



Universitat Autònoma de Barcelona

**Impacte dels sistemes de reparació
de lesions produïdes per agents
alquilants en la virulència de
Salmonella enterica ser. Typhimurium**



Tesi Doctoral

Gerard Àlvarez Juste

Departament de Genètica i de Microbiologia

Bellaterra, 2010



Universitat Autònoma de Barcelona

**Impacte dels sistemes de reparació
de lesions produïdes per agents
alquilants en la virulència de
Salmonella enterica ser. Typhimurium**

**Tesi Doctoral presentada per Gerard Àlvarez Juste
per a optar al Grau de Doctor en Microbiologia
per la Universitat Autònoma de Barcelona**

Amb el vistiplau dels Directors de la Tesi Doctoral:

Dr. Jordi Barbé García

Dra. Susana Campoy Sánchez

Bellaterra, 2010

i. Índex

1. Introducció	1
1.1. <i>Salmonella</i>	3
1.1.1. Classificació	3
1.1.2. Hàbitat	3
1.1.3. Patogènesi de <i>S. enterica</i>	4
1.1.4. <i>S. enterica</i> i el sistema immune	7
1.2. Tipus d'agents lesius del DNA	7
1.3. Mecanismes de reparació	9
1.3.1. Reversió directa del dany	9
1.3.2. Escissió del dany	10
1.3.3. Reparació per recombinació homòloga	13
1.3.4. El reguló SOS	15
1.4. Agents alquilants	16
1.4.1. Mecanisme alquilant	17
1.4.2. Lesions causades pels agents alquilants	19
1.4.2.1. Lesions en DNA de doble cadena	19
1.4.2.2. Lesions en DNA de cadena senzilla	19
1.4.3. Origen	20
1.4.3.1. Nitrosació de les amines	21
1.5. Proteïnes de reparació de dany alquilant	22
1.5.1. La proteïna AidB	22
1.5.2. La proteïna AlkB	24
1.5.3. La proteïna AlkA	27
1.5.4. La proteïna Ada	29
1.6. La resposta adaptativa a agents alquilants	32
1.6.1. Activació transcripcional de la resposta Ada	34
1.6.1.1. Activació durant la fase exponencial	36
1.6.1.2. Activació durant la fase estacionària	39
1.6.1.3. Regulació del gen <i>alkA</i>	40
1.6.1.4. Regulació del gen <i>aidB</i>	41
1.7. Les proteïnes Ogt i Tag	42
1.7.1. La proteïna Ogt	42
1.7.2. La proteïna Tag	43
1.8. Reparació d'alquilacions en <i>S. Typhimurium</i>	44
1.8.1. Diferències respecte a <i>E. coli</i>	44
1.8.2. Caracterització de la resposta Ada a <i>S. Typhimurium</i>	44
1.9. Reparació d'alquilacions en altres espècies	46
1.10. Sistemes de reparació que intervenen en la virulència	47
2. Objectius	51
3. Material i mètodes	55
3.1. Material	57
3.1.1. Soques bacterianes, plasmidis, bacteriòfag i oligonucleòtids	57

3.1.2. Medis de cultiu, suplementis i solucions	60
3.1.2.1. Medis de cultiu	65
3.1.2.1.1. Medi LB líquid	65
3.1.2.1.2. Medi LB sòlid	66
3.1.2.1.3. Medi LB semisòlid o LB agar tou	66
3.1.2.1.4. Medi AB	66
3.1.2.1.5. Medi BHI	67
3.1.2.1.6. Medi TB	67
3.1.2.1.7. Medi SOB	68
3.1.2.1.8. Medi SOC	68
3.1.2.1.9. Plaques verdes	68
3.1.2.2. Suplements	69
3.1.2.2.1. Antibiòtics	69
3.1.2.2.2. Glucosa	70
3.1.2.2.3. Arabinosa 0,4M	70
3.1.2.2.4. KCl 2,5M	70
3.1.2.2.5. RNasa 20 mg/ml	70
3.1.2.2.6. Agents alquilants	71
3.1.2.2.6.1. MNNG	71
3.1.2.2.6.2. MMS	71
3.1.2.2.6.3. DES	71
3.1.2.3. Altres solucions	71
3.1.2.3.1. Solució salina NaCl 0,9%	71
3.1.2.3.2. Solució de sulfat magnèsic 10 mM	72
3.1.2.3.3. Glicerol al 10%	72
3.1.2.3.4. EDTA 0,5M pH 8	72
3.1.2.3.5. Solució I	72
3.1.2.3.6. Solució II	72
3.1.2.3.7. Solució III	73
3.1.2.3.8. Terra de diatomees	73
3.1.2.3.9. TE	74
3.1.2.3.10. TAE 50 x	74
3.1.2.3.11. Solució transportadora 6 x	74
3.1.2.3.12. Aigua MQ amb dietil pirocarbonat	74
3.2. Mètodes	75
3.2.1. Mètodes microbiològics	75
3.2.1.1. Corba de creixement	75
3.2.1.2. Corba de supervivència a MNNG	75
3.2.1.3. Corba de supervivència a MMS	76
3.2.1.4. Corba de supervivència a DES	76
3.2.1.5. Corba de supervivència a pH àcid	76
3.2.1.6. Corba de supervivència a sals biliars	77
3.2.1.7. Transducció generalitzada	77
3.2.1.7.1. Obtenció d'un lisat fàgic	77

3.2.1.7.2. Titulació d'un lisat fàgic	78
3.2.1.7.3. Augment de títol d'un lisat fàgic	78
3.2.1.7.4. Infecció de la soca receptora	79
3.2.1.7.5. Selecció de clons no lisògens	80
3.2.1.7.6. Acumulació de mutacions en una mateixa soca	80
3.2.2. Mètodes de manipulació del DNA	81
3.2.2.1. Extracció de DNA cromosòmic	81
3.2.2.2. Extracció plasmídica	81
3.2.2.3. Macroextracció plasmídica	81
3.2.2.4. Transformació per electroporació	83
3.2.2.4.1. Preparació de cèl·lules competents per a transformació	83
3.2.2.4.2. Electroporació	83
3.2.2.4.3. Diàlisi	85
3.2.2.5. Reacció en cadena de la polimerasa	85
3.2.2.6. Electroforesi de gels de DNA o RNA	87
3.2.2.7. Purificació de fragments de DNA	88
3.2.2.8. Digestió amb enzims de restricció	89
3.2.2.9. Quantificació de DNA o RNA	89
3.2.2.10. Inactivació gènica en un pas	89
3.2.2.10.1. Introducció del plasmidi pKOBEGA a la soca receptora	89
3.2.2.10.2. Obtenció del DNA lineal	90
3.2.2.10.3. Transformació del fragment lineal en la soca receptora	92
3.2.2.10.4. Selecció dels clons	93
3.2.2.10.5. Pèrdua del plasmidi pKOBEGA	93
3.2.2.10.6. Pèrdua de la casset de resistència	94
3.2.2.11. Seqüenciació	95
3.2.3. Mètodes de manipulació de l'RNA	95
3.2.3.1. Extracció de l'RNA total	96
3.2.3.1.1. Cultiu per a extracció d'RNAs	96
3.2.3.1.2. Extracció d'RNA	96
3.2.3.1.3. Tractament amb DNasa	97
3.2.3.1.4. PCR de comprovació de restes cromosòmiques en l'RNA	98
3.2.3.1.5. Purificació i concentració de l'RNA	98
3.2.3.2. RT-PCR	99
3.2.3.3. RT-PCR quantitativa	100
3.2.4. Mètodes bioinformàtics	102
3.2.5. Índex de competitivitat	103
3.2.5.1. Preparació dels inòculs	104
3.2.5.1.1. Inoculacions intraperitoneals	104
3.2.5.1.2. Inoculacions orals	105
3.2.5.2. Experimentació animal	105
3.2.5.2.1. Model animal	106
3.2.5.2.2. Estabulació i dieta	106
3.2.5.2.3. Inoculació i supervisió	106

3.2.5.2.4. Necròpsia	108
3.2.5.2.5. Processat de les mostres de sang i càlcul de l'IC	109
3.2.5.2.6. Estadística	110
3.2.5.3. IC <i>in vitro</i>	111
3.2.5.3.1. Aerobiosi	111
3.2.5.3.2. Anaerobiosi	111
4. Resultats	113
4.1. Inducció de la resposta Ada a <i>S. Typhimurium</i>	115
4.2. Soques defectives en un gen de reparació d'alquilacions	116
4.2.1. Obtenció de mutants defectius en un gen de reparació d'alquilacions	116
4.2.1.1. Disseny <i>in silico</i>	116
4.2.1.2. Comprovació per RT-PCR de la unitat transcripcional <i>tag-yiaC</i>	117
4.2.1.3. Construcció de soques defectives en un gen de reparació d'alquilacions	118
4.2.1.4. Comprovació per RT-PCR quantitativa de la unitat transcripcional <i>tag-yiaC</i>	120
4.2.2. Caracterització de les soques defectives en un gen de reparació d'alquilacions	121
4.2.2.1. Corbes de creixement en absència de dany alquilant	121
4.2.2.2. Assaig de supervivència a MNNG en soques defectives en un gen de reparació d'alquilacions	122
4.2.2.3. Assaig de supervivència a MMS en soques defectives en un gen de reparació d'alquilacions	123
4.2.3. Assaig <i>in vivo</i> dels mutants defectius en un gen de reparació d'alquilacions	124
4.2.3.1. Índex de competitivitat de les soques UA1871 i UA1872	125
4.2.3.2. Índex de competitivitat dels mutants defectius en un gen de reparació d'alquilacions	126
4.3. Mutants defectius en dos gens de reparació d'alquilacions	128
4.3.1. Obtenció de mutants defectius en dos gens de reparació d'alquilacions	128
4.3.1.1. Disseny de soques mutants defectives en dos gens de reparació d'alquilacions	128
4.3.1.2. Transducció de les mutacions a noves soques	128
4.3.2. Caracterització de les soques mutants defectives en dos gens de reparació d'alquilacions	130
4.3.3. Índex de competitivitat dels mutants defectius en dos gens de reparació d'alquilacions	132
4.4. Soques defectives en múltiples gens de reparació d'alquilacions	133
4.4.1. Obtenció de mutants defectius en múltiples gens de reparació d'alquilacions	133
4.4.2. Caracterització de les soques mutants defectives en múltiples gens de reparació d'alquilacions	135
4.4.2.1. Índex de competitivitat <i>in vitro</i> de soques defectives en múltiples gens de reparació d'alquilacions	136
4.4.2.2. Assajos de supervivència a agents metilants	137
4.4.3. Índex de competitivitat <i>in vivo</i> dels mutants defectius en múltiples gens de reparació d'alquilacions	139
4.5. Soques defectives en gens vinculats a la reparació d'alquilacions i al sistema NER	140

4.5.1. Obtenció de mutants defectius en gens vinculats a la reparació d'alquilacions i al sistema NER	140
4.5.2. Caracterització de les soques defectives en gens vinculats a la reparació d'alquilacions i al sistema NER	142
4.5.2.1. Índex de competitivitat <i>in vitro</i> de la soca UA1869	142
4.5.2.2. Assaig de supervivència a MNNG en soques defectives en gens vinculats a la reparació d'alquilacions i al sistema NER	142
4.5.2.3. Assaig de supervivència a DES en soques defectives en gens vinculats a la reparació d'alquilacions i al sistema NER	143
4.5.3. Índex de competitivitat de mutants defectius en gens vinculats a la reparació d'alquilacions i al sistema NER	145
4.5.4. Índex de competitivitat de soques defectives relacionades amb UA1869	146
4.5.5. Viabilitat de la soca UA1869 en el tracte digestiu	148
4.5.5.1. Creixement en anaerobiosi de la soca UA1869	149
4.5.5.2. Assaig de supervivència a pH àcid de la soca UA1869	149
4.5.5.3. Assaig de supervivència a sals biliars de la soca UA1869	150
5. Discussió	151
5.1. Funcionalitat dels mecanismes de defensa contra agents alquilants a <i>S. Typhimurium</i>	153
5.2. Característiques del dany alquilant	156
5.2.1. Presència d'agents alquilants a l'organisme hoste	156
5.2.2. Diversitat de lesions	157
5.2.3. Origen del dany alquilant	158
5.3. Redundància dels mecanismes de reparació d'alquilacions	160
5.3.1. Redundància entre gens específics de reparació d'alquilacions	160
5.3.2. Redundància entre diferents sistemes de reparació	161
5.4. Conservació dels diferents mecanismes de reparació d'alquilacions	162
5.4.1. Conservació dels gens específics de reparació d'alquilacions	162
5.4.2. Conservació del sistema NER	163
6. Conclusions	165
7. Bibliografia	169
Agraïments	191

ii. Índex de figures

1.1. Invasió de l'epiteli intestinal	4
1.2. Model d'infecció sistèmica	5
1.3. Reparació per escissió de bases	11
1.4. Inici de la via RecBCD	14
1.5. Regulació del sistema SOS	15
1.6. Substitució nucleofílica	17
1.7. Diances de metilació dels agents alquilants S_N1 i S_N2	18
1.8. Principals amines	21
1.9. Distribució hipotètica de la proteïna AidB al voltant del DNA	24
1.10. Lesions no alquilants reparades per la proteïna AlkB	26
1.11. Mecanisme de reparació de la proteïna AlkB	27
1.12. Diances de metilació en les diferents bases nitrogenades i en el grup fosfat	28
1.13. Representació esquemàtica de la resposta Ada	31
1.14. Regulació de la resposta Ada	33
1.15. Model de regulació transcripcional de la proteïna Ada	36
1.16. Regulació transcripcional de la resposta Ada	38
1.17. Regulació del gen <i>aidB</i>	41
3.1. Marcadors de pes molecular	88
3.2. Plasmidis usats en la inactivació gènica en un pas	90
3.3. Estratègia del mètode d'inactivació gènica en un pas	91
3.4. Gel d'electroforesi per RNA	97
3.5. Amplificació per RT-PCR quantitativa	100
3.6. Inoculació d'un assaig de competitivitat	104
3.7. Immobilització i inoculació de ratolins	107
4.1. Anàlisi per RT-PCR quantitativa dels nivells d'inducció dels gens <i>ada</i> i <i>alkA</i> en la soca ATCC14028 <i>wt</i> en presència d'MNNG	116
4.2. Localització cromosòmica dels gens <i>tag</i> i <i>yiaC</i>	117
4.3. RT-PCR de la unitat transcripcional <i>tag-yiaC</i>	118
4.4. Comprovació de la inactivació en un pas del gen <i>ada</i> utilitzant oligonucleòtids interns de la casset	119
4.5. Comprovació per PCR de les soques defectives en un gen de reparació d'alquilacions	119
4.6. Anàlisi per RT-PCR quantitativa dels nivells d'inducció del gen <i>yiaC</i> en les soques $\Delta tag::Cm$ i Δtag respecte a la soca <i>wt</i>	120
4.7. Corba de creixement de les soques mutants defectives en un gen de reparació d'alquilacions	121
4.8. Sensibilitat de les soques defectives en un gen de reparació d'alquilacions als efectes letals de l'MNNG	122
4.9. Sensibilitat de les soques defectives en un gen de reparació d'alquilacions als efectes letals de l'MMS	123
4.10. Assaig de competitivitat entre la soca ATCC14028 <i>wt</i> i els mutants UA1872 i UA1871	126

4.11. Assaig de competitivitat entre la soca ATCC14028 <i>wt</i> i els mutants defectius en un gen de reparació d'alquilacions	127
4.12. Diagrama de construcció de les soques deficientes en dos gens de reparació d'alquilacions	129
4.13. Comprovació per PCR de les soques defectives en dos gens vinculats amb la reparació d'alquilacions	129
4.14. Sensibilitat de les soques defectives en dos gens vinculats amb la reparació d'alquilacions als efectes letals de l'MNNG	130
4.15. Sensibilitat de les soques defectives en dos gens vinculats amb la reparació d'alquilacions als efectes letals de l'MMS	131
4.16. Assaig de competitivitat entre la soca ATCC14028 <i>wt</i> i diversos mutants defectius en dos gens vinculats amb la reparació d'alquilacions	132
4.17. Diagrama del disseny de les soques mutants	133
4.18. Comprovació per PCR de les soques defectives en múltiples gens de reparació d'alquilacions	135
4.19. Assaig de competitivitat <i>in vitro</i> entre la soca ATCC14028 <i>wt</i> i els mutants $\Delta ada \Delta alkA \Delta alkB \Delta aidB::Cm$ i $\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta alkA::Cm$	136
4.20. Sensibilitat de les soques defectives en múltiples gens de reparació d'alquilacions als efectes letals de l'MNNG	137
4.21. Sensibilitat de les soques defectives en múltiples gens de reparació d'alquilacions als efectes letals de l'MMS	138
4.22. Assaig de competitivitat entre la soca ATCC14028 <i>wt</i> i els mutants defectius $\Delta ada \Delta ogt::Cm \Delta tag, \Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta alkA::Cm, \Delta ada \Delta alkA \Delta alkB \Delta aidB::Cm$ i $\Delta ada \Delta alkA \Delta alkB \Delta aidB \Delta tag \Delta ogt::Cm$	139
4.23. Comprovació per PCR de les soques defectives en gens vinculats a la reparació d'alquilacions i al sistema NER	141
4.24. Assaig de competitivitat <i>in vitro</i> entre les soques ATCC14028 <i>wt</i> i $\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA \Delta mfd::Cm$	142
4.25. Sensibilitat de les soques $\Delta uvrA::Cm, \Delta mfd::Cm, \Delta uvrA \Delta mfd::Cm, \Delta ada \Delta ogt::Cm \Delta tag, \Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA::Cm, \Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta mfd::Cm$ i $\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA \Delta mfd::Cm$ als efectes letals de l'MNNG	143
4.26. Sensibilitat de les soques $\Delta uvrA::Cm, \Delta mfd::Cm, \Delta uvrA \Delta mfd::Cm, \Delta alkB::Cm, \Delta ada \Delta ogt::Cm \Delta tag, \Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA::Cm, \Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta mfd::Cm$ i $\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA \Delta mfd::Cm$ als efectes letals del DES	144
4.27. Assaig de competitivitat entre la soca ATCC14028 <i>wt</i> i els mutants $\Delta uvrA::Cm, \Delta mfd::Cm, \Delta uvrA \Delta mfd::Cm$ i $\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA \Delta mfd::Cm$	145
4.28. Comprovació per PCR de la soca $\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta alkA \Delta uvrA \Delta mfd::Cm$	147
4.29. Assaig de competitivitat entre la soca ATCC14028 <i>wt</i> i els mutants defectius $\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA \Delta mfd::Cm, \Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA::Cm, \Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta mfd::Cm$ i $\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta alkA \Delta uvrA \Delta mfd::Cm$	148
4.30. Sensibilitat de la soca UA1869 als efectes letals del pH àcid	149
4.31. Sensibilitat de la soca UA1869 als efectes letals de les sals biliars	150
5.1. Diagrama de sensibilitat a la presència d'agents metilants de les soques defectives en gens vinculats a la reparació específica de lesions alquilants	154

ÍNDIX DE FIGURES

5.2. Diagrama de sensibilitat a la presència d'agents alquilants de les soques defectives en gens vinculats a la reparació d'alquilacions i al sistema NER	155
5.3. Soques defectives similars a la UA1869 assajades <i>in vivo</i>	157
5.4. Principals fonts de dany en la inoculació oral	159
5.5. Adquisició i pèrdua de gens de reparació	164

iii. Índex de taules

1.1. Substrats més importants per les diferents proteïnes de reparació de lesions alquilants	43
3.1. Soques bacterianes utilitzades en el present estudi	57
3.2. Plasmidis i bacteriòfag utilitzats en el present estudi	60
3.3. Oligonucleòtids usats en el present estudi	61
3.4. Concentracions de treball dels antibiòtics usats en el present estudi	69
3.5. Mescla de reacció per a PCR	86
3.6. Programa de termociclador per a PCR	87
3.7. Percentatges d'agarosa segons la mida dels fragments de DNA	87
3.8. Barreja de reacció per a RT-PCR	99
3.9. Programa de termociclador per a RT-PCR	99
3.10. Mescla de reacció per a RT-PCR quantitativa	101
3.11. Programació de l'aparell <i>LightCycler</i>	102
3.12. Protocol de supervisió per a l'experimentació amb animals	108
3.13. Taula de seguiment dels ratolins	109
3.14. Dilucions sembrades durant PIC <i>in vitro</i>	111
4.1. Gens de reparació d'alquilacions delecionats per inactivació gènica	117
4.2. Soques defectives en la via GGR i en gens específics de reparació d'alquilacions	148

iv. Resum

Salmonella enterica ser. Typhimurium (*S. Typhimurium*) és un enterobacteri patògen que afecta a diverses espècies de mamífers i que generalment causa infeccions lleus, com gastroenteritis, si bé pot arribar a generar malalties sistèmiques, produint septicèmia i, fins i tot, la mort de l'hoste infectat.

Com molts altres enterobacteris, el seu genoma codifica per proteïnes que permeten reparar les lesions alquilants en el DNA, les quals són causades quan agents alquilants, siguin procedents de l'ambient extern o bé originats pel propi metabolisme cel·lular, introdueixen grups alquil a les bases nitrogenades. Entre els gens que les codifiquen cal destacar *ada*, *alkA*, *alkB* i *aidB*, que componen l'anomenada resposta adaptativa a agents alquilants (resposta Ada); i *ogt* i *tag*, que desenvolupen funcions similars als anteriors però que no formen part de la resposta Ada. Altres sistemes de reparació més genèrics també intervenen en l'eliminació de lesions alquilants, essent particularment rellevants els gens que constitueixen les vies GGR (realitzada pel complex enzimàtic UvrABC) i TCR (dirigida a les zones transcripcionalment actives i portada a terme per la proteïna Mfd en conjunció amb el complex UvrABC o amb MutSL) de la reparació per escissió de nucleòtids (NER). Entre tots ells formen un grup molt ampli d'activitats de reparació que permeten reconèixer la gran varietat de dianes que poden ser generades per agents alquilants.

X Per comprendre el paper de cada un d'aquests gens durant el transcurs del procés infectiu es van construir soques defectives en un o en varis d'aquests gens. Seguidament es va analitzar la capacitat de supervivència de cadascuna d'elles al ser exposades a diferents agents alquilants. Malgrat de disposar de tantes proteïnes de reparació d'alquilacions, en la majoria de casos la manca d'una o varies d'elles va suposar una disminució de la viabilitat cel·lular quan aquestes soques creixien en presència d'agents alquilants. A continuació es van realitzar assajos de competitivitat en ratolins BALB/c per a determinar la capacitat infectiva de cada un dels mutants construïts. Els resultats experimentals obtinguts demostren que, fins i tot en les soques defectives en múltiples gens, la manca de la majoria d'aquestes proteïnes no suposa una disminució de la capacitat infectiva de *S. Typhimurium* ja que, malgrat les dades recollides prèviament a partir dels assajos *in vitro*, tan sols el mutant UA1869, deficient en els gens *ada*, *ogt*, *tag*, *uvrA* i *mfd*, va presentar una reducció de la competitivitat en relació a la soca salvatge. Per consegüent, la concentració d'agents alquilants generats a l'organisme deu ser menor a la utilitzada durant els assajos *in vitro*, de manera que la conservació dels gens de reparació d'alquilacions a *S. Typhimurium* podria ser deguda a la supervivència fora de l'hoste.

El fet que la disminució de la competitivitat s'hagi donat en la soca UA1869 i no en altres mutants, alguns amb un nombre major de mutacions, però on les funcions absents no eren tan diverses, fa pensar en l'existència d'activitats redundants entre diferents sistemes de reparació, de manera que la manca de proteïnes de reparació d'un mecanisme

podria ser compensada per altres pertanyents a sistemes amb una activitat aparentment diferent.

iv. Summary

Salmonella enterica ser. Typhimurium (*S. Typhimurium*) is an enteropathogen able to infect several mammalian species, generally causing mild diseases, such as gastroenteritis, although it can also become a systemic infection, producing septicaemia and even the death of the infected host.

Like other enterobacteria, the genome of *S. Typhimurium* codes for alkylation damage repair proteins. This kind of damage appears when alkylating agents, which are present in the environment or are produced endogenously as byproducts of normal metabolism, introduce alkyl groups in the DNA bases. Some of the most important genes coding for these proteins are *ada*, *alkA*, *alkB* and *aidB*, which generate the adaptive response to alkylation damage (known as the Ada response); and *ogt* and *tag*, which are not included in this response but possess similar functions. Other repair systems with a wider range of activities can also repair alkylation damage, being especially important the genes belonging to the *global genome repair* (GGR, which is carried out by the UvrABC enzymatic complex) and the *transcription-coupled DNA repair* (TCR, focused on the transcriptionally active genes and directed by the Mfd protein, which recruits the UvrABC or the MutSL complexes) pathways of the nucleotide excision repair system (NER). Altogether compound a large variety of repair activities which allow the recognition of a broad diversity of targets generated by alkylating agents.

xii

In order to establish the role of each of these genes and the consequences of their lack during the infection process, strains defective in one or several of them were constructed. Afterwards, each strain was treated with alkylating agents to analyze its survival. Although *S. Typhimurium* possesses so many alkylation damage repair proteins, in most strains the survival decreased due to the absence of just one or some of those proteins. Moreover, competitive assays using BALB/c mice were performed to determine the fitness of each strain. The results show that, even in those strains defective in several genes, the *in vivo* fitness of *S. Typhimurium* is not affected by the lack of most of the alkylation damage repair proteins studied, since only the strain UA1869 defective in the *ada*, *ogt*, *tag*, *uvrA*, and *mfd* genes presented a reduction of its virulence when it was orally inoculated. Therefore, the amount of alkylating agents generated in the organism might be lower than that used in the *in vitro* assays. Thus, the evolutionary conservation of the alkylation damage repair genes in *S. Typhimurium* may be due to survival outside the host.

The fact that the fitness decreased in the UA1869 strain and not in other mutants, some of them defective in a larger number of genes, suggests the existence of certain overlap between different repair systems. Thus, the absence of some repair proteins might be compensated by other belonging to other systems apparently different.

v. Abreujaments

<i>adaEc</i>	gen <i>ada</i> d' <i>Escherichia coli</i>
AdaEc	proteïna Ada d' <i>Escherichia coli</i>
<i>adaSt</i>	gen <i>ada</i> de <i>Salmonella</i> Typhimurium
AdaSt	proteïna Ada de <i>Salmonella</i> Typhimurium
AGT	O ⁶ -alquilguanina alquiltransferasa
Amp	ampicil·lina
AP	lloc abàsic
BER	reparació per escissió de bases
BHI	<i>brain heart infusion</i>
C-Ada	domini carboxi-terminal de la proteïna Ada quan aquest encara forma part de la proteïna
C-Ada19	domini carboxi-terminal de la proteïna Ada després de ser escindit del domini amino-terminal per proteòlisi de la proteïna
Cm	cloramfenicol
C-ter	domini carboxi-terminal
DEPC	dietil pirocarbonat
DES	dietil sulfat
DNA	àcid desoxiribonucleic
DO	densitat òptica
dsDNA	DNA de cadena doble
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ENNG	N-etil-N ² -nitro-N-nitrosoguanidina
E σ^{70}	RNA polimerasa que conté la subunitat σ^{70}
E σ^S	RNA polimerasa que conté la subunitat σ^S
FAD	dinucleòtid d'adenina flavina
FI	factor d'inducció
GGR	<i>global genome repair</i> : via general del NER
HTH	<i>helix-turn-helix</i>
IC	índex de competitivitat
ip	intraperitoneal
Km	kanamicina
LB	Luria-Bertani
LD ₅₀	dosi letal 50
MA	metilamina
^{me} Ada	proteïna Ada en la seva forma metilada
^{me} C-Ada	domini carboxi-terminal de la proteïna Ada en la seva forma metilada quan aquest encara forma part de la proteïna
^{me} C-Ada19	domini carboxi-terminal de la proteïna Ada en la seva forma metilada quan ha estat escindit del domini amino-terminal per proteòlisi
MeCl	clorur de metil
^{me} N-Ada	domini amino-terminal de la proteïna Ada en la seva forma metilada quan aquest encara forma part de la proteïna

ABREUJAMENTS

^{me} N-Ada20	domini amino-terminal de la proteïna Ada en la seva forma metilada quan ha estat escindit per proteòlisi del domini carboxi-terminal
mePTE	metilfosfotrièster
MgCl ₂	clorur de magnesi
MMR	reparació de falsos aparellaments
MMS	metil metanosulfonat
MNNG	N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina
MNU	N-metil-N-nitrosourea
MOI	multiplicitat d'infecció
MQ	aigua Milli-Q
MTasa	metiltransferasa
MU	metilurea
NaCl	clorur sòdic
N-Ada	domini amino-terminal de la proteïna Ada quan aquest encara forma part de la proteïna
ⁿ Ada	proteïna Ada no metilada
N-Ada20	domini amino-terminal de la proteïna Ada escindit per proteòlisi del domini carboxi-terminal
NER	reparació per escissió de nucleòtids
N-ter	domini amino-terminal
OD	<i>over-day</i> : cultiu de dia
ON	<i>over-night</i> : cultiu de nit
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
resposta Ada	resposta adaptativa a agents alquilants
RFU	<i>Relative Fluorescence Unit</i> : unitat relativa de fluorescència
RNA	àcid ribonucleic
RNasa	ribonucleasa
RNI	intermediaris reactius de nitrogen
ROI	intermediaris reactius d'oxigen
RT	retrotranscripció
RT-PCR	<i>reverse transcription</i> PCR
<i>S.</i> Typhimurium	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium
SAM	S-adenosilmetionina
SCV	vacuola que conté <i>Salmonella</i>
ser.	serovar
S _N 1	substitució nucleofílica de tipus 1
S _N 2	substitució nucleofílica de tipus 2
SPI1	illa de patogenicitat 1 de <i>Salmonella</i>
SPI2	illa de patogenicitat 2 de <i>Salmonella</i>
ssDNA	DNA de cadena senzilla
subsp.	subespècie
TCR	<i>transcription – coupled repair</i> : via NER dependent de la proteïna Mfd
t _e	temps d'elongació
T _m	<i>melting temperature</i> : temperatura de fusió

Ts	termosensible
UV	llum ultraviolada
<i>wt</i>	salvatge
α CTD	domini carboxi-terminal de la subunitat α de l'RNA polimerasa
α NTD	domini amino-terminal de la subunitat α de l'RNA polimerasa

<i>Base nitrogenada alquilada</i>	<i>Abreuament</i>	<i>Altres tipus de lesions</i>	<i>Abreuament</i>
O ⁶ -metilguanina	O ⁶ -meG	1,N ⁶ -etenoadenina	ϵ A
O ⁴ -metiltimina	O ⁴ -meT	3,N ⁴ -etenocitosina	ϵ C
N ⁷ -metilguanina	7-meG	1,N ² -etenoguanina	ϵ G
N ⁷ -metiladenina	7-meA		
N ³ -metiladenina	3-meA		
N ³ -metilguanina	3-meG		
N ¹ -metiladenina	1-meA		
N ³ -metilcitosina	3-meC		

<i>Aminoàcid</i>	<i>Codi de tres lletres</i>	<i>Codi d'una lletra</i>
Àcid aspàrtic	Asp	D
Àcid glutàmic	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteïna	Cys	C
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Triptòfan	Trp	W
Valina	Val	V

1. Introducció

1.1. *Salmonella*

1.1.1. Classificació

Salmonella és un gènere de la classe dels gammaproteobacteris i, més concretament, de la família *Enterobacteriaceae*. Està format per bacils gram negatius, anaerobis facultatius, incapaçs de desenvolupar càpsula ni espores i que estan envoltats de flagels peritrics que els confereixen mobilitat [237]. Durant anys la classificació d'aquest gènere ha estat motiu de discussió, quedant establerta en l'actualitat en tres espècies: *S. enterica*, *S. bongori* i *S. subterranea*, aquesta última aïllada recentment [313, 328]. *S. enterica* es divideix al seu torn en sis subespècies (subsp.): *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* i *indica* [328]. A més, dins de cada subespècie existeixen multitud de serovars (o serotips), entre els quals es podrien nombrar com a exemple els serovars (ser.) Typhi, Paratyphi, Enteritidis i Typhimurium, tots ells de la subsp. *enterica*.

1.1.2. Hàbitat

La majoria de *Salmonella* spp. són patògens facultatius intracel·lulars que viuen generalment colonitzant el tracte intestinal de l'hoste. Alguns estan molt adaptats a un determinat tipus d'hoste, com els serovars Gallinarum i Typhi de *S. enterica* subsp. *enterica*, que infecten galls i humans, respectivament. Altres, com les serovars Cholerasuis i Dublin de la mateixa subsp., tenen un espectre d'hoste molt més ampli [237].

Des del punt de vista sanitari, *S. enterica* subsp. *enterica* és la més rellevant, ja que causa el 99% d'infeccions per *Salmonella* en animals de sang calenta. Les altres subsp. de *S. enterica* i l'espècie *S. bongori*, en canvi, parasiten habitualment animals de sang freda [68].

El cicle infectiu de *S. enterica* i *S. bongori* té lloc majoritàriament dins d'un organisme superior, però la seva disseminació no es dona per contacte directe entre individus sinó de manera fecal – oral. Aquesta via comporta que *Salmonella* també ha de ser capaç de sobreviure fora de l'hoste, normalment en ambients aquàtics i sedimentaris, si bé també es pot trobar en sòls [68, 313]. Des d'aquests ambients pot concentrar-se en diversos substrats que li serviran com a vehicles de transmissió. El més corrent en el cas d'infecció d'humans és la seva presència en aigües i menjar contaminat per femtes, així com també per consum d'animals filtradors d'aigües contaminades i derivats animals com ous i llet [68]. Si bé al sòl no se sap si és capaç de dividir-se, es creu que sí seria possible en aliments rics en nutrients [68].

Finalment, *S. subterranea* té com a hàbitat principal els sòls àcids, sent un clar exemple d'especialització evolutiva per explotar un nínxol ecològic relativament poc utilitzat [313].

1.1.3. Patogènesi de *S. enterica*

S. enterica pot causar des d'infeccions locals com osteomielitis, meningitis, enterocolitis, etc, fins a malalties més sistèmiques com bacterièmia o febre tifoide (també anomenada febre entèrica) [68, 237]. El progrés de la infecció dependrà del serotip del patogen, de l'espècie hoste i del seu estat immunològic. La gastroenteritis sol ser el quadre clínic més habitual en humans en el cas d'infeccions per serovars no-tifoïdals com Typhimurium (al qual, d'acord amb la nomenclatura acceptada actualment per l'OMS [328], s'abreujarà en la present Tesi Doctoral com a *S. Typhimurium*) [315], mentre que els serotips tifoïdals Typhi i Paratyphi són causa de mortalitat en humans per febre entèrica. La capacitat de *Salmonella* spp. per provocar malalties sistèmiques com la febre tifoide depèn en gran part de la presència de certs plasmidis de virulència, tots ells pertanyents al grup d'incompatibilitat F de plasmidis transferibles i mobilitzables [237], raó per la qual serovars no-tifoïdals com Typhimurium poden causar ocasionalment septicèmia i febre tifoide en humans immunodeprimits [107, 197, 225]. En el cas dels múrids, aquests serotips causen un quadre patològic semblant al de la febre entèrica independentment d'haver incorporat algun d'aquests plasmidis [34, 128, 196], fet que els converteix en un bon model per dissenyar estudis *in vivo* d'infecció per *S. enterica*.

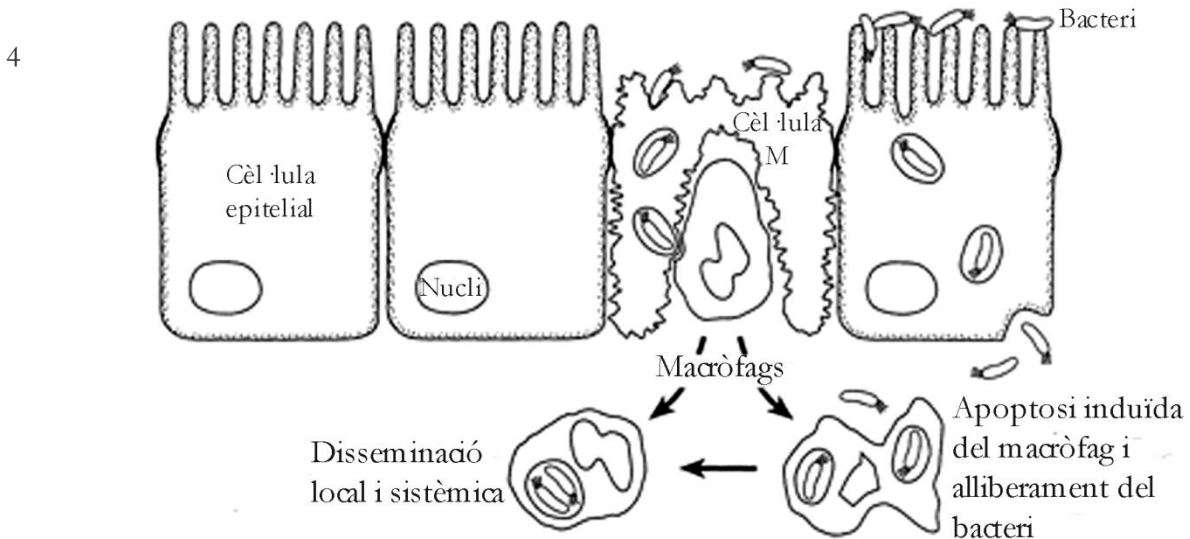


Figura 1.1. Invasió de l'epiteli intestinal. *S. enterica* utilitza tant cèl·lules M com cèl·lules epitelials columnars per arribar a la làmina pròpia, on podran ser fagocitades per macrofags residents.

Les infeccions solen iniciar-se per via oral [109] amb la ingestió de menjar contaminat no cuinat, com carn, ous o maionesa, derivats làctics, etc [247]; per la consumició de fruita o vegetals tractats amb fertilitzants [343]; etc. Les cèl·lules viatgen fins a l'intestí, on

són capaces d'envair la mucosa a través de cèl·lules epitelials columnars [95, 96] i cèl·lules M [139, 269], causant enterocolitis (Figura 1.1).

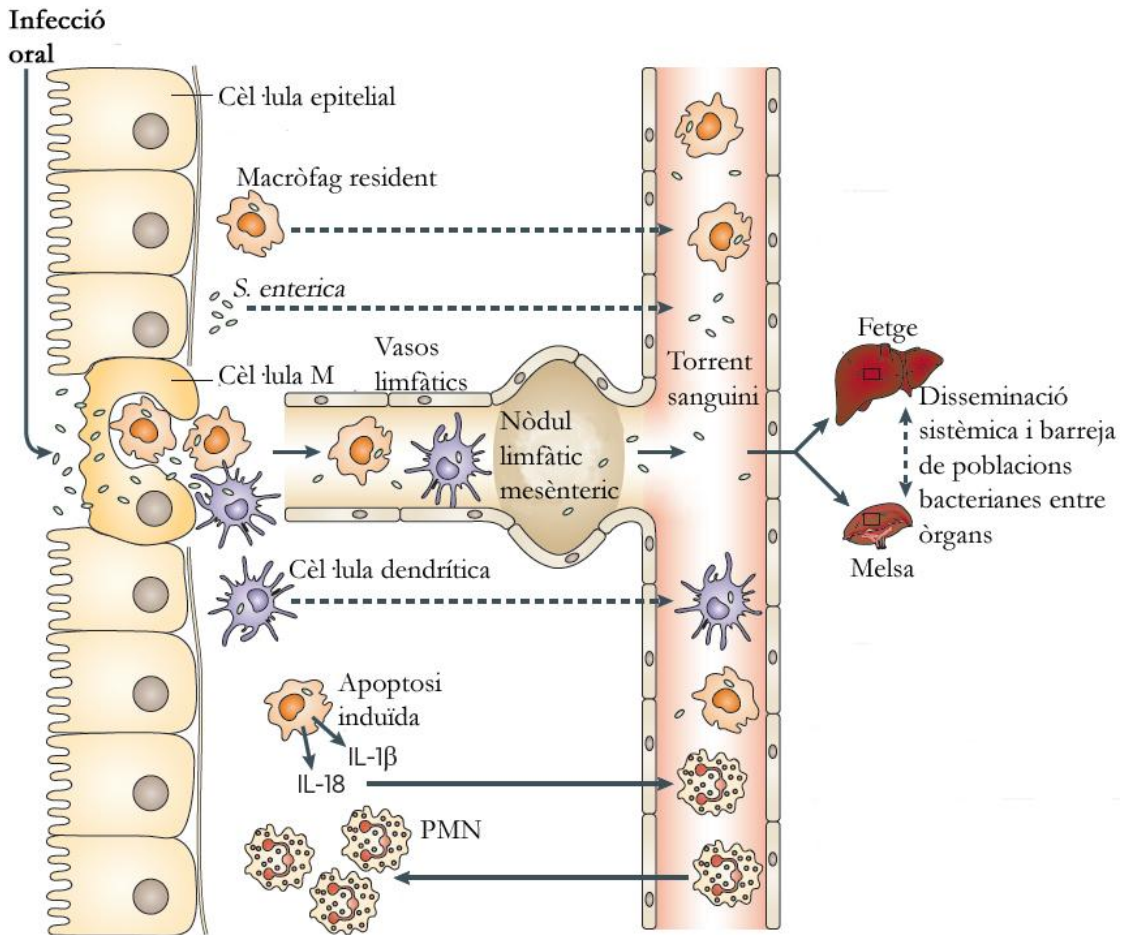


Figura 1.2. Model d'infecció sistèmica. Les cèl·lules bacterianes envaeixen l'epiteli intestinal i són fagocitades per macròfags residents i cèl·lules dendrítiques. Algunes poden viatjar directament a sang a l'interior de cèl·lules fagocítiques. Altres induïen l'apoptosi de macròfags, produint interleucines que atrauran leucòcits polimorfonuclears. També poden accedir als vasos sanguinis travessant els nòduls limfàtics. *Adaptat de Mastroeni et al [196].*

La invasió es donaria gràcies a la inducció de gens de virulència controlats per regulons com Fur [74], sensible a la concentració del ferro ambiental; o Fnr, el qual és un dels reguladors més importants de virulència i metabolisme en anaerobiosi [86]. La via preferida d'entrada són les cèl·lules M, un tipus de cèl·lules epitelials especialitzades en el transport d'antígens des del lumen de l'intestí a la submucosa per presentar-los a les cèl·lules residents del sistema immune, com macròfags i cèl·lules dendrítiques [319]. Per travessar les cèl·lules epitelials columnars i arribar a la submucosa, els bacteris utilitzen un sistema de secreció de tipus III codificat per l'illa de patogenicitat 1 (SPI1). L'ambient ric

en ferro (Fur) i pobre en oxigen (Fnr) serien senyals de l'arribada del bacteri a l'intestí prim que induirien l'expressió de l'SPI1 [5, 73]. Aquesta illa de patogenicitat conté gens estructurals del sistema de secreció que formaran un complex d'agulla que perforarà la membrana de la cèl·lula eucariota i connectarà el seu citosol amb el del bacteri, permetent-hi la introducció de factors de secreció també codificats en l'SPI1. La funció d'aquests factors de secreció serà controlar la maquinària de moviment vesicular eucariota, permetent el pas del bacteri fins a la cara basal de la cèl·lula epitelial columnar. En qualsevol dels dos casos, *S. enterica* pot replicar a l'interior de les cèl·lules abans d'arribar a la làmina pròpia [237], on podrà ser fagocitada per macròfags, cèl·lules dendrítiques i altres cèl·lules del sistema immune (Figura 1.2).

Un cop a l'interior de cèl·lules fagocítiques els bacteris podran:

- Seguir a l'interior de macròfags, accedint directament al flux sanguini i arribant a fetge i melsa (infecció sistèmica) [130, 237].
- Sobreviure dins de macròfags i causar-ne l'apoptosi per tal de seguir amb una infecció local [196].
- Produir l'apoptosi del macròfag per arribar als fol·licles limfàtics de les plaques de Peyer [338]. En aquest cas les cèl·lules bacterianes seguiran sent fagocitades i neutralitzades per macròfags, mentre que cèl·lules presentadores d'antígens com cèl·lules dendrítiques activaran cèl·lules B i T [196]. Finalment, els bacteris supervivents sortiran dels nòduls limfàtics, travessaran la làmina pròpia a través de vasos sanguinis i es dispersaran per via sistèmica fins a arribar a fetge i melsa [66, 130, 132, 173, 361].

6

En els teixits, el bacteri infectarà i replicarà dins de macròfags residents i en cèl·lules no fagocítiques [87]. Tant en aquest moment com en les altres etapes de la infecció no es troben cèl·lules hostes amb un gran nombre de cèl·lules bacterianes [314], sinó que aquestes es divideixen unes poques vegades abans de sortir de l'espai intracel·lular i formar nous focus d'infecció [349]. Si el patògen estableix l'adequat control de la replicació dins de les cèl·lules eucariotes (i, per tant, del dany causat a l'organisme) augmentaran les probabilitats d'aconseguir una infecció a llarg termini i de transmetre's a un altre hoste [84, 390], mentre que aquelles soques que no poden limitar el seu creixement solen ser atenuades [349]. L'augment poblacional del bacteri es realitzarà principalment per increment del número de focus d'infecció, que competirà amb l'escalada del sistema immune de l'hoste [314], sent aquelles cèl·lules bacterianes que s'allunyin més dels punts d'actuació del sistema immune les que sobrevisquin [196]. Finalment sortiran de nou a sang, on es mesclaran amb poblacions provinents d'altres òrgans, disseminant-se pel cos de l'hoste i causant septicèmia.

1.1.4. *S. enterica* i el sistema immune

S. enterica no és un patògen intracel·lular estricte sinó facultatiu, capaç de disseminar-se en la seva forma lliure, fora de cèl·lules de l'hoste, si bé un cop a sang correrà el risc de ser reconegut pel sistema del complement, que en promourà la lisi o l'opsonització i consegüent fagocitosi facilitada per macròfags o leucòcits polimorfonuclears. Com a resposta, *S. enterica* disposa de diversos mecanismes de supervivència extracel·lular, com per exemple l'activitat anticomplement, que evita l'opsonització i la fagocitosi [124].

L'estratègia principal de *S. enterica* per a la disseminació, però, consisteix en aprofitar el trànsit cel·lular sistèmic del sistema immune de l'hoste. Amb aquest objectiu infectarà en primer lloc cèl·lules immunològiques com macròfags o limfòcits B i T [364], residint a la via fagosoma – lisosoma, on replicarà i sobreviurà mentre és transportada cap als òrgans diana [99]. Això no significa que sigui immune als mecanismes de defensa de l'hoste, sinó que és capaç d'anar un pas per davant d'aquests per tal de mantenir en tot moment una població mínima. Per aconseguir-ho, *S. enterica* modularà la resposta immune de l'hoste per intentar establir una infecció a llarg termini que li permeti finalment transmetre's a altres hostes [237]. Per a aquesta fi utilitzarà estratègies com, per exemple, la inhibició de citocines proinflamàtores del sistema immune innat durant els primers contactes entre el bacteri i l'epiteli [384, 385]; o l'alliberació d'òxid nítric (NO), un immunosupressor utilitzat per macròfags [71]. A més, en el moment de la fagocitosi per cèl·lules del sistema immune hi haurà l'activació de gens de virulència del bacteri, la majoria dels quals estan agrupats en l'illa de patogenicitat 2 de *Salmonella* (SPI2) [155]. Aquesta, igual que SPI1, codifica per un sistema de secreció de tipus III, que permetrà l'alliberament de factors de secreció al citosol eucariota des de l'interior de la vacuola que conté la *Salmonella* (SCV) [98]. La seva funció serà la d'inhibir la fusió de lisosomes amb l'SCV [101], impedir el transport d'intermediaris reactius d'oxigen (ROI; també coneguts com a espècies reactives d'oxigen, ROS) i nitrogen (RNI; o espècies reactives de nitrogen, RNS) fins a l'SCV, disminuir la producció intracel·lular de RNI [36, 40, 75, 362], eliminar radicals d'oxigen mitjançant l'ús de superòxid dismutases [50], etc. Part d'aquests mecanismes aconseguiran que l'SCV arribi al compartiment lisosomal evitant les últimes etapes de la via dels endosomes, on el fagosoma s'hauria vist fusionat amb vesícules que contenen factors nocius pel bacteri [27, 135]. D'aquesta manera *S. enterica* podrà seguir replicant sense que la cèl·lula eucariota s'adoni que no ha neutralitzat al procariota [85].

7

1.2. Tipus d'agents lesius del DNA

Salmonella, com la resta d'éssers vius, es veu contínuament sotmesa a multitud d'agents que poden causar lesions en el seu DNA. Aquests agents poden ser tant exògens (provinents de l'hàbitat, ja sigui del sòl, del sistema immune de l'hoste, etc) com endògens (produïts pel propi organisme) [251]. A més, poden ser tant físics com químics. En

general es diu que els agents físics produeixen ruptures en el DNA, de manera que el seu efecte és independent de la replicació; mentre que els químics creen adductes i, per tant, depenen de la duplicació del material genètic per a la fixació de les mutacions. Tot i això, hi ha agents físics capaços de crear “quasi-adductes” i agents químics radiomimètics que poden generar ruptures [93].

De manera general, els **agents físics** es poden classificar en:

- Radiacions ionitzants: són els raigs X i gamma (radiacions electromagnètiques), els electrons, els protons, els neutrons i les partícules alfa (radiacions particulades). Totes elles poden trencar directament els enllaços fosfodièster, o actuar indirectament generant radicals d'oxigen altament reactius al impactar contra les molècules d'aigua [93].
- Llum ultraviolada (UV): és una radiació corpuscular que genera dímers de pirimidina. Es pot dividir en UV-A o llum negra, de longitud d'ona de 315 a 400 nm; UV-B o llum eritral, de 280 a 315 nm; i UV-C o llum germicida, de 200 a 280 nm. És aquesta última la més penetrant, arribant inclús a presentar activitat clastogènica; si a aquest fet se li afegeix, a més, que el màxim d'absorbància de la molècula de DNA es dona als 260 nm, s'entén el seu gran potencial mutagènic [93].

Per altra banda, els **agents químics** es poden classificar com a [93, 251]:

- Agents genotòxics directes: actuen directament sobre la molècula de DNA. Per exemple, els agents alquilants directes, mostasses nitrogenades, epòxids; etc.
- Agents genotòxics indirectes: requereixen ser processats pel metabolisme, ja que són els seus metabòlits els que causen l'activitat lesiva sobre el DNA. Com a exemples hi ha les N-nitrosamines; els carbamats dels pesticides, que causen alquilacions al formar adductes units covalentment al DNA; hidrocarburs aromàtics policíclics de la combustió orgànica; micotoxines; etc.
- Agents mutagènics no genotòxics: modifiquen indirectament el DNA, ja que actuen sobre altres molècules, com per exemple enzims, proteïnes importants per a la segregació cromosòmica, etc. Per exemple, la hidroxidurea, que inhibeix el mecanisme de reparació; mutàgens oxidatius; etc.
- Agents que són activats per la llum, com ara les furocumarines, que s'intercalen en el DNA i amb la llum causen encreuaments.
- Agents intercalants: són molècules cícliques planars molt semblants a les bases nitrogenades que poden intercalar-se entre dos parells de bases consecutius, augmentant la separació habitual de 34 nm i produint eventualment el trencament de la cadena de DNA.

- Anàlegs de bases: poden ser incorporats a la cadena de DNA i donar lloc a canvis de base. Per exemple, la bromodesoxiuridina, que es pot incorporar en lloc de la timina i que presenta un grau elevat de tautomeria.

Per fer front a tots aquests agents, els bacteris posseeixen diversos mecanismes de reparació que tenen com a funció superar les lesions al material genètic i garantir la supervivència cel·lular [93]. Aquelles lesions que no puguin ser eliminades abans de la duplicació cel·lular seran fixades i passaran a anomenar-se mutacions i, els agents que les provoquen, agents mutagènics [251].

1.3. Mecanismes de reparació

Els mecanismes de reparació es podrien dividir en lliures d'error i tendents a l'error [70, 117, 194, 251]. En el cas dels primers, la seva actuació permet eliminar les lesions sense introduir mutacions. Es classifiquen, al seu torn, en mecanismes de reversió directa del dany, on es retorna a l'estat previ a la formació de la lesió sense necessitat de nova síntesi; d'escissió del dany, en què les bases danyades són eliminades i reemplaçades per acció d'una DNA polimerasa; i en recombinació homòloga, un tipus de reparació postreplicativa que utilitza la cadena complementària generada durant el procés replicatiu.

Els mecanismes tendents a l'error actuen quan, a causa de lesions que no poden ser reparades per les seves característiques o per la saturació d'altres sistemes de reparació, es pot arribar a donar la mort cel·lular [24]. El seu paper és el de tolerar el dany, normalment a costa d'introduir mutacions, permetent finalitzar la divisió cel·lular.

9

1.3.1. Reversió directa del dany

Els mecanismes de reparació que en formen part són 3:

- **Fotoactivació enzimàtica:** la producció de dímers de pirimidina és un fet freqüent produït per la incidència de rajos UV en la molècula de DNA. Aquest tipus de lesió interfereix en la replicació i en la transcripció, causant mutagènesi i letalitat [383]. L'enzim fotoliasa monomeritza els dímers de pirimidina que s'hagin produït gràcies a l'aportació energètica de llum visible de 310 a 400 nm de longitud d'ona [211, 237], revertint així la lesió sense necessitat d'escindir i substituir els nucleòtids afectats. En absència de llum per activar la fotoliasa, els dímers de pirimidina també poden ser reconeguts pel mecanisme de reparació d'escissió de nucleòtids (Apartat 1.3.2) [70].
- **Lligament de trencaments de doble cadena:** la lligació del DNA s'utilitza en replicació, en recombinació i en totes les variants de reparació per escissió. A més, quan es donen trencaments de doble cadena serveix com a mecanisme de reversió

directa [70]. En aquest últim cas, les ruptures en la molècula de DNA són reparades ràpidament per una DNA lligasa específica, la qual torna a formar l'enllaç fosfodièster [237]. En el cas dels bacteris, aquest enzim pertany a la família de lligases-I NAD-dependents, mentre que en arqueas i eucariotes forma part de la família de lligases-II ATP-dependents [70].

- **Reversió d'alquilacions:** en el cas de la lesió O⁶-alquilguanina, la reversió directa es realitza mitjançant proteïnes de reparació amb activitat alquiltransferasa, les quals transfereixen el grup alquil unit a la base nitrogenada des del DNA fins a un aminoàcid de la seva pròpia cadena polipeptídica (veure els Apartats 1.5.4 i 1.7.1) [237, 253]. Altres alquilacions, en canvi, poden ser reconegudes per la proteïna AlkB (Apartat 1.5.2), d'activitat dioxigenasa, que elimina el grup alquil utilitzant una reacció d'oxidació.[93].

1.3.2. Escissió del dany

Es pot dividir alhora en 3 categories segons la maquinària utilitzada i les lesions reconegudes:

10 ▪ **Reparació per escissió de bases (BER):** actua sobre bases individuals que han estat alterades per oxidació, alquilació, hidròlisi o desaminació [154, 237]. En el primer pas actua una DNA N-glicosilasa, que eliminarà la base danyada gràcies a la hidròlisi de l'enllaç β -N-glicosídic que la unia amb la pentosa, creant un lloc abàsic (anomenat lloc AP) en la cadena de DNA (Figura 1.3) [60, 205]. De fet, aquest és un segon tipus de lesió que també pot ser generat espontàniament per despurinació o despirimidinació i és reparat per activitat AP endonucleasa [31]. Aquesta altra classe d'enzims produeix la hidròlisi de l'enllaç fosfodièster immediatament 5' o 3' del lloc abàsic, depenent del tipus d'endonucleasa. Com a conseqüència d'aquesta acció resta un fragment de desoxiribosa que impedeix l'activitat de la polimerasa, de manera que cal el processament per una exonucleasa coneguda com a DNA desoxiribofosfodiesterasa [175]. Finalment, la DNA polimerasa I (codificada pel gen *polA*) reemplaçarà el nucleòtid danyat i se segellarà el nou DNA amb una DNA lligasa (*lig*) [303].

La cèl·lula posseeix un gran nombre de DNA N-glicosilases, les quals confereixen l'especificitat del sistema BER, ja que cadascuna és capaç de reconèixer un espectre diferent de bases lesionades. Algunes són molt específiques, com la uracil DNA N-glicosilasa, que tan sols reconeix els residus d'uracil produïts per desaminació de la citosina [237]. Altres, com l'endonucleasa III (codificada per *nth*) o MutM, tenen un espectre molt més ampli. A més, les DNA N-glicosilases també es diferencien segons si només tenen activitat glicosilasa (monofuncionals), com la uracil DNA N-glicosilasa; o si porten associada una activitat endonucleasa (liasa), com l'exonucleasa

III o MutM, de manera que elles mateixes poden degradar la pentosa per β -eliminació de l'enllaç èster fosfat situat entre el grup fosfat i el C³ [158, 175]. Mentre que les primeres necessitaran de l'activitat posterior d'una AP endonucleasa, generalment l'exonucleasa III (codificada per *xthA*) o l'endonucleasa IV (*nfo*); les segones duran a terme per sí soles les dues accions [237].

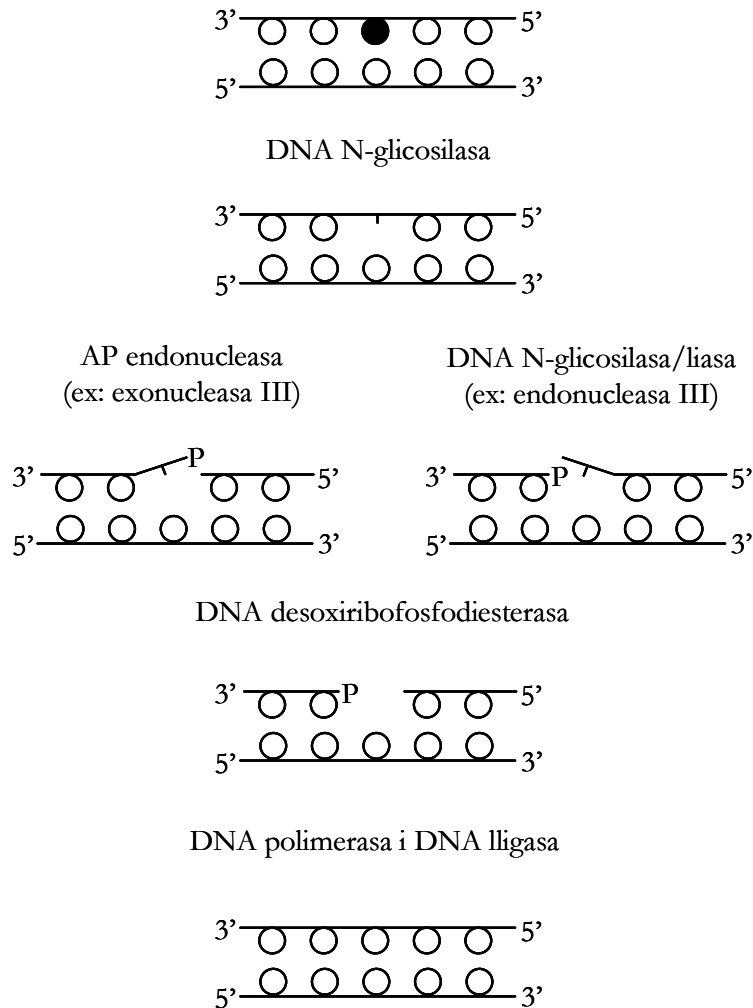


Figura 1.3. Reparació per escissió de bases. La via comença amb l'acció d'una DNA N-glicosilasa. Algunes porten associada una activitat AP endonucleasa (liasa), mentre que d'altres requereixen una AP endonucleasa com l'exonucleasa III. *Adaptat de Neidhardt [237].*

- **Reparació de falsos aparellaments (MMR):** corregeix bases mal aparellades introduïdes al DNA després de processos com la replicació o la recombinació [8, 219]. La proteïna MutS reconeix el desparellament i reclutarà a MutL [250]. Les 2 juntes reclutaran al seu torn l'endonucleasa MutH, la qual reconeix la seqüència GATC que es repeteix al cromosoma cada 200 pb aproximadament i que es troba

hemimetilada just després de la replicació. S'escindirà llavors la cadena de nova síntesi (la qual contindrà la seqüència GATC sense l'adenina metilada) compresa entre dues seqüències GATC i se sintetitzarà de nou [219, 326].

Aquesta via s'encarregaria de desaparellaments d'un sol pb [329] i petits heterodúplexs [249], mentre que desaparellaments G:T podrien ser reparats directament per MutS i MutL en el que es coneix com la via curta de reparació (*vsp: very short patch*) [219].

▪ **Reparació per escissió de nucleòtids (NER):** repara dany sobre cadenes més llargues, de 2 fins a 30 bases [188], enlloc de lesions puntuals, com ho fa el BER. Reconeix distorsions en la doble hèlix, com per exemple dímers de pirimidina, trencaments de cadena senzilla i alquilacions de més d'un carboni (etilacions, propilacions, etc). Gràcies a l'ús d'endonucleases més genèriques que en el sistema BER, el NER treballa sobre un espectre més ampli de bases modificades [237]. De fet, aquestes endonucleases no actuen sobre un tipus concret de dany, com en el BER, sinó que identifiquen estructures o determinants en el DNA que són comuns a diverses bases alterades [93]. Segons quines proteïnes intervinguin en el reconeixement del dany es pot dividir en dues vies:

- La més coneguda és la via GGR (*global genome repair*), que actua sobre tot el genoma i és duta a terme pel complex enzimàtic UvrABC [305, 352]. El trímer (UvrA)₂ – UvrB va resseguint tot el DNA, amb la proteïna UvrA cercant distorsions en la doble hèlix. Un cop es troba la lesió UvrA₂ se separa del complex i queda UvrB unida al lloc danyat [353]. UvrB recluta l'endonucleasa UvrC, que fa un tall 8 nucleòtids davant la lesió i 4 després d'aquesta i, amb l'ajut de la DNA helicasa II (també coneguda en aquest complex com a UvrD), escindirà aquest fragment de 12 nucleòtids. El buit resultant serà reomplert per la DNA polimerasa I i els extrems units per la DNA lligasa.

Posteriorment s'ha descobert la proteïna Cho, homòloga a UvrC però d'expressió induïble per dany, que també pot ser reclutada per UvrB per actuar com a endonucleasa. En aquest cas, però, només es produeix un tall 8 nucleòtids darrera la lesió (en direcció 3'), de manera que és necessari que UvrC produeixi el tall davant de la lesió, alliberant un fragment de 16 nucleòtids; o bé que actui una exonucleasa 3'→5', que degradi un fragment de mida indeterminada [355].

- L'altra via, descrita recentment, és la TCR (*transcription-coupled repair*), i que prioritza les zones del DNA que estan sent transcrites [305, 333]. Quan la cadena de DNA que fa de motlle per la transcripció presenta un trencament de cadena senzilla o bé una lesió voluminosa, tal com adductes o dímers de pirimidina [352], l'RNA polimerasa queda encallada damunt de la lesió [296, 350], impeding que sobre aquell punt puguin accedir tant la maquinària de replicació com la de reparació [61, 304, 306, 309]. En aquest cas serà la proteïna Mfd (*mutation frequency*

decline) [290, 352], i no UvrA, la que reconegui la distorsió i s'uneixi a la subunitat β de l'RNA polimerasa [97, 308]. A continuació s'uneix al DNA uns 25 pb *upstream* de l'RNA polimerasa [248, 323] i, gràcies a la seva activitat translocadora [306], estira de l'RNA polimerasa en el sentit de la transcripció fins que aquesta es desacobla del DNA o s'aconsegueix reactivar la transcripció. Un cop desacoblada, es creu que la proteïna Mfd podria captar la proteïna UvrA [290] gràcies a una regió homòloga que comparteix amb UvrB [51, 306]. A partir d'aquí la proteïna Mfd es desacoblarà [307] i se seguiria la reparació pel complex UvrABC com en la via GGR [116]. En aquest procés la presència d'Mfd és imprescindible [310], i aconseguir prioritzar les zones transcripcionalment actives de manera que es reparen més de pressa que si actués la via GGR [21, 208, 333].

També s'ha descrit que la via TCR podria interactuar amb el sistema MMR [15]: és possible que la proteïna MutS pogués reconèixer la bombolla de transcripció formada per una RNA polimerasa encallada com si d'un heterodúplex es tractés, reclutant després la proteïna MutL i estabilitzant la conformació. En aquest moment arribaria la proteïna Mfd, la qual alliberaria l'RNA polimerasa i reclutaria el complex UvrABC [209].

1.3.3. Reparació per recombinació homòloga

Forma part de la reparació postreplicativa, un mecanisme de tolerància al dany que permet sobreviure quan les lesions al DNA estan sense reparar o no són reparables [25]. Enlloc de reparar les lesions, la reparació postreplicativa les eludeix utilitzant la síntesi per translesió (mecanisme tendent a l'error: veure l'apartat següent) o la recombinació homòloga (lliure d'error) [24].

Aquesta última actua en reparació de trencaments de doble cadena, buits (*gaps*) postreplicatius en cadena senzilla, etc [242]. Intervenien en la reparació els complexos RecBCD o RecFOR, els quals recluten la proteïna RecA [223, 254]. La reparació es dona per recombinació homòloga aprofitant que el creixement bacterià sol permetre varies còpies equivalents del cromosoma [45].

En el cas dels trencaments de doble cadena, en gram negatius actua principalment la via RecBCD (exonucleasa V) [56], que s'uneix a la zona propera del trencament (Figura 1.4). Les subunitats RecB i RecD actuen com a helicases obrint la fibra de DNA alhora que realitzen activitat nucleasa sobre les dues cadenes. En el moment en què la subunitat RecC reconeix la seqüència χ (5'-GCTGGTGG-3') el complex passa a hidrolitzar tan sols la cadena 5', deixant intacta la 3', que serà recoberta per RecA [69]. Finalment, es promourà la invasió d'aquesta cadena dins d'una de germana, formant una estructura de *Holliday* que serà resolta per les proteïnes RuvA, RuvB i RuvC [45, 62]. El complex RecFOR, per la seva banda, repara trencaments de cadena senzilla, si bé també pot actuar

en trencaments de doble cadena quan la via RecBCD no és funcional (en gram positius és, de fet, la via majoritària [118]). El seu mecanisme és molt complex i encara està sent estudiat, si bé sembla que comparteix amb RecBCD el reclutament de la proteïna RecA, la formació de l'estructura de *Holliday* i la resolució per les proteïnes RuvA, RuvB i RuvC [119]. En primer lloc utilitzaria RecJ, una exonucleasa 5' → 3', per hidrolitzar la cadena 5' i deixar la 3' intacta, igual que feia RecBCD (Figura 1.4, pas 5). A aquesta última s'hi unirien proteïnes SSB (*single-strand binding protein*) per estabilitzar el DNA de cadena senzilla (ssDNA). Posteriorment, el complex RecFOR desplaçaria les proteïnes SSB mentre afavoriria la unió de la proteïna RecA fins que la cadena 3' estigués tota recoberta, passant a la formació de l'estructura de *Holliday* [279].

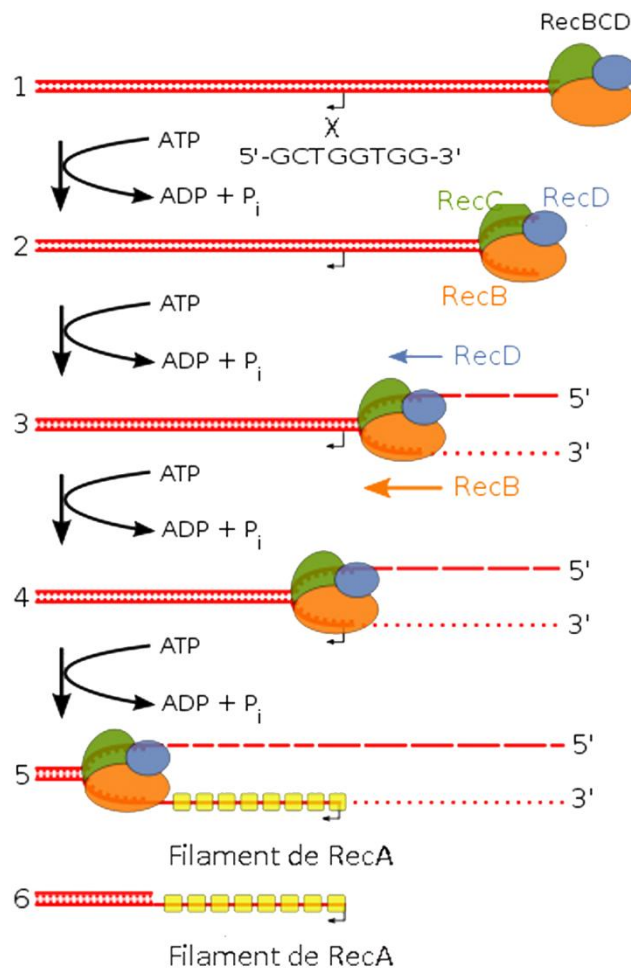


Figura 1.4. Inici de la via RecBCD. El complex RecBCD s'uneix al DNA (pas 1) i comença a separar les dues cadenes (pas 2). La subunitat RecD hidrolitza la cadena 5' amb menys freqüència que RecB, que alhora estarà produint nombrosos talls en la cadena 3' (pas 3). Un cop trobada la seqüència χ (pas 4), RecD segueix hidrolitzant la cadena 5' mentre que la cadena 3' es deixa intacta (pas 5), de manera que serà recoberta per la proteïna RecA.

1.3.4. El reguló SOS

El reguló SOS és un mecanisme de reparació tendent a l'error per la utilització de DNA polimerases capaces d'eludir la lesió per síntesi per translesió, si bé també és capaç de promoure la reparació per recombinació [24]. És un sistema multigènic format per més de 40 gens i regulat negativament per la proteïna LexA i positivament per RecA (Figura 1.5) [76, 373].

