



Departament de Microbiologia

**YfeR, un nuevo regulador de la familia
LysR, está implicado en la respuesta al
estrés en *Salmonella enterica* serovar
Typhimurium**

**Rosa Carmen Baños Molina
Tesis Doctoral
Barcelona, 2005**



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Departament de Microbiologia

Facultat de Biologia

Universitat de Barcelona

**YfeR, un nuevo regulador de la familia LysR, está implicado en la respuesta al estrés
en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium**

Memoria presentada por Rosa Carmen Baños Molina
para optar al grado de Doctor en Biología

Programa de Doctorado:
Microbiología Ambiental y Biotecnología
Bienio 1998-2000

Vº Bº de los Directores

Dr. Antonio Juárez Giménez

Dra. Josefina Martínez Martínez

Agradecimientos

Al Dr. Antonio Juárez por seguir los experimentos día a día, y a pesar del esfuerzo que eso supone, compaginar su cargo de Vicerector con el de Director de Tesis. A la Dra. Josefina Martínez por su continuo aporte de ideas y su ayuda en los problemas experimentales.

A Patxi, por darme la oportunidad de empezar esta Tesis Doctoral.

A todos mis compañeros de laboratorio porque conocer gente como vosotros es uno de los premios de esta Tesis Doctoral. A Carlos, por sus enseñanzas en mis años de estudiante colaboradora. A la Cristina, perquè ja no sé quants pernils et dec dels mils favors que em fas: inòculs, preguntes experimentals, i per donar sempre el consell més adient. A Jose, mi mamá del laboratorio (no por edad), por escucharme y darme ánimos. A en Toni, perquè encara que només vàrem coincidir un any al lab vaig aprendre moltíssim de tu. A la Teresa i l'Olga, que els he perdut la pista però em van fer molta companyia a l'altra banda de la Sibèria. A Carol y Núria, por todo el trabajo conjunto sobre Osmt. A José María, por brindarme su ayuda siempre que lo he necesitado. A la Sandra, per ser una persona encantadora i la companya de feina ideal. A l'Eli, per compartir els cursos de Doctorat, les hores de dinar, els sopars de Departament, els congressos... tot sempre amb un somriure. A la Sònia, sens dubte la meva confident, la meva germaneta dins del laboratori... encara et trobo a faltar!! A Sonia, que a pesar de ser del Madrid y del Hospi (je,je, no he podido evitarlo), ha sido un enorme placer compartir laboratorio y piscina contigo. A la Núria, l'altra companya de piscina, de dinar, i la veïna de poiata, perquè ets un sol i amb tu és impossible tenir cap problema. Al Nacho, el hombre del laboratorio, por tener siempre una historia curiosa que contar, por hacerme reír constantemente, por todas nuestras confianzas. A Eva, que aunque me has sacado de quicio en ocasiones, ha sido un placer tenerte como discípula y es difícil aburrirse contigo. A Jorge, el nuevo hombre del laboratorio, porque detrás de esas contestaciones "bordes" hay un angelito. A Sonia, por compartir los primeros años de carrera y porque además de ser mi amiga eres una compañera de trabajo excelente. A l'Aitziber, perquè encara que fa poc que compartim laboratori contagies alegria, i per substituir-me en la plaça de "la más cotilla del laboratorio". A la Sheila, pel seu enorme interés per aprendre i aguantar les nostres preguntes inquisidores. A la Míriam, la última incorporació, per entendre que aquests mesos estic una mica liada. Mil gracias a todos además, por soportar mi tendencia al desorden y aguantar mis cambios de humor.

