, New England Biolabs y Roche).

Para la ligación de fragmentos de ADN en plásmidos de clonaje y de expresión se ha utilizado la enzima comercial T4 *Ligasa* (Thermo Scientific) que cataliza la formación de puentes fosfodiéster entre los extremos 5'-fosfato y 3'-hidroxi-carboxilo de fragmentos de ADN de doble cadena. La reacción se produce a temperatura ambiente (RT) durante 30 minutos.

## V. Transformación de bacterias

Las células electro-competentes se prepararon según el protocolo de Wu et al. (Wu et al., 2010).

El método utilizado para la transformación bacteriana fue la electroporación (electroporador de Bio-Rad a 25µF, 200Ω y 1.25kV). Una vez producido el shock eléctrico, las bacterias fueron incubadas en LB durante una hora a 37°C. Tras este periodo, los transformantes se seleccionaron mediante plaqueo en medio LB agar suplementado con el antibiótico correspondiente.

## VI. Purificación de AADN

- a) Plásmidos: se utilizó el kit de purificación de ADN plasmídico NucleoSpin® Plasmid (MACHEY-NAGEL).

- b) Fragmentos de ADN provenientes de amplificación por PCR o digestiones enzimáticas desde gel de agarosa: Se siguió el protocolo descrito en el kit utilizado, Ultraclean 15 ADN Purification kit (MOBIO Laboratorios, Inc.).

## VII. Electroforesis

Para la separación de fragmentos de ADN se utilizaron geles horizontales de agarosa de bajo punto de fusión a una concentración del 1% en tampón TAE (Tris acetato 40mM, EDTA 1mM, pH8.0) y con bromuro de etidio para teñir el ADN, a un voltaje constante entre 80 y 120V.

Las bandas de ADN se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Chemi Doc de Bio-Rad).

## VIII. Obtención de extractos de proteínas

Colonias crecidas tras la incubación de 40 µl de un cultivo en fase estacionaria en placas conteniendo LB agar sin sal durante 24 o 48 horas a 28°C, se recogieron en 1ml de PBS. Tras vortexear, las bacterias se lisaron utilizando el FastPrep™ durante 40 segundos a una velocidad de 6. Tras la lisis se centrifugó durante 10 minutos a 14.000 rpm y se recogió el sobrenadante.

## IX. Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas a partir de los extractos se utilizaron dos métodos diferentes.

- a) **Bradford**: Se basa en la unión de un colorante a las proteínas. El colorante, azul de Comassie, en solución ácida, existe en dos formas, una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre (Bradford, 1976). Para la cuantificación se prepararon eppendorfs con distintas diluciones de la proteína estándar (BSA) en tampón fosfato, desde 0 hasta 40µg, que se utilizaron para hacer una recta de calibrado. Las muestras se diluyeron en tampón fosfato. A continuación se añadió el reactivo de color comercial Protein Assay (Bio-Rad). Las muestras se depositaron en una placa ELISA por triplicado y por último, se realizó una lectura colorimétrica a una longitud de onda de 595nm.

b) **BCA:** El ácido bicinconónico, sal sódica, es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones  $\text{Cu}^{1+}$  en medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ion cuproso producido en una reacción entre las proteínas con  $\text{Cu}^{2+}$  en medio alcalino, lo que se conoce como la reacción de Biuret (Smith *et al.*, 1985). Se preparó una curva de calibrado con concentraciones de BSA, desde 0 hasta  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Así mismo, se prepararon diluciones de las muestras en tampón fosfato y se añadieron  $200\mu\text{l}$  de BCA (kit Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination de SIGMA). Las muestras se depositaron en una placa ELISA por duplicado y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. A continuación se realizó una lectura colorimétrica a  $570\text{nm}$ .

## X. Ensayo $\beta$ -galactosidasa

Este ensayo cuantitativo permite medir la actividad hidrolítica de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, y por tanto la expresión del gen *lac Z* presente en las bacterias (Griffith & Wolf, 2002).

La proteína presente en el lisado de cada muestra se cuantificó mediante BCA. A cada extracto proteico se añadieron  $200\mu\text{l}$  de ONPG (sustrato de la enzima galactosidasa). Tras producirse un cambio de color a amarillo, se anotó el tiempo transcurrido y se añadieron  $500\mu\text{l}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  para parar la reacción.  $300\mu\text{l}$  de cada suspensión se añadieron por duplicado a pocillos de una placa ELISA y se realizó una lectura de la absorbancia a  $420\text{nm}$ .

La actividad galactosidasa se calculó con la siguiente fórmula

$$\text{Unidad Miller} = \frac{A_{420}}{t(\text{min}) * V(\text{ml}) * \mu\text{g prot.}} * 1000$$

Este ensayo se realizó utilizando tres muestras biológicas, es decir tres lisados de cada cepa a analizar. Además cada muestra biológica se dividió en tres submuestras dando lugar así a un triplicado técnico.

## XI. Construcción de los plásmidos $\text{pXG10}::\text{P}_{\text{LtetO-1}}\text{Vc2}$ y $\text{pXG10}::\text{P}_{\text{Vc2}}\text{Vc2}$

Para realizar estas construcciones se amplificó el riboswitch Vc2 a partir del plásmido  $\text{pRS414}::\text{P}_{\text{Vc2}}\text{Vc2}$  mediante PCR con la enzima *phusion polymerase*. Los

oligonucleótidos utilizados fueron AatII pVc2-Vc2 Fw/ NheI Vc2 Rv, cuando se amplificó el riboswitch con su propio promotor, y PstI Vc2 Fw/ NheI Vc2 Rv, cuando se amplificó el riboswitch sin promotor. Estos fragmentos se ligaron en el plásmido de clonaje pJet1.2, dando lugar a los plásmidos pJet 1.2::P<sub>Vc2</sub>Vc2 y pJet 1.2::Vc2 respectivamente. Estos plásmidos se transformaron en bacterias competentes de XL1 Blue por electroporación. Transformantes resistentes a ampicilina se chequearon mediante PCR con la enzima *Taq polimerasa* utilizando los oligonucleótidos mencionados anteriormente. A partir de un transformante positivo se aisló el plásmido correspondiente.