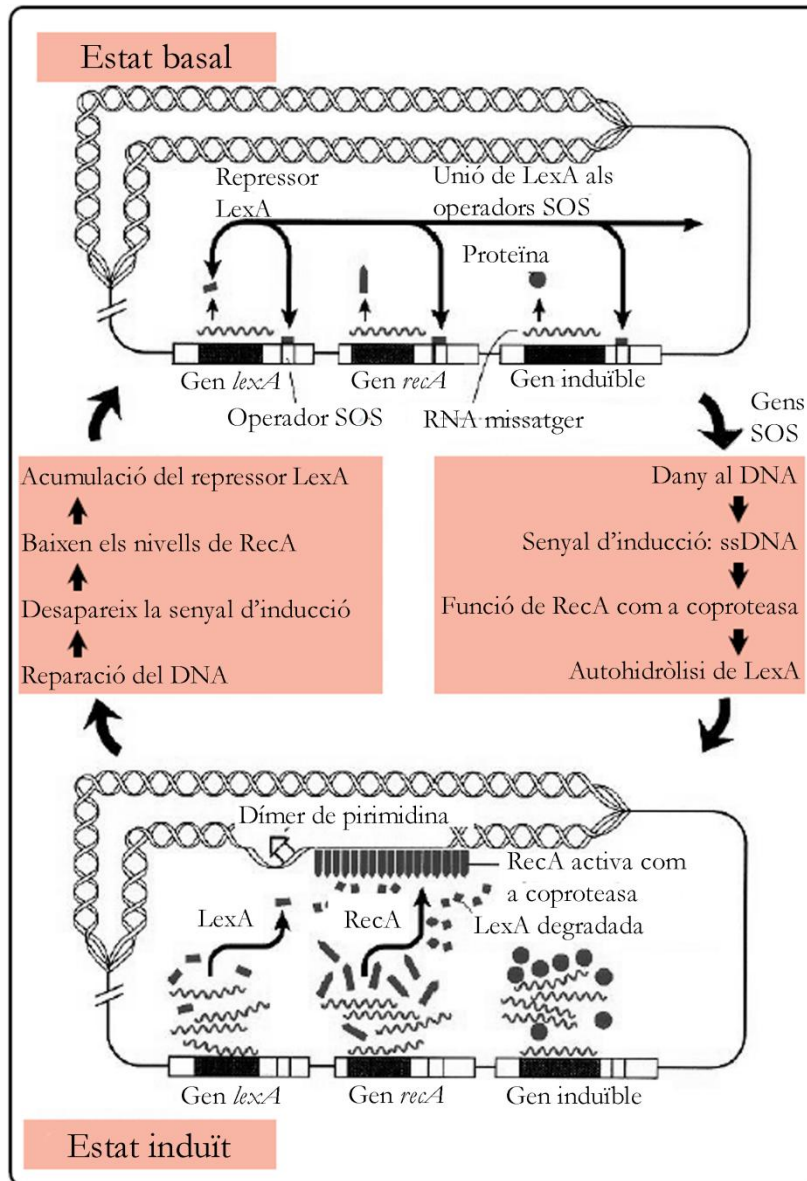


Figura 1.5. Regulació del sistema SOS. En estat basal, la proteïna LexA s'uneix a les caixes SOS dels gens del reguló, inhibint-ne l'expressió. En presència de lesions en el DNA s'indueix la seva autohidròlisi, permetent l'activació del sistema. Un cop reparat el dany es permet de nou l'acumulació de la proteïna LexA, retornant als nivells basals. *Adaptat de Serment et al [312].*

En situació normal el repressor del sistema (LexA) està en forma de dímer unit a una seqüència concreta, coneguda com a caixa SOS, present en els promotors dels gens del reguló [292]. El bloqueig de les forques de replicació per la presència de lesions no reparades, o a l'acumulació de moltes d'elles en el material genètic, produeix l'aparició de zones d'ssDNA [44, 83, 264]. Aquests fragments d'ssDNA seran recoberts per monòmers de la proteïna RecA, l'activador del sistema. Aquesta unió es dona de manera cooperativa i donarà lloc a un nucleofilament proteic, el qual es considera la forma activada de la proteïna RecA [312]. En aquest estat actuarà com a coproteasa, induint l'autohidròlisi de la proteïna LexA, que perdrà la seva capacitat d'unir-se a la caixa SOS [131], permetent l'increment dels nivells d'expressió del reguló i la reparació de les lesions [76], ja que molts dels gens induïts formen part de sistemes de reparació.

Així, entre les proteïnes del sistema SOS que se sintetitzaran hi haurà:

- RecA i SSB, que estabilitzaran els fragments d'ssDNA.
- UvrA, UvrB, RuvAB, RecN, etc, les quals permetran la reparació de lesions per escissió, recombinació homòloga, etc [373].
- Les DNA polimerases II, IV i V (codificades pels gens *polB*, *dinB* i *umuDC*, respectivament), que desencallaran les forques de replicació realitzant síntesi per translesió [94, 206, 234, 340, 372].
- SulA, que mitjançant la inhibició de la divisió cel·lular impedirà la fixació de les lesions [354].

16

Un cop reparat el dany disminuirà el número de zones de ssDNA, de manera que la proteïna RecA retornarà a la forma inactiva, permetent de nou l'acumulació de la proteïna LexA i la repressió del sistema, retornant a l'estat basal.

1.4. Agents alquilants

Els agents alquilants són substàncies químiques genotòxiques amb potencialitat mutagènica i carcinogènica. Produeixen alquilacions transferint un grup alquil (cadena hidrocarbonada acíclica i saturada, la qual ha perdut un hidrogen per poder actuar de substituent en un compost químic) a posicions nucleofíliques de la molècula de DNA [148]. Els seus efectes poden ser tant citotòxics com mutagènics, depenent del tipus d'agent alquilant, el mecanisme de transferència del grup alquil i de la posició del DNA on s'incorpora [239]. Els agents alquilants més importants són els metilants, en primer lloc perquè els seus efectes són més perjudicials que els causats per adductes més grans com etils, propils, etc; i en segon lloc perquè representen un dels majors grups de components nocius pel DNA.

1.4.1. Mecanisme alquilant

Els agents alquilants duen a terme un mecanisme de substitució nucleofílica, el qual es coneix com a S_N . Es poden classificar en dos tipus, S_N1 i S_N2 (Figura 1.6) [251].

Els **agents alquilants S_N1** s'anomenen monomoleculars ja que en el pas que determina la cinètica de la reacció intervé una sola molècula. S'acostuma a donar en halurs d'alquil secundaris o terciaris i presenta com a intermediari un carbocatió (C^+). Primerament es forma el carbocatió per dissociació d'un grup sortint, per exemple, d'un protó. En segon lloc es produeix l'atac nucleofílic per part del grup entrant, en aquest cas, el grup alquil. La seva cinètica només depèn del primer pas, la formació del carbocatió, i no de la nucleofilitat del nucleòfil. És a dir, dependrà de la concentració del substrat i no de la del nucleòfil.

Els **agents alquilants S_N2** s'anomenen bimoleculars perquè en el pas que determina la cinètica de la reacció hi ha involucrades dues espècies reactives. En aquest cas, el grup entrant farà un atac nucleofílic sobre la molècula diana, desplaçant el grup sortint i restant transitòriament el carboni que ha rebut l'atac en forma pentacoordinada, per finalment alliberar el grup sortint. A diferència del cas anterior, la seva cinètica dependrà tant de la concentració de nucleòfil com de substrat.

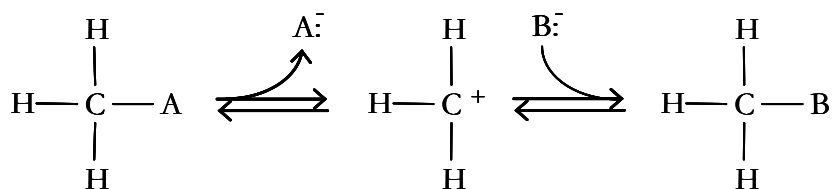
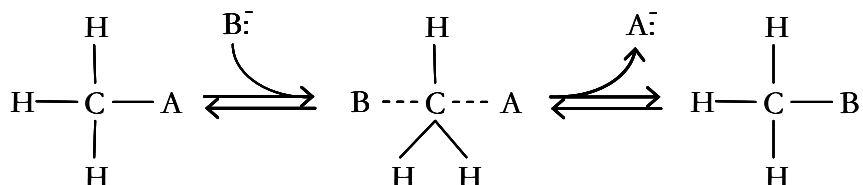
Mecanisme monomolecular (S_N1)Mecanisme bimolecular (S_N2)

Figura 1.6. Substitució nucleofílica. Les alquilacions es poden donar per substitució nucleofílica monomolecular (part superior), on el grup sortint (A) es desprèn abans de l'arribada del grup entrant (B); o per mecanisme bimolecular (part inferior), en què els grups entrant i sortint estan units transitòriament al mateix àtom. *Adaptat de Nieminszyczy [239].*

Les diferències en els seus mecanismes d'actuació comporten diferències en el tipus d'alquilacions que generen (Figura 1.7). Els agents alquilants S_N1 poden formar adductes en les bases nitrogenades del DNA tant en els àtoms de nitrogen (N-alquilacions) [239, 298] com en els exocíclics d'oxigen (O-alquilacions, sobre oxígens que es troben units a l'anell de purines o pirimidines però que no formen part de l'anell pròpiament dit) [239]; a més de poder actuar sobre oxígens del grup fosfat de l'esquelet del DNA, produint metilfosfotrièsters [299]. Els agents S_N2 , en canvi, pràcticament es limiten només als nitrògens de l'anell tant de purines com de pirimidines [239, 298]. És per aquesta raó que es diu que els agents S_N1 són altament mutagènics, ja que les O-alquilacions solen ser mutagèniques; mentre que les N-alquilacions tenen efectes citotòxics [386].

En qualsevol cas, aquests són dos extrems dins d'un espectre, ja que existeixen molts agents que poden actuar tant com a S_N1 com a S_N2 . És a dir, es pot donar que un agent majoritàriament S_N2 dugui a terme un atac nucleofílic sobre un carbocatió (mecanisme S_N1); o que un agent majoritàriament S_N1 realitzi un atac nucleofílic amb el mecanisme S_N2 .

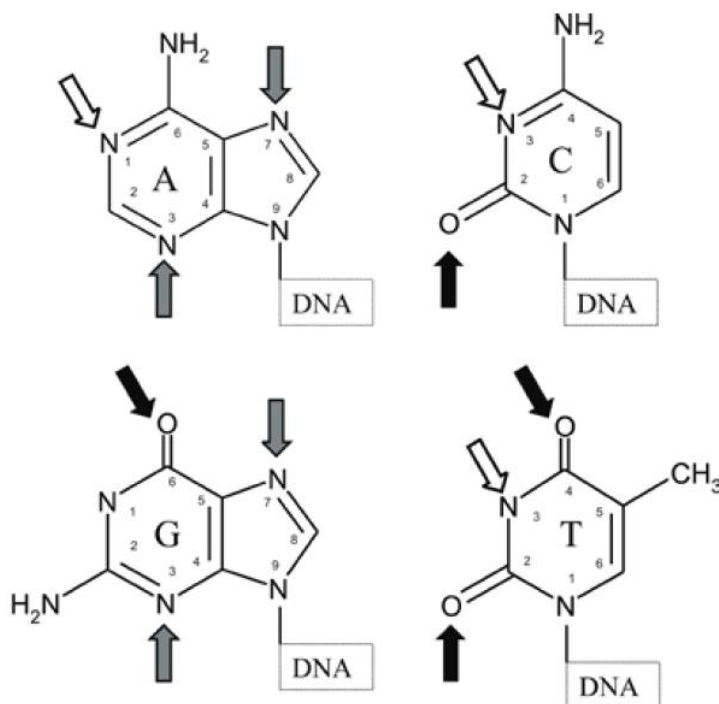


Figura 1.7. Dianes de metilació dels agents alquilants S_N1 i S_N2 . Les fletxes grises indiquen els àtoms que poden ser metilats per la majoria d'agents alquilants. Les fletxes blanques i negres indiquen les possibles dianes alquilables tan sols per agents alquilants S_N1 i S_N2 , respectivament. Adaptat de Nieminuszczy [239].

Per citar alguns exemples d'agents alquilants, l'N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) i l'N-metil-N-nitrosourea (MNU) són agents metilants de tipus S_N1 [359]; mentre que el metil metanosulfonat (MMS), el iodur de metil (MeI), el dimetil sulfat (DMS) i la S-adenosilmetionina (SAM) són de tipus S_N2 . Com a agents etilants es podrien citar l'N-etil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (ENNG) com a S_N1 i el dietil sulfat (DES) com a S_N2 .

1.4.2. Lesions causades pels agents alquilants

1.4.2.1. Lesions en DNA de doble cadena

Les posicions N^7 de la guanina i N^3 de l'adenina són les més reactives en el DNA [93]. La lesió més freqüent en DNA de doble cadena (dsDNA) és, precisament, la metilació en la posició N^7 de la guanina (7-meG) (Figura 1.7), encara que biològicament no és la més important, ja que no afecta en el reconeixement de la base per part de les polimerases [184, 298, 321]. Sí que és important la formació de la N^3 -metiladenina (3-meA), generada per la majoria d'agents alquilants, i que provoca citotoxicitat, ja que bloca la força de replicació [142, 220].

La metilació en la posició O^6 de la guanina (O^6 -meG) és considerada l'alquilació més important pels seus efectes mutagènics [182, 203, 252, 277, 299, 359], essent la mutació majoritària produïda per agents metilants. El grup metil interfereix de manera que la polimerasa afegeix preferentment timina davant la guanina, donant lloc a transicions G:C→A:T [10, 179, 276, 324]. La seva acumulació pot arribar a ser letal. Juntament amb la 3-meA, l' O^6 -meG produiria la majoria d'efectes biològics ocasionats per agents alquilants [320].

A més de l' O^6 -meG, la metilació en la posició O^4 de la timina (O^4 -meT) també indueix falsos aparellaments [299]. El fet de què els agents alquilants S_N1 siguin altament mutagènics es deu, en part, a què reaccionen fàcilment amb els oxígens del DNA, generant el principal adducte formador de falsos aparellaments, l' O^6 -meG, i també l' O^4 -meT [63, 298].

Finalment, també hi ha altres lesions minoritàries en dsDNA, com són l' N^7 -metiladenina, l' N^3 -metilcitosina (3-meC), l' N^1 -metiladenina (1-meA), etc (Figura 1.7) [239].

1.4.2.2. Lesions en DNA de cadena senzilla

Les metilacions més freqüents en ssDNA són l'1-meA i la 3-meC, generades sobretot per agents alquilants S_N2 [299], encara que ocasionalment poden ser generades per agents S_N1 [19, 321]. Aquestes mutacions també es generen en RNA, però gairebé mai en

dsDNA, ja que afecten a posicions que intervenen en l'aparellament de bases [19, 80]. Són lesions molt citotòxiques, ja que el grup alquil sobresurt de tal manera que bloqueja la DNA o l'RNA polimerasa i, per tant, la força de replicació o la bombolla de transcripció, respectivament [59]. En canvi, són poc mutagèniques per la seva escassa capacitat de produir falsos aparellaments durant la replicació [299]. La mutagènesi observada normalment serà dependent de la DNA polimerasa V (codificada per *umuDC*) del sistema SOS (Apartat 1.3.4) [94, 105], que s'induirà per l'aparició de zones d'ssDNA, donant lloc a transversions A:T→T:A [330] i canvis de pauta de lectura -1 G i -2 CG [59, 240, 241].

Els agents alquilants són, doncs, molt variats, i produeixen un ampli espectre d'alquilacions, des de les més innòcues a les més perjudicials; i des de mutagèniques, com l'O⁶-meG i l'O⁴-meT; fins a citotòxiques, com la 3-meA, l'N³-metilguanina (3-meG), l'1-meA i la 3-meC, que interfereixen en la força de replicació [298].

1.4.3. Origen

Els agents alquilants poden ser tant endògens (fruit del metabolisme cel·lular) com exògens (d'origen ambiental).

20 Els **agents alquilants exògens** més abundants són els halurs orgànics, i dins d'aquests halurs d'alquil com el clorur de metil (MeCl) (S_N2) [239]. El MeCl és alliberat per plantes i fongs com a producte de la destoxicació del clorur [301], a més de ser generat en la combustió i la descomposició de la matèria orgànica [115]. Altres compostos alquilants són antibiòtics generats per algunes espècies d'*Streptomyces* del sòl [299]; productes de la nitrosació d'amides, d'amines, d'aminoàcids i de pèptids sintetitzats químicament en sòls àcids [297]; hidrocarburs halogenats provinents de fonts antropogèniques [106]; bromur de metil produït de manera natural a l'oceà per alguns tipus d'algues [239]; NO alliberat per macròfags [67]; etc.

Els **agents alquilants endògens** no són menys importants. De manera anàloga a la formació endògena de ROI, que poden provocar dany en el DNA, els agents alquilants són produïts pel metabolisme cel·lular, especialment durant la fase estacionària [298], requerint sistemes de reparació que els contrarestin. En un inici es va postular que el SAM, el principal donador de metils a nivell cel·lular, podia ser responsable de la generació del dany alquilant endogen [183, 274]. No obstant, aquesta possibilitat es va acabar descartant, puix que és un agent S_N2 de baixa reactivitat (unes 2.000 vegades menys que l'MMS [257, 274]) amb poca capacitat per produir lesions detrimentals [239, 274, 298]. Actualment es consideren com a fonts d'alquilacions endògenes la peroxidació lipídica i, en especial, la nitrosació d'amines [100, 185]. Aquesta última es produeix per la reacció entre el nitrit i aminoàcids, pèptids i poliamines [120, 186, 297, 344], resultant-ne

compostos N-alquil-N-nitrosos com MNU [239] o MNNG [344], els quals, al ser de tipus S_N1 [299], són potencials inductors de lesions mutagèniques com l'O⁶-meG.

1.4.3.1. Nitrosació de les amines

Les amines són molècules que contenen un àtom de nitrogen i deriven de l'amoniac (NH_3) per substitució dels hidrògens per grups substituents (R) (Figura 1.8). Segons el nombre d'hidrògens substituïts es classifiquen en amines primàries, secundàries o terciàries. A més, poden ser alquil amines, si els grups són alquil; aril amines, si el nitrogen està unit a un grup aromàtic; o cícliques, quan el nitrogen està inclòs en un hidrocarbur cíclic, com en la purina. La nitrosació de les amines consisteix en la substitució d'un dels seus àtoms d'hidrogen per un radical nitrosil (-NO).

La formació de les N-nitrosamines, les quals comprenen un gran nombre de compostos mutagènics, es dona per la reacció del ió nitrosil (NO^+) amb una amina secundària en la reacció $R_2-NH + NO^+ \rightarrow R_2-N-NO + H^+$. El procés haurà començat amb la formació del ió nitrosil en la reacció $NO_2^- + 2 H^+ \rightarrow NO^+ + H_2O$, on una molècula de nitrit (NO_2^-) haurà reaccionat amb dos protons per alliberar el ió nitrosil (NO^+). Les amines primàries i terciàries no solen donar com a productes agents mutàgens.

S'ha demostrat *in vitro* que la reacció de nitrosació és possible en condicions fisiològiques a pH baix o mitjançant diferents enzims cel·lulars, i que *in vivo* estaria potenciada en condicions d'anaerobiosi o en cèl·lules estacionàries [32, 33, 67, 156, 265]. Entre aquests enzims es trobaria la nitrat reductasa, la qual permet la reducció del nitrat a nitrit, pas previ imprescindible per a què es doni la reacció de nitrosació [33]. En aquests experiments, realitzats amb metabòlits endògens, s'ha vist que és possible la

condensació de la metilamina (MA) amb carbamil fosfat (precursor de les pirimidines) per formar metilurea (MU) [149]. Aquesta, al seu torn, pot donar MNU per nitrosació [360]. Un altre exemple de nitrosació seria la formació de dimetilnitrosamina a partir de la dimetilamina incubada en *Escherichia coli* en fase estacionària. D'aquesta manera s'han presentat diversos candidats per a la generació d'agents mutàgens per nitrosació, com la MA, la MU, petits pèptids i aminoàcids i els seus productes de degradació [37, 207, 360].

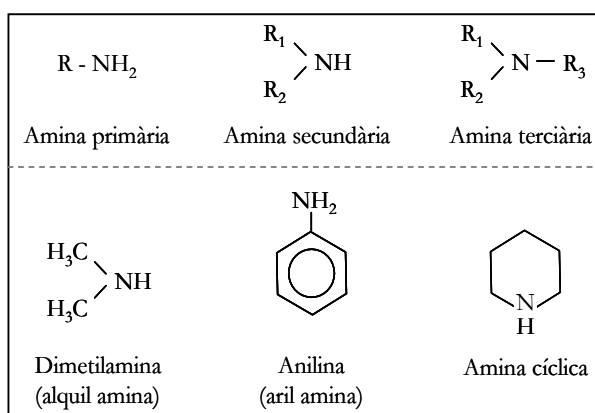


Figura 1.8. Principals amines. A la part superior s'esquematitza els diferents tipus d'amines segons el nombre de substituents. A la part inferior, els tipus segons la naturalesa dels substituents.

1.5. Proteïnes de reparació de dany alquilant

Existeixen diversos mecanismes de reparació que permeten superar el dany alquilant, els quals es troben conservats en gairebé tots els microorganismes i també en eucariotes [6, 70, 239]. Entre ells cal destacar:

- Sistema NER (Apartat 1.3.2).
- Sistema MMR (Apartat 1.3.2).
- Sistema SOS (Apartat 1.3.4).
- Recombinació homòloga (Apartat 1.3.3) [243].
- Proteïnes de protecció al dany alquilant.
- Sistema BER (Apartat 1.3.2).
- Activitat desmetilasa oxidativa.
- Activitat alquiltransferasa.

Si bé els quatre primers són genèrics, existeixen diverses proteïnes de reparació específiques de dany alquilant. La majoria de bibliografia relacionada amb la reparació d'alquilacions està basada en estudis en *E. coli*, raó per la qual en els següents apartats s'utilitzarà aquest microorganisme com a model.

22

1.5.1. La proteïna AidB

El substrat exacte sobre el que actua i el seu mecanisme de reparació segueixen sense estar definits malgrat tots els esforços realitzats per obtenir informació sobre la seva funció i estructura.

Des del punt de vista funcional, fins al moment es coneix que:

- El gen *aidB* presenta una expressió induïble per l'agent metilant MNNG (tipus S_N1), d'aquí el seu nom *aid*, d'*alkylation inducible gene* [368, 369]. A més, la seva sobreexpressió permet reduir els efectes mutagènics causats per aquest agent [164].
- Curiosament, un mutant deficient en AidB també és sensiblement més resistent als efectes de l'MNNG [164]; però no comporta cap canvi al ser exposat ni a MNU (també agent metilant S_N1) ni a MMS (agent metilant S_N2) [370].

Sembla, doncs, que la seva funció deu estar relacionada amb agents N-metil-N-nitrosos (com l'MNNG), però no està clar quin és el seu substrat concret perquè aquest agent metilant produeix els seus efectes mutagènics i citotòxics quan és activat pel propi metabolisme cel·lular durant la seva via de destoxicació [171]. Tenint en compte que la

deficiència en *aidB* augmenta la resistència a MNNG, el més probable és que la proteïna AidB intervingui en algun pas de la via de destoxicació [164].

Pel que fa a la seva estructura:

- La seva seqüència és similar a la de varies isovaleril-coenzim A deshidrogenases de mamífers [164], les quals intervenen en el metabolisme de la leucina [134]. Aquest fet i la presència d'un cofactor dinucleòtid d'adenina flavina (FAD) en la seva estructura [272], del qual probablement depengui la seva activitat reparadora, han permès la seva classificació dins de la **superfamília de flavoproteïnes d'activitat acil-coenzim A deshidrogenasa** [164, 272]. Tot i això, no presenta gaire capacitat per desenvolupar activitat isovaleril-coenzim A deshidrogenasa.
- La proteïna AidB té un pes molecular aproximat de 235 KDa i està formada per quatre monòmers idèntics. Cada monòmer, de 60.500 Da, conté la seva pròpia molècula de FAD i està format al seu torn per quatre dominis, tres dels quals són típics del nucli de les acil-coenzim A deshidrogenases. El quart domini, situat a l'extrem C-ter i d'estructura α -helicoidal, no es troba en altres membres d'aquesta superfamília [23].
- El quart domini de cada monòmer queda exposat a la cara externa del tetràmer i forma una zona d'unió a dsDNA [23]. Aquesta unió no requereix una seqüència nucleotídica específica, no depèn de l'estat de metilació del DNA i es pot donar també amb DNA nu (sense cap proteïna unida) [272], patró que recorda a la proteïna Dps, la qual protegeix el DNA del dany oxidatiu [3, 193].
- Per formar l'estructura quaternària homotetramèrica de la proteïna AidB els monòmers s'agrupen en dos dímers, quedant exposades dues superfícies idèntiques de contacte amb el DNA, una a cada banda de la proteïna [23]. Com es pot apreciar a la Figura 1.9, la molècula de DNA no envolta la proteïna AidB, sinó que queda atrapada en una cavitat formada per un *complex proteic*, de manera que cada molècula de DNA pot estar envoltada de varies proteïnes AidB i cada una d'aquestes unir diverses zones del DNA [272].

Tot aquest complex propiciaria la protecció del DNA. La proteïna AidB podria interceptar agents alquilants del tipus de les nitrosoguanidines [164, 171] (com l'MNNG o algun dels seus metabòlits) abans de què arribessin al DNA i els introduiria a la butxaca que conté el FAD, la qual està situada prop de la boca de la proteïna i de la zona d'unió al DNA. Dins d'aquesta cavitat, el substrat quedaria unit a les cadenes mòbils de residus com l'Asn-421, Trp-424 i Glu-425 [23]. La butxaca també és rica en grups tiol i metilsulfur de residus Cys i Met, els quals podrien intervenir en la destoxicació del substrat, tot i que encara no es coneix exactament ni el substrat ni les reaccions que patiria.

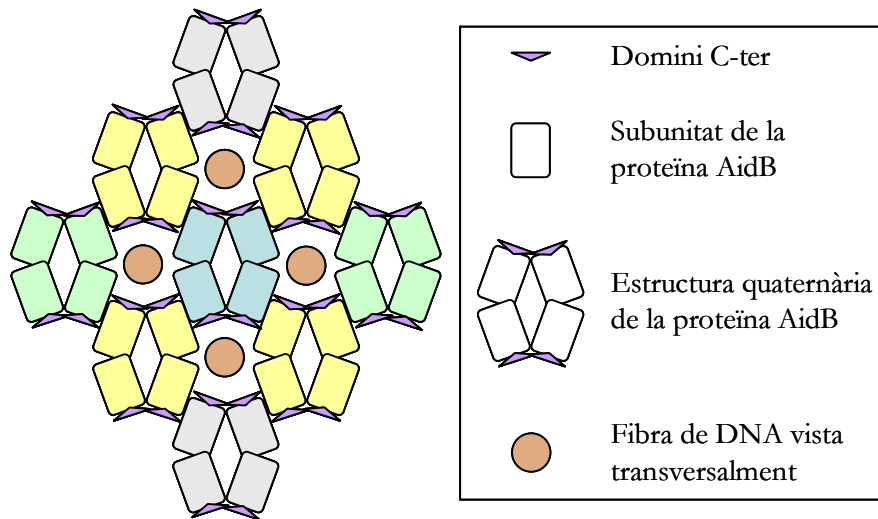


Figura 1.9. Distribució hipotètica de la proteïna AidB al voltant del DNA. Atès que la proteïna AidB s'uneix al DNA pel domini C-ter situat a la cara superficial de la proteïna, diverses molècules d'AidB se situarien simètricament amb els dominis d'unió encarats al DNA, formant porus de 25 Å que envoltarien la fibra de DNA, protegint-la dels agents alquilants. A l'esquema es representen 9 proteïnes AidB de diversos colors per a major claredat. *Adaptat de Bowles et al [23].*

1.5.2. La proteïna AlkB

24 És una proteïna de 23.900 Da codificada en el gen *alkB*, el qual forma part de l'operó *ada – alkB* [152]. Desenvolupa la funció d'**1-meA/3-meC DNA dioxigenasa** i pertany a la superfamília de les dioxigenases α -cetoglutarat- Fe^{2+} dependents, una superfamília que es caracteritza per requerir un àtom de Fe^{2+} (ferrós) com a cofactor i d' α -cetoglutarat i oxigen molecular (O_2) com a cosubstrats [7, 79, 351]. En el cas de la proteïna AlkB, l'única dioxigenasa descrita capaç d'actuar sobre DNA [298], l'àtom de Fe^{2+} es troba unit per dues histidines (H) i un grup carboxilat en el motiu $\text{HX}[\text{D/E}]\text{X}_{50-200}\text{HXNR}$, on X representa qualsevol aminoàcid. El residu d'Arg (R) més carboxi-terminal d'aquest mateix motiu serà l'encarregat d'interaccionar amb l' α -cetoglutarat [260, 275, 295] en el moment de la reparació, la qual es realitza per la reacció de desmetilació oxidativa [7, 299].

La proteïna AlkB repara principalment les lesions 1-meA i 3-meC, les quals solen produir-se en ssDNA per l'acció d'agents alquilants $\text{S}_\text{N}2$ [58, 376]. De fet, les soques defectives en AlkB són especialment sensibles a agents alquilants $\text{S}_\text{N}2$ com l'MMS [144, 145], mentre que la seva sensibilitat a agents alquilants $\text{S}_\text{N}1$ és moderada [59, 321]. Aquestes lesions són molt citotòxiques per la seva capacitat d'interferir en l'avanç tant de forques de replicació com de bombolles de transcripció (Apartat 1.4.2.2) [59], de manera que aquests seran bàsicament els llocs d'actuació de la proteïna AlkB, la qual serà essencial durant la fase exponencial, quan hi ha les taxes de replicació i transcripció més elevades [58, 59].

A més d'1-meA i 3-meC presents en ssDNA, la proteïna AlkB també és capaç d'actuar sobre els diferents tipus d'RNA, encara que la seva activitat és unes 10 vegades menor [1, 351]. Això planteja certs problemes, ja que tant tRNAs com rRNAs necessiten d'algunes bases en la forma 1-meA i 3-meC per a empaquetar-se i actuar correctament [273]. Es desconeix si existeix algun mecanisme per distingir les bases metilades necessàries de les aberrants, o si es podria tolerar nivells baixos de desmetilació si fossin restaurats per RNA metiltransferases [246]. Per altra banda, sembla que la proteïna AlkB pràcticament no actua sobre dsDNA, on es pot arribar a trobar aquestes lesions si s'aconsegueix la rehibridació de les cadenes [59].

A més de les anteriors també s'han descrit altres dianes sobre les quals podria actuar la proteïna AlkB:

- Pot revertir bases alquilades amb radicals més llargs, com etils, hidroxietils, propils i hidroxipropils [150]. Així doncs, per exemple, és capaç d'actuar sobre l'N¹-etiladenina, l'N³-hidroxietilcitosina, etc.
- És capaç de protegir contra epòxids (compostos cíclics que contenen un anell format per dos àtoms de carboni i un d'oxigen) que generen hidroxialquils [298].
- Pot reconèixer lesions no produïdes per agents alquilants:
 - Adductes exocíclics com l'1,N⁶-etenoadenina (εA), la 3,N⁴-etenocitosina (εC) o l'1,N²-etenoguanina (εG), els quals són productes de la peroxidació lipídica generats en condicions d'estrès oxidatiu (Figura 1.10). Tal com es pot apreciar en la Figura 1.12, aquests adductes afecten precisament els nitrògens que participen en la formació dels ponts d'hidrogen, d'aquí el seu gran potencial citotòxic. A més, s'ha comprovat que l'εC pot aparellar-se amb A, T o C; i l'εA dóna predominantment a transicions A:T→G:C [217]. La seva reparació s'ha vinculat a les DNA N-glicosilases, tot i que diversos autors han demostrat que AlkB també es capaç de restaurar εA i εC a adenina i citosina, respectivament [52, 217].
 - Igualment s'ha demostrat la seva funció reparant etanoadenina (Figura 1.10) [92].
- *In vitro* s'ha vist que podria actuar sobre trinucleòtids lliures, metildesoxiribonucleòsid monofosfat (me-dAMP) [150], N¹-metilguanina i N³-metilimina [217]. Totes aquestes activitats, però, han resultat ser ineficients *in vivo* [239].

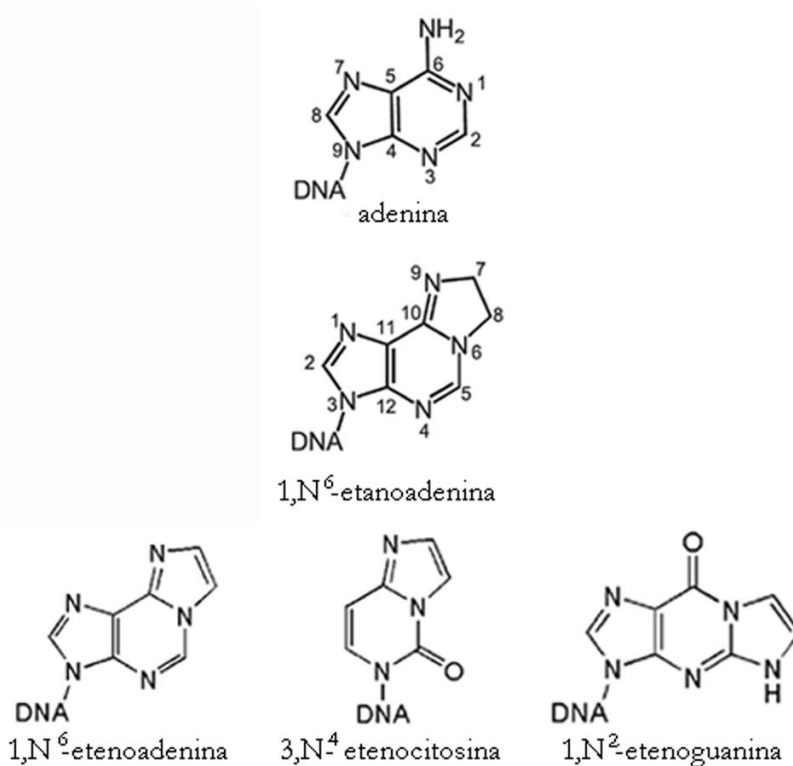


Figura 1.10. Lesions no alquilants reparades per la proteïna AlkB. A la part superior de la figura es representa l'adenina en la seva forma nativa. Al centre, l'1,N⁶-etanoadenina, deriva de l'adenina per la incorporació d'un grup età. A la part inferior les diferents etenobases, les quals es generen per la unió d'un grup etè, formant un anell addicional. *Adaptat de Frick et al [92] i Mishina et al [217].*

26

El mecanisme de reparació de la proteïna AlkB (Figura 1.11) es basa en acoblar la hidroxilació de la lesió (grup alquil) amb la descarboxilació oxidativa d'una molècula d' α -cetoglutarat [260, 275, 295]. En el cas de l'1-meA i la 3-meC, primer l' α -cetoglutarat es descarboxila en presència d'una molècula d'oxigen amb l'ajuda del grup Fe^{2+} present al centre catalític de la dioxigenasa AlkB [298], donant lloc a succinat més un grup carboxil transitori. Un àtom d'oxigen s'unirà al grup carboxil per formar CO_2 , mentre que l'altre àtom s'incorporarà en forma d'hidroxil en el metil de la base danyada. D'aquesta manera s'haurà obtingut com a productes CO_2 i succinat per una banda [260, 295], i com a conseqüència de la hidroxilació del metil es generaran els productes intermedis 1-hidroximetiladenina o 3-hidroximetilcitosina, segons el cas. El nou grup $-\text{CH}_2\text{OH}$ obtingut és inestable i s'escindirà espontàniament de la base nitrogenada, generant una molècula de formaldehid (HCHO) i quedant restaurada la base nitrogenada [351].

En el cas de les bases amb grups alquil més llargs, la reversió de la lesió segueix el mateix mecanisme, amb l'oxidació del grup alquil corresponent. Per exemple, l' N^1 -etiladenina patiria hidroxilació del grup etil, alliberant acetaldehid (H_3CCHO) enlloc de formaldehid.

Pel que respecte a les etenobases i etanobases, el mecanisme segueix sent de reversió directa tot i que el procés és diferent: la proteïna AlkB produeix epoxidació sobre els dos enllaços de l'adducte etè, alliberant-lo en forma de glioxal (OCHCHO) i deixant la base nitrogenada restaurada.

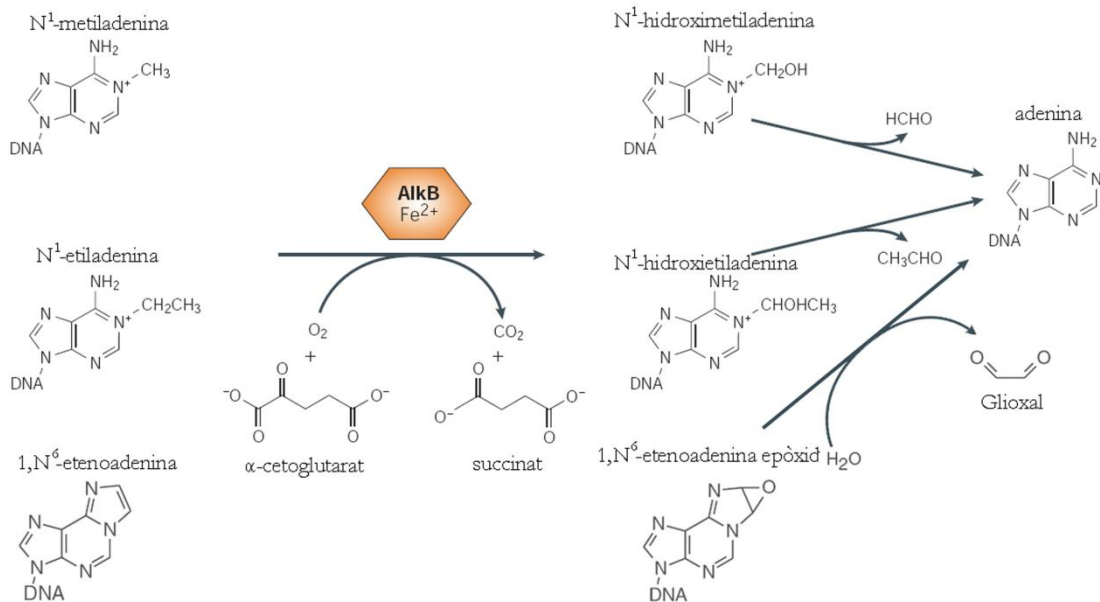


Figura 1.11. Mecanisme de reparació de la proteïna AlkB. La descarboxilació d'una molècula d' α -cetoglutarat en presència d'oxigen permet a la proteïna AlkB la hidroxilació de diferents substrats alquilats. L'alliberació espontània del grup oxidat restaurarà la base nitrogenada al seu estat natural. *Adaptat de Sedgwick [298] i Delaney et al [52].*

27

1.5.3. La proteïna AlkA

La proteïna AlkA té un pes molecular aproximat de 31,5 KDa [231] i es coneix també com a **3-meA-DNA glicosilasa II** [229]. La seva funció principal és la d'eliminar la 3-meA (Apartat 1.4.2.1), una lesió molt freqüent i citotòxica que pot ser generada tant per agents metilants S_N1 com S_N2 (Figura 1.12).

És una DNA N-glicosilasa monofuncional del sistema BER (Apartat 1.3.2) [194] considerada membre de la família HhH de les DNA N-glicosilases, i a la qual també pertanyen N-glicosilases com l'endonucleasa III (*nth*) i MutY, si bé aquestes presenten a més activat liasa [235]. Totes elles es caracteritzen per unir-se al DNA gràcies a un motiu HTH (*helix-turn-helix*), altrament conegut com a HhH (*helix-hairpin-helix*) [158]. Un cop sobre el DNA, AlkA obligarà al nucleòtid danyat a girar sobre sí mateix per quedar encarat al centre actiu [129], alhora que un residu de leucina s'intercalerà en el DNA per reomplir l'espai generat [298]. Seguidament el residu Asp-238 del centre actiu

desprotonarà una molècula d'aigua, la qual al seu torn realitzarà l'atac nucleofílic que trencarà l'enllaç β -N-glicosídic [158].

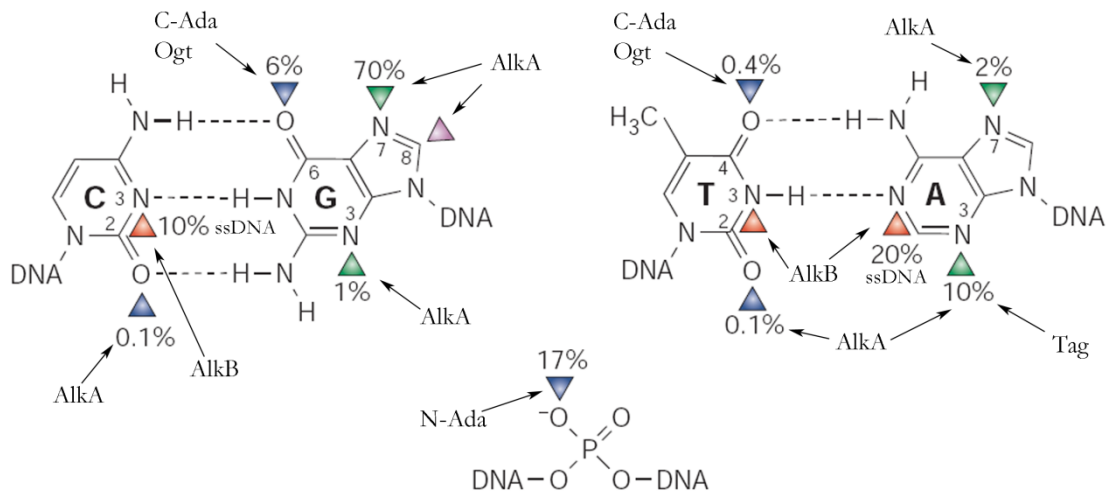


Figura 1.12. Dianes de metilació en les diferents bases nitrogenades i en el grup fosfat.

Les fletxes blaves indiquen els àtoms de carboni que solen ser metilats per agents S_N1 . Les fletxes vermelles assenyalen àtoms que poden ser metilats en ssDNA per agents S_N2 . Les fletxes verdes mostren les dianes que poden ser metilades per la majoria d'agents alquilants. La fletxa porpra assenjala una posició que pot ser metilada per radicals de metil. Es mostra amb percentatge la freqüència amb què es metilada cada posició. Finalment, està indicada quina és la proteïna encarregada de corregir cada cas. *Adaptat de Sedgwick [298].*

28

Si bé el seu paper en la reparació de la 3-meA és biològicament dels més importants, la proteïna AlkA és capaç de reconèixer un espectre molt ampli de lesions (Figura 1.12) [13, 154, 200, 262]. Es desconeix, però, quin pot ser el tret comú que reconeix en les bases aberrants, ja que aquestes difereixen en el solc que ocupen, en les seves característiques estèriques, etc [170, 176]:

- Repara N^3 -metilpurines (generades tant per S_N1 com per S_N2) i O^2 -metilpirimidines (produïdes pràcticament només per S_N1 al ser O-alquilacions) [203, 229, 231].
- És capaç de reparar 7-meG. Aquesta lesió és caracteritzada per tenir el grup metil aberrant situat al solc major del DNA, mentre que les lesions del punt anterior tenen el grup metil situat en el solc menor [238, 298]
- Escindeix C^8 -metilguanina, una lesió poc estudiada induïda per radicals metil [102, 127].
- Pot reconèixer diverses lesions que no són produïdes per agents alquilants:

- Pot actuar sobre etenobases com l'εA (Figura 1.10) i l'N²,3-etenoguanina, generades com a conseqüència de la peroxidació de lípids en situacions d'estrès oxidatiu [72, 192, 199, 287], així com reparar etanobases [113].
- També sobre altres derivats de l'adenina, com la hipoxantina [141], que és un derivat natural de les purines consistent en una adenina desaminada [93]. La hipoxantina és típica del metabolisme de les purines i està present en alguns tRNA en la forma de nucleòsid d'inosina (dIMP: hipoxantina unida a ribosa) [288]. En el DNA, aquesta lesió es pot generar espontàniament o per efecte d'un radical lliure d'òxid nítric [382]. Habitualment és reconeguda per una hipoxantina-DNA glicosilasa específica, però també pot ser escindida per AlkA. En cas de no ser reparada és una lesió mutagènica que dona lloc a transicions A:T→G:C [126, 142].
- Reconeix 5-formiluracil [18, 262], una de les lesions majoritàries generades per radiació ionitzant i que és producte de l'oxidació de la timina. Si no és reparada dona lloc a transicions A:T→G:C [143].
- És capaç de reparar un producte de la timina amb l'anell fragmentat generat per oxigen actiu [262].
- Pot eliminar les formes no modificades de guanina i adenina, encara que amb una freqüència molt baixa [13].

1.5.4. La proteïna Ada

La proteïna Ada, de 39.351 Da de pes molecular [228], és coneguda com a **O⁶-meG-DNA metiltransferasa tipus I**. Presenta 2 dominis funcionals units per una zona flexible sense estructura definida anomenada frontissa [53]. Aquesta zona posseeix una diana susceptible a l'activitat d'una proteasa endògena, cosa que permet l'obtenció dels dos dominis: el domini carboxi-terminal (C-Ada) i l'amino-terminal (N-Ada) [190]. Els dos desenvolupen activitats alquiltransferases, si bé actuen sobre substrats diferents, i són capaços de conservar la seva funció després del trencament de la proteïna (Figura 1.12) [300]. En ambdós casos es dona la transferència a la cadena polipeptídica del grup alquil, el qual habitualment és un metil, de manera que freqüentment es fa referència a la proteïna Ada com a metiltransferasa (MTasa).

El **domini C-Ada**, de 19 KDa, desenvolupa una funció **O⁶-meG MTasa** i té com a dianes tant l'O⁶-meG com l'O⁴-meT, les quals, si no són reparades, indueixen la formació de transicions G:C→A:T i A:T→G:C, respectivament [138, 186, 293]. La proteïna Ada reconeix la base danyada i transfereix de manera irreversible el grup metil des de la base nitrogenada a la Cys-321, situada en el domini C-Ada, revertint totalment la lesió [54, 55, 245]. Aquesta Cys-321 es troba en una seqüència altament conservada (VIPCHRVI) que

permet crear un ambient adequat per a la transferència [55, 133, 283]. D'igual forma també es troba conservada una seqüència RAV[A/G] pertanyent a un dit d'arginina situat a la segona hèlix d'un motiu HTH present a C-Ada [46, 47, 378].

Es creu que aquest domini localitzaria la lesió al reconèixer una determinada pertorbació estructural en el DNA i que la seva unió al DNA es donaria només sobre la cadena metilada i sense implicar un canvi conformacional important en la proteïna. De fet, C-Ada pot reparar O⁶-meG tant en ssDNA com en dsDNA amb una eficiència semblant, tot i que la reparació de la lesió en ssDNA seria més lenta, probablement perquè la pertorbació serà menor i més difícil de reconèixer [17]. La reparació no es podria donar immediatament després de localitzar la lesió ja que la Cys-321, que fa d'acceptor final del metil, queda parcialment amagada dins de l'estructura terciària de la proteïna Ada, de manera que inicialment no té accés al grup metil [221]. Per aquesta raó, en primer lloc cal que el motiu HTH d'unió al DNA situat a C-Ada acobli la proteïna a la zona de la lesió per a què, seguidament, el dit d'arginina present a la segona hèlix d'aquest motiu s'introdueixi entre els nucleòtids i promogui el gir del nucleòtid danyat [47, 221, 371], obligant-lo a introduir-se dins la proteïna a través d'una obertura de la superfície i quedant així alineat amb la Cys-321 [371]. En aquest ambient hidrofòbic tindrà lloc la transferència de l'alquil a la Cys-321, la qual es produeix gràcies a l'atac nucleofílic del seu grup tiol (R-SH), que és activat a anió tiolat just en el moment de l'atac per una tètrada catalítica d'àtoms d'hidrogen present en el domini C-Ada que recorda lleugerament a la tríada catalítica de les serin proteases [363]. La reacció de transferència és estequiomètricament irreversible i segurament segueix un mecanisme S_N2 [177, 178, 325, 363]. No es coneix cap mecanisme per revertir la transferència i recuperar l'activitat O⁶-meG MTasa, raó per la qual no es considera la proteïna Ada com un enzim sinó com una proteïna de reparació suïcida [148, 176, 177].

30

El **domini N-ter**, de 20 KDa, presenta activitat **metilfosfotrièster-DNA MTasa** i té com a diana enllaços fosfodièster que han estat metilats en un dels seus àtoms d'oxigen, formant un metilfosfotrièster (mePTE) [255]. Aquesta metilació, encara que no infreqüent, és bastant innòcua per la cèl·lula. Per tant, no és d'estranyar que el domini N-Ada reconegui només l'S-diastereoisòmer de mePTE de DNA però, en canvi, no l'R-diastereoisòmer [202, 204, 377]. Un cop reconegut, el domini N-Ada realitzarà la transferència irreversible del metil, aquest cop a la Cys-38, quedant inactivat. Aquesta transferència produeix un canvi conformacional en la proteïna Ada, la qual es converteix en **activador transcripcional** [230, 365] i guanya la capacitat d'unir-se específicament a tres promotors: els dels gens *aidB* i *alkA*, i el de l'operó *ada - alkB* (Figura 1.13) [152, 299]. La inducció dels quatre gens es coneix com a resposta adaptativa a agents alquilants (resposta Ada).

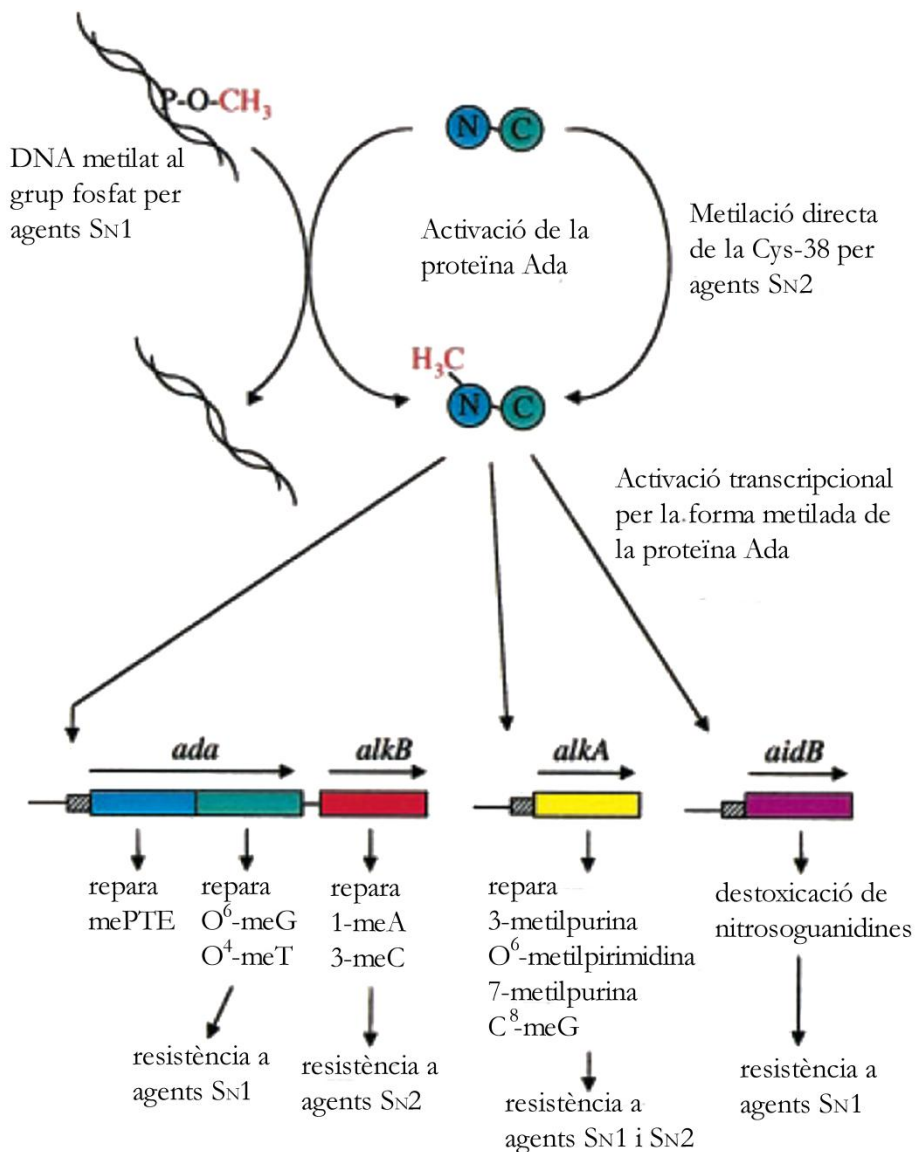


Figura 1.13. Representació esquemàtica de la resposta Ada. La metilació del residu Cys-38 de la proteïna Ada provoca la inducció de la transcripció dels gens de la resposta Ada. L'activació de la proteïna Ada es pot donar tant per agents S_N1 com S_N2 . *Adaptat de Sedgwick et al [299].*

Cal aclarir que en estudis previs a l'any 2002 es considerava la Cys-69 [300] enlloc de la Cys-38 [123] com a acceptor final del grup metil. Estudis estructurals posteriors han demostrat que, de fet, intervé un dit de zinc format per quatre cisteïnes: les Cys-38, -42, -69 i -72 [121, 122, 226], totes elles essencials i altament conservades en molts microorganismes [299]. Fortament unit a les quatre Cys hi hauria un catió de Zn^{2+} , el qual es requereix pel correcte empaquetament de la proteïna, i que metaloactiva l'àtom de sofre (R-SH) de la Cys-38, aportant-li la nucleofilicitat necessària per a la transferència del metil [227]. El metil incorporat no participa en el reconeixement dels promotors, sinó que tan sols indueix un canvi en la conformació que crearà un nou lloc d'alta afinitat pel

DNA [174]. Aquest lloc d'unió als promotors estaria format per un motiu HTH d'unió al DNA situat a N-Ada i una regió bàsica de la proteïna [280, 299].

1.6. La resposta adaptativa a agents alquilants

La conservació de proteïnes de reparació d'alquilacions en gairebé tots els microorganismes denota la importància d'aquest tipus de lesions [70, 297]. No obstant, tot i que poden contrarestar la majoria d'efectes causats per agents alquilants, només són capaços d'actuar a dosis subletals d'aquests, ja que a concentracions més altes els sistemes se saturen. Per poder respondre a dosis superiors els organismes disposen de la resposta Ada [299, 365, 366], la qual s'activa tan bon punt es detecta la presència de lesions alquilants en el DNA. La seva completa inducció requereix aproximadament una hora [93], però l'augment de proteïnes de reparació d'alquilacions conferirà a la cèl·lula una major resistència als efectes mutagènics i tòxics a dosis letals [82, 178, 359].

La importància de la resposta Ada no recau només en l'augment de proteïnes de reparació, sinó també en la varietat de les seves funcions, ja que s'obtidrà (Figura 1.13) [64, 299]:

- Un augment de l'activitat O⁶-meG i O⁴-meT MTasa gràcies a la proteïna Ada.
- L'increment de reparacions sobre 1-meA i 3-meC degut a la proteïna AlkB.
- Una major eficiència de reparació de metilacions per part del sistema BER com a conseqüència de la inducció d'AlkA [389].
- Un increment de la destoxicació de nitrosoguanidines per part d'AidB.

La suma de totes les seves activitats permetria fer front a dotze de les catorze lesions per metilació que es poden donar en el DNA [298], incloses les quatre més importants (O⁶-meG, 3-meA, 1-meA i 3-meC) [299].

La proteïna Ada deu el seu nom a la resposta adaptativa a agents alquilants, on hi té un paper clau desenvolupant fins a quatre funcions diferents (Figura 1.14) [93, 178]:

- Actua com a quimiosensor, reconeixent i reparant lesions alquilants gràcies a l'activitat mePTE-DNA MTasa del domini N-Ada [123, 178]. És remarcable que l'evolució hagi seleccionat l'S-diastereoisòmer de mePTE com a marcador de la presència d'agents alquilants per induir la resposta Ada tot i ser un tipus de lesió bastant innòcua, ja que no té efecte ni en l'aparellament de bases ni en la replicació i la transcripció. De fet, els R-diastereoisòmers de mePTE no són reparats i resten al DNA sense conseqüències deletèries [169, 215].
- Desenvolupa el paper d'activador transcripcional de la resposta Ada [2].
- Presenta l'activitat reparadora O⁶-meG MTasa del domini C-Ada.

- És el repressor de la resposta Ada. Durant anys va ser discutit quin era el mecanisme repressor de la resposta, tenint en compte que el pas a activador transcripcional de la proteïna Ada es dona per la transferència del metil, la qual és irreversible, és a dir, que un cop reparat tot el dany la concentració de l'activador transcripcional no disminueix. S'han anat proposant diverses hipòtesis (un efecte de dilució de les proteïnes Ada activades al llarg dels cicles de divisió [53, 278]; o la inactivació per proteòlisi de la proteïna Ada [2, 54], la qual generaria dominis N-Ada metilats, que continuarien unint-se als promotors però que serien incapaçs d'actuar com a activadors transcripcionals en *ada-alkB* i *aidB* [346]) les quals s'han acabat descartant pel seu baix efecte repressor. Actualment, diversos estudis recolzen que la pròpia proteïna Ada actua com a repressor del sistema: a mesura que disminueix el dany alquilant es donarà l'acumulació de proteïnes Ada no metilades. A partir d'una determinada concentració, que podria estar al voltant de les 200 molècules, començarà a inhibir-se l'acció inductora de la forma metilada d'Ada [278]. La regió responsable d'aquesta inhibició resideix en els últims 67 aminoàcids de la regió C-Ada, ja que si manca la proteïna Ada perd la capacitat de produir la inhibició de la resposta Ada [278].

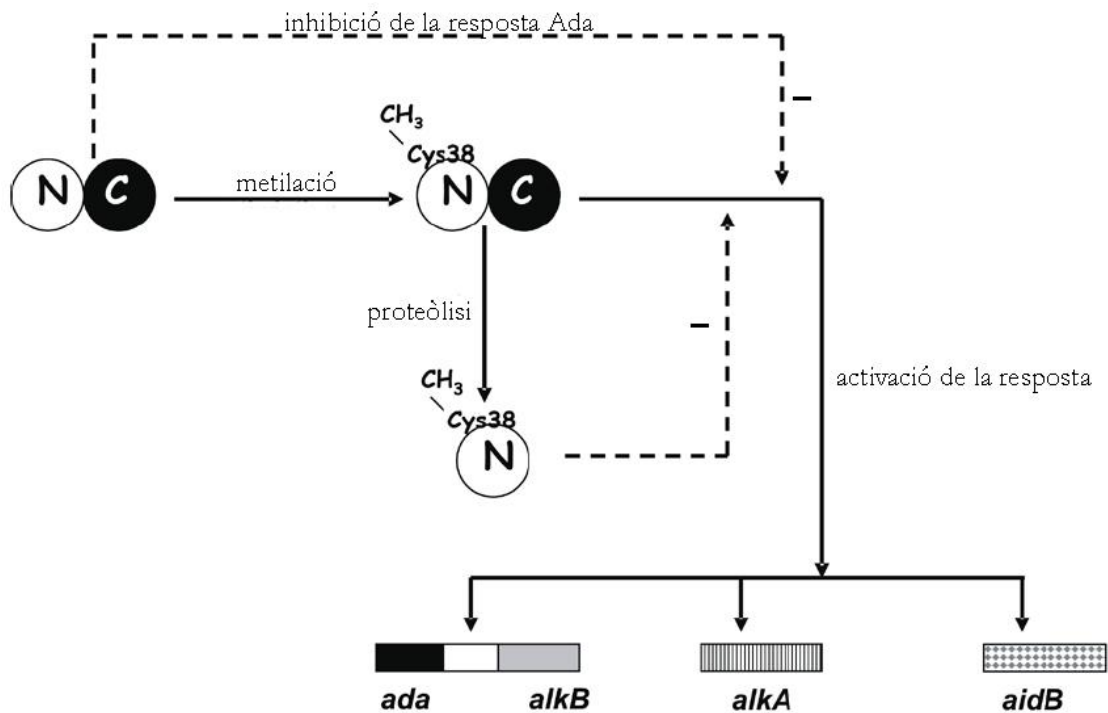


Figura 1.14. Regulació de la resposta Ada. L'activació de la proteïna Ada provoca la inducció de la resposta. L'acumulació de proteïna Ada no metilada o del domini amino-terminal poden provocar la repressió de la via. *Adaptat de Nieminuszczy et al [239].*

En absència de lesions alquilants hi ha aproximadament 2 – 4 proteïnes Ada a la cèl·lula [268]. Al produir-se l'exposició a dosis subletals d'agent alquilant, alguna de les molècules d'Ada es convertirà en activador transcripcional, induint l'expressió dels gens de la resposta Ada, inclosa la seva pròpia [178]. Si el creixement bacterià se segueix produint sota condicions subletals d'agents alquilants s'aniran acumulant proteïnes Ada en la forma d'activador transcripcional, enfortint la inducció de la resposta Ada i arribant a acumular fins a 3.000 molècules d'Ada per cèl·lula [239]. La proteïna Ada haurà incrementat, doncs, unes 1.000 vegades el seu nivell basal [122, 271]. La proteïna AlkB, al formar part del mateix operó (*ada – alkB*), presentarà uns nivells gairebé iguals als d'Ada [299]; mentre que la proteïna AlkA augmentarà en 10 cops els seus nivells [148]. S'entén així que la resistència cel·lular als efectes mutagènics i tòxics en dosis més altes d'agent alquilant es vegi incrementada al estar activada la resposta Ada.

La capacitat per induir la resposta Ada és major en els agents alquilants S_N1 , especialment en aquells preferentment O-alquiladors, que en els de tipus S_N2 [298], ja que generaran fàcilment S-diastereoisòmers de mePTE, que seran reconeguts pel domini N-Ada i permetran el pas a activador transcripcional de la proteïna Ada (Figura 1.13). Els agents de tipus S_N2 , per contra, alquilen gairebé exclusivament àtoms de nitrogen i són bastant ineficaços produint mePTE. Es creu que en un inici es podria activar dèbilment la resposta per l'activació d'algunes molècules d'Ada que haguessin reconegut aquests mePTE i, a mesura que s'anessin incrementant els nivells d'Ada, els agents S_N2 podrien metilar directament la proteïna Ada a la Cys-38 [334-336, 358]. Tot i això, la metilació directa tampoc és molt eficient, raó per la qual no són tan bons inductors de la resposta Ada com els de tipus S_N1 [299]. Tot això fa pensar que la resposta Ada podria haver evolucionat en primer lloc per fer front a agents alquilants de tipus S_N1 de l'entorn [298].

Els agents metilants indueixen la resposta Ada de manera més eficaç que agents alquilants formadors d'adductes més grans [366]. Se sap que els gens de la resposta Ada també són capaços de reparar etilacions, encara que competeixen en la reparació amb el sistema NER (Apartat 1.3.2), el qual no pot reparar metilacions [201]. Alquils més grans com propils i butils serien reparats gairebé exclusivament pel sistema NER [356, 375]. El gen *ybaZ* d'*E. coli* (*stm0466* en *S. Typhimurium*) augmenta l'eficiència del sistema NER en el reconeixement d'alquilacions de cadena llarga, ja que codifica una proteïna similar a les alquiltransferases, la qual reconeix adductes O^6 -alquilguanina, per a continuació facilitar que la proteïna UvrA del sistema NER la reconegui [201].

1.6.1. Activació transcripcional de la resposta Ada

En primer lloc caldria deixar clara la nomenclatura que s'emprarà:

- Es referirà a la proteïna Ada metilada en la Cys-38 com a ^mcAda. Quan es vulgui remarcar que la proteïna Ada no està metilada, s'usarà ⁿAda.

- Els abreujaements N-Ada i C-Ada que s'han usat fins ara es referiran exclusivament als dominis amino-terminal i carboxi-terminal quan aquests encara formen part de la proteïna. Si aquesta té algun dels dominis metilats se'ls nombrarà com a ^{me}N-Ada o ^{me}C-Ada.
- La proteïna Ada pot patir proteòlisi i dividir-se en el domini amino-terminal de 20 KDa i el carboxi-terminal de 19 KDa, ambdós totalment funcionals. En aquest cas s'usarà els abreujaements N-Ada20 i C-Ada19, respectivament, per recalcar que el domini ha estat escindit de la proteïna. Si estan metilats, llavors s'anomenaran ^{me}N-Ada20 o ^{me}C-Ada19.

La resposta Ada serà necessària bàsicament en dues situacions:

- Davant l'exposició a dosis elevades d'agents alquilants exògens. Aquest fet és inesperat i es pot donar en qualsevol fase de creixement, si bé la màxima importància serà en fase exponencial, quan l'alta taxa de replicació augmentarà la probabilitat de fixació de mutacions.
- A causa de l'increment d'agents alquilants endògens degut al metabolisme cel·lular, especialment durant la fase estacionària [297, 344]. Al contrari que en el cas anterior, l'aparició del dany estarà relativament prevista.

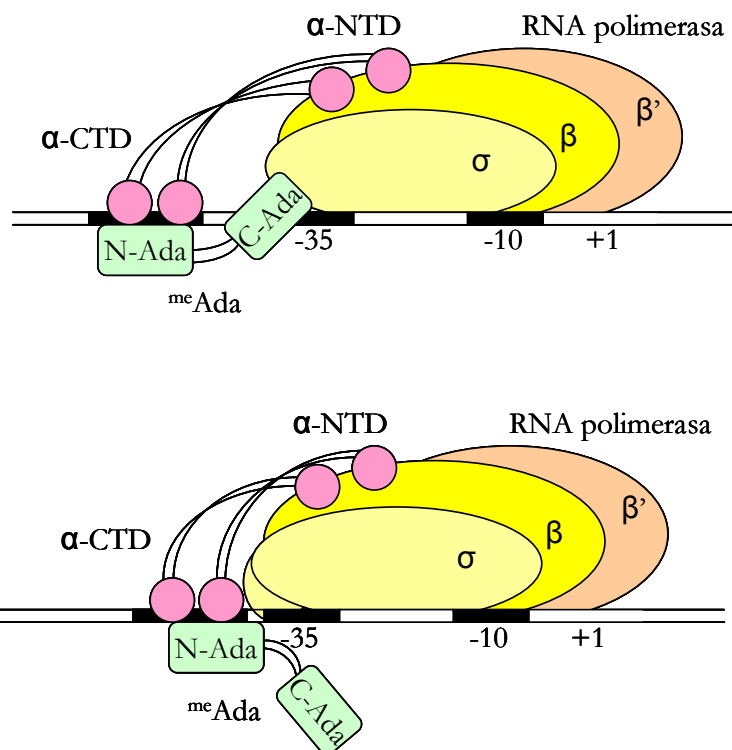
La regulació en aquestes dues situacions serà similar, si bé hi haurà certes diferències en els nivells d'expressió dels gens de la resposta. En ambdós casos, ^{me}Ada reconeix en els promotors la seqüència consens 5'-AAANNAAAGCGCA-3', anomenada la caixa Ada [345], on N representa qualsevol nucleòtid. Tanmateix, la posició de la caixa en relació a l'origen de transcripció i la regió de la seqüència més rellevant per al reconeixement varia lleugerament entre cada un dels tres promotors, permetent la modulació de l'expressió dels gens de la resposta. Així:

- El promotor dels gens *ada-alkB* requereix la seqüència AAAGCGCA [167, 281].
- AlkA posseeix la caixa AAANNAA [167].
- AidB, per la seva banda, presenta poca similitud amb la seqüència consens: AAT(N_o)GCAA. De fet, aquesta caixa mostra més similitud amb altres d'espècies com *S. Typhimurium* i *Bacillus subtilis* que no pas amb la pròpia *E. coli* [114, 167, 224].

La diferència més gran radica en el gen *alkA*, on la seqüència i posició de la caixa Ada provoca que aquesta tingui uns nivells d'expressió basals lleugerament més alts en cèl·lules no induïdes, mentre que en cèl·lules induïdes s'expressi només en fase exponencial i no en estacionària [165, 278].

1.6.1.1. Activació durant la fase exponencial

El nucli de l'RNA polimerasa està compost per cinc subunitats ($\alpha_2\beta\beta'$), de les quals cal destacar les dues subunitats α , encarregades de reconèixer els elements del promotor. Cada una d'elles està formada per dos dominis, el domini C-ter (α CTD), el qual s'uneix als elements de regulació del promotor; i el domini N-ter (α NTD), que s'acobla a la resta de l'RNA polimerasa (Figura 1.15).



36

Figura 1.15. Model de regulació transcripcional de la proteïna Ada. A la part superior es representa la unió en els promotors *ada* i *aidB*. L'RNA polimerasa s'ancora al promotor mitjançant la formació d'un complex ternari entre α CTD, el DNA i *meN-Ada*. L'inici de la transcripció es dona gràcies a la interacció de la subunitat σ amb C-Ada. En el promotor d'*alkA*, esquematitzat a la part inferior, la interacció de *meN-Ada* amb α CTD i σ és capaç d'iniciar la transcripció. *Adaptat de Landini et al [165].*

Cada situació fisiològica i/o ambiental requereix l'actuació d'un determinat conjunt de gens. L'augment de l'expressió de determinats gens i la inhibició d'altres de manera gairebé simultània permet una millor adaptació de la cèl·lula a cada situació. Per aconseguir-ho, el nucli de l'RNA polimerasa necessita acoblar-se a la subunitat σ , que s'uneix específicament a una determinada regió de certs promotors. Cada subunitat σ reconeix un conjunt de promotors, així que el canvi d'aquesta subunitat permet modular ràpidament els gens que l'RNA polimerasa està transcrivint en aquell moment. Durant la

fase exponencial, la subunitat σ principal és σ^{70} , mentre que la subunitat σ codificada pel gen *rpoS*, anomenada σ^S , σ^{38} , RpoS o KatF [136, 180], controla l'expressió en fase estacionària i en condicions d'estrès com l'anaerobiosi, el dany per peroxidació o el xoc osmòtic [22, 125, 213, 291]. En aquestes situacions els nivells de σ^S arriben aproximadament fins al 30 – 40% dels de σ^{70} [136, 168, 180].

En el cas dels gens de la resposta Ada, α CTD és capaç d'unir-se a les regions promotores d'*ada* i *aidB* gràcies a unes regions riques en A/T situades fora de la caixa Ada i a 40-60 pb per sobre del lloc d'inici de transcripció, però la unió és tan dèbil que l'expressió basal dels gens és pràcticament inexistent [166]. Per altra banda, l'activació per metilació de la proteïna Ada permet que el domini ^{me}N-Ada guanyi la capacitat d'unir-se a la caixa Ada, la qual està situada a la mateixa regió del promotor on s'uneix α CTD (Figura 1.15, part superior). La formació d'un complex ternari entre α CTD, ^{me}N-Ada i la pròpia molècula de DNA és la que permet iniciar la transcripció dels gens *ada* i *aidB* [166]. Aquest complex s'estableix de manera no cooperativa, tant ^{me}N-Ada com α CTD s'uneixen a les seves regions de manera independent.