A todos los miembros de otros laboratorios del Anexo: a Santi, perquè hem compartit moltes coses junts, com ser un dels dinosaures del Departament. A Óscar, otro compañero de piscina, porque eres un trozo de pan y estás siempre dispuesto a ayudar a los demás. A en Marc (l'home del temps), en Quim (sempre disposat a fer la punyeta), a Lida, a Laura, a Christian, por su compañía a la hora de comer en este último año, con los debates hombres-mujeres incluidos. A Javi del Campo (sempre discutidor), Marta (la risa más escandalosa), Marga ("bichito"), Serena (la italiana), Núria Prim, Cristina Bofill, Pere, Julia, Jordi Sabaté (un pozo de sabiduría), Jorge, Zaira, Núria Jiménez, Dani, Glòria, Susanna, Xavi Abad (un plaer conversar amb tu), Cristina Villena, Islem, Mari, Lluís, Núria Pujol, Unai... También a los del edificio viejo, especialmente a Luis, por su inestimable ayuda con los protocolos de mutagénesis. Sé que me puedo olvidar de nombrar a alguien así que gracias a todos los compañeros del Departamento de Microbiología sin excepción, por hacer que trabajar aquí sea un lujo, por los mil favores diarios (sacar placas, aparatos, material, consejos, etc.) y por supuesto por las cenas de Departamento y juergas varias, entre ellas el congreso de Alicante.

A los secretarios del Departamento, especialmente a Manolo y Macu (siempre sonriente). A Rosario, por su paciencia con todo lo derivado de la cocina.

Muy especialmente a mi familia, porque sin ellos no sería lo que soy. A mi yayo, que aunque ya no esté y me considerara la oveja negra, sé que estaría orgulloso de mí. A mi yaya, por ser mi segunda madre y la persona más buena y generosa del mundo. A mis padres, por quererme, protegerme, cuidarme, educarme, por no insistirme en estudiar una Ingeniería y animarme a cumplir mi sueño de científica, por estar orgullosos de mí, por ser los padres más maravillosos del mundo aunque os haya salido un poco rebelde. A mi hermano, por ser el mejor ejemplo a seguir, por aceptar jugar a vendedoras a cambio de unos centros, por hacerme cómplice de sus juegos y no tratarme como una niña, por ser mi compinche en casa durante 27 años. A mis suegros, a ti Isabel, por tratarme con tanto cariño, y a ti Víctor porque me encanta discutir contigo. A mis cuñaaaás, Dalila y Esther, por quererme como una hermana, y a mi cuñado Jose, la persona más hospitalaria que conozco.

A "los de Barcelona": a las flores Esther, Mónica, Sandra, Say y Vanessa; por crecer juntas, por escucharme y estar siempre dispuestas a dar buenos consejos, por entenderme mejor que nadie, por confiar en mí, por las tardes en el Mr. Desayuno, por las noches de juerga, por discutirnos y no guardarnos rencor.... en resumen por todos estos años de maravillosa amistad que espero no se acabe nunca. A los chicos del grupo: a Alberto, por superar la manía del Instituto y guardarme una habitación en vuestra futura casa, a Geoff,

por ensalzar mi acento inglés, a Josete (el freakie), por sus numerosas y graciosas ocurrencias, y a Rubén. A Iñaki, por aquella amistad que nació en Formentera y aunque no nos veamos mucho sé que estás ahí.

A "los de Vallirana", porque después de tantos años aún conservamos la amistad. A Santi-Esther, Jose-Dalila, porque además de mi familia sois mis amigos. A Fran (siempre serás mi vecino) y Sonia, los mejores compañeros de viaje. A Javi, un buenazo y Olga, por organizar tantos eventos y no quejarte nunca. A "la Kike" y "el Merce" (siempre me equivoco), la pareja pimpinela. A Ricard, el malo del grupo, y Sandra, no conozco a nadie con más vitalidad (tampoco me puedo olvidar del Tabo). A Edu, sin duda el músico del grupo. Y también a los que no veo tanto: A Vane (por su alegría e inocencia), Marce, I sa, Miguel, Monchi, David y Dani. A todos gracias por las vacaciones (Platja d'Aro, Peñíscola, etc.), los cumpleaños, las bodas, las masías....por todos los momentos que hemos compartido.

A ti Víctor, porque podría escribir un libro entero de todas las cosas que te puedo agradecer, pero sobre todo porque nadie me mima tanto como tu y contigo puedo ser cómo realmente soy.

