



# Estudi de l'expressió i funció de les Ribonucleotidil Reductases d'*Escherichia coli*

María del Mar Cendra Gascón

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**Departament de Microbiologia**  
**Facultat de Biologia**

**Estudi de l'expressió i funció de les**  
**Ribonucleotidil Reductases d'*Escherichia coli***

**Maria del Mar Cendra Gascón**  
**Tesi Doctoral**  
**Barcelona 2013**



**Departament de Microbiologia**

**Facultat de Biologia**

**Estudi de l'expressió i funció de les  
Ribonucleotidil Reductases d'*Escherichia coli***

Memòria presentada per Maria del Mar Cendra Gascón per optar al grau de Doctor  
per la Universitat de Barcelona

Programa de Doctorat: Microbiologia Ambiental i Biotecnologia

**Memòria presentada per:**

**Maria del Mar Cendra Gascón**

**Conformitat del director de Tesi:**

**Conformitat del tutor de Tesi:**

**Dr. Eduard Torrents Serra**

**Dra. Cristina Madrid Xufre**



---

*Agraiments*



Després d'escriure la Tesi semblava que lo dels agraïments seria cosa fàcil... I la veritat és que no sé per on començar.

Primer de tot vull agrair al Prof. Antonio Juárez per obrir-me la porta a entrar al seu grup d'investigació ara fa 5 anys, i a la Dra. Cristina Madrid per ser la primera supervisora que vaig tenir quan vaig entrar a col·laborar al Departament de Microbiologia.

Especialment, vull agrair al Dr. Eduard Torrents per donar-me la oportunitat de fer aquesta tesi doctoral. Al llarg d'aquests gairebé 5 anys hi han hagut moments de tot, i ell, a les dures i a les madures, ha estat allà.

La gent amb la que he compartit aquests anys ha estat molt diversa, inicialment al IBEC amb la Laura, la Rosa i la Nahia (quins riures que fèiem eh...!). I també amb la Mary i després amb la Núria, l'Íngrid i amb l'Ana Oliva! Amb qui també hem compartit molt bons moments. Ja més tard amb la Manu who I consider a very good friend inside and also outside of the lab, la Francesca, l'Ariadna, el David i també el Mário, primer al departament i ara a l'IBEC, que sempre m'ha ajudat quan li he preguntat qualsevol cosa. Amb molt afecte vull mencionar a l'Anna, que ha estat present al llarg de tots aquest anys de treball, començant a col·laborar en el grup el mateix estiu que jo vaig començar el doctorat, i a qui he vist "créixer" al laboratori. Ella de tant en tant encara diu que sóc una mica la seva "jefa", tot i que les dues sabem que en veritat som molt bones amigues.

De l'IBEC també vull mencionar al grup "JAR" que sempre m'ha ajudat quan he necessitat alguna cosa, i especialment a la Vane i a l'Òscar. També és molt important anomenar l'AitorT! Que més que agrair-li alguna cosa crec que ell m'hauria d'agrair a mi la paciència que tinc amb ell!! jajaja ara en serio, t'has convertit en un gran amic Aitor. I les Infraestructures girls! Amb la Isabel, Laura i últimament amb la Cris! Molt amables amb mi en tot moment.

Encara que hagi fet la tesi a l'IBEC, inicialment vaig estar al Departament de Microbiologia i no puc no mencionar a la Carla, Marta, Llorenç, Juanda, Jorge, ja una mica més tard la Tania i com no, les dos Sònies. La Sònia Aznar (encara recordo com si fos ahir quan et vaig conèixer el meu primer dia) una gran persona i que encara que amb el temps ens hem anat veient menys, li guardo un gran afecte. I també a la Sònia Paytubi, qui m'ha introduït al món Prosperil i s'ha convertit en una gran amiga.



## *Agraïments*

I els meus amics! Tant els biologuitos com els de Vilanova! Especialment vull mencionar al Robert, Nahia, Ainhoa, Elvira, Aina, Laura, Anna, Núria, Murci, Mireia Mayo, Mireia Serra, Marta Caminoli i a l'Ana. Que m'han ajudat i han tingut molta paciència quan els hi comentava alguna cosa de la feina i els intentava explicar en què consistia el que faig i també quan els hi ensenyava a dir: Ribonucleotidil Reductasa d'una tirada! que en serio... no és cosa fàcil.

Ja per últim les persones més importants, vull agrair al meu germà i als meus pares el seu recolzament i ajut incondicional, ja no només durant aquest període de doctorat, sinó en tot el que faig.

*Als meus pares*



## *Índex*

---



# 1 ÍNDEX

<b>2</b>	<b>ABREVIATURES</b> .....	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>LA RIBONUCLEOTIDIL REDUCTASA (RNR)</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1.1</b>	<b>INTRODUCCIÓ A L'ENZIM</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1.2</b>	<b>CLASSES DE L'ENZIM</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1.3</b>	<b>REGULACIÓ AL·LOSTÈRICA</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1.4</b>	<b>MECANISME CATALÍTIC</b> .....	<b>34</b>
3.1.4.1	Mecanisme de regeneració del poder reductor de les cisteïnes .....	35
3.1.4.1.1	Sistema de tioredoxines.....	37
3.1.4.1.2	Sistema de glutaredoxines .....	37
3.1.4.2	Diferències en el Mecanisme catalític entre classes de RNR .....	38
3.1.4.2.1	Mecanisme catalític de la RNR de classe Ia.....	39
3.1.4.2.2	Mecanisme catalític classe Ib .....	39
3.1.4.2.3	Mecanisme catalític classe Ic .....	41
3.1.4.3	Mecanisme catalític classe II .....	41
3.1.4.4	Mecanisme catalític classe III.....	42
<b>3.1.5</b>	<b>ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LES RNR</b> .....	<b>44</b>
3.1.5.1	Classe Ia.....	44
3.1.5.2	Classe Ib.....	48
3.1.5.3	Classe Ic .....	51
3.1.5.4	Classe II .....	52
3.1.5.5	Classe III .....	54
<b>3.1.6</b>	<b>EVOLUCIÓ DE LES TRES CLASSES DE RNR</b> .....	<b>57</b>
<b>3.2</b>	<b>LES DIFERENTS CLASSES DE RNR D'<i>ESCHERICHIA COLI</i>: IA, IB I III</b> .....	<b>60</b>
<b>3.2.1</b>	<b>LA RNR DE CLASSE I: CLASSE IA</b> .....	<b>60</b>
3.2.1.1	Organització gènica .....	60
3.2.1.2	Regulació transcripcional.....	60
<b>3.2.2</b>	<b>LA RNR DE CLASSE I: CLASSE IB</b> .....	<b>63</b>
3.2.2.1	Organització gènica .....	63
3.2.2.2	Regulació transcripcional.....	63

<b>3.2.3</b>	<b>LA CLASSE III RNR.....</b>	<b>66</b>
3.2.3.1	Organització gènica .....	66
3.2.3.2	Regulació transcripcional.....	67
<b>3.3</b>	<b>LA PROTEÏNA ASSOCIADA AL NUCLEOID H-NS .....</b>	<b>69</b>
<b>3.3.1</b>	<b>EL REGULADOR GLOBAL H-NS.....</b>	<b>69</b>
<b>3.3.2</b>	<b>STPA I FIS: ALTRES NAPS ESTUDIADES EN AQUEST TREBALL.....</b>	<b>71</b>
3.3.2.1	Fis.....	71
3.3.2.2	StpA .....	71
<b>3.4</b>	<b>BIOFILMS BACTERIANS.....</b>	<b>73</b>
<b>3.4.1</b>	<b>INTRODUCCIÓ ALS BIOFILMS BACTERIANS.....</b>	<b>73</b>
<b>3.4.2</b>	<b>ORGANITZACIÓ I REGULACIÓ DE LA FORMACIÓ DE BIOFILM.....</b>	<b>75</b>
<b>4</b>	<b><u>MATERIAL I MÈTODES .....</u></b>	<b><u>81</u></b>
<b>4.1</b>	<b>SOQUES, FAGS I PLASMIDIS.....</b>	<b>81</b>
4.1.1	SOQUES .....	81
4.1.2	FAGS.....	83
4.1.3	PLASMIDIS .....	83
<b>4.2</b>	<b>OLIGONUCLEÒTIDS .....</b>	<b>85</b>
<b>4.3</b>	<b>MÈTODES MICROBIOLÒGICS.....</b>	<b>86</b>
4.3.1	MÈDIS I CONDICIONS DE CULTIU.....	86
4.3.2	PLAQUES D'AGAR TAU PER L'ESTUDI DE LA MOTILITAT I LA XEMOTAXIS BACTERIANA .....	87
4.3.3	PLAQUES CAS PER LA DETECCIÓ DE SIDERÒFORS.....	87
4.3.4	ESTERILITZACIÓ.....	88
4.3.5	MANTENIMENT DE MICROORGANISMES .....	88
<b>4.4</b>	<b>TÈCNiques EXPERIMENTALS AMB ADN .....</b>	<b>89</b>
4.4.1	AÏLLAMENT D'ADN PLASMÍDIC .....	89
4.4.2	UTILITZACIÓ D'ENZIMS DE RESTRICCIÓ, DE LLIGACIÓ I DE DEFOSFORILACIÓ.....	89
4.4.3	AMPLIFICACIÓ DE FRAGMENTES D'ADN MITJANÇANT LA REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	89
4.4.3.1	PCR de comprovació .....	89
4.4.3.2	PCR d'alta fidelitat .....	90
4.4.4	SEQÜENCIACIÓ DE FRAGMENTES D'ADN.....	90

<b>4.4.5 ELECTROFORESI DE L'ADN EN GELS D'AGAROSA</b> .....	<b>91</b>
4.4.5.1 Tinció de l'ADN després de l'electroforesi .....	92
4.4.5.1.1 Tinció per bromur d'etidi .....	92
4.4.5.1.2 Tinció per Sybr Safe® .....	92
<b>4.4.6 AÏLLAMENT DE FRAGMENTES D'ADN</b> .....	<b>92</b>
<b>4.4.7 ASSAJOS D'EMSA (ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY)</b> .....	<b>93</b>
<b>4.5 TÈCNiques EXPERIMENTALS AMB ARN</b> .....	<b>93</b>
<b>4.5.1 EXTRACCIÓ D'ARN TOTAL</b> .....	<b>93</b>
<b>4.5.2 QUANTIFICACIÓ DE L'ARN TOTAL PURIFICAT</b> .....	<b>94</b>
<b>4.5.3 RT-PCR (PCR DE TRANSCRIPCIÓ REVERSA)</b> .....	<b>94</b>
<b>4.5.4 PCR A TEMPS REAL (REAL TIME PCR)</b> .....	<b>95</b>
4.5.4.1 Anàlisi de les dades obtingudes en una reacció de Real Time PCR.....	95
<b>4.5.5 MICROXIPS D'ARN (MICROARRAY D'ARN)</b> .....	<b>96</b>
<b>4.6 MÈTODES DE TRANSFERÈNCIA GÈNICA</b> .....	<b>96</b>
<b>4.6.1 TRANSFORMACIÓ BACTERIANA</b> .....	<b>96</b>
<b>4.6.2 TRANSFORMACIÓ BACTERIANA DE CÈL·LULES COMPETENTS OBTINGUDES MITJANÇANT TRACTAMENT DE CaCl<sub>2</sub> SEGONS COHEN (259)</b> .....	<b>96</b>
<b>4.6.3 TRANSFORMACIÓ BACTERIANA PER ELECTROPORACIÓ CEL·LULAR SEGONS DOWER (260)</b> .....	<b>97</b>
<b>4.6.4 TRANSDUCCIÓ GENERALITZADA AMB EL BACTERIÒFAG P1VIR SEGONS MILLER (246)</b> .....	<b>98</b>
4.6.4.1 Obtenció del lisat de P1 vir .....	98
4.6.4.2 Transducció amb el P1 vir .....	98
<b>4.6.5 CONJUGACIÓ BACTERIANA</b> .....	<b>99</b>
4.6.5.1 Conjugació en medi sòlid.....	99
<b>4.6.6 CONSTRUCCIÓ GÈNIQUES PER L'ESTUDI TRANSCRIPCIONAL DELS GENS <i>NRD</i></b> <b>100</b>	
4.6.6.1 Construcció plasmídica per l'estudi transcripcional dels gens <i>nrd</i> mitjançant la GFP (Green Fluorescent Protein).....	100
4.6.6.2 Construcció de les fusions transcripcionals plasmídiques i cromosòmiques PnrdAB::lacZ, PnrdDG::lacZ, PentC::lacZ i Pfur::lacZ .....	101
<b>4.6.7 CONSTRUCCIÓ PLASMÍDICA PER PURIFICACIÓ DE NRDR: CLONACIÓ DEL GEN <i>NRDR</i> EN EL VECTOR PAVITAG-C N-HIS SUMO</b> .....	<b>104</b>