S'ha vist que ^{me}N-Ada i ^{me}N-Ada20 poden unir-se al promotor a una velocitat similar [165]. Tot i això, per activar la transcripció d'*ada* i *aidB* no n'hi ha prou amb què ^{me}N-Ada hagi format el complex ternari amb α CTD i el DNA. També es requereix la interacció entre el domini C-Ada i la subunitat σ^{70} per acabar d'estabilitzar la unió de l'RNA polimerasa al promotor [159, 160]. Aquesta interacció és una interacció directa proteïna – proteïna [137], i es dona gràcies a certs determinants situats a C-Ada [317]. Per aquesta raó la proteòlisi de la proteïna Ada desactiva la seva funció com a activador transcripcional dels gens *ada* – *alkB* i *aidB*, ja que la manca del domini C-Ada no permet que el domini ^{me}N-Ada20 sol pugui iniciar la transcripció.

Per a una òptima activació transcripcional d'*ada* i *aidB* és necessari que el domini C-Ada es trobi també en la seva forma metilada [337, 345], tot i que sembla ser que es pot aconseguir certs nivells transcripcionals si no ho està [281, 345]. La Cys-321 i els aminoàcids que la flanquegen (PCHR) es troben amagats dins de l'estructura terciària de la proteïna (Apartat 1.5.4), però la metilació de la Cys provoca que quedin exposats a la superfície [221]. Malgrat això, no és aquesta la regió que participa en la interacció amb σ^{70} , ja que la seva deleció no impedeix la inducció dels gens, sinó que el canvi conformacional que provoca la metilació de la Cys-321 exposa la veritable regió d'interacció, permetent la funció activadora de la proteïna Ada [172, 318].

La regulació d'*alkA* presenta variacions importants. La més important és que no es requereix la interacció del domini C-Ada amb σ^{70} [161, 165]. Tal com es pot apreciar a la part inferior de la Figura 1.15, ^{me}N-Ada és capaç d'interaccionar alhora amb α CTD i σ^{70} [166]. Per tant, la metilació del domini N-Ada és suficient per a l'activació d'*alkA* [2]. De fet, es pot aconseguir transcripció del gen *alkA* tan sols amb el domini ^{me}N-Ada20 o, fins

i tot, amb ⁿAda, encara que en ambdós casos amb una eficiència menor que amb ^{me}Ada (Figura 1.16) [2, 232].

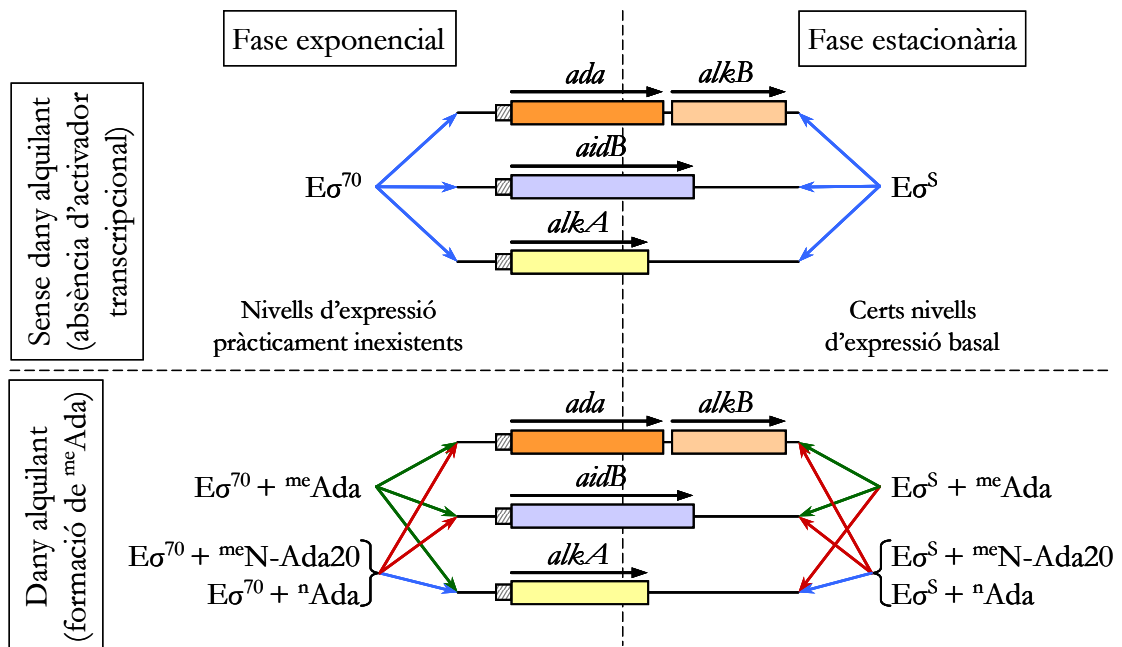


Figura 1.16. Regulació transcripcional de la resposta Ada. Es marca amb fletxes vermelles les situacions en què es dona repressió de l'expressió, amb fletxes blaves quan existeix una inducció no gaire marcada i amb fletxes verdes quan la inducció és completa.

38

Aquesta regulació diferencial entre *alkA* per una banda i *ada* i *aidB* per l'altra s'aconsegueix de la següent forma:

- ^{me}Ada és capaç d'interaccionar d'una manera totalment específica amb dos grups de determinants diferents en la subunitat σ^{70} de l'RNA polimerasa. Més concretament, ^{me}C-Ada interacciona amb un conjunt d'aminoàcids de σ^{70} carregats negativament en el cas d'*ada* i *aidB* [159], mentre que és un grup d'aminoàcids carregats positivament de σ^{70} el que interacciona amb ^{me}N-Ada quan la unió es produeix en el promotor d'*alkA* [160]. Ada va ser la primera proteïna descrita capaç d'interaccionar en dos llocs diferents en σ^{70} .
- El domini C-ter de σ^{70} és molt poc flexible, de manera que es requereix que l'activador transcripcional estigui molt ben posicionat per poder interaccionar-hi. En canvi, les subunitats α són molt més flexibles i poden flexionar-se per interaccionar amb l'activador encara que aquest estigui emplaçat diferent [103, 212].
- La caixa Ada està situada en una o altra posició segons el promotor. En el promotor d'*ada*, ^{me}N-Ada es col·loca entre les posicions -57 i -45. En *aidB* la

localització és molt semblant, la unió es dona entre -55 i -43. En canvi, en el promotor d'*alkA*, ^{me}N-Ada s'uneix entre -47 i -35, el que significa aproximadament una volta d'hèlix més en direcció 3' [165]. Com es pot apreciar a la Figura 1.15, tant el nucli de l'RNA polimerasa com la subunitat σ^{70} no varien la seva posició en el promotor de manera que, al desplaçar la caixa Ada en el promotor d'*alkA* en direcció a l'inici de transcripció, s'aconsegueix que ^{me}N-Ada interaccioni amb α CTD i σ^{70} alhora. Aquest fet es relaciona amb els punts acabats de comentar, ja que per una banda implica que Ada interaccioni amb un grup d'aminoàcids diferents en σ^{70} , i per l'altra que les subunitats α de l'RNA polimerasa siguin prou flexibles per seguir contactant amb ^{me}N-Ada. ^{me}N-Ada és la portadora, en *alkA*, dels determinants per interaccionar tant amb α CTD com amb σ^{70} .

1.6.1.2. Activació durant la fase estacionària

La generació d'agents alquilants endògens per processos metabòlics com la nitrosació de les amines o la peroxidació dels lípids durant la fase estacionària produeix lesions en el DNA [297]. El nivell de dany és prou important com per suposar un augment de la taxa de mutagènesi espontània en soques deficientes en MTases [186, 267]. Com aquest fet és independent de la presència d'agents alquilants a l'ambient, és necessari que la resposta Ada tingui una altra regulació durant aquesta fase, la qual és dependent de σ^S [165].

39

- En una situació on encara no hi ha dany totes les molècules d'Ada estaran en la forma ⁿAda. En aquestes condicions, $E\sigma^S$ (RNA polimerasa que conté la subunitat σ^S de fase estacionària) és capaç de realitzar certa transcripció des dels promotors d'*ada*, *aidB* i *alkA*, ja que l'afinitat de la subunitat σ^S per aquests tres promotors és major que la de σ^{70} (Figura 1.16) [161, 163, 344]. Per tant, els nivells basals dels gens de la resposta Ada durant la fase estacionària seran lleugerament més alts que en fase exponencial en absència d'inducció (per citar un exemple, durant fase estacionària els nivells d'Ada són unes 20 vegades superiors [344]). Aquest fet permetrà fer front als agents alquilants endògens tan bon punt apareguin, moment en el qual s'activarà la resposta Ada de fase estacionària [165]. La regulació és tan fina que permet un augment paral·lel dels nivells d'expressió tant de la resposta Ada com dels gens causants de l'aparició d'agents alquilants.
- En el moment que aparegui el dany alquilant endogen durant la fase estacionària hi haurà reparació de lesions i aparició de l'activador transcripcional ^{me}Ada. En el cas dels promotors d'*ada* i d'*aidB*, les interaccions que estableix ^{me}Ada amb $E\sigma^S$ són les mateixes que feia amb $E\sigma^{70}$ (RNA polimerasa que conté la subunitat σ^{70} de fase exponencial), ja que els aminoàcids que són importants per la interacció amb C-Ada estan conservats entre σ^S i σ^{70} (Figura 1.15, part superior) [159]. En el cas

del promotor d'*ada*, els nivells de transcripció en presència de ^{me}Ada seran iguals tant per $E\sigma^{70}$ com per $E\sigma^S$ [165]. En el cas d'*aidB*, però, la seva expressió és significativament superior en presència d' $E\sigma^S$ que d' $E\sigma^{70}$ tant en fase exponencial com en estacionària [161, 162, 367]. De fet, els nivells d'expressió es veuen reduïts en mutants defectius en RpoS; mentre que un lleuger increment d' $E\sigma^S$ durant la fase exponencial ja pot ser suficient per l'activació completa d'*aidB*, gràcies a que σ^S presenta una gran afinitat pel promotor d'aquest [161, 163].

La regulació d'*alkA* durant fase estacionària, per contra, és radicalment diferent. ^{me}Ada no tan sols és incapaç d'activar la transcripció d'*alkA* en presència d' $E\sigma^S$, sinó que a més la inhibeix [161]. S'ha vist que, a diferència del que passava amb els promotors d'*ada* i d'*aidB*, els determinants responsables de la interacció entre N-Ada i σ^{70} en el promotor d'*alkA* no estan conservats en σ^S [160]. És a dir, que en aquest cas ^{me}Ada no és capaç d'interactuar amb σ^S com ho feia amb σ^{70} (Figura 1.15, part inferior). A més, s'ha descrit que les interaccions d' $E\sigma^S$ o d' $E\sigma^{70}$ amb el promotor no són iguals entre sí, sinó que existeixen diferències que podrien venir donades per la localització d' α CTD dins del complex binari DNA- $E\sigma$ o de les proteïnes accessòries [43, 151]. El fet és que ^{me}Ada probablement s'uneix en una zona del promotor d'*alkA* que és important per a la interacció d' $E\sigma^S$, establint-se una competència entre elles per la regió; o bé la unió de ^{me}Ada produeix un canvi en la topologia del DNA que serà menys favorable per $E\sigma^S$ [165].

1.6.1.3. Regulació del gen *alkA*

El cas del gen *alkA* afegeix un grau de complexitat en la regulació de la resposta Ada. Tal com s'ha explicat a l'inici de l'Apartat 1.6, la repressió de la resposta es podria donar gràcies a ⁿAda i ^{me}N-Ada20, que competirien amb ^{me}Ada pel promotor [278]. Això, però, només seria aplicable a *ada* i *alkB* ja que, com ha quedat reflectit a l'Apartat 1.6.1.1, ⁿAda i ^{me}N-Ada20 són capaces d'activar fins a un cert nivell la transcripció d'*alkA*, i nivells alts de ⁿAda no reprimeixen la seva expressió [278]. En el cas d'*alkA*, la repressió dependria de l'estat de creixement (Figura 1.16). Durant la fase exponencial, un cop desaparegut l'agent alquilant la recuperació dels nivells basals es donaria per la disminució de la concentració cel·lular de la proteïna Ada (l'activador transcripcional), la qual sí es veu afectada per la regulació [161]. Durant la fase estacionària i en situació de dany alquilant, tan bon punt σ^S comencés a substituir a σ^{70} seria la pròpia ^{me}Ada la que actuaria com a regulador negatiu d' $E\sigma^S$ en el promotor del gen *alkA*. Dit d'una altra manera, ^{me}Ada pot actuar tant com a modulador positiu com negatiu de la transcripció del gen *alkA*, depenent de l'estat fisiològic cel·lular. A més, també cal destacar que el gen *alkA* presenta uns nivells basals d'expressió superiors als dels altres gens.

Aquests fets es podrien explicar tenint en compte la naturalesa de les dianes de la proteïna AlkA. Per una banda, AlkA és responsable, principalment, de la reparació de 3-meA, una lesió que bloqueja la replicació [178]. Durant la fase estacionària, quan els nivells de replicació són baixos, els efectes citotòxics d'aquesta lesió podrien ser tolerats per la cèl·lula, inclús durant l'exposició a agents alquilants, gràcies a altres N-glicosilases del sistema BER (Apartat 1.7.2) i al sistema NER [161, 165]. Per altra banda, AlkA reconeix un seguit de lesions que no són generades per alquilacions (Apartat 1.5.3), les quals podrien ser reparades en condicions no induïdes gràcies als nivells basals d'expressió d'AlkA (superiors als dels altres). Entre les dianes d'AlkA també es troben nucleòtids d'adenina i guanina no danyats, als quals pot escindir a un ritme similar a la freqüència espontània de despurinació. En aquest cas, l'augment dels nivells d'AlkA durant la resposta Ada podria tenir un cert detriment al generar masses llocs abàsics [13, 256], així que aquest podria ser un dels motius pel qual la seva regulació és diferent. De fet, en una cèl·lula induïda i en creixement exponencial podria haver 10 vegades menys de proteïna AlkA que d'Ada.

1.6.1.4. Regulació del gen *aidB*

La proteïna AidB té un paper important en la destoxicació de nitrosoguanidines, les quals es generen endògenament durant la fase estacionària [344]. És probablement per aquesta raó que *aidB* presenta una doble regulació (Figura 1.17): una dependent de la proteïna Ada (Apartat 1.6.1.2), i una altra independent d'Ada que es dona en anaerobiosi i on RpoS tindria un paper important [367, 369]. Aquest segon control no depèn en absolut de l'aparició de dany alquilant sinó de la concentració d'oxigen. Estudis en diferents condicions de creixement demostren que els nivells d'AidB no augmenten en cultius airejats sigui quina sigui la seva fase de creixement [367]. Per tant, a més d'RpoS, *aidB* respon a altres tipus de senyals que afegixen un altre control addicional relacionat amb l'anaerobiosi. Aquesta regulació podria ser, fins i tot, suficient per induir lleument *aidB* en cèl·lules deficientes en RpoS [367].

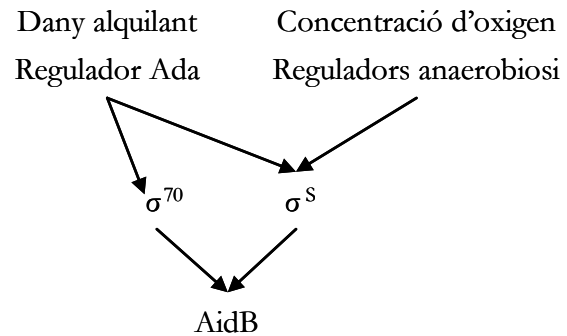


Figura 1.17. Regulació del gen *aidB*.

1.7. Les proteïnes Ogt i Tag

A més de les proteïnes de reparació d'alquilacions descrites a l'Apartat 1.5, existeixen dues proteïnes que no formen part de la resposta Ada.

1.7.1. La proteïna Ogt

La proteïna Ogt, coneguda també com a **O⁶-meG MTasa tipus II**, està codificada pel gen *ogt* i és independent de la resposta Ada [89, 359]. Presenta un pes molecular de 19 KDa i és homòloga al domini C-Ada, realitzant la mateixa activitat que aquest [259, 268, 316]. Tot i això, li manca un domini equivalent a N-Ada, de manera que no és capaç de reparar mePTE ni d'actuar com a activador transcripcional [289]. De fet, aquesta lesió, que s'utilitza com a senyal desencadenant de la resposta Ada, no és reparada per cap activitat constitutiva [299].

L'eficiència de la proteïna Ogt en la reparació de la lesió O⁶-meG és lleugerament inferior a la de la proteïna Ada [191]; mentre que resol més eficaçment O⁴-meT, ja que presenta fins a 3 vegades més d'afinitat per aquest tipus de lesió (Figura 1.12) [289, 380]. A més, també és més eficient que Ada en la reparació d'adductes d'alquils més grans, com l'O⁶-etilguanina [114, 380].

42 L'expressió de la proteïna Ogt es considerava constitutiva al no variar en situacions de dany alquilant [258]. Tot i això, s'ha demostrat que *ogt* forma part del reguló RpoS i, per tant, els seus nivells es veuen augmentats en fase estacionària o en situacions d'estrès [132], probablement per fer front al dany endogen. Durant el creixement exponencial els seus nivells cel·lulars són baixos, aproximadament de 30 – 40 molècules per cèl·lula [218, 258, 259, 360], però atès que són unes 16 vegades més que de proteïna Ada representa el 94% de l'activitat MTasa cel·lular [259, 266, 268]. L'altre 6% seria degut a la proteïna Ada, ja que són les dues úniques MTases de reparació cel·lulars [388]. Igual que en la proteïna Ada, la transferència del metil a la pròpia Cys és irreversible, de manera que s'inactiva per autometilació després d'una sola reparació. És per aquesta raó que, en situacions on no actua RpoS, només pot contrarestar nivells baixos de dany per alquilació, d'aquí la importància de la resposta Ada, que permet la sobreexpressió de l'O⁶-meG MTasa tipus I.

Tal com s'ha comentat a l'inici de l'Apartat 1.6, la resposta Ada requereix aproximadament una hora per estar totalment activada [284]. Durant aquest temps és lògic pensar que la cèl·lula hagi pogut replicar el seu genoma com a mínim un cop. Per tant, la proteïna Ogt, com a MTasa majoritària en aquest interval, és imprescindible per evitar la fixació d'alquilacions durant aquest període.

1.7.2. La proteïna Tag

La proteïna Tag està codificada pel gen *tag* i és també coneguda com a **3-meA-DNA glicosilasa I** [282, 348]. Té un pes molecular d'uns 21,5 KDa i no pertany a la resposta Ada sinó que és d'expressió constitutiva [78].

Igual que la proteïna AlkA, Tag és una glicosilasa monofuncional del sistema BER capaç de reconèixer 3-meA (Figura 1.12). A diferència d'AlkA, però, la proteïna Tag és molt específica i a més d'aquesta lesió tan sols pot reparar l'altra N³-metilpurina, la 3-meG, tot i que amb poca eficiència [140, 178, 270, 299].

La proteïna Tag té poca identitat en la seva seqüència primària amb la família HhH de les DNA N-glicosilases, a la qual pertanyen altres N-glicosilases com AlkA, l'endonucleasa III i MutY (Apartat 1.5.3). Tot i això, s'ha acabat incloent dins d'aquesta família quan estudis estructurals usant ressonància magnètica nuclear van demostrar que posseeix un motiu HTH estabilitzat per un ió de zinc [65, 157]. L'alta especificitat de la proteïna Tag per la 3-meA vindria donada per l'absència d'un residu Asp en el seu centre catalític que sí és present en les altres DNA N-glicosilases d'aquesta família [65].

Les lesions que poden ser reconegudes per les proteïnes descrites fins ara es resumeixen a la Taula 1.1:

43

Taula 1.1. Substrats més importants per les diferents proteïnes de reparació de lesions alquilants.

	S _N 1	S _N 2	Radicals de metil	Altres
N-Ada	mePTE			
C-Ada	O ⁶ -meG i O ⁴ -meT			
Ogt	O ⁶ -meG i O ⁴ -meT			
AlkA	N ³ -metilpurina: 3-meA i 3-meG O ² -metilpirimidina: O ² -meC i O ² -meT N ⁷ -metilpurina: 7-meA i 7-meG	N ³ -metilpurina N ⁷ -metilpurina	C ⁸ -metilguanina	Etanobases Etenobases Hipoxantina 5-formiluracil
Tag	3-meA	3-meA		
AlkB		1-meA i 3-meC (Hidroxi)etils (Hidroxi)propils		Etanobases Etenobases Hidroxi alquils
AidB	Destoxicació de nitrosoguanidines			

1.8. Reparació d'alquilacions en *S. Typhimurium*

1.8.1. Diferències respecte a *E. coli*

Els Apartats 1.5, 1.6 i 1.7 s'han basat en la bibliografia centrada en *E. coli* al ser el microorganisme sobre el qual s'han realitzat més estudis. En aquest apartat es comentaran les diferències que existeixen pel que fa a *S. Typhimurium*, l'espècie de treball de la present Tesi Doctoral:

- La proteïna Ada de *S. Typhimurium* (Ada_{St}) presenta 2 aminoàcids menys que la d'*E. coli* (Ada_{Ec}). Concretament li manquen l'últim aminoàcid de C-ter i un dels 6 primers de N-ter (els quals no estan ben conservats). L'única conseqüència que té aquest fet és en la posició de les Cys: al parlar de *S. Typhimurium* cal recordar sempre que les Cys que conformen el dit de zinc no són les Cys-38, -42, -69 i -72; sinó les Cys-37, -41, -68 i -71. D'igual forma, la Cys-321 passa a ser la Cys-320. L'entorn de Cys-320 està molt conservat i és el mateix tant en Ada com en Ogt per a les dues espècies [114].
- La proteïna Ada de *S. Typhimurium* comparteix un 75% de similitud amb la proteïna d'*E. coli* a nivell aminoacídic i 70% a nivell nucleotídic [114].
- La seqüència de la caixa Ada en el gen *ada* de *S. Typhimurium* és 5'-GAATTAAAΔCGCA-3', i es diferencia de la del gen *ada* d'*E. coli* (5'-AAATTAAAGGCGCA-3') en només dos nucleòtids [114].
- A *E. coli*, els gens *ada* i *alkB* estan superposats en 1 parell de bases (pb). En *S. Typhimurium*, en canvi, aquests dos gens estan separats per 2 pb [114, 152].
- A diferència d'*E. coli*, es discuteix si hi ha resposta adaptativa a agents alquilants en *S. Typhimurium* [111, 112, 178, 359].

1.8.2. Caracterització de la resposta Ada a *S. Typhimurium*

S'han descrit els nivells d'inducció de la resposta Ada per diversos microorganismes, observant que l'atenuació o no de la resposta és relativament independent del grup filogenètic. Per exemple, s'ha demostrat que tenen una resposta totalment funcional espècies de gèneres com *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodobacter*, *Shigella*, *Klebsiella*, etc [35]; mentre que és nul·la o pràcticament en espècies com *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *S. enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, etc [82, 146]. En el cas de *S. Typhimurium*, la seva capacitat per induir la resposta és molt menor a la d'*E. coli* malgrat la seva proximitat filogenètica [82].

Hi ha diversos estudis que han intentat caracteritzar la resposta Ada en *S. Typhimurium*:

- Es va observar com cèl·lules d'*E. coli* tractades prèviament amb dosis subletals d'MNNG presentaven una freqüència mutagènica menor que cèl·lules no adaptades al ser sotmeses a dosis letals del mateix mutagen. En canvi, al fer el mateix experiment amb *S. Typhimurium*, tant cèl·lules adaptades com no adaptades tenien la mateixa freqüència de mutagènesi. Per tant, a diferència d'*E. coli*, **no hi havia hagut adaptació a agents alquilants** [114].
- La clonació del gen *ada* de *S. Typhimurium* (*adaSt*) mitjançant un plasmidi en una soca d'*E. coli* $\Delta ada::lacZ$ va permetre observar com després d'un tractament amb MNNG els nivells d'Ada haurien augmentat 13 vegades, tres cops menys que al introduir el gen *ada* d'*E. coli* (*adaEc*) en la mateixa soca. Per tant, la proteïna **Ada de *S. Typhimurium* és un activador transcripcional poc eficient**, ja que la seva capacitat per activar l'expressió del gen *ada* és molt menor que la de la proteïna *AdaEc* [114].

Aquest fet no es pot explicar per la funció com a quimiosensor de la proteïna *AdaSt*, ja que el seu domini N-Ada repara mePTE tan eficientment com en *E. coli* [359]. Així mateix, tampoc és un problema de la conservació de la caixa Ada, ja que entre les dues espècies aquesta només difereix en la primera i la novena base (veure l'apartat anterior). Encara més, la introducció de mutacions en la caixa d'*E. coli* per assimilar-la a la de *S. Typhimurium* tampoc afecta gaire en l'expressió del gen *adaEc* [233]. Ara bé, sí podria ser conseqüència de certs canvis aminoacídics en *AdaSt* respecte a *AdaEc* en zones del domini HTH que podrien ser importants per la unió al DNA [114].

- Les dades d'estudis d'immunoassaig per mesurar l'activitat O⁶-meG-DNA MTasa i mePTE-DNA MTasa en diferents espècies abans i després de tractar amb MNNG demostren que gairebé tots els enterobacteris analitzats presenten un clar increment de varies vegades en les dues activitats després del tractament [359]. *S. Typhimurium*, en canvi, no va mostrar activitat mePTE-DNA MTasa en cap moment i la mínima activitat O⁶-meG-DNA MTasa observada abans del tractament no va variar. L'ús posterior d'anticossos monoclonals anti-Ada va permetre observar que Ada estava 10-20 vegades menys induïda que en els altres enterobacteris estudiats [359].

Aquest **lleuger augment dels nivells de la proteïna Ada no es correlacionen amb un increment de l'activitat MTasa**. Segurament *AdaSt* és tan mal activador transcripcional que les noves proteïnes Ada sintetitzades són ràpidament inactivades per autometilació, de manera que no es pot detectar l'increment d'activitat MTasa. En *E. coli*, en canvi, la taxa d'activació transcripcional és molt més alta que la d'inactivació de la proteïna, cosa que permet la seva acumulació. De fet, la introducció del gen *adaEc* en un plasmidi de baix número de còpies tant en *S. Typhimurium* com en *E. coli* va permetre

augmentar en 50 vegades l'activitat MTasa. La introducció del gen *adaSt* en un plasmidi d'alt número de còpies en la mateixa soca d'*E. coli* produeix, per contra, 2-3 vegades d'inducció [359].

Atès que la proteïna *AdaSt* té la mateixa eficiència i cinètica que *AdaEc* en la reparació d'alquilacions [359, 388], es corrobora que **la causa resideix en la relació entre cinètica de metilació – inactivació de la proteïna *AdaSt* i el nivell d'inducció**, és a dir, que la proteïna *AdaSt* és un mal activador transcripcional.

Alguns autors han assenyalat que la proteïna *AdaSt* podria tenir un paper més important en la tolerància a l'estrès per àcids orgànics [11], i que el rol de la proteïna *Ogt* en la protecció a agents alquilants podria ser més important en *S. Typhimurium* que en *E. coli*:

- La deficiència en la proteïna *Ada* comporta una disminució en la viabilitat cel·lular en presència d'agents alquilants exògens com l'MNNG, mentre que no és així per mutants defectius en *Ogt*. Per tant, o bé *Ada* desenvolupa un paper front a dany metilant tòxic, o bé és conseqüència indirecta per la lleugera disminució en els nivells d'*AlkA*. En qualsevol cas, semblaria que *Ogt* col·labora quan *Ada* s'esgota o manca, ja que el defecte en les dues proteïnes encara és més deleteri [388].
- Per contra, només el defecte en *Ogt* causa un augment de la taxa de mutagènesi induïda per un agent metilant com l'MNNG. En aquest cas *Ada* no juga cap paper, ja que la deficiència en les dues proteïnes no es tradueix en una major mutagènesi [387, 388]. La funció de les dues proteïnes està invertida en *E. coli*, on és *Ada* la que proporciona la protecció davant dels efectes mutagènics dels agents alquilants [388].
- Així mateix, la taxa de mutagènesi espontània s'incrementa només quan manca la proteïna *Ogt*. Tanmateix, a diferència de l'anterior, el defecte en *Ada* i en *Ogt* sí suposa encara un lleuger increment més de la taxa, així és que *Ada* deu contribuir quan *Ogt* és absent [388].

46

1.9. Reparació d'alquilacions en altres espècies

Els mecanismes per fer front al dany alquilant estan bastant conservats en la majoria d'organismes [70, 93]:

- S'han trobat homòlegs de les MTases *Ada* i *Ogt* en gairebé tots els éssers vius i el seu grau de conservació és considerablement alt [70, 224, 322].
- També les dues 3-meA glicosilases estan presents en gairebé totes les espècies donada la importància de la lesió 3-meA. Curiosament, la seva estructura no està

tan conservada, sobretot en el cas d'AlkA [210]. De fet, no existeix homologia entre *alkA* i *tag*, ni amb altres N-glicosilases d'altres organismes [299].

- Diferents cerques utilitzant el programa BLAST han assenyalat possibles homòlegs en diferents espècies bacterianes per al gen *alkB* [80, 299]. També se n'ha pogut trobar homòlegs en eucariotes (en humans hi ha dos homòlegs a AlkB, coneguts com a ABH2 i ABH3). En canvi, no s'ha trobat cap homòleg ni d'AlkB ni de cap membre de la superfamília de les dioxigenases α -cetoglutarat-Fe²⁺ dependents en arqueobacteris. Per aquesta raó s'ha suggerit una transferència horitzontal posterior des d'eubacteris a eucariotes [7]. Per altra banda, cap estudi ha pogut trobar un homòleg constitutiu al gen *alkB*. Alguns treballs han assenyalat la generació d'intermediaris ferro-oxo, necessaris per a la hidroxilació d'1-meA i 3-meC [298], com a una amenaça per la pròpia cèl·lula a causa del seu potencial oxidatiu sobre DNA i proteïnes [299].
- Finalment, AidB sembla ser la proteïna de la resposta Ada amb menys número d'homòlegs en altres espècies. De fet, no es detecten homòlegs d'AidB en espècies emparentades amb *E. coli* i *S. enterica* com *Klebsiella*, *Vibrio*, *Shewanella* o *Photobacterium*.

L'estructura en dos dominis de la proteïna Ada és també un tret diferencial entre diferents espècies. Sembla ser que aquesta proteïna està formada per la fusió de dominis proteics [189, 299]. Per exemple, en *E. coli* i en *S. Typhimurium*, la proteïna Ada està formada per dos dominis, un codificant per una mePTE-DNA MTasa encarregada de la detecció del dany alquilant i la inducció del sistema, i un altre codificant d'una O⁶-meG-DNA MTasa homòloga a la proteïna Ogt. En canvi, *B. subtilis* presenta aquests dos dominis en proteïnes separades, AdaA (mePTE-DNA MTasa) i AdaB (O⁶-meG-DNA MTasa) [301]. Per donar un altre exemple, en *Mycobacterium tuberculosis* són els dominis AdaA (mePTE-DNA MTasa) i AlkA els que estan fusionats en una proteïna [70, 302]. Aquesta fusió és tan comú en les diferents espècies com la fusió d'AdaA i AdaB en *E. coli* [299].

47

1.10. Sistemes de reparació que intervenen en la virulència

Els organismes hostes posseeixen un seguit de mecanismes, des de barreres físiques a agents químics, per defensar-se de la invasió per microorganismes. Molts d'aquests mecanismes actuen sobre el DNA del patogen, afectant seriosament a la seva supervivència. Per aquest motiu, la presència de mecanismes de reparació del DNA és essencial pel desenvolupament del procés infectiu de molts agents patògens. En el cas concret de *S. Typhimurium*, alguns dels factors de virulència més coneguts són factors d'adherència, invasives, toxines, etc. Tots ells no solen ser importants per a la supervivència o manteniment de l'estructura fora de l'hoste [237]. És per això que

l'expressió dels gens de virulència s'ha de modular, generant un mosaic de respostes que permet l'adaptació del bacteri als canvis en factors ambientals com la temperatura, l'osmolaritat, la concentració d'oxigen, el pH, la manca de nutrients, etc [214]. Entre aquestes respostes s'inclouen diversos mecanismes de reparació i nombrosos gens, sovint d'activitats variades, de manera que la seva cooperació permet incrementar notablement la probabilitat d'èxit.

Una de les respostes més importants associades a la virulència és la que fa front a l'estrès oxidatiu [81], especialment durant el procés infectiu al ser un dels principals mecanismes antibacterians de macròfags i leucòcits polimorfonuclears [237]. Conegut com a esclat oxidatiu, consisteix en l'alliberament ràpid de ROI com superòxids, peròxids, radicals hidroxil i àcid hipoclorós per eliminar els elements fagocitats [374]. Per neutralitzar els compostos oxidants generats, *S. Typhimurium* presenta enzims que estan englobats principalment en els regulons SoxRS i OxyR, els quals responen a anions superòxid (O_2^-) i peròxid (H_2O_2), respectivament [81].

En el cas de la resposta SoxRS, el canvi en el potencial redox de l'interior de la cèl·lula provocarà l'activació de la proteïna SoxR gràcies a l'oxidació del seu centre [$2Fe - 2S$]. Aleshores SoxR induirà el gen *soxS*, que codifica per un activador transcripcional de més de 15 gens involucrats en resistència a dany oxidatiu [81, 108]. Un cop finalitzat l'estrès oxidatiu, el grup [$2Fe - 2S$] de SoxR retornarà al seu estat reduït, finalitzant la inducció d'aquest reguló [57]. Alguns dels gens que hauran estat induïts codificaran superòxids dismutases, com *sodA*; altres serviran pel manteniment del metabolisme central davant dany oxidatiu, com *fumC*, que codifica per una fumarasa estable en aerobiosi; etc. De tots ells, l'únic que està directament involucrat en la reparació del DNA serà el gen *nfo*, que codifica per l'endonucleasa IV del sistema BER (Apartat 1.3.2) [104, 237], el qual s'encarrega de reparar les bases oxidades. Per altra banda, també s'ha vist que SoxR pot ser activada per NO [104], compost utilitzat per macròfags com a bactericida [187, 339].

48

La reacció que realitzen les superòxids dismutases per neutralitzar els anions superòxid allibera peròxids, els quals també són ROI. Tant aquests peròxids com aquells provinents del metabolisme intern o dels mecanismes de defensa de l'hoste seran els inductors del reguló OxyR, que també inclou un gran nombre de gens [81, 222]. El regulador transcripcional d'aquest sistema és OxyR, que presenta un control posttraduccional dependent dels nivells de peròxid existents. El nivell transcripcional del gen *oxyR* no es veu augmentat després de l'aparició de compostos peròxid [341], ni tampoc es veu incrementada la seva síntesi proteica [327], sinó que OxyR s'activa al oxidar-se en presència de peròxids. Entre els gens induïts per OxyR es troben varies catalases, com *katG*, que catalitzen la reacció de destoxicació del peròxid d'hidrogen [88]; *gorA*, que codifica per una glutatió reductasa; *dps*, el producte del qual presenta similituds amb AidB al unir-se inespecíficament al DNA i protegir-lo de la toxicitat del peròxid d'hidrogen (Apartat 1.5.1) [3, 193]; etc.

A més d'aquests dos regulons hi ha altres mecanismes per fer front al dany oxidatiu. El sistema BER realitza una tasca important en la supervivència reparant lesions oxidants al DNA [331, 374], especialment durant la infecció. La inducció per part de RecA del sistema SOS com a conseqüència de l'acumulació de lesions i l'aparició de regions d'ssDNA al cromosoma bacterià permetrà la síntesi de factors antioxidants [81], si bé el paper de RecA imprescindible per la virulència sembla ser com a recombinasa [28, 29, 81]. A més, un cop a l'interior de macròfags i leucòcits polimorfonuclears hi haurà l'activació de l'SPI2 per fer front a l'esclat oxidatiu [332]. Finalment, altres proteïnes de reparació importants durant l'estrès oxidatiu, com la catalasa KatE [181] o l'exonucleasa III [81] codificada per *xthA* del BER (Apartat 1.3.2), estan regulades per RpoS durant fase estacionària i en anaerobiosi [20, 168, 291].

A part del dany oxidatiu també existeixen mecanismes de defensa no oxidants, com les defensines alliberades per macròfags i leucòcits polimorfonuclears [347], on és important el sistema de dos components PhoP/Q [216], el qual intervé en altres processos com impedir la fusió dels lisosomes amb l'PSCV [101] (Apartat 1.1.4). Un altre mecanisme contra dany no oxidatiu és el de supervivència a pH extrem. El pH pot disminuir fins a 5 a l'interior de l'PSCV [9] i el pH estomacal pot estar entre 2 i 3 [237], de manera que caldrà activar gens de virulència que permetin el manteniment de l'homeòstasi a l'interior de la cèl·lula [4]. La majoria estan regulats conjuntament en la resposta de tolerància a l'àcid (ATR), a més d'intervenir de nou el reguló PhoP/Q (induïble per pH), el qual controla cinc gens *pag* imprescindibles per la supervivència a fagosomes [4].

49

Per últim, *S. Typhimurium* també podrà veure's sotmesa a dany alquilant (Apartat 1.4). Com a resposta existeixen diverses proteïnes de reparació amb diferents activitats (Apartats 1.5 i 1.7), algunes de les quals s'agrupen formant una resposta adaptativa (Apartat 1.6). Aquesta resposta, així com els gens, tant induïbles com independents de la resposta, capaços de fer front a dany alquilant, han estat àmpliament estudiats en *E. coli*, si bé no tant en *S. Typhimurium*, especialment pel que fa al seu impacte en la virulència. És per aquesta raó que en la present Tesi Doctoral es pretén aprofundir més en aquest coneixement.

2. Objectius

S. Typhimurium disposa de diversos mecanismes de reparació que li permeten fer front a un ventall ampli de lesions en el seu material genètic [93]. Entre ells es troba la maquinària de reparació de lesions alquilants, les quals, com ja s'ha comentat, poden tenir un origen tant exogen com endogen [239]. Part d'aquesta maquinària es troba englobada dins de la resposta adaptativa a agents alquilants, que es troba conservada en diverses espècies d'enterobacteris [82], si bé en la soca LT2 de *S. Typhimurium* està atenuada i no pot induir-se en el mateix grau que en altres espècies com *E. coli* [114]. Així mateix, encara no ha estat definida la implicació dels gens vinculats a la reparació d'alquilacions durant el procés infectiu ni els nivells de dany alquilant que es generen.

Per aquestes raons, l'objectiu principal de la present Tesi Doctoral ha estat definir la importància de la maquinària de reparació de lesions alquilants de *S. Typhimurium* durant el procés infectiu d'aquest patogen entèric.

Amb aquesta finalitat van plantejar-se una sèrie d'objectius parcials:

1. Determinar per RT-PCR quantitativa si el grau d'inducció de la resposta Ada en la soca de treball ATCC14028 de *S. Typhimurium* és equivalent o menor al d'*E. coli*.
2. Estudiar l'aportació individual o conjunta de diferents proteïnes de reparació a la supervivència de *S. Typhimurium* davant d'agents alquilants, la qual cosa es portarà a terme mitjançant la construcció d'una bateria de mutants defectius en gens de la resposta Ada, en *ogt* i *tag*, i en les vies de reparació GGR i TCR del sistema NER.
3. Definir si la presència dels diferents mecanismes de reparació d'alquilacions és essencial per al desenvolupament del procés infectiu de *S. Typhimurium*. Per assolir aquest objectiu s'utilitzarà la bateria de soques mutants per a realitzar un seguit d'assajos de competitivitat *in vivo* junt amb la soca salvatge emprant com a animal d'experimentació ratolins BALB/c.
4. Delimitar l'origen del dany alquilant present a l'interior del model animal. Per a aquesta fi, en funció dels resultats obtinguts en el punt 3 es realitzaran experiments suplementaris, tals com assajos de supervivència a sals biliars, d'anaerobiosi, experiments *in vivo* per altres vies d'infecció, etc.

3. Material i mètodes

3.1. Material

3.1.1. Soques bacterianes, plasmidis, bacteriòfag i oligonucleòtids

Per al seu ús diari, les soques bacterianes van ser mantingudes fresques mitjançant resembres en plaques de medi Luria-Bertani (LB). Partint d'un d'aquests cultius frescs crescut en medi sòlid es va resuspendre un inòcul en vials de crioconservació (Protect) per a la seva conservació a -75°C .

Les soques bacterianes utilitzades en la present Tesi Doctoral es detallen a la Taula 3.1.

Taula 3.1. Soques bacterianes utilitzades en el present estudi.

Soca bacteriana	Característiques	Font
<i>S. Typhimurium</i>		
ATCC14028 <i>wt</i>	Soca salvatge de referència	ATCC ^{®1}
UA1826	ATCC14028 que conté el plasmidi pKOBEGA	Aquest laboratori
UA1827	LB5000 que conté el plasmidi pCP20	Aquest estudi
UA1871	$\Delta\text{recA}::Km^2$	Aquest laboratori
UA1872	Deleció i inserció de la casset Cm a la regió 16.088 – 17.026 del cromosoma	Aquest laboratori
UA1779	$\Delta\text{fur}::Cm$	Aquest laboratori
Soques ATCC14028 defectives en un gen de reparació d'alquilacions		
UA1828	$\Delta\text{ada}::Cm^2$	Aquest estudi
UA1829	Δada	Aquest estudi
UA1830	$\Delta\text{alkA}::Cm$	Aquest estudi
UA1831	$\Delta\text{alkB}::Cm$	Aquest estudi
UA1832	$\Delta\text{aidB}::Cm$	Aquest estudi
UA1833	$\Delta\text{ogt}::Cm$	Aquest estudi
UA1834	$\Delta\text{tag}::Cm$	Aquest estudi
UA1835	Δtag	Aquest estudi
Soques ATCC14028 defectives en dos gens de reparació d'alquilacions		
UA1837	$\Delta\text{ada} \Delta\text{alkA}::Cm$. Deriva per transducció d'UA1829	Aquest estudi
UA1838	$\Delta\text{ada} \Delta\text{alkA}::Cm$. Conté el plasmidi pKOBEGA	Aquest estudi
UA1839	$\Delta\text{ada} \Delta\text{ogt}::Cm$. Deriva per transducció d'UA1829	Aquest estudi
UA1840	$\Delta\text{ada} \Delta\text{ogt}$	Aquest estudi

Taula 3.1. Continuació

Soca bacteriana	Característiques	Font
UA1841	$\Delta ada::Cm \Delta tag$. Deriva per transducció d'UA1835	Aquest estudi
UA1842	$\Delta alkA::Cm \Delta tag$. Deriva per transducció d'UA1835	Aquest estudi
UA1843	$\Delta alkA \Delta tag$	Aquest estudi
UA1844	$\Delta ogt::Cm \Delta tag$. Deriva per transducció d'UA1835	Aquest estudi
UA1845	$\Delta ada \Delta tag$	Aquest estudi
Soques ATCC14028 defectives en tres gens de reparació d'alquilacions		
UA1846	$\Delta ada \Delta alkA::Cm \Delta alkB::Km$. Construïda pel mètode d'inactivació gènica en un pas a partir d'UA1838	Aquest estudi
UA1847	$\Delta ada \Delta alkA \Delta alkB$	Aquest estudi
UA1848	$\Delta ada \Delta ogt::Cm \Delta tag$. Deriva per transducció d'UA1845	Aquest estudi
UA1849	$\Delta ada \Delta ogt \Delta tag$	Aquest estudi
Soques ATCC14028 defectives en quatre gens de reparació d'alquilacions		
UA1850	$\Delta ada \Delta alkA \Delta alkB \Delta aidB::Cm$. Deriva per transducció d'UA1847	Aquest estudi
UA1851	$\Delta ada \Delta alkA \Delta alkB \Delta aidB$	Aquest estudi
UA1852	$\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta alkA::Cm$. Deriva per transducció d'UA1849	Aquest estudi
UA1853	$\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta alkA$	Aquest estudi
Soques ATCC14028 defectives en cinc gens de reparació d'alquilacions		
UA1854	$\Delta ada \Delta alkA \Delta alkB \Delta aidB \Delta ogt::Cm$. Deriva per transducció d'UA1851	Aquest estudi
UA1855	$\Delta ada \Delta alkA \Delta alkB \Delta aidB \Delta tag::Cm$. Deriva per transducció d'UA1851	Aquest estudi
UA1856	$\Delta ada \Delta alkA \Delta alkB \Delta aidB \Delta tag$	Aquest estudi
Soques ATCC14028 defectives en sis gens de reparació d'alquilacions		
UA1857	$\Delta ada \Delta alkA \Delta alkB \Delta aidB \Delta tag \Delta ogt::Cm$. Deriva per transducció d'UA1856	Aquest estudi
UA1858	$\Delta ada \Delta alkA \Delta alkB \Delta aidB \Delta tag \Delta ogt$	Aquest estudi
Soques ATCC14028 $\Delta uvrA$		
UA1836	$\Delta uvrA::Cm$	Aquest laboratori

Taula 3.1. Continuació

Soca bacteriana	Característiques	Font
UA1866	$\Delta uvrA$	Aquest estudi
UA1859	$\Delta ada \Delta ogt \Delta uvrA::Cm$. Deriva per transducció d'UA1840	Aquest estudi
UA1860	$\Delta alkA \Delta tag \Delta uvrA::Cm$. Deriva per transducció d'UA1843	Aquest estudi
UA1861	$\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA::Cm$. Deriva per transducció d'UA1849	Aquest estudi
UA1862	$\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA$	Aquest estudi
UA1863	$\Delta ada \Delta alkA \Delta alkB \Delta aidB \Delta uvrA::Cm$. Deriva per transducció d'UA1851	Aquest estudi
UA1864	$\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta alkA \Delta uvrA::Cm$. Deriva per transducció d'UA1853	Aquest estudi
UA1873	$\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta alkA \Delta uvrA$	Aquest estudi
UA1865	$\Delta ada \Delta alkA \Delta alkB \Delta aidB \Delta tag \Delta ogt \Delta uvrA::Cm$. Deriva per transducció d'UA1858	Aquest estudi
Soques ATCC14028 Δmfd		
UA1870	$\Delta mfd::Cm$	Aquest laboratori
UA1867	$\Delta uvrA \Delta mfd::Cm$. Deriva per transducció d'UA1866	Aquest estudi
UA1868	$\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta mfd::Cm$. Deriva per transducció d'UA1849	Aquest estudi
UA1869	$\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA \Delta mfd::Cm$. Deriva per transducció d'UA1862	Aquest estudi
UA1874	$\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta alkA \Delta uvrA \Delta mfd::Cm$. Deriva per transducció d'UA1873	Aquest estudi
<i>E. coli</i>		
BL21 pKOBEGA		[38]
BW25113 pKD3		[48]
BW25113 pKD4		[48]
BW25113 pCP20		[39]

¹ *American Type Culture Collection*

² Cm i Km fan referència a cassets de resistència a cloramfenicol i kanamicina, respectivament.

Els plasmidis van ser mantinguts dins de soques bacterianes i extrets en el moment del seu ús. Una alíquota del DNA obtingut va ser conservada a -20°C .

Els bacteriòfags van ser conservats en medi líquid LB amb un 5 – 10% de cloroform a una temperatura de 4°C . Els plasmidis i bacteriòfag usats estan detallats a la Taula 3.2.

Taula 3.2. Plasmidis i bacteriòfag utilitzats en el present estudi.

Plasmidi o bacteriòfag	Característiques	Font
Plasmidi		
pKOBEGA	Amp ^R 1 Ts ²	[38]
pKD3	Amp ^R Cm ^R	[48]
pKD4	Amp ^R Km ^R	[48]
pCP20	Amp ^R Cm ^R Ts	[39]
Bacteriòfag		
P22HT ^{int7}	Int, alta eficiència de transducció	J. L. Ingraham

¹ Amp fa referència a una casset de resistència a ampicil·lina.

² Ts indica que el plasmidi és termosensible.

Per a diferents tècniques de manipulació del DNA es van usar els oligonucleòtids llistats a la Taula 3.3. La casa comercial (Invitrogen o Roche) els serveix liofilitzats. Previ al seu ús van ser rehidratats en aigua Milli-Q (MQ) per a obtenir una concentració final de 100 pmols/ μl i conservats a -20°C . La seva seqüència i aplicació també està descrita a la Taula 3.3.

3.1.2. Medis de cultiu, suplementes i solucions

Com a medis de cultiu es van usar medis sòlids, semisòlids i líquids. Per a la seva preparació es va usar per tots aigua ultrapura MQ obtinguda mitjançant l'aparell *Ultra-pure water system Milli-Q_{plus} 185* (Millipore). Un cop preparats es van esterilitzar per calor humit a 121°C durant 15 min en un autoclau. En el cas dels medis sòlids, es van deixar refredar fins a una temperatura aproximada de 50°C , quan corresponia se'ls va addicionar suplementes (antibiòtics, glucosa, etc) i es van dispensar en volums de 20 ml en plaques de Petri de plàstic estèrils (Sterilin). Aquells suplementes o solucions que no podien ser esterilitzats, com antibiòtics o lisats fàgics, eren filtrats mitjançant l'ús de filtres estèrils de 25 mm de diàmetre amb porus de $45\ \mu\text{m}$ de diàmetre (Whatman).

Tot el material que havia de ser usat en condicions estèrils va ser prèviament esterilitzat per calor humit a 135°C durant 15 min.

Taula 3.3. Oligonucleòtids usats en el present estudi.

Aplicació	Oligonucleòtid	Seqüència (5' → 3')
Oligonucleòtids per a la inactivació gènica en un pas ¹		
Amplificació de la casset Cm (pKD3) o Km (pKD4)	P1 ^A (directe)	GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	P2 ^A (revers)	CATATGAATATCCTCCTTAGT
Inactivació en un pas del gen <i>ada</i>	ada1pasD	CTTATCGATGATGAATGCTGGCTGCGGGTGCAGGCGCGCGATGCCAGCGC GGATGGGCGTTTCGTTTTGCGGTGCGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	ada1pasR	CTTTTTGCGCTTCTCGCTTTAATAGCTGCGCTTTTCGACGCACGCCCAACG ATAACCGGAGAGCGCGCCATCGCGACATATGAATATCCTCCTTAGT
Inactivació en un pas del gen <i>alkA</i>	alkA1pasD	TACCCTGAGCTGGCAGCCGCTTACGACTGGTCGTGGATGTTGGGCTTTCT TGCCGCGCGTGCAGGTGACGGCGTGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	alkA1pasR	ACTGAATACCAGCTATTTTCGCTATCCATTGACGGTTGCCAGCCGTGGGTAT ACCAGATATGCAGTAGCGCGTAGGAAACATATGAATATCCTCCTTAGT
Inactivació en un pas del gen <i>alkB</i>	alkB1pasD	ATCTATTTGCTGATGAAGCGCCCTGGCAAGAGCCCTGGCGCCTGGCGCG GTGGTGTGCGCCGCTTTGCGTTTCGCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	alkB1pasR	ATTCTTTTTCAGCTGCCTGACGGAAGGTGAGATTGTAACGAAATTCACCGG TCATGGGATGAAAGCCCGCTTTAAGCCATATGAATATCCTCCTTAGT
Inactivació en un pas del gen <i>aidB</i>	aidB1pasD	ATGTCCTGGCAAACACATACCGTCTTTAATCAACCTGCTCCGCTCAATAACA GTAACCTATTCCIGTCTGATGGCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	aidB1pasR	TTACCGCAGTCCCCGGTCGCCCTTAACAGTAAATCATTTTGCACCTGGGC AGGCAGCGGCATTTCCGCCGCTGTATATGAATATCCTCCTTAGT
Inactivació en un pas del gen <i>ogt</i>	ogt1pasD	GATTACTTGAAGAGAAGATAGCCACGCCATTAGGACCGTTATGGGTGGTT TGCGATGAGCAGTTTTGACTGCGGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	ogt1pasR	ATAATAAAAGATAGCCTTCATGGCGTAATAGCCACTCTTTTCGCTGCACGC CGCCTGCGTATCCGGTCAGAGTGCCATATGAATATCCTCCTTAGT

Taula 3.3. Continuació

Aplicació	Oligonucleòtid	Seqüència (5' → 3')
Inactivació en un pas del gen <i>tag</i>	tag1pasD	AGCCAGGACCCCCTTTATATTTGCCTATCATGATAACGAGTGGGGCGTACCG GAAACTGACAGCAGAAAAGCTGTTTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	tag1pasR	GAATCATGTTTTTCTCCCGGATGGCAAAAACAGCCGGTAATATGGTCATTG ACCAGTCCGCACGCCTGCATAAAGGCATATGAATATCCTCCTTAGT
Inactivació en un pas del gen <i>uvrA</i>	uvrA1pasD	ACCTGCGCCTGCTGTTTGCCCGCGTGGGCGAGCCGCGTTGTCCGGATCAT GACGTGCCGCTGGCGGCGCAAACCGTTAGCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	uvrA1pasR	GGGTGCGCCCGATTGGGCTCTGGTTCGATATCGATCACITTTATCGAAATGTT CCAGCCCCTGAATATCCCATAACGGCGCCCATATGAATATCCTCCTTAGT
Inactivació en un pas del gen <i>mfd</i>	mfd1pasD	TCCCGCCGCACGATCAACCCGGATACGTTGATTTCGTAACCTGGCGGAGCTC CACGTCGGTCAGCCGGTAGTGCATCTGGAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	mfd1pasR	TTCAAACGGGAAGCTGTCGCAGAATAACTGATACTGCTCACGATCATGCTT AAAGGCAAAACCCTCTTTTGCCGCCCGTCATATGAATATCCTCCTTAGT
Inserció de la casset en la regió intergènica 16.088 – 17.026	16088IR1pasD	TTGGGCGGCGGATTAAAAAAATTATCGAAGGTAATAAATTCAGATTAATTAT CATTTGCAGTATCAGGCTCATCCGTGAGCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	17026IR1pasR	TAAACGTTGCTGAGAAAAACCACAATAACGAACAATTTATTTATGGCTGGA TCAAGAATAGAGTGACCTAGACCAGGCTGCATATGAATATCCTCCTTAGT
Oligonucleòtids per a la comprovació de la inserció de la casset ²		
Comprovació de la inserció de la casset de resistència a Cm junt amb l'encebador directe situat en el gen diana	c1 ^A (revers)	TTATACGCAAGGCGACAAGG
Comprovació de la inserció de la casset de resistència a Cm junt amb l'encebador revers situat en el gen diana	c2 ^A (directe)	GATCTTCCGTCACAGGTAGG

Taula 3.3. Continuació

Aplicació	Oligonucleòtid	Seqüència (5'→ 3')
Comprovació de la inserció de la casset de resistència a Km junt amb l'encebador directe situat en el gen <i>diana</i>	k1 ^A (revers)	CAGTCATAGCCGAATAGCCT
Comprovació de la inserció de la casset de resistència a Km junt amb l'encebador revers situat en el gen <i>diana</i>	k2 ^A (directe)	CGGTGCCCTGAATGAACTGC
Comprovació de la inserció en el gen <i>ada</i>	<i>adaD</i> <i>adaR</i>	CTGCATGTAAGCAAGCAC GATCCAGCATTGCTACTC
Comprovació de la inserció en el gen <i>alkA</i>	<i>alkAD</i> <i>alkAR</i>	GTGCGATTAGCGTTTATGC TTATGGCCGACACTATCGC
Comprovació de la inserció en el gen <i>alkB</i>	<i>alkBD</i> <i>alkBR</i>	AGAGGAGTAGCAATGCTG AACTAACTCCACCTGCAC
Comprovació de la inserció en el gen <i>aidB</i>	<i>aidBD</i> <i>aidBR</i>	ATTGAAGGAGGGAGACACC GGATGGCATGTACTACAGG
Comprovació de la inserció en el gen <i>ogt</i>	<i>ogtD</i> <i>ogtR</i>	ATGTGAGAGAACGGATGC GTGTGACCGATAAGGCAC
Comprovació de la inserció en el gen <i>tag</i>	<i>tagD</i> <i>tagR</i>	AAGTCTATGCAGCGTTGC TAGACGCCATGTCTTCAC
Comprovació de la inserció en el gen <i>uvrA</i>	<i>uvrAD</i> <i>uvrAR</i>	ACCGGATGTCGACCATATIG GTTATAGCGCTTGCCITTGC
Comprovació de la inserció en el gen <i>mfd</i>	<i>mfdD</i> <i>mfdR</i>	GAGAGCTCCTGGCTCGCATA CAGCGTAGTCGGCACCAGTA
Comprovació de la inserció en la regió intergènica	IRD IRR	GTGTTTTCGCGAGTCCGATC GTGTTTTCGCGAGTCCGATC

Taula 3.3. Continuació

Aplicació	Oligonucleòtid	Seqüència (5'→3')
Oligonucleòtids per a RT-PCR quantitativa³		
Comprovació dels nivells d'expressió del gen <i>ada</i>	adaRTsqD adaRTsqR	GCAAAGGCGGGCGATAATGT TGATAGCCGCGACAACCTG
Comprovació dels nivells d'expressió del gen <i>alkA</i>	alkARTsqD alkARTsqR	GGATGCGCCCGATTATGT ATGCAGTAGCGCGTAGGAAC
Comprovació dels nivells d'expressió del gen <i>yiaC</i>	yiaCRTsqD yiaCRTsqR	TCGCAAATCCCAGAGTGAAGA GAAGTTTACGGCGGATTGATTT
Oligonucleòtids per a RT-PCR³		
Comprovació de la unitat transcripcional <i>tag – yiaC</i>	tagRTD yiaCRTR	TACTCCTTTATGCAGGCG ACAATTGCTTCGCTCTCG
Oligonucleòtids per a altres usos		
Comprovació de la presència de DNA en una mostra d'RNA	fhuAD fhuAR	TCAGGCGGAATGGAATAAGTGG GTAAGAAACGCGTGGGGTGCTC

^A Per a més detalls sobre la seva localització consultar la Figura 3.2.

¹ Oligonucleòtids usats en el primer pas del protocol de la inactivació gènica en un pas (Apartat 3.2.2.10 i Figura 3.3). Contenen una cua d'homologia al gen diana a la regió 5' i una seqüència a l'extrem 3' capaç d'hibridar amb els plasmidis pKD3 o pKD4. Tots ells van ser construïts per la casa comercial Invitrogen.

² Utilitzats un cop aconseguida la inserció de la casset per comprovar la correcta localització d'aquesta en el gen diana. c1 i c2 hibriden en la casset Cm, k1 i k2 en la casset Km (Figura 3.2). Tots ells foren encarregats a Invitrogen.

³ Dissenyats específicament per a l'amplificació de petits fragments de DNA a partir d'RNA mitjançant l'ús d'una retrotranscriptasa. Van ser sintetitzats per la casa comercial Roche.

3.1.2.1. Medis de cultiu

La majoria dels mètodes requereixen partir d'un cultiu de nit fresc (ON: *over-night*), el qual es prepararà el dia anterior a l'assaig per resuspensió d'un petit inòcul de la soca bacteriana en 5 – 10 ml de medi LB líquid i estèril en una ampolla (Pyrex[®]). Es deixarà incubant tota la nit i al dia següent es farà una dilució de l'ON en la quantitat requerida de medi nou estèril. La incubació dels cultius sol ser en agitació, la qual es va fer a 140 rpm en una agitador *Excella 5 Platform Shaker* (New Brunswick Scientific). Si no es diu el contrari, per a les incubacions en medi LB líquid sempre es va utilitzar la variació de Miller (veure l'Apartat 3.1.2.1.1).

En els casos en què es va requerir la lectura d'absorbància (DO: densitat òptica) es va utilitzar un espectrofotòmetre (*Uvikon 810 Kontron*, Microbean). Per a llegir les lectures d'emissió es va emprar cubetes d'espectrofotometria de metacrilat (Hellma) carregades amb un mil·lilitre de cultiu. La longitud d'ona a la qual es van fer les lectures depenia del medi de cultiu usat: 420 nm en el cas de medi mínim AB, 550 nm pel medi ric LB i 600 nm pel medi SOB.

Per a les centrifugacions es van utilitzar diferents tipus de centrífuga, depenent del volum de la mostra:

- Per a volums menors a 1,5 ml es va utilitzar la centrífuga *MiniSpin*[®] (Eppendorf), amb una velocitat màxima de 13.400 rpm (12.100 x g).
- Per a volums menors de 10 ml es va centrifugar els cultius en tubs de polipropilè de 10 ml en una centrífuga Beckman J2-21 amb rotor JA-20. Aquest rotor també admet tubs *Corex*[®] II (Corning) de 30 ml utilitzats durant la macroextracció plasmídica. En aquest rotor, la mostra està sotmesa en el radi màxim (180 mm) a 7.740 x g quan se centrifuga a 8.000 rpm, o a 12.100 x g per a 10.000 rpm.
- Per volums majors es van emprar tubs de 85 ml de policarbonat (Nalgene[®]) en el model de centrífuga *Centrifuge 5810R* d'Eppendorf, la qual permet a més la centrifugació refrigerada. Es va centrifugar a una velocitat de 8.000 rpm (6.797 x g) o de 6.000 rpm (3.824 x g).

65

3.1.2.1.1. Medi LB líquid

Descrit inicialment per Bertani el 1951 [14], existeixen actualment tres formulacions que varien en la concentració de clorur sòdic (NaCl): Miller (10 g/L), Lennox (5 g/L) i Luria (0,5 g/L). És un medi ric usat en la majoria d'assajos per al creixement d'*E. coli* i *S. Typhimurium*. Normalment es va utilitzar la variació descrita per Miller, excepte en la preparació de cèl·lules competents per a electroporació (Apartat 3.2.2.4.1), on es va utilitzar la variació de Lennox.

LB-Miller		LB-Lennox	
NaCl (Panreac)	10 g	NaCl (Panreac)	5 g
Tryptona bacto (Difco)	10 g	Tryptona bacto (Difco)	10 g
Extracte de llevat (Difco)	5 g	Extracte de llevat (Difco)	5 g
Aigua MQ	Ajustar a 1L	Aigua MQ	Ajustar a 1L
pH final: 7,2		pH final: 7,2	

3.1.2.1.2. Medi LB sòlid

La seva preparació és igual que pel medi LB-Miller líquid però amb l'addició de 16 g d'agar (Difco) per cada litre de medi preparat.

3.1.2.1.3. Medi LB semisòlid o LB agar tou

LB semisòlid

Tryptona bacto (Difco)	1 g
Extracte de llevat (Difco)	0,5 g
Agar (Difco)	0,7 g
Aigua MQ	Ajustar a 100 ml

66

3.1.2.1.4. Medi AB

Medi líquid mínim descrit per Clark i Maaløe [41]. Està compost per dues solucions, A i B, que s'han de preparar i guardar per separat. Per a la realització de les corbes de creixement es va suplementar amb un 0,2% de glucosa com a font de carboni (Apartat 3.2.1.1).

La preparació de les solucions A i B es realitza com segueix:

Solució A

(NH ₄) ₂ SO ₄ (Panreac)	20 g
Na ₂ HPO ₄ (Merck)	55,99 g
KH ₂ PO ₄ (Panreac)	30 g
NaCl (Panreac)	30 g
Na ₂ SO ₄ (Panreac)	0,11 g
Aigua MQ	Ajustar a 1L

Dissoldre totalment les sals i dispensar en volums de 100 ml en ampolles abans d'esterilitzar.

Solució B: prèviament cal preparar 3 solucions**Solució MgCl₂**

- MgCl₂ · 6 H₂O (Merck) 16 g
- Aigua MQ Ajustar a 500 ml

Solució CaCl₂

- CaCl₂ · 2 H₂O (Merck) 0,58 g
- Aigua MQ Ajustar a 250 ml

Solució FeCl₃

- FeCl₃ · 6 H₂O 0,032 g
- Aigua MQ Ajustar a 250 ml

Esterilitzar les 3 solucions per separat. Un cop refredades ajuntar en esterilitat.

Un cop estèrils, les solucions A i B es guardaran per separat fins al moment de necessitar del medi AB. En aquest moment s'escalfaran lleugerament (màxim a 50°C) i es mesclaran en esterilitat. La suplementació amb glucosa per obtenir una concentració final al 0,2% es realitzarà amb glucosa al 20% (Apartat 3.1.2.2.2).

AB

Solució A	100 ml
Solució B	25 ml
Glucosa al 20%	10 ml
Aigua MQ	875 ml

67

3.1.2.1.5. Medi BHI (*Brain-Heart Infusion*)

Utilitzat durant el període d'expressió fenotípica just després de l'electroporació (Apartat 3.2.2.4.2).

BHI

BHI (Oxoid). Composició:	37 g
▪ 12,5 g d'extracte de cervell	
▪ 5 g d'extracte de cor	
▪ 10 g de proteosa peptona	
▪ 2 g de glucosa	
▪ 5 g de NaCl	
▪ 2,5 g de Na ₂ HPO ₄	
Aigua MQ	Ajustar a 1L

3.1.2.1.6. Medi TB (*Terrific-broth*)

Descrit per Tartof i Hobbs [342], és un medi òptim per al creixement de cèl·lules transformants com a pas previ a l'extracció plasmídica (Apartat 3.2.2.3).

Es requereix la preparació de dues solucions, les quals s'esterilitzaran per separat en l'autoclau. Es deixaran refredar fins a una temperatura inferior a 50°C abans de mesclar-les en esterilitat, en cas contrari es donaria la precipitació de les sals. Un cop barrejades es pot dispensar el medi en volums de 100 ml.

Solució A

Triptona bacto (Difco)	12 g
Extracte de llevat (Difco)	24 g
Glicerol (Panreac)	4 ml
Aigua MQ	Ajustar a 900 ml

Solució B

KH ₂ PO ₄ (Panreac)	2,312 g
K ₂ HPO ₄ (Merck)	16,432 g
Aigua MQ	Ajustar a 100 ml

3.1.2.1.7. Medi SOB

Utilitzat durant la preparació de cèl·lules competents per a transformació en el mètode d'inactivació gènica en un pas (Apartat 3.2.2.10.3) [48].

68

SOB

NaCl (Panreac)	0,5 g
Triptona bacto (Difco)	20 g
Extracte de llevat (Difco)	5 g
KCl 2,5M	0,5 ml
Aigua MQ	Ajustar a 1L
pH final 7. Si escau corregir amb NaOH 10N	

3.1.2.1.8. Medi SOC

Emprat durant l'expressió fenotípica de cèl·lules transformants en el mètode d'inactivació gènica en un pas. Per a la seva preparació tan sols cal afegir al medi SOB glucosa 1M estèril fins a una concentració final de 20 mM.

3.1.2.1.9. Plaques verdes

Usades durant el mètode de transducció per a seleccionar transductants no lisògens (Apartat 3.2.1.7).

Plaques verdes

NaCl (Panreac)	5 g
Tryptona bacto (Difco)	8 g
Extracte de llevat (Difco)	1 g
Agar (Difco)	15 g
Groc d'alizarin R (Panreac)	833 mg
Blau d'anilina (Panreac)	132 mg
Aigua MQ	Ajustar a 966 ml
Esterilitzar. Un cop temperat afegir 34 ml de glucosa al 40% en esterilitat i dispensar en plaques de Petri	

3.1.2.2. Suplements

3.1.2.2.1. Antibiòtics

En diferents mètodes va caldre un pas de selecció per antibiòtic, tant en medi líquid com en medi sòlid. Es va preparar solucions estoc 1.000 x de cada antibiòtic, les quals es van conservar a -20°C.

En el cas de l'ampicil·lina i la kanamicina es va dissoldre la quantitat corresponent d'antibiòtic en 10 ml d'aigua MQ i es va filtrar amb filtres Whatman amb porus de 45 µm de diàmetre. En el cas del cloramfenicol, en canvi, la dissolució es va portar a terme en 10 ml d'etanol absolut (Panreac), sense necessitat posterior de filtratge.

Per a la preparació de medis sòlids amb antibiòtic es va afegir 1 ml de la solució estoc 1.000 x corresponent per cada litre de medi preparat. Per als medis líquids, considerant que els seus volums solien ser aproximadament de 10 ml, es van preparar solucions 100 x a partir de les solucions inicials 1.000 x i es van conservar a 4°C.

Les concentracions finals de treball per a cada antibiòtic estan descrites a la Taula 3.4.

Taula 3.4. Concentracions de treball dels antibiòtics usats en el present estudi.

Antibiòtic	Concentració final (µg/ml)
Ampicil·lina (Roche)	100*
Cloramfenicol (Sigma)	34
Kanamicina (Sigma)	100

* En el cas de la soca d'*E. coli* BRW25113 pCP20 la concentració final és 50 µg/ml.

3.1.2.2.2. Glucosa

Es van utilitzar tres solucions de glucosa segons el mètode. Per a la suplementació del medi AB es va preparar glucosa al 20% (equivalent a 1,11M), per a la preparació de plaques verdes es va emprar glucosa al 40% (2,22M) i per al mètode de la inactivació gènica en un pas es va utilitzar glucosa 1M (equivalent a 18,016%).

	Glucosa 20%	Glucosa 40%	Glucosa 1M
Glucosa monohidratada (Merck)	220 g	440 g	198,17 g
Aigua MQ	En els tres casos ajustar a 1L		
Esterilitzar i conservar a 4°C			

3.1.2.2.3. Arabinosa 0,4M

Per a obtenir una molaritat de 0,4M cal preparar una solució a 0,06 g/ml de DL-arabinosa (Sigma). Típicament s'afegiran 0,6 g en un tub amb 10 ml d'aigua MQ i es dissoldrà totalment amb l'ajut d'un agitador orbital o per inversió. Seguidament s'esterilitzarà passant la solució a través d'un filtre amb porus de 45 µm ajudant-se d'una xeringa. Conservar a 4°C.

70

3.1.2.2.4. KCl 2,5M

Aquesta solució es va utilitzar per a la preparació del medi SOB. Com que aquest medi s'esterilitzarà en l'autoclau, no és necessari haver autoclavat prèviament aquesta solució de clorur potàssic 2,5M. Aquesta molaritat correspon en pes a 0,1864 g/ml de KCl (Panreac). Preparar 10 ml d'aigua MQ en un tub i afegir 1,864 g de KCl. Dissoldre totalment i conservar a 4°C.