A continuación, el plásmido pXG10 se digirió con las enzimas de restricción AatII/NheI y PstI/NheI, mientras que el plásmido pJet 1.2:: P<sub>Vc2</sub>Vc2 se digirió con las enzimas AatII/NheI y el plásmido pJet 1.2::Vc2 con PstI/NheI. Los insertos P<sub>Vc2</sub>Vc2 y Vc2 se ligaron con el plásmido pXG10 digerido anteriormente y dichas ligaciones se electroporaron en bacterias competentes de XL1 Blue. Transformantes resistentes a cloranfenicol se chequearon mediante PCR con la enzima *Taq polimerasa* utilizando los oligonucleótidos mencionados. A partir de un transformante positivo se aisló el plásmido correspondiente, pXG10::P<sub>Vc2</sub>-Vc2 y pXG10::P<sub>LetO-1</sub>Vc2.

Por último, ambos plásmidos se transformaron en células electrocompetentes de las cepas de *Salmonella* WT,  $\Delta$ XII y  $\Delta$ XII Pcl rbs *adrA*.

## **XII. Cuantificación de la proteína GFP**

Para analizar la expresión del gen reporter *gfp* presente en los plásmidos pXG10::P<sub>Vc2</sub>-Vc2 y pXG10:: P<sub>LetO-1</sub>Vc2 se cuantificó la proteína GFP mediante la técnica Western blot.

El lisado de cada muestra conteniendo 7 mg de proteínas totales se separó mediante electroforesis en geles verticales al 12% de poliacrilamida. Los extractos de proteínas resueltos en SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,45  $\mu$ m de poro (GE Healthcare). La transferencia se realizó empleando el sistema Trans-Blot® Turbo® (Bio-Rad) en tampón de transferencia (TRIS-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM y 20% etanol). Las membranas se bloquearon incubándolas durante una noche a 4°C en tampón fosfato (PBS) conteniendo 0,1 % Tween y 5% de leche descremada. Tras 5 lavados de 5 minutos cada uno en PBS-Tween 20, las membranas se incubaron

durante 1 hora y media con el anticuerpo primario anti GFP (Clontech) diluido 1:5000, se lavaron de nuevo tres veces y se incubaron otra hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario de Cabra anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa y diluido 1:2500 en PBS- Tween 20. Tras 5 lavados de 5 min en PBS-Tween 20, la reacción se reveló utilizando un reactivo quimioluminiscente (Thermo Scientific) y un transiluminador o papel de fotografía.

Por otra parte, las cepas en estudio se visualizaron utilizando un microscopio de fluorescencia Eclipse TE300 (Nikon).

### **XIII. Construcción del plásmido pGEX 6P-2::Vc2**

Con el objetivo de fusionar traduccionalmente el riboswitch Vc2 al gen *lacI* se realizó una PCR inversa utilizando como molde el plásmido pGEX-6P-2 y los cebadores pGEX Vc2 Fw/pGEX Vc2 Rv. Como resultado se obtuvo el plásmido en forma lineal y con las dianas de restricción NcoI y SacI en los extremos. Así mismo, se amplificó el riboswitch con los oligonucleótidos Ribos Vc2 Fw/ Ribos Vc2 Rv, utilizando el plásmido pRS414::P<sub>Vc2</sub>Vc2 como ADN molde. Este fragmento se ligó en el plásmido pJet 1.2 dando lugar al plásmido pJet 1.2:: P<sub>Vc2</sub>Vc2 bis. Tanto el plásmido pGEX 6P-2 lineal como el plásmido pJet 1.2:: P<sub>Vc2</sub>Vc2 bis se digirieron con las enzimas de restricción NcoI y SacI. Tras la ligación de ambos fragmentos, el producto de ligación se electroporó en células competentes de XL1 Blue, y se seleccionaron transformantes resistentes a ampicilina. Tras el chequeo mediante PCR con la enzima *Taq polimerasa* utilizando los oligonucleótidos Ribos Vc2 Fw/ Ribos Vc2 Rv se seleccionó un transformante positivo, a partir del cual se aisló el plásmido correspondiente, pGEX 6P-2::Vc2. Con este plásmido se transformaron células electrocompetentes de las cepas de *Salmonella* WT,  $\Delta$ XII y  $\Delta$ XII Pcl rbs *adrA*.

### **XIV. Cuantificación de la expresión de la proteína GST**

Para analizar la expresión del gen *gst* se cuantificó la proteína GST mediante la técnica Western blot, tal y como se ha explicado anteriormente, con las siguientes modificaciones. El lisado de cada muestra contuvo 2,5 mg de proteínas totales. El anticuerpo primario utilizado fue anti-GST (Zymed Laboratories) diluido 1:2000.