<b>4.6.8</b>	<b>CONSTRUCCIONS PLASMÍDIQUES PER LES COMPLEMENTACIONS DE LES MUTACIONS <math>\Delta NRDE</math>, <math>\Delta NRDD</math>, <math>\Delta NRDR</math> I <math>\Delta NRDDNRDE</math> PER L'ESTUDI DE FORMACIÓ DE BIOFILM .....</b>	<b>104</b>
4.6.8.1	Construccions plasmídiques en el vector pBluescriptSK(+)	104
4.6.8.2	Construcció plasmídica en el vector pBBR1MCS-5	105
<b>4.6.9</b>	<b>CONSTRUCCIONS PLASMÍDIQUES PER LA COMPLEMENTACIÓ DE LES MUTACIONS <math>\Delta NRDD</math> I <math>\Delta NRDE</math> EN LA SOCA D'<i>E. COLI</i> LF82 .....</b>	<b>105</b>
<b>4.6.10</b>	<b>CONSTRUCCIONS PLASMÍDIQUES PER L'ASSAIG DE COMPLEMENTACIÓ EN LA SOCA LF82 DE LA RNR CROMOSÒMICA DE CLASSE IA PER LA RNR PLASMÍDICA.</b>	<b>106</b>
<b>4.7</b>	<b>MÈTODES DE MUTAGÈNESI BACTERIANA .....</b>	<b>106</b>
<b>4.7.1</b>	<b>GENERACIÓ DEL FRAGMENT DE PCR QUE CONTÉ EL GEN DE RESISTÈNCIA A UN ANTIBIÒTIC .....</b>	<b>106</b>
<b>4.7.2</b>	<b>SUBSTITUCIÓ AL·LÈLICA.....</b>	<b>107</b>
<b>4.8</b>	<b>TÈCNiques EXPERIMENTALS AMB PROTEÏNES.....</b>	<b>108</b>
<b>4.8.1</b>	<b>INDUCCIÓ DEL pETS174 I PURIFICACIÓ DE NRDR.....</b>	<b>108</b>
<b>4.8.2</b>	<b>OBTENCIÓ D'EXTRACTES PROTEICS TOTALS .....</b>	<b>108</b>
<b>4.8.3</b>	<b>DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ PROTEICA PEL MÈTODE DE BRADFORD (264).....</b>	<b>108</b>
<b>4.8.4</b>	<b>ELECTROFORESIS EN GELS DE POLIACRILAMIDA AMB SDS .....</b>	<b>109</b>
4.8.4.1	Fase de compactació	109
4.8.4.2	Fase de resolució	110
4.8.4.3	Preparació del gel de poliacrilamida amb SDS	110
4.8.4.4	Electroforesi del gel de poliacrilamida amb SDS	111
<b>4.8.5</b>	<b>TINCIÓ DELS GELS AMB PAGEBLUE™ PROTEIN STAINING SOLUTION.....</b>	<b>111</b>
<b>4.8.6</b>	<b>IMMUNODETECCIÓ PROTEICA.....</b>	<b>111</b>
4.8.6.1	Transferència de les proteïnes del gel a la membrana de PVDF	111
4.8.6.2	Immunodetecció i revelatge quimioluminiscent mitjançant el sistema ECL™	112
<b>4.9</b>	<b>VALORACIÓ D'ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES .....</b>	<b>113</b>
<b>4.9.1</b>	<b>ASSAIG DE LA <math>\beta</math>-GALACTOSIDASSA (246) .....</b>	<b>113</b>
<b>4.10</b>	<b>ESTUDI DE LA FORMACIÓ DE BIOFILM .....</b>	<b>114</b>
<b>4.10.1</b>	<b>FORMACIÓ DE BIOFILM SOBRE PLACA DE POLIVINIL .....</b>	<b>114</b>
<b>4.10.2</b>	<b>FORMACIÓ DE BIOFILM SOBRE SUPERFÍCIE DE VIDRE.....</b>	<b>115</b>

<b>5</b>	<b>OBJECTIUS.....</b>	<b>119</b>
<b>6</b>	<b>RESULTATS-DISCUSSIÓ.....</b>	<b>123</b>
<b>6.1</b>	<b>EXPRESSIÓ DIFERENCIAL I FUNCIÓ DELS GENS <i>NRD</i> DURANT LA FORMACIÓ DE BIOFILM DE LES SOQUES SALVATGES D’<i>E. COLI</i> MG1655 I L’ENTEROPATOGENÈICA (EPEC) E2348/69. ARTICLE: <i>BIOFILM MODIFIES EXPRESSION OF RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE GENES IN ESCHERICHIA COLI</i>.....</b>	<b>123</b>
<b>6.1.1</b>	<b>LES RNR DE CLASSE IB I III SÓN IMPORTANTS EN LA FORMACIÓ DE BIOFILM</b>	<b>123</b>
<b>6.1.2</b>	<b>MECANISMES TRANSCRIPCIONALS QUE INDUEIXEN L’EXPRESSIÓ DE LES RNR DE CLASSE IB I III DURANT LA FORMACIÓ DE BIOFILM .....</b>	<b>128</b>
<b>6.1.3</b>	<b>ARTICLE: “BIOFILM MODIFIES EXPRESSION OF RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE GENES IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>” .....</b>	<b>131</b>
<b>6.2</b>	<b>EFFECTE REGULADOR DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL H-NS SOBRE ELS GENS QUE CODIFIQUEN PER LES TRES CLASSES DE RNR D’<i>E. COLI</i>. MANUSCRIT: <i>H-NS AS A NOVEL TRANSCRIPTIONAL MODULATOR FOR THE RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE GENES IN ESCHERICHIA COLI</i> .....</b>	<b>140</b>
<b>6.2.1</b>	<b>H-NS REPRIMEIX LA TRANSCRIPCIÓ DE LES RNR DE CLASSE IA I III D’<i>E. COLI</i></b>	<b>140</b>
<b>6.2.2</b>	<b>EFFECTE AMBIENTAL EN LA REGULACIÓ D’H-NS SOBRE ELS GENS <i>NRDAB</i>.</b>	<b>145</b>
<b>6.2.3</b>	<b>ARTICLE: “H-NS AS A NOVEL TRANSCRIPTIONAL MODULATOR FOR THE RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE GENES IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>” <i>JOURNAL OF BACTERIOLOGY</i> (2013) 195: <i>IN PRESS</i>. .....</b>	<b>149</b>
<b>6.3</b>	<b>ESTUDI DEL REGULÓ <i>NrDR</i> EN LA SOCA D’<i>E. COLI</i> MG1655. MANUSCRIT: <i>GENOME-WIDE TRANSCRIPTIONAL ANALYSIS OF ESCHERICHIA COLI NrDR REGULON</i></b>	<b>167</b>
<b>6.3.1</b>	<b><i>NrDR</i> REPRIMEIX LA MOTILITAT D’<i>E. COLI</i>.....</b>	<b>170</b>
<b>6.3.2</b>	<b>IMPLICACIÓ DE <i>NrDR</i> EN EL PLEGAMENT PROTEIC I EN LA VIABILITAT CEL·LULAR DURANT UN XOC TÈRMIC .....</b>	<b>171</b>
<b>6.3.3</b>	<b><i>NrDR</i> PARTICIPA EN LA CAPTACIÓ DEL FERRO.....</b>	<b>172</b>
<b>6.3.4</b>	<b>INTERACCIONS DIRECTES DEL FACTOR <i>NrDR</i> SOBRE ELS GENS TRANSCRIPCIONALMENT ALTERATS .....</b>	<b>177</b>
<b>6.3.5</b>	<b>MANUSCRIT: “GENOME WIDE TRANSCRIPTIONAL ANALYSIS OF <i>NrDR</i> REGULON”.....</b>	<b>179</b>
<b>6.4</b>	<b>ESTUDI DE LES DIFERENTS CLASSES DE RNR DE LA SOCA ADHERENT I INVASIVA D’<i>ESCHERICHIA COLI</i> (AIEC) LF82 I LA SEVA EXPRESSIÓ DIFERENCIAL</b>	

DURANT UN PROCÉS INFECTIU. CERCA DEL PAPER DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL NrdR EN LA REGULACIÓ. MANUSCRIT: <i>ROLE OF RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE DURING INFECTION OF ADHERENT-INVASIVE ESCHERICHIA COLI LF82 FROM CROHN'S DISEASE</i> .....	200
6.4.1 LA CÒPIA PLASMÍDICA DE L'OPERÓ <i>NRDAB</i> DEL PLÀSMID pLF82 CODIFICA PER UNA RNR ENZIMÀTICAMENT NO ACTIVA .....	201
6.4.2 AVALUACIÓ DEL ROL DE LES DIFERENTS CLASSES DE RNR I DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL NrdR DE LA SOCA LF82 DURANT LA INFECCIÓ CEL·LULAR....	203
6.4.3 MECANISMES PELS QUALS NrdR POT SER IMPORTANT PER LA INFECCIÓ DE LA AIEC LF82 .....	204
6.4.4 MANUSCRIT: “ <i>ROLE OF RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE DURING INFETION OF ADHERENT-INVASIVE ESCHERICHIA COLI LF82 ISOLATED FROM CROHN'S DISEASE</i> ”	211
<b>7 CONCLUSIONS .....</b>	<b>235</b>
<b>8 BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>241</b>
<b>9 ANNEX .....</b>	<b>263</b>
<b>9.1 TAULA I. LLISTAT D'OLIGONUCLEÒTIDS UTILITZATS EN AQUEST TREBALL .</b>	<b>263</b>