3.1.2.2.5. RNasa 20 mg/ml

Usada durant la macroextracció plasmídica (Apartat 3.2.2.3), es prepara com segueix:

RNasa 20 mg/ml	
RNasa A (Roche)	20 mg
Tris-HCl 1M pH 7,5 (AppliChem)	10 µl
NaCl 5M (AppliChem)	3 µl
Aigua MQ	987 µl
Incubar 15 min a 100°C. Refredar en gel, dispensar en alíquotes de 25 µl i conservar a -20°C	

3.1.2.2.6. Agents alquilants

3.1.2.2.6.1. MNNG

Es prepara una solució estoc a una concentració d'1 mg/ml d'MNNG (Chem Service). Aquest compost és molt poc soluble en aigua, de manera que es va preparar tampó citrat 0,1M a pH 5,5 per a la seva dissolució.

Tampó citrat 0,1M pH 5,5

Citrat trisòdic dihidrat (Merck)	14,705 g (0,1M)
Àcid cítric (Panreac)	10,5 g
NaOH pastilles (Panreac)	4,4 g
Aigua MQ	Ajustar a 500 ml
Ajustar el pH a 5,5 amb NaOH	

Segons el mètode s'usarà una concentració de treball d'MNNG de 5, 7,5 ó 10 µg/ml (equivalent a 34, 51 i 68 µM, respectivament).

3.1.2.2.6.2. MMS

L'MMS (Sigma) és subministrat en forma líquida per la casa comercial i presenta una densitat d'1,3 g/ml. La concentració de treball és del 0,1% (9,08 mM). Per 10 ml de medi, per exemple, caldran 7,692 µl.

71

3.1.2.2.6.3. DES

El DES (Sigma) arriba en format líquid i presenta una densitat de 1,177 g/ml i un pes molecular de 154,18 g/mol. La concentració de treball és 30 mM (4,6254 mg/ml). Per 10 ml de cultiu caldrien 39,271 µl.

3.1.2.3. Altres solucions

3.1.2.3.1. Solució salina NaCl 0,9%

Per a la seva preparació tan sols cal afegir 0,9 g de NaCl (Panreac) en 100 ml d'aigua MQ, mesclar breument i esterilitzar.

3.1.2.3.2. Solució de sulfat magnèsic (MgSO_4) 10 mM**MgSO₄ 10 mM**

MgSO ₄ (Panreac)	1,56 g
Aigua MQ	Ajustar a 1L

Cal agitar bé la solució fins a la dissolució de les sals. Repartir en ampolles en volums de 100 ml abans d'esterilitzar.

3.1.2.3.3. Glicerol al 10%

El glicerol es prepara en una ampolla de 100 ml, on s'afegeixen 10 ml de glicerol (Panreac) i 90 ml d'aigua MQ. Cal esterilitzar-lo.

3.1.2.3.4. EDTA 0,5M pH 8

EDTA 0,5M pH 8

EDTA 0,5M (Sigma)	186,12 g
Ajustar a 1L amb aigua MQ	

72

3.1.2.3.5. Solució I

Solució I (2 x)

Tris-HCl 1M pH 8 (AppliChem)	50 ml
EDTA 0,5M pH 8	40 ml
Ajustar a 1L amb aigua MQ	

Un cop preparada cal esterilitzar-la. La solució de treball és 1 x i es conserva a 4°C

3.1.2.3.6. Solució II

Solució II

SDS*	5 ml
NaOH 10N**	1 ml
Aigua MQ	44 ml

Ajustar el pH a 7,2 amb NaOH 1N

*** SDS**

SDS (Merck)	10 g
Ajustar el volum a 100 ml amb aigua MQ	

**** NaOH 10N**

NaOH (Panreac)	40 g
Ajustar el volum a 100 ml amb aigua MQ	

3.1.2.3.7. Solució III

Solució III

Acetat potàssic 5M*	600 ml
Àcid acètic glacial (Panreac)	115 ml
Aigua MQ	Ajustar a 1L
Portar el pH a 4,8 amb HCl	
Conservar a 4°C	

*** Acetat potàssic 5M**

Acetat potàssic (Panreac)	294,4 g
Aigua MQ	Ajustar a 100 ml

73

3.1.2.3.8. Terra de diatomees

En primer lloc dissoldre 3,5 g de terra de diatomees (Sigma) en 50 ml d'aigua MQ. Deixar que precipiti durant mínim 3 hores. Passat aquest temps eliminar tot el sobrenedant. Paral·lelament es prepara la següent solució:

Hidroclorur de guanidina (Sigma)	100 g
Tris-HCl 1M pH 7,4 (AppliChem)	8,75 ml
EDTA 0,5M pH 8	14 ml
Dissoldre en 50 ml d'aigua MQ. Un cop dissolt acabar d'ajustar a 175 ml amb aigua MQ	

Afegir aquesta solució a la terra de diatomees prèviament preparada i mesclar totalment.

3.1.2.3.9. TE

TE

EDTA 0,5M pH 8	2 ml
Tris-HCl 1M pH 7,4 (AppliChem)	1 ml
Aigua MQ	97 ml

3.1.2.3.10. TAE 50 x

TAE 50 x

Trizma Base (Sigma)	242 g
EDTA 0,5M pH 8	100 ml
Àcid acètic glacial (Panreac)	57 ml
Ajustar el volum a 1L amb aigua MQ	

3.1.2.3.11. Solució transportadora 6 x

Solució transportadora 6 x

Glicerol (Panreac)	30 g
Xilencianol (Clontech)	0,25 g
Blau de bromofenol (Panreac)	0,25 g
EDTA 0,5M pH 8*	2 ml
Ajustar el volum a 100 ml amb aigua MQ	

Un cop preparada cal esterilitzar-la

* Afegir un cop la resta de productes
ja estiguin dissolts

3.1.2.3.12. Aigua MQ amb dietil pirocarbonat (DEPC)

El DEPC (Sigma) es prepara de la següent manera:

- I. Preparar una ampolla lliure de RNases deixant-la 3 hores a 120°C. A partir d'aquí es manipularà seguint les precaucions adequades per treballar amb RNAs.
- II. Un cop refredada l'ampolla s'omplirà amb aigua MQ i es portarà a una cambra de protecció biològica, on s'afegirà 1 ml de DEPC per cada litre d'aigua MQ. Abans de tancar bé l'ampolla s'hi posarà també a dins un agitador magnètic o *mosca*.
- III. Deixar agitant entre 1 i 2 hores.
- IV. Esterilitzar a l'autoclau a 120°C durant 45 min per a evaporar el DEPC.
- V. Alhora d'obrir l'autoclau esperar que s'hagi refredat per sota dels 60°C.

3.2. Mètodes

3.2.1. Mètodes microbiològics

3.2.1.1. Corba de creixement

Es van realitzar corbes de creixement utilitzant medi mínim AB suplementat amb 0,2% de glucosa. Per cada soca es va preparar un cultiu a partir d'un ON, es va posar a incubar a 37°C i es van anar prenent mostres cada 30 minuts per a la mesura de l'absorbància fins que es va observar l'entrada a la fase estacionària. La representació de les dades es va fer en una gràfica semilogarítmica de dispersió on es va representar el temps a les abscisses i les absorbàncies en escala logarítmica a les ordenades.

3.2.1.2. Corba de supervivència a MNNG

Aquest tipus de corba requereix que s'acompanyi d'una titulació exacte de viables amb motiu de la mortalitat causada per l'agent mutagen. Segueix el mateix protocol que l'Apartat 3.2.1.1 però amb certes variacions:

- I. A partir d'un cultiu ON realitzar una dilució 1:100 en 10 ml d'LB estèril.
- II. Incubar en agitació a 37°C fins que arribi a una DO_{550} aproximada de 0,2.
- III. Prendre la mostra t_0 i posar-la en gel*.
- IV. Afegir MNNG al cultiu a la concentració final requerida.
- V. Posar immediatament en agitació a 37°C durant 20 min.
- VI. Agafar la següent mostra. Tornar al punt V.

* Prendre 100 µl de mostra, afegir en 900 µl de solució salina NaCl al 0,9% i deixar en gel. Un cop retornada l'ampolla a l'incubador es realitzarà el banc de dilucions i la sembra en placa per a la titulació exacte per a impedir que l'agent mutagen segueixi actuant.

En total es prendran mostres en els temps 0, 20, 40 i 60 min. En cas de no conèixer l'efecte de l'MNNG sobre la soca analitzada caldrà fer una prova prèvia utilitzant diferents concentracions i sembrant prou dilucions de cada mostra.

En cas de voler comparar la sensibilitat de diverses soques portar 2 ó 3 cultius en paral·lel. Considerant que en la present Tesi Doctoral es van comparar més de 3 soques, cada vegada que es feia l'assaig s'inclouïa la soca salvatge (*wt*) com a control.

3.2.1.3. Corba de supervivència a MMS

Bàsicament igual al protocol de l'apartat anterior, tan sols varia el punt IV, on s'afegeix MMS a una concentració final de 0,1% enlloc d'MNNG.

3.2.1.4. Corba de supervivència a DES

El protocol és el mateix que en l'Apartat 3.2.1.2 però afegint DES a una concentració final de 30 mM enlloc d'MNNG.

3.2.1.5. Corba de supervivència a pH àcid

Aquest tipus de corba va ser utilitzada per emular els efectes del pH estomacal en una soca inoculada oralment. El procediment és similar al de les corbes de supervivència descrites anteriorment. Com a control negatiu es va realitzar paral·lelament una corba per a la soca *wt*. Com a control positiu es duia a terme a més una tercera corba utilitzant un mutant defectiu en el gen *fur*, el qual està descrit que és més sensible al pH [90, 91].

- I. Preparar resembres afegint 100 µl dels cultius ON en ampolles amb 10 ml d'LB.
- II. Incubar en agitació a 37°C fins a arribar a una DO₅₅₀ de 0,4 – 0,5.
- III. Abocar cada cultiu en un tub de polipropilè de 10 ml i centrifugar 10 min a 8.000 rpm.
- IV. Eliminar totalment el sobrenedant.
- V. Resuspendre les cèl·lules amb 100 µl de medi LB. Recollir tot el contingut del tub amb una micropipeta i afegir a una ampolla amb 10 ml de medi LB a pH 3¹.
- VI. Immediatament agitar l'ampolla per a homogeneïtzar el contingut, prendre la mostra t₀ i deixar-la en gel².
- VII. Incubar les ampolles en agitació a 37°C durant 1 hora.
- VIII. Agafar la següent mostra. Tornar al punt VII.

¹ El pH estomacal es troba al voltant de 3 [237]. Per aquesta raó, prèviament a la realització de l'assaig es prepararà medi LB-Miller líquid, el qual s'ajustarà a pH 3 amb HCl abans de l'esterilització. Un cop autoclavats es confirmarà el pH prenent una alíquota.

² Prendre 100 µl de cultiu i afegir en 900 µl de solució salina NaCl al 0,9% i deixar en gel. Per neutralitzar el pH àcid es realitzarà el banc de dilucions i la sembra en placa per a la titulació exacte abans de recollir la mostra del següent temps

Es prendran mostres en els temps 0, 60, 120, 180, 240, 300 i 360 min.

3.2.1.6. Corba de supervivència a sals biliars

De manera semblant a l'apartat anterior, la corba de supervivència a sals biliars permet veure si la delecio d'un determinat gen provoca un augment de la sensibilitat de la nova soca a aquests compostos. El procediment serà exactament el mateix que en l'apartat anterior, excepte el punt V, on s'utilitzarà medi amb sals biliars enlloc d'LB a pH 3,2. El medi amb sals biliars consisteix en un medi líquid LB-Miller, al qual se li afegeix un 30% (pes/volum) de colat sòdic (Sigma) previ a la seva esterilització [261, 357].

3.2.1.7. Transducció generalitzada

Per a la transducció generalitzada es va escollir el bacteriòfag P22HT $int7$, el qual té una alta eficiència de transducció a *S. Typhimurium*. A més, aquest bacteriòfag és un mutant HT (*high transduction*) que presenta una freqüència de transducció més elevada que el fag P22 gràcies a un reconeixement menys específic de la seqüència *pac* [294]. La transducció generalitzada es va utilitzar per a la construcció de mutants defectius en múltiples gens a partir de mutants defectius en un sol gen.

3.2.1.7.1. Obtenció d'un lisat fàgic

En primer lloc cal infectar la soca que conté el gen o el fragment de DNA d'interès (soca donadora) amb el bacteriòfag P22HT $int7$. Per a aquesta infecció caldrà tenir prèviament un lisat fàgic, idealment a $10^9 - 10^{11}$ pfu/ml¹. A continuació s'obté el lisat fàgic, el qual contindrà una població de partícules víriques, algunes de les quals hauran encapsidat part del cromosoma bacterià.

En tots els passos en què s'agafin volums del lisat fàgic es recomana utilitzar puntes estèrils per micropipeta amb filtre (M β P[®]) per evitar el pas de partícules víriques a l'interior de la micropipeta i la subsegüent contaminació de cultius d'altres assajos.

- I. Fer una resembra des d'un cultiu de nit de la soca donadora en una ampolla amb 10 ml d'LB estèril mitjançant una dilució 1/50.
- II. Incubar en agitació a 37°C fins que aquest arribi a una DO₅₅₀ de 0,4 – 0,5, que correspondrà a unes $2 \cdot 10^8 - 4 \cdot 10^8$ cfu/ml.
- III. Afegir la quantitat suficient d'un lisat de P22HT $int7$ per a obtenir una MOI² aproximada de 5 – 10 i deixar 20 min a 37°C sense agitació.
- IV. Incubar a 37°C en agitació durant 4 – 5 hores.
- V. Traspasar el cultiu a tubs de polipropilè i centrifugar 10 min a 10.000 rpm.

- VI. Recuperar el sobrenedant i filtrar amb l'ajut d'una xeringa de 5 – 10 ml usant un filtre estèril amb porus de 45 µm de diàmetre.
 - VII. Afegir cloroform al 5 – 10% del volum per assegurar l'eliminació de qualsevol cèl·lula bacteriana del lisat fàgic.
 - VIII. Passar a titular el lisat fàgic.
- ¹ pfu és el número d'unitats formadores de calbes i indica el número de fags capaços de generar un cicle infectiu.
- ² El valor MOI (multiplicitat d'infecció) correspon a la relació entre el número d'agents infectius (bacteriòfag) i la quantitat de dianes d'infecció (bacteri), i es calcula com a pfu/cfu.

3.2.1.7.2. Titulació d'un lisat fàgic

La titulació fàgica es fa mitjançant sembra en doble capa. Prèviament a l'assaig cal liquar completament LB agar tou i dispensar-lo en tubs de polipropilè de 5 ml en volums de 2,5 ml. Els tubs es mantindran a 45 – 50°C en un bloc tèrmic fins al moment del seu ús.

Per a la titulació es va escollir la soca *wt* de *S. Typhimurium*, encara que s'hauria pogut usar la mateixa soca donadora.

- 78
- I. Preparar una suspensió cel·lular en LB de la soca a infectar a una $DO_{550} = 0,2 - 0,3$.
 - II. Preparar també un banc de dilucions del lisat fàgic utilitzant $MgSO_4$ 10 mM.
 - III. Per a cada dilució de lisat fàgic que es vulgui sembrar afegir 100 µl de suspensió cel·lular i 100 µl de la dilució. Mesclar ràpidament, abocar immediatament en una placa d'LB i repartir homogeniament.
 - IV. Esperar 10 – 20 min a què l'agar se solidifiqui i deixar incubant a 37°C durant 16 – 20 hores.
 - V. Fer el recompte de calbes i calcular el valor de pfu/ml mitjançant la fórmula:

$$pfu / ml = \frac{\text{Número de calbes}}{\text{Factor de dilució} \times \text{Volum sembrat}}$$

3.2.1.7.3. Augment de títol d'un lisat fàgic

En cas d'obtenir un títol baix (inferior a 10^9 pfu/ml), normalment degut a què el lisat fàgic original provingués d'una soca amb un patró de metilació diferent al de la soca donadora, caldrà fer un augment de títol. El protocol és similar al de l'apartat anterior:

- I. Preparar una suspensió cel·lular en LB estèril de la soca a infectar (soca donadora) a una DO_{550} de 0,2 – 0,3.
- II. Afegir 100 μ l de suspensió cel·lular i 100 μ l del lisat fàgic. Mesclar ràpidament, abocar immediatament en una placa d'LB i repartir homogèniament. Sembrar vàries plaques.
- III. Esperar 10 – 20 min a què l'agar se solidifiqui i incubar 16 – 20 hores a 37°C.
- IV. Afegir 2 - 3 ml de $MgSO_4$ 10 mM a les plaques i deixar en agitació moderada a 4°C.
- V. Recollir tot el $MgSO_4$ en un tub de 10 ml de polipropilè. Recollir també la capa d'agar tou de sobre les plaques i abocar-la en el mateix tub.
- VI. Centrifugar 10 min a 8000 rpm.
- VII. Recuperar i filtrar el sobrenedant amb un filtre estèril de 45 μ m de porus.
- VIII. Afegir cloroform al 5 – 10% del volum i titular el lisat fàgic.

3.2.1.7.4. Infeció de la soca receptora

Amb el lisat fàgic obtingut a l'Apartat 3.2.1.7.1 s'infecta la soca que volem que incorpori la mutació (soca receptora).

79

- I. Fer una resembra d'un cultiu de nit de la soca receptora en una ampolla amb 5 – 10 ml d'LB estèril mitjançant una dilució 1/50.
- II. Incubar en agitació a 37°C fins que aquest arribi a una DO_{550} de 0,4 – 0,5, que correspondrà a unes $2 \cdot 10^8$ – $4 \cdot 10^8$ cfu/ml.
- III. En aquest moment caldrà preparar 4 tubs:
 - a. Soca receptora infectada a MOI 1: ajuntar en un tub 500 μ l de cultiu cel·lular amb 500 μ l de lisat fàgic 10^8 pfu/ml.
 - b. Soca receptora infectada a MOI 10: ajuntar 500 μ l de cultiu cel·lular amb 500 μ l de lisat fàgic 10^9 pfu/ml.
 - c. Control soca receptora: posar només 500 μ l de cultiu cel·lular en un tub.
 - d. Control lisat fàgic: posar tan sols 500 μ l de lisat en un tub.
- IV. Deixar 25 min a 37°C sense agitació.
- V. Incubar a 37°C en agitació durant 3 hores.
- VI. Sembrar en plaques selectives*.
- VII. Deixar créixer a 37°C durant 24 – 48 hores fins a l'aparició de colònies.

* Considerant que en la present Tesi Doctoral es van utilitzar les cassetes de resistència a Cm i Km, les sèmres es van realitzar en plaques LB suplementades amb 34 µg/ml de Cm o 100 µg/ml de Km, respectivament.

3.2.1.7.5. Selecció de clons no lisògens

Com a conseqüència del procés, part de les cèl·lules presents en les plaques selectives contindran el bacteriòfag P22HT*int7* integrat al seu cromosoma. Per a seleccionar aquells clons lliures de fag cal fer sèmres seriades en plaques verdes [49]. En aquest tipus de medi, els bacteris lisògens expressaran certes proteïnes fàgiques a membrana que en presència dels colorants del medi es tenyiran d'una tonalitat verd fosca, mentre que les cèl·lules lliures de fag tindran un color verd clar o marronós.

- I. Picar clons des de les plaques selectives de l'apartat anterior i sembrar-los per esgotament o en escocès en plaques verdes i incubar a 37°C durant tota la nit.
- II. Escollir aquells clons de tonalitat més clara i sembrar-los de nou en escocès en plaques verdes.
- III. Repetir aquest procés fins que no es vegi cap clon infectat amb el bacteriòfag.

Finalment, abans d'assignar un nom amb el codi del laboratori i crioconservar la nova soca mutant (Apartat 3.1.1) només caldrà comprovar la incorporació de la mutació per PCR (Apartat 3.2.2.5).

80

3.2.1.7.6. Acumulació de mutacions en una mateixa soca

Per tal de fer la transducció és important poder seleccionar aquelles cèl·lules bacterianes que hagin incorporat el fragment de DNA d'interès. En aquest cas, aquesta selecció era possible per la resistència antibiòtica incorporada. Per tant, la soca receptora ha de ser sempre sensible a aquest antibiòtic. Quan es va voler construir mutants defectius en més d'un gen a partir de mutants previs es va seguir l'ordre següent:

- I. En primer lloc, calia obtenir una soca receptora sensible a l'antibiòtic (Cm o Km). Quan la soca no ho era, abans calia fer saltar la casset de resistència (Apartat 3.2.2.10.6).
- II. Un cop obtinguda la soca receptora sensible a l'antibiòtic s'hi passava la mutació per transducció des de la soca donadora.
- III. En el cas de voler afegir una mutació més, calia tornar al primer punt. En el cas dels mutants *Δtag* i *Δada* calia perdre la casset sempre per no afectar l'expressió dels gens *yiaC* i *alkB*, respectivament.

Cada transducció permetia òbviament la incorporació d'una sola nova mutació. L'obtenció, per exemple, d'un mutant defectiu en quatre gens implicaria, doncs, de tres transduccions.

3.2.2. Mètodes de manipulació del DNA

3.2.2.1. Extracció de DNA cromosòmic

Per a l'extracció del DNA cromosòmic es va utilitzar el kit comercial *Easy DNA™ Kit* (Invitrogen) seguint les instruccions del fabricant. L'extracció es va realitzar sempre a partir d'un cultiu fresc sembrat en placa. Un cop finalitzada l'extracció es va comprovar la integritat del DNA mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa al 0,4% (Apartat 3.2.2.6).

3.2.2.2. Extracció plasmídica

L'extracció plasmídica es va realitzar amb el kit *GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas) i es va seguir les indicacions del fabricant. Un cop extret es va carregar el DNA en un gel d'electroforesi al 0,7% d'agarosa (Apartat 3.2.2.6) per a comprovar la seva integritat i patró.

3.2.2.3. Macroextracció plasmídica

En els casos en què es requeria una quantitat major de plasmidi, el protocol d'extracció va ser el següent:

- I. A partir de la soca que conté el plasmidi preparar un cultiu en una ampolla amb 10 ml de medi TB. Incubar a 37°C en agitació durant tot el dia.
- II. A final del dia abocar directament els 10 ml de cultiu en un matràs de 250 ml amb 90 ml de medi TB estèril. Incubar tota la nit en agitació a 37°C.
- III. Repartir la mostra en 2 tubs de policarbonat i centrifugar a 4°C durant 10 min a 6.000 rpm.
- IV. Eliminar totalment el sobrenedant i resuspendre en 4 ml de solució I freda (2 ml per tub).
- V. Traspasar el contingut dels dos tubs a un tub Corex® II de vidre de 30 ml.
- VI. Afegir 8 ml de solució II, segellar el tub amb Parafilm® M i agitar per inversió. Deixar reposar en gel durant 10 min.
- VII. Retirar el Parafilm® M i afegir 6 ml de solució III. Tornar a segellar amb Parafilm® M i agitar per inversió. Deixar reposar en gel durant 10 min.

- VIII. Centrifugar 10 min a 8.000 rpm i recuperar el sobrenedant en un tub nou de vidre Corex[®] II de 30 ml amb compte de no tocar el sediment.
- IX. Afegir 0,6 volums (12 ml) d'isopropanol absolut (Panreac).
- X. Segellar el tub amb Parafilm[®] M i mesclar per inversió. Deixar reposar durant 15 min.
- XI. Centrifugar 10 min a 8.000 rpm.
- XII. Decantar el sobrenedant. Sense donar la volta al tub, deixar boca avall sobre paper absorbent durant aproximadament una hora.
- XIII. Un cop tot l'isopropanol s'hagi evaporat, afegir 1 ml d'aigua MQ i 10 µl de RNasa A 20 mg/ml.
- XIV. Deixar resuspenent a 37°C durant 1 hora.
- XV. Repartir en dos tubs d'1,5 ml, afegir 1 ml de terra de diatomees a cada i barrejar. Deixar reposar durant 5 min.
- XVI. Transferir el contingut dels dos tubs en una xeringa de 5 ml, la qual s'haurà col·locat sobre una columna de purificació *Wizard Minicolumn* (Promega).
- XVII. Passar tota la solució a través de la columna pressionant l'èmbol de la xeringa.
- XVIII. Extreure la xeringa de la columna, retirar l'èmbol i tornar a col·locar la xeringa en la columna.
- XIX. Afegir 3 ml d'etanol al 70% (dissolt en aigua MQ) en la xeringa i passar a través de la columna pressionant de nou l'èmbol.
- XX. Retirar la xeringa de la columna i posar aquesta en un tub d'1,5 ml.
- XXI. Centrifugar el tub amb la columna durant 2 min a 13.400 rpm per eliminar totalment l'etanol.
- XXII. Descartar el tub i col·locar la columna sobre un nou tub d'1,5 ml.
- XXIII. Afegir 100 µl d'aigua MQ prèviament temperada a 50°C en la columna.
- XXIV. Deixar reposar 5 min i centrifugar 2 min a 13.400 rpm.
- XXV. El volum eluït contindrà el DNA plasmídic. Per recuperar més quantitat es pot tornar al pas XXII.
- XXVI. Carregar les mostres en un gel d'electroforesi de DNA al 0,7% d'agarosa (Apartat 3.2.2.6) per veure la seva integritat.

3.2.2.4. Transformació per electroporació

3.2.2.4.1. Preparació de cèl·lules competents per a transformació

La incorporació de DNA en *Salmonella* i *Escherichia* es pot realitzar mitjançant transformació induïda per electroporació, mètode que requereix prèviament l'obtenció de cèl·lules competents.

Per a aquest mètode s'utilitzarà com a medi de cultiu LB-Lennox. Els tubs de centrífuga de 85 ml de policarbonat, l'aigua MQ i el glicerol al 10% s'hauran de refredar prèviament a 4°C. El mètode és el següent:

- I. Preparar una resembra abocant 10 ml d'un ON en 1L d'LB-Lennox.
- II. Incubar a 37°C en agitació fins que el cultiu arribi a una DO_{550} de 0,5 – 0,6 (per soques $\Delta recA$) ó 0,2 – 0,3 (per soques $recA^+$).
- III. Repartir el cultiu en tubs de 85 ml de policarbonat i deixar refredar a 4°C durant 15 min.
- IV. Centrifugar a 4°C durant 10 min a 8.000 rpm.
- V. Eliminar el sobrenedant per decantació.
- VI. Resuspendre en 1 volum d'aigua MQ freda (primer rentat).
- VII. Centrifugar a 4°C durant 10 min a 8.000 rpm.
- VIII. Eliminar el sobrenedant per decantació.
- IX. Resuspendre en 1 volum d'aigua MQ freda (segon rentat).
- X. Centrifugar a 4°C durant 10 min a 8.000 rpm.
- XI. Eliminar el sobrenedant per decantació.
- XII. Resuspendre en 20 ml de glicerol fred al 10%.
- XIII. Centrifugar a 4°C durant 10 min a 8.000 rpm.
- XIV. Eliminar el sobrenedant per decantació.
- XV. Afegir 1 ml de glicerol fred al 10% i resuspendre bé.
- XVI. Repartir en volums de 50 μ l en tubs d'1.5 ml i posar en gel sec fins acabar d'aliquotar. Conservar a -75°C.

83

3.2.2.4.2. Electroporació

Es va aplicar un pols elèctric mitjançant els aparells *Gene Pulser II* i *Pulse Controller Electroporation System* de Biorad. Pels casos d'*Escherichia* i *Salmonella* s'ajusta l'aparell per a

què confereixi un corrent de $25 \mu\text{F}^1$ de capacitància i $200 \Omega^2$ de resistència en paral·lel. En el cas d'*Escherichia* cal aplicar un pols elèctric de $2 \text{ kV}/\text{cm}^2$, mentre que per *Salmonella* és necessari arribar als $2,5 \text{ kV}/\text{cm}^2$. Per a l'electroporació s'ha de seguir els passos següents:

- I. Descongelar en gel un vial de cèl·lules competents en cas de què estigués conservat a -75°C .
- II. Afegir uns 200 ng de DNA plasmídic³. Si es tracta de DNA lineal (mètode d'inactivació gènica en un pas, Apartat 3.2.2.10) afegir entre 500 ng i $1 \mu\text{g}$ de DNA.
- III. Deixar reposar 10 – 15 minuts en gel.
- IV. Transferir les cèl·lules competents a una cubeta d'electroporació (2 mm *electrode gap*, de Biolabs; tenen una superfície d' 1 cm^2 i deixen 2 mm d'espai entre les dues plaques que transmeten el corrent elèctric) estèril i freda.
- V. Posicionar correctament (segons les especificacions de l'aparell) en el *Gel Pulser*.
- VI. Aplicar el pols elèctric i immediatament després afegir 1 ml de BHI fred dins de la cubeta d'electroporació. En el cas de la inactivació gènica afegir 1 ml de SOB enlloc de medi BHI.
- VII. Transferir tot el líquid en un tub estèril de vidre, el qual s'incubarà a 37°C durant 60 – 90 min per a permetre l'expressió fenotípica del material genètic incorporat. En les transformacions dels plasmidis pKOBEGA i pCP20 (Apartats 3..2.2.10.1 i 3.2.2.10.6), atès que són termosensibles, incubar a 30°C .
- VIII. Sembrar tot el contingut en plaques selectives⁴ i incubar a la temperatura adequada.

¹ La capacitància es mesura en farads (F) i representa la capacitat d'un cos per emmagatzemar energia elèctrica, normalment entre dues plaques. En aquest cas, és la capacitat de l'aparell d'acumular transitòriament energia entre les dues plaques de la cubeta d'electroporació, és a dir, l'espai on es troben les cèl·lules.

² La resistència es mesura en ohms (Ω) i significa la resistència d'un determinat cos al pas d'un corrent elèctric. La resistència és característica de cada cos i és independent de la diferència de potencial aplicada.

³ En alguns casos caldrà realitzar prèviament una diàlisi (veure l'apartat següent).

⁴ Plaques LB Cm o Km en el cas de la inactivació gènica en un pas. Plaques LB Amp $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ en el cas de transformants amb pKOBEGA o pCP20.

3.2.2.4.3. Diàlisi

Durant la transformació per electroporació és important que el DNA afegit al pas II (veure l'apartat anterior) estigui en una solució lliure de sals. En cas contrari és possible que la presència d'aquestes sals provoqui una forta descàrrega dins de la cubeta d'electroporació al aplicar el pols elèctric, fet que provocaria la mort de gran part de les cèl·lules competents i una baixada dramàtica de l'eficiència de la transformació.

Si la mostra de DNA ha estat prèviament purificada (Apartat 3.2.3.1.5) és improbable que això succeeixi. Si, per contra, el DNA prové d'una reacció prèvia on s'ha usat un tampó, és possible que aquesta descàrrega es doni si s'utilitzen més de 1 – 2 μ l de solució amb DNA per a l'electroporació. En aquests casos serà necessari dialitzar per eliminar restes de sals:

- I. Omplir una placa de Petri buida amb aigua MQ fins a cobrir tota la superfície.
- II. Col·locar adequadament (cara brillant cap amunt) un filtre de diàlisi (Millipore) amb porus de 0,05 μ m de diàmetre.
- III. Deixar amb compte el DNA sobre el filtre amb l'ajut d'una micropipeta.
- IV. Esperar 15 – 20 minuts (si la solució conté moltes sals caldrà un màxim de 30 min).
- V. Recuperar el DNA amb una micropipeta.

85

3.2.2.5. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

Per a evitar contaminacions per altres DNAs, alhora de preparar la barreja de reacció (Taula 3.5) es va utilitzar la cabina de flux vertical per a PCR *FLV60 Euro Aire*, amb la qual s'irradiava el material i la zona de treball durant 15 min abans de realitzar a mescla. Per a aquesta mescla es va usar:

- El kit *ExpandTM High Fidelity PCR System* (Roche), que inclou l'enzim Taq DNA polimerasa, un tampó amb clorur de magnesi ($MgCl_2$), un tampó sense $MgCl_2$ i una solució de $MgCl_2$ 25 mM. En la majoria de casos es va usar el primer tampó, de manera que quedava una concentració final de $MgCl_2$ de 1,5 mM. Tot i això, en alguns casos es va haver d'ajustar les condicions de reacció augmentant la concentració final de $MgCl_2$ a 2,5 mM (utilitzant per a la barreja de reacció 2,5 μ l de tampó sense $MgCl_2$ i afegint 2,5 μ l de $MgCl_2$).
- Els oligonucleòtids (descrits a la Taula 3.3) van ser reconstituïts a 100 pmols/ μ l i conservats a -20°C. Com a solució de treball es va usar una dilució 1:10 d'aquest estoc. En la barreja de reacció la concentració final era de 0,5 pmols cadascun.

- Els quatre dNTPs van ser subministrats de manera separada per Thermo Scientific, cadascun a una concentració de 100 mM. Per al seu ús es va preparar una barreja equimolar dels dNTPs afegint 10 µl de cada dNTP en 460 µl d'aigua MQ, quedant a una concentració final de 2 mM cadascun en la mescla de treball i a 0,2 mM en la mescla de reacció.
- En alguns casos va ser necessari afegir 1,25 µl de dimetil sulfòxid (DMSO) (Merck) a la barreja de reacció, el qual facilita la reacció ajudant a mantenir separades les dues cadenes de DNA [147]. En altres es va afegir 2 µl d'albumina sèrica bovina (BSA) a 1 mg/ml, la qual ajuda a estabilitzar la polimerasa [153].
- Per a la verificació de la incorporació d'una mutació després dels processos d'inactivació gènica en un pas i de transducció, així com per a la identificació dels mutants Δada i Δtag després d'un assaig *in vivo*, el DNA utilitzat no va ser extret com ha estat descrit a l'Apartat 3.2.2.1, sinó que es va obtenir directament des de colònia: en aquest cas es pica un clon d'interès des d'una placa i es resuspén en un tub d'1,5 ml amb 100 µl d'aigua MQ. A continuació es bull durant 10 min, se centrifuga 2 min a 13.400 rpm (centrífuga *MiniSpin*[®]) i es transfereix el sobrenedant a un tub nou. S'ha de conservar a -20°C fins al moment del seu ús.

La mescla conjunta sense DNA per a totes les mostres es prepararà en un sol tub, afegint sempre una mostra més al càlcul que servirà com a control negatiu. Un cop preparada es distribuirà la mescla en tubs i es tancarà el tub del control negatiu abans d'afegir el DNA a la resta de tubs per evitar contaminacions. Quan sigui possible s'haurà d'afegir també un control positiu per verificar que les condicions de la PCR són les adequades. Un cop preparada la reacció s'utilitzava un termociclador 2720 *Thermal Cycler* (Applied Biosystems) programat per realitzar cicles de temperatura que permetessin l'amplificació del fragment per la polimerasa (Taula 3.6).

86

Taula 3.5. Mescla de reacció per a PCR.

Mescla de reacció (25µl)	
Tampó (10 x)	2,5 µl
dNTPs	2,5 µl
Oligonucleòtid directe	1,25 µl
Oligonucleòtid revers	1,25 µl
Taq Expand (3 U/µl)	0,2 µl
DNA	200 ng*
Aigua MQ	Fins a 25 µl

* En cas dels cromosòmics extrets des de colònia s'afegirà 2 µl de DNA a la mescla de reacció.

Taula 3.6. Programa de termociclador per a PCR.

Fase	Temperatura	Temps	
Desnaturalització inicial	94°C	4 min	} 30 cicles
Desnaturalització	94°C	30 s	
Hibridació	T _m ¹	30 s	
Elongació	72°C	t _e ²	
Elongació final	72°C	7 min	
Refredament	4°C	Indefinit	

¹ T_m (*melting temperature*), és la temperatura de fusió de DNA, és a dir, la temperatura a la qual la meitat de les cadenes estan dissociades [286]. La T_m de la reacció depèn de les característiques dels encebadors i condiona l'especificitat de l'amplificació.

² t_e es refereix al temps d'elongació o extensió. Caldrà consultar les especificacions del fabricant sobre el temps necessari per amplificar una determinada mida de banda. En el cas de la Taq polimerasa usada en aquest estudi es recomana 45 s per amplificar 0,75 kpb, 1 min per 1,5 kpb, etc.

3.2.2.6. Electroforesi de gels de DNA o RNA

El percentatge d'agarosa utilitzat per als gels d'electroforesi de DNA es va ajustar en funció de la mida del fragment d'estudi. En la Taula 3.7 es faciliten alguns percentatges orientatius. En el cas dels RNAs, els gels d'electroforesi sempre contenen un 1% d'agarosa.

87

Taula 3.7. Percentatges d'agarosa segons la mida dels fragments de DNA.

Percentatge d'agarosa	Mida del fragment de DNA
0,3	5 – 60 kpb
0,6	1 – 20 kpb
0,7	800 pb – 10 kpb
0,9	500 pb – 7 kpb
1,2	400 pb – 6 kpb
1,5	200 pb – 3 kpb
2	100 pb – 2 kpb

Per a la preparació dels gels es va utilitzar agarosa LWO EEO (Pronadisa), la qual es va diluir en tampó TAE 1 x (preparat a partir de TAE 50 x). Quan calia recuperar una banda del gel es va utilitzar l'agarosa LM Sieve (Pronadisa), la qual té un punt de fusió més baix. A més, es va afegir 2,5 µl de bromur d'etidi a 10 mg/ml (Amresco) per cada 50 ml de gel per obtenir una concentració final de 0,5 µg/ml. Aquest agent mutagen

s'intercala entre les molècules de l'àcid nucleic, permetent visualitzar els fragments al irradiar-se el gel amb llum UV. L'observació del gel es va fer amb el sistema de transil·luminació i captació d'imatge *E-box-1000/20 M* (Vilber Lourmat).

En el moment de carregar el gel es va afegir solució transportadora 6 x a les solucions de DNA o RNA en una relació 1:6 respecte al volum final de mostra. A més, sempre es va reservar un pou del gel per ser carregat amb un dels següents marcadors de pes molecular: DNA del fag λ (Promega) digerit amb l'enzim de restricció *BstEII* (New England Biolabs® Inc.) o amb *HindIII* (Roche); o bé DNA φ X174 digerit amb *HinfI* (Biotools) (Figura 3.1). Per a l'electroforesi es va utilitzar una cubeta *Mini-Sub Cell GT Cell* (Bio-Rad).

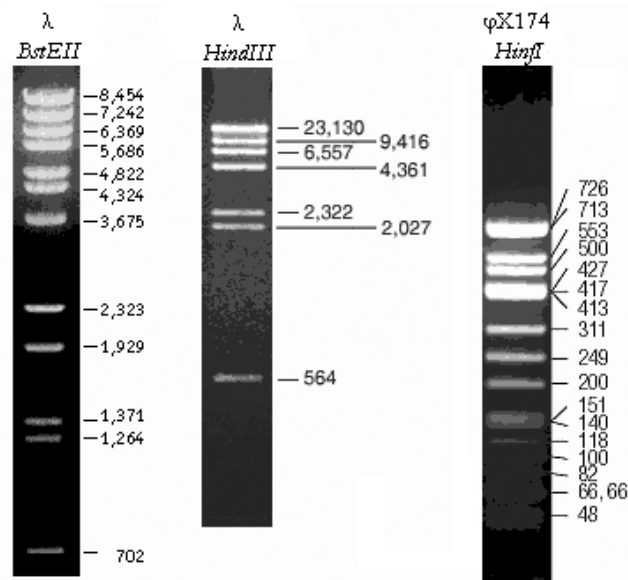


Figura 3.1. Marcadors de pes molecular.

3.2.2.7. Purificació de fragments de DNA

Per a la recuperació de fragments específics des de gels d'electroforesi es va utilitzar el kit *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare) seguint les instruccions del fabricant. També es va usar per recuperar DNA des de solució després de determinats mètodes quan les sals dels tampons de la reacció podien interferir en els procediments que es realitzarien a continuació.

3.2.2.8. Digestió amb enzims de restricció

Els enzims de restricció usats van ser subministrats per Roche o per New England Biolabs[®] Inc, i les reaccions es van realitzar segons les especificacions del fabricant i les unitats per microlitre (U/ μ l) de l'enzim. Les incubacions de les reaccions normalment van ser de 16 – 20 hores (ON) a la temperatura indicada. Segons el cas la reacció es va inactivar seguint el protocol del fabricant o per purificació del DNA des de solució (Apartat 3.2.2.7).

3.2.2.9. Quantificació de DNA o RNA

La concentració de DNA o RNA present a una mostra es va mesurar amb l'aparell *GeneQuant*TM (Amersham Biosciences). Per a la lectura de la puresa dels RNA es va tenir en compte les raons entre absorbàncies 260/230 i 260/280, les quals haurien de ser majors o iguals a 1,8 i 2, respectivament.

3.2.2.10. Inactivació gènica en un pas

La construcció de mutants defectius en determinats gens es va dur a terme seguint el protocol descrit en l'article de Datsenko i Wanner [48] amb la incorporació d'algunes modificacions. En primer lloc, s'ha d'introduir en la soca que es vol mutar el plasmidi pKOBEGA [38]. En segon lloc, cal tornar competents les cèl·lules recent transformades per a la introducció d'un fragment lineal de DNA, sintetitzat per PCR, que conté una casset de resistència i seqüències d'homologia al gen diana. Finalment, cal seleccionar els clons transformants que hagin adquirit la mutació per doble recombinació amb el fragment lineal introduït i, quan es requereixi, eliminar la casset de resistència.

89

3.2.2.10.1. Introducció del plasmidi pKOBEGA a la soca receptora

El plasmidi pKOBEGA va ser extret de la soca original (Apartat 3.2.2.2) i introduït per electroporació en la soca ATCC14028 que havia de rebre les mutacions (receptora). Per a aquest efecte es va seguir el protocol descrit a l'Apartat 3.2.2.4. Considerant que el plasmidi és termosensible i confereix resistència a Amp, la sembra de la transformació es va realitzar en plaques selectives Amp 100 μ g/ml, les quals es van incubar a 30°C. Al dia següent es va escollir algun clon, es va comprovar per extracció plasmídica que contenia el plasmidi i es va crioconservar la nova soca a -75°C.

3.2.2.10.2. Obtenció del DNA lineal

El mètode d'inactivació gènica en un pas es basa en introduir un fragment de DNA lineal dins la soca receptora que ha incorporat el plasmidi pKOBEGA. Aquest plasmidi conté el sistema Red, que inclou els gens γ , β i exo , els quals codifiquen per les proteïnes Gamma, Beta i Exo, respectivament. La proteïna Gamma inhibeix l'exonucleasa V, codificada pels gens RecBCD, i que degrada qualsevol DNA lineal que entri a la cèl·lula. Les proteïnes Beta i Exo, per la seva part, participen en la recombinació del DNA gràcies a la síntesi d'una recombinasa altament eficient capaç de recombinar amb regions d'homologia de tan sols 60 – 70 pb. L'expressió d'aquests tres gens està controlada pel promotor P_{araB} , el qual és induïble per arabinosa. Finalment, aquest plasmidi també codifica per un gen de resistència a ampil·lina.

Per altra banda, les cassetts de resistència estan codificades en els plasmidis pKD3 (casset Cm) i pKD4 (casset Km), tal com es pot observar en la Figura 3.2. Per als dos plasmidis hi ha dissenyats la parella d'oligonucleòtids P1 i P2 (Taula 3.3, secció *Oligonucleòtids per a la inactivació gènica en un pas*), els quals flanquegen la casset i permeten la seva amplificació per PCR. Aquests plasmidis de baix número de còpies van ser obtinguts des de les soques BW25113 d'*E. coli* que els contenen (Taula 3.1) per extracció plasmídica (Apartat 3.2.2.2) o macroextracció plasmídica (Apartat 3.2.2.3), segons la quantitat que se'n volia obtenir.

90

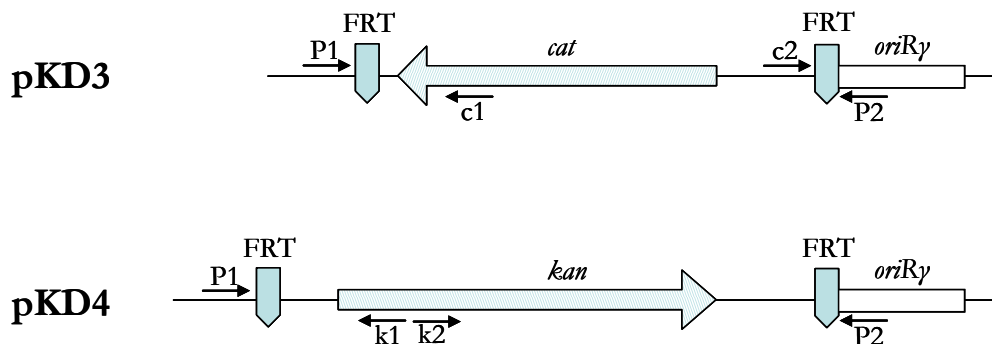
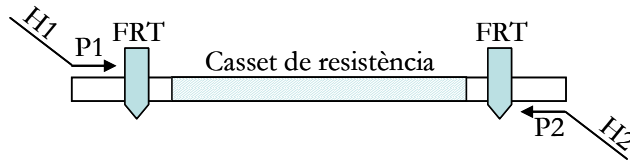


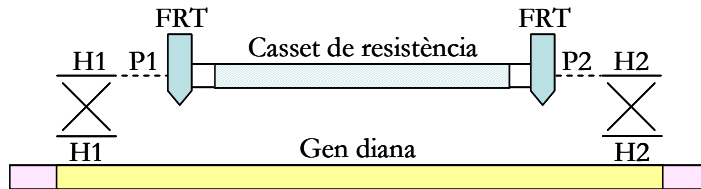
Figura 3.2. Plasmidis usats en la inactivació gènica en un pas. Es representa a la part superior el plasmidi pKD3, portador del gen *cat* de resistència a Cm; i a la part inferior el plasmidi pKD4, que codifica pel gen *kan* de resistència a Km. S'esquematitza les zones on hibriden els oligonucleòtids P1 i P2, que permeten clonar les cassetts; c1 i c2 per comprovar la correcta introducció de la casset Cm en el gen diana; i k1 i k2, que serveixen per corroborar la clonació de la casset Km en el gen diana. *Adaptat de Datsenko et al [48].*

Així doncs, aquest mètode es basa en realitzar una PCR amb oligonucleòtids que continguin les seqüències P1 i P2 per tal d'amplificar la casset Cm o Km, segons si s'utilitza com a motlle el plasmidi pKD3 o pKD4, respectivament (primer pas Figura 3.3).

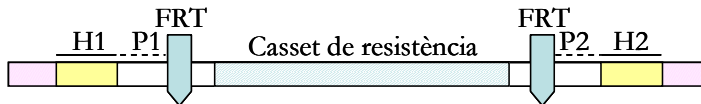
1r pas. Amplificar per PCR la casset de resistència, afegint als extrems cues d'homologia.



2n pas. Transformar el fragment amplificat en la soca receptora que expressa la recombinasa Red del fag λ .



3r pas. Seleccionar per resistència a antibiòtic transformants que hagin incorporat la casset.



4t pas (optatiu). Eliminar la casset de resistència usant el plasmidi pCP20 que codifica per FLP.

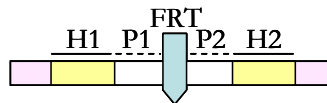


Figura 3.3. Estratègia del mètode d'inactivació gènica en un pas. H1 i H2 fan referència a les regions d'homologia amb el gen diana. P1 i P2 són els encebadors que flanquegen la casset. *Adaptat de Datsenko et al [48].*

Els oligonucleòtids dissenyats portaran incorporats, a més de les seqüències P1 i P2, seqüències homòlogues al gen diana on es vol incorporar la casset. D'aquesta manera el producte de PCR serà la casset de resistència flanquejada a cada banda per una cua d'homologia al gen diana. La introducció d'aquest fragment en una cèl·lula competent que contingui el plasmidi pKOBEGA i que expressi la recombinasa permetrà la doble recombinació de les seqüències homòlogues, incorporant la casset de resistència en el gen diana. Si les seqüències homòlogues seleccionades s'han dissenyat de manera que estan allunyades una de l'altra dins del gen diana, al produir-se la doble recombinació no només s'incorporarà la casset, sinó que a més es deleccionarà un fragment del gen.

A la Taula 3.3 (secció *Oligonucleòtids per a la inactivació gènica en un pas*) estan anotats els oligonucleòtids usats per a obtenir el DNA lineal de la casset junt amb les cues d'homologia. Aquests oligonucleòtids es poden usar tant sobre el pKD3 com el pKD4. Amb ells com a motlle es va realitzar una reacció de PCR (Apartat 3.2.2.5) amb un volum final de 200 µl utilitzant sempre una T_m de 56°C i un temps d'elongació d'1 min. La reacció de PCR es va carregar en un gel d'electroforesi (Apartat 3.2.2.6) i la purificació de les bandes es va realitzar tal com s'ha descrit a l'Apartat 3.2.2.7, però eluint en l'últim pas dues vegades amb 45 µl d'aigua MQ cadascuna. En el cas de la casset Cm el fragment recuperat mesurava 1,1 – 1,2 kpb, mentre que per la casset Km la banda era d'1,6 – 1,7 kpb.

Un cop purificada es va digerir amb DpnI (Apartat 3.2.2.8) per eliminar el DNA motlle i es va tornar a purificar la solució amb el DNA (Apartat 3.2.2.7). En l'últim pas es va eluir en 25 – 30 µl d'aigua MQ per a obtenir una concentració de DNA propera a 1 µg/ml.

3.2.2.10.3. Transformació del fragment lineal en la soca receptora

Per a la transformació del fragment de DNA obtingut a l'apartat anterior cal preparar abans cèl·lules competents de la soca receptora (obtinguda a l'Apartat 3.2.2.10.1). Durant la preparació s'afegirà arabinosa a una concentració final 20 mM per induir el sistema Red.

Per a realitzar aquest mètode caldrà abans refredar a 4°C tubs de policarbonat i glicerol 10%. A diferència de la preparació de competents descrita a l'Apartat 3.2.2.4.1, aquest cop s'utilitzarà medi SOB enlloc de medi LB-Lennox i els rentats es faran amb glicerol 10%.

- I. Realitzar una resembra 1:100 en 50 ml de medi SOB a partir d'un ON de la soca receptora. Afegir al medi Amp i arabinosa a concentracions finals de 100 µg/ml i 20 mM, respectivament.
- II. Incubar a 30°C en agitació fins arribar a una DO_{600} de 0,5.
- III. Repartir el cultiu en tubs freds de policarbonat de 85 ml.
- IV. Centrifugar a 4°C durant 15 min a 6.000 rpm.
- V. Eliminar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en 20 ml de glicerol al 10% fred.
- VI. Centrifugar a 4°C durant 15 min a 6.000 rpm.
- VII. Eliminar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en 10 ml de glicerol al 10% fred.

- VIII. Centrifugar a 4°C durant 15 min a 6.000 rpm.
- IX. Eliminar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en 5 ml de glicerol al 10% fred.
- X. Centrifugar a 4°C durant 15 min a 6.000 rpm.
- XI. Resuspendre en 300 µl de glicerol al 10% fred.
- XII. Preparar alíquotes de 100 µl en tubs d'1,5 ml.
- XIII. Per a incrementar l'eficiència realitzar l'electroporació a continuació. En cas de què no sigui possible, conservar ràpidament a -75°C.

L'electroporació es va realitzar tal com s'ha descrit a l'Apartat 3.2.2.4.2. Es va sembrar en plaques de medi LB amb Cm 34 µg/ml o Km 100 µg/ml, segons la casset de resistència, i es va incubar a 37°C.

3.2.2.10.4. Selecció dels clons

L'aparició dels clons resistents pot requerir de 24 a 48 hores d'incubació. Per a distingir els clons que hagin incorporat la casset dels inespecífics caldrà realitzar una PCR obtenint el DNA des de colònia (Apartat 3.2.2.5) i utilitzant les combinacions d'oligonucleòtids (Taula 3.3, secció *Oligonucleòtids per a la comprovació de la inserció de la casset*) següents:

- c1/k1 – directe gen diana (situat al gen i prop de l'extrem 5' de la casset).
- c2/k2 – revers gen diana (localitzat al gen i prop de l'extrem 3' de la casset).
- directe gen diana – revers gen diana.

Per a les dues primeres combinacions, els dos primers fragments amplificats tindran una mida inferior a 400 pb en el cas de la casset Cm (Figura 3.2), mentre que en el cas de la casset Km el fragment serà menor de 400 pb per la combinació amb el k1 i superior a 1 kpb per la combinació amb el k2.

3.2.2.10.5. Pèrdua del plasmidi pKOBEGA

Un cop trobat un clon que hagi incorporat la casset de resistència serà necessari curar la soca del plasmidi pKOBEGA aprofitant que aquest és termosensible.

- I. Picar el clon escollit i incubar a 42°C durant tota la nit en agitació en una ampolla amb 5 ml de medi LB sense Amp.
- II. Fer una resembra 1:100 en 5 ml d'LB líquid i incubar de nou a 42°C en agitació durant tot el dia.

- III. Al final del dia fer un banc de dilucions en solució salina NaCl al 0,9% i sembrar la dilució 10^{-6} en medi LB sòlid sense Amp. Incubar tota la nit a 42°C.
- IV. A partir dels clons crescuts a la placa, fer rèpliques en plaques LB Cm o Km (segons correspongui) i LB Amp. Incubar tota la nit a 30°C. Les rèpliques que hagin perdut el plasmidi creixeran en medi LB Cm o Km però no en plaques LB Amp.

Per a la conservació de la nova soca es va triar una rèplica positiva, es va sembrar en placa LB Cm o Km i un cop crescuda a 37°C es va crioconservar (Apartat 3.1.1) i es va anotar el seu nom amb el codi del laboratori en un registre de soques.

3.2.2.10.6. Pèrdua de la casset de resistència

En alguns casos va ser necessària l'eliminació de la casset de resistència. Per a tal efecte es va haver d'introduir el plasmidi pCP20, que codifica per una recombinasa FLP induïble per calor i que reconeix les seqüències FRT. Aquestes seqüències estan situades en repetició directa flanquejant la casset de resistència (Figura 3.3), de manera que l'acció de la FLP provocarà l'escissió de la casset, deixant només una petita regió que conté entre d'altres les seqüències P1, FRT i P2.

94

Si s'observa la seqüència complementària reversa de l'oligonucleòtid P2 (5'-ACTAAGGAGGATATTCATATG-3') es pot veure com conté una seqüència d'unió a ribosoma (seqüència Shine-Dalgarno) i un codó metionina, de manera que és possible la recuperació de l'expressió d'un possible gen situat *downstream* a aquesta regió i que formés una unitat transcripcional amb el gen delecionat.

Abans de seguir el protocol de pèrdua de la casset pròpiament dit es va haver de realitzar un seguit de passos. Totes les incubacions realitzades en aquests passos es van fer a 30°C donada la termosensibilitat del plasmidi.

- a. En primer lloc es va extreure el plasmidi pCP20 per macroextracció plasmídica (Apartat 3.2.2.3) des de la soca original BW25113 d'*E. coli* (Taula 3.1).
- b. Per evitar la baixada d'eficiència deguda a la diferència en els patrons de metilació entre *E. coli* i *S. Typhimurium*, el plasmidi va ser prèviament transformat per electroporació (Apartat 3.2.2.4) en la soca LB5000 de *S. Typhimurium* (restricció metilació⁺) [30], des de la qual va ser posteriorment recuperat de nou per extracció plasmídica (Apartat 3.2.2.2) o macroextracció plasmídica (Apartat 3.2.2.3).
- c. Es va preparar cèl·lules competents (Apartat 3.2.2.4.1) de la soca mutant de la qual es volia perdre la casset de resistència.

- d. Finalment, el plasmidi pCP20 va ser introduït per electroporació (Apartat 3.2.2.4.2) en les competents recent preparades en el punt anterior. Al final del procés es va sembrar la transformació en plaques LB amb Amp.

A partir de les plaques sembrades en la transformació es va escollir alguns clons per a portar a terme la pèrdua de la casset. Aquesta es realitza a 42°C, ja que el promotor que regula l'expressió de la FLP és termoinduïble alhora que el plasmidi és termosensible.

- I. Picar el clon escollit i incubar en una ampolla amb 5 ml de medi LB sense antibiòtic a 42°C en agitació durant tot el dia.
- II. Al final del dia realitzar una resembra 1:100 en 5 ml d'LB líquid estèril i incubar de nou a 42°C en agitació durant tota la nit.
- III. Al dia següent fer un banc de dilucions en solució salina NaCl al 0,9% a partir de l'ON i sembrar 100 µl de les dilucions 10^{-6} i 10^{-7} en plaques LB sense antibiòtic. Incubar a 42°C.
- IV. A partir dels clons crescuts a les plaques, fer rèpliques en plaques LB, LB Cm o Km (segons correspongui) i LB Amp. Incubar tota la nit a 30°C.
- V. Les rèpliques que hagin perdut tant la casset de resistència com el plasmidi creixeran en medi LB però no en LB Cm o Km ni en LB Amp.
- VI. Seleccionar alguna rèplica positiva i comprovar la pèrdua de la casset per PCR (Apartat 3.2.2.5) utilitzant els oligonucleòtids directe i revers situats en el gen diana (Taula 3.3, secció *Oligonucleòtids per a la comprovació de la inserció de la casset*). Tenint en compte la pèrdua de la casset més la mida del fragment deletat, els fragments amplificats en la present Tesi Doctoral solien ser d'uns 300 pb.

95

D'igual forma que en l'Apartat 3.2.2.10.5, es va seleccionar alguna rèplica positiva, es va sembrar i es va incubar a 37°C en una placa LB sense antibiòtic, se li va assignar un nom segons el codi del laboratori per la seva anotació en un registre de soques i es va crioconservar tal com s'ha explicat a l'inici de l'Apartat 3.1.1.

3.2.2.11. Seqüenciació

Es va utilitzar el servei de seqüenciació de Macrogen (<http://dna.macrogen.com>) per a la comprovació de totes les mutacions introduïdes.

3.2.3. Mètodes de manipulació de l'RNA

Alhora de treballar amb RNA seguir les recomanacions dels fabricants per a evitar-ne la degradació. En tots els mètodes es va utilitzar aigua MQ tractada amb DEPC (Apartat

3.1.2.3.12). Les superfícies de treball van ser prèviament tractades amb *RNase Zap* (Ambion®).

3.2.3.1. Extracció de l'RNA total

3.2.3.1.1. Cultiu per a extracció d'RNAs

Per a tots els assajos realitzats es va escollir la fase de creixement exponencial com a moment òptim per a l'estudi de l'expressió dels diferents gens. En aquest moment hi haurà un gran nombre de cèl·lules bacterianes amb quantitat suficient d'RNA per a poder fer una extracció eficient, mentre que el nivell d'RNases acumulades dins les cèl·lules encara no serà excessiu. Cal tenir en compte que els estudis d'expressió gènica sempre es fan comparant diversos cultius, ja sigui de diferents soques, o bé la mateixa soca amb diferents tractaments. Per a què l'estudi sigui el més significatiu possible tots els cultius s'hauran de portar en paral·lel. Els passos posteriors també s'hauran de seguir alhora per a totes les mostres que vulguin ser comparades entre sí.

La preparació del cultiu és com segueix:

- I. A partir d'una placa fresca preparar una suspensió cel·lular en 1 ml de medi LB. Afegir la quantitat necessària d'aquesta suspensió cel·lular en una ampolla amb 14 ml de medi LB estèril per tal d'obtenir una DO_{550} el més propera possible a 0,05 (rang 0,04 – 0,06).
- II. Incubar el cultiu en agitació moderada a 37°C i controlar-ne el creixement fins que aquest arribi a una DO_{550} de 0,8 – 1.
- III. Dividir cada un dels cultius en dos tubs de polipropilè amb 5 ml cadascun.
- IV. Centrifugar els tubs a 8.000 rpm durant 10 min.
- V. Descartar el sobrenedant per decantació. Acabar d'eliminar totalment les restes del medi amb l'ajut d'una micropipeta.

Deixar els tubs en gel fins al moment del seu ús. En cas de necessitat es poden conservar els sediments o *pellets* a -75°C, encara que no es recomana fer-ho. Les mostres haurien d'estar el menor temps possible en gel abans de passar al següent apartat.

3.2.3.1.2. Extracció d'RNA

Els dos sediments cel·lulars obtinguts a partir de cada cultiu es mantindran per separat en tots els passos fins arribar a l'apartat 3.2.3.1.5.

Per a l'extracció de l'RNA s'utilitzarà el kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega). Se seguirà les instruccions del fabricant per a l'extracció d'RNA des de bacteris

gramnegatiu (apartat 8.C del manual). El tractament inicial amb lisozim indicat al pas 4 es va fer utilitzant lisozim de clara d'ou de gallina (Sigma) dissolt en Tris-EDTA (Sigma) però a una concentració de 50 mg/ml enlloc dels 0,4 mg/ml indicats al manual, i la incubació amb el lisozim va ser de 10 min. Un cop extret l'RNA:

- a. Carregar una mostra en un gel d'electroforesi (Apartat 3.2.2.6) per veure la integritat de l'RNA. En el cas de *Salmonella* s'hauria de poder distingir dues bandes (Figura 3.4). Ocasionalment es pot apreciar una tercera banda molt tènue.
- b. Prendre una mostra per a quantificar la concentració de l'RNA (Apartat 3.2.2.9).

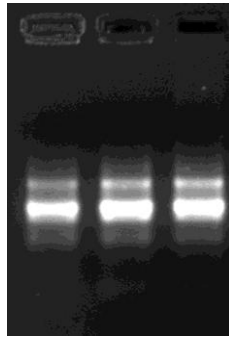


Figura 3.4. Gel d'electroforesi per RNA. Es pot observar tres mostres d'RNA, cadascuna amb dues bandes ben diferenciades. En cas de degradació les bandes desapareixerien i només s'observaria una llapisada contínua.

3.2.3.1.3. Tractament amb DNasa

Per eliminar les restes de DNA s'utilitzarà el kit *Turbo DNA-freeTM* (Ambion). Se seguirà bàsicament les instruccions del fabricant amb lleugeres modificacions:

- I. Per cada mostra (volum d'uns 90 μ l) d'RNA obtinguda després de l'extracció afegir 10 μ l de tampó *TURBO DNase 10X Reaction Buffer* i 4 μ l de l'enzim *TURBO DNaseTM*.
- II. Incubar a 37°C durant 30 min, afegir de nou 3 μ l d'enzim i incubar 30 min més.
- III. Per a inactivar la reacció afegir 10 μ l de *DNase Inactivation Reagent* i deixar a temperatura ambient durant 2 min. En aquest temps resuspendre el contingut del tub mínim dues vegades.
- IV. Centrifugar 4 min a les màximes revolucions (13.400 rpm).
- V. Transferir el sobrenedant a un nou tub d'1,5 ml amb cura de no emportar-se el sediment format per l'inactivador.
- VI. Tornar a centrifugar 4 min a les màximes revolucions.

VII. Transferir el sobrenedant a un tub nou d'1,5 ml*.

* En cas de què el sediment format per l'inactivador en el pas IX encara fos important repetir una centrifugació més. És important que no quedin restes de *DNase Inactivation Reagent*, ja que podrien interferir amb la retrotranscriptasa en passos posteriors.

En aquest moment caldrà prendre 3 mostres d'RNA:

- a. Una s'utilitzarà per carregar un gel d'electroforesi (Apartat 3.2.2.6) i veure la integritat de l'RNA (Figura 3.4).
- b. Una segona per a quantificar la concentració de l'RNA (Apartat 3.2.2.9).
- c. Una última mostra de 2 µl s'utilitzarà per a fer una PCR (apartat següent).

3.2.3.1.4. PCR de comprovació de restes cromosòmiques en l'RNA

És important comprovar que no quedin restes de DNA a les mostres d'RNA, ja que la presència de DNA en una de les mostres podria donar un resultat enganyós alhora de realitzar una RT-PCR o una RT-PCR quantitativa.

La PCR es realitzarà tal com s'ha descrit en l'Apartat 3.2.2.5. S'utilitzarà com a encebadors l'fhuAD i l'fhuAR (Taula 3.3, secció *Oligonucleòtids per a altres usos*), els quals amplifiquen un petit fragment de 247 pb del gen *fhuA*. La T_m serà de 60°C i el temps d'elongació de 30 s. Com a control positiu s'utilitzarà DNA cromosòmic de *S. Typhimurium*.

98

Un cop finalitzada la PCR es carregarà les reaccions en un gel d'electroforesi de DNA (Apartat 3.2.2.6) al 2% d'agarosa. Per a passar al següent pas és imprescindible que no hi hagi amplificació en cap de les mostres d'RNA. En cas d'observar l'aparició d'una banda caldrà tornar a l'apartat anterior de tractament amb DNasa.

3.2.3.1.5. Purificació i concentració de l'RNA

Per tal d'eliminar qualsevol possible resta de *DNase Inactivation Reagent* i per concentrar les mostres d'RNA s'utilitzarà el protocol d'*RNA Cleanup* del kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) seguint les instruccions del fabricant. És just abans de començar amb el primer pas del protocol quan s'ajuntarà les 2 mostres d'RNA derivades del mateix cultiu, les quals s'havien tractat per separat fins al moment.

Totes les mostres d'RNA que s'hagin d'estudiar conjuntament s'hauran d'ajustar a una concentració similar, la qual mai serà inferior a 500 ng/µl.

3.2.3.2. RT-PCR

RT-PCR són les sigles de *reverse transcription – polymerase chain reaction* i és un mètode en el qual, partint d'una mostra d'RNA, s'aconsegueix l'amplificació d'una determinada banda de DNA. Per aconseguir-ho es realitzen dues reaccions seguides: un primer pas on una transcriptasa reversa sintetitza una molècula de ssDNA a partir d'RNA; i una segona reacció en què una DNA polimerasa realitza una reacció normal de PCR sobre el DNA acabat de sintetitzar. Partint d'una mostra d'RNA total extreta d'un determinat cultiu es pot realitzar una RT-PCR, per a continuació carregar la reacció en un gel d'electroforesi (Apartat 3.2.2.6) i comprovar l'aparició o no d'una banda.

Taula 3.8. Barreja de reacció per a RT-PCR.

Mescla I (volum per a una reacció)		Mescla II (per a una reacció)	
dNTPs (2 mM cada dNTP)	5 µl	Tampó 5 x	10 µl
Oligonucleòtid directe (10 pmols/µl)	2 µl	Enzims	1 µl
Oligonucleòtid revers (10 pmols/µl)	2 µl	Aigua MQ amb DEPC	14 µl
DTT (100 mM)	2,5 µl		
Aigua MQ amb DEPC	Fins a 25 µl		

Per a cada reacció barrejar 25 µl de cada mescla en un sol tub i afegir 200 ng d'RNA.

En el present treball es va utilitzar aquest mètode per a la comprovació de la unitat transcripcional entre el gen *tag* i el següent gen, *yiaC*. Es va dissenyar un oligonucleòtid directe situat al gen *tag* i un oligonucleòtid revers al gen *yiaC* (Taula 3.3, secció *Oligonucleòtids per a RT-PCR*). A continuació es va realitzar una RT-PCR utilitzant el kit *Titan One Tube RT-PCR System* (Roche), el qual presenta la barreja d'enzims *AMV Reverse Transcriptase* i *Expand High Fidelity PCR System*, fet que permet la retrotranscripció (RT) i la PCR en un pas. Tal com especifica el fabricant es va preparar la mescla de reacció (Taula 3.8), per a continuació programar el termociclador com si d'una PCR es tractés però afegint un pas previ d'incubació (Taula 3.9). Els oligonucleòtids i els dNTPs es van preparar a les mateixes concentracions que per a una PCR però utilitzant aigua MQ amb DEPC.

99

Taula 3.9. Programa de termociclador per a RT-PCR.

Fase	Temperatura	Temps
Incubació inicial	50°C	30 min
Desnaturalització inicial	94°C	4 min
Desnaturalització	94°C	1 min
Hibridació	T _m	1 min
Elongació	72°C	1 min
Elongació final	72°C	7 min
Refredament	4°C	Indefinit

} 35 cicles

3.2.3.3. RT-PCR quantitativa

El mètode d'RT-PCR quantitativa és utilitzat per a l'estudi, a partir de l'anàlisi de l'RNA total, de variacions en els nivells d'expressió gènica entre parelles de mostres. La tècnica utilitzada no permet saber exactament la concentració d'un RNA, sinó que quantifica de manera indirecte (d'aquí que també es coneix com a semiquantitativa) mitjançant la relativització de la senyal obtinguda en una suspensió problema en funció de la mostra control.

Per aquesta tècnica s'aprofita els avantatges del fluorocrom SYBR Green I. És un agent intercalant que s'introdueix en l'estructura secundària del DNA de doble cadena, incrementant considerablement la seva capacitat per emetre fluorescència. El complex DNA – SYBR Green I presenta el seu pic d'absorció a una longitud d'ona de 498 nm (llum blava) i el pic d'emissió a 552 nm (llum verda). D'aquesta manera, la síntesi de noves molècules de dsDNA al llarg dels cicles permetrà un augment del número de complexos DNA – SYBR Green I i, per tant, l'increment de la fluorescència. Aquest increment es detectarà en primer lloc en aquelles mostres on la concentració de l'mRNA problema sigui més gran (Figura 3.5).