## 4. Resultados y discusión

### I. Cuantificación de los niveles intracelulares de c-di-GMP mediante el plásmido pRS414::P<sub>Vc2</sub>Vc2

El plásmido pRS414::P<sub>Vc2</sub>Vc2 (Sudarsan *et al.*, 2008) presenta el riboswitch Vc2 bajo su propio promotor fusionado traduccionalmente al gen *lacZ*. Como se ha explicado anteriormente, el riboswitch Vc2 se ha descrito como un posible interruptor en “ON”, que en presencia de c-di-GMP permitiría la traducción del ARNm al que está unido (en este caso ARNm de *lac Z*) (Sudarsan *et al.*, 2008). Este plásmido se transformó en las cepas de *Salmonella* WT,  $\Delta$ XII y  $\Delta$ XII PcL rbs *adrA* con el objetivo de testar la validez de esta herramienta como posible testigo de los niveles bacterianos de c-di-GMP *in vivo*, aprovechando que dichas cepas presentan distintas concentraciones de c-di-GMP intracelular. La cepa  $\Delta$ XII es un derivado de la cepa 3934, y es un mutante múltiple en los doce genes que codifican proteínas con dominio GGDEF, es decir con posible actividad DGC. Como resultado, esta cepa es incapaz de producir c-di-GMP (referencias Solano 2009, Zorraquino 2013). La cepa  $\Delta$ XII PcL rbs *adrA* es un derivado de la cepa  $\Delta$ XII en la que el gen *adrA* está bajo el control del cassette kmPcLrbs (Da Re *et al.*, 2007), de manera que se expresa constitutivamente. El gen *adrA* codifica para una DGC muy activa y por lo tanto, esta cepa contiene niveles muy altos, constitutivos, de c-di-GMP. Según lo descrito, del análisis de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en los lisados bacterianos de las cepas en estudio, se esperaba encontrar un nivel de actividad muy alto en los lisados de la cepa  $\Delta$ XII PcL rbs *adrA*, correspondientes a una concentración elevada de c-di-GMP. Por el contrario, se esperaban niveles de actividad nulos en la cepa  $\Delta$ XII, que carece de c-di-GMP. El nivel esperado en lisados de la cepa WT sería intermedio a los de las dos cepas anteriores.

A diferencia de lo esperado, los resultados del análisis de actividad  $\beta$ -galactosidasa en los lisados bacterianos mostraron niveles de actividad muy elevados en la cepa  $\Delta$ XII y en cambio, muy bajos en la cepa  $\Delta$ XII PcL rbs *adrA* (Fig. 5). Los resultados fueron similares tras analizar muestras de cultivos incubados durante 24 o 48 horas en condiciones óptimas de síntesis de c-di-GMP, es decir en placas de LB sin sal incubadas a 28°C. Estos resultados indican que el riboswitch Vc2 en el género *Salmonella* no funciona como se había sugerido, y que, en esta especie bacteriana, dicho riboswitch expresado bajo su propio promotor y en presencia de c-di-GMP, se une al ligando

cambiando su estructura y evitando la expresión del gen al que está unido, en este caso *lac Z*. En el caso de la cepa  $\Delta$ XII, que no contiene c-di-GMP, este cambio conformacional no se produciría dando lugar a la expresión del gen *lac Z*. Es decir, el plásmido pRS414::P<sub>Vc2</sub>Vc2 se podría utilizar para obtener una medida inversa de la cantidad de c-di-GMP en el citoplasma de las bacterias, de forma que cuando hay una concentración elevada de c-di-GMP no se observaría prácticamente actividad galactosidasa, mientras que cuando no hay presencia de c-di-GMP en el citoplasma se observaría una actividad muy elevada. Así mismo, esta herramienta permite detectar la actividad intermedia correspondiente a los niveles fisiológicos de c-di-GMP presentes en la cepa salvaje.

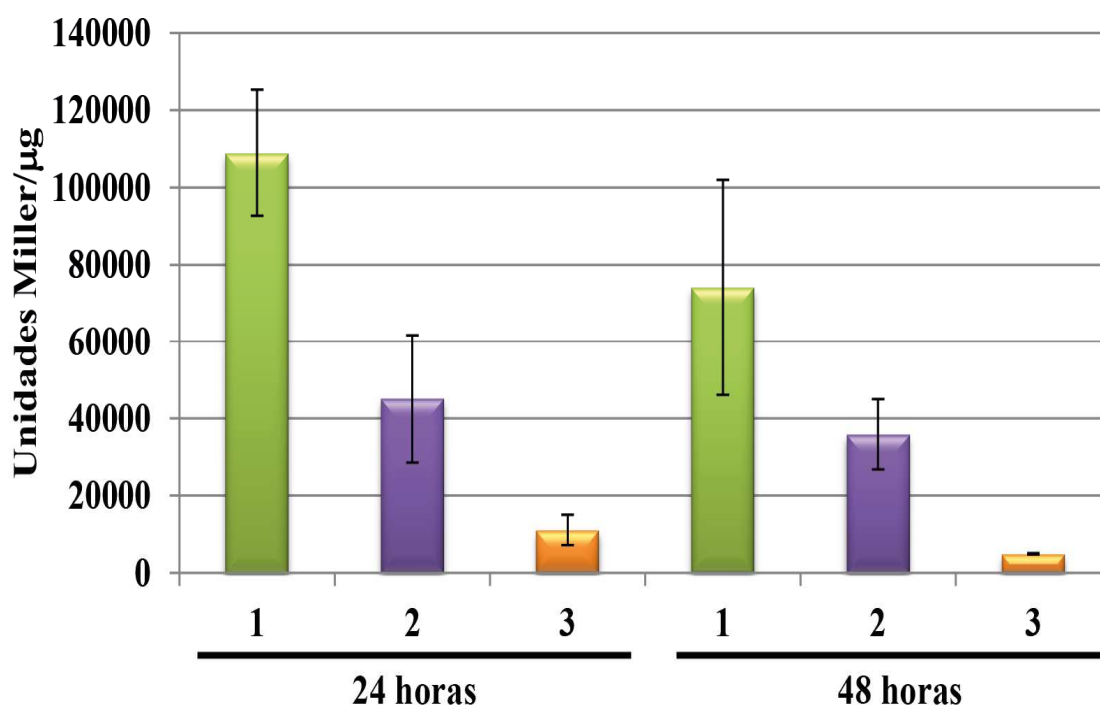


Figura 5. Ensayo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en extractos de cepas de *Salmonella* con el plásmido pRS414::P<sub>Vc2</sub>Vc2, que contiene el gen *lac Z* fusionado traduccionalmente al riboswitch Vc2. 1)  $\Delta$ XII pRS414::P<sub>Vc2</sub>Vc2. 2) WT pRS414::P<sub>Vc2</sub>Vc2. 3)  $\Delta$ XII PcL rbs *adrA* pRS414::P<sub>Vc2</sub>Vc2.