## *Abreviatures*

---



## 2 Abreviatures

Abreviatura	Nom
%	Percentatge
A	Adenina
ADN	Àcid desoxiribonucleic
ADNc	Àcid desoxiribonucleic complementari
AdoCbl	Adenosil cobalamina
AdoMet	Adenosil metionina
ADP	Difosfat d'adenosina
Ala	Alanina
Ap	Ampicil·lina
Arg	Arginina
ARN	Àcid ribonucleic
ARNm	Àcid ribonucleic missatger
Asn	Asparragina
ATP	Trifosfat d'adenosina
bd	Bi-destil·lat
C	Citosina/Carboni<
CW	<i>Clock Wise</i> -agulles del rellotge
CCW	<i>Counter Clock Wise</i> -contra les agulles del rellotge
c-di-GMP	Diguanilat cíclic
C-terminal	Carboxi terminal
CDP	Difosfat de citidina
Cm	Cloramfenicol
Co	Cobalt
Cys	Cisteïna
dATP	Trifosfat de desoxiadenosina
dCTP	Trifostat de desoxicitidina
dGTP	Trifosfat de desoxiguanosina
DO	Densitat òptica
DIP	2,2'-dipiridil
DTT	Ditiothreitol
dTTP	Trifosfat de timina
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogènica
EPS	Exopolisacàrid
Fe	Ferro
FLP	Flipasa
FRT	Seqüència diana de reconeixement de la flipasa
G	Guanosina

Abreviatura	Nom
g	Gram
GDP	Difosfat de guanosina
Gln	Glutamina
Glu	Àcid glutàmic
Gm	Gentamicina
GR	Glutació reductasa
Grx	Glutaredoxina
GSH	Glutació
GTP	Trifosfat de guanosina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Aigua oxigenada
His	Histidina
HSP	<i>Heat Shock Proteins</i> –Proteïnes de shock tèrmic
HU	Hidroxiurea
Ile	Isoleucina
Kb	Quilobase
K <sub>D</sub>	Constant de dissociació
kDa	Quilodalton
Km	Kanamicina
l	Litre
Leu	Leucina
Lys	Lisina
M	Molar
MCS	<i>Multi cloning site</i> –Lloc de clonació múltiple
MIC	Mínima concentració inhibidora
mm	Mil·límetre
mM	Mil·limolar
Mn	Manganés
N-terminal	Amino-terminal
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat
NDP	Nucleòsid difosfat
nm	Nanomolar
nrd	<i>Nucleotide reduction</i> - gen que codifica per a la RNR
NTP	Nucleòsid difosfat
O/N	<i>Over/night</i> –tota la nit
O <sub>2</sub>	Oxigen
ONPG	Orto-nitrofenil-β-D-galactopiranòsid
pb	Parell de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> -Reacció en cadena de la polimerasa
PFL	Piruvat format liasa
PGA	poly-1,6-N-acetil-D-glucosamina
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina

<b>Abreviatura</b>	<b>Nom</b>
PVC	<i>Polyvinyl Chloride</i> -Policlorur de vinil
Rif	rifampicina
RNR	Ribonucleotidil reductasa
rpm	Revolucions per minut
RT-PCR	Reacció en cadena de la polimerasa amb transcriptasa reversa
S	Sofre
Ser	Serina
Sm	Estreptomicina
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i> –Resonància plasmònica de superfície
T	Timidina
Tc	Tetraciclina
TCA	Tricarboxílics
Thr	Treonina
Tm	Temperatura de fusió
Trp	Triptofan
TrxR	Tioredoxina reductasa
Tyr	Tirosina
UDP	Uridina
UFC	Unitats formadores de colònies
V	Volts
Val	Valina
Zn	Zinc
Δ	Delta-deleció
μg	Microgram
μl	Microlitre
μm	Micrometre
μM	Micromolar
3D	Tri-dimensional





## ***Introducció***

---



## **3 Introducció**

### **3.1 La Ribonucleotidil reductasa (RNR)**

#### **3.1.1 Introducció a l'enzim**

L'enzim ribonucleotidil reductasa (RNR) és l'enzim encarregat de proveir els deoxiribonucleòtids (dATP, dTTP, dCTP i dGTP) per a la síntesi i la reparació de l'ADN. Va ser descobert a l'any 1960 pel Professor Peter Reichard al Karolinska Institute de Suècia (1).

Durant la replicació de l'ADN de qualsevol ésser viu, el rati entre l'ADN i la massa cel·lular (ADN/massa cel·lular) s'ha de mantenir constant i independent del cicle cel·lular (2), per aquest motiu és important que hi hagi una forta regulació de totes les proteïnes i mecanismes implicats en la replicació de l'ADN perquè aquest rati es mantingui estable. Aquesta regulació ha de permetre que a mesura que la síntesi d'àcids nucleics augmenta, també ho faci la massa cel·lular. La RNR actua en aquest nivell proveint dels precursors de l'ADN, per tant, sense ella no hi ha ADN. El control de la RNR és fonamental per mantenir la integritat del genoma.

La regulació de l'activitat de l'enzim es dona a dos nivells diferents: un nivell de regulació al·lostèrica que indica quin és el ribonucleòtid que s'ha de reduir en cada moment (3) i un altre nivell de regulació transcripcional en funció del cicle cel·lular i en resposta a diferents estressos causats en la maquinària de replicació o resposta a l'oxigen (4, 5). Encara que més endavant es detallaran aspectes importants sobre aquests dos nivells de regulació de les RNR, es important mencionar que dins del nivell de regulació al·lostèrica de l'enzim, existeixen dos tipus diferents: el de regulació al·lostèrica d'especificitat, el qual indica el NTP que s'ha de reduir segons l'efector que s'hi uneix, i el de regulació al·lostèrica de l'activitat, que s'encarrega de modular l'activitat general de l'enzim, activant-lo i reprimint-lo, depenent si és l'ATP o el dATP el que s'hi troba unit (3).

L'evolució ha fet que hagin anat apareixent diferents classes de RNR codificades per unitats transcripcionals diferents (6) i que presenten activitat en condicions ambientals diverses, encara que totes elles s'encarreguen de realitzar la

mateixa reacció de catàlisi. A continuació hi ha una breu descripció de totes les classes de ribonucleotidil reductases descrites fins al moment.

### 3.1.2 Classes de l'enzim

En l'actualitat hi ha descrites 3 classes diferents de RNR: la classe I, II i III. Les tres classes de RNR catalitzen la mateixa reacció i la seva regulació al·lostèrica és molt similar. Diferències quant a l'estructura primària de l'enzim així com el mecanisme que utilitzen per dur a terme la catàlisi de la reducció dels NTPs són punts importants a l'hora de diferenciar entre les diferents classes de RNR.

L'enzim originàriament descobert és la que en l'actualitat es descriu com la RNR de classe Ia. Aquesta classe es troba present en tots els organismes eucariòtics, alguns microorganismes, virus i bacteriòfags (6). La classe Ia és una subdivisió de la classe I, i a on també s'hi engloben les RNR de classes Ib i Ic. La RNR de classe Ib va ser descoberta l'any 1995 en el bacteri *Salmonella typhimurium* (7) mentre que la RNR de classe Ic va ser descoberta més recentment en el patògen intracel·lular *Chlamydia trachomatis* (8).

En general la RNR de classe I es troba composta per dues proteïnes homodimèriques: una de major pes molecular anomenada R1 (ò  $\alpha$ 1) i una de menor pes molecular anomenada R2 (ò  $\beta$ 2). Les RNR de classe I només són actives en condicions aeròbiques i en presència d'un àtom d'oxigen, originen un radical tirosil en un centre metàl·lic que es troba en la proteïna R2 i que viatja al llarg d'una cadena de transport d'electrons fins a la proteïna R1. És en aquesta proteïna R1 a on, en últim terme, el radical proteic acaba generant un radical transitori tiil encarregat d'iniciar la reducció dels ribonucleòtids (NTPs) (9).

Tant la RNR de classe Ia com Ic es troben codificades en l'operó *nrdAB* a on NrdA equival a la R1 i NrdB a la R2. En canvi, la RNR de classe Ib es troba codificada en l'operó *nrdHIEF* a on, a més a més de les proteïnes R1E (NrdE) i R2F (NrdF), s'hi codifiquen les proteïnes NrdI i NrdH, una flavodoxina que participa en la generació del centre metàl·lic i s'encarrega de mantenir l'estabilitat del radical proteic, i una glutaredoxina específica de substrat respectivament (10-12). Aquesta RNR de classe Ib varia de la Ia i Ic en la seva estructura primària, així com, en la seva regulació al·lostèrica (13).

Una gran diferència entre les 3 RNR de classes I és el tipus de centre metàl·lic que posseeixen per generar el radical. En totes tres classes el centre és troba en la proteïna de menor pes molecular R2. En el de la classe Ia és un centre de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O-Fe}^{\text{III}}$ , en el de la classe Ib és un centre predominantment de  $\text{Mn}^{\text{III}}\text{-O-Mn}^{\text{III}}$ , encara que també es pot trobar el centre  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O-Fe}^{\text{III}}$ , i per últim, el de la classe Ic és un centre  $\text{Mn}^{\text{IV}}\text{-O-Fe}^{\text{III}}$ . A més a més, un tret diferencial de la RNR la classe Ic és que es capaç de generar el radical proteic en presència del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Aquesta capacitat ha fet que se li hagi atribuït un rol de patogènesi *in vivo* per conferir resistència contra el  $\text{O}_2^-$ , NO, peroxinitrit i altres oxidants produïts pel sistema immune (14-16).

La RNR de classe II consta únicament d'una subunitat anomenada NrdJ funcionalment equivalent a la R1 de la classe I. La primera subunitat d'aquesta classe de RNR es va cristal·litzar l'any 2002 en forma monomèrica en el bacteri *Lactobacillus leichmannii* (17) dos anys més tard però, també es va poder aconseguir l'estructura cristal·lina en forma dimèrica en *Thermotoga maritima* (18). El mecanisme de catàlisi d'aquesta classe és molt similar al de la classe Ia tot i que varia a l'hora de generar el radical proteic. És una RNR completament independent a l'oxigen ja que tant sols requereix de la S-adenosilcobalamina (AdoCbl)/vitamina B<sub>12</sub> per generar un radical deoxiadenosil per dur a terme la reacció de reducció dels NTPs (9).

El monòmer NrdJ i la proteïna R1 de la classe Ia presenten homologia en la composició aminoacídica del seu extrem C-terminal amb la seqüència: Cys-Glu-Gly-Gly-Ala-Cys-Pro-Ile-Leu. Les dos cisteïnes són les encarregades de transferir els electrons a les cisteïnes que es troben en el centre actiu de l'enzim per reduir el substrat (19, 20).

Per últim, trobem la RNR de classe III. Aquesta classe es troba codificada pels gens *nrdDG*, NrdD actua de proteïna catalítica mentre que NrdG actua com a una *activasa*. La proteïna NrdG posseeix un centre metàl·lic amb un clúster 4Fe-4S que en presència del cofactor S-adenosilmetionina (AdoMet) genera un radical proteic glicil altament sensible a l'oxigen (21, 22). Una vegada s'ha generat el radical, ja no es requereix més de l'*activasa* (23) i a diferència de la classe I, la proteïna gran és la que conté el radical glicil (24, 25). La sensibilitat que presenta el radical glicil per l'oxigen comporta que es requereixin de condicions d'anaerobiosi estricta perquè la classe III pugui dur a terme la catàlisi (26). Una peculiaritat d'aquesta és que, el poder reductor necessari per reduir el NTP ve donat pel format, a

diferència de la classe I i II que utilitzen ditiols provinents d'un sistema redox compost per tioredoxines i glutaredoxines (27).

Les tres classes de RNR també difereixen en la naturalesa del substrat que redueixen. Mentre que la classe I només redueix 5'-nucleòsid difosfats (NDPs), la classe III només redueix 5'-nucleòsids trifosfats (NTPs). La classe II es troba dividida havent algunes que són capaces de reduir NDPs i altres, només NTPs (28).