100

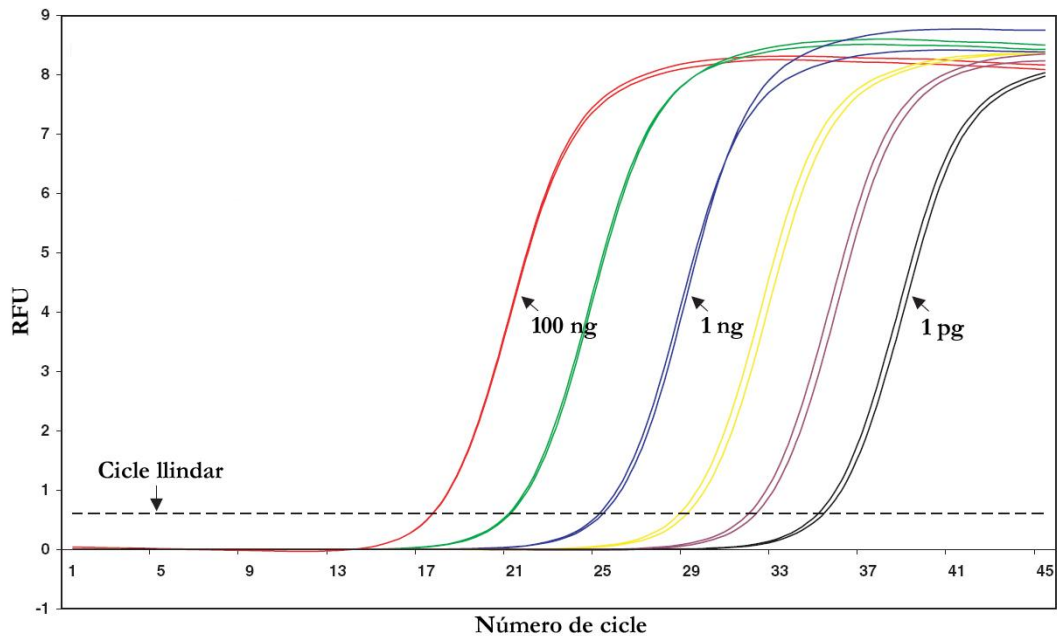


Figura 3.5. Amplificació per RT-PCR quantitativa. Resultat per RT-PCR de diferents motlles que varien de 100 ng a 1 pg. Totes provenen de la mateixa mostra a la qual s'ha realitzat una dilució seriada en magnituds de 10. RFU és l'acrònim de *Relative Fluorescence Unit* i és la unitat de mesura dels nivells de fluorescència.

Un dels inconvenients d'aquesta tècnica és el fet que el SYBR Green I és capaç d'incorporar-se en qualsevol dsDNA, incloent els dímers d'oligonucleòtids o productes inespecífics. Per aquesta raó i pel propi aparell de mesura hi ha un soroll de fons en els nivells d'RFU (unitat de mesura de la fluorescència). Així doncs, cal marcar per a totes les mostres el nivell d'RFU a partir del qual es considera que la reacció està entrant en fase exponencial. El cicle en què això succeeix rep el nom de cicle llindar.

A partir del cicle llindar es pot calcular el factor d'inducció (FI) entre dues mostres. Prenent una mostra com a referència dels nivells d'expressió del gen s'estima si els nivells d'expressió en la mostra problema no han variat o són significativament diferents, és a dir, si hi ha hagut inducció ($FI \geq 2$) o repressió ($FI \leq 0,5$) del gen.

Per a aquest estudi es va utilitzar el kit *LightCycler RNA Master SYBR Green I* (Roche) amb el suport de l'aparell *LightCycler Instrument* (Roche). Aquest kit utilitza la Tth polimerasa, una polimerasa termoestable que va ser aïllada originàriament de *Thermus thermophilus*. En aquest kit es presenta combinada amb aptàmers, petits oligonucleòtids que s'uneixen amb alta afinitat al centre actiu de la polimerasa, impedit la unió d'altres àcids nucleics. A la temperatura òptima per a la Tth polimerasa (uns 74°C) els aptàmers es dissocien, permetent la seva activitat enzimàtica. Aquesta consisteix en activitat retrotranscriptasa dependent d'RNA i DNA polimerasa dependent de DNA, raó per la qual l'ús d'aquest enzim permet realitzar una RT i una PCR en una sola reacció.

A cada cicle es donarà la desnaturalització, hibridació i síntesi de nou dsDNA. Gràcies a l'especificitat del SYBR Green I pel dsDNA s'unirà als productes de PCR a cada cicle, fet que pot ser monitorat per l'equip *LightCycler*, el qual mesura la fluorescència a 521 nm. Amb les dades recollides es pot realitzar al moment un anàlisi dels nivells d'amplificació per cada mostra, permetent dibuixar una gràfica semblant a la de la Figura 3.5. El processament de les dades pel *LightCycler Software* (Roche) permet, a més, estimar els punts de fusió dels fragments amplificats, descartant les amplifícacions inespecífiques i marcant el cicle llindar.

101

Taula 3.10. Mescla de reacció per a RT-PCR quantitativa.

Mescla de reacció (18µl)	
Mn(OAc) ₂	1,3 µl
LightCycler RNA Master SYBR Green I	7,5 µl
Oligonucleòtid directe (10 pmols/µl)	0,6 µl
Oligonucleòtid revers (10 pmols/µl)	0,6 µl
Mostra d'RNA	2 µl*
Aigua MQ amb DEPC	Fins a 20 µl

* La quantitat d'RNA dependrà dels nivells d'expressió de cada gen. Caldrà provar diferents concentracions d'RNA per a optimitzar la reacció.

Seguint les especificacions del fabricant preparar una mescla de reacció com es detalla en la Taula 3.10, per seguidament transferir-la en un capil·lar fred i segellar-lo amb l'ajut del rotor de l'aparell. A continuació es posa en marxa l'aparell amb el programa descrit a la Taula 3.11.

Els oligonucleòtids usats estan descrits a la Taula 3.3 (secció *Oligonucleòtids per a RT-PCR quantitativa*) i van ser resuspesos i diluïts en aigua MQ amb DEPC. Van ser dissenyats amb el programa *Primer Select* (DNA Star Inc.), el qual permet escollir oligonucleòtids amb menys probabilitat de formar dímers inespecífics. Es va utilitzar una T_m de 57°C. Abans de realitzar la reacció d'RT-PCR quantitativa es va preparar una PCR (Apartat 3.2.2.5) amb els oligonucleòtids i DNA cromosòmic com a motlle per comprovar que a una T_m de 57°C hi havia amplificació d'una sola banda.

Taula 3.11. Programació de l'aparell *LightCycler*.

Programa	Temperatura (°C)	Temps (s)	Pendent (°C/s)	Número de cicles
Retrotranscripció	61	1200	20	1
Desnaturalització	95	30	20	1
Amplificació	95	1	20	45
	57	10	20	
	72	15	20	
	76	5	20	
Corba de fusió	95	5	20	1
	68	18	20	
	95	0	0,1	
Refredament	40	30	20	1

102

3.2.4. Mètodes bioinformàtics

Part del treball de la present Tesi Doctoral es va realitzar *in silico* amb l'ús tant d'eines ofertes en diferents pàgines d'Internet com de programes:

- Per a la síntesi dels oligonucleòtids necessaris per a la mutació dels diferents gens va ser necessari l'accés a les seves seqüències nucleotídiques. Aquestes es van aconseguir des de l'eina *Comprehensive Microbial Resource* (CMR) del *J. Craig VenterTM Institute* (JCVI) (<http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/CmrHomePage.cgi>), la qual permet accés a tots els genomes procarïotes complerts publicats. Aquesta mateixa eina va ser útil per comprovar la presència de possibles unitats transcripcionals.
- La base de dades nucleotídica *Genbank* del *National Center for Biotechnology Information site* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>)

forma part del projecte de col·laboració *International Nucleotide Sequence Database Collaboration*, en la qual participen també el *DNA DataBank of Japan* (DDBJ) i l'*European Molecular Biology Laboratory* (EMBL). A través d'aquesta pàgina es pot tenir accés a un gran nombre de seqüències, entre elles el genoma complet de *S. Typhimurium*, cosa que va permetre l'obtenció de les regions intergèniques.

- c. El paquet de programes *DNAStar* (DNAStar Inc.) va facilitar la manipulació de les dades. Dins d'aquest programa es va utilitzar el programa *PrimerSelect* per al disseny d'oligonucleòtids per a RT-PCR i RT-PCR quantitativa, el programa *EditSeq* per a l'edició de les seqüències nucleotídiques i aminoacídiques i el *SeqMan* per a l'acoblament de diferents seqüències amb regions d'homologia.
- d. Per a conèixer a quins gens o regions pertanyien les seqüències rebudes des de Macrogen (Apartat 3.2.2.11) es va utilitzar l'eina anomenada *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), oferta per l'NCBI i usada per comparar regions locals de similitud entre seqüències nucleotídiques o proteiques problema i les bases de dades.
- e. Per a l'alineament de múltiples seqüències es va utilitzar el programa *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) de l'*European Bioinformatics Institute* (EBI), el qual forma part de l'EMBL.

3.2.5. Índex de competitivitat (IC)

103

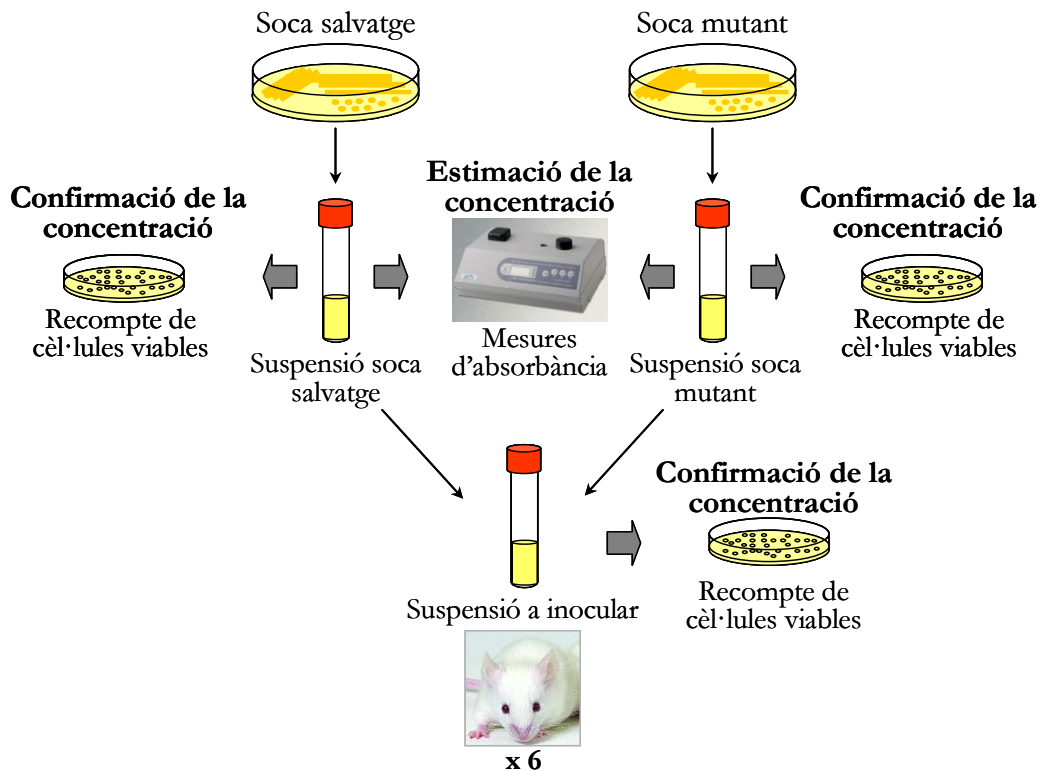
La soca ATCC14028 de *S. Typhimurium* és una soca virulenta de la qual es coneix la seva dosi letal 50 (LD_{50}), és a dir, la dosi mínima necessària per causar la mort al 50% dels individus d'assaig. En el cas de ratolins BALB/c femelles de 3 setmanes d'edat, les LD_{50} són les següents: per via intraperitoneal (ip) és menor de 10 cfu per animal, mentre que per via oral és d'aproximadament $10^5 - 10^6$ cfu/animal.

Treballant sobre aquesta base, diversos autors van usar un tipus d'assaig que permet comparar dues soques entre sí [16]. Aquest assaig consisteix en inocular en un mateix animal dues soques diferents en proporció 1:1. La dosi administrada sol ser igual o superior a la LD_{50} , de manera que gairebé tots els ratolins desenvoluparan tots els estadis de la infecció. A partir d'aquí es fa un seguiment de l'animal fins que aquest presenta clars símptomes de septicèmia, moment en què és eutanasiat. S'obté una mostra de sang del cor de l'animal, des de la qual es calcularà la proporció final entre les dues soques.

Atès que experimentalment sempre es cometen errors, la relació inicial entre les dues soques no serà mai exactament 1:1. Per tant, es calcularà l'IC, que corregeix la proporció final obtinguda en funció de la relació inicial calculada per titulació exacte dels inòculs de partida.

3.2.5.1. Preparació dels inòculs

Les mostres que s'inocularan en els ratolins es prepararan just abans de l'administració. Es partirà sempre d'una placa fresca sembrada el dia anterior. Per a inoculacions orals es prepararà una mostra a $2 \cdot 10^9$ cfu/ml, mentre que per inoculacions ip serà de $2 \cdot 10^4$ cfu/ml (Figura 3.6).



104

Figura 3.6. Inoculació d'un assaig de competitivitat. Es preparen separatament les suspensions de les soques a inocular. Seguidament es mesclen en un tub i s'inoculen en 6 ratolins BALB/c. Es realitzarà un recompte de viables tant de les suspensions de cada soca com de la barreja a inocular.

3.2.5.1.1. Inoculacions intraperitoneals

- I. Resuspènere una petita quantitat de la soca *wt* en un volum suficient d'LB fins a obtenir una DO_{550} aproximada de 0,2.
- II. Ajustar la resta d'inòculs de les altres soques a una DO_{550} el més similar possible al valor obtingut per la *wt*.
- III. Fer un banc de dilucions i sembrar les dilucions 10^{-5} i 10^{-6} per a una titulació exacte.

- IV. Barrejar en un mateix tub 700 µl de la dilució 10^{-4} de les soques *wt* i mutant.
- V. Procedir a la inoculació dels ratolins (Apartat 3.2.5.2.3).

3.2.5.1.2. Inoculacions orals

El mètode és molt similar al descrit a l'apartat anterior. En aquest cas, però, es vol obtenir un inòcul a $2 \cdot 10^9$ cfu/ml. Atès que la lectura de l'absorbància se satura a partir de certa densitat del cultiu, aquest cop caldrà:

- I. Resuspendre una quantitat moderada de la soca *wt* en una quantitat suficient d'LB.
- II. Fer una dilució 1:10 de la suspensió en medi LB i llegir l'absorbància des d'aquesta última. L'absorbància hauria d'estar a 0,2.
- III. En cas de no estar-ho, modificar la suspensió inicial i preparar de nou una dilució 1:10, des de la qual es tornarà a llegir la DO_{550} . Repetir aquesta seqüència fins a aconseguir-ho.
- IV. Per a la resta de soques ajustar de la mateixa manera la DO_{550} a un valor d'absorbància el més similar possible a la *wt*.
- V. Fer un banc de dilucions i sembrar les dilucions 10^{-6} i 10^{-7} per a una titulació exacte.
- VI. Barrejar 700 µl de la suspensió inicial de les soques *wt* i mutant.
- VII. Procedir a la inoculació dels ratolins (Apartat 3.2.5.2.3).

105

3.2.5.2. Experimentació animal

Per a la investigació amb animals de laboratori és necessari realitzar cursos de manipulació d'animals, tal com recull el decret 214/1997 del 30 de juliol de la Generalitat de Catalunya (DOGC núm. 2450 del 7 d'agost). És per aquesta raó que es donaran tan sols unes poques directrius, partint de la base de què ja s'han de tenir uns coneixements previs.

Aquest mateix decret estableix a més l'obligatorietat d'establir comitès ètics que vetllin pel benestar dels animals d'experimentació. El procés experimental que s'explica a continuació va ser sotmès al comitè d'ètica, rebent la referència 700 en el registre del Departament d'Agricultura i Pesca de la Generalitat de Catalunya (DARP).

3.2.5.2.1. Model animal

Per a l'experimentació amb animals es van usar ratolins femella BALB/cAnNHsd de 3 setmanes d'edat subministrats per Harlan Interfauna Iberica. Els ratolins BALB/c són una soca albina de ratolins adquirida el 1913 per H. Bagg. La soca BALB/cAnNHsd en concret deriva d'un nucli de cria obtingut pel *National Institute of Health* (Bethesda, EUA) i es caracteritza per presentar un alt grau d'homozigosi aconseguit per endogàmia.

3.2.5.2.2. Estabulació i dieta

Els ratolins van ser entregats en el Servei d'Estabulari de la Universitat Autònoma de Barcelona (número de registre B9900001), on van ser establats en grups de 6 per gàbia. Les gàbies permetien un ambient lliure de patògens gràcies a l'ús de filtres HEPA. La sala va ser mantinguda a una temperatura de 20 – 24°C i a una humitat relativa del 50 – 60%. La il·luminació, de tipus artificial, presentava un fotoperíode constant amb cicles de 12 h de llum i 12 h de fosc.

La sala contava amb una cabina de flux laminar vertical, la qual es va utilitzar per a les inoculacions dels ratolins, la seva supervisió i la realització de les necròpsies.

L'alimentació, consistent en una dieta natural pel·letejada lliure d'antibiòtics, va ser subministrada *ad libitum*. L'aigua, aportada de manera estèril en bevedors, era d'accés lliure i il·limitat per als ratolins.

3.2.5.2.3. Inoculació i supervisió

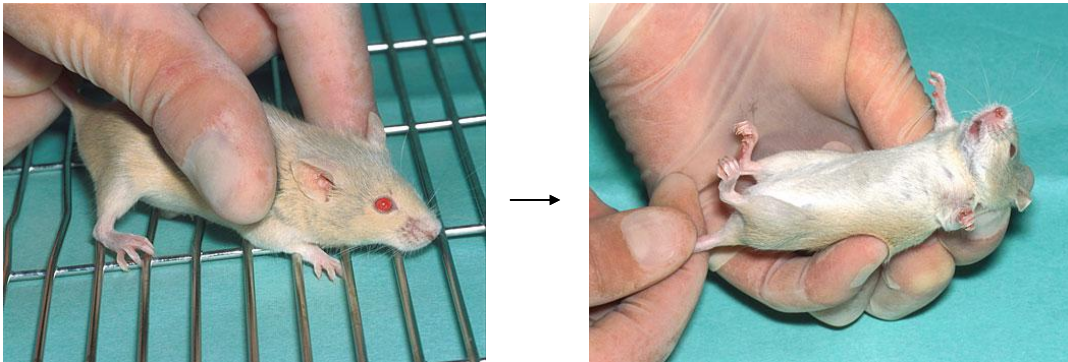
Un cop establats es va deixar un període de quarantena de 7 dies per permetre l'adaptació dels ratolins al nou ambient. Transcorregut aquest temps es va passar finalment a la inoculació dels ratolins amb els cultius preparats prèviament al laboratori (veure l'Apartat 3.2.5.1). Per cada inòcul diferent, format d'un 50% de soca *wt* i un 50% d'una soca mutant, van ser inoculats 6 ratolins. El número de ratolins usats era el número mínim de ratolins per a què els resultats fossin estadísticament significatius.

Per a les inoculacions es van utilitzar xeringues estèrils d'1 ml (Icogamma[®] plus). Per a les inoculacions ip es va utilitzar l'agulla 25G 0,5 mm x 16 mm subministrada junt amb les xeringues, inoculant 100 µl de preparat a 10⁴ cfu/ml; mentre que per les inoculacions orals es van utilitzar cànules de dosificació rectes model 7.7.1 de 38 mm i 22G (Harvard Apparatus), inoculant 100 µl de cultiu a 10⁹ cfu/ml.

Per a realitzar qualsevol inoculació en primer lloc és necessari immobilitzar l'animal de manera adequada (Figura 3.7). Les inoculacions ip es realitzen inclinant lleugerament l'animal cap a baix, de manera que els òrgans *caiguin* cap al cap, i introduint l'agulla en un

angle d'uns 30 – 45° en un o altre costat de la zona abdominal, preferentment el costat dret de l'animal. En el cas de les inoculacions orals, l'animal es disposarà verticalment amb el cap mirant amunt i s'introduirà la sonda per la boca fins a tocar la part superior del paladar. Seguidament, amb l'ajuda de la sonda, s'inclinarà el cap totalment endarrere per alinear-lo amb l'esòfag i es deixarà caure la sonda fins l'entrada de l'estómac sense forçar mai la introducció d'aquesta.

IMMOBILITZACIÓ



Sostenint el ratolí per la cua, immobilitzar el ratolí per les orelles amb el polze i l'índex. Seguidament aixecar l'animal i situar la cua entre els dits anular i menovell.

INOCULACIÓ IP



Introduir l'agulla al costat dret de l'animal de la zona abdominal.

INOCULACIÓ ORAL



Alinear tot l'aparell digestiu superior i sense forçar introduir la sonda.

Figura 3.7. Immobilització i inoculació de ratolins. Les imatges de la immobilització i la inoculació intraperitoneal han estat extretes de la guia tutorial per a la manipulació d'animals de la *British Veterinary Association Animal Welfare Foundation (BVA AWF)* des de la pàgina <http://www.bva-awf.org.uk/resources/tutorials/BVA05-Mouse/Mouse>. La soca de ratolins utilitzada en l'exemple no és BALB/c. L'última imatge, corresponent a la inoculació oral, va ser obtinguda de la pàgina http://www.theodora.com/rodent_laboratory/injections.html.

Un cop realitzada la inoculació dels ratolins es va seguir un protocol de supervisió diari (Taula 3.12) utilitzant una taula de seguiment (Taula 3.13). Els animals que sobrepassaven el criteri de punt final van ser eutanasiats per dislocació cervical. Aquells animals que van sobreviure als 30 dies de durada de l'experiment van ser sacrificats de la mateixa manera.

Taula 3.12. Protocol de supervisió per a l'experimentació amb animals.

Paràmetre	Situació	Puntuació
Pes	No hi ha pèrdua de pes o l'animal creix amb normalitat	0
	Pèrdua de pes inferior al 10%	1
	Pèrdua de pes del 10 – 20%	2
	Pèrdua de pes superior al 20%	3
Aspecte	Normal	0
	Pelatge en mal estat	1
	Pelatge en mal estat, secrecions oculars i/o nasals	2
	Pelatge en mal estat, secrecions oculars i/o nasals, postura anormal, automutilacions o vocalitzacions indicadores de dolor	3
Conducta	Normal	0
	Lleuger encorbament al caminar	1
	Encorbament, certa inactivitat	2
	Inactivitat, pobra resposta als estímuls o aspecte comatós	3
Respiració	Normal	0
	Dispnea lleu	1
	Dispnea moderada	2
	Dispnea severa	3
Quan un animal presenti una puntuació de 3 en dos o més paràmetres, tots els 3 es comptabilitzaran com a 4.		
El criteri de punt final s'estableix en una puntuació igual o superior a 8 (la meitat de la màxima puntuació possible, 16).		

108

3.2.5.2.4. Necròpsia

Un cop morts, es va practicar la necròpsia dels animals utilitzant pinces i tisores de dissecció d'acer inoxidable (Selecta). En primer lloc, es va utilitzar un joc de pinces dentades i tisores romes per a obrir i apartar la pell que cobreix el tòrax. En segon lloc, es va utilitzar un segon joc de pinces més fines i tisores punxegudes per a obrir la cavitat toràcica. Utilitzant el mateix joc es va extreure el cor i es van prendre mostres de sang en plaques LB. Els cossos dels ratolins van ser incinerats pel Servei d'Estabulari, mentre que el material utilitzat per a la necròpsia va ser esterilitzat per a nou ús.

Taula 3.13. Taula de seguiment dels ratolins. Per a cada gàbia, composta de 6 ratolins, s'utilitza una taula de seguiment de 30 dies.

		Identificador del ratolí					
		1	2	3	4	5	6
Dia 1 INFECCIÓ	Puntuació	Pes					
		Aspecte					
		Conducta					
		Respiració					
		TOTAL					
Dia 2	Puntuació	Pes					
		Aspecte					
		Conducta					
		Respiració					
		TOTAL					
Dia 3	Puntuació	Pes					
		Aspecte					
		Conducta					
		Respiració					
		TOTAL					
...							
Dia 30	Puntuació	Pes					
		Aspecte					
		Conducta					
		Respiració					
		TOTAL					

3.2.5.2.5. Processat de les mostres de sang i càlcul de l'IC

Les plaques de medi LB amb les mostres de sang van ser dutes al laboratori, on es va realitzar una sembra en esgotament i es van incubar a 37°C. En el cas dels IC on la soca mutant contenia una casset de resistència es van realitzar rèpliques en plaques LB i LB amb Cm 34 µg/ml a partir de les colònies aïllades. Pels mutants on s'havia perdut la casset es va realitzar PCRs (Apartat 3.2.2.5) per comprovar si el gen estava deletat. Amb aquestes dades i els resultats de les titulacions dels inòculs inicials es pot passar a fer el càlcul de l'IC:

$$IC = \frac{\left(\frac{\text{número de clons mutants}}{\text{número de clons } wt} \right)_{\text{finals}}}{\left(\frac{\text{cfu/ml soca mutant}}{\text{cfu/ml soca } wt} \right)_{\text{inicials}}}$$

Per cada mutant a estudiar es van inocular 6 ratolins, obtenint 6 valors d'IC. Per obtenir el valor central de la tendència es va utilitzar la mitjana geomètrica o proporcional. L'avantatge d'aquest tipus de mitjana és que té en compte tots els valors de la distribució, sent menys sensible als valors extrems que la mitja aritmètica. La desavantatge és que no es pot calcular si algun valor és 0:

$$\bar{x} = \sqrt[n]{\prod_{i=1}^n x_i} = \sqrt[n]{x_1 \cdot x_2 \cdots x_n}$$

3.2.5.2.6. Estadística

Per al tractament estadístic de les dades de l'assaig *in vivo* es va utilitzar una prova de *t* d'Student. La probabilitat d'aquest estadístic es calcula tenint en compte la mida de la mostra (n), la qual marca els graus de llibertat ($d = n-1$) de la distribució. Com a nivell de significació (α ó p) es va establir un $\alpha = 0,05$.

Es va plantejar un test bilateral amb les següents hipòtesis:

- Hipòtesi nul·la (H_0): $\mu = 1$
- Hipòtesi alternativa (H_1): $\mu \neq 1$

110 μ representa la mitjana aritmètica mostral calculada a partir dels valors d'IC obtinguts per cada ratolí. 1 és el valor que hauria de tenir l'IC si les dues soques es recuperessin al final de l'assaig *in vivo* en la mateixa proporció que a l'inici, és a dir, si la mutació introduïda no afectés en la virulència de la soca mutant. Així doncs, la hipòtesi nul·la és la que defensa que al final de l'assaig es recuperarà la mateixa proporció de soca mutant que de soca *wt* i, per tant, l'IC serà aproximadament d'1.

Com a estadístic es va utilitzar la fórmula $t = \frac{\mu - 1}{\sigma / \sqrt{n}}$, on σ és la desviació estàndard.

Amb les dades es va calcular el valor de t , per seguidament utilitzar el programa *Microsoft® Office Excel* per a calcular el valor de p . Aquest valor representa l'error de tipus I i expressa la probabilitat de rebutjar la hipòtesi nul·la quan aquesta en realitat sí és certa. És a dir, si s'obté un valor de $p = 0,04$ i es rebutja que les dues soques siguin iguals entre sí, hi ha una probabilitat de 0,04 d'equivocar-se.

Per al càlcul es va crear una taula en el programa on s'anotava el valor de t i els graus de llibertat. A continuació es va seleccionar el menú *Inserció* i després *Funció*. En el panell que s'obria es va escollir l'opció *DISTR.T* de la categoria *Estadístiques*. En la finestra que apareixia es marcava com a X el valor de t obtingut, s'indicava els graus de llibertat i es posava un 2 (test bilateral) en *cues*. El valor que retornava el programa era el de p . S'acceptava H_1 quan $p \leq 0,05$.

3.2.5.3. IC *in vitro*

3.2.5.3.1. Aerobiosi

Aquest assaig pretén emular un IC *in vivo*. És per això que se segueix un mètode semblant al descrit a l'Apartat 3.2.5.1.2. La variació comença a partir del punt VI:

- VI. En una ampolla amb 10 ml d'LB estèril afegir 100 µl de cada una de les dues suspensions.
- VII. Incubar en agitació a 37°C.
- VIII. Prendre una mostra de 100 µl a les dues, vuit i vint-i-quatre hores. Utilitzar aquestes mostres per fer un banc de dilucions.
- IX. Sembrar les dilucions indicades en la Taula 3.14 en plaques amb medi LB. Incubar les plaques a 37°C durant tota la nit.
- X. A partir de clons aïllats crescuts a les plaques fer rèpliques en plaques LB i LB Cm^{*}. Incubar tota la nit a 37°C.
- XI. El càlcul de l'IC és el mateix que en l'Apartat 3.2.5.2.5.

* Els mutants utilitzats eren Cm^R, la soca *wt* és Cm^S.

Taula 3.14. Dilucions sembrades durant l'IC *in vitro*.

111

	2 hores	8 hores	24 hores
Dilucions	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷

3.2.5.3.2. Anaerobiosi

També se segueix el mètode descrit a l'Apartat 3.2.5.1.2 variant des del punt VI:

- VI. En un tub de polipropilè de 10 ml amb 10 ml de LB líquid afegir 100 µl de cada una de les dues suspensions. Segellar el tub amb Parafilm[®] M.
- VII. Col·locar el tub i les plaques amb les titulacions en una gerra d'anaerobiosi (GasPak100, Afora). Posar-hi també un sobre d'anaerobiosi *BD GasPakTM EZ Anaerobe Container System* i un indicador d'anaerobiosi *BD BBLTM Dry Anaerobic Indicator System* i tancar la gerra. Incubar a 37°C.
- XII. Obrir la gerra a les 24 h i prendre una mostra per fer un banc de dilucions, des del qual sembrar les dilucions 10⁻⁵, 10⁻⁶ i 10⁻⁷ en medi LB. Incubar a 37°C durant tota la nit.

XIII. A partir de clons aïllats crescuts a les plaques fer rèpliques en plaques LB i LB Cm^{*}. Incubar durant tota la nit a 37°C.

XIV. El càlcul de l'IC és el mateix que en l'Apartat 3.2.5.2.5.

* Els mutants utilitzats eren Cm^R, la soca *wt* és Cm^S.

4. Resultats

4.1. Inducció de la resposta Ada a *S. Typhimurium*

La presència de proteïnes vinculades a la reparació de lesions alquilants ha estat descrita en els tres dominis taxonòmics (bacteria, archaea i eukaryota) [70, 239], demostrant que els mecanismes per fer front a aquest tipus de dany es van originar aviat en el procés evolutiu. Tot i això, actualment són diversos els gèneres que han perdut part d'aquests sistemes de reparació [6].

Varis dels gens que codifiquen per aquestes proteïnes es troben agrupats en alguns microorganismes, tant de grampositius com de gramnegatius, formant la resposta Ada (Apartat 1.6). Hi ha certa variació en el nombre de proteïnes que s'induiran, depenent del grau de conservació de la resposta en cada espècie. En *E. coli*, on la resposta Ada ha estat àmpliament caracteritzada, s'ha descrit l'augment de la concentració cel·lular de les proteïnes Ada, AlkA, AlkB i AidB (Apartat 1.5). Aquestes quatre proteïnes també estan codificades en el genoma de *S. Typhimurium*, si bé els nivells d'inducció són molt menors que els descrits en *E. coli* [114, 237] ja que, encara que la proteïna Ada hauria de reconèixer correctament els promotors [233], no és bon activador transcripcional. Aquest fet pot dependre tant de la capacitat de la proteïna Ada per interaccionar amb la regió promotora, com de les unions que ha d'establir amb l'RNA polimerasa (Apartat 1.6.1). Aquestes varien segons el gen, però també en funció de la subunitat σ utilitzada. La bibliografia relacionada amb l'activació de la resposta Ada està basada en la inducció dels gens *ada* [114, 359] i *alkA* [82] en la soca LT2 de *S. Typhimurium*, la qual és deficient en la subunitat σ^S a causa d'una mutació en el gen que la codifica, *rpoS* [381].

115

En la present Tesi Doctoral es va utilitzar la soca ATCC14028 de *S. Typhimurium*, que presenta una còpia salvatge del gen *rpoS*. Per aquest motiu, el primer objectiu d'aquest treball va ser determinar si el grau d'inducció de la resposta Ada en la soca ATCC14028 variava respecte a la descrita en LT2 com a conseqüència de la presència d'una subunitat σ^S funcional.

Per a acomplir aquest objectiu es va utilitzar el mètode d'RT-PCR quantitativa, que permetria la comparació dels nivells transcripcionals dels gens *ada* i *alkA* (estudiats prèviament en LT2) en un cultiu d'ATCC14028 salvatge (*wt*) en una situació de dany alquilant respecte a condicions de creixement no lesives. Per a la inducció de lesions alquilants es va realitzar un tractament amb 5 $\mu\text{g/ml}$ d'MNNG, un agent metilant $\text{S}_\text{N}1$ utilitzat freqüentment en aquest tipus d'assaigs per la seva capacitat d'inducció de la resposta Ada.

A partir de les dades obtingudes (Figura 4.1) es va determinar que el gen *ada* incrementa els seus nivells transcripcionals unes 6,5 vegades (contra les 40 vegades descrites en *E. coli* [114]) en una situació de dany metilant causada per MNNG respecte a una situació de creixement sense lesions alquilants, mentre que *alkA* no presenta una variació significativa en relació a condicions no lesives. Els resultats obtinguts van

confirmar assajos anteriors d'RT-PCR quantitativa realitzats sobre la soca LT2 i la bibliogràfica abans esmentada [82, 114, 359].

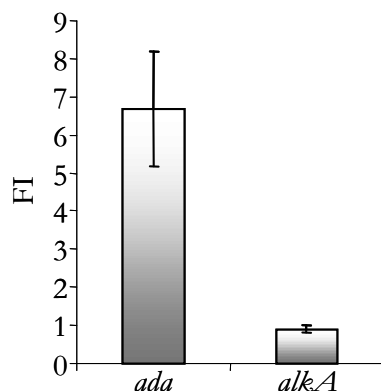


Figura 4.1. Anàlisi per RT-PCR quantitativa dels nivells d'inducció dels gens *ada* i *alkA* en la soca ATCC14028 *wt* en presència d'MNNG. Els valors d'FI calculats (mitja de 3 experiments independents) s'obtenen per comparació de l'expressió de cada gen en la soca ATCC14028 *wt* tractada amb 5 µg/ml d'MNNG respecte a la mateixa soca sense tractament. Els oligonucleòtids usats (*ada*RTsqD, *ada*RTsqR, *alkA*RTsqD i *alkA*RTsqR) estan descrits a la Taula 3.3.

4.2. Soques defectives en un gen de reparació d'alquilacions

4.2.1. Obtenció de mutants defectius en un gen de reparació d'alquilacions

Per a acomplir l'objectiu de conèixer en més detall el paper dels mecanismes de reparació d'alquilacions de *S. Typhimurium* durant el procés infectiu es va dissenyar un seguit de mutants defectius en algun gen de reparació d'alquilacions utilitzant com a base una soca tipus per a la realització d'assaigs de virulència, l'ATCC14028 *wt* de *S. Typhimurium*.

4.2.1.1. Disseny *in silico*

Els gens seleccionats per a la construcció dels mutants es descriuen a la Taula 4.1. *ada*, *alkA*, *alkB* i *aidB* corresponen als gens que integren la resposta Ada, mentre que els gens *ogt* i *tag* en són independents. En conjunt formen tots els gens descrits que reparen específicament lesions alquilants (Apartats 1.5 i 1.7).

Com es pot observar, els gens *ada* i *alkB* estan separats per tan sols 2 parells de bases, formant una mateixa unitat transcripcional [299]; així mateix, el gen *tag* està superposat en 23 pb amb el gen posterior, *yiaC*, que està localitzat en la posició 3.829.911 – 3.830.351 del genoma. Pel que fa a la resta de gens de la Taula 4.1, l'absència d'altres gens pròxims i d'igual orientació en el seu entorn indica que formen unitats monocistròniques.

Taula 4.1. Gens de reparació d'alquilacions delecionats per inactivació gènica.

Gen	Funció	Coordenades cromosòmiques	Coordenades d'inserció/deleció *
<i>ada</i>	O ⁶ -meG MTasa I	2.364.195 – 2.363.134	2.364.100 – 2.363.219
<i>alkA</i>	3-meA-DNA glicosilasa II	2.212.357 – 2.211.488	2.212.275 – 2.211.567
<i>alkB</i>	1-meA/3-meC DNA dioxigenasa	2.363.131 – 2.362.481	2.363.047 – 2.362.560
<i>aidB</i>	superfamília de les acil-coA deshidrogenases	4.619.614 – 4.621.236	4.619.689 – 4.621.161
<i>ogt</i>	O ⁶ -meG MTasa II	1.753.663 – 1.754.178	1.753.759 – 1.754.101
<i>tag</i>	3-meA-DNA glicosilasa I	3.829.352 – 3.829.933	3.829.449 – 3.829.841

* Regió delecionada en el moment de la inserció de la casset de resistència.

4.2.1.2. Comprovació per RT-PCR de la unitat transcripcional *tag – yiaC*

La proximitat entre els gens *ada* i *alkB* i la seva condició d'unitat transcripcional descrita prèviament [299] suposava un inconvenient alhora d'inserir una casset de resistència antibiòtica en el gen *ada*, ja que s'alteraria el patró d'expressió del gen *alkB*. Els possibles efectes sobre el fenotip degudes a aquesta alteració podrien interferir en els estudis posteriors realitzats amb la soca deficient en el gen *ada*.

La superposició observada entre els gens *tag* i *yiaC* feia molt probable que ambdós constituïssin també una unitat transcripcional, de manera que en aquest cas es podia aplicar el mateix raonament que en els gens *ada* i *alkB*. Atès que no hi ha cap descripció referent a una unitat transcripcional *tag – yiaC* calia verificar si realment era així abans de construir una soca deficient en el gen *tag*.

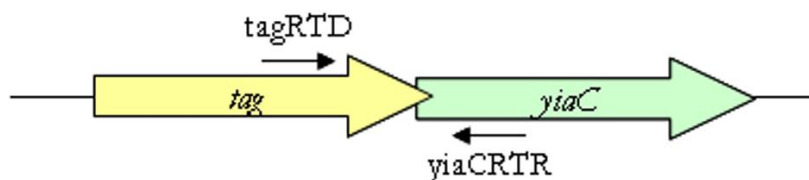


Figura 4.2. Localització cromosòmica dels gens *tag* i *yiaC*. Ambdós gens se superposen en 23 pb. Amb fletxes negres es representa la posició dels oligonucleòtids usats per a la RT-PCR.

En el cas de formar part d'una mateixa unitat transcripcional hi hauria síntesi d'un mRNA policistrònic que contingués els dos gens, de manera que l'ús dels oligonucleòtids indicats a la Figura 4.2 (descrits a la Taula 3.3) en una RT-PCR utilitzant com a motlle l'RNA total de la soca ATCC14028 *wt* crescuda en condicions no lesives amplificaria un fragment de DNA visible en un gel d'electroforesi. En canvi, si els gens *tag* i *yiaC* formessin unitats monocistròniques individuals no seria possible l'obtenció de cap banda.

Com es pot observar a la Figura 4.3 es va corroborar la presència d'RNA policistrònic amb l'obtenció d'una banda de la mida corresponent i d'intensitat similar a la del control positiu, que consistia en una reacció d'RT-PCR idèntica a l'anterior però utilitzant com a motlle DNA cromosòmic de la soca ATCC14028 *wt*.

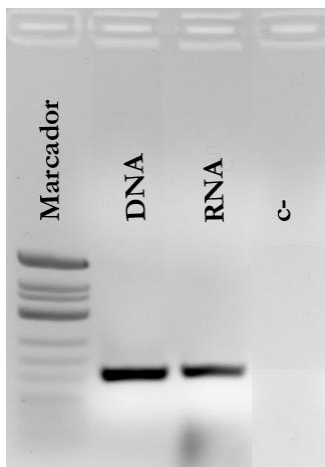


Figura 4.3. RT-PCR de la unitat transcripcional *tag - yiaC*. Les tres mostres es diferencien en el motlle utilitzat: en el control positiu (rotulat com a “DNA”) va emprar-se DNA cromosòmic de la soca ATCC14028 *wt*, en la mostra problema (“RNA”) es va usar RNA total extret de la mateixa soca i en el control negatiu (“c-”) no es va afegir cap àcid nucleic. El marcador de pes molecular correspon a ϕ X174 digerit amb *HinfI*.

4.2.1.3. Construcció de soques defectives en un gen de reparació d'alquilacions

Després d'escollir els gens a deleccionar (Taula 4.1) i estudiar el seu entorn es va decidir construir soques amb els següents genotips: Δada , $\Delta alkA::Cm$, $\Delta alkB::Cm$, $\Delta aidB::Cm$, $\Delta ogf::Cm$ i Δtag . L'obtenció dels mutants es va realitzar seguint el protocol d'inactivació gènica en un pas utilitzant la soca ATCC14028 *wt* pKOBEGA (Taula 3.1). En tots els gens deleccionats es va inserir la casset de resistència a cloramfenicol codificada en el plasmidi pKD3. Com es pot observar en l'última columna de la Taula 4.1, les regions d'homologia necessàries per a la recombinació i introducció de la casset es van dissenyar de manera que es deleccionés gran part de cada gen, de manera que si calia escindir la casset de resistència no es revertís al genotip salvatge.

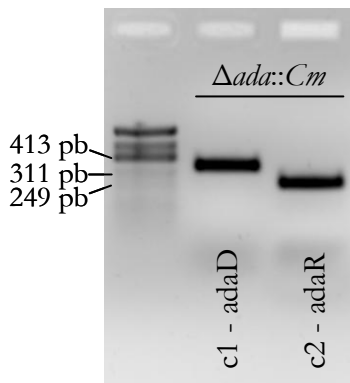


Figura 4.4. Comprovació de la inactivació en un pas del gen *ada* utilitzant oligonucleòtids interns de la casset. Com s'indica a la part superior es va usar com a motlle el DNA del mutant $\Delta ada::Cm$. Per a les reaccions van emprar-se els oligonucleòtids interns de la casset (c1 i c2) junt amb *adaD* i *adaR* (pertanyents al gen diana), emparellant-los com es mostra a la part inferior de la figura. El marcador de pes molecular correspon a $\phi X174$ digerit amb *HinfI*.

Un cop introduït el fragment lineal en la soca receptora es va seleccionar els clons que haguessin incorporat la casset de resistència a cloramfenicol, que van ser confirmats per PCR. A la Figura 4.4 es posa com a exemple la comprovació de la inserció de la casset en el gen *ada* utilitzant les combinacions c1 – *adaD* i c2 – *adaR*, que permeten verificar si el fragment està orientat correctament en el gen mitjançant l'ús dels oligonucleòtids interns de la casset (c1 i c2). Per a la resta de soques mutants es mostra tan sols la comprovació de la mutació utilitzant els oligonucleòtids directe i revers del gen diana (Figura 4.5).

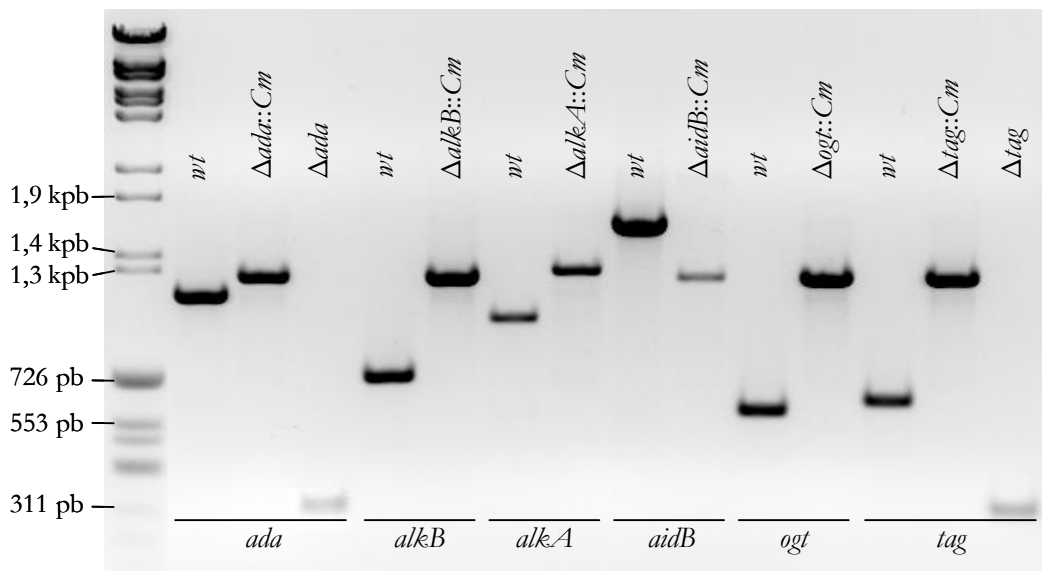


Figura 4.5. Comprovació per PCR de les soques defectives en un gen de reparació d'alquilacions. La PCR es va realitzar amb els oligonucleòtids corresponents en funció del gen diana i es va visualitzar en un gel d'electroforesi a l'1% d'agarosa. A les parts superior i inferior de la figura s'indica la procedència del DNA motlle utilitzat i el gen analitzat, respectivament. El primer carril correspon al marcador de pes molecular compost d'una mescla dels DNAs del fag λ digerit amb *BstEII* i del $\phi X174$ digerit amb *HinfI*. Els controls negatius de la reacció de PCR per cada parella d'oligonucleòtids no es mostren a la figura vist que cap d'ells presentava bandes d'amplificació.

Com que la casset de resistència a Cm està codificada a la cadena complementària i el seu sentit de transcripció és contrari al del gen on s'insereix (Figura 3.2), en el cas de les soques $\Delta adu::Cm$ i $\Delta tag::Cm$ es podien donar efectes polars en els gens situats a 3' del gen mutant. És per aquest motiu que en ambdues soques es va realitzar un pas addicional (Apartat 3.2.2.10.6) per escindir la casset introduïda. L'escissió va ser confirmada de nou per PCR utilitzant els oligonucleòtids directe i revers del gen diana (Figura 4.5). En tots els casos les mutacions van ser comprovades per seqüenciació.

4.2.1.4. Comprovació per RT-PCR quantitativa de la unitat transcripcional *tag - yiaC*

Per confirmar que l'escissió de la casset de cloramfenicol de la soca $\Delta tag::Cm$ evitava que es donessin efectes polars gràcies a la recuperació dels nivells transcripcionals habituals del gen *yiaC* (situat a 3' de *tag*) es va utilitzar la tècnica d'RT-PCR quantitativa per comparar la seva expressió entre les soques *wt*, $\Delta tag::Cm$ i Δtag en condicions de creixement no lesives.

120 Va fer-se l'extracció de l'RNA de cada una de les soques i es va realitzar l'RT-PCR quantitativa utilitzant els oligonucleòtids adients (descrits a la Taula 3.3, secció *Oligonucleòtids per a RT-PCR quantitativa*). Els factors d'inducció es van calcular comparant els valors obtinguts per les parelles $\Delta tag::Cm - wt$ i $\Delta tag - wt$ (Figura 4.6).

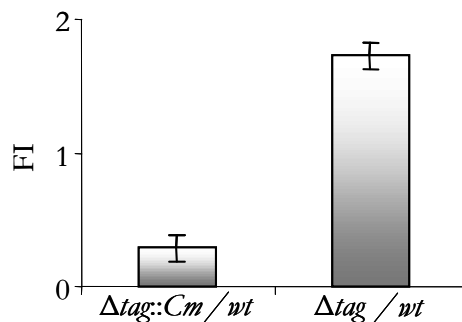


Figura 4.6. Anàlisi per RT-PCR quantitativa dels nivells d'inducció del gen *yiaC* en les soques $\Delta tag::Cm$ i Δtag respecte a la soca *wt*. En els tres casos es van utilitzar els oligonucleòtids *yiaCRTsqD* i *yiaCRTsqR*. Els valors d'FI calculats corresponen a la mitja de 3 experiments independents.

Com es pot observar, la inserció de la casset de resistència a cloramfenicol en el gen *tag* (soca $\Delta tag::Cm$) va comportar una disminució de l'expressió del gen *yiaC*; d'altra banda, l'escissió de la casset (soca Δtag) va suposar la recuperació de la seva expressió. Per

consegüent, es va decidir utilitzar la soca Δtag com a soca de treball i descartar el mutant $\Delta tag::Cm$.

4.2.2. Caracterització de les soques defectives en un gen de reparació d'alquilacions

Un cop obtingudes les soques de treball i abans d'efectuar assajos *in vivo* es va determinar les seves cinètiques de creixement en absència i en presència de diferents tipus de dany alquilant.

4.2.2.1. Corbes de creixement en absència de dany alquilant

En primer lloc es van realitzar corbes de creixement en medi AB suplementat amb 0,2% de glucosa i en absència d'agents alquilants per comprovar si alguna de les mutacions introduïdes suposava una alteració en la cinètica de creixement de les diferents soques que serien utilitzades posteriorment en els assajos *in vivo*. Com s'observa a la Figura 4.7, en aquestes condicions tots els mutants presentaven un creixement similar al de la *wt*.

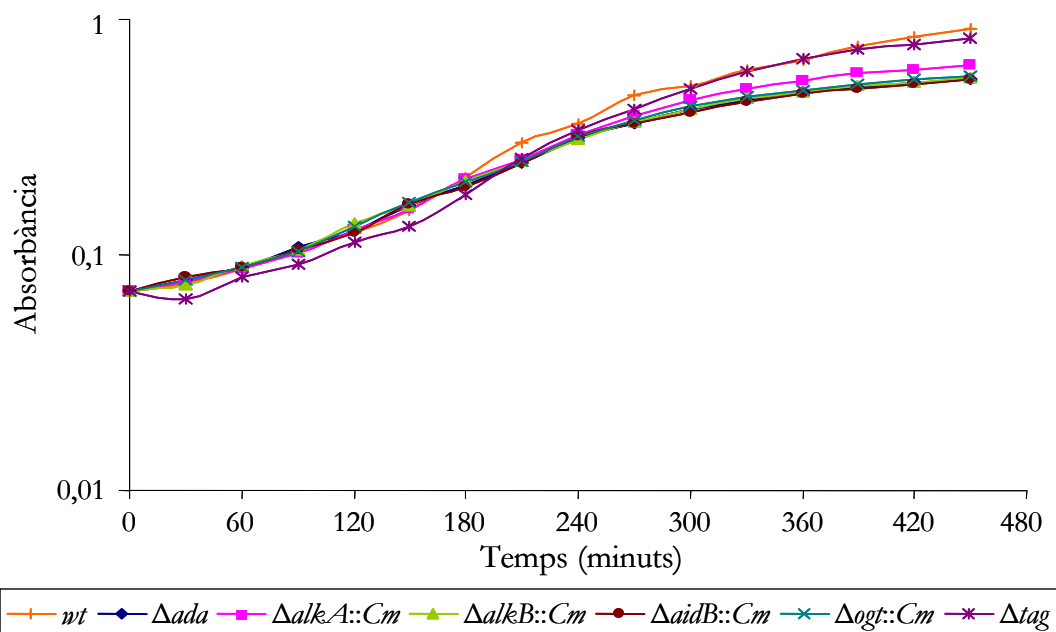
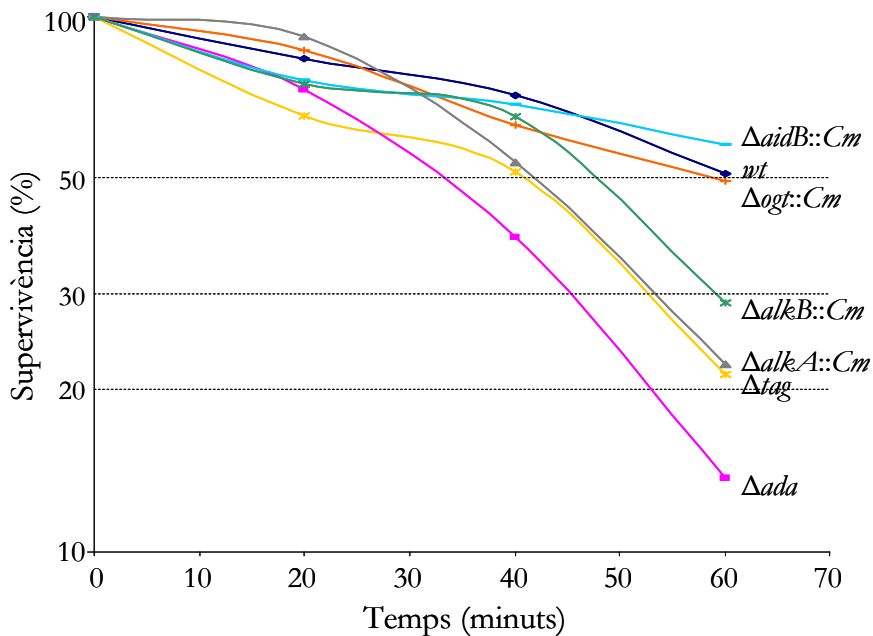


Figura 4.7. Corba de creixement de les soques mutants defectives en un gen de reparació d'alquilacions. Com a medi de cultiu es va utilitzar medi AB suplementat amb 0,2% de glucosa. Es va ajustar l'absorbància inicial de totes les soques a una DO_{420} aproximada de 0,07 i es van anar prenent mesures d'absorbància cada 30 min. Les dades corresponen a la mitja de 3 experiments independents i presenten una desviació típica màxima de 0,25 unitats d'absorbància.

4.2.2.2. Assaig de supervivència a MNNG en soques defectives en un gen de reparació d'alquilacions

En diversos apartats de la introducció s'ha descrit com l'exposició a MNNG té una clara acció mutagènica i citotòxica sobre la cèl·lula, especialment per la seva capacitat d'induir O-metilacions com l'O⁶-meG. Així doncs, aquelles soques defectives en algun gen involucrat en la reparació de lesions causades per aquest agent metilant haurien de presentar una disminució de la viabilitat cel·lular respecte a la soca *wt*.

A fi de comprovar el fenotip dels diferents mutants (Taula 4.1) es van realitzar assajos de supervivència en presència d'aquest agent metilant S_N1. Els resultats corresponen a la sembra de viables en diferents temps i es representen a la Figura 4.8.



122

Figura 4.8. Sensibilitat de les soques defectives en un gen de reparació d'alquilacions als efectes letals de l'MNNG. Es mostra la supervivència de les diferents soques en presència de 10 µg/ml d'MNNG. El percentatge de supervivència (corresponent a la mitja de 3 experiments independents) es calcula segons el recompte de viables en cada temps en relació a la concentració cel·lular en el moment inicial. Com a control es va utilitzar la soca ATCC14028 *wt*. La desviació típica màxima és del 15%.

La soca *Δada* va presentar la major sensibilitat a MNNG. En canvi, el mutant deficient en l'altra O⁶-meG MTasa codificada en el gen *ogt* es va comportar de manera similar a la soca *wt*, atès que el paper d'Ogt en *S. Typhimurium* està més relacionat amb la mutagènesi que no pas amb la supervivència cel·lular (veure l'Apartat 1.8.2) [388].

Malgrat el seu paper en la destoxicació de nitroguanidines com l'MNNG (Apartat 1.5.1), en el mutant $\Delta aidB::Cm$ tampoc es van observar diferències significatives respecte a la soca *wt*, ja fos perquè la seva absència va ser suplerta per l'activitat reparadora de la proteïna Ada, o bé per una disminució en la formació de productes intermedis mutagènics de la degradació de l'MNNG.

Les soques defectives $\Delta alkA::Cm$ i $\Delta tag::Cm$ van mostrar una susceptibilitat lleugerament inferior a la de la soca Δada . El fet de què ambdues presentessin una susceptibilitat a MNNG gairebé idèntica entre sí malgrat que la proteïna AlkA posseeixi un espectre d'actuació més ampli que Tag (la qual només repara N³-metilpurines, veure la Taula 1.1) podria indicar que aquest agent metilant només genera les lesions reconegudes tant per AlkA com per Tag. Per acabar, el mutant $\Delta alkB::Cm$ va presentar una sensibilitat moderada als efectes de l'MNNG [321], però no tanta com les soques $\Delta alkA::Cm$, $\Delta tag::Cm$ o Δada .

4.2.2.3. Assaig de supervivència a MMS en soques defectives en un gen de reparació d'alquilacions

Seguint amb la caracterització fenotípica de les diferents soques mutants (Taula 4.1) es va comprovar la seva viabilitat al ser exposades a dosis letals d'MMS, el qual té efectes essencialment citotòxics donada la seva naturalesa N-metiladora (Figura 4.9).

123

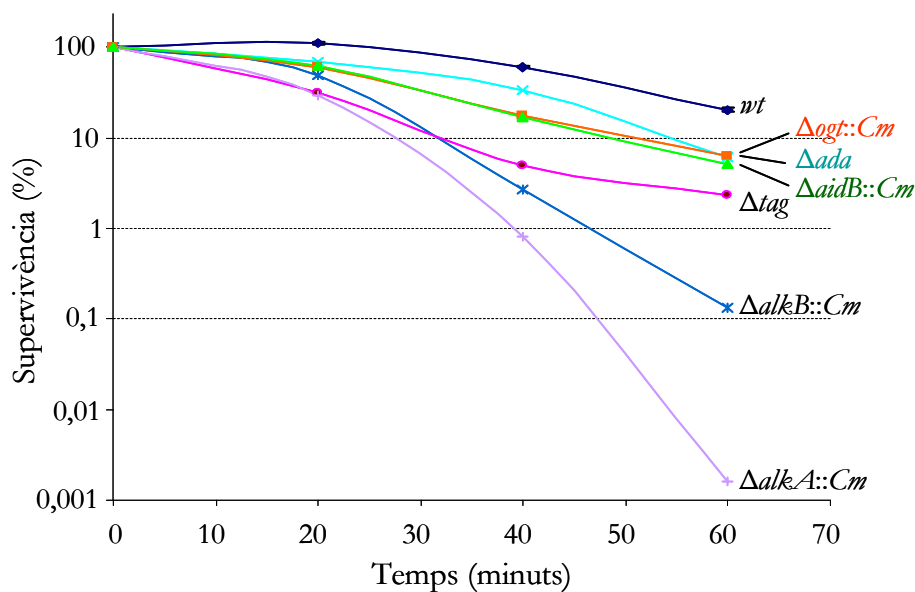


Figura 4.9. Sensibilitat de les soques defectives en un gen de reparació d'alquilacions als efectes letals de l'MMS. A la figura s'indica la supervivència de les diferents soques al ser exposades a MMS 0,1%. El percentatge de supervivència es calcula segons el recompte de viables en cada temps en relació a la concentració cel·lular inicial. Com a control es va utilitzar la soca ATCC14028 *wt*. Les dades corresponen a la mitja de 3 experiments independents i presenten una desviació típica màxima del 10%.

Atès que aquest agent metilant S_N2 indueix lesions 1-meA i 3-meC en ssDNA, que són reparades per la proteïna AlkB, el defecte d'aquesta va comportar un increment important de la sensibilitat a MMS. Els mutants Δada , $\Delta ogt::Cm$ i $\Delta aidB::Cm$, per contra, van presentar tan sols una lleugera disminució de la viabilitat respecte a la soca *wt*. Aquest resultat era previsible en els mutants deficientes en reparació d'O⁶-meG ja que l'MMS, al ser un agent S_N2 , gairebé no és capaç de produir O-metilacions. En el cas de la soca Δtag es va observar una sensibilitat major que en les tres anteriors, ja que la seva diana de reparació (la N³-A) és una posició molt reactiva metilada per la majoria d'agents alquilants. La soca $\Delta alkA::Cm$ va mostrar la major sensibilitat a MMS, com havia estat descrit anteriorment en la bibliografia [110, 243], i la diferència de mortalitat observada respecte a la soca deficient en Tag podria explicar-se si aquest agent metilant generés eficientment altres lesions també reconegudes per la proteïna AlkA però no per Tag.

4.2.3. Assaig *in vivo* dels mutants defectius en un gen de reparació d'alquilacions

A partir dels resultats observats en els dos apartats anteriors (4.2.2.2 i 4.2.2.3) es va concloure que, encara que *S. Typhimurium* no posseeixi una resposta Ada com la present en altres microorganismes, els quatre gens que la formen segueixen sent funcionals i la seva manca comporta una baixada en la viabilitat cel·lular davant d'agents alquilants. Pel que respecte a la importància de les proteïnes independents de la resposta Ada, la presència de Tag també va demostrar ser important per a la supervivència cel·lular; mentre que la importància d'Ogt radicaria en la protecció contra la fixació de mutacions [388].

124

Tots aquests assajos *in vitro* havien permès estudiar en cada soca l'impacte de la manca d'una proteïna de reparació a l'exposició a un determinat agent alquilant. Per a acomplir els objectius de la present Tesi Doctoral i definir la importància del dany alquilant durant el cicle infectiu de *S. Typhimurium* era necessari també portar a terme assajos de competitivitat *in vivo* per analitzar la capacitat infectiva de les diferents soques. L'aplicació d'aquests assaigs és possible gràcies a les observacions realitzades per alguns autors sobre les característiques de la infecció de *S. Typhimurium* en animals [109, 196]. Sembla ser que, durant el procés infectiu, cada clon es comporta de manera independent: una cèl·lula bacteriana que infecti un macròfag, o una cèl·lula hepàtica, etc, serà independent d'altres cèl·lules bacterianes que estiguin infectant altres cèl·lules de l'hoste [314]. Encara més, rarament es troba dues cèl·lules bacterianes diferents infectant la mateixa cèl·lula de l'hoste [26]. L'actuació del sistema immune sobre un focus d'infecció determinat no augmenta la probabilitat d'actuar sobre un altre excepte en casos molt concrets [314]. De fet, la infecció es podria comparar amb una cursa entre els focus d'infecció i el sistema immune, en què la infecció continua sempre que hi hagi cèl·lules bacterianes que escapin de la zona on està actuant el sistema immune i que aconseguixin colonitzar i formar nous focus d'infecció. Dit d'una altra manera, seran aquelles cèl·lules que tinguin major

eficiència dividint-se i escapant per generar focus d'infecció llunyans a la zona on es troba actuant el sistema immune les que sobreviuran i prosseguiran amb la infecció [198]. Per tant, en cas de què un hoste fos infectat per dues soques bacterianes diferents, les dues infeccions serien totalment independents entre sí, atès que el creixement de les cèl·lules bacterianes també ho és. No es produirà el desplaçament d'una infecció per l'altra, ni el sistema immune reconeixerà més una soca per culpa de l'altra, ni hi haurà competència directa per l'espai ni els nutrients [195]. És a dir, que el valor de l'índex de competitivitat no implica que una soca hagi desplaçat a l'altra durant la infecció, sinó només que la seva capacitat infectiva ha estat superior i, per tant, la seva presència en les etapes finals de la infecció ha estat també major.

4.2.3.1. Índex de competitivitat de les soques UA1871 i UA1872

En tots els assajos *in vivo* que es van realitzar, tant en aquest apartat com en els posteriors, es va calcular l'IC de les soques mutants d'alquilacions en relació a la soca *wt*.

Abans de començar amb aquests assajos *in vivo* es van realitzar proves pilot amb dues soques control pertanyents a la col·lecció del laboratori (Taula 3.1): la soca UA1872, a la qual se li havia introduït la casset de resistència a cloramfenicol en una regió intergènica i, per tant, no hauria de presentar canvis en la seva capacitat infectiva; i la soca UA1871 ($\Delta recA::Km$), que havia estat descrita prèviament en la bibliografia com a avirulenta [29].

125

L'assaig de competitivitat *in vivo* s'inicia des d'una suspensió composta teòricament d'un 50% de soca *wt* i un 50% de la soca problema. Partint d'aquesta premissa, durant el disseny de l'experiment es va calcular que la mida mostral necessària per a obtenir resultats estadísticament significatius era de 6 ratolins si s'establia que, inoculant aquesta suspensió, només una recuperació menor del 20% o major del 80% de la soca mutant respecte a la *wt* podria indicar un canvi significatiu en la seva capacitat virulenta (sempre sotmès a l'aplicació del test estadístic). Qualsevol resultat comprès entre el 20% i el 80% seria considerat directament no significatiu, ja que en cas de voler disminuir aquest rang s'hauria d'augmentar la mida mostral per donar potència estadística al test. Aquests valors equivaldrien a un IC menor de 0,25 o major de 4, respectivament. Naturalment, aquests valors, que no tenen en compte la dispersió de les dades, es van establir tan sols com a orientació i es van supeditar a l'estadístic usat, el qual es va aplicar posteriorment.

Els resultats obtinguts de la inoculació per via oral dels mutants UA1872 i UA1871 es mostren a la Figura 4.10. La soca UA1872 va presentar clarament una dispersió al voltant d'1 amb l'excepció de dos punts. Respecte a la soca atenuada UA1871, no es va recuperar cap clon mutant en cinc de les sis mostres, obtenint un valor d'IC per cada una d'elles menor de 0,01. La mitja geomètrica de l'IC de la soca UA1871 es va calcular suposant un valor de 0,01 per aquestes cinc mostres, per consegüent, el seu veritable valor serà menor

que l'indicat a la Figura 4.10. Òbviament, la soca UA1871 presentava diferències significatives respecte a la soca *wt* amb un valor *p* molt inferior a 0,01.

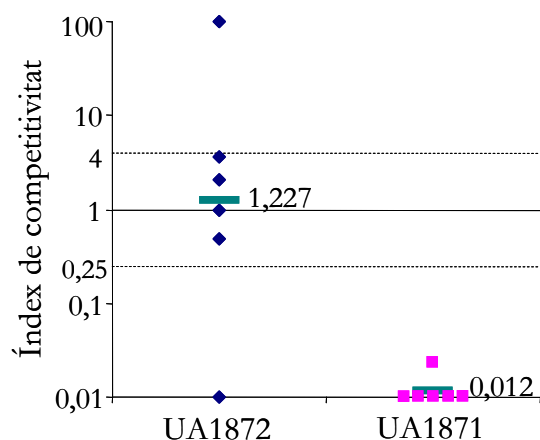


Figura 4.10. Assaig de competitivitat entre la soca ATCC14028 *wt* i els mutants UA1872 (casset de resistència a regió intergènica) i UA1871 ($\Delta recA::Km$). En cada cas es van inocular 6 ratolins oralment amb la mateixa proporció de soca *wt* que de mutant. A l'eix d'abscisses es mostra la soca mutant utilitzada en cada assaig. Cada punt representa el valor d'IC obtingut en un ratolí, i les barres horitzontals indiquen la mitja geomètrica de l'IC per cada experiment, el valor de la qual està anotat al costat. Com a orientació es delimita amb dues línies discontinües la zona on els valors d'IC no són considerats significativament diferents.

4.2.3.2. Índex de competitivitat dels mutants defectius en un gen de reparació d'alquilacions

A continuació van realitzar-se assajos de competitivitat amb les soques mutants caracteritzades a l'Apartat 4.2.2 per determinar la contribució a la virulència de cada un dels gens de reparació d'alquilacions delecionats. Tots els mutants van ser inoculats juntament amb la soca *wt* tant per via oral com ip. La via oral simula el procés infecciós natural de *S. Typhimurium*, ja que el patògen travessa l'aparell digestiu, de manera que haurà de fer front al pH estomacal, envair l'epiteli intestinal, sobreviure al procés inflamatori i a la fagocitosis per cèl·lules del sistema immunitari, etc (veure l'Apartat 1.1.3). Finalment *S. Typhimurium* accedirà al torrent sanguini, des d'on es dispersarà fins a diferents òrgans. La inoculació ip, en canvi, introdueix l'inòcul directament en la cavitat intraperitoneal, on el sistema immunitari innat detectarà el patògen i induirà una resposta inflamatòria gràcies a l'alliberació de citocines com l'interleucina-8 [379]. En el procés seran atretes cèl·lules immunes, com macròfags i leucòcits polimorfonuclears [196], que fagocitaran cèl·lules bacterianes, les quals aprofitaran el trànsit cel·lular sistèmic del sistema immunitari per a disseminar-se per l'organisme i arribar als òrgans. Així doncs, el

procés infectiu per la via ip és de més curta durada que per la via oral ja que evita els primers estadis de la infecció.

Per cada un dels IC a realitzar es va preparar una suspensió composta d'un 50% de la soca *wt* i un 50% del mutant a estudiar a la concentració cel·lular adient segons la via d'inoculació a seguir (Apartat 3.2.5.1).

La Figura 4.11 mostra els valors d'IC obtinguts per cada un dels 6 ratolins corresponents a la inoculació ip de cada soca mutant amb la *wt*. Els resultats de les inoculacions orals no es representen a la figura per presentar un patró similar, si bé amb major dispersió, a l'observat en la via ip. Cap de les soques va presentar diferències estadísticament significatives amb referència a la soca *wt*. Les soques Δada , $\Delta ogt::Cm$, $\Delta alkA::Cm$ i Δtag van presentar una mitja geomètrica dels valors d'IC compresa en la zona de resultats estadísticament no significatius. Els mutants $\Delta alkB::Cm$ i $\Delta aidB::Cm$, en canvi, van obtenir una mitja superior a 4 per la presència d'alguns valors molt desviats, tot i que cap dels dos era significativament diferent a la soca *wt*.

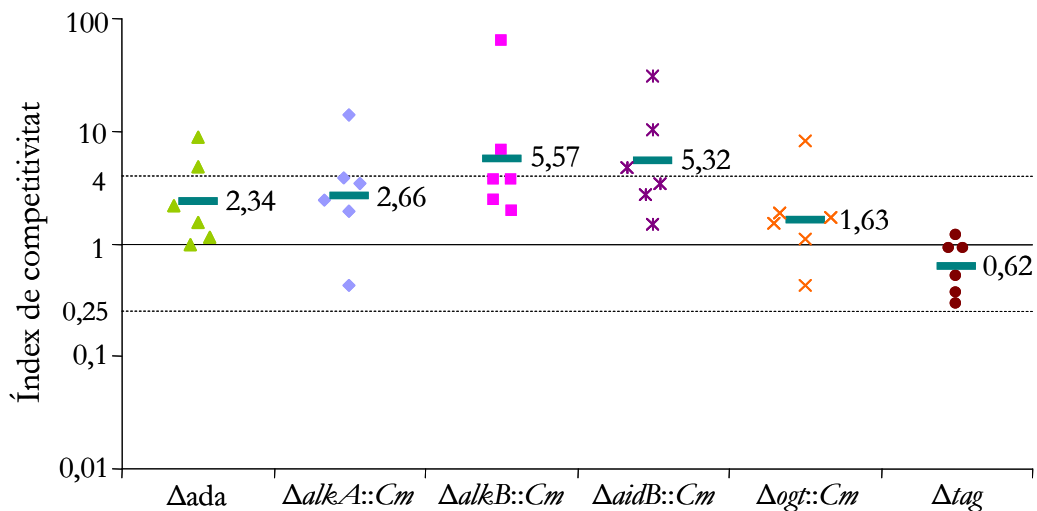


Figura 4.11. Assaig de competitivitat entre la soca ATCC14028 *wt* i els mutants defectius en un gen de reparació d'alquilacions. En cada cas es van inocular 6 ratolins per via ip amb la mateixa proporció de soca *wt* que de mutant. A l'eix d'abscisses es mostra la soca mutant utilitzada en cada assaig. Cada punt representa el valor d'IC obtingut en un ratolí, i les barres horitzontals indiquen la mitja geomètrica de l'IC per cada experiment, el valor de la qual està anotat al costat. Com a orientació es delimita amb dues línies discontinües la zona on els valors d'IC no són considerats significativament diferents.