## II. Cuantificación de los niveles intracelulares de c-di-GMP utilizando el gen reporter *gfp*.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el ensayo anterior se decidió testar la utilidad de otro gen reporter tras el riboswitch Vc2, en este caso el gen *gfp* que codifica la proteína fluorescente GFP. Para ello, se clonó el riboswitch en el plásmido

pXG10, el cual está diseñado para realizar fusiones de regiones 5'UTRs antes del gen *gfp*. El clonaje se realizó de dos formas:

- ✂ Realizando una fusión del riboswitch con el gen *gfp*, manteniendo el promotor presente en el plásmido pXG10 ( $P_{\text{LtetO-1}}$ , el cual es un promotor constitutivo derivado del promotor  $\lambda P_L$ ). El resultado es el plásmido pXG10:: $P_{\text{LtetO-1}}Vc2$ .
- ✂ Realizando una fusión del riboswitch con el gen *gfp*, pero deleccionando el promotor del plásmido y sustituyéndolo por el promotor del riboswitch ( $P_{Vc2}$ ), consiguiendo, de esta forma, el plásmido pXG10:: $P_{Vc2}Vc2$ .

En estas construcciones el riboswitch controla la expresión del gen reporter (*gfp*) mediante los cambios de conformación que se producen en el transcrito por la presencia o ausencia de c-di-GMP en el citoplasma de la bacteria. Además, en este caso se cuenta con la ventaja de que este gen codifica una proteína con coloración verde fluorescente y por tanto, se puede observar las bacterias con ayuda de un microscopio de fluorescencia y visualizar la expresión de *gfp*.

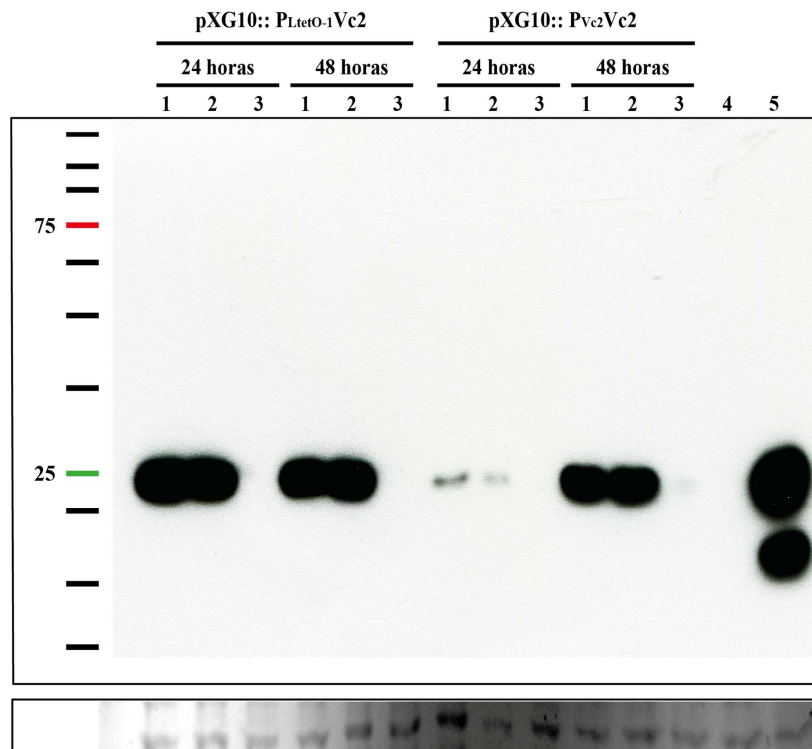
En primer lugar, con el objetivo de medir la expresión del gen *gfp* en las cepas WT,  $\Delta XII$  y  $\Delta XII$  PcL rbs *adrA* transformadas con ambos plásmidos, pXG10:: $P_{\text{LtetO-1}}Vc2$  y pXG10:: $P_{Vc2}Vc2$ , se cuantificó la cantidad de proteína GFP mediante western blot en lisados obtenidos tras incubar las bacterias en condiciones óptimas de síntesis de c-di-GMP. En este ensayo, los resultados esperados podrían ser de dos tipos:

- ≈ Por un lado, si el riboswitch funcionase como se había afirmado (Sudarsan *et al.*, 2008) (permitiendo la traducción del gen al que está fusionado cuando hay presencia de c-di-GMP), se esperaría tener niveles elevados de GFP en el caso de la cepa  $\Delta XII$  PcL rbs *adrA* y ninguna expresión en el caso de la cepa  $\Delta XII$ .
- ≈ Por el contrario, si el riboswitch funcionase en sentido inverso (inactivando la traducción del gen al que está fusionado en presencia de c-di-GMP), y de forma análoga a como se ha observado en el ensayo anterior (actividad  $\beta$ -galactosidasa), se esperaría encontrar una cantidad de proteína mucho mayor de la cepa  $\Delta XII$  y muy baja o nula en la cepa con mucho c-di-GMP ( $\Delta XII$  PcL rbs *adrA*).

Los resultados obtenidos (Fig. 6) mostraron que los lisados correspondientes a la cepa  $\Delta$ XII presentan una cantidad elevada de proteína GFP mientras que los lisados de la cepa  $\Delta$ XII PcL rbs *adrA* no contienen dicha proteína. Estos resultados indican, de nuevo, que el riboswitch Vc2, cuando se une a c-di-GMP, cambia su conformación impidiendo la traducción del gen al que está fusionado, es decir, que funciona como un interruptor en “OFF”.