A la taula 1 s'hi troben detallades les principals característiques diferencials de les RNR descrites fins a l'actualitat.

**Taula 1:** Característiques principals de les diferents classes de RNR.

	Classe I			Classe II	Classe III
	Classe Ia	Classe Ib	Classe Ic		
<b>Dependència a l'oxigen</b>	Aeròbica	Aeròbica	Aeròbica	Aeròbica/ Anaeròbica	Anaeròbica
<b>Estructura</b>	$\alpha_2\beta_2/\alpha_6\beta_6$ ( <i>E. coli</i> /home)	$\alpha_2\beta_2$	$\alpha_2\beta_2$	$\alpha(\alpha_2)$	$\alpha_2+\beta_2$
<b>Gens</b>	<i>nrdAB</i>	<i>nrdHIEF</i>	<i>nrdAB</i>	<i>nrdJ</i>	<i>nrdDG</i>
<b>Radical</b>	Tyr...Cys	Tyr...Cys	Phe...Cys	AdB12...Cys	AdoMet...Gly ...Cys
<b>Centre Metàl·lic</b>	Fe <sup>III</sup> -O-Fe <sup>III</sup>	Mn <sup>III</sup> -O-Mn <sup>III</sup> Fe <sup>III</sup> -O-Fe <sup>III</sup>	Mn <sup>IV</sup> -O-Fe <sup>III</sup>	Co	4Fe-4S
<b>Substrat</b>	NDP	NDP	NDP	NDP/NTP	NTP
<b>Reductant</b>	Tioredoxina Glutaredoxina	NrdH-redoxina Glutaredoxina	Format	Tioredoxina	Format
<b>Llocs Al·lostèrics</b>	2	1	2	1/2	2
<b>Inhibició ATP</b>	Si	No	Si	No/Si	Si
<b>Distribució</b>	Eucariotes Eubacteris Bacteriòfags Virus	Eubacteris	Arqueobacteris Eubacteris	Arqueobacteris Eubacteris Bacteriòfags	Arqueobacteris Eubacteris Bacteriòfags

### 3.1.3 Regulació al·lostèrica

Un dels trets més característics d'aquesta família d'enzims és el mecanisme de regulació al·lostèrica que presenten. Aquest mecanisme garanteix que una sola proteïna sigui capaç de reduir els quatre NTPs de manera específica i equilibrada en un mateix centre actiu. És així com aquest enzim manté els *pools* cel·lulars adequats de dNTPs per la correcta replicació de l'ADN (27).

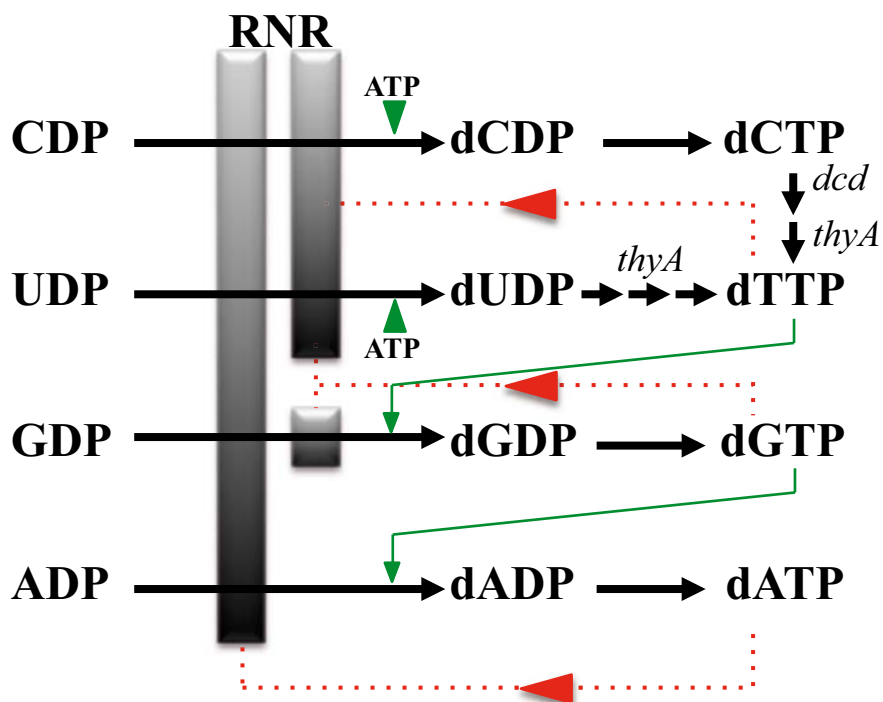
En el model de regulació d'*E. coli*, la proteïna catalítica NrdA conté dos llocs de regulació al·lostèrica: un que modula l'activitat general de l'enzim anomenat lloc al·lostèric d'activitat, i un altre anomenat lloc al·lostèric d'especificitat que decideix quin NTP ha de ser reduït en el centre actiu segons l'efector que se li uneix.

El lloc al·lostèric d'activitat només es troba present en algunes classes de RNR (Taula 1) i actua estimulants l'activitat general de l'enzim quan s'hi uneix ATP i inhibint-la, quan és el dATP el que s'hi uneix. L'afinitat del dATP pel lloc d'activitat és 10 vegades menor que la que té pel lloc al·lostèric d'especificitat (29). La RNR de classe Ib i algunes RNR de classe II no posseeixen la seqüència relativa al lloc al·lostèric d'activitat en l'extrem N-terminal en la seva estructura primària. La pèrdua d'aquesta seqüència, que si que està present en les RNR de classe Ia i III, indica la pèrdua del lloc al·lostèric d'activitat i, per tant, la no inhibició de l'activitat general de l'enzim (30).

Per altre banda, el lloc al·lostèric d'especificitat es troba present en totes les classes de RNR. Aquesta ubiqüitat fa pensar que tots els enzims presenten una regulació molt similar. En aquest lloc al·lostèric si uneix dGTP i dTTP a més a més de ATP i dATP. La unió d'ATP o dATP promou la reducció del CDP i UDP mentre que la unió del dGTP estimula la reducció de l'ADP i la del dTTP la del GDP (Figura 1). Quan la cèl·lula conté altes concentracions de dATP, és quan s'inactiva l'enzim i es para el subministrament dels dNTPs.

La seqüència aminoacídica que codifica pel lloc d'especificitat és molt similar en les RNR de classe I, II i III (9, 31). La classe III uneix 2 dATP i un ATP per cadena polipeptídica. Quan el dGTP o dTTP s'uneixen al lloc d'unió a purines (equivalent al lloc d'especificitat) l'enzim redueix ATP i GTP respectivament. La unió de dATP al lloc d'unió a purines o a pirimidines (equivalent al lloc de regulació al·lostèrica d'activitat) inhibeix l'activitat global de l'enzim.



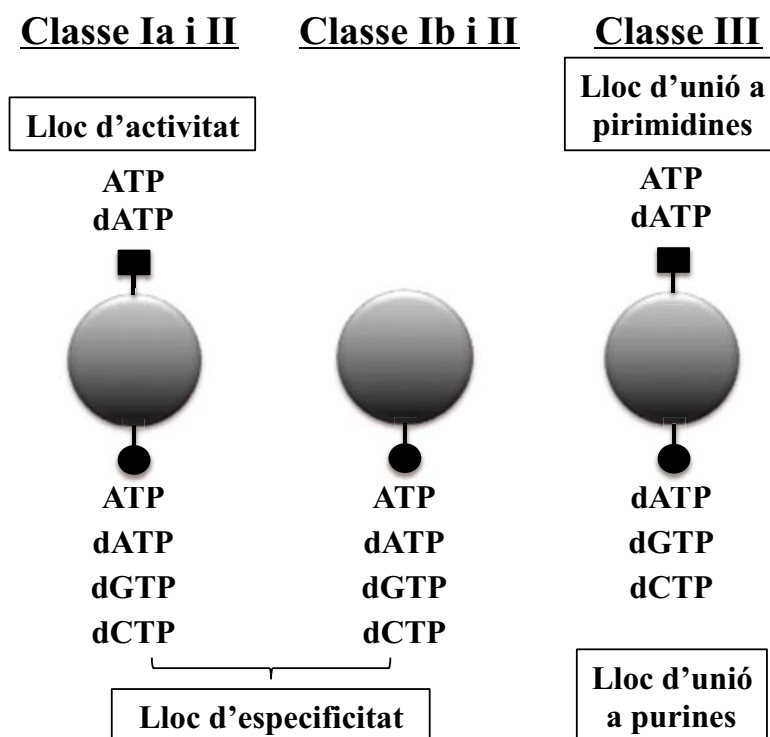


**Figura 1: Mecanisme de la regulació al·lostèrica d'especificitat de substrat per part de les RNR.** Les fletxes en vermell indiquen la inhibició de la reacció mentre que les de color verd indiquen activació.

La molècula dATP presenta un comportament dual quant a la regulació de la RNR: en baixes concentració actua com a efector positiu unint-se només al lloc al·lostèric d'especificitat mentre que a altes concentracions, també s'uneix al lloc al·lostèric d'activitat inhibint completament l'enzim. Hi han diferents explicacions descrites del motiu de la inhibició de la RNR per la unió del dATP. Estudis en *E. coli* i ratolí mostren com en altes concentracions de dATP es forma l'octàmer inactiu  $\alpha_4\beta_4$  en el bacteri i el complex  $\alpha_8\beta_2$  en el ratolí en comptes dels complexos actius  $\alpha_2\beta_2$  i  $\alpha_8\beta_2$  respectivament (29, 32, 33). Altres estudis han mostrat que en la RNR de ratolí suggereixen que a altes concentracions de dATP, el complex R1-R2 interfereix en la transferència del radical des de R2 a R1 (34).

En un treball on s'estudiava la RNR de classe Ia d'*E. coli* es va veure mitjançant *Surface Plasmon Resonance* (SPR) com a concentracions creixents de dATP la constant de dissociació ( $K_D$ ) del complex R1-R2 disminueix dràsticament (fins a 100 vegades). Aquest increment de dATP coincideix amb la inhibició de l'enzim (35, 36).

Segons el Professor Peter Reichard es pot explicar l'evolució de les diferents classes de RNR segons els llocs al·lostèrics d'aquest enzim. Així tenim que la regulació al·lostèrica d'aquest enzim començaria en la RNR de classe III mitjançant la presència dels dos llocs de regulació per separat. Només el lloc al·lostèric d'activitat seria capaç d'unir ATP, regulant així, tant l'activitat com l'especificitat pel substrat de l'enzim. El lloc de regulació al·lostèrica d'especificitat modularia l'especificitat així com l'activitat de la RNR, però no seria capaç de dur a terme la reducció de les purines. Durant l'evolució, el lloc al·lostèric d'especificitat de la classe II i Ia ha anat adquirint la capacitat d'unir ATP convertint-se en el lloc d'especificitat mentre que el lloc al·lostèric d'activitat ha derivat, només, a regular únicament l'activitat de l'enzim (Figura 2) (30).



**Figura 2. Esquema comparatiu dels diferents llocs d'unió a efectors de les RNR.** Les RNR de classe Ia i III contenen dos llocs de regulació al·lostèrica (d'activitat general i el d'especificitat de substrat) mentre que les RNR de classe Ib i la majoria de classe II només presenten el d'especificitat. (Figura adaptada de Reichard P 2002 (30)).