4.3. Mutants defectius en dos gens de reparació d'alquilacions

4.3.1. Obtenció de mutants defectius en dos gens de reparació d'alquilacions

Malgrat que les proves realitzades *in vitro* demostraven que la deficiència en alguns dels gens de reparació d'alquilacions augmentava la sensibilitat a diferents agents alquilants, els resultats dels assajos *in vivo* no van revelar una atenuació de la capacitat virulenta respecte a la soca *wt*. Atès que algunes de les lesions alquilants poden ser reconegudes per més d'una proteïna de reparació, especialment en el cas de les parelles de proteïnes homòlogues Ada/Ogt i AlkA/Tag, es va tenir en compte la possibilitat de què la manca d'una d'elles fos suplerta per alguna altra proteïna de reparació. Per aquest motiu es va procedir a la construcció de soques mutants defectives en dos gens vinculats de reparació, les quals es detallen a l'apartat següent.

4.3.1.1. Disseny de soques mutants defectives en dos gens de reparació d'alquilacions

Amb la intenció d'augmentar la probabilitat d'obtenir soques amb una capacitat d'infecció reduïda es va plantejar el disseny de les parelles de gens a deleccionar en funció de les característiques de cada proteïna de reparació (Taula 4.1). Finalment es va construir:

128

- Una soca deficient en l'activitat O⁶-alquilguanina alquiltransferasa (AGT): UA1839 ($\Delta ada \Delta ogt::Cm$).
- Un mutant deficient en l'activitat 3-meA-DNA glicosilasa: UA1842 ($\Delta alkA::Cm \Delta tag$).
- Una soca mutant deficient en els gens de reparació d'alquilacions independents de la resposta Ada: UA1844 ($\Delta ogt::Cm \Delta tag$).
- Atès que a la Figura 4.11 els mutants defectius en *ada* i *tag* van presentar la menor mitja geomètrica es va dissenyar el mutant UA1841 ($\Delta ada::Cm \Delta tag$), similar a més a la soca UA1844 al ser deficient en una AGT i en una 3-meA-DNA glicosilasa.

4.3.1.2. Transducció de les mutacions a noves soques

L'obtenció de les soques defectives en dos gens es va realitzar mitjançant el mètode de transducció utilitzant el bacteriòfag P22HT $int7$, que va permetre la transferència de les mutacions de les soques $\Delta ogt::Cm$, $\Delta alkA::Cm$ i $\Delta ada::Cm$ als mutants Δada i Δtag (Figura 4.12).

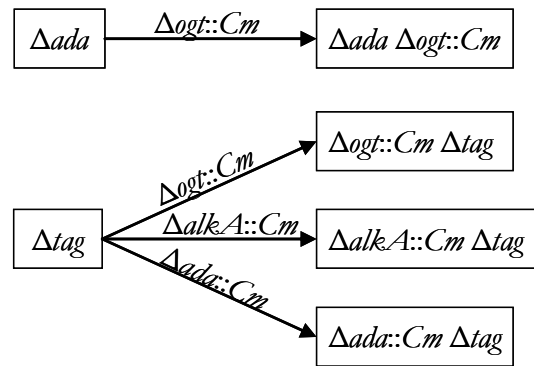


Figura 4.12. Diagrama de construcció de les soques deficientes en dos gens de reparació d'alquilacions. Amb fletxes s'uneixen les soques *parentals* amb les soques que en deriven, indicant en cada cas la mutació introduïda per transducció.

La incorporació de les noves mutacions va ser comprovada per PCR (Figura 4.13) utilitzant els oligonucleòtids adients (Taula 3.3) i mitjançant seqüenciació. Si bé no es mostra a la figura, la inserció de la casset també va ser visualitzada utilitzant els oligonucleòtids c1 i c2 tal com es va fer a l'Apartat 4.2.1.3.

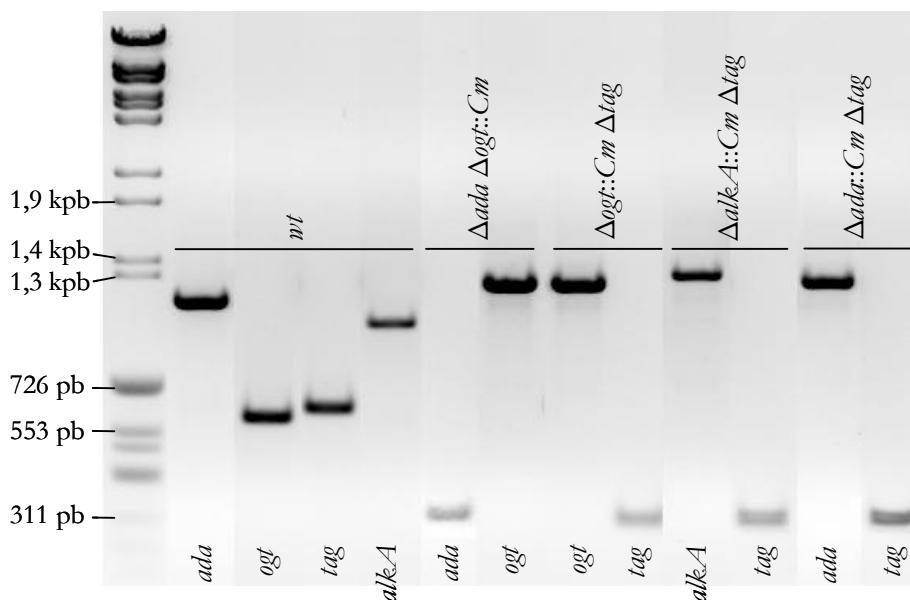
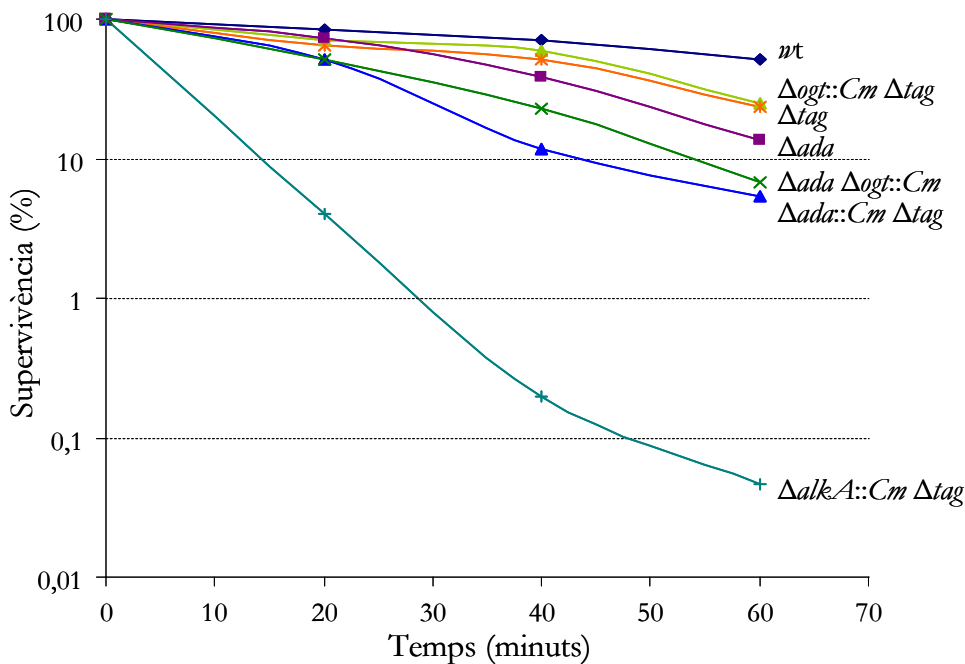


Figura 4.13. Comprovació per PCR de les soques defectives en dos gens vinculats amb la reparació d'alquilacions. La PCR es va realitzar amb els oligonucleòtids corresponents en funció del gen diana i es va visualitzar en un gel d'electroforesi a l'1% d'agarosa. A les parts superior i inferior de la figura s'indica la procedència del DNA motlle utilitzat i el gen analitzat, respectivament. El primer carril correspon al marcador de pes molecular compost d'una mescla dels DNAs del fag λ digerit amb *BstEII* i del φ X174 digerit amb *HinfI*. Els controls negatius de la reacció de PCR per cada parella d'oligonucleòtids no es mostren a la figura vist que cap d'ells presentava bandes d'amplificació.

4.3.2. Caracterització de les soques mutants defectives en dos gens de reparació d'alquilacions

Les noves soques construïdes a l'apartat anterior van ser caracteritzades *in vitro* mitjançant assajos de supervivència cel·lular en presència dels agents alquilants MNNG o MMS.

A la Figura 4.14 es mostra la sensibilitat de les diferents soques al ser tractades amb 10 µg/ml d'MNNG. La soca $\Delta alkA::Cm \Delta tag$, amb una diferència de fins a tres ordres de magnitud respecte a la soca *wt*, va presentar la major sensibilitat a aquest agent metilant com a conseqüència de l'absència de les dues DNA glicosilases capaces de reconèixer la lesió a la posició N³ de l'adenina, una de les dues posicions més reactives del DNA i reconeguda per la majoria d'agents alquilants.



130

Figura 4.14. Sensibilitat de les soques defectives en dos gens vinculats amb la reparació d'alquilacions als efectes letals de l'MNNG. Es mostra la supervivència de les diferents soques al ser tractades amb 10 µg/ml d'MNNG, a més, s'inclouen les corbes dels mutants Δada i Δtag de la Figura 4.8 com a referència. El percentatge de supervivència (corresponent a la mitja de 3 experiments independents) es calcula segons el recompte de viables en cada temps en relació a la concentració cel·lular en el moment inicial. Com a control es va utilitzar la soca ATCC14028 *wt*. La desviació típica màxima és del 15%.

Les combinacions del gen *ada* amb cada un dels gens independents de la resposta Ada ($\Delta ada \Delta ogt::Cm$ i $\Delta ada::Cm \Delta tag$) van donar un resultat similar entre sí, presentant una supervivència gairebé un ordre de magnitud menor que la soca *wt*. En el cas de la soca

$\Delta ada \Delta ogt::Cm$, el mutant defectiu només en *ogt* no havia presentat diferències amb la soca *wt* (Figura 4.8), però l'eliminació de les dues O^6 -meG MTases va resultar en una disminució de la viabilitat major que en el mutant deficient només en el gen *ada*, tal com s'havia descrit anteriorment [388]. Per altra banda, la soca $\Delta ogt::Cm \Delta tag$ va comportar-se igual que la soca Δtag (Figura 4.14), ja que en els dos casos no era *Ogt* sinó *Ada* la O^6 -meG MTasa rellevant.

La Figura 4.15 representa els resultats de supervivència de les mateixes soques a l'exposició a 0,1% d'MMS. De nou, la soca $\Delta alkA::Cm \Delta tag$ va presentar la major disminució de la supervivència (més d'un ordre de magnitud menys que $\Delta alkA::Cm$), arribant al 100% de mortalitat en l'últim temps mostrejat. Les soques $\Delta ada \Delta ogt::Cm$ i $\Delta ogt::Cm \Delta tag$ van presentar una sensibilitat major que qualsevol de les soques defectives en *ada*, *ogt* o *tag*, però encara menor que la que havia mostrat la soca $\Delta alkB::Cm$.

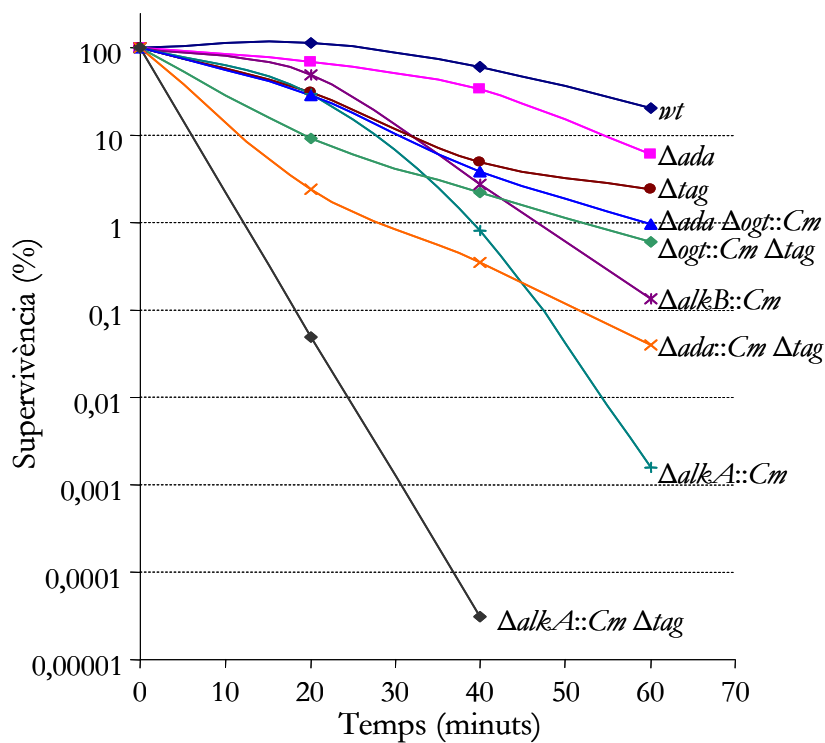


Figura 4.15. Sensibilitat de les soques defectives en dos gens vinculats amb la reparació d'alquilacions als efectes letals de l'MMS. A la figura s'indica la supervivència de les diferents soques en presència d'MMS 0,1%, incloent a més les corbes dels mutants Δada , Δtag , $\Delta alkB::Cm$ i $\Delta alkA::Cm$ de la Figura 4.9 com a referència. El percentatge de supervivència es calcula segons el recompte de viables en cada temps en relació a la concentració cel·lular inicial. Com a control es va utilitzar la soca ATCC14028 *wt*. Les dades corresponen a la mitja de 3 experiments independents i presenten una desviació típica màxima del 10%.

Malgrat que la mortalitat en la soca $\Delta ogf::Cm \Delta tag$ corresponia aproximadament al producte dels efectes detrimentals de cada deleció, la sensibilitat del mutant deficient en *ada* i *tag* va ser molt superior que la combinació dels efectes deleteris de cada una de les delecions (Figura 4.15), segurament a causa d'una disminució en els nivells cel·lulars de les proteïnes AlkA i AlkB, ambdues importants en la reparació de lesions causades per MMS (Figura 4.9).

4.3.3. Índex de competitivitat dels mutants defectius en dos gens de reparació d'alquilacions

Un cop caracteritzades les soques defectives en dos gens descrites a l'Apartat 4.3.1.1 i demostrada l'existència d'activitats redundants en la reparació de lesions alquilants (especialment entre les proteïna AlkA i Tag) es va procedir a la determinació de la seva capacitat infectiva. Es va optar per realitzar totes les inoculacions per la via oral ja que el procés infectiu és més complet que per la via ip i permet distingir millor les possibles diferències entre les soques mutants i la *wt*.

132

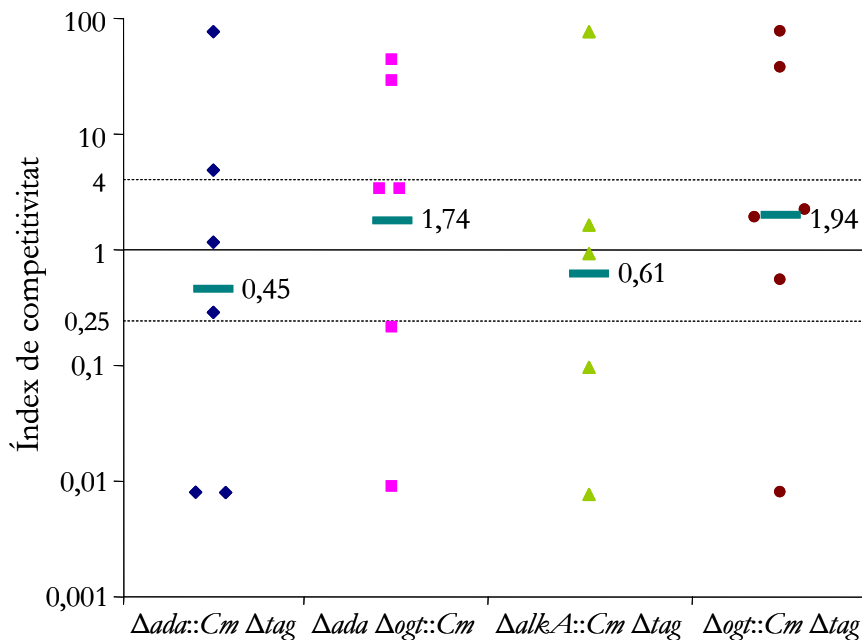


Figura 4.16. Assaig de competitivitat entre la soca ATCC14028 *wt* i diversos mutants defectius en dos gens vinculats amb la reparació d'alquilacions. En cada cas es van inocular 6 ratolins per via oral amb la mateixa proporció de soca *wt* que de mutant. A l'eix d'abscisses es mostra la soca mutant utilitzada en cada assaig. Cada punt representa el valor d'IC obtingut en un ratolí, i les barres horitzontals indiquen la mitja geomètrica de l'IC per cada experiment, el valor de la qual està anotat al costat. Com a orientació es delimita amb dues línies discontinües la zona on els valors d'IC no són considerats significativament diferents.

Com es pot observar a la Figura 4.16, els valors d'IC obtinguts en l'assaig de les soques defectives en dos gens de reparació d'alquilacions van presentar una gran dispersió, tanmateix, les mitges geomètriques calculades per totes quatre soques van quedar compreses dins de la regió de resultats considerats no significatius.

4.4. Soques defectives en múltiples gens de reparació d'alquilacions

4.4.1. Obtenció de mutants defectius en múltiples gens de reparació d'alquilacions

Els resultats obtinguts en els assajos *in vivo* van revelar que cap de les soques defectives en dos gens de reparació d'alquilacions presentava una disminució de la capacitat infectiva. Per aquest motiu es va optar per la construcció de noves soques defectives en un número major de gens, augmentant així la sensibilitat del bacteri tant per l'eliminació d'altres possibles activitats redundants com per l'acumulació de lesions en el material genètic. Concretament es va obtenir (Figura 4.17):

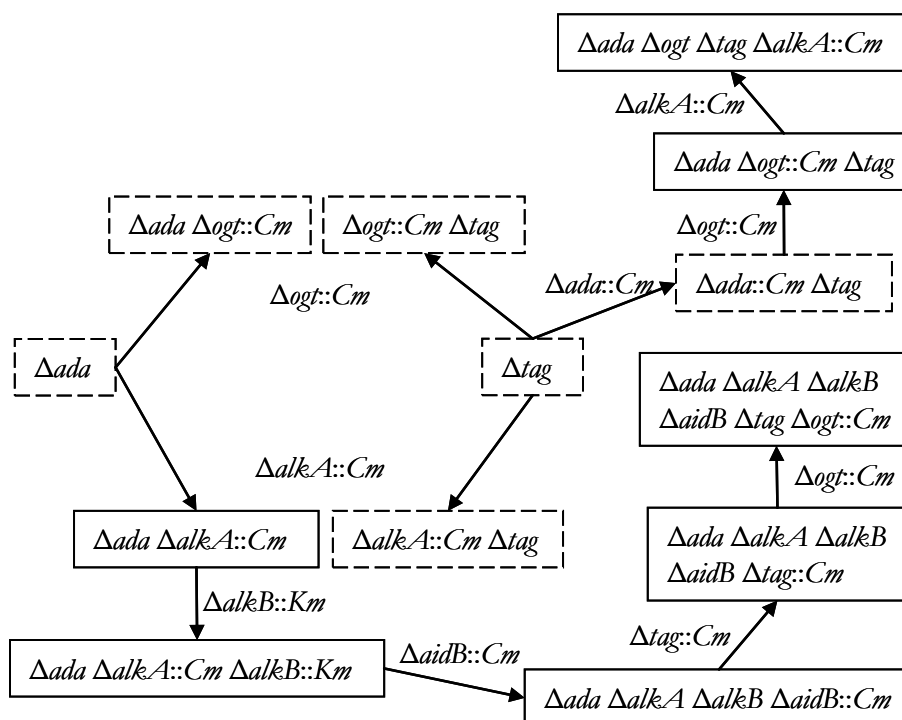


Figura 4.17. Diagrama del disseny de les soques mutants. Emmarcades amb línia discontinua s'indica les soques construïdes anteriorment i amb línia contínua els mutants obtinguts a l'Apartat 4.4.1. A través de fletxes s'uneix les soques *parentals* amb aquelles que en deriven, sent *Δada* i *Δtag* els mutants de partida. Al costat de cada fletxa es mostra la mutació que s'ha inserit per donar lloc a la nova soca mutant. Els marcadors transduïts provenen en tots els casos de les soques defectives en un únic gen.

- Un mutant defectiu en els gens vinculats a la resposta Ada: UA1850 ($\Delta ada \Delta alkA \Delta alkB \Delta aidB::Cm$). Per a la seva construcció va ser necessari obtenir prèviament les soques UA1837 ($\Delta ada \Delta alkA::Cm$) i després UA1846 ($\Delta ada \Delta alkA::Cm \Delta alkB::Km$).
- Una soca deficient en tots els gens específics de reparació d'alquilacions (Taula 4.1): UA1857 ($\Delta ada \Delta alkA \Delta alkB \Delta aidB \Delta tag \Delta ogt::Cm$).
- Un mutant deficient en els gens de reparació d'alquilacions independents de la resposta Ada (*ogt* i *tag*) i en l'activador transcripcional d'aquesta resposta (*ada*): UA1848 ($\Delta ada \Delta ogt::Cm \Delta tag$).
- Una soca defectiva en les activitats O⁶-meG MTasa i 3-meA-DNA glicosilasa: UA1852 ($\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta alkA::Cm$).

L'acumulació de mutacions en la majoria d'aquestes soques va realitzar-se pel mètode de transducció utilitzant el bacteriòfag P22HT $int7$. Abans de cada una de les transduccions va ser necessària l'escissió de la casset de resistència antibiòtica de la soca receptora, de manera que posteriorment pogués seleccionar-se la nova soca per la resistència incorporada en el nou marcador transduït. Els lisats fàgics utilitzats per les transduccions van ser obtinguts de les soques defectives en un únic gen. La introducció de les mutacions va seguir l'esquema que es mostra a la Figura 4.17.

134 L'única soca on no es va aplicar la transducció generalitzada va ser en la $\Delta ada \Delta alkA::Cm \Delta alkB::Km$, que es va construir pel mètode d'inactivació gènica en un pas (usat anteriorment per a la construcció dels mutants deficientes en un gen de reparació d'alquilacions) sobre la soca $\Delta ada \Delta alkA::Cm$ amb la introducció de la mutació en el gen *alkB*. El motiu és que els gens *ada* i *alkB* estan separats per tan sols 2 pb, de manera que els dos gens rarament no cotransdueixen junts, reduint extremadament la possibilitat d'obtenir la soca $\Delta ada \Delta alkA::Cm \Delta alkB::Km$ a partir d'una soca receptora amb genotip $\Delta ada alkB^+ \Delta alkA::Cm$ i una donadora $ada^+ \Delta alkB::Cm$. Per a la inactivació gènica es va dissenyar oligonucleòtids codificants per cues d'homologia situades fora de la regió del gen *ada*. En aquest cas es va utilitzar la casset de resistència a kanamicina codificada en el plasmidi pKD4 per ser introduïda directament en la soca $\Delta ada \Delta alkA::Cm$ sense necessitat de perdre la casset de resistència del gen *alkA*.

Totes les soques van ser verificades per PCR utilitzant els oligonucleòtids adients (Taula 3.3), així com per seqüenciació. La Figura 4.18 mostra la comprovació per PCR dels mutants que van ser utilitzats a continuació en els assajos de sensibilitat a agents metilants i d'IC, mentre que no s'inclouen les soques intermèdies del procés de transducció a les quals s'havia escindit la casset de resistència.

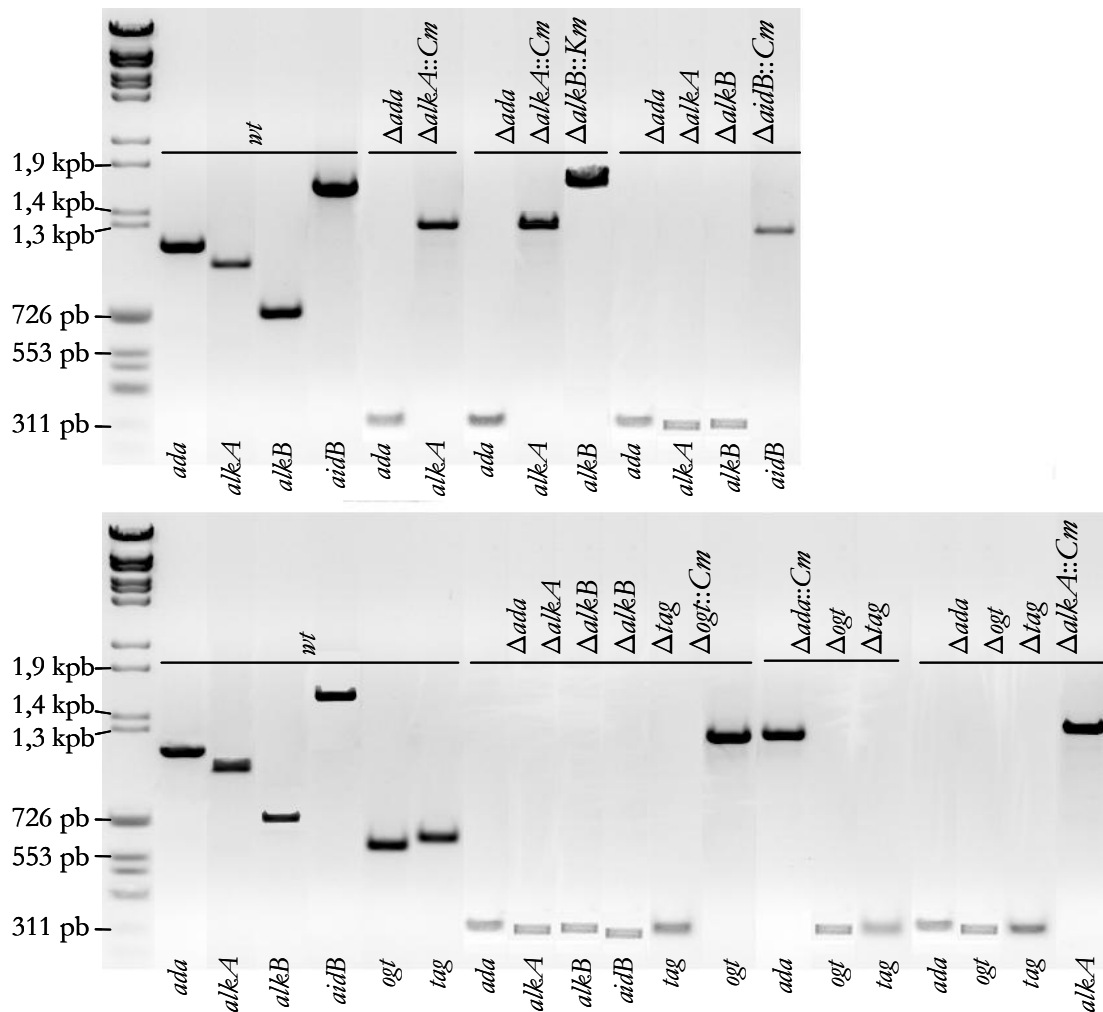


Figura 4.18. Comprovació per PCR de les soques defectives en múltiples gens de reparació d'alquilacions. La PCR es va realitzar amb els oligonucleòtids corresponents en funció del gen diana i es va visualitzar en dos gels d'electroforesi a l'1% d'agarosa. A les parts superior i inferior de cada porció de gel s'indica la procedència del DNA motlle utilitzat i el gen analitzat, respectivament. El primer carril correspon al marcador de pes molecular compost d'una mescla dels DNAs del fag λ digerit amb *BstEII* i del φ X174 digerit amb *HinfI*. Els controls negatius de la reacció de PCR per cada parella d'oligonucleòtids no es mostren a la figura vist que cap d'ells presentava bandes d'amplificació.

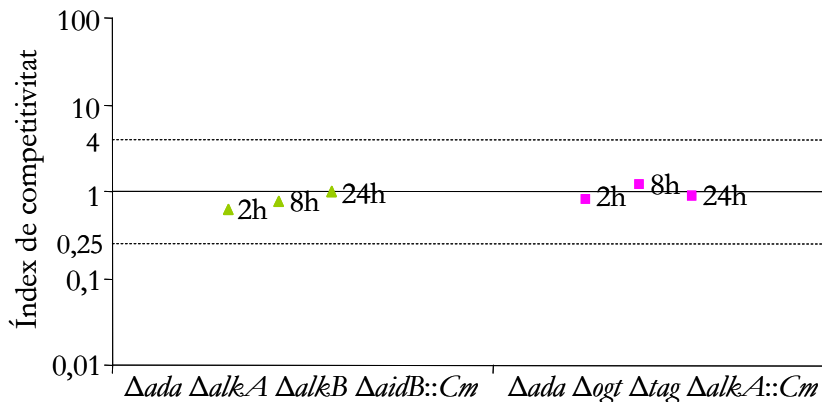
4.4.2. Caracterització de les soques mutants defectives en múltiples gens de reparació d'alquilacions

La caracterització *in vitro* de les soques construïdes a l'apartat anterior es va realitzar mitjançant assajos de supervivència en presència dels agents metilants MNNG i MMS. A més, es va portar a terme un assaig de competitivitat *in vitro* per verificar que la introducció de més de dues delecions no estava afectant la viabilitat cel·lular en condicions de creixement sense dany alquilant.

4.4.2.1. Índex de competitivitat *in vitro* de soques defectives en múltiples gens de reparació d'alquilacions

L'assaig de competitivitat *in vitro* és un estudi similar a una corba de creixement, on la soca *wt* i un mutant són incubats conjuntament en absència de dany alquilant i en què es calcula el valor d'IC a diferents temps. L'objectiu és determinar si l'acumulació de mutacions en una determinada soca pot causar algun tipus de defecte en la seva capacitat de creixement.

A diferència de l'IC *in vivo*, on cada valor correspon a un resultat obtingut en un ratolí, l'IC *in vitro* es calcula com la proporció de soca mutant en un determinat temps d'incubació respecte al moment inicial. La presa de mostres es va realitzar concretament a les 2 hores de l'inici de l'experiment (fase exponencial de creixement), a les 8 hores (fase estacionària) i a les 24 hores (cultiu saturat).



136

Figura 4.19. Assaig de competitivitat *in vitro* entre la soca ATCC14028 *wt* i els mutants $\Delta ada \Delta alkA \Delta alkB \Delta aidB::Cm$ i $\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta alkA::Cm$. En cada cas es va inocular en medi LB una mescla amb la mateixa proporció de la soca *wt* que de mutant, es va incubar i es va calcular el valor d'IC a les 2, 8 i 24 h. A l'eix d'abscisses s'indica la soca mutant utilitzada en cada experiment. Com a orientació es delimita amb dues línies discontinües la zona on els valors d'IC no són considerats significativament diferents. Els assaigs es van realitzar 3 vegades de manera independent i sense obtenir variacions en el resultat.

Cap de les soques assajades va presentar diferències significatives respecte a la soca *wt* en cap dels temps estudiats. La Figura 4.19 mostra els valors d'IC obtinguts per les soques UA1850 ($\Delta ada \Delta alkA \Delta alkB \Delta aidB::Cm$), deficient en la resposta Ada, i UA1852 ($\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta alkA::Cm$), deficient en les activitats O⁶-meG MTasa i 3-meA-DNA glicosilasa i en l'activador transcripcional de la resposta Ada.

4.4.2.2. Assajos de supervivència a agents metilants

El creixement en presència d'agents alquilants de les soques deficientes en múltiples gens vinculats amb la reparació d'alquilacions (Apartat 4.4.1) va ser caracteritzat en presència de 10 µg/ml d'MNNG i 0,1% d'MMS (Figures 4.20 i 4.21, respectivament).

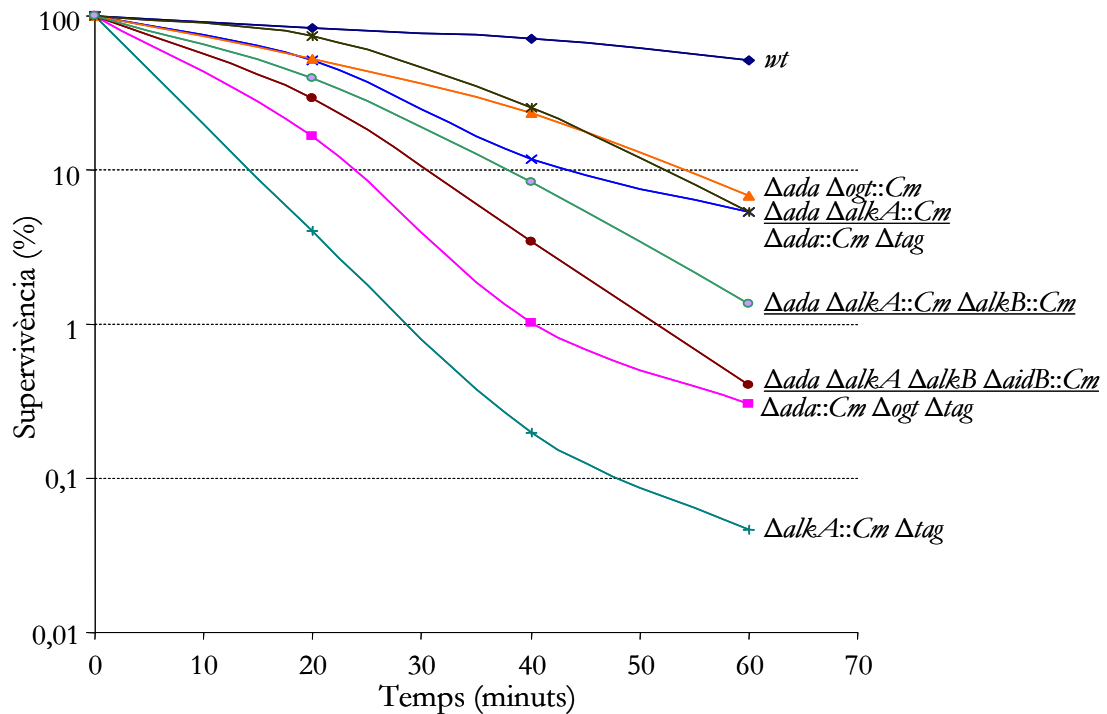


Figura 4.20. Sensibilitat de les soques defectives en múltiples gens de reparació d'alquilacions als efectes letals de l'MNNG. Es mostra la supervivència de les diferents soques al ser exposades a 10 µg/ml d'MNNG, a més, s'inclouen les corbes dels mutants *Δada Δogt::Cm*, *Δada::Cm Δtag*, i *ΔalkA::Cm Δtag* de la Figura 4.14 com a referència. Se subratlla les soques defectives en gens de la resposta Ada per destacar l'augment de la sensibilitat en relació al número de mutacions. El percentatge de supervivència (corresponent a la mitja de 3 experiments independents) es calcula segons el recompte de viables en cada temps en relació a la concentració cel·lular en el moment inicial. Com a control es va utilitzar la soca ATCC14028 *wt*. La desviació típica màxima és del 15%.

En tots dos casos es pot apreciar com l'acumulació de mutacions va acompanyada d'un augment en la sensibilitat als agents alquilants, especialment en el cas de les soques mutants deficientes en gens de la resposta Ada.

La sensibilitat de la soca *Δada ΔalkA::Cm* va ser molt similar a la de la soca *Δada::Cm Δtag* en presència d'MNNG (Figura 4.20), com s'havia observat anteriorment entre els mutants *ΔalkA::Cm* i *Δtag* (Figura 4.8). En canvi, la supervivència de *Δada ΔalkA::Cm* enfront d'MMS va ser un ordre de magnitud inferior a l'obtinguda per *Δada::Cm Δtag*

(Figura 4.21), diferències que ja s'havien observat entre els mutants $\Delta alkA::Cm$ i Δtag (Figura 4.9).

Pel que fa a la soca $\Delta ada \Delta ogt::Cm \Delta tag$, en presència d'MNNG la seva viabilitat va disminuir un ordre respecte a les soques $\Delta ada \Delta ogt::Cm$, $\Delta ada::Cm \Delta tag$ i prop de dos ordres en el cas de $\Delta ogt::Cm \Delta tag$ (Figures 4.14 i 4.20). En MMS, la disminució va ser de dos ordres en relació a $\Delta ada \Delta ogt::Cm$ i $\Delta ogt::Cm \Delta tag$, però de només un ordre respecte a $\Delta ada::Cm \Delta tag$.

En els dos assajos, cap de les soques analitzades va presentar una supervivència menor a la de la soca $\Delta alkA::Cm \Delta tag$, on el sistema BER, del qual AlkA i Tag en són DNA N-glicosilases, és incapaç d'actuar sobre les alquilacions, especialment sobre la més citotòxica, la 3-meA. Tan sols la soca defectiva en tots els gens de la resposta Ada va comportar-se de manera similar en presència d'MMS, on ambdues soques van arribar al 100% de mortalitat abans dels 60 minuts d'exposició.

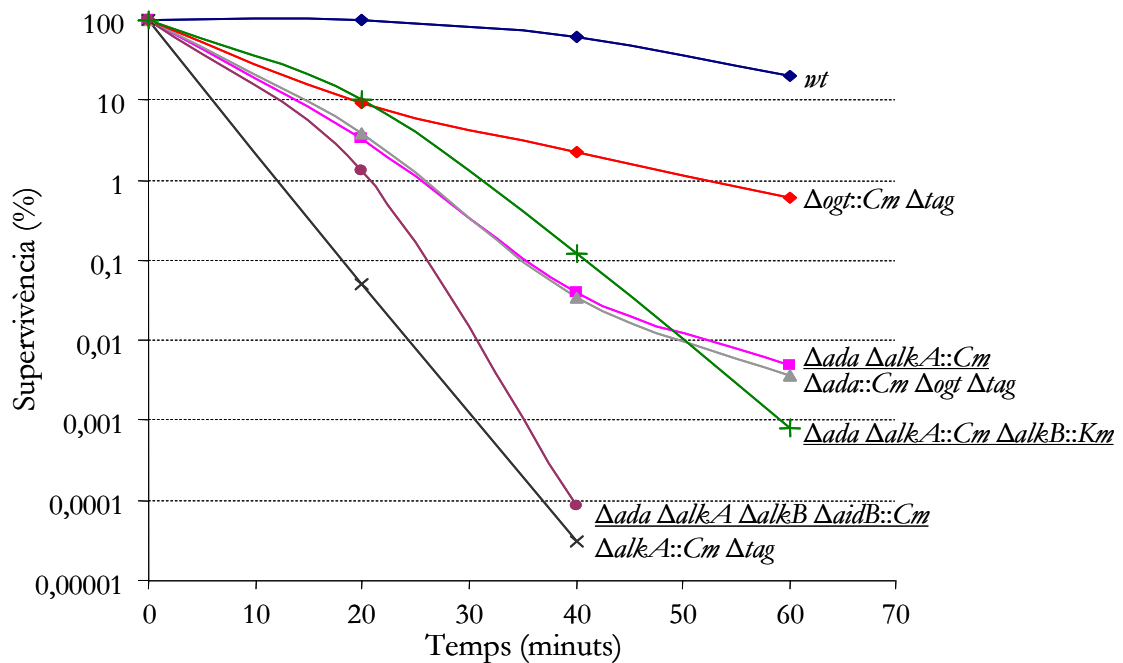


Figura 4.21. Sensibilitat de les soques defectives en múltiples gens de reparació d'alquilacions als efectes letals de l'MMS. A la figura s'indica la supervivència de les diferents soques al ser exposades a MMS 0,1%, s'inclouen a més les corbes dels mutants $\Delta ogt::Cm \Delta tag$ i $\Delta alkA::Cm \Delta tag$ de la Figura 4.15 com a referència. Se subratlla les soques defectives en gens de la resposta Ada per destacar l'augment de la sensibilitat en relació al nombre de mutacions. El percentatge de supervivència es calcula segons el recompte de viables en cada temps en relació a la concentració cel·lular inicial. Com a control es va utilitzar la soca ATCC14028 *wt*. Les dades corresponen a la mitja de 3 experiments independents i presenten una desviació típica màxima del 10%.

4.4.3. Índex de competitivitat *in vivo* dels mutants defectius en múltiples gens de reparació d'alquilacions

La caracterització de les soques indicava que, encara que la introducció de diverses mutacions en gens de reparació d'alquilacions no afectava a la viabilitat cel·lular (Figura 4.19), la seva sensibilitat a agents alquilants era cada cop major i superior a l'observada en els mutants deficients en un únic gen (Figures 4.20 i 4.21). A continuació es van dur a terme els assajos de competitivitat *in vivo*, els quals es representen a la Figura 4.22. Els animals van ser inoculats per via oral, on el procés infectiu és més complet, amb les soques UA1848 ($\Delta ada \Delta ogt::Cm \Delta tag$), UA1852 ($\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta alkA::Cm$), UA1850 ($\Delta ada \Delta alkA \Delta alkB \Delta aidB::Cm$) i UA1857 ($\Delta ada \Delta alkA \Delta alkB \Delta aidB \Delta tag \Delta ogt::Cm$). Els mutants amb els genotips $\Delta ada \Delta alkA::Cm$ i $\Delta ada \Delta alkA::Cm \Delta alkB::Km$ inicialment no van ser inoculats en espera dels resultats de la soca UA1850 per motius ètics i d'acord amb el concepte de reducció de l'ús d'animals en experimentació.

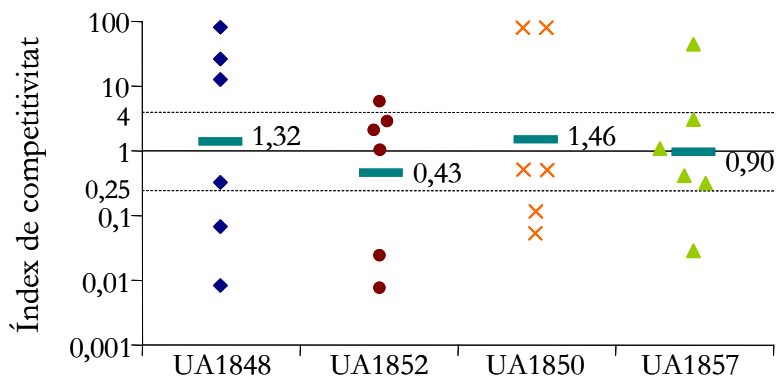


Figura 4.22. Assaig de competitivitat entre la soca ATCC14028 *wt* i els mutants defectius UA1848 ($\Delta ada \Delta ogt::Cm \Delta tag$), UA1852 ($\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta alkA::Cm$), UA1850 ($\Delta ada \Delta alkA \Delta alkB \Delta aidB::Cm$) i UA1857 ($\Delta ada \Delta alkA \Delta alkB \Delta aidB \Delta tag \Delta ogt::Cm$). En cada cas es van inocular 6 ratolins per via oral amb la mateixa proporció de soca *wt* que de mutant. A l'eix d'abscisses es mostra la soca mutant utilitzada en cada assaig. Cada punt representa el valor d'IC obtingut en un ratolí, i les barres horitzontals indiquen la mitja geomètrica de l'IC per cada experiment, el valor de la qual està anotat al costat. Com a orientació es delimita amb dues línies discontinües la zona on els valors d'IC no són considerats significativament diferents.

Com s'havia observat en assajos de competitivitat previs, les dades obtingudes per les quatre soques van presentar una gran dispersió, sense que cap de les mitges geomètriques dels valors d'IC quedés compresa fora de la regió de resultats considerats estadísticament no significatius.

4.5. Soques defectives en gens vinculats a la reparació d'alquilacions i al sistema NER

Fins al moment, cap de les soques construïdes va presentar una disminució significativa de la competitivitat. Totes elles eren defectives en gens específics de reparació d'alquilacions: *ada*, *alkA*, *alkB*, *aidB*, *ogt* i *tag*. Com s'havia assajat fins i tot un mutant defectiu en tots ells, l'única manera de dissenyar nous mutants amb una menor redundància en la reparació d'alquilacions era eliminar gens pertanyents a altres sistemes capaços d'actuar davant d'aquest tipus de lesions (Apartat 1.5) [64, 110, 239]. Entre aquests, el sistema NER, implicat en la reparació de lesions alquilants de cadena llarga (Apartat 1.3.2), és probablement el més específic i el més implicat en la reparació d'alquilacions, ja que fins i tot s'hi ha descrit la presència d'un gen (*stm0466*) codificant per una proteïna similar a les alquiltransferases i que ajuda en el reconeixement d'O⁶-alquilguanines (Apartat 1.6) [201].

El sistema NER presenta dos mecanismes de reparació, els quals es diferencien bàsicament en el reconeixement de la lesió (Apartat 1.3.2). La via GGR repara les bases alterades en qualsevol part del genoma i utilitza la proteïna UvrA per a identificar la lesió. La via TCR, en canvi, actua sobre les zones transcripcionalment actives i empra la proteïna Mfd per al reconeixement. La mutació d'una d'aquestes proteïnes ja és suficient per inactivar tota la via de la qual formen part.

140

4.5.1. Obtenció de mutants defectius en gens vinculats a la reparació d'alquilacions i al sistema NER

Tenint en compte tota la informació recollida fins al moment es va optar per la construcció d'un mutant deficient en les principals proteïnes vinculades a la reparació d'alquilacions: Ada, l'O⁶-alquilguanina alquiltransferasa I i activador transcripcional de la resposta Ada; Ogt i Tag, proteïnes independents de la resposta Ada amb funció O⁶-alquilguanina alquiltransferasa II i 3-meA-DNA glicosilasa I, respectivament; UvrA, com a proteïna imprescindible per al funcionament de la via GGR [42, 352]; i Mfd, essencial en aquest cas pel sistema TCR [310].

Com a punt de partida es va utilitzar la soca $\Delta ada \Delta ogt::Cm \Delta tag$ sobre la qual, després d'escindir la casset de resistència antibiòtica, es va utilitzar el mètode de transducció per transferir les mutacions en els gens *uvrA* i *mfd*. L'obtenció dels lisats fàgics es va realitzar a partir de les soques UA1836 ($\Delta uvrA::Cm$) i UA1870 ($\Delta mfd::Cm$), les quals formaven part de la col·lecció de soques del laboratori i que havien estat construïdes pel mètode d'inactivació gènica en un pas. En primer lloc es va obtenir les soques intermèdies UA1861 ($\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA::Cm$) i UA1868 ($\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta mfd::Cm$) i, posteriorment, el mutant UA1869 ($\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA \Delta mfd::Cm$).

Paral·lelament, i com a control dels assajos que es realitzarien sobre la soca UA1869, es va construir el mutant UA1867 ($\Delta uvrA \Delta mfd::Cm$) defectiu en les dues vies del sistema NER per escissió de la casset de la soca UA1836 i transducció de la mutació $\Delta mfd::Cm$ des de la UA1870.

La verificació de les soques es va realitzar per seqüenciació de les regions modificades, així com per PCR emprant els oligonucleòtids adients (Taula 3.3). A la Figura 4.23 es mostra la comprovació per PCR mitjançant els oligonucleòtids directe i revers del gen diana per les soques UA1867 i UA1869, mentre que no s'inclouen els mutants intermedis.

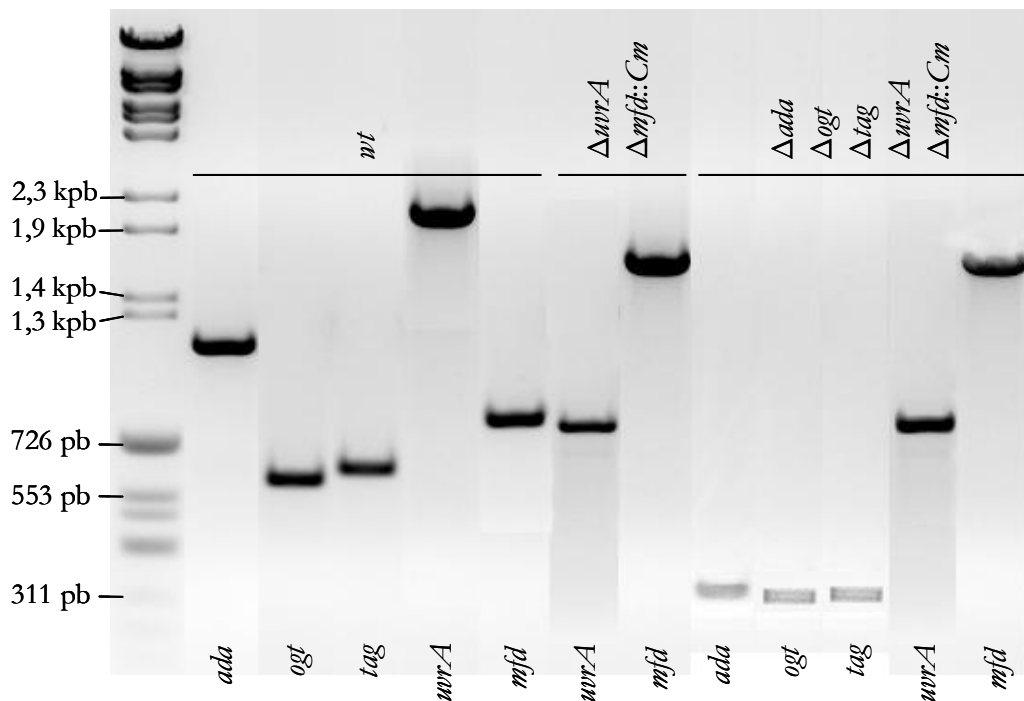
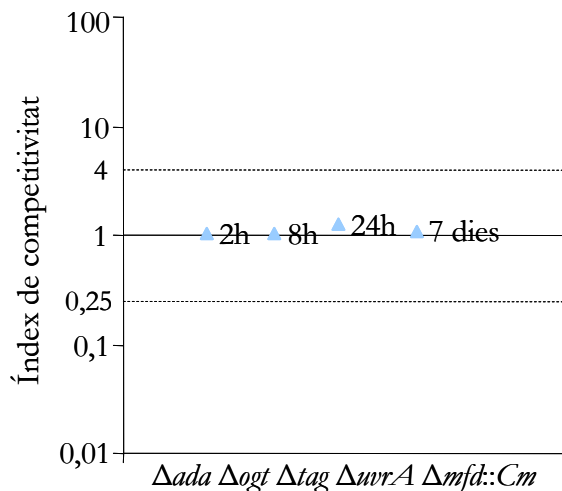


Figura 4.23. Comprovació per PCR de les soques defectives en gens vinculats a la reparació d'alquilacions i al sistema NER. La PCR es va realitzar amb els oligonucleòtids corresponents en funció del gen diana i es va visualitzar en un gel d'electroforesi a l'1% d'agarosa. A les parts superior i inferior de la figura s'indica la procedència del DNA motlle utilitzat i el gen analitzat, respectivament. El primer carril correspon al marcador de pes molecular compost d'una mescla dels DNAs del fag λ digerit amb *BstEII* i del φ X174 digerit amb *HinfI*. Els controls negatius de la reacció de PCR per cada parella d'oligonucleòtids no es mostren a la figura vist que cap d'ells presentava bandes d'amplificació.

4.5.2. Caracterització de les soques defectives en gens vinculats a la reparació d'alquilacions i al sistema NER

4.5.2.1. Índex de competitivitat *in vitro* de la soca UA1869

En primer lloc es va determinar mitjançant un IC *in vitro* si les mutacions acumulades a la soca UA1869 podien causar una disminució en la seva capacitat de creixement. Es van obtenir mostres a diferents temps i en cada un es va calcular la proporció de soca mutant en aquell moment respecte al moment inicial. Les mostres es van prendre a les 2, 8, 24 hores i als 7 dies, sense que el cultiu on es va realitzar l'assaig fos renovat en cap moment. Com es pot observar a la Figura 4.24, la capacitat de creixement de la soca UA1869 no va presentar cap diferència en relació a la soca *wt* en les condicions no lesives en què es va portar a terme.



142

Figura 4.24. Assaig de competitivitat *in vitro* entre les soques ATCC14028 *wt* i $\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA \Delta mfd::Cm$. En cada cas es va inocular en medi LB una mescla amb la mateixa proporció de la soca *wt* que de mutant, es va incubar i es va calcular el valor d'IC en els temps 2 h, 8 h, 24 h i 7 dies. Com a orientació es delimita amb dues línies discontinües la zona on els valors d'IC no són considerats significativament diferents. Els assaigs es van realitzar 3 vegades de manera independent i sense obtenir variacions en el resultat.

4.5.2.2. Assaig de supervivència a MNNG en soques defectives en gens vinculats a la reparació d'alquilacions i al sistema NER

A continuació es va determinar la sensibilitat de la soca UA1869 ($\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA \Delta mfd::Cm$) a l'agent metilant S_N1 MNNG. Com a referència es van incloure en l'assaig soques estretament relacionades amb ella: el mutant *parental* UA1848 ($\Delta ada \Delta ogt::Cm \Delta tag$) i les soques intermèdies UA1861 ($\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA::Cm$) i UA1868 ($\Delta ada \Delta ogt \Delta tag$

$\Delta mfd::Cm$). Així mateix, es va determinar la sensibilitat a MNNG dels mutants UA1836 ($\Delta uvrA::Cm$), UA1870 ($\Delta mfd::Cm$) i UA1867 ($\Delta uvrA \Delta mfd::Cm$) a fi de controlar els efectes deleteris que aquestes mutacions podien aportar a la soca UA1869.

Per aconseguir la màxima resolució entre les corbes de supervivència de les diferents soques es va realitzar l'assaig a les concentracions 5, 7,5 i 10 $\mu\text{g/ml}$ d'MNNG, això no obstant, el patró observat en tots els casos va ser molt similar. La Figura 4.25 mostra els resultats obtinguts en presència de 7,5 $\mu\text{g/ml}$ d'MNNG. Les corbes de les soques $\Delta ada \Delta ogt::Cm \Delta tag$, $\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA::Cm$ i $\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta mfd::Cm$ van ser similars, presentant una sensibilitat aproximadament un ordre i mig superior a la de la soca *wt*, mentre que en el mutant $\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA \Delta mfd::Cm$ la mortalitat va ser dos ordres de magnitud major que en la soca *wt*. El patró que es va poder observar en els controls va ser semblant, ja que les soques $\Delta uvrA::Cm$ i $\Delta mfd::Cm$ no van presentar diferències respecte a la *wt*, mentre que la $\Delta uvrA \Delta mfd::Cm$ va mostrar aproximadament el doble de mortalitat.

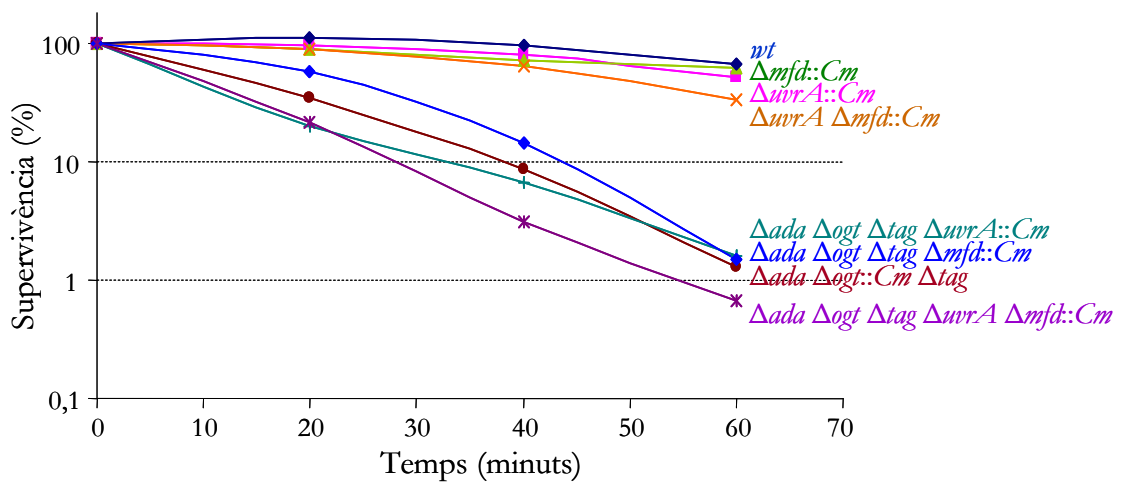
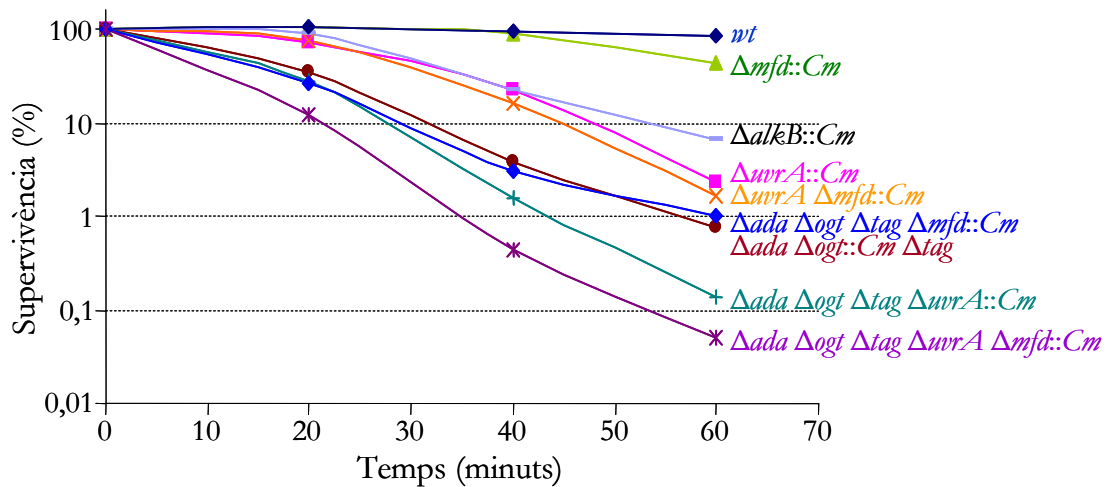


Figura 4.25. Sensibilitat de les soques $\Delta uvrA::Cm$, $\Delta mfd::Cm$, $\Delta uvrA \Delta mfd::Cm$, $\Delta ada \Delta ogt::Cm \Delta tag$, $\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA::Cm$, $\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta mfd::Cm$ i $\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA \Delta mfd::Cm$ als efectes letals de l'MNNG. Es mostra la supervivència de les diferents soques al ser exposades a 7,5 $\mu\text{g/ml}$ d'MNNG. El percentatge de supervivència (corresponent a la mitja de 3 experiments independents) es calcula segons el recompte de viables en cada temps en relació a la concentració cel·lular en el moment inicial. Com a control es va utilitzar la soca ATCC14028 *wt*. La desviació típica màxima és del 15%.

4.5.2.3. Assaig de supervivència a DES en soques defectives en gens vinculats a la reparació d'alquilacions i al sistema NER

Mentre que els gens específics de reparació d'alquilacions actuen principalment sobre metilacions, el sistema NER repara majoritàriament alquilacions de més d'un carboni

(Apartats 1.3.2 i 1.6) [201]. Atès que la soca UA1869 ($\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA \Delta mfd::Cm$) és defectiva en les dues vies del sistema NER era necessari caracteritzar-la també utilitzant un agent alquilant que introduís grups alquil de cadena llarga, escollint per aquest cas un compost etilant. A la bibliografia es descriuen diversos agents etilants àmpliament utilitzats, com ara l'ENNG o el dietil sulfat (EMS). Ara bé, com que aquests són les formes etiladores dels agents metilants MNNG i MMS, ambdós utilitzats en apartats anteriors, es va escollir un compost amb unes característiques totalment diferents, el DES, el qual realitza un mecanisme preferentment de tipus S_N2 .



144

Figura 4.26. Sensibilitat de les soques $\Delta uvrA::Cm$, $\Delta mfd::Cm$, $\Delta uvrA \Delta mfd::Cm$, $\Delta alkB::Cm$, $\Delta ada \Delta ogt::Cm \Delta tag$, $\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA::Cm$, $\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta mfd::Cm$ i $\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA \Delta mfd::Cm$ als efectes letals del DES. Es mostra la supervivència de les diferents soques al ser exposades a 30 mM de DES. El percentatge de supervivència (corresponent a la mitja de 3 experiments independents) es calcula segons el recompte de viables en cada temps en relació a la concentració cel·lular en el moment inicial. Com a control es va utilitzar la soca ATCC14028 *wt*. La desviació típica màxima és del 17%.

A l'assaig de supervivència es van incloure també les soques analitzades en l'apartat anterior: UA1848 ($\Delta ada \Delta ogt::Cm \Delta tag$), UA1861 ($\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA::Cm$) i UA1868 ($\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta mfd::Cm$) per la seva similitud genotípica amb UA1869; UA1836 ($\Delta uvrA::Cm$), UA1870 ($\Delta mfd::Cm$) i UA1867 ($\Delta uvrA \Delta mfd::Cm$) com a control de l'efecte deletori causat per la inactivació d'una o ambdues vies del sistema NER. A més, es va estudiar el mutant $\Delta alkB::Cm$ per ser la soca tipus utilitzada en assajos amb agents alquilants S_N2 . A la Figura 4.26 es pot observar com les soques problema $\Delta ada \Delta ogt::Cm \Delta tag$ i $\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta mfd::Cm$, portadores d'una còpia salvatge d'*uvrA*, presentaven una sensibilitat significativament menor a la de les soques $\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA::Cm$ i UA1869, deficientes en la via GGR. Els controls van mostrar un patró semblant, de manera que la mortalitat dels mutants $\Delta uvrA::Cm$ i $\Delta uvrA \Delta mfd::Cm$ (deficients en *uvrA*)

en presència de DES era significativament major a la de les soques *wt* i $\Delta mfd::Cm$. La soca deficient en la proteïna AlkB també va presentar una disminució significativa de la seva viabilitat en relació a la soca *wt*, puix que el seu espectre d'actuació no es limita només a metilacions (Taula 1.1), si bé el percentatge de supervivència final va ser gairebé dos ordres de magnitud major que en MMS (també agent S_N2), ja que els agents metilants causen adductes més nocius [165, 298].

4.5.3. Índex de competitivitat de mutants defectius en gens vinculats a la reparació d'alquilacions i al sistema NER

Després de determinar la cinètica de creixement i la sensibilitat a diferents agents alquilants de la soca UA1869 defectiva tant en els principals gens específics de reparació d'alquilacions com del sistema NER es va procedir a definir la seva capacitat infectiva mitjançant un assaig de competitivitat. Aquest es va realitzar per via oral, utilitzant com a control la soca UA1867 ($\Delta uvrA \Delta mfd::Cm$) deficient en el sistema NER. En la Figura 4.27 es mostra també els resultats obtinguts en estudis de laboratori anteriors pels mutants UA1836 ($\Delta uvrA::Cm$) i UA1870 ($\Delta mfd::Cm$).

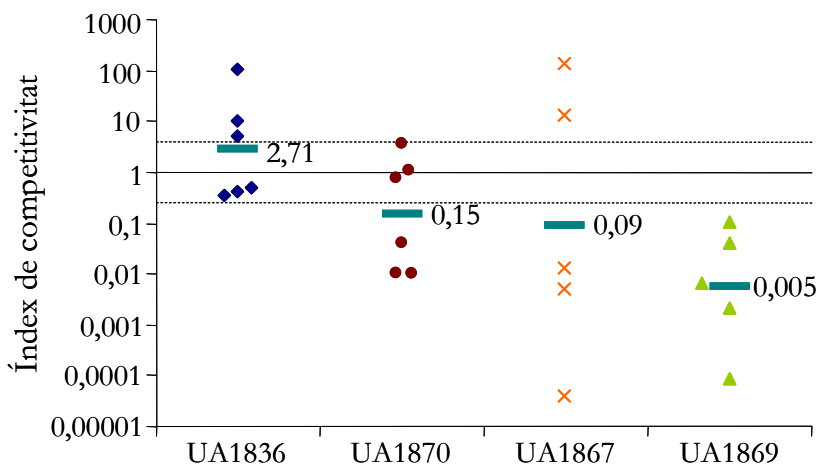


Figura 4.27. Assaig de competitivitat entre la soca ATCC14028 *wt* i els mutants UA1836 ($\Delta uvrA::Cm$), UA1870 ($\Delta mfd::Cm$), UA1867 ($\Delta uvrA \Delta mfd::Cm$) i UA1869 ($\Delta ada \Delta ogf \Delta tag \Delta uvrA \Delta mfd::Cm$). En cada cas es van inocular 6 ratolins per via oral amb la mateixa proporció de soca *wt* que de mutant. A l'eix d'abscisses es mostra la soca mutant utilitzada en cada assaig. Cada punt representa el valor d'IC obtingut en un ratolí, i les barres horitzontals indiquen la mitja geomètrica de l'IC per cada experiment, el valor de la qual està anotat al costat. Com a orientació es delimita amb dues línies discontinües la zona on els valors d'IC no són considerats significativament diferents.

Tots els valors d'IC obtinguts dels ratolins assajats amb la soca UA1869 es van situar a la regió de resultats estadísticament significatius, i l'aplicació del test estadístic va confirmar que la capacitat infectiva d'aquesta soca és menor a la de la *wt* ($p = 9,55 \cdot 10^{-7}$). En canvi, cap dels mutants utilitzats com a control (UA1836, UA1867 i UA1870) va resultar ser estadísticament significatiu com a conseqüència de la dispersió de les dades per diversos valors fora de la regió de significança.

4.5.4. Índex de competitivitat de soques defectives relacionades amb UA1869

Per aprofundir en les causes de la menor competitivitat de la soca UA1869 es va realitzar assajos de competitivitat addicionals que consistien en la inoculació de:

- El mutant UA1869 per via ip, on els bacteris accedeixen ràpidament a l'aparell circulatori sense haver d'envair l'aparell digestiu, de manera que es pretenia delimitar la zona causant de la disminució de la competitivitat.
- Les soques UA1861 ($\Delta ada \Delta ogf \Delta tag \Delta uvrA::Cm$) i UA1868 ($\Delta ada \Delta ogf \Delta tag \Delta mfd::Cm$), funcionals en les vies TCR i GGR, respectivament. D'aquesta manera es volia concretar el pes en el procés infectiu del sistema NER.
- El mutant UA1874 ($\Delta ada \Delta ogf \Delta tag \Delta alkA \Delta uvrA \Delta mfd::Cm$), el qual es diferenciava de la soca UA1869 en la manca de la proteïna AlkA. Així, a més de ser defectiu en les dues AGT i en les dues vies del sistema NER, també ho era en les dues 3-meA-DNA glicosilases del sistema BER. Aquest mutant es va construir pel mètode de transducció per introducció, en primer lloc, de la mutació en el gen *uvrA* en la soca UA1853 ($\Delta ada \Delta ogf \Delta tag \Delta alkA$, derivada de $\Delta ada \Delta ogf \Delta tag \Delta alkA::Cm$ per escissió de la casset) i posterior mutació del gen *mfd*, també per transducció. Totes les soques van ser verificades per seqüenciació i per PCR (Figura 4.28) utilitzant els oligonucleòtids adients (Taula 3.3).

146

Malgrat que la soca UA1869 havia presentat clares diferències respecte a la soca *wt* al ser inoculada per via oral no va resultar ser menys competitiva quan va ser assajada per via ip (Figura 4.29), on la dispersió, a més, va ser molt menor que en les inoculacions orals. D'aquesta manera es va poder concretar que la deficiència d'aquesta soca devia ser causada en algun punt anterior a l'entrada a l'aparell circulatori.

Pel que fa a les soques UA1861 ($\Delta ada \Delta ogf \Delta tag \Delta uvrA::Cm$) i UA1868 ($\Delta ada \Delta ogf \Delta tag \Delta mfd::Cm$), cap d'elles va mostrar una capacitat infectiva significativament menor a la soca *wt*, de manera que era necessària la inactivació de les dues vies del sistema NER per obtenir l'atenuació observada a la soca UA1869.

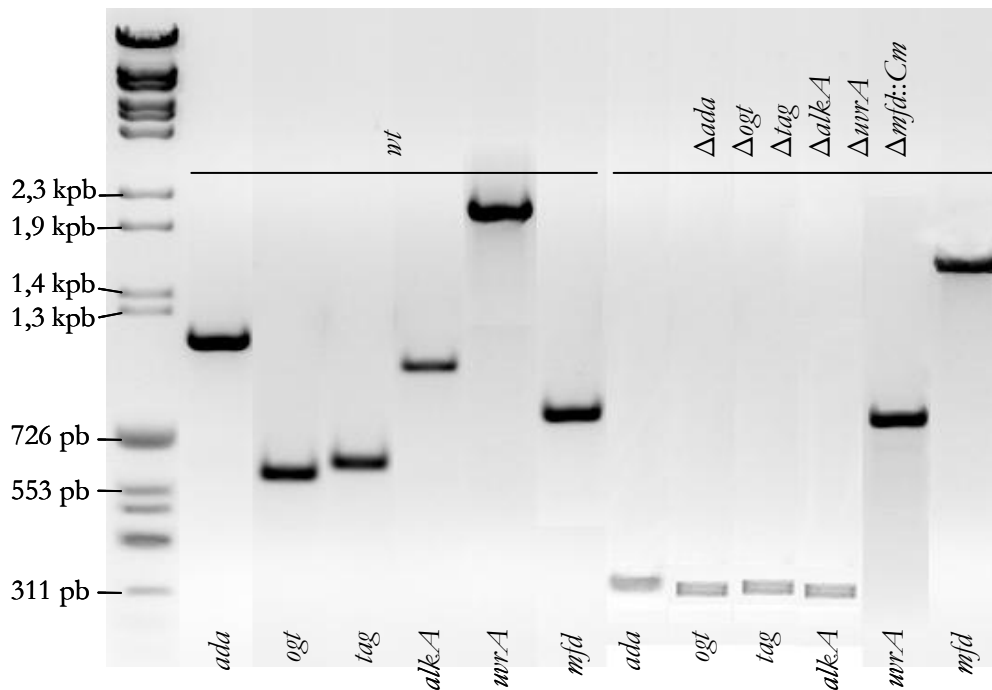


Figura 4.28. Comprovació per PCR de la soca UA1874 ($\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta alkA \Delta uvrA \Delta mfd::Cm$). La PCR es va realitzar amb els oligonucleòtids corresponents en funció del gen diana i es va visualitzar en un gel d'electroforesi a l'1% d'agarosa. A les parts superior i inferior de la figura s'indica la procedència del DNA motlle utilitzat i el gen analitzat, respectivament. El primer carril correspon al marcador de pes molecular compost d'una mescla dels DNAs del fag λ digerit amb *BstEII* i del $\phi X174$ digerit amb *HinfI*. Els controls negatius de la reacció de PCR per cada parella d'oligonucleòtids no es mostren a la figura vist que cap d'ells presentava bandes d'amplificació.