<u>1. INTRODUCCIÓN</u>	1
<u>1.1 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA A NIVEL TRANSCRIPCIONAL</u>	4
<u>1.1.1 FACTORES SIGMA</u>	4
<u>1.1.2 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN</u>	7
<u>1.1.3 SUPERENROLLAMIENTO DEL ADN</u>	10
<u>1.2 REDES REGULADORAS. MODULACIÓN GLOBAL</u>	15
<u>1.2.1 LOS MODULADORES GLOBALES DENTRO DE LAS FAMILIAS DE PROTEÍNAS REGULADORAS</u>	15
<u>1.3 LA FAMILIA LYSR DE REGULADORES TRANSCRIPCIONALES</u>	19
<u>1.4 OSMOREGULACIÓN</u>	27
<u>1.4.1 LA RESPUESTA DE LAS BACTERIAS AL ESTRÉS HIPO-OSMÓTICO</u> ...	28
<u>1.4.2 LA RESPUESTA DE LAS BACTERIAS AL ESTRÉS HIPER-OSMÓTICO</u> ..	28
<u>1.4.2.1 Regulación del operón <i>kdp</i></u>	29
<u>1.4.2.2. Regulación de ProP y ProU:</u>	30
<u>1.4.3 OSMOLARIDAD Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS ESTRUCTURALES</u>	31
<u>1.4.4 OSMOREGULACIÓN Y VIRULENCIA</u>	32
<u>ANTECEDENTES</u>	35
<u>2. MATERIAL Y MÉTODOS</u>	39
<u>2.1 CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS</u>	41
<u>2.2. MEDIOS DE CULTIVO Y ANTIBIÓTICOS</u>	43
<u>2.2.1 MEDIOS DE CULTIVO</u>	43
<u>2.2.2 ANTIBIÓTICOS</u>	46
<u>2.3 MÉTODOS DE TRANSFERENCIA GENÉTICA</u>	48

<u>2.3.1 TRANSFORMACIÓN BACTERIANA</u>	48
<u>2.3.1.1 Transformación de células competentes obtenidas mediante tratamiento con CaCl₂</u>	48
<u>2.3.1.2 Electroporación</u>	49
<u>2.3.2 TRANSDUCCIÓN CON EL BACTERIÓFAGO P22</u>	50
<u>2.3.2.1 Obtención de lisados de P22</u>	50
<u>2.3.2.2 Titulación del lisado fágico</u>	50
<u>2.3.2.3 Transducción con P22</u>	51
<u>2.4 TÉCNICAS DE MUTAGÉNESIS BACTERIANA</u>	52
<u>2.4.1 INACTIVACIÓN DE GENES CROMOSÓMICOS UTILIZANDO FRAGMENTOS DE PCR</u>	52
<u>2.4.1.1 Generación del fragmento de PCR</u>	52
<u>2.4.1.2 Transformación del plásmido pKD46</u>	52
<u>2.4.1.3 Eliminación de la resistencia al antibiótico</u>	53
<u>2.4.2 MUTAGÉNESIS DIRIGIDA POR DOBLE RECOMBINACIÓN</u>	54
<u>2.5 TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS</u>	56
<u>2.5.1 AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO</u>	56
<u>2.5.1.1 Aislamiento de ADN plasmídico por lisis alcalina</u>	56
<u>2.5.1.1.1 Desproteización del ADN por precipitación con cloruro de litio</u>	57
<u>2.5.1.1.2 Desproteización del ADN por extracción con fenol</u>	58
<u>2.5.1.1.3 Tratamiento del ADN con RNasa A</u>	59
<u>2.5.1.2 Aislamiento de ADN plasmídico con “kits” comerciales</u>	59
<u>2.5.1.3 Caracterización rápida de ADN plasmídico a partir de colonia</u>	59
<u>2.5.3 USO DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN, LIGASA Y ENZIMAS MODIFICANTES</u>	60
<u>2.5.4 AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)</u>	60
<u>2.5.5 SECUENCIACIÓN</u>	62
<u>2.5.6 ELECTROFORESIS DE ADN</u>	63
<u>2.5.6.1 Electroforesis en geles de agarosa</u>	63
<u>2.5.6.2 Marcadores de tamaño molecular</u>	63