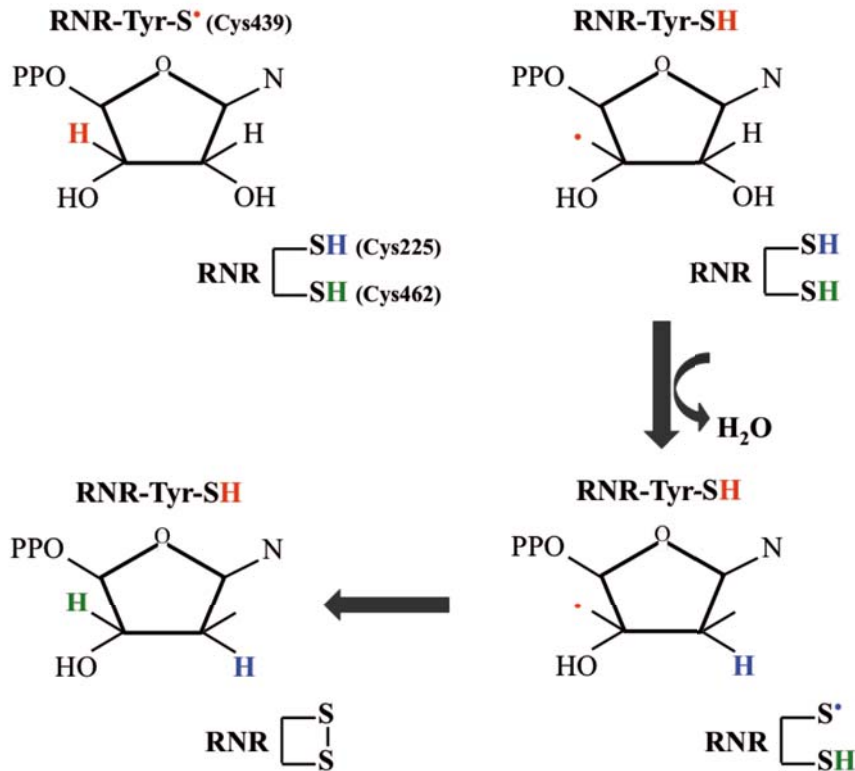
### 3.1.4 Mecanisme catalític

L'explicació del mecanisme catalític de les RNR es farà en relació a la RNR de classe Ia d'*E. coli* i en el sub-apartat 3.1.4.2 s'especificaran les diferències a nivell del mecanisme catalític entre les diferents classes de RNR.

La reacció de reducció dels NTP és dóna en el centre actiu de l'enzim localitzat en la proteïna catalítica R1. En aquest centre actiu és on hi han localitzades 3 cisteïnes, conservades a totes les diferents classes de RNR, encarregades de donar els hidrògens necessaris per reduir els ribonucleòtids (NTPs) que s'uniran (37).

En *E. coli*, les 3 cisteïnes és troben localitzades en els carbonis C<sub>439</sub> (Cys439), C<sub>225</sub> (Cys225) i C<sub>462</sub> (Cys462) de la cadena polipeptídica de la proteïna R1. La primera, Cys439, és l'encarregada d'iniciar la reducció del NTP i les altres dos s'oxiden contínuament amb la consegüent reducció del substrat. El potencial reductor d'aquestes dos últimes cisteïnes es regenera gràcies a unes redoxines (Trx o Grx) que participen en la regeneració del seu potencial redox perquè es pugui donar un altre cicle de reducció del NTP.

La reacció s'inicia quan el radical proteic, generat en el centre metàl·lic de la proteïna R2 arriba en últim terme, mitjançant una cadena transferència d'electrons, a la Cys439 oxidant-la. Aquesta oxidació, genera un radical tiil -S transitori que, seguidament, entra en contacte amb l'àtom d'hidrogen del C3 del nucleòtid oxidant-lo i fent que la cisteïna regeneri el seu potencial reductor altre vegada a tiol -SH. Aquest primer pas de la reacció, provoca que el C2 de la ribosa capti l'hidrogen de la cisteïna en posició més proximal a la ribosa, Cys225, reacció de la que n'esdevé una molècula d'H<sub>2</sub>O. En el pas següent, la cisteïna situada en posició més distal del NTP, Cys462, redueix el C3 de la ribosa inicial. Aquesta reacció genera un pont disulfur S-S entre les dos cisteïnes, Cys225 i Cys462 (Figura 3). Per tant, per reduir un NTP és necessiten de dos àtoms d'hidrogen (3, 10, 37).



**Figura 3:** Esquema de la reacció de catàlisi de la RNR de classe Ia. En cada pas de la reacció s'indica en diferent color la cisteïna involucrada en la reacció i el carboni de la ribosa que s'està reduint en cada cas.

### 3.1.4.1 Mecanisme de regeneració del poder reductor de les cisteïnes

Les cisteïnes que participen en la reducció del NTP s'han de tornar a reduir per poder catalitzar un altre cicle de reducció d'un altre ribonucleòtid diferent. Aquest poder reductor el proporciona un sistema de reductases tiol-depenent constituït per unes proteïnes petites (9-16 kDa), anomenades tioredoxines i glutaredoxines, que són les encarregades de tornar a reduir el grup disulfid S-S de l'extrem C-terminal de la RNR (38).

En el cas d'*E. coli*, aquest codifica en el seu genoma per dos tioredoxines (Trx1 i Trx2), tres glutaredoxines (Grx1, Grx2 i Grx3) i dos glutaredoxines-like (Grx4 i NrdH) (39). La primera tioredoxina que es va descobrir (Trx1) va ser identificada per la seva participació en la reducció dels NTPs (Taula 2) (39, 40).

Tant les tioredoxines com les glutaredoxines conserven el motiu CXXC, amb dos cisteïnes en la seqüència, en el seu centre actiu (41). Diferents estudis han identificat aquest motiu conservat com imprescindible per la regeneració del centre

actiu en la proteïna R1 de la RNR de classe Ia (42). Encara que mantinguin el centre actiu conservat, els dos sistemes redox difereixen a l'interior de la cèl·lula variant la manera en que es redueixen: mentre que les tioredoxines ho fan directament mitjançant una tioredoxina reductasa (TrxR) i el NADPH, les glutaredoxines ho fan via la proteïna glutatió (GSH) (43).

**Taula 2 adaptada de Meyer *et al.*, 2009 (39):** Descripció de les redoxines presents en *E. coli*.

Proteïna	Gen	Tamany	Centre Redox	Reductant
<b>Trx1</b>	<i>trxA</i>	127 aa	WCGPC	NADPH/Trx Reductasa
<b>Trx2</b>	<i>trxC</i>	139 aa	WCGPC	NADPH/Trx Reductasa
<b>Grx1</b>	<i>grxA</i>	85 aa	GCPYC	Glutatió Reduït
<b>Grx2</b>	<i>grxB</i>	215 aa	HCPYC	Glutatió Reduït
<b>Grx3</b>	<i>grxC</i>	82 aa	TCPYC	Glutatió Reduït
<b>Grx4</b>	<i>grxD</i>	115 aa	FCGFS	La 1/2 de la barreja de disulfid amb glutatió és reduïda per TrxR o Grx1
<b>NrdH</b>	<i>nrdH</i>	81 aa	DCVQC	TrxR

Estudis *in vitro* i *in vivo* han demostrat que tant la Trx1, Trx2, Grx1 i amb menys eficiència la Grx3 són capaces de proveir del potencial reductor requerit per les RNR (44, 45). Tot i així, la Trx1 és la preferent a l'hora de proveir els electrons en la RNR de classe Ia *in vivo*. En el cas de la classe Ib, aquest potencial ve donat per una glutaredoxina-like codificada dins del mateix operó que codifiquen les proteïnes R1 (NrdE) i R2 (NrdF) d'aquesta classe (46). Per altre banda, la RNR de classe II pot utilitzar el mateixos reductants que la classe I (47). I, per últim, la classe III RNR és la més diferent ja que el potencial reductor ve donat per una molècula molt senzilla com és el format, encara que alguns estudis, que necessiten ser corroborats, descriuen que necessita de l'activació d'una Trx (48). Més endavant s'explicarà amb més detall les diferències entre els mecanismes redox de les diferents classes de RNR.

Últimament s'està investigant el disseny de medicaments contra les tioredoxines i glutaredoxines com a una altre estratègia per combatre les infeccions bacterianes i el càncer. La inhabilitació del d'aquest sistema redox promouria la

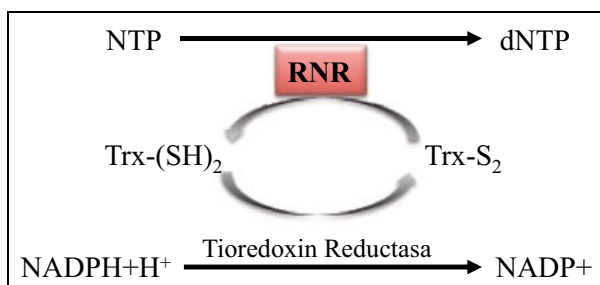
inhibició de les RNR bacterianes o humanes reduint els efectes tòxics per les cèl·lula no maligne (49-51).

En el proper apartat s'explicaran les diferències entre les tioredoxines i les glutaredoxines quant al mecanisme que fan servir per reduir el pont disulfid de la RNR.

#### 3.1.4.1.1 Sistema de tioredoxines

Les tioredoxines d'*E. coli* comparteixen els residus Cys-Gly-Pro-Cys en el centre actiu amb la resta de tioredoxines presents en altres éssers vius (52). Aquest sistema disulfid reductasa es poc eficient, posseeix una activitat 8 vegades inferior al sistema de glutaredoxines (53).

La TrxR (tioredoxina reductasa) s'uneix a una butxaca hidrofòbica constituïda pels residus Phe12, Phe27, Phe81 i Leu58 i utilitza els electrons provinents del NADPH per catalitzar la reacció en que el centre actiu disulfid de la Trx queda reduït (54). La reacció és dona mitjançant les dos reaccions: una primera encarregada de generar el potencial reductor de la tioredoxina a través del NADPH i una segona que empra aquest poder reductor per regenerar el sistema redox de la RNR (Figura 4):

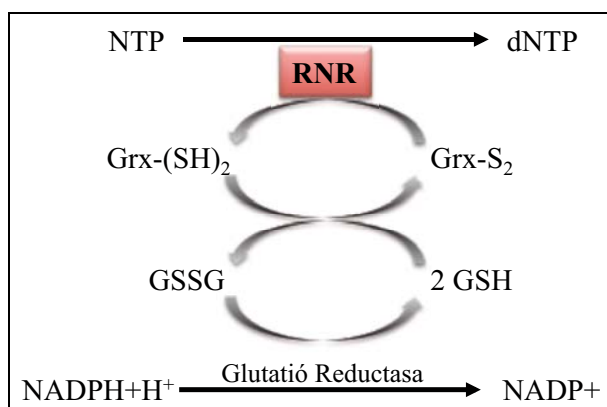


**Figura 4:** Esquema de la reducció dels NTP mitjançant el sistema redox de la Trx. La Trx abstrau el potencial redox del NADPH+H<sup>+</sup> per reduir el NTP.

#### 3.1.4.1.2 Sistema de glutaredoxines

Per una altra banda, totes les glutaredoxines presents en *E. coli* comparteixen un centre actiu conservat Cys-Pro-Tyr-Cys. Aquest sistema redox és capaç no només de catalitzar reaccions via ditiols (igual que el sistema de tioredoxines) sinó també via un mecanisme que utilitza monotiols (55-57).