Finalment, el mutant UA1874 ($\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta alkA \Delta uvrA \Delta mfd::Cm$), genotípicament similar a UA1869 però defectiu a més en el gen *alkA*, va ser significativament menys competitiu que la soca *wt*, però els valors d'IC obtinguts no van ser clarament diferents als de la soca UA1869 (Figura 4.27).

Paral·lelament a aquests estudis es van realitzar assajos de competitivitat amb diferents soques defectives tant en gens específics de reparació d'alquilacions com en la via GGR (Taula 4.2), responsable de la reparació global del genoma, a fi de cercar altres combinacions de mutacions que poguessin conduir a una disminució en la capacitat infectiva. Ninguna de les soques va presentar una competitivitat significativament menor a la soca ATCC14028 *wt*.

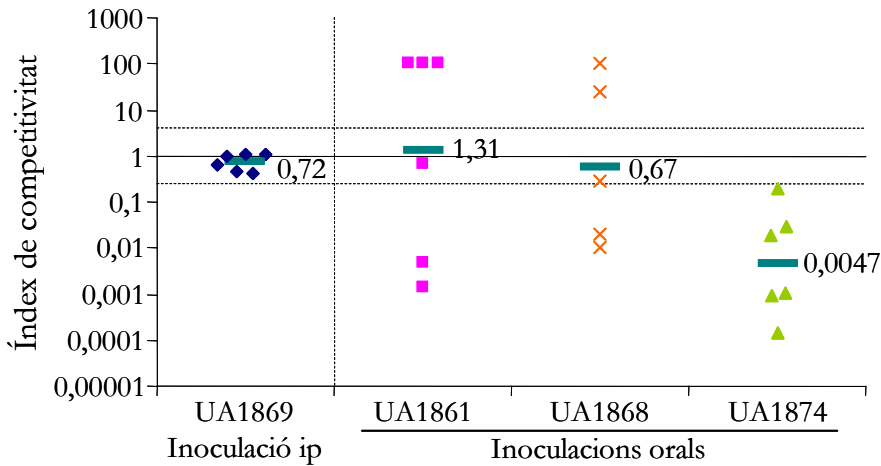


Figura 4.29. Assaig de competitivitat entre la soca ATCC14028 wt i els mutants defectius UA1869 ($\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA \Delta mfd::Cm$), UA1861 ($\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA::Cm$), UA1868 ($\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta mfd::Cm$) i UA1874 ($\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta alkA \Delta uvrA \Delta mfd::Cm$). En cada cas es van inocular 6 ratolins amb la mateixa proporció de soca wt que de mutant. A l'eix d'abscisses es mostra les diferents soques mutants utilitzades i la via per on van ser assajades. Cada punt representa el valor d'IC obtingut en un ratolí, i les barres horitzontals indiquen la mitja geomètrica de l'IC per cada experiment, el valor de la qual està anotat al costat. Com a orientació es delimita amb dues línies discontinúes la zona on els valors d'IC no són considerats significativament diferents.

148

Taula 4.2. Soques defectives en la via GGR i en gens específics de reparació d'alquilacions.

Soca	Genotip
UA1863	$\Delta ada \Delta alkA \Delta alkB \Delta aidB \Delta uvrA::Cm$
UA1865	$\Delta ada \Delta alkA \Delta alkB \Delta aidB \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA::Cm$
UA1860	$\Delta alkA \Delta tag \Delta uvrA::Cm$
UA1873	$\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta alkA \Delta uvrA::Cm$

4.5.5. Viabilitat de la soca UA1869 en el tracte digestiu

Els assajos de competitivitat realitzats amb la soca UA1869 ($\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA \Delta mfd::Cm$) tant per via oral com ip havien demostrat que aquesta pateix una disminució de la seva competitivitat només quan el procés s'inicia en el tracte digestiu. L'atenuació de la seva capacitat virulenta podia venir donada per algun factor comprès en aquesta regió de l'organisme hoste, ja fos de tipus químic, com el pH estomacal o l'exposició a agents alquilants; immune, com la resposta inflamatòria; intrínsec a la cèl·lula, com la seva capacitat d'invasió de l'epiteli intestinal; etc. Per a determinar la viabilitat de la soca mutant en algunes d'aquestes situacions es van realitzar un seguit d'assajos *in vitro*:

4.5.5.1. Creixement en anaerobiosi de la soca UA1869

La concentració d'oxigen en el tracte gastrointestinal és menor que en altres ambients, de manera que és necessari que la cèl·lula indueixi diversos mecanismes d'adaptació (Apartat 1.1.3) [86], els quals podrien afavorir l'aparició de dany alquilant endogen. Per a determinar el comportament de la soca UA1869 en un entorn pobre en oxigen es va realitzar un assaig de competitivitat *in vitro* similar al que ja s'havia efectuat a l'Apartat 4.5.2.1, però induint un ambient anaeròbic en el cultiu. En aquestes condicions el mutant no va presentar cap diferència en relació a la soca *wt*, obtenint un valor d'IC de 0,93 comprés a la regió de resultats estadísticament no significatius.

4.5.5.2. Assaig de supervivència a pH àcid de la soca UA1869

Salmonel·la ha de ser capaç de sobreviure al pH àcid estomacal abans d'accedir al tracte intestinal i envair el teixit epitelial [237]. La sensibilitat de la soca UA1869 a condicions àcides de creixement va ser mesurada per incubació a pH 3 i presa de mostres a diferents temps. També es van utilitzar la soca *wt* com a control negatiu i la soca UA1779 ($\Delta fur::Cm$) com a control positiu, ja que la seva supervivència davant de pH àcid és inferior a la de la soca *wt* [90, 91].

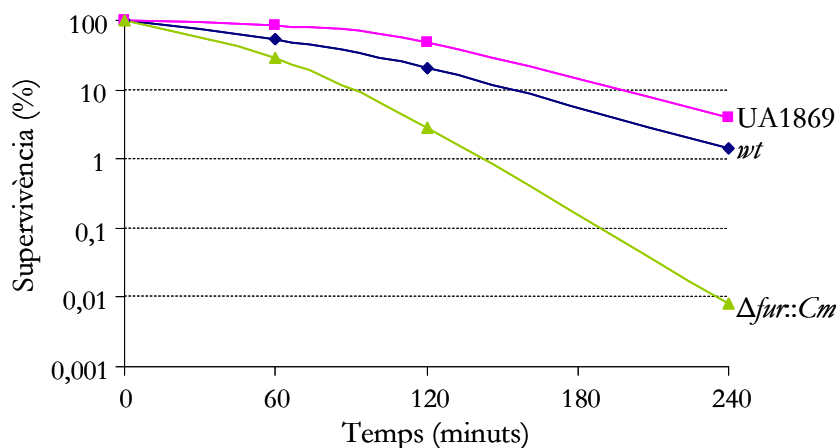


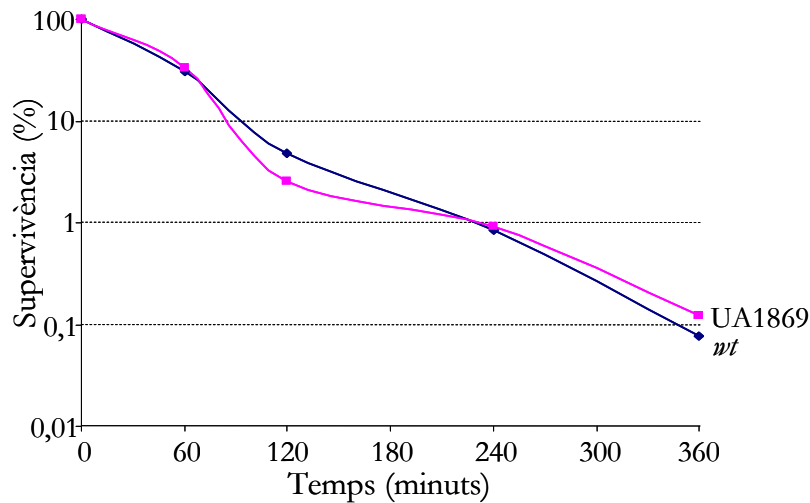
Figura 4.30. Sensibilitat de la soca UA1869 als efectes letals del pH àcid. Es mostra la supervivència de les diferents soques al ser incubades en medi LB a pH 3. El percentatge de supervivència (corresponent a la mitja de 3 experiments independents) es calcula segons el recompte de viables en cada temps en relació a la concentració cel·lular en el moment inicial. Com a controls es van utilitzar les soques ATCC14028 *wt* i $\Delta fur::Cm$. La desviació típica màxima és del 13%.

A la Figura 4.30 es pot apreciar el resultat de l'assaig, on la soca UA1869 no va presentar una supervivència a pH àcid significativament diferent a la de la soca *wt*.

L'assaig es va allargar fins a les 4 hores per diferenciar bé el comportament de les tres soques, mes el temps real d'exposició al pH àcid estomacal abans de què el patogen arribi al tracte intestinal és molt menor, probablement inferior a la mitja hora.

4.5.5.3. Assaig de supervivència a sals biliars de la soca UA1869

En el seu pas pel tracte gastrointestinal, el bacteri també ha de poder sobreviure a diverses secrecions digestives, entre elles les sals biliars. Per a determinar el grau de mortalitat que poden generar sobre la soca UA1869 es va realitzar un assaig de supervivència en presència de colat sòdic, observant que tant la soca *wt* (utilitzada com a control) com la soca UA1869 presentaven un comportament semblant (Figura 4.31).



150

Figura 4.31. Sensibilitat de la soca UA1869 als efectes letals de les sals biliars. Es mostra la supervivència de les diferents soques al ser incubades en medi LB amb 30% de colat sòdic. El percentatge de supervivència es calcula segons el recompte de viables en cada temps en relació a la concentració cel·lular en el moment inicial. Com a control es va utilitzar la soca ATCC14028 *wt*. Les dades corresponen a la mitja de 3 experiments independents i presenten una desviació típica màxima del 9%.

5. Discussió

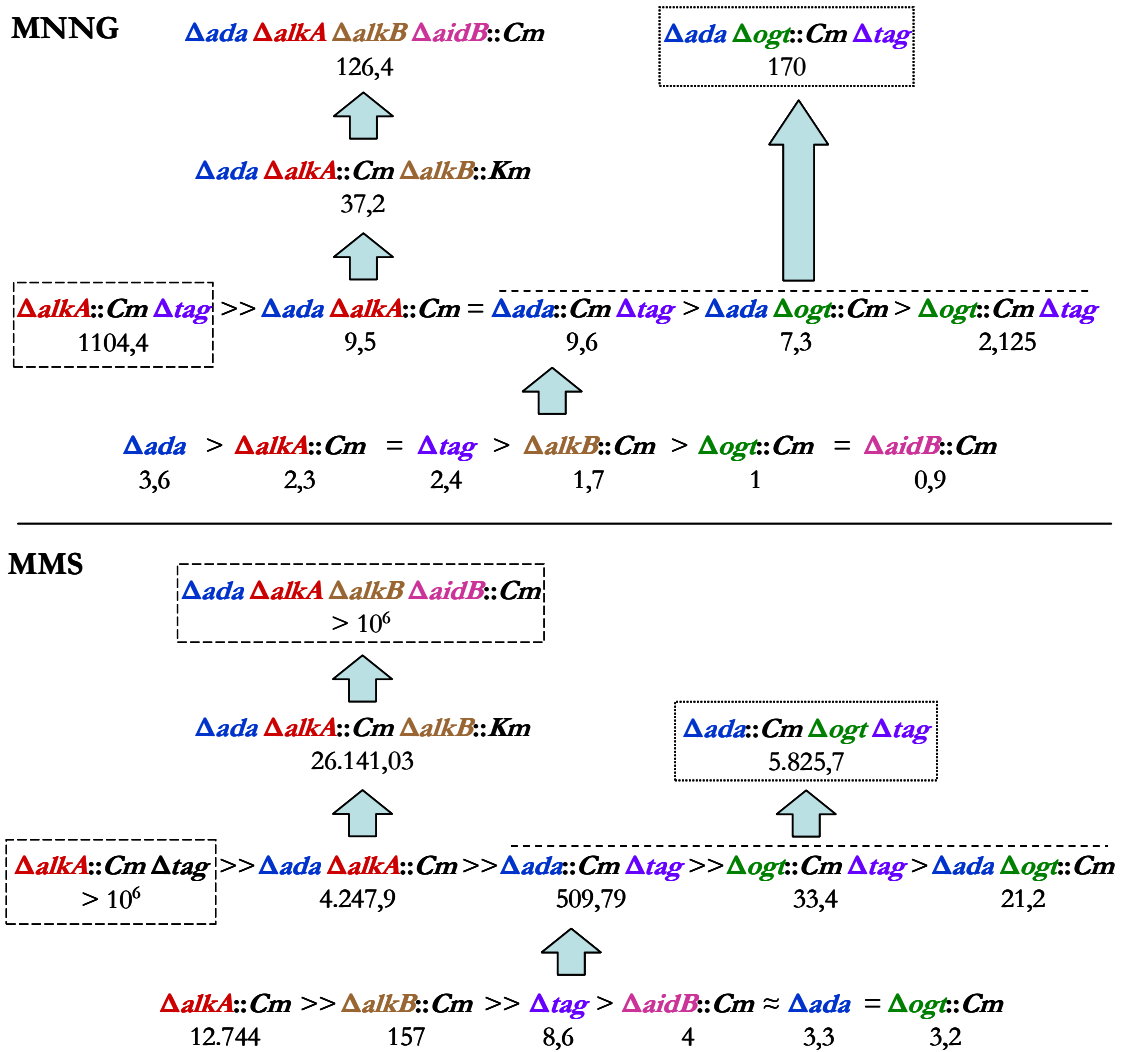
5.1. Funcionalitat dels mecanismes de defensa contra agents alquilants a *S. Typhimurium*

Cada un dels nucleòtids que formen part del DNA pot ser alquilat en diverses posicions. Algunes alquilacions són gairebé innòcues, com les que afecten als grups fosfat [255]. D'altres, en canvi, poden tenir propietats citotòxiques o mutagèniques, ja que afecten als àtoms de nitrogen i oxigen de les bases nitrogenades, interferint en la formació de ponts d'hidrogen amb la cadena complementària (Apartat 1.4.2). La capacitat d'un agent alquilant per introduir un grup alquil en una o altra posició dependrà de la reactivitat i accessibilitat d'aquesta, i del tipus de mecanisme de substitució nucleofílica (S_N1 o S_N2) amb què actui principalment l'agent en qüestió (Apartat 1.4.1) [93]. És a causa de la varietat de lesions que es poden generar (tant en les posicions com en la naturalesa del grup alquil) que existeixen diversos mecanismes capaços de reparar alquilacions (resposta Ada, proteïnes Ogt i Tag, sistema NER, etc), cada un dels quals tindrà activitat sobre un o varis substrats. Com que *S. Typhimurium* presenta una resposta Ada atenuada respecte a altres microorganismes com *E. coli* (Apartat 4.1), és possible que les proteïnes que en formen part hagin perdut parcialment la seva funció, la qual hagi estat substituïda per algun dels altres mecanismes de reparació.

Per a determinar la importància de les principals proteïnes de reparació d'alquilacions en la supervivència a agents alquilants i durant al procés infectiu es va dissenyar una bateria de soques mutants, cap de les quals presentava una disminució de la seva viabilitat en absència de dany alquilant en relació a la soca ATCC14028 *wt* original (Apartats 4.2.2.1, 4.4.2.1 i 4.5.2.1). Per a estudiar la seva sensibilitat a agents alquilants es va emprar l'MNNG, un compost metilant de tipus S_N1 molt utilitzat en assajos de dany alquilant i conegut per la seva capacitat de produir O^6 -meG (Apartat 1.4.3); i l'MMS, un altre agent metilant amb mecanisme S_N2 també molt usat experimentalment per la seva citotoxicitat. Per a aquelles soques deficientes en gens del sistema NER es va usar l'agent etilant DES, ja que aquest mecanisme de reparació actua principalment en grups alquil del tipus etil o superior [201, 356, 375]. El panorama general que sorgeix dels resultats obtinguts és el següent:

- **Soques defectives en un gen de reparació d'alquilacions.** Com es pot observar a la Figura 5.1, les proteïnes específiques de reparació d'alquilacions (Ada, AlkA, AlkB, AidB, Ogt i Tag) segueixen desenvolupant un paper important en situacions de dany alquilant, ja que la seva manca comporta un augment de la sensibilitat en les soques defectives en algun dels gens que les codifiquen. Aquesta disminució de la supervivència, però, no va comportar una disminució de la capacitat infectiva de cap de les soques, fossin deficientes en gens independents de la resposta Ada (*ogt* i *tag*) o de la pròpia resposta (Apartat 4.2.3.2). Ni tan sols la manca de la proteïna Ada va comportar cap diferència *in vivo*, malgrat que la soca

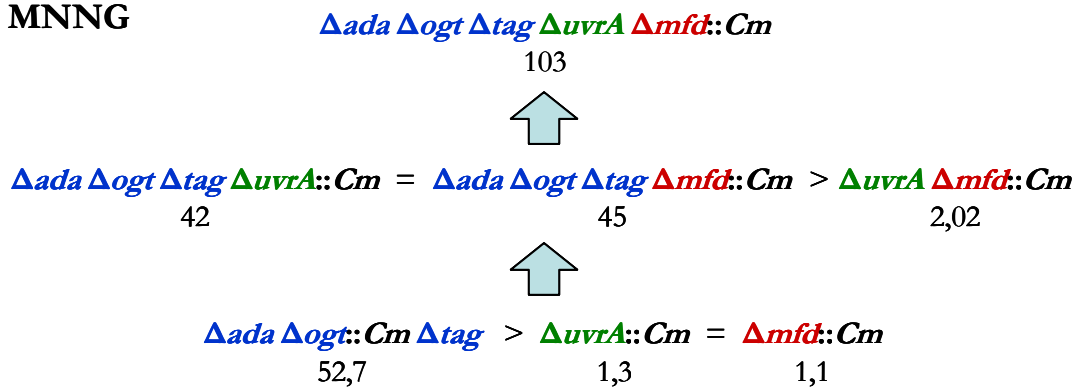
que n'era deficient no disposava de l'activitat AGT I ni de l'activador transcripcional de la resposta.



154

Figura 5.1. Diagrama de sensibilitat a la presència d'agents metilants de les soques defectives en gens vinculats a la reparació específica de lesions alquilants. A la part superior i inferior es resumeixen els resultats dels assajos de supervivència a MNNG (10 µg/ml) i MMS (0,1%), respectivament. A sota de cada mutant s'anota el seu índex de sensibilitat en relació a la soca *wt*, el qual s'ha calculat per comparació dels percentatges de mortalitat en l'últim temps de mostreig entre les soques mutant i *wt*. Els noms dels diferents gens es representa amb un codi de colors. Amb un marc ratllat es ressalten els mutants amb més mortalitat, mentre que la soca $\Delta ada::Cm \Delta og t \Delta tag$ es destaca amb un marc puntejat.

- **Soques defectives en dos o més gens de reparació d'alquilacions.** L'increment en el número de mutacions es tradueix en un augment de la sensibilitat de la majoria de soques (Figura 5.1). Ara bé, aquesta constatació no es dona quan l'efecte deleteri de varies mutacions és menor a la d'una sola. Per exemple, la soca deficient en la proteïna AlkB va presentar una mortalitat en presència d'MMS superior a la dels mutants $\Delta ogt::Cm \Delta tag$ i $\Delta ada \Delta ogt::Cm$, ja que AlkB repara 1-meA i 3-meC, dues lesions altament citotòxiques generades en ssDNA majoritàriament per agents metilants S_N2 com l'MMS (Apartat 1.4.2.2) [145]; mentre que les activitats d'Ada, Ogt i Tag són menys rellevants enfront d'aquest agent metilant. Tanmateix, ni les soques amb una sensibilitat més acusada tenien una capacitat infectiva menor a la de la soca *wt* (Apartats 4.3.3 i 4.4.3).

MNNG

155

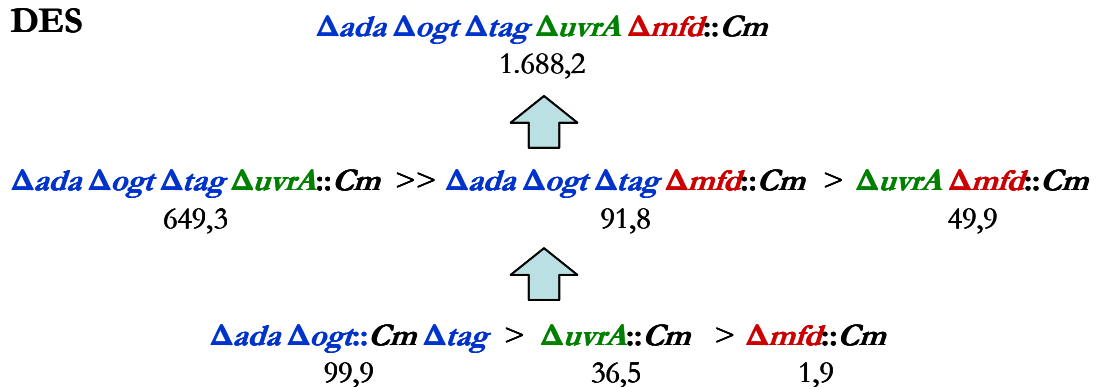
DES

Figura 5.2. Diagrama de sensibilitat a la presència d'agents alquilants de les soques defectives en gens vinculats a la reparació d'alquilacions i al sistema NER. A la part superior i inferior es resumeixen els resultats dels assajos de supervivència a MNNG (7,5 µg/ml) i DES (30 mM), respectivament. A sota de cada mutant s'anota el seu índex de sensibilitat en relació a la soca *wt*, i que s'ha calculat per comparació dels percentatges de mortalitat en l'últim temps de mostreig entre les soques mutant i *wt*. Els noms dels diferents gens es representa amb un codi de colors.

- **Soques defectives en gens vinculats a la reparació d'alquilacions i al sistema NER.** Partint de la soca $\Delta ada \Delta ogt::Cm \Delta tag$ es va construir mutants deficients en les vies del sistema NER per mutació dels gens *uvrA* i *mfd*. Mitjançant la realització d'assajos de supervivència a MNNG (Figura 5.2, part superior) es va determinar que la sensibilitat a agents metilants de les soques $\Delta ada \Delta ogt::Cm \Delta tag$, $\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA::Cm$, $\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta mfd::Cm$ i $\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA \Delta mfd::Cm$ és causada principalment per la manca de les proteïnes específiques de reparació d'alquilacions (Ada, Ogt i Tag), ja que la incorporació de les mutacions en els gens *uvrA* i *mfd* no suposa un augment important de la mortalitat. De fet, la via GGR de la reparació per escissió de nucleòtids intervé quan la proteïna UvrA reconeix una distorsió en la doble hèlix [352], mentre que la via TCR ho fa quan la proteïna Mfd detecta que l'RNA polimerasa ha quedat encallada durant la transcripció d'una regió [305]. Les dues situacions poden ser ocasionades per la presència d'un grup alquil de cadena llarga (Apartat 1.3.2). Per aquest motiu, és en presència de l'agent etilant DES (Figura 5.2, inferior) quan realment es pot apreciar l'aportació del sistema NER a la reparació de lesions alquilants, en especial de la via GGR. La inactivació de la via TCR com a conseqüència de la mutació del gen *mfd* no provoca efectes tan deleteris com la interrupció de la via GGR, ja que probablement les alquilacions presents en les zones transcripcionalment actives són reparades pel mecanisme GGR un cop la transcripció es desbloqueja. En quant a la soca UA1869 ($\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA \Delta mfd::Cm$), la sensibilitat aportada per la manca del sistema NER és remarcablement superior a la del mutant defectiu tan sols en els gens *ada*, *ogt* i *tag*. De fet, només la soca UA1869 va presentar una capacitat infectiva significativament menor a la de la soca *wt* (Apartats 4.5.3 i 4.5.4) malgrat l'escassa diferència observada en els assajos de supervivència entre ella i els mutants $\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta mfd::Cm$ i $\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA::Cm$ (en especial respecte a aquesta última), la competitivitat de les quals no és significativament diferent a la de la soca *wt*.

156

Per consegüent, les proves de supervivència realitzades demostren que tots els gens delecionats, fins i tot aquells que conformen la resposta Ada, codifiquen proteïnes que desenvolupen un paper important en la protecció contra agents alquilants.

5.2. Característiques del dany alquilant

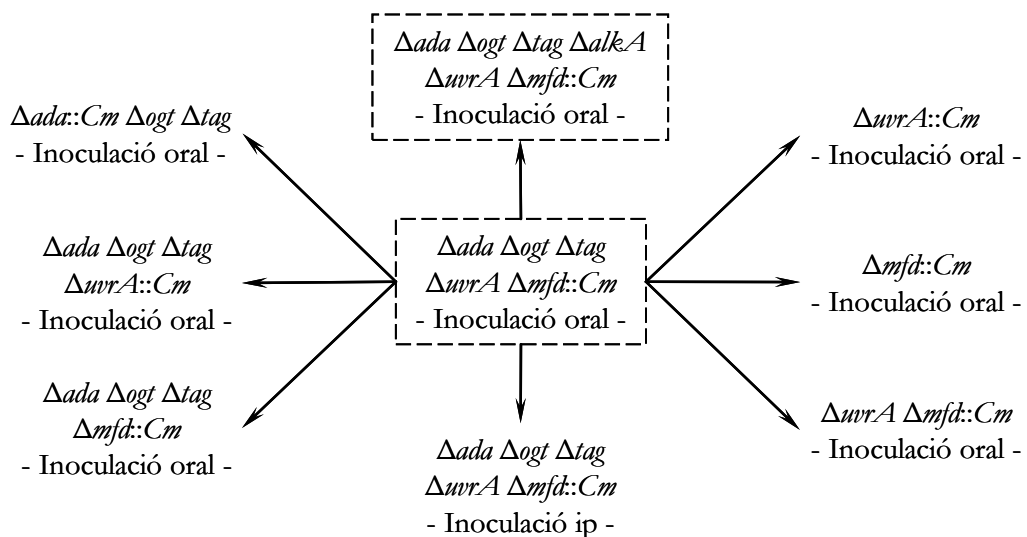
5.2.1. Presència d'agents alquilants a l'organisme hoste

Les diferències observades entre els assajos realitzats *in vitro* i *in vivo* evidencien que els nivells d'agents alquilants als quals ha de fer front el patogen durant la infecció no són tan elevats com les dosis administrades en els assajos de supervivència.

Un dels mecanismes de defensa dels organismes superiors davant la infecció per microorganismes és la utilització de ROI (Apartat 1.10). Aquesta estratègia es basa en la producció no desitjada de productes tòxics pel propi organisme, els quals han estat reaprofitats com a mecanisme de defensa (Apartat 1.1.4). Malgrat els paral·lelismes observats entre la reparació d'oxidacions i la d'alquilacions (les dues disposen de regulons que permeten la generació d'una resposta adaptativa, part de les seves proteïnes de reparació formen part del reguló RpoS, disposen de DNA N-glicosilases específiques del sistema BER, etc; veure els Apartats 1.6 i 1.10), sembla ser que els organismes superiors no utilitzen els agents alquilants fruit del metabolisme de les cèl·lules eucariotes com a mecanisme de defensa.

5.2.2. Diversitat de lesions

La primera soca amb què es van obtenir resultats estadísticament significatius en els assajos *in vivo* va ser la UA1869. Per a comprendre les causes que havien portat a aquest fenotip es va realitzar la inoculació de soques similars a ella (Figura 5.3).



157

Figura 5.3. Soques defectives similars a la UA1869 ($\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta uvrA \Delta mfd::Cm$) assajades *in vivo*. Al centre del diagrama se situa la soca atenuada UA1869. Al seu voltant s'indica els diferents mutants sobre els quals es va realitzar assajos de competitivitat (representats a les Figures 4.27 i 4.29) per a determinar l'origen de la disminució de la competitivitat en la UA1869. S'emmarca les soques amb capacitat infectiva significativament menor a la *wt*.

De totes aquestes, només la UA1874 ($\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta alkA \Delta uvrA \Delta mfd::Cm$), deficient en les dues activitats AGT, les dues 3-meA-DNA glicosilases i les dues vies del sistema NER va resultar ser també menys competitiva que la soca *wt*. No obstant això, la

seva capacitat infectiva aparentment no és menor que la de la soca UA1869, de la qual es diferencia tan sols per ser defectiva en la proteïna AlkA. És possible, doncs, que la causa de la menor competitivitat d'aquestes dues soques no sigui l'absència total d'una o altra activitat reparadora, sinó la suma de les diferents mancances, la qual no aconsegueixi contrarestar la varietat de lesions (diversitat en la llargària de les alquilacions, en les posicions que afecten, etc) que s'estiguin produint. Aquest raonament es veuria recolzat pel fet que ni les soques deficientes només en el sistema NER (Figura 5.3, banda dreta) ni les similars a UA1869 (Figura 5.3, banda esquerra) presenten una capacitat infectiva menor a la de la soca *wt*.

5.2.3. Origen del dany alquilant

Contràriament a l'observat durant la inoculació per via oral, la capacitat infectiva de la soca UA1869 no disminueix en relació a la soca *wt* quan és assajada per via ip (Figura 5.3, part inferior), fet que delimita la regió on es deu originar principalment el dany alquilant, ja que la via oral comprèn més etapes que la ip. En aquesta última les cèl·lules bacterianes accedeixen ràpidament a l'aparell circulatori, per on arribaran als òrgans més irrigats (Apartat 4.2.3.2); mentre que, en la via oral, el patogen ha de fer front a l'ambient del tracte gastrointestinal i als mecanismes de defensa que en ell tenen lloc (aquells que intenten evitar que els patògens aprofitin la ingesta per accedir al torrent sanguini per les mucoses intestinals). Per tant, en aquestes etapes, on precisament es dona la disminució de la competitivitat de la soca UA1869, s'hi inclouen situacions d'estrès com les causades per (Figura 5.4):

- L'acidesa del pH estomacal.
- La hidròlisi enzimàtica produïda per les sals biliars i altres secrecions gàstriques.
- La manca d'oxigen.
- La competència amb la microbiota intestinal, la qual estarà recobrint la major part de les cèl·lules epitelials intestinals, dificultant l'adhesió i la invasió d'aquestes.
- El sistema immunològic resident a l'aparell digestiu.
- Etc.

Tant aquestes situacions com la invasió de l'epiteli i la proliferació a la submucosa suposen un coll d'ampolla el qual, sumat a la naturalesa estocàstica dels primers estadis de la infecció, causaria una variació important en la proporció “soca mutant / soca *wt*” que accedeix a l'aparell circulatori [196] (en relació a la raó 1:1 inoculada inicialment). La presència d'aquest coll d'ampolla pot explicar la diferència entre els valors de LD₅₀ de les vies oral i ip per la soca ATCC14028 *wt*: mentre que en el primer cas el rang és de 10⁵ – 10⁶ cfu, en el segon cas la xifra és de 5 – 10 cfu, uns 5 ordres de magnitud menys (Apartat

3.2.5). A més, també permet justificar perquè la dispersió observada en les inoculacions orals és molt major que en la via ip (fins i tot en el cas de la soca pilot UA1872, on la casset estava situada en una regió intergènica; veure l'Apartat 4.2.3.1).

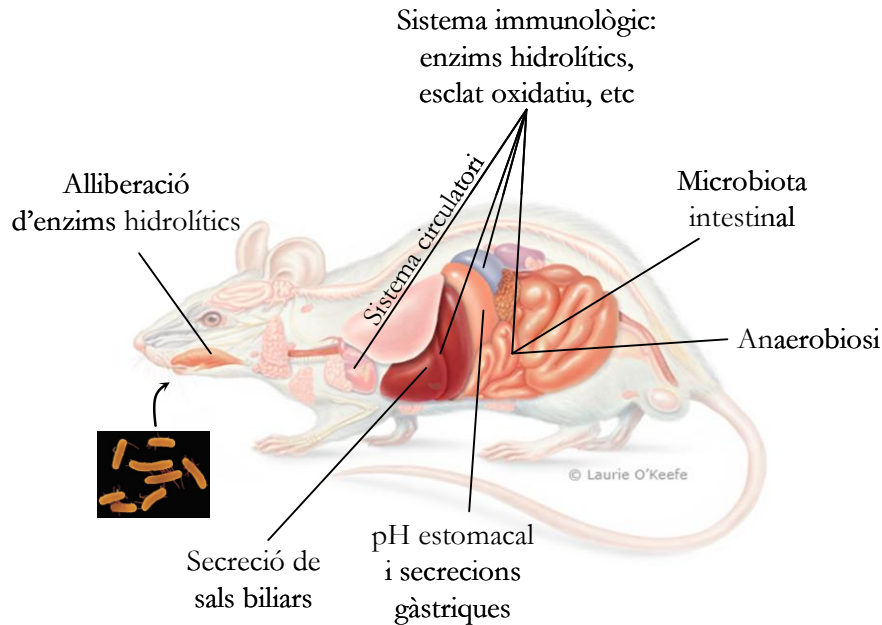


Figura 5.4. Principals fonts de dany en la inoculació oral. S'assenyala alguns dels mecanismes de defensa de l'organisme. La melsa es representa com a un òrgan blau per a diferenciar-la de l'estómac. Imatge adaptada de: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/cancer-research/learning-center/carcinogen-selector/digestive-system.html>.

159

Tanmateix, encara que aquestes situacions d'estrès afecten a la raó entre soca mutant i *wt* que accedeix a l'aparell circulatori, probablement no comporten un desavantatge en quant a la competitivitat de la soca mutant en relació a la *wt* (en termes de dany alquilant), ja que la realització de diferents assajos *in vitro* (Apartat 4.5.5) va permetre determinar que la soca UA1869:

- És capaç de desplegar els mecanismes de supervivència a la manca d'oxigen, ja que la seva capacitat per replicar en condicions d'anaerobiosi no disminueix en relació a la *wt*.
- No presenta una major sensibilitat al pH baix que la soca *wt*.
- Manté la seva integritat davant de sals biliars.

De fet, les característiques genotípiques de la soca UA1869 apunten a què la disminució de la capacitat competitiva tingui com a causa principal l'exposició a agents alquilants, ja siguin d'origen exogen o endogen, a l'interior de l'hoste:

- La microbiota intestinal podria utilitzar agents alquilants producte del seu metabolisme (per exemple, nitrosoguanidines sintetitzades a partir de la nitrosació d'amines [285]) per a reduir la competència per l'espai i els nutrients [299].
- La producció d'agents alquilants a partir de la nitrosació d'amines secundàries per nitrit es pot donar també espontàniament a l'estómac com a conseqüència del pH baix a partir de nitrats i nitrats de la dieta [12].
- Les altes concentracions d'òxid nítric (NO) alliberats pels macròfags durant el procés inflamatori (especialment durant la invasió de l'epiteli intestinal: Apartat 1.1.3) podria afavorir la reacció de nitrosació [77].
- La peroxidació de lípids causa també un augmentant dels nivells de NO [263].

5.3. Redundància dels mecanismes de reparació d'alquilacions

5.3.1. Redundància entre gens específics de reparació d'alquilacions

Observant els resultats de sensibilitat de soques com $\Delta alkA::Cm \Delta tag$ o $\Delta ada \Delta alkA \Delta alkB \Delta aidB::Cm$, on la mortalitat era molt elevada, especialment en presència d'MMS (Figura 5.1), és evident que l'exposició a agents alquilants dins de l'hoste no és tan elevada com en els assajos *in vitro* (Apartat 5.2.1). Tot i això, els resultats obtinguts *in vivo* també poden ser explicats en part pel solapament en les activitats de diferents gens.

160

Si es repassa la bibliografia sobre les lesions que reconeixen cada una de les proteïnes de les quals s'ha construït mutants és evident com existeix cert nivell de redundància en la reparació d'alquilacions. A partir de l'anàlisi dels assajos de supervivència (Figura 5.1) es pot definir la importància d'aquest solapament:

- L'acumulació de mutacions suposa en alguns casos un increment de la sensibilitat superior a l'esperada a partir de la suma d'efectes deleteris. La soca més destacable és $\Delta alkA::Cm \Delta tag$, on la mortalitat obtinguda en presència d'MNNG i d'MMS va ser molt superior a l'observada en els mutants $\Delta alkA::Cm$ i Δtag . Tant la proteïna AlkA com Tag reverteixen la 3-meA (Apartats 1.5.3 i 1.7.2), una lesió altament citotòxica generada molt freqüentment tant per agents alquilants S_N1 com S_N2 (Apartat 1.4.2.1), de manera que té associada aquestes dues proteïnes específiques de reparació per si es dona el cas de què una de les dues manqui. Un fenomen similar es dona en la soca $\Delta ada::Cm \Delta ogf \Delta tag$, on la conjunció de les tres mutacions produeix una disminució de la viabilitat molt superior a qualsevol de les soques defectives de les quals deriva.
- Alguns dels resultats obtinguts (Figura 5.1) probablement no són conseqüència directa de la redundància sinó de la inactivació de la resposta Ada, ja que, com es

va demostrar a l'Apartat 4.1, en presència d'agents metilants es genera certa inducció del gen *ada*. Així doncs, la diferència de sensibilitat a l'MMS observada entre les soques $\Delta ada::Cm \Delta tag$ i $\Delta ogt::Cm \Delta tag$ (ambdues defectives en una AGT i la proteïna Tag) podria ser deguda a una disminució en els nivells de les proteïnes de la resposta Ada en el primer cas. Com els gens *ada* i *alkB* formen part d'un operó [152], segurament la causa és la disminució de la proteïna AlkB, que juga un paper molt important en presència d'MMS [145]. Anàlogament, la sensibilitat de soques com $\Delta ada::Cm \Delta ogt \Delta tag$ no seria causada tan sols per la pèrdua de solapament sinó també com a conseqüència d'una possible disminució en els nivells transcripcionals dels gens de la resposta Ada.

- En el cas de les proteïnes Ada i Ogt, ambdues encarregades de la reparació d'O⁶-alquilguanines i O⁴-alquilimidines, el solapament inicial de les seves funcions s'ha aprofitat evolutivament per a obtenir una especialització en la seva activitat. Gràcies als assajos de supervivència a MNNG per les soques Δada i $\Delta ogt::Cm$ es va determinar que només la deficiència en la proteïna Ada produeix una disminució de la viabilitat cel·lular (Figura 5.1). Sumat als resultats d'altres estudis [388] es dedueix que la proteïna Ada intervé majoritàriament en supervivència cel·lular i estrès a àcids orgànics, mentre que la proteïna Ogt s'ha especialitzat en la protecció envers la fixació de mutacions (Apartat 1.8.2). No obstant això, Ogt actuaria també en supervivència cel·lular un cop s'hagués produït la inactivació de totes les proteïnes Ada, puix que el mutant $\Delta ada \Delta ogt::Cm$ presenta una supervivència menor que Δada encara que en la soca deficient només en Ogt no s'observin efectes deleteris.

161

5.3.2. Redundància entre diferents sistemes de reparació

El fet que ni tan sols una soca com $\Delta ada \Delta alkA \Delta alkB \Delta aidB \Delta ogt::Cm \Delta tag$, defectiva en tots els gens vinculats amb la reparació específica d'alquilacions, presenti una capacitat infectiva menor que la soca *wt* (Apartat 4.4.3) demostra que la redundància gènica s'estén també a altres sistemes de reparació (Apartat 1.5). La disminució de competitivitat obtinguda durant la inoculació per via oral de la soca UA1869 ($\Delta ada \Delta ogt \Delta tag \Delta mrrA \Delta mfd::Cm$) evidencia que el sistema NER també és capaç de suplir l'absència de les proteïnes específiques de reparació d'alquilacions:

- Per una banda, la inactivació tan sols del sistema NER (Figura 5.3, dreta) no és suficient per atenuar la capacitat infectiva de la soca, segurament gràcies a l'activitat de les proteïnes vinculades específicament a la reparació d'aquest tipus de lesions, que revertiran les metilacions (considerades les alquilacions més nocives [165, 298]) i algunes alquilacions de cadena més llarga (Taula 1.1). En la situació inversa, és a dir, quan són les proteïnes específiques les que manquen, és

el sistema NER (o altres mecanismes de reparació com el SOS o l'MMR: veure l'Apartat 1.5) el que permet mantenir la competitivitat de la soca.

- Per altra banda, la mutació dels gens *ada*, *ogt* i *tag*, sola o conjunta amb una de les vies del sistema NER (Figura 5.3, esquerra), tampoc provoca una disminució de la competitivitat del patogen. Per tant, és suficient l'activitat d'una fracció del sistema NER per a impedir arribar a una càrrega lesiva tal que es produeixi una caiguda en la capacitat infectiva (probablement per la col·laboració d'altres sistemes de reparació), fet que destaca encara més la importància de la redundància en les activitats reparadores enfront d'un mateix tipus de lesió.

Per tant, tenint en compte la diversitat en els sistemes de reparació que intervenen en la reparació d'alquilacions (alquiltransferases, la dioxigenasa AlkB, la proteïna de destoxicació AidB, els sistemes BER, NER, SOS i MMR, etc: veure l'Apartat 1.5), no té sentit parlar dels sistemes de reparació com a caixes estanques, sinó com a una *xarxa* interrelacionada *de reparació*, la qual presenta punts de solapament que possibiliten que la manca de diverses de proteïnes de reparació puguin ser suplertes per l'activitat d'altres de funció similar. És a dir, que es dona un fenomen de redundància que actua com a *suport* i que permet mantenir la integritat del genoma.

5.4. Conservació dels diferents mecanismes de reparació d'alquilacions

162

El número creixent de genomes complets que han estat seqüenciats i les eines d'anàlisi comparatiu han permès determinar l'adquisició i pèrdua en diferents grups dels gens vinculats a la reparació d'alquilacions [6, 70]. Segons aquests estudis, molts d'aquests mecanismes es troben presents en els tres dominis taxonòmics [6], de manera que el seu origen es troba en algun ancestre comú (Figura 5.5), a excepció d'algunes proteïnes, com Ada i Mfd, que van aparèixer dins del domini Bacteria [70]. Així mateix, la resposta Ada (que segons l'espècie presenta el domini regulador associat a activitat AGT o a AlkA: veure l'Apartat 1.9) podria haver-se originat inicialment per fer front a agents alquilants del tipus S_N1 [298], els quals podrien generar-se espontàniament en condicions de pH baix [344].

5.4.1. Conservació dels gens específics de reparació d'alquilacions

Com es pot apreciar a la Figura 5.5, diversos grups taxonòmics haurien anat perdent part dels gens de reparació d'alquilacions, probablement en funció de les característiques del seu nínxol ecològic [244]. En el cas dels enterobacteris, els gens específics de reparació d'alquilacions (Taula 4.1) es troben conservats i la majoria d'espècies encara mantenen la resposta Ada [82]. Com s'ha demostrat en els assajos de competitivitat, la

baixa exposició a agents alquilants a l'interior de l'organisme i la redundància en les activitats reparadores permet la pèrdua de vàries proteïnes de reparació sense suposar una disminució en la capacitat infectiva (Apartats 5.2 i 5.3). Segurament per aquests motius l'atenuació de la resposta a *S. Typhimurium* [114] no implica un desavantatge per al procés infectiu, tot i que el fet que totes les proteïnes específiques de reparació estiguin conservades i mantinguin la seva funció (Apartat 5.1) pot indicar que aporten una major capacitat d'adaptació enfront de determinades situacions del seu cicle vital, les quals no devien donar-se durant els assajos de competitivitat.

Tanmateix, un altre factor a tenir en compte per a la conservació d'aquestes proteïnes és la supervivència del patògen fora de l'hoste (Apartat 1.1.2) [68, 236, 311]. Durant aquest estadi, en què *S. Typhimurium* és capaç de sobreviure fins a varis mesos, segons les condicions ambientals [68], podria ser important l'exposició a agents alquilants exògens (alliberats per plantes i fongs, produïts químicament per nitrosació en sòls àcids o com a productes de la descomposició de matèria orgànica, etc: veure l'Apartat 1.4.3) o endògens (especialment en situacions d'estrès com la manca de nutrients).

5.4.2. Conservació del sistema NER

De manera anàloga a les proteïnes específiques de reparació d'alquilacions, l'eliminació només del sistema NER (Figura 5.3, banda dreta) no suposa una disminució de la competitivitat. A més, a partir dels assajos de sensibilitat a agents alquilants (Figura 5.2) es podria pensar que la contribució del sistema NER a la supervivència és molt menor que la de proteïnes específiques com Ada, Ogt o Tag. Ara bé, NER no només reconeix bases alquilades, sinó també altres lesions com dímers de pirimidina o trencaments de doble cadena (via GGR) [352], així com l'encallament de l'RNA polimerasa com a conseqüència de diverses classes de lesions (via TCR) [305].

És per aquest motiu que, encara que alguns dels gens de reparació d'alquilacions s'hagin perdut en diferents grups taxonòmics (Figura 5.5), els gens que componen el sistema NER són dels més conservats en l'evolució (junt amb els gens principals de replicació i de reparació per recombinació); mentre que proteïnes de reparació per reversió directa (com Ada i AlkB) o del sistema BER (com AlkA, Tag, Nfo o XthA) manquen en molts microorganismes [6, 70]. Tant és així que el sistema NER es troba conservat fins i tot en diversos microorganismes que presenten reducció gènica com *Buchnera aphidicola*, *Borrelia*, *Rickettsia* o *Chlamydia* [244], mentre que aquestes mateixes espècies no contenen els gens específics de reparació d'alquilacions.

Així i tot, els resultats de la present Tesi Doctoral apunten a què, en el cas de *S. Typhimurium*, totes les proteïnes de reparació d'alquilacions, incloses les que formen part de l'atenuada resposta Ada, desenvolupen un paper important en un o altre moment del seu cicle vital. Malgrat que la redundància gènica existent permet que només una soca

com la UA1869, deficient en una gamma àmplia d'activitats de reparació, es ressentí durant el procés infectiu, l'avantatge de comptar amb les diferents proteïnes de reparació ha permès la seva conservació i, fins i tot en alguns casos, l'especialització de les seves funcions.

164

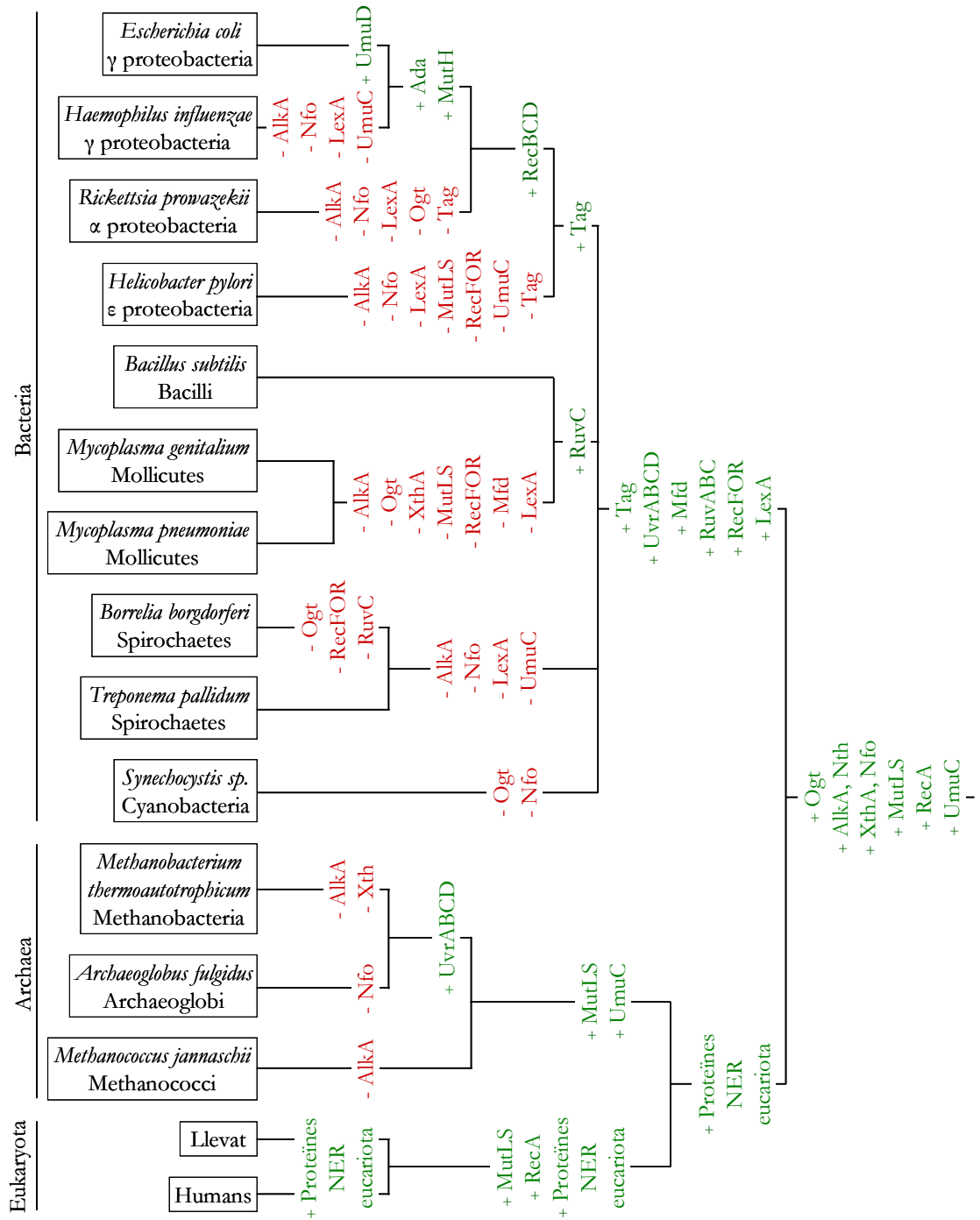


Figura 5.5. Adquisició i pèrdua de gens de reparació. A través d'un arbre evolutiu d'espècies dels tres dominis taxonòmics es representa l'adquisició (en verd) i pèrdua (en vermell) d'alguns dels gens que poden estar vinculats amb la reparació d'alquilacions. La longitud de les branques no és proporcional a l'antiguitat dels llinatges. *Adaptat de Eisen et al [70].*

6. Conclusions

Les principals conclusions que es poden extreure a partir dels resultats obtinguts en la present Tesi Doctoral són les següents:

1. El nivell d'inducció de la resposta Ada a la soca ATCC14028 de *S. enterica* ser. Typhimurium és equivalent al descrit en la bibliografia per la soca LT2 de *S. enterica* ser. Typhimurium i inferior a l'observat en *E. coli*.
2. La pèrdua d'un o més gens relacionats amb la reparació d'alquilacions no comporta una disminució de la viabilitat cel·lular en condicions de creixement no lesives, mentre que sí ho fa en presència d'agents alquilants.
3. Tant les soques deficientes en els gens *ada*, *alkA*, *alkB*, *aidB*, *ogt*, *tag*, *wvrA* i/o *mfd* com aquelles deficientes en combinacions dels 6 primers gens amb *wvrA* o *mfd* presenten una capacitat infectiva similar a la de la soca salvatge al realitzar estudis de competitivitat en ratolins BALB/c tant per via oral com intraperitoneal.
4. La soca UA1869 (defectiva en els gens *ada*, *ogt*, *tag*, *wvrA* i *mfd*) presenta una capacitat infectiva aproximadament 200 vegades inferior a la de la soca salvatge quan és inoculada per via oral. La disminució de la competitivitat seria conseqüència de la manca de proteïnes vinculades a diferents sistemes de reparació de DNA, de manera que no es podria fer front a la varietat de lesions generada dins de l'organisme.
5. El dany alquilant s'originaria principalment en els primers passos de la infecció per via oral. Un cop *S. enterica* ser. Typhimurium aconsegueix entrar en l'aparell circulatori i accedir als òrgans més irrigats els nivells d'aquest tipus de dany disminueixen i deixen de tenir importància sobre la virulència del bacteri.
6. Els nivells de dany alquilant dins de l'organisme hoste són poc significatius i no suposen un mecanisme de defensa efectiu contra la infecció per *S. enterica* ser. Typhimurium, ja que, malgrat l'elevada sensibilitat observada en els assajos *in vitro* en gairebé totes les soques mutants, tan sols la soca UA1869 va presentar una disminució de la capacitat infectiva.
7. La baixa rellevància dels mecanismes de reparació d'alquilacions durant el procés infectiu de *S. enterica* ser. Typhimurium suggereix que la seva importància podria radicar en la supervivència d'aquest microorganisme fora de l'hoste.
8. Els gens de reparació d'alquilacions de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium no es troben estancats en un sol sistema de reparació, sinó que es dona una xarxa de relacions entre diferents mecanismes. L'existència d'un cert solapament entre els diferents sistemes permet que l'absència d'un gen pugui ser suplerta total o parcialment per un altre.

7. Bibliografia

1. **Aas, P. A., M. Otterlei, P. O. Falnes, C. B. Vagbo, F. Skorpen, M. Akbari, O. Sundheim, M. Bjoras, G. Slupphaug, E. Seeberg, and H. E. Krokan.** 2003. Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature* **421**:859-63.
2. **Akimaru, H., K. Sakumi, T. Yoshikai, M. Anai, and M. Sekiguchi.** 1990. Positive and negative regulation of transcription by a cleavage product of Ada protein. *J. Mol. Biol.* **216**:261-73.
3. **Almiron, M., A. J. Link, D. Furlong, and R. Kolter.** 1992. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **6**:2646-54.
4. **Alpuche Aranda, C. M., J. A. Swanson, W. P. Loomis, and S. I. Miller.** 1992. *Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:10079-83.
5. **Altier, C.** 2005. Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *J. Microbiol.* **43 Spec No**:85-92.
6. **Ambur, O. H., T. Davidsen, S. A. Frye, S. V. Balasingham, K. Lagesen, T. Rognes, and T. Tonjum.** 2009. Genome dynamics in major bacterial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**:453-70.
7. **Aravind, L., and E. V. Koonin.** 2001. The DNA-repair protein AlkB, EGL-9, and leprecan define new families of 2-oxoglutarate- and iron-dependent dioxygenases. *Genome Biol.* **2**:RESEARCH0007.
8. **Arczewska, K. D., and J. T. Kusmierk.** 2007. Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 2. Role of bacterial mutator gene homologues in human disease. Overview of nucleotide pool sanitization and mismatch repair systems. *Acta Biochim. Pol.* **54**:435-57.
9. **Bassoe, C. F., and R. Bjerknes.** 1985. Phagocytosis by human leukocytes, phagosomal pH and degradation of seven species of bacteria measured by flow cytometry. *J. Med. Microbiol.* **19**:115-25.
10. **Basu, A. K., and J. M. Essigmann.** 1988. Site-specifically modified oligodeoxynucleotides as probes for the structural and biological effects of DNA-damaging agents. *Chem. Res. Toxicol.* **1**:1-18.
11. **Bearson, B. L., L. Wilson, and J. W. Foster.** 1998. A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress. *J. Bacteriol.* **180**:2409-17.
12. **Benjamin, N.** 2000. Nitrates in the human diet - good or bad? *Ann. Zootech.* **49**:207-216.
13. **Berdal, K. G., R. F. Johansen, and E. Seeberg.** 1998. Release of normal bases from intact DNA by a native DNA repair enzyme. *Embo J.* **17**:363-7.
14. **Bertani, G.** 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**:293-300.
15. **Bertrand, P., D. X. Tishkoff, N. Filosi, R. Dasgupta, and R. D. Kolodner.** 1998. Physical interaction between components of DNA mismatch repair and nucleotide excision repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:14278-83.
16. **Beuzon, C. R., and D. W. Holden.** 2001. Use of mixed infections with *Salmonella* strains to study virulence genes and their interactions in vivo. *Microbes Infect.* **3**:1345-52.
17. **Bhattacharyya, D., R. S. Foote, A. M. Boulden, and S. Mitra.** 1990. Physicochemical studies of human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase. *Eur. J. Biochem.* **193**:337-43.
18. **Bjelland, S., N. K. Birkeland, T. Benneche, G. Volden, and E. Seeberg.** 1994. DNA glycosylase activities for thymine residues oxidized in the methyl group are functions of the AlkA enzyme in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**:30489-95.

19. **Bodell, W. J., and B. Singer.** 1979. Influence of hydrogen bonding in DNA and polynucleotides on reaction of nitrogens and oxygens toward ethylnitrosourea. *Biochemistry* **18**:2860-3.
20. **Bohannon, D. E., N. Connell, J. Keener, A. Tormo, M. Espinosa-Urgel, M. M. Zambrano, and R. Kolter.** 1991. Stationary-phase-inducible "gearbox" promoters: differential effects of *katF* mutations and role of sigma 70. *J. Bacteriol.* **173**:4482-92.
21. **Bohr, V. A., C. A. Smith, D. S. Okumoto, and P. C. Hanawalt.** 1985. DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the *DHFR* gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell* **40**:359-69.
22. **Bordes, P., F. Repoila, A. Kolb, and C. Gutierrez.** 2000. Involvement of differential efficiency of transcription by Esigmas and Esigma70 RNA polymerase holoenzymes in growth phase regulation of the *Escherichia coli osmE* promoter. *Mol. Microbiol.* **35**:845-53.
23. **Bowles, T., A. H. Metz, J. O'Quin, Z. Wawrzak, and B. F. Eichman.** 2008. Structure and DNA binding of alkylation response protein AidB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**:15299-304.
24. **Broomfield, S., T. Hryciw, and W. Xiao.** 2001. DNA postreplication repair and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* **486**:167-84.
25. **Brown, M., Y. Zhu, S. M. Hemmingsen, and W. Xiao.** 2002. Structural and functional conservation of error-free DNA postreplication repair in *Schizosaccharomyces pombe*. *DNA Repair (Amst)* **1**:869-80.
26. **Brown, S. P., S. J. Cornell, M. Sheppard, A. J. Grant, D. J. Maskell, B. T. Grenfell, and P. Mastroeni.** 2006. Intracellular demography and the dynamics of *Salmonella enterica* infections. *PLoS Biol.* **4**:e349.
27. **Buchmeier, N. A., and F. Heffron.** 1991. Inhibition of macrophage phagosome-lysosome fusion by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **59**:2232-8.
28. **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**:1047-53.
29. **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**:933-6.
30. **Bullas, L. R., and J. I. Ryu.** 1983. *Salmonella typhimurium* LT2 strains which are r- m+ for all three chromosomally located systems of DNA restriction and modification. *J. Bacteriol.* **156**:471-4.
31. **Cadet, J., A. G. Bourdat, C. D'Ham, V. Duarte, D. Gasparutto, A. Romieu, and J. L. Ravanat.** 2000. Oxidative base damage to DNA: specificity of base excision repair enzymes. *Mutat. Res.* **462**:121-8.
32. **Calmels, S., H. Ohshima, and H. Bartsch.** 1988. Nitrosamine formation by denitrifying and non-denitrifying bacteria: implication of nitrite reductase and nitrate reductase in nitrosation catalysis. *J. Gen. Microbiol.* **134**:221-6.
33. **Calmels, S., H. Ohshima, H. Rosenkranz, E. McCoy, and H. Bartsch.** 1987. Biochemical studies on the catalysis of nitrosation by bacteria. *Carcinogenesis* **8**:1085-8.
34. **Carter, P. B., and F. M. Collins.** 1974. The route of enteric infection in normal mice. *J. Exp. Med.* **139**:1189-203.
35. **Ceccoli, J., N. Rosales, M. Goldstein, and D. B. Yarosh.** 1988. Polyclonal antibodies against O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in adapted bacteria. *Mutat. Res.* **194**:219-26.
36. **Chakravorty, D., I. Hansen-Wester, and M. Hensel.** 2002. *Salmonella* pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular *Salmonella* from reactive nitrogen intermediates. *J. Exp. Med.* **195**:1155-66.
37. **Challis, B. C., N. Carman, M. H. R. Fernandes, B. R. Glover, F. Latif, P. Patel, J. S. Sandhu, and S. Shuja.** 1994. Peptide nitrosations. *ACS Symp. Ser.* **553**:74-92.

38. **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.
39. **Cherepanov, P. P., and W. Wackernagel.** 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Km^R cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**:9-14.
40. **Cirillo, D. M., R. H. Valdivia, D. M. Monack, and S. Falkow.** 1998. Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol. Microbiol.* **30**:175-88.
41. **Clark, D., and O. Maaløe.** 1967. DNA replication and the division cycle in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **23**:99 - 112.
42. **Clauss, M., and N. Grotjohann.** 2009. Comparative mutagenesis of *Escherichia coli* strains with different repair deficiencies irradiated with 222-nm and 254-nm ultraviolet light. *Mutat. Res.* **673**:83-6.
43. **Colland, F., N. Fujita, D. Kotlarz, J. A. Bown, C. F. Meares, A. Ishihama, and A. Kolb.** 1999. Positioning of sigma(S), the stationary phase sigma factor, in *Escherichia coli* RNA polymerase-promoter open complexes. *Embo J.* **18**:4049-59.
44. **Courcelle, J., A. Khodursky, B. Peter, P. O. Brown, and P. C. Hanawalt.** 2001. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics* **158**:41-64.
45. **Cromie, G. A., J. C. Connelly, and D. R. Leach.** 2001. Recombination at double-strand breaks and DNA ends: conserved mechanisms from phage to humans. *Mol. Cell* **8**:1163-74.
46. **Daniels, D. S., C. D. Mol, A. S. Arvai, S. Kanugula, A. E. Pegg, and J. A. Tainer.** 2000. Active and alkylated human AGT structures: a novel zinc site, inhibitor and extrahelical base binding. *Embo J.* **19**:1719-30.
47. **Daniels, D. S., and J. A. Tainer.** 2000. Conserved structural motifs governing the stoichiometric repair of alkylated DNA by O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Mutat. Res.* **460**:151-63.
48. **Datsenko, K. A., and B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:6640-5.
49. **Davis, R. W., D. Botstein, and J. R. Roth.** 1980. Advanced bacterial genetics. A manual for genetic engineering. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
50. **De Groote, M. A., U. A. Ochsner, M. U. Shiloh, C. Nathan, J. M. McCord, M. C. Dinauer, S. J. Libby, A. Vazquez-Torres, Y. Xu, and F. C. Fang.** 1997. Periplasmic superoxide dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:13997-4001.
51. **Deaconescu, A. M., A. L. Chambers, A. J. Smith, B. E. Nickels, A. Hochschild, N. J. Savery, and S. A. Darst.** 2006. Structural basis for bacterial transcription-coupled DNA repair. *Cell* **124**:507-20.
52. **Delaney, J. C., L. Smeester, C. Wong, L. E. Frick, K. Taghizadeh, J. S. Wishnok, C. L. Drennan, L. D. Samson, and J. M. Essigmann.** 2005. AlkB reverses etheno DNA lesions caused by lipid oxidation in vitro and in vivo. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**:855-60.
53. **Demple, B.** 1986. Mutant *Escherichia coli* Ada proteins simultaneously defective in the repair of O⁶-methylguanine and in gene activation. *Nucleic Acids Res.* **14**:5575-89.
54. **Demple, B., A. Jacobsson, M. Olsson, P. Robins, and T. Lindahl.** 1982. Repair of alkylated DNA in *Escherichia coli*. Physical properties of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **257**:13776-80.
55. **Demple, B., B. Sedgwick, P. Robins, N. Totty, M. D. Waterfield, and T. Lindahl.** 1985. Active site and complete sequence of the suicidal methyltransferase that counters alkylation mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:2688-92.

56. **Dillingham, M. S., and S. C. Kowalczykowski.** 2008. RecBCD enzyme and the repair of double-stranded DNA breaks. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* **72**:642-71, Table of Contents.
57. **Ding, H., E. Hidalgo, and B. Demple.** 1996. The redox state of the [2Fe-2S] clusters in SoxR protein regulates its activity as a transcription factor. *J. Biol. Chem.* **271**:33173-5.
58. **Dinglay, S., B. Gold, and B. Sedgwick.** 1998. Repair in *Escherichia coli alkB* mutants of abasic sites and 3-methyladenine residues in DNA. *Mutat. Res.* **407**:109-16.
59. **Dinglay, S., S. C. Treweek, T. Lindahl, and B. Sedgwick.** 2000. Defective processing of methylated single-stranded DNA by *E. coli* AlkB mutants. *Genes Dev.* **14**:2097-105.
60. **Doetsch, P. W., and R. P. Cunningham.** 1990. The enzymology of apurinic/apyrimidinic endonucleases. *Mutat. Res.* **236**:173-201.
61. **Donahue, B. A., S. Yin, J. S. Taylor, D. Reines, and P. C. Hanawalt.** 1994. Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:8502-6.
62. **Donaldson, J. R., C. T. Courcelle, and J. Courcelle.** 2006. RuvABC is required to resolve holliday junctions that accumulate following replication on damaged templates in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **281**:28811-21.
63. **Dosanjh, M. K., B. Singer, and J. M. Essigmann.** 1991. Comparative mutagenesis of O⁶-methylguanine and O⁴-methylthymine in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **30**:7027-33.
64. **Drablos, F., E. Feyzi, P. A. Aas, C. B. Vaagbo, B. Kavli, M. S. Bratlie, J. Pena-Diaz, M. Otterlei, G. Slupphaug, and H. E. Krokan.** 2004. Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)* **3**:1389-407.
65. **Drohat, A. C., K. Kwon, D. J. Krosky, and J. T. Stivers.** 2002. 3-Methyladenine DNA glycosylase I is an unexpected helix-hairpin-helix superfamily member. *Nat. Struct. Biol.* **9**:659-64.
66. **Dunlap, N. E., W. H. Benjamin, Jr., R. D. McCall, Jr., A. B. Tilden, and D. E. Briles.** 1991. A 'safe-site' for *Salmonella typhimurium* is within splenic cells during the early phase of infection in mice. *Microb. Pathog.* **10**:297-310.
67. **Durbach, S. I., B. Springer, E. E. Machowski, R. J. North, K. G. Papavinasundaram, M. J. Colston, E. C. Bottger, and V. Mizrahi.** 2003. DNA alkylation damage as a sensor of nitrosative stress in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **71**:997-1000.
68. **Dworking, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K. Schleifer, and E. Stackebrandt.** 2006. *The Prokaryotes*, vol. 6 Proteobacteria: Gamma Subclass. Springer, New York.
69. **Eggleston, A. K., and S. C. West.** 1997. Recombination initiation: easy as A, B, C, D... chi²? *Curr. Biol.* **7**:R745-9.
70. **Eisen, J. A., and P. C. Hanawalt.** 1999. A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes. *Mutat. Res.* **435**:171-213.
71. **Eisenstein, T. K., D. Huang, J. J. Meissler, Jr., and B. al-Ramadi.** 1994. Macrophage nitric oxide mediates immunosuppression in infectious inflammation. *Immunobiology* **191**:493-502.
72. **el Ghissassi, F., A. Barbin, J. Nair, and H. Bartsch.** 1995. Formation of 1,N⁶-ethenoadenine and 3,N⁴-ethenocytosine by lipid peroxidation products and nucleic acid bases. *Chem. Res. Toxicol.* **8**:278-83.
73. **Ellermeier, J. R., and J. M. Slauch.** 2007. Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**:24-9.
74. **Ellermeier, J. R., and J. M. Slauch.** 2008. Fur regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system through HilD. *J. Bacteriol.* **190**:476-86.
75. **Eriksson, S., S. Lucchini, A. Thompson, M. Rhen, and J. C. Hinton.** 2003. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* **47**:103-18.