2.5.6.3 Tinción con bromuro de etidio.....	64
2.5.7 AISLAMIENTO DE BANDAS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA: ELECTROELUCIÓN.....	64
2.5.8 ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES ADN-PROTEÍNA MEDIANTE ENSAYOS DE RETARDO EN GEL.....	65
2.5.8.1 Marcaje radiactivo de fragmentos de ADN.....	65
2.5.8.2 Reacción de unión ADN-proteína:.....	66
2.6 TÉCNICAS EXPERIMENTALES CON ARN.....	67
2.6.1 EXTRACCIÓN DE ARN CELULAR TOTAL.....	67
2.6.1.1 Extracción de ARN celular total mediante fenol ácido caliente.....	67
2.6.1.2 Extracción ARN celular total con “kits” comerciales.....	68
2.6.1.3 Cuantificación espectrofotométrica del ARN.....	68
2.6.2 ELECTROFORESIS DE ARN EN GELES DE AGAROSA.....	69
2.6.3 ENSAYO DE PROTECCIÓN CONTRA LA RNasa ONE™.....	69
2.6.3.1 Obtención de una sonda de cadena sencilla marcada radiactivamente.....	69
2.6.3.1.1 Preparación de un molde de ADN.....	69
2.6.3.1.2 Síntesis <i>in vitro</i> de ARN dirigida por la ARN polimerasa de T7.....	70
2.6.3.2 Hibridación ARN-sonda radiactiva.....	71
2.6.3.3 Ensayo de protección contra la RNasa ONE™.....	71
2.6.3.4 Electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes de poliacrilamida/urea y autoradiografía.....	72
2.6.4 ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL ARN POR RT-PCR.....	73
2.6.4.1 Digestión con DNasaI.....	73
2.6.4.2 RT-PCR.....	73
2.7 TÉCNICAS EXPERIMENTALES CON PROTEÍNAS.....	74
2.7.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS.....	74
2.7.1.1 Fraccionamiento de cultivos bacterianos y aislamiento de proteínas de membrana.....	75
2.7.1.1.1 Fraccionamiento de cultivos bacterianos.....	75
2.7.1.1.2 Obtención de proteínas de membrana.....	76
2.7.1.2 Obtención de extractos totales.....	76
2.7.1.3 Obtención de extractos para geles de 2D-PAGE.....	77

2.7.2 VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO BRADFORD.....	78
2.7.3 TÉCNICAS DE ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS.....	78
2.7.3.1 Geles de poliacrilamida en Tris-Glicina-SDS.....	78
2.7.3.2 Electroforesis bidimensional (2D-PAGE).....	80
2.7.3.2.1 Primera dimensión.....	80
2.7.3.2.2 Segunda dimensión.....	81
2.7.3.3 Marcadores de peso molecular.....	83
2.7.3.4 Tinción de geles de proteínas.....	83
2.7.3.4.1 Tinción de proteínas con azul de Coomassie®.....	83
2.7.3.4.2 Tinción de proteínas con nitrato de plata (geles 2D- PAGE).....	84
2.7.4 SOBREENPRESIÓN DE PROTEÍNAS.....	85
2.7.5 VALORACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	85
2.7.5.1 Determinación de la actividad β -galactosidasa.....	85
3. RESULTADOS	87
3.1 LA LOCALIZACIÓN DE LA FUSIÓN <i>yfeR::MudJ</i> ES CROMOSÓMICA.....	89
3.2 SECUENCIACIÓN DEL EXTREMO 5' DEL GEN <i>yfeR</i>	90
3.3 ANÁLISIS DE SECUENCIA DE LA PROTEÍNA YfeR.....	95
3.4 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>yfeR</i>	98
3.4.1 OSMOREGULACIÓN DE <i>yfeR</i>	98
3.4.1.1 Valoración de la actividad β -galactosidasa de la cepa YFER en medio LB a baja y elevada osmolaridad.....	98
3.4.1.2 Valoración de la actividad β -galactosidasa de la cepa YFER en LB con KCl o sacarosa.....	99
3.4.1.3 Evaluación de la transcripción del gen <i>yfeR</i> mediante un ensayo de protección contra la RNasa ONE™.....	100
3.4.2 AUTOREGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>yfeR</i>	102
3.4.2.1 Clonaje del gen <i>yfeR</i> en un vector pLG338-30.....	103