Del resultado de este Western blot también cabe destacar la diferencia entre los dos plásmidos utilizados. Cuando el riboswitch Vc2 está bajo el control del promotor  $P_{LtetO-1}$  (presente en el pXG-10::  $P_{LtetO-1}$  Vc2) se obtiene una cantidad de proteína más elevada que cuando está fusionado a su propio promotor  $P_{Vc2}$ , indicando que el primer promotor es más fuerte.

También cabe resaltar que mediante esta técnica, y utilizando cualquiera de los dos plásmidos, no es posible detectar diferencias entre los niveles de c-di-GMP presentados en la cepa salvaje y  $\Delta$ XII. Es decir, la cantidad de c-di-GMP que presenta la cepa salvaje no daría lugar a un cambio en la estructura del riboswitch Vc2 suficiente como para detectar cambios en la expresión de GFP mediante Western-Blot.



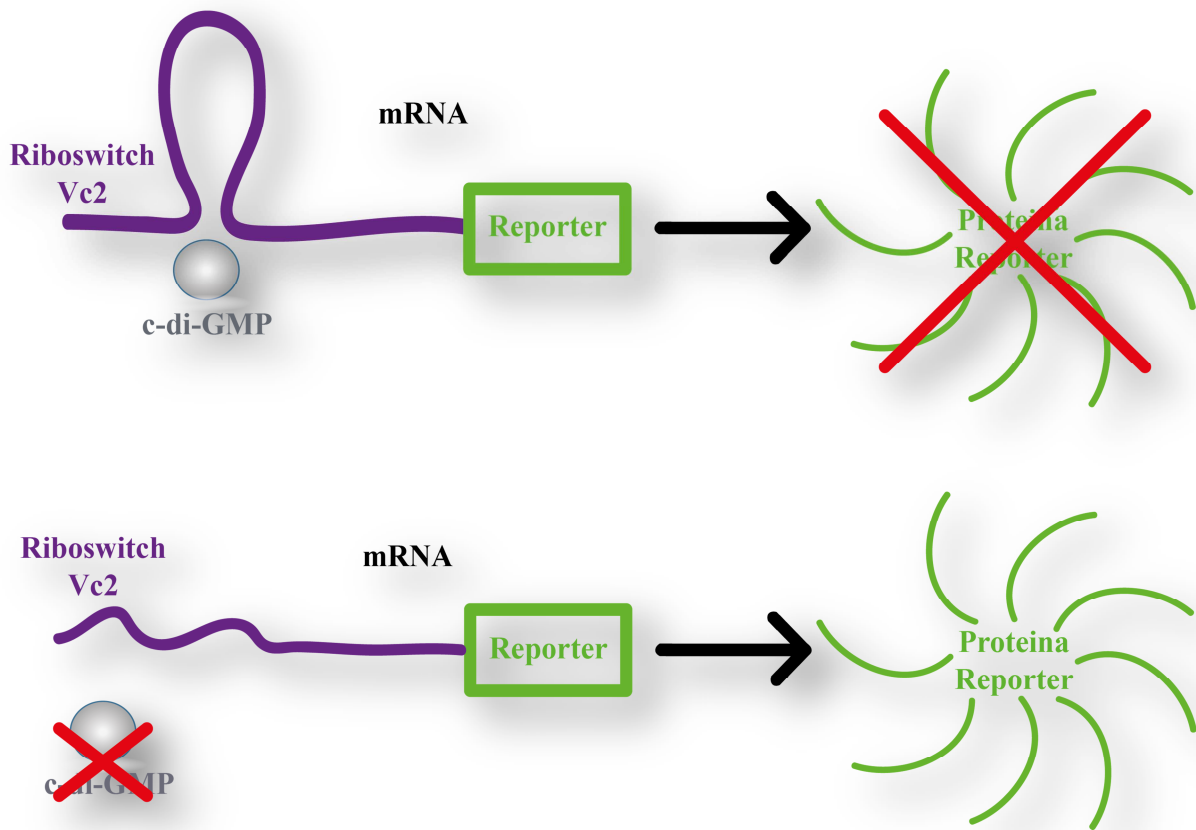
**Figura 6. Cuantificación de la expresión del gen *gfp* fusionado con el riboswitch Vc2 en los plásmidos pXG-10:: $P_{LtetO-1}$  Vc2 y pXG-10:: $P_{Vc2}$  Vc2.** En la parte superior, la película de revelado del Western blot. En la parte inferior la tinción de comassie como control de carga. **1)**  $\Delta$ XII; **2)** WT; **3)**  $\Delta$ XII PcL rbs *adrA*; **4)** Control negativo: WT sin transformar; **5)** Control positivo: WT transformada con el plásmido pXG-1.

Paralelamente al Western blot y gracias a que la proteína GFP, cuando se estimula con luz ultravioleta es verde fluorescente, se analizó la presencia de dicha proteína en bacterias vivas con ayuda de un microscopio de fluorescencia. En la figura 7 se muestran imágenes representativas de cada cepa transformada con cada uno de los dos plásmidos tras su incubación durante 24 o 48 horas en condiciones óptimas de producción de c-di-GMP. Los resultados confirmaron los resultados previos obtenidos mediante western blot, es decir, las bacterias de la cepa  $\Delta$ XII presentaron un alto nivel de fluorescencia, similar a los presentados por la cepa salvaje, mientras que en las preparaciones de las bacterias correspondientes a la cepa  $\Delta$ XII PcL rbs *adrA* se observó sólo una fluorescencia de fondo.

En conclusión, las dos técnicas utilizadas, western blot y fluorescencia, indican de nuevo que el riboswitch Vc2 funciona como un interruptor en “OFF” del gen al que está fusionado. Los dos plásmidos construidos y analizados se podrían utilizar para obtener una medida inversa de la cantidad de c-di-GMP en el citoplasma de las bacterias, aunque sería difícil poder utilizarlos para detectar niveles fisiológicos de c-di-GMP en la cepa salvaje.