76. **Erill, I., S. Campoy, and J. Barbe.** 2007. Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**:637-56.
77. **Espey, M. G., K. M. Miranda, D. D. Thomas, S. Xavier, D. Citrin, M. P. Vitek, and D. A. Wink.** 2002. A chemical perspective on the interplay between NO, reactive oxygen species, and reactive nitrogen oxide species. *Ann. NY Acad. Sci.* **962**:195-206.
78. **Evensen, G., and E. Seeberg.** 1982. Adaptation to alkylation resistance involves the induction of a DNA glycosylase. *Nature* **296**:773-5.
79. **Falnes, P. O., R. F. Johansen, and E. Seeberg.** 2002. AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature* **419**:178-82.
80. **Falnes, P. O., and T. Rognes.** 2003. DNA repair by bacterial AlkB proteins. *Res. Microbiol.* **154**:531-8.
81. **Farr, S. B., and T. Kogoma.** 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* **55**:561-85.
82. **Fernandez de Henestrosa, A. R., and J. Barbe.** 1991. Induction of the *alkA* gene of *Escherichia coli* in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **173**:7736-40.
83. **Fernandez De Henestrosa, A. R., T. Ogi, S. Aoyagi, D. Chafin, J. J. Hayes, H. Ohmori, and R. Woodgate.** 2000. Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **35**:1560-72.
84. **Ficht, T. A.** 2003. Intracellular survival of *Brucella*: defining the link with persistence. *Vet. Microbiol.* **92**:213-23.
85. **Fields, P. I., R. V. Swanson, C. G. Haidaris, and F. Heffron.** 1986. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:5189-93.
86. **Fink, R. C., M. R. Evans, S. Porwollik, A. Vazquez-Torres, J. Jones-Carson, B. Troxell, S. J. Libby, M. McClelland, and H. M. Hassan.** 2007. FNR is a global regulator of virulence and anaerobic metabolism in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028s). *J. Bacteriol.* **189**:2262-73.
87. **Finlay, B. B.** 1994. Molecular and cellular mechanisms of *Salmonella* pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **192**:163-85.
88. **Finn, G. J., and S. Condon.** 1975. Regulation of catalase synthesis in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **123**:570-9.
89. **Foote, R. S., S. Mitra, and B. C. Pal.** 1980. Demethylation of O⁶-methylguanine in a synthetic DNA polymer by an inducible activity in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **97**:654-9.
90. **Foster, J. W., and H. K. Hall.** 1992. Effect of *Salmonella typhimurium* ferric uptake regulator (*fur*) mutations on iron- and pH-regulated protein synthesis. *J. Bacteriol.* **174**:4317-23.
91. **Foster, J. W., and H. K. Hall.** 1991. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **173**:5129-35.
92. **Frick, L. E., J. C. Delaney, C. Wong, C. L. Drennan, and J. M. Essigmann.** 2007. Alleviation of 1,N⁶-ethanoadenine genotoxicity by the *Escherichia coli* adaptive response protein AlkB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**:755-60.
93. **Friedberg, E. C., G. C. Walker, and W. Siede.** 1995. DNA Repair and Mutagenesis. ASM Press, Washington, DC.
94. **Fuchs, R. P., S. Fujii, and J. Wagner.** 2004. Properties and functions of *Escherichia coli*: Pol IV and Pol V. *Adv. Protein Chem.* **69**:229-64.
95. **Galan, J. E.** 1996. Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol. Microbiol.* **20**:263-71.
96. **Galan, J. E., and R. Curtiss, 3rd.** 1989. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:6383-7.
97. **Ganesan, A. K., A. J. Smith, N. J. Savery, P. Zamos, and P. C. Hanawalt.** 2007. Transcription coupled nucleotide excision repair in *Escherichia coli* can be affected by

- changing the arginine at position 529 of the beta subunit of RNA polymerase. DNA Repair (Amst) **6**:1434-40.
98. **Garcia-del Portillo, F.** 2001. *Salmonella* intracellular proliferation: where, when and how? Microbes Infect. **3**:1305-11.
99. **Garcia-del Portillo, F., and B. B. Finlay.** 1995. Targeting of *Salmonella typhimurium* to vesicles containing lysosomal membrane glycoproteins bypasses compartments with mannose 6-phosphate receptors. J. Cell Biol. **129**:81-97.
100. **Garcia-Santos Mdel, P., E. Calle, and J. Casado.** 2001. Amino acid nitrosation products as alkylating agents. J. Am. Chem. Soc. **123**:7506-10.
101. **Garvis, S. G., C. R. Beuzon, and D. W. Holden.** 2001. A role for the PhoP/Q regulon in inhibition of fusion between lysosomes and *Salmonella*-containing vacuoles in macrophages. Cell Microbiol. **3**:731-44.
102. **Gasparutto, D., C. Dherin, S. Boiteux, and J. Cadet.** 2002. Excision of 8-methylguanine site-specifically incorporated into oligonucleotide substrates by the AlkA protein of *Escherichia coli*. DNA Repair (Amst) **1**:437-47.
103. **Gaston, K., A. Bell, A. Kolb, H. Buc, and S. Busby.** 1990. Stringent spacing requirements for transcription activation by CRP. Cell **62**:733-43.
104. **Gonzalez-Flecha, B., and B. Demple.** 2000. Genetic responses to free radicals. Homeostasis and gene control. Ann. NY Acad. Sci. **899**:69-87.
105. **Goodman, M. F., and R. Woodgate.** 2000. The biochemical basis and in vivo regulation of SOS-induced mutagenesis promoted by *Escherichia coli* DNA polymerase V (UmuD'2C). Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **65**:31-40.
106. **Goodwin, K. D., R. Tokarczyk, F. C. Stephens, and E. S. Saltzman.** 2005. Description of toluene inhibition of methyl bromide biodegradation in seawater and isolation of a marine toluene oxidizer that degrades methyl bromide. Appl. Environ. Microbiol. **71**:3495-503.
107. **Graham, S. M., C. A. Hart, E. M. Molyneux, A. L. Walsh, and M. E. Molyneux.** 2000. Malaria and *Salmonella* infections: cause or coincidence? Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **94**:227.
108. **Greenberg, J. T., P. Monach, J. H. Chou, P. D. Josephy, and B. Demple.** 1990. Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**:6181-5.
109. **Grenfell, B. T., O. G. Pybus, J. R. Gog, J. L. Wood, J. M. Daly, J. A. Mumford, and E. C. Holmes.** 2004. Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens. Science **303**:327-32.
110. **Grzesiuk, E., A. Gozdek, and B. Tudek.** 2001. Contribution of *E. coli* AlkA, TagA glycosylases and UvrABC-excinuclease in MMS mutagenesis. Mutat. Res. **480-481**:77-84.
111. **Guttenplan, J. B.** 1979. Comutagenic effects exerted by N-nitroso compounds. Mutat. Res. **66**:25-32.
112. **Guttenplan, J. B., and S. Milstein.** 1982. Resistance of *Salmonella typhimurium* TA 1535 to O⁶-guanine methylation and mutagenesis induced by low doses of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine: an apparent constitutive repair activity. Carcinogenesis **3**:327-31.
113. **Habraken, Y., C. A. Carter, M. Sekiguchi, and D. B. Ludlum.** 1991. Release of N²,3-ethanoguanine from haloethylnitrosourea-treated DNA by *Escherichia coli* 3-methyladenine DNA glycosylase II. Carcinogenesis **12**:1971-3.
114. **Hakura, A., K. Morimoto, T. Sofuni, and T. Nohmi.** 1991. Cloning and characterization of the *Salmonella typhimurium* *ada* gene, which encodes O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase. J. Bacteriol. **173**:3663-72.
115. **Hamilton, J. T., W. C. McRoberts, F. Keppler, R. M. Kalin, and D. B. Harper.** 2003. Chloride methylation by plant pectin: an efficient environmentally significant process. Science **301**:206-9.
116. **Hanawalt, P. C.** 2002. Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. Oncogene **21**:8949-56.

117. **Hanawalt, P. C., P. K. Cooper, A. K. Ganesan, and C. A. Smith.** 1979. DNA repair in bacteria and mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.* **48**:783-836.
118. **Handa, N., A. Ichige, and I. Kobayashi.** 2009. Contribution of RecFOR machinery of homologous recombination to cell survival after loss of a restriction-modification gene complex. *Microbiology* **155**:2320-32.
119. **Handa, N., K. Morimatsu, S. T. Lovett, and S. C. Kowalczykowski.** 2009. Reconstitution of initial steps of dsDNA break repair by the RecF pathway of *E. coli*. *Genes Dev.* **23**:1234-45.
120. **Harrison, K. L., R. Jukes, D. P. Cooper, and D. E. Shuker.** 1999. Detection of concomitant formation of O⁶-carboxymethyl- and O⁶-methyl-2'-deoxyguanosine in DNA exposed to nitrosated glycine derivatives using a combined immunoaffinity/HPLC method. *Chem. Res. Toxicol.* **12**:106-11.
121. **He, C., J. C. Hus, L. J. Sun, P. Zhou, D. P. Norman, V. Dotsch, H. Wei, J. D. Gross, W. S. Lane, G. Wagner, and G. L. Verdine.** 2005. A methylation-dependent electrostatic switch controls DNA repair and transcriptional activation by *E. coli* *ada*. *Mol. Cell* **20**:117-29.
122. **He, C., and G. L. Verdine.** 2002. Trapping distinct structural states of a protein/DNA interaction through disulfide crosslinking. *Chem. Biol.* **9**:1297-303.
123. **He, C., H. Wei, and G. L. Verdine.** 2003. Converting the sacrificial DNA repair protein N-ada into a catalytic methyl phosphotriester repair enzyme. *J. Am. Chem. Soc.* **125**:1450-1.
124. **Heffernan, E. J., S. Reed, J. Hackett, J. Fierer, C. Roudier, and D. Guiney.** 1992. Mechanism of resistance to complement-mediated killing of bacteria encoded by the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid gene *rck*. *J. Clin. Invest.* **90**:953-64.
125. **Hengge-Aronis, R.** 1999. Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:148-52.
126. **Hill-Perkins, M., M. D. Jones, and P. Karran.** 1986. Site-specific mutagenesis in vivo by single methylated or deaminated purine bases. *Mutat. Res.* **162**:153-63.
127. **Hix, S., S. Morais Mda, and O. Augusto.** 1995. DNA methylation by tert-butyl hydroperoxide-iron (II). *Free Radic. Biol. Med.* **19**:293-301.
128. **Hohmann, E. L.** 2001. Nontyphoidal salmonellosis. *Clin. Infect. Dis.* **32**:263-9.
129. **Hollis, T., A. Lau, and T. Ellenberger.** 2000. Structural studies of human alkyladenine glycosylase and *E. coli* 3-methyladenine glycosylase. *Mutat. Res.* **460**:201-10.
130. **Hook, E. W.** 1990. *Salmonella* species (including typhoid fever), p. 1256-1269. *In* G. L. Mandell, R. G. Douglas, and J. E. Bennet (ed.), *Principles and practice of infectious diseases*. John Wiley & Sons, New York, N.Y.
131. **Horii, T., T. Ogawa, T. Nakatani, T. Hase, H. Matsubara, and H. Ogawa.** 1981. Regulation of SOS functions: purification of *E. coli* LexA protein and determination of its specific site cleaved by the RecA protein. *Cell* **27**:515-22.
132. **Ibanez-Ruiz, M., V. Robbe-Saule, D. Hermant, S. Labrude, and F. Norel.** 2000. Identification of RpoS (sigma(S))-regulated genes in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J. Bacteriol.* **182**:5749-56.
133. **Ihara, K., H. Kawate, L. L. Chueh, H. Hayakawa, and M. Sekiguchi.** 1994. Requirement of the Pro-Cys-His-Arg sequence for O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase activity revealed by saturation mutagenesis with negative and positive screening. *Mol. Gen. Genet.* **243**:379-89.
134. **Ikeda, Y., and K. Tanaka.** 1983. Purification and characterization of isovaleryl coenzyme A dehydrogenase from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **258**:1077-85.
135. **Ishibashi, Y., and T. Arai.** 1990. Specific inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages mediated by *Salmonella typhimurium* infection. *FEMS Microbiol. Immunol.* **2**:35-43.
136. **Ishihama, A.** 1997. Adaptation of gene expression in stationary phase bacteria. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**:582-8.

137. **Ishihama, A.** 1992. Role of the RNA polymerase alpha subunit in transcription activation. *Mol. Microbiol.* **6**:3283-8.
138. **Jeggo, P.** 1979. Isolation and characterization of *Escherichia coli* K-12 mutants unable to induce the adaptive response to simple alkylating agents. *J. Bacteriol.* **139**:783-91.
139. **Jones, B. D., N. Ghorji, 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.
140. **Karran, P., T. Hjelmgren, and T. Lindahl.** 1982. Induction of a DNA glycosylase for N-methylated purines is part of the adaptive response to alkylating agents. *Nature* **296**:770-3.
141. **Karran, P., and T. Lindahl.** 1978. Enzymatic excision of free hypoxanthine from polydeoxynucleotides and DNA containing deoxyinosine monophosphate residues. *J. Biol. Chem.* **253**:5877-9.
142. **Karran, P., T. Lindahl, I. Ofsteng, G. B. Evensen, and E. Seeberg.** 1980. *Escherichia coli* mutants deficient in 3-methyladenine-DNA glycosylase. *J. Mol. Biol.* **140**:101-27.
143. **Kasai, H., A. Iida, Z. Yamaizumi, S. Nishimura, and H. Tanooka.** 1990. 5-Formyldeoxyuridine: a new type of DNA damage induced by ionizing radiation and its mutagenicity to *Salmonella* strain TA102. *Mutat. Res.* **243**:249-53.
144. **Kataoka, H., and M. Sekiguchi.** 1985. Molecular cloning and characterization of the *alkB* gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **198**:263-9.
145. **Kataoka, H., Y. Yamamoto, and M. Sekiguchi.** 1983. A new gene (*alkB*) of *Escherichia coli* that controls sensitivity to methyl methane sulfonate. *J. Bacteriol.* **153**:1301-7.
146. **Kimball, R. F.** 1980. Further studies on the induction of mutation in *Haemophilus influenzae* by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine: lack of an inducible error-free repair system and the effect of exposure medium. *Mutat. Res.* **72**:361-72.
147. **Kitade, Y., S. Ootsuka, O. Iitsuka, and N. Saga.** 2003. Effect of DMSO on PCR of *Porphyra yezoensis* (*Rhodophyta*) gene. *J. Appl. Phycol.* **15**:555-557.
148. **Kleibl, K.** 2002. Molecular mechanisms of adaptive response to alkylating agents in *Escherichia coli* and some remarks on O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase in other organisms. *Mutat. Res.* **512**:67-84.
149. **Kodama, M., and H. Saito.** 1980. Formation of methylurea from methylamine and carbamyl phosphate: a possible environmental hazard. *Cancer Lett.* **10**:319-24.
150. **Koivisto, P., T. Duncan, T. Lindahl, and B. Sedgwick.** 2003. Minimal methylated substrate and extended substrate range of *Escherichia coli* AlkB protein, a 1-methyladenine-DNA dioxygenase. *J. Biol. Chem.* **278**:44348-54.
151. **Kolb, A., D. Kotlarz, S. Kusano, and A. Ishihama.** 1995. Selectivity of the *Escherichia coli* RNA polymerase E sigma 38 for overlapping promoters and ability to support CRP activation. *Nucleic Acids Res.* **23**:819-26.
152. **Kondo, H., Y. Nakabeppu, H. Kataoka, S. Kuhara, S. Kawabata, and M. Sekiguchi.** 1986. Structure and expression of the *alkB* gene of *Escherichia coli* related to the repair of alkylated DNA. *J. Biol. Chem.* **261**:15772-7.
153. **Kreider, C. A.** 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1102-6.
154. **Krwawicz, J., K. D. Arczewska, E. Speina, A. Maciejewska, and E. Grzesiuk.** 2007. Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 1. Mutations in genes involved in base excision repair (BER) and DNA-end processors and their implication in mutagenesis and human disease. *Acta Biochim. Pol.* **54**:413-34.
155. **Kuhle, V., and M. Hensel.** 2004. Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *Cell Mol. Life Sci.* **61**:2812-26.
156. **Kunisaki, N., and M. Hayashi.** 1979. Formation of N-nitrosamines from secondary amines and nitrite by resting cells of *Escherichia coli* B. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**:279-82.

157. **Kwon, K., C. Cao, and J. T. Stivers.** 2003. A novel zinc snap motif conveys structural stability to 3-methyladenine DNA glycosylase I. *J. Biol. Chem.* **278**:19442-6.
158. **Labahn, J., O. D. Scharer, A. Long, K. Ezaz-Nikpay, G. L. Verdine, and T. E. Ellenberger.** 1996. Structural basis for the excision repair of alkylation-damaged DNA. *Cell* **86**:321-9.
159. **Landini, P., J. A. Bown, M. R. Volkert, and S. J. Busby.** 1998. Ada protein-RNA polymerase sigma subunit interaction and alpha subunit-promoter DNA interaction are necessary at different steps in transcription initiation at the *Escherichia coli* *ada* and *aidB* promoters. *J. Biol. Chem.* **273**:13307-12.
160. **Landini, P., and S. J. Busby.** 1999. The *Escherichia coli* Ada protein can interact with two distinct determinants in the sigma70 subunit of RNA polymerase according to promoter architecture: identification of the target of Ada activation at the *alkA* promoter. *J. Bacteriol.* **181**:1524-9.
161. **Landini, P., and S. J. Busby.** 1999. Expression of the *Escherichia coli* *ada* regulon in stationary phase: evidence for *rpoS*-dependent negative regulation of *alkA* transcription. *J. Bacteriol.* **181**:6836-9.
162. **Landini, P., T. Gaal, W. Ross, and M. R. Volkert.** 1997. The RNA polymerase alpha subunit carboxyl-terminal domain is required for both basal and activated transcription from the *alkA* promoter. *J. Biol. Chem.* **272**:15914-9.
163. **Landini, P., L. I. Hajec, L. H. Nguyen, R. R. Burgess, and M. R. Volkert.** 1996. The leucine-responsive regulatory protein (Lrp) acts as a specific repressor for sigma s-dependent transcription of the *Escherichia coli* *aidB* gene. *Mol. Microbiol.* **20**:947-55.
164. **Landini, P., L. I. Hajec, and M. R. Volkert.** 1994. Structure and transcriptional regulation of the *Escherichia coli* adaptive response gene *aidB*. *J. Bacteriol.* **176**:6583-9.
165. **Landini, P., and M. R. Volkert.** 2000. Regulatory responses of the adaptive response to alkylation damage: a simple regulon with complex regulatory features. *J. Bacteriol.* **182**:6543-9.
166. **Landini, P., and M. R. Volkert.** 1995. RNA polymerase alpha subunit binding site in positively controlled promoters: a new model for RNA polymerase-promoter interaction and transcriptional activation in the *Escherichia coli* *ada* and *aidB* genes. *Embo J.* **14**:4329-35.
167. **Landini, P., and M. R. Volkert.** 1995. Transcriptional activation of the *Escherichia coli* adaptive response gene *aidB* is mediated by binding of methylated Ada protein. Evidence for a new consensus sequence for Ada-binding sites. *J. Biol. Chem.* **270**:8285-9.
168. **Lange, R., and R. Hengge-Aronis.** 1991. Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**:49-59.
169. **Larson, K., J. Sahm, R. Shenkar, and B. Strauss.** 1985. Methylation-induced blocks to in vitro DNA replication. *Mutat. Res.* **150**:77-84.
170. **Laval, J., J. Jurado, M. Sapparbaev, and O. Sidorkina.** 1998. Antimutagenic role of base-excision repair enzymes upon free radical-induced DNA damage. *Mutat. Res.* **402**:93-102.
171. **Lawley, P. D.** 1974. Some chemical aspects of dose-response relationships in alkylation mutagenesis. *Mutat. Res.* **23**:283-95.
172. **Lemotte, P. K., and G. C. Walker.** 1985. Induction and autoregulation of *ada*, a positively acting element regulating the response of *Escherichia coli* K-12 to methylating agents. *J. Bacteriol.* **161**:888-95.
173. **Lin, F. R., X. M. Wang, H. S. Hsu, V. R. Mumaw, and I. Nakoneczna.** 1987. Electron microscopic studies on the location of bacterial proliferation in the liver in murine salmonellosis. *Br. J. Exp. Pathol.* **68**:539-50.
174. **Lin, Y., V. Dotsch, T. Wintner, K. Peariso, L. C. Myers, J. E. Penner-Hahn, G. L. Verdine, and G. Wagner.** 2001. Structural basis for the functional switch of the *E. coli* Ada protein. *Biochemistry* **40**:4261-71.

175. **Lindahl, T.** 1979. DNA glycosylases, endonucleases for apurinic/apyrimidinic sites, and base excision-repair. *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* **22**:135-92.
176. **Lindahl, T.** 1982. DNA repair enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **51**:61-87.
177. **Lindahl, T., B. Demple, and P. Robins.** 1982. Suicide inactivation of the *E. coli* O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase. *Embo J.* **1**:1359-63.
178. **Lindahl, T., B. Sedgwick, M. Sekiguchi, and Y. Nakabeppu.** 1988. Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents. *Annu. Rev. Biochem.* **57**:133-57.
179. **Loechler, E. L., C. L. Green, and J. M. Essigmann.** 1984. In vivo mutagenesis by O⁶-methylguanine built into a unique site in a viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:6271-5.
180. **Loewen, P. C., B. Hu, J. Strutinsky, and R. Sparling.** 1998. Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol* **44**:707-17.
181. **Loewen, P. C., and B. L. Triggs.** 1984. Genetic mapping of *katF*, a locus that with *katE* affects the synthesis of a second catalase species in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **160**:668-75.
182. **Loveless, A.** 1969. Possible relevance of O-6 alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides. *Nature* **223**:206-7.
183. **Lu, S. C.** 2000. S-Adenosylmethionine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**:391-5.
184. **Ludlum, D. B.** 1970. The properties of 7-methylguanine-containing templates for ribonucleic acid polymerase. *J. Biol. Chem.* **245**:477-82.
185. **Lutz, W. K.** 1990. Endogenous genotoxic agents and processes as a basis of spontaneous carcinogenesis. *Mutat. Res.* **238**:287-95.
186. **Mackay, W. J., S. Han, and L. D. Samson.** 1994. DNA alkylation repair limits spontaneous base substitution mutations in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**:3224-30.
187. **MacMicking, J., Q. W. Xie, and C. Nathan.** 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**:323-50.
188. **Maddukuri, L., D. Dudzinska, and B. Tudek.** 2007. Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 4. The role of nucleotide excision DNA repair (NER) system in mammalian cells. *Acta Biochim. Pol.* **54**:469-82.
189. **Marcotte, E. M., M. Pellegrini, H. L. Ng, D. W. Rice, T. O. Yeates, and D. Eisenberg.** 1999. Detecting protein function and protein-protein interactions from genome sequences. *Science* **285**:751-3.
190. **Margison, G. P., D. P. Cooper, and J. Brennand.** 1985. Cloning of the *E. coli* O⁶-methylguanine and methylphosphotriester methyltransferase gene using a functional DNA repair assay. *Nucleic Acids Res.* **13**:1939-52.
191. **Margison, G. P., D. P. Cooper, and P. M. Potter.** 1990. The *E. coli* *ogt* gene. *Mutat. Res.* **233**:15-21.
192. **Marnett, L. J.** 1994. DNA adducts of alpha,beta-unsaturated aldehydes and dicarbonyl compounds. *IARC Sci. Publ.*:151-63.
193. **Martinez, A., and R. Kolter.** 1997. Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *J. Bacteriol.* **179**:5188-94.
194. **Martins-Pinheiro, M., R. C. Marques, and C. F. Menck.** 2007. Genome analysis of DNA repair genes in the alpha proteobacterium *Caulobacter crescentus*. *BMC Microbiol* **7**:17.
195. **Maskell, D. J., C. E. Hormaeche, K. A. Harrington, H. S. Joysey, and F. Y. Liew.** 1987. The initial suppression of bacterial growth in a salmonella infection is mediated by a localized rather than a systemic response. *Microb. Pathog.* **2**:295-305.
196. **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.
197. **Mastroeni, P., and N. Menager.** 2003. Development of acquired immunity to *Salmonella*. *J. Med. Microbiol* **52**:453-9.

198. **Mastroeni, P., and M. Sheppard.** 2004. Salmonella infections in the mouse model: host resistance factors and in vivo dynamics of bacterial spread and distribution in the tissues. *Microbes Infect.* **6**:398-405.
199. **Matijasevic, Z., M. Sekiguchi, and D. B. Ludlum.** 1992. Release of N²,3-ethenoguanine from chloroacetaldehyde-treated DNA by *Escherichia coli* 3-methyladenine DNA glycosylase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:9331-4.
200. **Mattes, W. B., C. S. Lee, J. Laval, and T. R. O'Connor.** 1996. Excision of DNA adducts of nitrogen mustards by bacterial and mammalian 3-methyladenine-DNA glycosylases. *Carcinogenesis* **17**:643-8.
201. **Mazon, G., G. Philippin, J. Cadet, D. Gasparutto, and R. P. Fuchs.** 2009. The alkyltransferase-like *ybaZ* gene product enhances nucleotide excision repair of O(6)-alkylguanine adducts in *E. coli*. *DNA Repair (Amst)* **8**:697-703.
202. **McCarthy, J. G., B. V. Edington, and P. F. Schendel.** 1983. Inducible repair of phosphotriesters in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:7380-4.
203. **McCarthy, T. V., P. Karran, and T. Lindahl.** 1984. Inducible repair of O-alkylated DNA pyrimidines in *Escherichia coli*. *Embo J.* **3**:545-50.
204. **McCarthy, T. V., and T. Lindahl.** 1985. Methyl phosphotriesters in alkylated DNA are repaired by the Ada regulatory protein of *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* **13**:2683-98.
205. **McCullough, A. K., M. L. Dodson, and R. S. Lloyd.** 1999. Initiation of base excision repair: glycosylase mechanisms and structures. *Annu. Rev. Biochem.* **68**:255-85.
206. **McKenzie, G. J., P. L. Lee, M. J. Lombardo, P. J. Hastings, and S. M. Rosenberg.** 2001. SOS mutator DNA polymerase IV functions in adaptive mutation and not adaptive amplification. *Mol. Cell* **7**:571-9.
207. **Meier, I., S. E. Shephard, and W. K. Lutz.** 1990. Nitrosation of aspartic acid, aspartame, and glycine ethylester. Alkylation of 4-(p-nitrobenzyl)pyridine (NBP) in vitro and binding to DNA in the rat. *Mutat. Res.* **238**:193-201.
208. **Mellon, I.** 2005. Transcription-coupled repair: a complex affair. *Mutat. Res.* **577**:155-61.
209. **Mellon, I., and G. N. Champe.** 1996. Products of DNA mismatch repair genes *mutS* and *mutL* are required for transcription-coupled nucleotide-excision repair of the lactose operon in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:1292-7.
210. **Memisoglu, A., and L. Samson.** 2000. Base excision repair in yeast and mammals. *Mutat. Res.* **451**:39-51.
211. **Menck, C. F.** 2002. Shining a light on photolyases. *Nat Genet* **32**:338-9.
212. **Meng, W., N. J. Savery, S. J. Busby, and M. S. Thomas.** 2000. The *Escherichia coli* RNA polymerase alpha subunit linker: length requirements for transcription activation at CRP-dependent promoters. *Embo J.* **19**:1555-66.
213. **Michan, C., M. Manchado, G. Dorado, and C. Pueyo.** 1999. In vivo transcription of the *Escherichia coli* *oxyR* regulon as a function of growth phase and in response to oxidative stress. *J. Bacteriol.* **181**:2759-64.
214. **Miller, J. F., J. J. Mekalanos, and S. Falkow.** 1989. Coordinate regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence. *Science* **243**:916-22.
215. **Miller, P. S., S. Chandrasegaran, D. L. Dow, S. M. Pulford, and L. S. Kan.** 1982. Synthesis and template properties of an ethyl phosphotriester modified decadeoxyribonucleotide. *Biochemistry* **21**:5468-74.
216. **Miller, S. I., W. S. Pulkkinen, M. E. Selsted, and J. J. Mekalanos.** 1990. Characterization of defensin resistance phenotypes associated with mutations in the *phoP* virulence regulon of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **58**:3706-10.
217. **Mishina, Y., C. G. Yang, and C. He.** 2005. Direct repair of the exocyclic DNA adduct 1,N⁶-ethenoadenine by the DNA repair AlkB proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **127**:14594-5.
218. **Mitra, S., B. C. Pal, and R. S. Foote.** 1982. O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in wild-type and *ada* mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **152**:534-7.
219. **Modrich, P.** 1991. Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu Rev Genet* **25**:229-53.

220. **Monti, P., P. Campomenosi, Y. Ciribilli, R. Iannone, A. Inga, D. Shah, G. Scott, P. A. Burns, P. Menichini, A. Abbondandolo, B. Gold, and G. Fronza.** 2002. Influences of base excision repair defects on the lethality and mutagenicity induced by Me-lex, a sequence-selective N³-adenine methylating agent. *J. Biol. Chem.* **277**:28663-8.
221. **Moore, M. H., J. M. Gulbis, E. J. Dodson, B. Demple, and P. C. Moody.** 1994. Crystal structure of a suicidal DNA repair protein: the Ada O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase from *E. coli*. *Embo J.* **13**:1495-501.
222. **Morgan, R. W., M. F. Christman, F. S. Jacobson, G. Storz, and B. N. Ames.** 1986. Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other stress proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:8059-63.
223. **Morimatsu, K., and S. C. Kowalczykowski.** 2003. RecFOR proteins load RecA protein onto gapped DNA to accelerate DNA strand exchange: a universal step of recombinational repair. *Mol. Cell* **11**:1337-47.
224. **Morohoshi, F., K. Hayashi, and N. Munakata.** 1990. *Bacillus subtilis* *ada* operon encodes two DNA alkyltransferases. *Nucleic Acids Res.* **18**:5473-80.
225. **Mulholland, E. K., and R. A. Adegbola.** 2005. Bacterial infections--a major cause of death among children in Africa. *N. Engl. J. Med.* **352**:75-7.
226. **Myers, L. C., M. P. Terranova, A. E. Ferentz, G. Wagner, and G. L. Verdine.** 1993. Repair of DNA methylphosphotriesters through a metalloactivated cysteine nucleophile. *Science* **261**:1164-7.
227. **Myers, L. C., and G. L. Verdine.** 1994. DNA repair proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**:51-59.
228. **Nakabeppu, Y., H. Kondo, S. Kawabata, S. Iwanaga, and M. Sekiguchi.** 1985. Purification and structure of the intact Ada regulatory protein of *Escherichia coli* K12, O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **260**:7281-8.
229. **Nakabeppu, Y., H. Kondo, and M. Sekiguchi.** 1984. Cloning and characterization of the *alkA* gene of *Escherichia coli* that encodes 3-methyladenine DNA glycosylase II. *J. Biol. Chem.* **259**:13723-9.
230. **Nakabeppu, Y., Y. Mine, and M. Sekiguchi.** 1985. Regulation of expression of the cloned *ada* gene in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* **146**:155-67.
231. **Nakabeppu, Y., T. Miyata, H. Kondo, S. Iwanaga, and M. Sekiguchi.** 1984. Structure and expression of the *alkA* gene of *Escherichia coli* involved in adaptive response to alkylating agents. *J. Biol. Chem.* **259**:13730-6.
232. **Nakabeppu, Y., and M. Sekiguchi.** 1986. Regulatory mechanisms for induction of synthesis of repair enzymes in response to alkylating agents: Ada protein acts as a transcriptional regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:6297-301.
233. **Nakamura, T., Y. Tokumoto, K. Sakumi, G. Koike, Y. Nakabeppu, and M. Sekiguchi.** 1988. Expression of the *ada* gene of *Escherichia coli* in response to alkylating agents. Identification of transcriptional regulatory elements. *J. Mol. Biol.* **202**:483-94.
234. **Napolitano, R., R. Janel-Bintz, J. Wagner, and R. P. Fuchs.** 2000. All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis. *Embo J.* **19**:6259-65.
235. **Nash, H. M., S. D. Bruner, O. D. Scharer, T. Kawate, T. A. Addona, E. Spooner, W. S. Lane, and G. L. Verdine.** 1996. Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily. *Curr. Biol.* **6**:968-80.
236. **Natvig, E. E., S. C. Ingham, B. H. Ingham, L. R. Cooperband, and T. R. Roper.** 2002. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* contamination of root and leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:2737-44.
237. **Neidhardt, F. C., Editor in chief.** 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology, vol. ASM Press.

238. **Nickoloff, J. A., and M. F. Hoekstra.** 1998. DNA Damage and Repair: DNA Repair in Prokaryotes and Lower Eukaryotes, vol. 1. Humana Press, Totowa, NJ.
239. **Nieminuszczy, J., and E. Grzesiuk.** 2007. Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 3. AlkB dioxygenase and Ada methyltransferase in the direct repair of alkylated DNA. *Acta Biochim. Pol.* **54**:459-68.
240. **Nieminuszczy, J., C. Janion, and E. Grzesiuk.** 2006. Mutator specificity of *Escherichia coli alkB117* allele. *Acta Biochim. Pol.* **53**:425-8.
241. **Nieminuszczy, J., A. Sikora, M. Wrzesinski, C. Janion, and E. Grzesiuk.** 2006. AlkB dioxygenase in preventing MMS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: effect of Pol V and AlkA proteins. *DNA Repair (Amst)* **5**:181-8.
242. **Nowosielska, A.** 2007. Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 5. The role of recombination in DNA repair and genome stability. *Acta Biochim. Pol.* **54**:483-94.
243. **Nowosielska, A., S. A. Smith, B. P. Engelward, and M. G. Marinus.** 2006. Homologous recombination prevents methylation-induced toxicity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **34**:2258-68.
244. **Ochman, H., and N. A. Moran.** 2001. Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science* **292**:1096-9.
245. **Olsson, M., and T. Lindahl.** 1980. Repair of alkylated DNA in *Escherichia coli*. Methyl group transfer from O⁶-methylguanine to a protein cysteine residue. *J. Biol. Chem.* **255**:10569-71.
246. **Ougland, R., C. M. Zhang, A. Liiv, R. F. Johansen, E. Seeberg, Y. M. Hou, J. Remme, and P. O. Falnes.** 2004. AlkB restores the biological function of mRNA and tRNA inactivated by chemical methylation. *Mol. Cell* **16**:107-16.
247. **Pang, T., Z. A. Bhutta, B. B. Finlay, and M. Altwegg.** 1995. Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge. *Trends Microbiol.* **3**:253-5.
248. **Park, J. S., M. T. Marr, and J. W. Roberts.** 2002. *E. coli* Transcription repair coupling factor (Mfd protein) rescues arrested complexes by promoting forward translocation. *Cell* **109**:757-67.
249. **Parker, B. O., and M. G. Marinus.** 1992. Repair of DNA heteroduplexes containing small heterologous sequences in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:1730-4.
250. **Pauly, G. T., S. H. Hughes, and R. C. Moschel.** 1994. Response of repair-competent and repair-deficient *Escherichia coli* to three O⁶-substituted guanines and involvement of methyl-directed mismatch repair in the processing of O⁶-methylguanine residues. *Biochemistry* **33**:9169-77.
251. **Paz y Miño, C., A. Creus, O. Cabré, and P. E. Leone.** 2002. Genética toxicológica y carcinogénesis. **PUCE/FUNDACYT**.
252. **Pegg, A. E.** 1984. Methylation of the O⁶ position of guanine in DNA is the most likely initiating event in carcinogenesis by methylating agents. *Cancer Invest.* **2**:223-31.
253. **Pegg, A. E., and T. L. Byers.** 1992. Repair of DNA containing O⁶-alkylguanine. *Faseb. J.* **6**:2302-10.
254. **Persky, N. S., and S. T. Lovett.** 2008. Mechanisms of recombination: lessons from *E. coli*. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **43**:347-70.
255. **Pieper, R. O.** 1998. Cellular responses to methylation damage. In J. A. Nickoloff and M. F. Hoekstra (ed.), *DNA Damage and Repair: DNA Repair in Higher Eukaryotes*, Vol. 2. Humana Press, Totowa, NJ.
256. **Posnick, L. M., and L. D. Samson.** 1999. Imbalanced base excision repair increases spontaneous mutation and alkylation sensitivity in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**:6763-71.
257. **Posnick, L. M., and L. D. Samson.** 1999. Influence of S-adenosylmethionine pool size on spontaneous mutation, dam methylation, and cell growth of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**:6756-62.

258. **Potter, P. M., K. Kleibl, L. Cawkwell, and G. P. Margison.** 1989. Expression of the *ogt* gene in wild-type and ada mutants of *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* **17**:8047-60.
259. **Potter, P. M., M. C. Wilkinson, J. Fitton, F. J. Carr, J. Brennan, D. P. Cooper, and G. P. Margison.** 1987. Characterisation and nucleotide sequence of *ogt*, the O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase gene of *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* **15**:9177-93.
260. **Prescott, A. G., and M. D. Lloyd.** 2000. The iron(II) and 2-oxoacid-dependent dioxygenases and their role in metabolism. *Nat. Prod. Rep.* **17**:367-83.
261. **Prieto, A. I., F. Ramos-Morales, and J. Casadesus.** 2006. Repair of DNA damage induced by bile salts in *Salmonella enterica*. *Genetics* **174**:575-84.
262. **Privezentzev, C. V., M. Saparbaev, A. Sambandam, M. M. Greenberg, and J. Laval.** 2000. AlkA protein is the third *Escherichia coli* DNA repair protein excising a ring fragmentation product of thymine. *Biochemistry* **39**:14263-8.
263. **Radi, R., J. S. Beckman, K. M. Bush, and B. A. Freeman.** 1991. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**:481-7.
264. **Radman, M.** 1975. SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. *Basic Life Sci.* **5A**:355-67.
265. **Ralt, D., J. S. Wishnok, R. Fitts, and S. R. Tannenbaum.** 1988. Bacterial catalysis of nitrosation: involvement of the *nar* operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**:359-64.
266. **Rebeck, G. W., S. Coons, P. Carroll, and L. Samson.** 1988. A second DNA methyltransferase repair enzyme in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:3039-43.
267. **Rebeck, G. W., and L. Samson.** 1991. Increased spontaneous mutation and alkylation sensitivity of *Escherichia coli* strains lacking the *ogt* O⁶-methylguanine DNA repair methyltransferase. *J. Bacteriol.* **173**:2068-76.
268. **Rebeck, G. W., C. M. Smith, D. L. Goad, and L. Samson.** 1989. Characterization of the major DNA repair methyltransferase activity in unadapted *Escherichia coli* and identification of a similar activity in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **171**:4563-8.
- 184 269. **Rescigno, M., M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, R. Bonasio, F. Granucci, J. P. Kraehenbuhl, and P. Ricciardi-Castagnoli.** 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* **2**:361-7.
270. **Riazuddin, S., and T. Lindahl.** 1978. Properties of 3-methyladenine-DNA glycosylase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **17**:2110-8.
271. **Robins, P., and J. Cairns.** 1979. Quantitation of the adaptive response to alkylating agents. *Nature* **280**:74-6.
272. **Rohankhedkar, M. S., S. B. Mulrooney, W. J. Wedemeyer, and R. P. Hausinger.** 2006. The AidB component of the *Escherichia coli* adaptive response to alkylating agents is a flavin-containing, DNA-binding protein. *J. Bacteriol.* **188**:223-30.
273. **Rozenski, J., P. F. Crain, and J. A. McCloskey.** 1999. The RNA Modification Database: 1999 update. *Nucleic Acids Res.* **27**:196-7.
274. **Rydberg, B., and T. Lindahl.** 1982. Nonenzymatic methylation of DNA by the intracellular methyl group donor S-adenosyl-L-methionine is a potentially mutagenic reaction. *Embo J.* **1**:211-6.
275. **Ryle, M. J., and R. P. Hausinger.** 2002. Non-heme iron oxygenases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**:193-201.
276. **Saffhill, R.** 1985. In vitro miscoding of alkylthymines with DNA and RNA polymerases. *Chem. Biol. Interact* **53**:121-30.
277. **Saffhill, R., G. P. Margison, and P. J. O'Connor.** 1985. Mechanisms of carcinogenesis induced by alkylating agents. *Biochim. Biophys. Acta* **823**:111-45.
278. **Saget, B. M., and G. C. Walker.** 1994. The Ada protein acts as both a positive and a negative modulator of *Escherichia coli*'s response to methylating agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:9730-4.

279. **Sakai, A., and M. M. Cox.** 2009. RecFOR and RecOR as distinct RecA loading pathways. *J. Biol. Chem.* **284**:3264-72.
280. **Sakashita, H., T. Sakuma, Y. Akitomo, T. Ohkubo, M. Kainosho, M. Sekiguchi, and K. Morikawa.** 1995. Sequence-specific DNA recognition of the *Escherichia coli* Ada protein associated with the methylation-dependent functional switch for transcriptional regulation. *J. Biochem* **118**:1184-91.
281. **Sakumi, K., and M. Sekiguchi.** 1989. Regulation of expression of the *ada* gene controlling the adaptive response. Interactions with the *ada* promoter of the Ada protein and RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **205**:373-85.
282. **Sakumi, K., and M. Sekiguchi.** 1990. Structures and functions of DNA glycosylases. *Mutat. Res.* **236**:161-72.
283. **Samson, L.** 1992. The suicidal DNA repair methyltransferases of microbes. *Mol. Microbiol.* **6**:825-31.
284. **Samson, L., J. Thomale, and M. F. Rajewsky.** 1988. Alternative pathways for the in vivo repair of O⁶-alkylguanine and O⁴-alkylthymine in *Escherichia coli*: the adaptive response and nucleotide excision repair. *Embo J.* **7**:2261-7.
285. **Sandercock, L. E., M. C. Kwok, H. A. Luchman, S. C. Mark, J. L. Giesbrecht, L. D. Samson, and F. R. Jirik.** 2004. Mutational-reporter transgenes rescued from mice lacking either Mgmt, or both Mgmt and Msh6 suggest that O⁶-alkylguanine-induced miscoding does not contribute to the spontaneous mutational spectrum. *Oncogene* **23**:5931-40.
286. **SantaLucia, J., Jr.** 1998. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:1460-5.
287. **Saparbaev, M., K. Kleibl, and J. Laval.** 1995. *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, rat and human 3-methyladenine DNA glycosylases repair 1,N⁶-ethenoadenine when present in DNA. *Nucleic Acids Res.* **23**:3750-5.
288. **Saparbaev, M., and J. Laval.** 1994. Excision of hypoxanthine from DNA containing dIMP residues by the *Escherichia coli*, yeast, rat, and human alkylpurine DNA glycosylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:5873-7.
289. **Sassanfar, M., M. K. Dosanjh, J. M. Essigmann, and L. Samson.** 1991. Relative efficiencies of the bacterial, yeast, and human DNA methyltransferases for the repair of O⁶-methylguanine and O⁴-methylthymine. Suggestive evidence for O⁴-methylthymine repair by eukaryotic methyltransferases. *J. Biol. Chem.* **266**:2767-71.
290. **Savery, N. J.** 2007. The molecular mechanism of transcription-coupled DNA repair. *Trends Microbiol.* **15**:326-33.
291. **Schellhorn, H. E., and V. L. Stones.** 1992. Regulation of *katF* and *katE* in *Escherichia coli* K-12 by weak acids. *J. Bacteriol.* **174**:4769-76.
292. **Schendel, P. F., M. Defais, P. Jeggo, L. Samson, and J. Cairns.** 1978. Pathways of mutagenesis and repair in *Escherichia coli* exposed to low levels of simple alkylating agents. *J. Bacteriol.* **135**:466-75.
293. **Schendel, P. F., and P. E. Robins.** 1978. Repair of O⁶-methylguanine in adapted *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:6017-20.
294. **Schmieger, H.** 1972. Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities. *Mol. Gen. Genet.* **119**:75-88.
295. **Schofield, C. J., and Z. Zhang.** 1999. Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**:722-31.
296. **Scicchitano, D. A., E. C. Olesnick, and A. Dimitri.** 2004. Transcription and DNA adducts: what happens when the message gets cut off? *DNA Repair (Amst)* **3**:1537-48.
297. **Sedgwick, B.** 1997. Nitrosated peptides and polyamines as endogenous mutagens in O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase deficient cells. *Carcinogenesis* **18**:1561-7.
298. **Sedgwick, B.** 2004. Repairing DNA-methylation damage. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**:148-57.

299. **Sedgwick, B., and T. Lindahl.** 2002. Recent progress on the Ada response for inducible repair of DNA alkylation damage. *Oncogene* **21**:8886-94.
300. **Sedgwick, B., P. Robins, N. Totty, and T. Lindahl.** 1988. Functional domains and methyl acceptor sites of the *Escherichia coli* Ada protein. *J. Biol. Chem.* **263**:4430-3.
301. **Sedgwick, B., and P. Vaughan.** 1991. Widespread adaptive response against environmental methylating agents in microorganisms. *Mutat. Res.* **250**:211-21.
302. **Seeberg, E., and K. G. Berdal.** 1999. Base excision repair of DNA damage: repair of alkylation damage to DNA, p. 151-168. *In* I. Hickson (ed.). Austin, T. X.: Landes Bioscience.
303. **Seeberg, E., L. Eide, and M. Bjoras.** 1995. The base excision repair pathway. *Trends Biochem. Sci.* **20**:391-7.
304. **Selby, C. P., and A. Sancar.** 1991. Gene- and strand-specific repair in vitro: partial purification of a transcription-repair coupling factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:8232-6.
305. **Selby, C. P., and A. Sancar.** 1994. Mechanisms of transcription-repair coupling and mutation frequency decline. *Microbiol. Rev.* **58**:317-29.
306. **Selby, C. P., and A. Sancar.** 1993. Molecular mechanism of transcription-repair coupling. *Science* **260**:53-8.
307. **Selby, C. P., and A. Sancar.** 1995. Structure and function of transcription-repair coupling factor. I. Structural domains and binding properties. *J. Biol. Chem.* **270**:4882-9.
308. **Selby, C. P., and A. Sancar.** 1995. Structure and function of transcription-repair coupling factor. II. Catalytic properties. *J. Biol. Chem.* **270**:4890-5.
309. **Selby, C. P., and A. Sancar.** 1990. Transcription preferentially inhibits nucleotide excision repair of the template DNA strand in vitro. *J. Biol. Chem.* **265**:21330-6.
310. **Selby, C. P., E. M. Witkin, and A. Sancar.** 1991. *Escherichia coli mfd* mutant deficient in "mutation frequency decline" lacks strand-specific repair: in vitro complementation with purified coupling factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:11574-8.
- 186 311. **Semenov, A. V., L. van Overbeek, and A. H. van Bruggen.** 2009. Percolation and survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in soil amended with contaminated dairy manure or slurry. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:3206-15.
312. **Serment, J., M. Breña, and J. Espinosa.** 2005. La respuesta SOS en *Escherichia coli*. *Tip Revista especializada en ciencias químico-biológicas (Universidad Nacional Autónoma de México)* **2**:99-105.
313. **Shelobolina, E. S., S. A. Sullivan, K. R. O'Neill, K. P. Nevin, and D. R. Lovley.** 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. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:2959-65.
314. **Sheppard, M., C. Webb, F. Heath, V. Mallows, R. Emilianus, D. Maskell, and P. Mastroeni.** 2003. Dynamics of bacterial growth and distribution within the liver during *Salmonella* infection. *Cell Microbiol.* **5**:593-600.
315. **Shere, K. D., M. B. Goldberg, and R. H. Rubin.** 1998. *Salmonella* infections. *In* S. L. Gorbarch, J. G. Bartlett, and N. R. Blacklow (ed.), *Infectious diseases*, 2nd edition.
316. **Shevell, D. E., A. M. Abou-Zamzam, B. Demple, and G. C. Walker.** 1988. Construction of an *Escherichia coli* K-12 *ada* deletion by gene replacement in a *recD* strain reveals a second methyltransferase that repairs alkylated DNA. *J. Bacteriol.* **170**:3294-6.
317. **Shevell, D. E., P. K. LeMotte, and G. C. Walker.** 1988. Alteration of the carboxyl-terminal domain of Ada protein influences its inducibility, specificity, and strength as a transcriptional activator. *J. Bacteriol.* **170**:5263-71.
318. **Shevell, D. E., and G. C. Walker.** 1991. A region of the Ada DNA-repair protein required for the activation of *ada* transcription is not necessary for activation of *alkA*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:9001-5.

319. **Siebers, A., and B. B. Finlay.** 1996. M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. *Trends Microbiol.* **4**:22-9.
320. **Singer, B.** 1976. All oxygens in nucleic acids react with carcinogenic ethylating agents. *Nature* **264**:333-9.
321. **Singer, B., and D. Grunberger.** 1983. *Molecular biology of mutagens and carcinogens: reactions of directly acting agents with nucleic acids.* Plenum Press, New York.
322. **Skorvaga, M., N. D. Raven, and G. P. Margison.** 1998. Thermostable archaeal O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:6711-5.
323. **Smith, A. J., and N. J. Savery.** 2005. RNA polymerase mutants defective in the initiation of transcription-coupled DNA repair. *Nucleic Acids Res.* **33**:755-64.
324. **Snow, E. T., R. S. Foote, and S. Mitra.** 1984. Base-pairing properties of O⁶-methylguanine in template DNA during in vitro DNA replication. *J. Biol. Chem.* **259**:8095-100.
325. **Spratt, T. E., and C. R. Campbell.** 1994. Synthesis of oligodeoxynucleotides containing analogs of O⁶-methylguanine and reaction with O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Biochemistry* **33**:11364-71.
326. **Stojic, L., R. Brun, and J. Jiricny.** 2004. Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair (Amst)* **3**:1091-101.
327. **Storz, G., L. A. Tartaglia, and B. N. Ames.** 1990. Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science* **248**:189-94.
328. **Su, L. H., and C. H. Chiu.** 2007. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Med. J.* **30**:210-9.
329. **Su, S. S., R. S. Lahue, K. G. Au, and P. Modrich.** 1988. Mismatch specificity of methyl-directed DNA mismatch correction in vitro. *J. Biol. Chem.* **263**:6829-35.
330. **Sutton, M. D., B. T. Smith, V. G. Godoy, and G. C. Walker.** 2000. The SOS response: recent insights into UmuDC-dependent mutagenesis and DNA damage tolerance. *Annu. Rev. Genet.* **34**:479-497.
331. **Suvarnapunya, A. E., H. A. Lagasse, and M. A. Stein.** 2003. The role of DNA base excision repair in the pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.* **48**:549-59.
332. **Suvarnapunya, A. E., and M. A. Stein.** 2005. DNA base excision repair potentiates the protective effect of *Salmonella* Pathogenicity Island 2 within macrophages. *Microbiology* **151**:557-67.
333. **Svejstrup, J. Q.** 2002. Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**:21-9.
334. **Takahashi, K., and Y. Kawazoe.** 1987. Methyl iodide, a potent inducer of the adaptive response without appreciable mutagenicity in *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **144**:447-53.
335. **Takahashi, K., and Y. Kawazoe.** 1987. Potent induction of the adaptive response by a weak mutagen, methyl iodide, in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* **180**:163-9.
336. **Takahashi, K., Y. Kawazoe, K. Sakumi, Y. Nakabeppu, and M. Sekiguchi.** 1988. Activation of Ada protein as a transcriptional regulator by direct alkylation with methylating agents. *J. Biol. Chem.* **263**:13490-2.
337. **Taketomi, A., Y. Nakabeppu, K. Ihara, D. J. Hart, M. Furuichi, and M. Sekiguchi.** 1996. Requirement for two conserved cysteine residues in the Ada protein of *Escherichia coli* for transactivation of the *ada* promoter. *Mol. Gen. Genet.* **250**:523-32.
338. **Tam, M. A., A. Rydstrom, M. Sundquist, and M. J. Wick.** 2008. Early cellular responses to *Salmonella* infection: dendritic cells, monocytes, and more. *Immunol. Rev.* **225**:140-62.
339. **Tamir, S., T. deRojas-Walker, J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum.** 1996. DNA damage and genotoxicity by nitric oxide. *Methods Enzymol.* **269**:230-43.

340. **Tang, M., X. Shen, E. G. Frank, M. O'Donnell, R. Woodgate, and M. F. Goodman.** 1999. UmuD'(2)C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**:8919-24.
341. **Tao, K., K. Makino, S. Yonei, A. Nakata, and H. Shinagawa.** 1991. Purification and characterization of the *Escherichia coli* OxyR protein, the positive regulator for a hydrogen peroxide-inducible regulon. J. Biochem. **109**:262-6.
342. **Tartof, K. D., and C. A. Hoobs.** 1987. Improved media for growing plasmid and cosmid clones. Beteshda Research Laboratory Focus **9**:12.
343. **Tauxe, R. V.** 1997. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. Emerg. Infect. Dis. **3**:425-34.
344. **Taverna, P., and B. Sedgwick.** 1996. Generation of an endogenous DNA-methylating agent by nitrosation in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **178**:5105-11.
345. **Teo, I., B. Sedgwick, M. W. Kilpatrick, T. V. McCarthy, and T. Lindahl.** 1986. The intracellular signal for induction of resistance to alkylating agents in *E. coli*. Cell **45**:315-24.
346. **Teo, I. A.** 1987. Proteolytic processing of the Ada protein that repairs DNA O⁶-methylguanine residues in *E. coli*. Mutat. Res. **183**:123-7.
347. **Thomas, E. L., R. I. Lehrer, and R. F. Rest.** 1988. Human neutrophil antimicrobial activity. Rev. Infect. Dis. **10 Suppl 2**:S450-6.
348. **Thomas, L., C. H. Yang, and D. A. Goldthwait.** 1982. Two DNA glycosylases in *Escherichia coli* which release primarily 3-methyladenine. Biochemistry **21**:1162-9.
349. **Tierrez, A., and F. Garcia-del Portillo.** 2005. New concepts in *Salmonella* virulence: the importance of reducing the intracellular growth rate in the host. Cell Microbiol. **7**:901-9.
350. **Tornaletti, S., and P. C. Hanawalt.** 1999. Effect of DNA lesions on transcription elongation. Biochimie **81**:139-46.
351. **Trewick, S. C., T. F. Henshaw, R. P. Hausinger, T. Lindahl, and B. Sedgwick.** 2002. Oxidative demethylation by *Escherichia coli* AlkB directly reverts DNA base damage. Nature **419**:174-8.
352. **Truglio, J. J., D. L. Croteau, B. Van Houten, and C. Kisker.** 2006. Prokaryotic nucleotide excision repair: the UvrABC system. Chem. Rev. **106**:233-52.
353. **Truglio, J. J., E. Karakas, B. Rhau, H. Wang, M. J. DellaVecchia, B. Van Houten, and C. Kisker.** 2006. Structural basis for DNA recognition and processing by UvrB. Nat. Struct. Mol. Biol. **13**:360-4.
354. **Trusca, D., S. Scott, C. Thompson, and D. Bramhill.** 1998. Bacterial SOS checkpoint protein Sula inhibits polymerization of purified FtsZ cell division protein. J. Bacteriol. **180**:3946-53.
355. **Van Houten, B., J. A. Eisen, and P. C. Hanawalt.** 2002. A cut above: discovery of an alternative excision repair pathway in bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**:2581-3.
356. **Van Houten, B., and A. Sancar.** 1987. Repair of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced DNA damage by ABC excinuclease. J. Bacteriol. **169**:540-5.
357. **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**:1614-22.
358. **Vaughan, P., T. Lindahl, and B. Sedgwick.** 1993. Induction of the adaptive response of *Escherichia coli* to alkylation damage by the environmental mutagen, methyl chloride. Mutat. Res. **293**:249-57.
359. **Vaughan, P., and B. Sedgwick.** 1991. A weak adaptive response to alkylation damage in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. **173**:3656-62.
360. **Vaughan, P., B. Sedgwick, J. Hall, J. Gannon, and T. Lindahl.** 1991. Environmental mutagens that induce the adaptive response to alkylating agents in *Escherichia coli*. Carcinogenesis **12**:263-8.
361. **Vazquez-Torres, A., J. Jones-Carson, A. J. Baumler, S. Falkow, R. Valdivia, W. Brown, M. Le, R. Berggren, W. T. Parks, and F. C. Fang.** 1999. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. Nature **401**:804-8.

362. **Vazquez-Torres, A., Y. Xu, J. Jones-Carson, D. W. Holden, S. M. Lucia, M. C. Dinauer, P. Mastroeni, and F. C. Fang.** 2000. *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* **287**:1655-8.
363. **Verdemato, P. E., J. A. Brannigan, C. Damblon, F. Zuccotto, P. C. Moody, and L. Y. Lian.** 2000. DNA-binding mechanism of the *Escherichia coli* Ada O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Nucleic Acids Res.* **28**:3710-8.
364. **Verjans, G. M., J. H. Ringrose, L. van Alphen, T. E. Feltkamp, and J. G. Kusters.** 1994. Entrance and survival of *Salmonella typhimurium* and *Yersinia enterocolitica* within human B- and T-cell lines. *Infect. Immun.* **62**:2229-35.
365. **Volkert, M. R.** 1988. Adaptive response of *Escherichia coli* to alkylation damage. *Environ. Mol. Mutagen.* **11**:241-55.
366. **Volkert, M. R., F. H. Gately, and L. I. Hajec.** 1989. Expression of DNA damage-inducible genes of *Escherichia coli* upon treatment with methylating, ethylating and propylating agents. *Mutat. Res.* **217**:109-15.
367. **Volkert, M. R., L. I. Hajec, Z. Matijasevic, F. C. Fang, and R. Prince.** 1994. Induction of the *Escherichia coli* *aidB* gene under oxygen-limiting conditions requires a functional *rpoS* (*katF*) gene. *J. Bacteriol.* **176**:7638-45.
368. **Volkert, M. R., L. I. Hajec, and D. C. Nguyen.** 1989. Induction of the alkylation-inducible *aidB* gene of *Escherichia coli* by anaerobiosis. *J. Bacteriol.* **171**:1196-8.
369. **Volkert, M. R., and D. C. Nguyen.** 1984. Induction of specific *Escherichia coli* genes by sublethal treatments with alkylating agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:4110-4.
370. **Volkert, M. R., D. C. Nguyen, and K. C. Beard.** 1986. *Escherichia coli* gene induction by alkylation treatment. *Genetics* **112**:11-26.
371. **Vora, R. A., A. E. Pegg, and S. E. Ealick.** 1998. A new model for how O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase binds DNA. *Proteins* **32**:3-6.
372. **Wagner, J., P. Gruz, S. R. Kim, M. Yamada, K. Matsui, R. P. Fuchs, and T. Nohmi.** 1999. The *dinB* gene encodes a novel *E. coli* DNA polymerase, DNA pol IV, involved in mutagenesis. *Mol. Cell* **4**:281-6.
373. **Walker, G. C.** 1984. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **48**:60-93.
374. **Wallace, S. S.** 1997. Oxidative damage to DNA and its repair, p. 49-90. *In* J. G. Scandalios (ed.), *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
375. **Warren, W., and P. D. Lawley.** 1980. The removal of alkylation products from the DNA of *Escherichia coli* cells treated with the carcinogens N-ethyl-N-nitrosourea and N-methyl-nitrosourea: influence of growth conditions and DNA repair defects. *Carcinogenesis* **1**:67-78.
376. **Wei, Y. F., K. C. Carter, R. P. Wang, and B. K. Shell.** 1996. Molecular cloning and functional analysis of a human cDNA encoding an *Escherichia coli* AlkB homolog, a protein involved in DNA alkylation damage repair. *Nucleic Acids Res.* **24**:931-37.
377. **Weinfeld, M., A. F. Drake, J. K. Saunders, and M. C. Paterson.** 1985. Stereospecific removal of methyl phosphotriesters from DNA by an *Escherichia coli* *ada*⁺ extract. *Nucleic Acids Res.* **13**:7067-77.
378. **Wibley, J. E., A. E. Pegg, and P. C. Moody.** 2000. Crystal structure of the human O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Nucleic Acids Res.* **28**:393-401.
379. **Wick, M. J.** 2004. Living in the danger zone: innate immunity to *Salmonella*. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**:51-7.
380. **Wilkinson, M. C., P. M. Potter, L. Cawkwell, P. Georgiadis, D. Patel, P. F. Swann, and G. P. Margison.** 1989. Purification of the *E. coli* *ogt* gene product to homogeneity and its rate of action on O⁶-methylguanine, O⁶-ethylguanine and O⁴-methylthymine in dodecadeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **17**:8475-84.

BIBLIOGRAFIA

381. **Wilmes-Riesenberg, M. R., J. W. Foster, and R. Curtiss, 3rd.** 1997. An altered *rpoS* allele contributes to the avirulence of *Salmonella typhimurium* LT2. *Infect. Immun.* **65**:203-10.
382. **Wink, D. A., I. Hanbauer, M. C. Krishna, W. DeGraff, J. Gamson, and J. B. Mitchell.** 1993. Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:9813-7.
383. **Witkin, E. M.** 1976. Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.* **40**:869-907.
384. **Wu, H., R. Jones, L. Luo, and A. S. Neish.** 2008. *Salmonella* evades host innate immunity via AvrA mediated inhibition of cytokine production and pro-apoptotic pathways. *FASEB J.* **22**:899-813.
385. **Wu, H., and A. S. Neish.** 2007. *Salmonella* AvrA modulates innate immune signaling in a mammalian model of enteric infection. *FASEB J.* **21**:711-712.
386. **Xiao, W., and L. Samson.** 1993. In vivo evidence for endogenous DNA alkylation damage as a source of spontaneous mutation in eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:2117-21.
387. **Yamada, M., A. Hakura, T. Sofuni, and T. Nohmi.** 1993. New method for gene disruption in *Salmonella typhimurium*: construction and characterization of an *ada*-deletion derivative of *Salmonella typhimurium* TA1535. *J. Bacteriol.* **175**:5539-47.
388. **Yamada, M., B. Sedgwick, T. Sofuni, and T. Nohmi.** 1995. Construction and characterization of mutants of *Salmonella typhimurium* deficient in DNA repair of O⁶-methylguanine. *J. Bacteriol.* **177**:1511-9.
389. **Yamamoto, Y., M. Katsuki, M. Sekiguchi, and N. Otsuji.** 1978. *Escherichia coli* gene that controls sensitivity to alkylating agents. *J. Bacteriol.* **135**:144-52.
390. **Young, D., T. Hussell, and G. Dougan.** 2002. Chronic bacterial infections: living with unwanted guests. *Nat. Immunol.* **3**:1026-32.

Agraïments

Han hagut de passar un bon grapat d'anys per poder arribar a aquest moment on un s'ha d'asseure i escriure la seva pròpia tesi. En tot aquest temps hi ha hagut moments bons i moments bastant desesperants. En tots ells sempre he tingut els meus amics al costat (sovint perquè no en tenien més remei) per riure amb mi quan les coses anaven bé, per donar-me ànims quan anaven malament. A tots ells els vull donar el meu agraïment aquí, tots ells es mereixen molt més que les quatre paraules que els escriuré:

En primer lloc, als meus directors de tesi: a en Jordi Barbé, per donar-me l'oportunitat d'aprendre en el grup de Microbiologia Molecular i per guiar-me durant aquests cinc anys. Per intentar ensenyar-me japonès, encara que no sigui un bon estudiant (i no per falta d'interès!), i per ajudar-me a tenir els colzes més elàstics. *Domo arigato!* I a la Susana Campoy, per preocupar-se sempre de com m'anava tot, per intentar entendre els meus problemes i sobretot pel seu inestimable ajut i direcció tant en el treball experimental com en la redacció d'aquesta memòria.

També a la Montse Llagostera, per interessar-se sempre pels meus avanços encara que no fos la seva obligació, pels seus ànims i el seu recolzament. I pels seus intents (infructuosos) d'engreixar-me en cada sopar de Nadal. I a la Pilar Cortés, per les teves reprimendes! Gràcies per ensenyar-me quan no en tenies cap obligació i per parar-te a donar-me consells sempre que te'ls demanava. Segur que amb aquesta salut tan estupenda que tens et veurà a les notícies quan facis 100 anys i amb les teves memòries sota el braç: "Les meves vacances: 7 voltes a la Terra i una escapadeta a la Lluna".

Al Jesús, per ensenyar-me gairebé tot el que sé. Sobretot pel que fa a ser el mascle alfa, el mode sosoman ja el portava jo també de sèrie. A la Carlota, per ser tan pesada i fer-me enrabiatar tant. Ja saps que t'aprecio moltíssim, perla. Espero que segueixis sent sempre així d'alegre i que no perdís aquesta energia i ganes de fer coses. Al Xavi també, per aguantar als pesats dels teus amics. A la Susana E., bingueli-bingueli biip! Per ser un model de força i paciència. Per tenir un cor immens i ser tan simpàtica. I pel teu particular sentit de l'humor, tot i que encara no puguis competir amb el del Sergio. A la Vanessa, per recolzar-me sempre, sobretot quan vaig entrar; pels teus ànims, els teus consells i la teva il·lusió. Al Denis, pel teu etern somriure i la teva amistat. Espero que els anys que passis a Europa no et treguin mai aquesta ment tan oberta ni la manera com superes qualsevol problema. A la Sandra, la Krankenschwester multiusos. Per totes les abraçades que m'has fet i que espero que segueixis fent-me. Per més que m'hi esforci, no aconsegueixo recordar que devia fer al principi de conèixer-nos perquè m'apreciis tant. A la Paula, perquè ens hem pogut tornar a conèixer. Per regalar-nos sempre amb el teu somriure i la teva veu calmada, i alhora tenir una personalitat tan sòlida i les idees super clares. Fins a la pròxima vegada que ens tornem a trobar. A l'Elena, la primera persona que vaig trobar a qui també li agradava córrer, Linkin Park i els còmics! Sempre tan intel·ligent i desperta, però amb un caràcter! Una abraçada també per a la Queralt, el José Manuel i tota la teva

família. A l'Anna, per tenir aquest cor tan gran. Estic segur que amb aquesta manera de ser que tens seràs una mare fantàstica. Sento les vegades que t'he fet entristir, però espero de veritat que siguin menys que les que t'he fet riure. Cuida bé del Lluís. I un superpetonàs pel Guillem. A la Laura T., que cada any es torna més guapa i intel·ligent. Si hagués de posar aquí els agraïments per tu no acabaria mai. Ja saps que et tinc molt de carinyo, llàstima que les nostres maneres de pensar siguin tan diferents que si passem massa estona junts comencem a mossegar-nos! A la Neus, per la teva sinceritat i per la teva manera tan directa de dir les coses. Gràcies per escoltar-me sempre que ho he necessitat, pels piropos pel passadís i per no obligar-me mai a menjar el que portaves per dinar, sobretot quan estava cuinat per l'Ivan. Un petó molt fort. A la Laura M., la nostra il·licitana! Pel teu riure sincer, la teva preocupació per la gent i la teva bondat. No et prenguis tan malament tot el que et diuen i confia més en tu mateixa. A la Montse R., per aguantar totes les meves pallassades. Jo també accepto els teus agraïments per aguantar les teves. Per ser tan feliç i alegrar-nos sempre amb el teu riure. Al Joan, pels teus comentaris aguts i punyents, la teva facilitat per riure amb la gent, el teu caràcter conciliador i la teva immensa capacitat per solucionar qualsevol problema. I per ser un bon company esportista. Llàstima que siguis taure. A l'Andrea, per no callar-te mai el que penses, encara que no sempre ho sàpiga encaixar bé; per la teva alegria i il·lusió, per intentar animar-me sempre (si tu comences una conga, jo et segueixo!) i per ser una bona amiga. Moltes gràcies a tu i al Joaquín per aguantar-nos a Viena quan no en teníeu l'obligació. A la Natàlia, pel *Bon dia* que em deies sempre, per com ens alegraves cada dia amb les teves bromes i el teu riure. Pels *fríjoles*. Pels tacons. I per ser com ets, sincera i alegre. Al Marc P., per ser tan bon *tio*. No sé quan de temps vas estar amb nosaltres, però es va passar rapidíssim. Fes-me un bon pòster! A l'Ariadna, per ser tan alegre, simpàtica i carinyosa, per la teva manera tan *espontània* de parlar, i per punxar tu aquelles bèsties. Segur que arribes molt lluny, que jo sé que vals molt, només has de confiar més en tu mateixa. A la Laura G, la meva amiga *otaku* (per fi algú amb cultura després de tants anys!), per la teva immensa simpatia, la teva il·lusió i la teva espontaneïtat. I jo que quan et vaig conèixer pensava que eres tímida i resulta que ets la primera en posar-se a cantar, ballar i apuntar-se al que sigui! Naroarentzat: ez nuke lortuko sentitzen dudan guztia hemen idaztea. Zure indarrarekin nire animoa pizteagatik, zure irribarreagatik, hainbat aldiz SAF-ean jasatzeagatik, hain maitagarri izateagatik eta hamaika arrazoi gehiago ditudalako, mila esker. A la Núria T., sempre destorbant davant de la pica! Amb aquest caràcter tan ferm i sense pèls a la llengua, sempre disposada a parlar de qualsevol cosa i a acceptar qualsevol crítica, una abraçada a tu i també a les tres criatures. A la Núria V., tan reservada que em semblaves al principi i al final ens hem fet un tip de parlar, gràcies per donar-me sempre tema de conversa i preocupar-te de com m'anaven les coses, un petó als teus nens. A la Marta, la primera gironina que he conegut (i de moment l'única), per la teva simpatia, per suportar la meva tiferia (i per no matar-me obrint la porta del passadís), molta sort amb el pròxim congrés! A l'Agnès, sort que de tant en tant puc

parlar amb algú sense que em faci mal el coll! Per ser tan riallera i simpàtica, per les teves sortides i per poder xerrar amb tu de temes *frikis*.

A la resta de gent que encara em falta: al Jordi M., gràcies per pagar el cafè; al Jordi E., que està com jo al final del camí; a la Tamara, llàstima que ja no jugui a *Magic*, sinó hauríem fet una partideta; a la Isabel, què t'hem trobat a faltar (i no ho dic pels medis); a l'Oihane, per ser tan amable i ser la meva còmplice!; a les secretàries, en especial a la Julia, per solucionar-me tants problemes; a la gent de l'estabulari: al Carlos, al Matías, al Joan, al Paco, al Nacho i a tots els altres encara que no en sàpiga el nom; i a un munt de gent més: la Maira, el Sergi, el Carlos, l'Òscar, el Marc A. i la Paqui, l'Anna H., el Gerard M., la Núria B. i el Jordi C., la Noèlia, la Mònica J., el Joan, a tota la gent nova que està entrant i que encara no conec bé: l'Albert (x2), l'Estela, la Menta, la Gloria...

Molt especialment a l'Àngel, per ser un gran amic. Sovint desitjo que al *jove andorrà*, com crec que posava a la teva entrevista, li vagi tot bé per *la capital*. Amb la teva intel·ligència segur que acabes el doctorat amb tots els honors. Espero que malgrat la distància no perdem mai l'amistat. Gràcies de nou als teus pares i a la teva germana per tot. A la Irene, com sempre, una abraçada que espero poder fer-te algun dia d'aquests. A la Laura C., la millor amiga que he tingut mai malgrat que només ens veiem quan topem pel carrer! Has estat una de les raons per seguir endavant només que per no donar-te motius per riure't sobre les meves *taques a l'expedient*! També al Jordi i la Sèfora, que sempre s'han preocupat per com m'anava tot i m'han aguantat tot i ser tan *diferent*. Que us vagi tot bé. I a l'Eulàlia, encara que sembla que sempre t'hagin preocupat més els ratolins que jo.

193

Als meus pares, per estar sempre allà i donar-me la millor educació. Per donar-me totes les facilitats i lluitar tant per nosaltres. Al papa, per ensenyar-me tant quan era petit i obrir-me la curiositat per la ciència. A la mama, per ensenyar-me com ser bona persona i a tenir paciència. A la Moni, que ara t'estàs esforçant per treure't un altre títol. Què n'és de difícil escriure un llibre, encara que en una tesi no t'hagis d'inventar l'argument! A l'Eloi, que sempre has estat espiant mentre escrivia, espero que hagi entès alguna cosa. Al Xavi, que també estàs estudiant de valent, per aquesta afició que tens per ser brutalment apallissat i per les més de 100 sèries, *nani kore?* A l'àvia, per preguntar sempre com m'anava tot i per haver fet sempre l'esforç de venir a veure'ns, de part de tot el laboratori, gràcies per endolcir-nos una mica més la vida. Mia, Du, die immer eine Freundin für meine Oma gewesen bist. Dafür, dass Du so viele Sachen erzählt hast. Dafür, dass Ihr beide Vertrauen in mich habt. Und der Rest der deutschen Familie, die immer nach mir gefragt haben und sich um mich gekümmert haben. I als meus tiets, cosins, als padrins i a tots els que heu estat sempre amb mi.

Moltes gràcies.