3.4.2.2. Valoración de la actividad β -galactosidasa de las cepas YFER, YFER (pLG338-30) y YFER (pLGYFER).....	104
<u>3.5 SECUENCIACIÓN DEL GEN <i>yfeH</i> Y ANÁLISIS DE SECUENCIA DE LA PROTEÍNA YfeH</u>	105
<u>3.5.1 SECUENCIACIÓN DEL GEN <i>yfeH</i></u>	105
<u>3.5.2 ANÁLISIS DE SECUENCIA DE YfeH</u>	106
<u>3.6 UNIÓN DE LA PROTEÍNA YfeR AL ADN</u>	109
<u>3.6.1 SOBREENPRESIÓN DE LA PROTEÍNA YfeR</u>	109
<u>3.6.2 ENSAYO DE RETARDO EN GEL</u>	111
<u>3.7 CONSTRUCCIÓN DE UN MUTANTE <i>yfeR</i></u>	113
<u>3.8 LA EXPRESIÓN DE <i>yfeH</i> ES INDEPENDIENTE DE YfeR</u>	116
<u>3.8.1 CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pLGYFEHLAC (<i>yfeH::lacZ</i>)</u>	116
<u>3.8.2 VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD β-GALACTOSIDASA EN LAS CEPAS TT1704 e YFER2</u>	119
<u>3.9 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>yfeH</i></u>	120
<u>3.9.1 FASE ESTACIONARIA</u>	120
<u>3.9.1.1 Dilución de un cultivo en fase estacionaria en medio fresco</u>	120
<u>3.9.1.2 Expresión de <i>yfeH</i> en una cepa <i>rpoS</i>⁻</u>	121
<u>3.9.2 pH BÁSICO</u>	122
<u>3.9.3 pH ÁCIDO</u>	124
<u>3.9.4 ANAEROBIOSIS Y TEMPERATURA</u>	127
<u>3.9.5 LIMITACIÓN DE FÓSFORO</u>	127
<u>3.10 OBTENCIÓN DE UN MUTANTE <i>yfeH</i></u>	128
<u>3.11 CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO DEL MUTANTE <i>yfeH</i></u>	130
<u>3.11.1 SUPERVIVENCIA Y SALIDA DE FASE ESTACIONARIA</u>	130
<u>3.11.2 RESISTENCIA A COMPUESTOS TÓXICOS</u>	133
<u>3.11.2.1 Antibióticos</u>	133
<u>3.11.2.2 Sales biliares</u>	134

3.11.2.3 Resistencia a arsenato/arsenito	136
3.11.3 ANÁLISIS DEL PATRÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE LA CEPA YFEH.....	136
3.12 LA PROTEÍNA YfeR INTEGRADA EN UNA RED DE REGULACIÓN GLOBAL	137
3.12.1 ANÁLISIS COMPARATIVO POR ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DEL PROTEOMA DE LAS CEPAS TT1704 E YFER(pLGYFER) (<i>yfeR</i> ⁺), YFER E YFER(pIG338-30) (<i>yfeR</i> ⁻)	137
3.12.2 EFECTO DE LA MUTACIÓN <i>yfer</i> SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>ibpA</i> y <i>lrp</i>	145
3.12.3 RELACIÓN ENTRE LOS GENES <i>ygdP</i> e <i>yfeR</i>	146
3.12.3.1 Antecedentes	146
3.12.3.2 Análisis del patrón de proteínas de los mutantes <i>ygdP</i> , <i>yfeR ygdP</i> y <i>lrp</i>	147
3.12.3.3 Regulación de la expresión del gen <i>ygdP</i> según la osmolaridad del medio.....	149
4. DISCUSIÓN	151
4.1 YfeR, UNA NUEVA PROTEÍNA LysR QUE SE INDUCE EN FUNCIÓN DE LA OSMOLARIDAD DEL MEDIO	153
4.1.1 UNIÓN DE YFER A SECUENCIAS ADYACENTES. AUTORREGULACIÓN. PAPEL DE YFER EN LA REGULACIÓN DE <i>yfeH</i>	155
4.2 EL GEN <i>yfeH</i> . REGULACIÓN Y FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA YfeH.....	156
4.2.1 OSMOREGULACIÓN E INDUCCIÓN EN FASE ESTACIONARIA	157
4.3 LA PROTEÍNA YfeR INTEGRADA EN UNA RED DE REGULACIÓN GLOBAL EN <i>S. Typhimurium</i>	158
5. CONCLUSIONES	163

6. BIBLIOGRAFÍA 167