El sistema de glutaredoxines requereix del glutatió (o proteïna GSH) per dur a terme la reducció, a més a més, d'una glutatió reductasa (GR) encarregada de captar els hidrògens del NADPH i reduir aquest glutatió. Una vegada reduït, el glutatió transfereix el poder reductor a la glutaredoxina, a diferència del sistema de tioredoxines a on la Trx capta els hidrògens directament del NADPH (Figura 5) (43). El glutatió s'uneix a un solc de la glutaredoxina format pels residus: Tyr13, Thr50, Thr51, Val52 i Arg40 (58).



**Figura 5:** Esquema de la reducció dels NTP mitjançant el sistema redox de la Grx. La glutaredoxina obté el potencial redox per dur a terme la catàlisi de l'oxidació del glutatió (GSH), que al mateix temps l'abstrau de la molècula NADPH+H<sup>+</sup>.

El rol que presenta el sistema de glutaredoxines per la regeneració de la RNR es pot correlacionar amb estudis que mostren com la concentració del GSH augmenta a mesura que també ho fa la proliferació cel·lular i per contra, la limitació d'aquesta proteïna la limita (59).

### 3.1.4.2 Diferències en el Mecanisme catalític entre classes de RNR

Les tres classes de RNR presenten una estructura molt similar quant a la composició del centre actiu: totes tres conserven la cisteïna encarregada de generar el radical tiil per dur a terme la reducció dels diferents ribonucleòtids. Aquesta cisteïna correspon a la Cys439 en la RNR de classe Ia d'*E. coli*, a la Cys408 de la RNR de classe II de *L. leichmanni* i la Cys290 en la RNR de classe III del bacteriòfag T4.

Apart d'aquesta similitud, les tres classes de RNR es diferencien en diferents aspectes sobretot en el mecanisme d'iniciació de la catàlisi.

#### 3.1.4.2.1 Mecanisme catalític de la RNR de classe Ia

El mecanisme de catàlisi de la RNR de classe Ia és el descrit en l'apartat 3.1.4 i és el més estudiat. En la RNR de classe Ia, el radical es genera en la proteïna NrdB (R2) mentre que la catàlisi (reducció del ribonucleòtid) es dona en la proteïna NrdA (R1), sent les dues proteïnes essencials per a l'activitat de l'enzim (3, 28).

Com ja s'ha comentat anteriorment, la subunitat R1 conté el centre catalític de l'enzim mentre que la R2 conté un radical tirosil i és capaç de generar un radical tiil al final d'una cadena d'electrons. Al final d'aquesta cadena d'electrons és on hi han dues cisteïnes conservades que configuren el centre actiu de l'enzim, en subunitat R1. En la RNR de classe Ia, la presència de l'oxigen és el que fa generar un centre di-fèrric  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O-Fe}^{\text{III}}$  i un radical proteic en la Tyr122 encarregada de transferir el radical a la cisteïna Cys439, la qual iniciarà la reducció del substrat (60, 61).

La RNR de classe Ia conté residus aminoacídics actius en el centre actiu de l'enzim que es troben estructuralment més conservats amb la classe II que no amb la classe III. Els aminoàcids Glu441, Asn437, Cys225 i Cys462 de la classe Ia d'*E. coli*, corresponen als residus Glu410, Asn406, Cys119 i Cys419 de la RNR de classe II de *L. leichmannii* (model bacterià per la RNR de classe II) (56).

El poder reductor necessari per tornar a reduir les cisteïnes i que es doni un altre cicle de reducció del ribonucleòtid ve donat pel sistema de tioredoxines o glutaredoxines juntament amb el NADPH (56). A més a més, estudis de cinètica i mutagènesis *in vitro* mostren un rol clau del parell de cisteïnes (CXXXXC o CXXC) en posició C-terminal de la subunitat R1 en la regeneració del poder reductor del seu centre actiu (62).

#### 3.1.4.2.2 Mecanisme catalític classe Ib

La presència de les dues proteïnes addicionals NrdI i NrdH involucrades en la reducció de la ribosa són el tret diferencial de la RNR de classe Ib.

La flavodoxina NrdI es va identificar per primera vegada en *E. coli* i *S. typhimurium* per transcriure's en el mateix operó que els gens *nrdEF* (63). NrdI posseeix unes condicions redox que li confereixen la capacitat de poder transferir dos electrons simultàniament, sent així, una excepció dins de la família de flavodoxines a



on l'usual és la transferència d'un sol electró (64). Estudis han demostrat que quan el cofactor del centre metàl·lic és el Fe<sup>III</sup>, NrdI només és capaç de proveir d'un electró mentre que quan és el Mn<sup>III</sup> en dona dos (65).

En resum, NrdI és l'encarregada de la biosíntesi del clúster de di-manganés en la proteïna NrdF. Quan aquesta proteïna està en forma reduïda (NrdI<sub>hq</sub>) s'encarrega de reduir l'O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o HO<sub>2</sub>[HOO(H)], el qual està unit en el centre metàl·lic de NrdF, proveint així l'oxidant necessari per la generació del centre de di-manganés (66). Després d'aquesta reacció, NrdI passa a estar en forma oxidada (NrdI<sub>ox</sub>), en aquest estat redox, NrdI es dissociaria de NrdF per permetre que la unió d'una altre NrdI<sub>hq</sub> o bé, seria reduïda per un reductant desconegut (65).

Com s'ha dit al començament d'aquest apartat, la RNR de classe Ib també es diferencia de les altres classes per codificar per la seva pròpia glutaredoxina: NrdH. Aquesta glutaredoxina-like es va aïllar inicialment en *Lactococcus lactis* i després es va veure que tant *E. coli* com *S. typhimurium* presentaven homòlegs d'aquesta proteïna. NrdH posseeix el domini CXXC típic de les redoxines i és imprescindible perquè NrdI sigui activa i es pugui generar el radical (11). Una vegada general el radical, el mecanisme de transferència d'electrons és el mateix que per la RNR de classe Ia. En l'apartat 3.1.5.2 s'aprofundeix en l'estructura de NrdH i les diferències i semblances amb les tioredoxines i glutaredoxines.

Inicialment, estudis en el bacteri *Corynebacterium ammoniagenes* mostraven que la presència del radical tirosil requeria de la presència d'un centre di-fèrric, encara que la seva proteïna NrdF (corresponent a R2) podia tenir altres tipus de centres metàl·lics. Experiments a on es feia una tractament d'apoNrdF amb quantitats equimolars de ferro i manganés, resultaven en que la proteïna era capaç d'unir la mateixa proporció de cada cofactor (67). Anys més tard, i basant-se en estudis fets en *C. ammoniagenes* (68) i *Bacillus subtilis* (69) a on es demostrava el requeriment del manganés pel seu creixement, es van fer diferents estudis *in vitro* on l'objectiu era aconseguir una proteïna NrdF activa i capaç de generar el radical tirosil. La purificació de la proteïna NrdF de *C. ammoniagenes* va establir que es requerís d'un centre de Mn<sup>III</sup>-O-Mn<sup>III</sup> per poder generar el radical (66, 70). Tot i així, NrdF és catalíticament actiu tant amb un centre di-fèrric com de di-manganés tot i que estudis *in vivo* estableixen que la classe Ib utilitza el de di-manganés (12).

### 3.1.4.2.3 Mecanisme catalític classe Ic

Aquesta classe de RNR es va descobrir en *Chlamydia trachomatis* (8) sent aquest el bacteri a on més estudis s'han fet i en el que em basaré per explicar aquest apartat.

La gran diferència de la RNR classe Ic quant al mecanisme catalític és que genera un radical de fenilalanina, en comptes de tirosil, en un centre metàl·lic Mn<sup>IV</sup>-O-Fe<sup>III</sup> en la subunitat NrdB. La cristal·lització de la proteïna NrdB de *C. trachomatis* va mostrar la posició d'una Phe127 a on en la RNR de classe Ia hi ha una tirosina (8, 71).

Quan no hi ha O<sub>2</sub>, aquest centre es troba en estat Mn<sup>II</sup>-Fe<sup>II</sup>. En presència d'O<sub>2</sub>, el Mn<sup>II</sup>-Fe<sup>II</sup> passa a un estat intermedi Mn<sup>IV</sup>-Fe<sup>IV</sup> i finalment a Mn<sup>IV</sup>-O-Fe<sup>III</sup> (72). Altres estudis han demostrat que apart de l'O<sub>2</sub>, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> també es capaç d'activar el centre metàl·lic i generar el radical (14). Aquesta reacció es dona en dos passos a través del Trp51 (corresponent al Trp48 en *E. coli*) en comptes de la Tyr222 (equivalent a la Tyr338 d'*E. coli*) (73). Per analogia amb la RNR de classe Ia d'*E. coli*, la Cys672 conservada en la subunitat NrdA seria l'encarregada de reduir de manera reversible el Mn<sup>IV</sup> a través de la cadena d'electrons generada pels residus aromàtics Tyr990 i Tyr991 en NrdA i Tyr338 i Trp51 en NrdB (74).

### 3.1.4.3 Mecanisme catalític classe II

En el cas de la RNR de classe II, el radical tiil, es genera directament en el centre actiu de l'enzim utilitzant el cofactor 5' deoxiadenosilcobalamina (AdoCbl). La generació del radical tiil es dona després de la unió de la deoxiadenosilcobalamina generant el radical deoxiadenosil i també cobalt<sup>II</sup>. La unió de l'AdoCbl té lloc en un motiu extra conservat (Asp-x-His-x-Gly-x14-Val-x-x-Gly-x35-Ser-x-Val-x36-Gly) (75) que es troba en l'extrem C-terminal de la proteïna (56, 76).

En l'extrem C-terminal, és on hi han el parell de cisteïnes que completen el cicle catalític interactuant amb el sistema de tioredoxines i reduint el pont disulfur format en el centre actiu per les dos cisteïnes Cys119 i Cys419 (numeració de *L. leichmanni*) (56).

### 3.1.4.4 Mecanisme catalític classe III

En la RNR de classe III el radical proteic es troba en el residu aminoacídic Gly580 de la proteïna NrdD del bacteriòfag T4. Aquest radical glicil es dona gràcies a 3 components principals:

- 1) **Sistema redox** constituït per: NADPH, una flavodoxina i una NADPH flavodoxia reductasa.
- 2) La proteïna **NrdG** o anomenada també *activasa*.
- 3) La **S-adenosilmetionina**.

Les diferències quant al mecanisme catalític d'aquesta classe de RNR s'explicaran en referència al bacteriòfag T4 per poder tenir els tres models diferents de RNR en tres microorganismes diferents i no només en *E. coli*.

La classe III del bacteriòfag T4 posseeix, només, de dos cisteïnes conservades en el centre actiu de l'enzim: la Cys290 i la Cys79. La Cys79 és la que s'ha descrit com encarregada de reduir-se gràcies a l'hidrogen situat a la posició 3' de la ribosa corresponent a la Cys225 d'*E. coli* (classe I) i la Cys119 de *L. leichmanni* (classe II). El paper de de la Cys462 en NrdA, ve donat per l'Asn311 en la RNR de classe III (9, 77).

En aquesta classe, la generació del radical comença quan en el centre metàl·lic 4Fe-4S, localitzat en la proteïna NrdG, transfereix un electró provinent d'una flavodoxina a la S-adenosilmetionina. La transferència de l'electró es dona en NrdG sent aquesta la única reacció de la que es responsable aquesta proteïna (78). En condicions d'anaerobiosi estricta, el centre 4Fe-4S pot trobar-se en dos estats redox diferents:  $[4Fe-4S]^{2+}$  i  $[4Fe-4S]^+$  (79).