En la figura 8 se muestra la conclusión obtenida sobre el funcionamiento del riboswitch Vc2, gracias a los resultados mostrados hasta el momento: bajo la presencia de c-di-GMP en el citoplasma de las bacterias, el transcrito se une al mensajero secundario c-di-GMP y se produce un cambio conformacional que posteriormente evita la traducción del ARNm tras el riboswitch, evitándose así la producción de la proteína correspondiente. En cambio, en ausencia de c-di-GMP, no se produce un cambio en la conformación del riboswitch y por tanto se permite la traducción del ARNm tras el riboswitch y la producción de proteína.



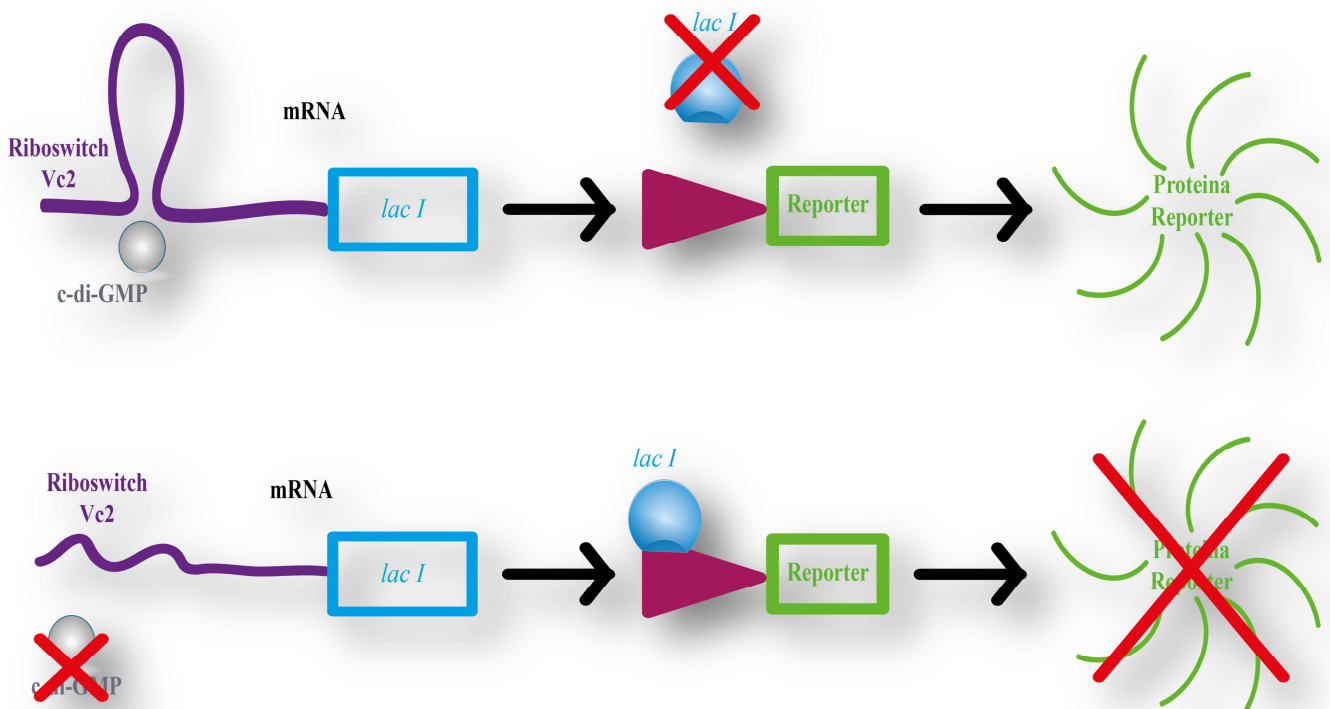
**Figura 8. Funcionamiento del riboswitch Vc2 en presencia o ausencia de c-di-GMP.** Cuando hay c-di-GMP en el citoplasma, éste se une al riboswitch y se evita la traducción del ARNm a proteína. Cuando no hay c-di-GMP se produce la traducción a proteína.

### III. Desarrollo de un sistema reporter que funcione como un interruptor en “ON” en presencia de c-di-GMP

Con las construcciones anteriores se han creado herramientas que miden de forma inversa la concentración de c-di-GMP intracelular en las bacterias. Puesto que el objetivo de este trabajo fin de master es diseñar un sistema “reporter” de los niveles intracelulares de c-di-GMP *in vivo* y de aplicación general, en el siguiente paso se

pretendió crear una herramienta con la cual poder medir los niveles de c-di-GMP de forma que los niveles de proteína reporter sean directamente proporcionales a la cantidad de este mensajero secundario.

Para ello, se construyó el plásmido pGEX6P-2::Vc2, en el cual el riboswitch Vc2 se encuentra fusionado traduccionalmente al gen *lac I*. En este plásmido también se encuentra el gen que codifica la proteína GST bajo un promotor reprimible por *lac I*. Por tanto, con esta nueva construcción, se esperaba que en presencia de c-di-GMP, el transcrito del riboswitch Vc2 cambie de conformación impidiendo la traducción de *lac I*, permitiendo así que se exprese el gen *gst*. Es decir, en este caso, cuando haya c-di-GMP en el citoplasma de la bacteria se producirá una cantidad de proteína GST proporcional a los niveles de c-di-GMP intracelulares. Por el contrario, en ausencia de c-di-GMP el riboswitch Vc2 adquiriría una conformación que permitiría la traducción de *lac I*, el cual reprimiría la expresión de *gst*. En este caso, en ausencia de c-di-GMP no se produciría expresión de la proteína GST (Fig. 9).