Quan el clúster  $[4Fe-4S]^{2+}/[4Fe-4S]^+$  es troba reduït, es capaç de reduir el cofactor AdoMet donant lloc a la S-adenosilmetionina permetent així la generació d'un radical 5'-deoxiadenosil (80). Un estudi va mostrar, mitjançant mutagènesis dirigida, que les tres cisteïnes Cys26, Cys30 i Cys33 en NrdG donen lloc al motiu CXXXCXXC encarregat de la unió del ferro. Aquestes tres cisteïnes s'han trobat conservades en totes les proteïnes NrdG de totes el enterobactèries i tenen un paper indispensable en l'estabilització del clúster 4Fe-4S per la reducció de l'AdoMet i la

posterior generació del radical. El motiu CXXXCXXC també s'ha trobat conservat en l'enzim piruvat format liasa (PFL; enzim essencial pel metabolisme anaeròbic) i en la biotina sintasa, enzim encarregat de la conversió de la detiobiotina a biotina, el qual també posseeix un clúster [2Fe-2S] (56, 79).

La RNR de classe III no regenera el seu potencial redox gràcies al sistema tioredoxines o glutaredoxines com ho fan les RNR de classe I o II, sinó que ho fa a partir del format. Quan el radical tiil es forma en la Cys290, aquesta pren l'hidrogen del format generant així un radical formil i sent l'encarregat de generar el radical en la ribosa (56).

### 3.1.5 Estructura tridimensional de les RNR

#### 3.1.5.1 Classe Ia

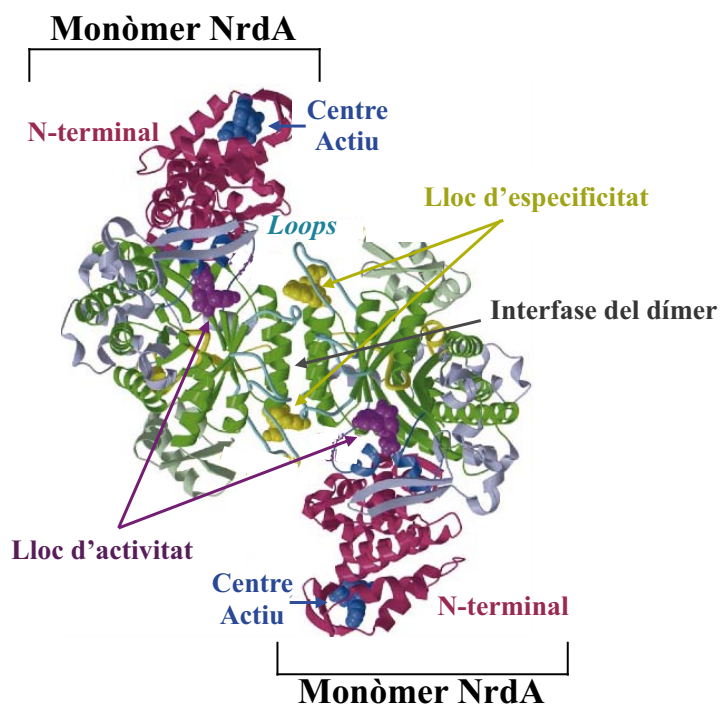
Com ja he esmentat en altres apartats, l'enzim RNR consta de dues subunitats no idèntiques anomenades R1 (ò  $\alpha$ ) i R2 (ò  $\beta$ ). La RNR de classe Ia, en proteïna NrdA (R1) és a on hi han els dos llocs de regulació al·lostèrica i es produeix la catàlisi, mentre que NrdB (R2) a on es genera el radical. Les dues proteïnes componen l'holoenzim actiu.

En *E. coli* el monòmer NrdA té un pes molecular de 85.7 kDa i consisteix de 761 aminoàcids agrupats en dominis: un domini hèlix en l'extrem N-terminal compost per 220 residus aminoacídics, un altre domini format per 480 residus que donen lloc a 10 làmines  $\alpha/\beta$  en forma de barril i és a on es troba el centre actiu de l'enzim, i 70 residus més que formem un domini  $\alpha\beta\alpha\beta$  encarregat de cobrir el fons del barril (81).

La purificació de la proteïna NrdA d'*E. coli* a finals dels anys 60 va evidenciar que l'estructura predominant de l'enzim es troba en forma dimèrica en absència de qualsevol lligand o efector (29). Per tant, sempre s'ha cregut l'estructura tetramèrica  $\alpha_2\beta_2$  és la forma predominant activa de l'enzim d'*E. coli*. El dímer  $[\text{NrdA}]_2$  el componen dos polipèptids idèntics. Els dos polipèptids contenen una leucina en el seu extrem C-terminal, mentre que en l'extrem N-terminal, un conté un residu d'àcid glutàmic i l'altre el conté d'àcid aspàrtic (32). L'àrea d'interacció entre els dos polipèptids NrdA per formar el dímer la constitueix la regió formada per una hèlix  $\alpha A$  (residus 234-250) i la regió constituïda per una hèlix  $\alpha B$  (residus 279-289) del barril que es troben connectades a la cadena  $\beta B$  (residus 253-257) mitjançant dos regions de *loop* entre els residus 251-252 i 258-278. La regió *loop* més llarga (*loop* 1) juntament amb part de la regió *loop* (residus 290-297) que segueix a continuació  $\alpha B$  anomenat *loop* 2 contribueixen a la interacció del dímer així com en la interacció de NrdA amb NrdB. La formació del dímer  $[\text{NrdA}]_2$  s'estabilitza gràcies a unions del tipus Van der Waals (82).

En la interfase del dímer  $[\text{NrdA}]_2$  és on es troba situat el lloc de regulació al·lostèrica d'especificitat, el qual es comunica mitjançant l'estructura del *loop* 2 amb el centre actiu de l'enzim. La conformació del *loop* 2 es troba modulada tant pel

substrat com per la unió del efector, sent el major determinant per la correcta regulació de l'especificitat pel substrat de la RNR (9, 18, 83). Mutacions que afectin en la conformació del *loop 2* afecten en la capacitat de l'enzim per discernir quin NTP és el que s'ha d'unir (84). Per altre banda, el lloc de regulació al·lostèrica d'activitat es troba situat en l'extrem N-terminal de la proteïna NrdA. Els 20 residus inicials de l'extrem N-terminal formen 3 làmines  $\beta$  juntament amb els residus 50-52 que cobreixen 4 cadenes  $\alpha$  formant així una fissura a on es troba el lloc al·lostèric d'activitat (9) (Figura 6).



**Figura 6. Dibuix del dímer [NrdA]<sub>2</sub>.** Al dibuix es mostra la disposició dels dos monòmers NrdA quan es forma el dímer i la situació espacial dels diferents elements estructurals: en groc es mostra els llocs de regulació al·lostèrica d'especificitat i en lila els d'activitat general de l'enzim. Les diferents estructures *loop* es troben en color turquesa, en blau els centres actius i magenta els domini N-terminal. A més a més, en verd s'assenyalen les 10 làmines  $\alpha/\beta$  en ambdós monòmers. (Figura adaptada de Erikson M *et al.*, 1997 (9)).

La RNR de classe Ia (igual com les altres classes de RNR) requereix d'una integritat absoluta ja que mutacions simples en la proteïna NrdA poden canviar-ne l'estructura quaternària així com la seva activitat. La substitució de l'Asp238 en el polipèptid  $\alpha A$  per una alanina, per exemple, interfereix en la formació del dímer. Així com, substitucions aminoacídiques en el lloc al·lostèric d'activitat com His59Tyr i

His88Tyr fan que l'enzim no sigui capaç d'unir ATP o dATP, fent, a més a més, que l'enzim no sigui capaç de discernir entre l'efecte inhibitori o activador d'aquests dos efectors (82). També s'ha vist com diferents mutacions que involucren les hèlix  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  i  $\alpha 4$  del lloc al·lostèric d'activitat en NrdA, interfereixen en la formació dels *loops*, afectant també en la unió del dATP i inhibint la formació del complex NrdAB (36, 84).

Per una altre banda, el monòmer NrdB (R2) d'*E. coli* te un pes molecular de 43.4 kDa que consta en 375 aminoàcids. Cada monòmer el formen 13 hèlix  $\alpha$  i 2 fulles  $\beta$ . Com ja s'ha comentat, en NrdB és on es genera el radical necessari per dur a terme la catàlisi. La Tyr122, que conté el radical, es troba enterrada a l'interior de cada monòmer NrdB molt a prop del centre di-fèrric. Comparat amb NrdA, la interacció entre els monòmers NrdB per la formació del dímer és molt més fina. Aquesta zona te una àrea d'interacció, constituïda per una zona hidrofòbica en el centre, que es troba envoltada per aminoàcids carregats i interaccions polars. Estudis d'homologia entre espècies han corroborat que ni les interaccions proteïna-proteïna de NrdB ni els residus encarregats d'interaccionar en la interfase proteica es troben conservats (85).

Igual com passa en NrdA, petites mutacions poden esdevenir fatals per l'activitat de l'enzim. S'ha vist com canvis en la conformació de NrdB provoquen que la comunicació entre el radical tirosil, generat en NrdB i la Cys439, localitzat en el lloc catalític de NrdA, es perdi (84, 86).

La interacció entre R1 i R2 per formar l'enzim actiu es dona per l'extrem C-terminal de la proteïna R2 (NrdB) i les dos hèlix ( $\alpha 1$  i  $\alpha 3$ ) de R1 (NrdA) (81, 87-89). El model de l'holoenzim NrdAB d'*E. coli* revela que l'estructura dimèrica de NrdA presenta complementarietat a una part del dímer de NrdB permeten generar una estructura de l'holoenzim  $\alpha_2\beta_2$  (81, 84, 90).

Una vegada s'ha format l'holoenzim, aquest s'ha de mantenir i reforçar. Hi han diferents estudis d'ultracentrifugació i de SPR que han anat revelant diferents condicions i mecanismes que fan que l'holoenzim R1-R2 enforteixi la seva interacció. Un d'ells és la corroboració de que la unió dels nucleòtids efectors enforteixen la formació del complex R1-R2, sent aquesta unió fins a 2-3 vegades més intensa quan s'utilitzen diferents combinacions de nucleòtids efectors amb el substrat que quan només s'utilitza un sol nucleòtid efector (32, 35, 91). També s'ha vist com la presència de la tioredoxina reforça la formació del complex R1-R2. Aquest reforç ve donat

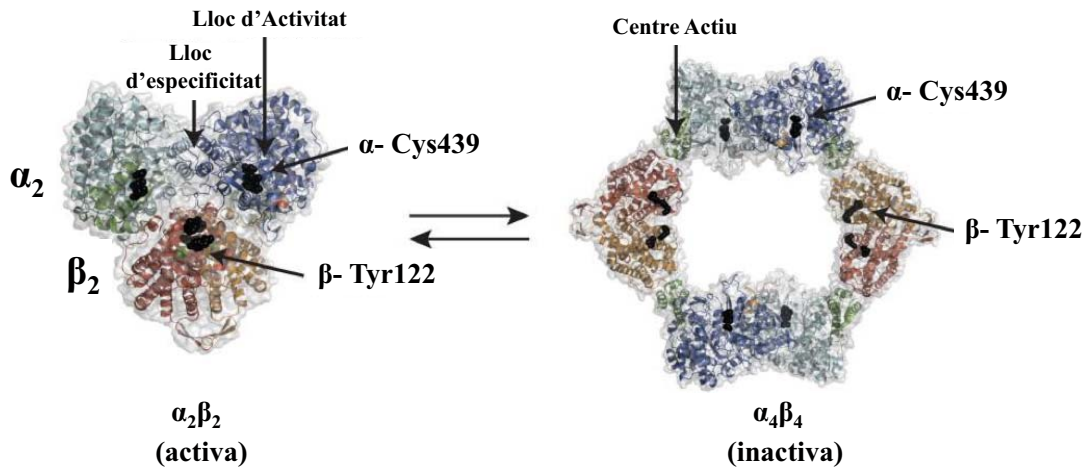
perquè la proteïna R1 oxidada presenta una unió feble a R2, altres estudis han corroborat que tant la tioredoxina com la glutaredoxina redueix l'extrem C-terminal de R2 (92), la presència de la redoxina promou que s'enforteixi la formació del complex assegurant-se que l'extrem C-terminal es troba reduït (35). La unió del dATP també afecta en la interacció entre R1 i R2 i la formació del complex oligomèric (36, 84).