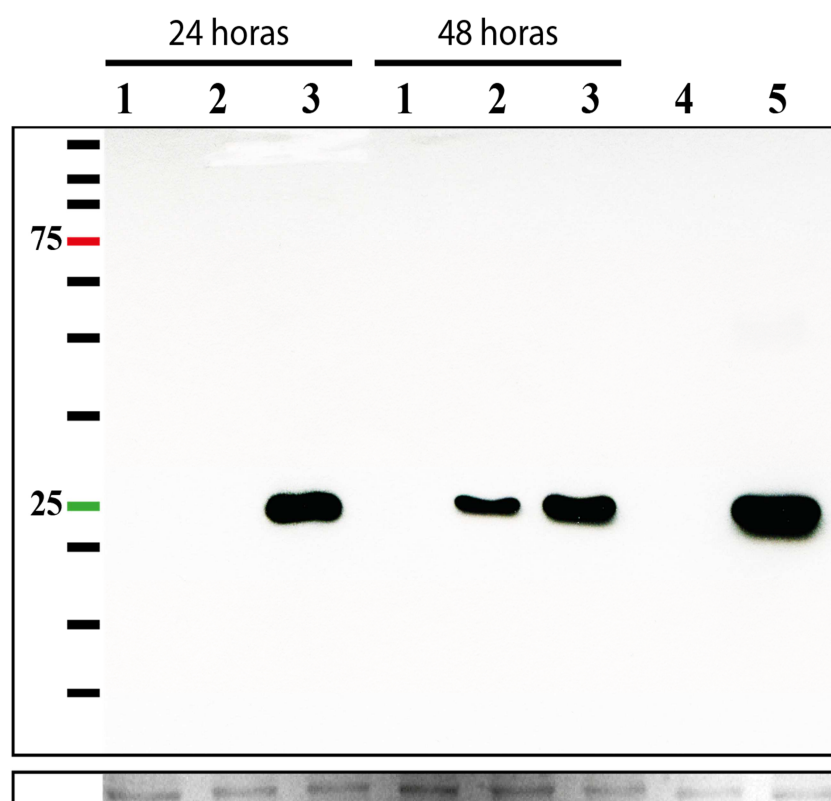
**Figura 9. Funcionamiento del sistema reporter basado en el plásmido pGEX6P-2::Vc2.** En presencia de c-di-GMP se inhibe la traducción de *lac I* y se produce proteína reporter. En ausencia de c-di-GMP, se produce Lac I y se reprime la producción de proteína reporter.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, en este experimento se esperaba obtener un cantidad de GST elevada en los lisados de la cepa  $\Delta$ XII PcL rbs *adrA* y nula en los lisados de la cepa  $\Delta$ XII. En cuanto a los lisados de la cepa WT, lo ideal sería encontrar



niveles intermedios de dicha proteína. Para medir la cantidad de proteína GST y por tanto la expresión del gen *gst*, se utilizó la técnica Western blot, con extractos proteicos de las tres cepas, incubadas durante 24 o 48 horas en condiciones óptimas de producción de c-di-GMP.

El resultado obtenido mediante Western blot se muestra en la figura 10. Tal y como se esperaba, el nivel de GST fue elevado en los lisados de la cepa  $\Delta$ XII PcL rbs *adrA*. Por otro lado, en los lisados procedentes de la cepa  $\Delta$ XII no se detectó la presencia de esta proteína. Con respecto a la cepa WT, no se detectó la presencia de GFP en los lisados obtenidos tras 24 horas de incubación pero sí tras 48 horas de incubación, siendo este nivel menor al observado en el lisado de la cepa  $\Delta$ XII PcL rbs *adrA*. Por lo tanto, la cantidad de c-di-GMP presente en la cepa WT tras 24h de incubación en LB sin sal no es suficiente para reprimir de forma visible la expresión del represor *lac I*, pero si lo es tras 48 horas de incubación.



**Figura 10. Cuantificación de la expresión del gen *gst* fusionado con el riboswitch Vc2 en el plásmido pGEX 6P-2::P<sub>Vc2</sub> Vc2.** En la parte superior, la película de revelado del Western blot. En la parte inferior, la tinción de comassie como control de carga. **1)**  $\Delta$ XII pGEX-6P-2::Vc2. **2)** WT pGEX-6P-2::Vc2. **3)**  $\Delta$ XII PcL rbs *adrA* pGEX-6P-2::Vc2. **4)** Control negativo: cepa WT sin transformar. **5)** Control positivo: *E. coli* BL21 pGEX-6P-2::Vc2 inducido con IPTG 1mM.

Como resumen de esta aproximación se puede decir que se ha creado una herramienta que permite medir los niveles de c-di-GMP intracelular en *Salmonella* de

forma indirecta, mediante la cuantificación de los niveles de proteína GST, los cuales son proporcionales a la concentración del mensajero secundario c-di-GMP.

## 5. Conclusiones

Para concluir este trabajo fin de master en este apartado se presentan las conclusiones obtenidas a lo largo de los distintos experimentos.

- ✓ El riboswitch Vc2 de la clase I, procedente de *Vibrio cholerae* y que se encuentra en la región 5'UTR del gen *VC1722* (homólogo a *tfoX*) funciona “*in vivo*” como interruptor en “OFF” de la traducción del ARNm al que está fusionado.
- ✓ Al realizar una fusión traduccional del riboswitch Vc2 con un gen reporter, se obtiene una herramienta, **indirecta e inversa**, de medida de c-di-GMP intracelular. Esto sucede utilizando los plásmidos pRS414::P<sub>Vc2</sub>Vc2, pXG10::P<sub>Vc2</sub>Vc2 y pXG10::P<sub>LtetO-1</sub>Vc2.
- ✓ Se ha generado una herramienta genética que permite medir los niveles intracelulares de c-di-GMP “*in vivo*” de forma indirecta y proporcional a dichos niveles. Para ello se ha fusionado el riboswitch Vc2 al gen *lac I* en un plásmido que contiene un gen reporter (*gst*) bajo un promotor reprimible por *lac I*, obteniéndose así el plásmido pGEX 6P-2::Vc2

## 6. Bibliografía

- 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.
- Breaker, W.C.W.a.R.R., (2005) Regulation of Bacterial Gene Expression by Riboswitches. *The Annual Review of Microbiology* **59**: 487–517.
- Brenner, F.W., R.G. Villar, F.J. Angulo, R. Tauxe & B. Swaminathan, (2000) Salmonella nomenclature. *Journal of clinical microbiology* **38**: 2465-2467.
- Christen, M., H.D. Kulasekara, B. Christen, B.R. Kulasekara, L.R. Hoffman & S.I. Miller, (2010) Asymmetrical distribution of the second messenger c-di-GMP upon bacterial cell division. *Science* **328**: 1295-1297.
- Da Re, S., B. Le Quere, J.M. Ghigo & C. Beloin, (2007) Tight modulation of Escherichia coli bacterial biofilm formation through controlled expression of adhesion factors. *Applied and environmental microbiology* **73**: 3391-3403.
- Fabrega, A. & J. Vila, (2013) Salmonella enterica serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin Microbiol Rev* **26**: 308-341.
- Gerstel, U. & U. Romling, (2001) Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate agfD promoter activity and expression of the multicellular morphotype in Salmonella typhimurium. *Environmental microbiology* **3**: 638-648.
- Griffith, K.L. & R.E. Wolf, Jr., (2002) Measuring beta-galactosidase activity in bacteria: cell growth, permeabilization, and enzyme assays in 96-well arrays. *Biochemical and biophysical research communications* **290**: 397-402.
- I. Lasa, J.L.d.P., J. R. Penadés, J. Leiva, (2005) Biofilms bacterianos e infección. *An. Sist. Sanit. Navarra* **28(2)**: 163-175.
- Krasteva, P.V., K.M. Giglio & H. Sondermann, (2012) Sensing the messenger: the diverse ways that bacteria signal through c-di-GMP. *Protein science : a publication of the Protein Society* **21**: 929-948.
- Latasa, C., A. Roux, A. Toledo-Arana, J.M. Ghigo, C. Gamazo, J.R. Penades & I. Lasa, (2005) BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of Salmonella enterica serovar Enteritidis. *Molecular microbiology* **58**: 1322-1339.
- Okako Omadjela, A.N., Joanna Strumillo, Hugo Mérida, Olga Mazur, Vincent Bulone & a.J. Zimmer, (2013) BcsA and BcsB form the catalytically active core of bacterial cellulose synthase sufficient for in vitro cellulose synthesis. *PNAS* **110**: 17856–17861.
- Popoff, M.Y., J. Bockemühl & L.L. Gheesling, (2003) Supplement 2001 (no. 45) to the Kauffmann–White scheme. *Research in Microbiology* **154**: 173-174.
- Robijns, S.C., S. Roberfroid, S. Van Puyvelde, B. De Pauw, E. Uceda Santamaria, A. De Weerd, D. De Coster, K. Hermans, S.C. De Keersmaecker, J. Vanderleyden & H.P. Steenackers, (2014) A GFP promoter fusion library for the study of Salmonella biofilm formation and the mode of action of biofilm inhibitors. *Biofouling* **30**: 605-625.
- Romling, U., M.Y. Galperin & M. Gomelsky, (2013) Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiology and molecular biology reviews* **77**: 1-52.
- Rybtke, M.T., B.R. Borlee, K. Murakami, Y. Irie, M. Hentzer, T.E. Nielsen, M. Givskov, M.R. Parsek & T. Tolker-Nielsen, (2012) Fluorescence-based reporter

- for gauging cyclic di-GMP levels in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology* **78**: 5060-5069.
- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson & D.C. Klenk, (1985) Measurement Of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical biochemistry* **150**: 76-85.
- Solano, C., B. Garcia, C. Latasa, A. Toledo-Arana, V. Zorraquino, J. Valle, J. Casals, E. Pedroso & I. Lasa, (2009) Genetic reductionist approach for dissecting individual roles of GGDEF proteins within the c-di-GMP signaling network in *Salmonella*. *PNAS* **106**: 7997-8002.
- Solano, C., B. Garcia, J. Valle, C. Berasain, J.M. Ghigo, C. Gamazo & I. Lasa, (2002) Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Molecular microbiology* **43**: 793-808.
- Steenackers, H., K. Hermans, J. Vanderleyden & S.C.J. De Keersmaecker, (2012) *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International* **45**: 502-531.
- Sudarsan, N., E.R. Lee, Z. Weinberg, R.H. Moy, J.N. Kim, K.H. Link & R.R. Breaker, (2008) Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science* **321**: 411-413.
- Urban, J.H. & J. Vogel, (2007) Translational control and target recognition by *Escherichia coli* small RNAs in vivo. *Nucleic acids research* **35**: 1018-1037.
- Wu, N., K. Matand, B. Kebede, G. Acquah & S. Williams, (2010) Enhancing ADN electrotransformation efficiency in *Escherichia coli* DH10B electrocompetent cells. *Electronic Journal of Biotechnology* **13**: 0-0.
- Zogaj, X., M. Nimtz, M. Rohde, W. Bokranz & U. Romling, (2001) The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular microbiology* **39**: 1452-1463.
- Zorraquino, V., B. Garcia, C. Latasa, M. Echeverz, A. Toledo-Arana, J. Valle, I. Lasa & C. Solano, (2013) Coordinated cyclic-di-GMP repression of *Salmonella* motility through YcgR and cellulose. *Journal of Bacteriology* **195**: 417-428.