Mitjançant 4 tècniques diferents: desviació de raig X en angle petit (SAXS), ultracentrifugació analítica, microscopia electrònica i cristal·lografia X-ray, un estudi va investigar com la unió del dATP induïx l'oligomerització del complex actiu  $\alpha_2\beta_2$  a l'inactiu  $\alpha_4\beta_4$ , gràcies a les imatges obtingudes mitjançant aquestes tècniques, es va poder generar l'estructura tridimensional de l'anell del complex  $\alpha_4\beta_4$ , el qual es va corroborar mitjançant la co-cristal·lització de la proteïna NrdA i de la NrdB amb 10 mM d'ATP (93). Gràcies aquest estudi, es va saber que en l'estructura  $\alpha_4\beta_4$ ,  $\alpha_2$  i  $\beta_2$  a més a més de contactar entre elles mitjançant una butxaca d'unió en  $\alpha_2$  a la part C-terminal de  $\beta_2$  (81), també ho fan a través del lloc de regulació al·lostèrica d'activitat (93).

L'estructura quaternària de la RNR no estava molt clara fins que es van realitzar uns estudis mitjançant la tècnica GEMMA (*Gas-phase Electrophoretic Mobility Macromolecule Analysis*). Aquesta tècnica fa passar les proteïnes a estat gasos per mesurar el seu diàmetre i s'ha fet servir com a una tècnica d'alta resolució per caracteritzar la RNR de classe Ia d'*E. coli*. Gràcies a aquesta tècnica, juntament amb anàlisis de SPR i altres assajos enzimàtics complementaris, es va saber que la RNR de classe Ia induïx la seva forma activa de l'enzim  $\alpha_2\beta_2$ , en presència de l'ATP, dTTP o el dGTP, mitjançant l'estimulació de la formació  $\alpha_2$  i promovent la interacció entre els monòmers R1. A més a més, en presència d'ATP o combinacions d'ATP + dTTP/dGTP l'enzim passa a la seva estructura inactiva  $\alpha_4\beta_4$  (Figura 7). També es sap que la unió del dTTP al lloc d'especificitat podia augmentar l'efecte inhibitori del dATP augmentant la unió del dATP en el lloc d'activitat general de l'enzim (94), els resultats de GEMMA va suggerir que l'afinitat de l'ATP pel lloc d'activitat augmenta en presència de la proteïna R2 i del dTTP. Aquesta inhibició es produeix quan la concentració de dATP que es necessita per causar la inhibició de l'enzim disminueix. En comparació, l'afinitat de l'ATP pel lloc d'activitat es aproximadament 10 vegades inferior que el dATP quan es mesura en absència de dTTP i proteïna R2. L'efecte favorable de R2 en l'afinitat de l'ATP/dATP pot ser



explicat pel fet que la forma inactiva  $\alpha_4\beta_4$  té una afinitat superior per l'ATP que la té el complex  $\alpha_2$  (33).



**Figura 7.** Dibuix de l'estructura quaternària de la RNR de classe Ia d' *E. coli*. Al dibuix es mostra l'estructura activa de l'enzim  $\alpha_2\beta_2$  que seria en presència d'ATP, dTTP o el dGTP i també l'estructura inactiva  $\alpha_4\beta_4$  quan es troba en presència d'ATP o ATP + dTTP/dGTP. (Figura adaptada de Zimanyi CM *et al.*, 2012 (95)).

### 3.1.5.2 Classe Ib

La RNR de classe Ib de *S. typhimurium*, primer bacteri a on es va obtenir la seqüència dels gens i estructura tridimensional, és el prototip d'aquesta classe de RNR. NrdE (R1E) és la subunitat catalítica mentre que NrdF (R2F) és l'encarregada de generar el radical. NrdE consta de 720 aminoàcids amb un pes molecular de 80.5 kDa, mentre que la subunitat NrdF la formen 319 aminoàcids amb un pes molecular de 36 kDa (96). El funcionament enzimàtic de NrdE i NrdF és igual que el que ve donat per NrdA i NrdB en la RNR de classe Ia d'*E. coli*. Aquesta classe però, es diferencia per la implicació de dues proteïnes accessòries específiques per aquest sistema: la flavodoxina NrdI i la glutaredoxina-like NrdH. NrdH és una proteïna de tant sols 9 kDa compresos en 81 aminoàcids mentre que NrdI té un pes de 15.3 kDa per monòmer agrupats en 136 aminoàcids que uneix flavina (FMN) com a cofactor (3). En aquest apartat em centraré en l'explicació d'aquestes dos proteïnes exclusives d'aquesta classe de RNR.

La família de redoxines NrdH tenen el típic motiu CXXC en el centre actiu situat en l'extrem N-terminal molt semblant al que trobem en les tioredoxines, en

aquest cas, però, els residus interns són una glutamina i una valina. Aquesta glutaredoxina-*like* posseeix una seqüència que comparteix entre un 35 a un 85% d'identitat amb la família de les glutaredoxines (11, 97) per això, malgrat tingui un centre actiu semblant a les Trx, la seva estructura primària és semblant a les Grx. La gran diferència, i per això no es pot classificar com una glutaredoxina, és la manca del lloc d'unió al glutatió (GSH) en la seva seqüència primària, per tant, el glutatió no és l'encarregat de reduir les cisteïnes de RNR sinó que ho fa a través de la tioredoxina reductasa TrxR (11). En la NrdH d'*E.coli* s'ha trobat que conté una butxaca hidrofòbica al costat del seu centre actiu composta per: Val54 i Ile55 envoltades pels residus hidrofòbics Val33, Leu43, Phe48 i Tyr6. Al final d'aquesta butxaca s'hi troben tres arginines: Arg8, Arg44 i Arg49 que aporten càrregues positives al voltant de la superfície. Aquesta butxaca en NrdH es troba situada en similar posició que la butxaca que posseeixen les tioredoxines formades per Phe12, Phe27, Phe81 i Leu58 (en aquest cas no hi ha superfície carregada positivament) i correspondria al lloc d'unió de la TrxR (58).

L'estructura tridimensional de NrdH d'*E. coli* consisteix en 4 làmines  $\beta$ , amb topologia  $-1x, +2x, +1x$ , que es troben flanquejades per tres hèlix  $\alpha$ , sent aquesta l'estructura típica de la família proteica de les tioredoxines (98). Una de les hèlix ( $\alpha_2$ ) es disposa perpendicular a les altres hèlix ( $\alpha_1$  i  $\alpha_3$ ), la llargada d'aquesta  $\alpha_2$  fa que no hi hagi el *loop* entre l'hèlix  $\alpha_2$  i la làmina  $\beta_3$  que sí que hi ha en les Trx. A més a més, s'ha identificat una prolina (Pro52) en *cis*, altament conservada dins la família de les tioredoxines, al començament de la làmina  $\beta_3$  de NrdH (58). Entre el final de la cadena  $\beta_4$ , l'estructura *loop* que la segueix i el començament de l'hèlix  $\alpha_3$  s'hi troba conservat el motiu Trp-Ser-Gly-Phe-Arg-Pro(Asp/Glu). La part N-terminal es estructuralment molt similar amb la família de Trx i Grx. Les seqüències de les làmines  $\beta_1, \beta_2$  i  $\beta_3$  així com amb la part N-terminal de hèlix  $\alpha_1$  s'alineen igual en les 3 famílies proteiques. A diferència de les tioredoxines, NrdH no posseeix una làmina  $\beta$  extra i una  $\alpha$  a la part N-terminal de la seva seqüència així com tampoc conté el *loop* format per l'hèlix  $\alpha_2$  i la làmina  $\beta_3$  que sí que tenen les tioredoxines. Al començament de l'hèlix  $\alpha_1$  és on es troba el centre actiu i les Cys11 i Cys14 formen un pont disulfidic que NrdH es trobi en estat oxidat (58, 64).

A l'any 2008 es va veure la importància de NrdI en *Streptococcus pyogenes* quant a la reducció dels NTP en la RNR de classe Ib. En aquest bacteri, la seqüència

aminoacídica de NrdI comparteix un 75% de similitud amb la proteïna NrdI d'*E. coli* (11, 99). En el 2010 es va aconseguir l'estructura cristal·lina del la proteïna NrdI de *Bacillus anthracis* en estat oxidat i també químicament reduït. En aquest article es va mostrar com una regió rica en estructures *loop* contribuïa en l'afinitat que tenia NrdI per NrdF (100). En el mateix 2010 un estudi va revelar la formació del complex NrdI-NrdF en *E. coli* tant quan NrdI es troba en estat oxidat com reduït (101). NrdI podria induir canvis conformacionals en NrdF per permetre que l'entrada de l'electró al centre metàl·lic, encara que ni la unió de NrdI<sub>hq</sub> ni NrdI<sub>ox</sub> han donat canvis en el clúster de Mn<sup>II</sup>M<sup>II</sup> en l'estructura de cristall. Les reorganitzacions que es donen durant la oxidació del centre metàl·lic Mn<sup>II</sup>M<sup>II</sup> en NrdF s'haurien d'estudiar monitoritzant els canvis estructurals que es van produint mentre es va afegint O<sub>2</sub> a complex de cristall NrdI<sub>hq</sub>-NrdF (10).

En el cas *E. coli*, en estat oxidat, un monòmer NrdI s'uneix a NrdF per la part contrària de la interfase del dímer [NrdF]<sub>2</sub> pel canal hidròfil que va directe al centre metàl·lic de manganés. Aquest canal s'estén al llarg de la interfase NrdI-NrdF fins a la flavina que s'hi troba unida (101). La naturalesa hidròfila d'aquest canal és un tret diferencial amb els canals hidrofòbics que uneixen l'oxigen amb el ferro en les classes Ia i Ic RNR (10, 85, 102). La interfase que queda entre el complex NrdI-NrdF és molt hidrofòbica i conté molts ponts d'hidrogen entre les proteïnes (101).

La NrdI d'*E. coli* adopta la conformació típica d'una flavodoxina amb l'anell de isoalloxazina del cofactor FMN en la superfície proteica, molt a prop de dos regions riques amb estructures del tipus *loop*. Una d'aquestes regions confereix càrrega positiva a NrdI perquè interaccioni amb l'Arg92 de la flavina mentre que l'altre regió de *loops* és una regió rica en glicines que dona lloc a 50 d'aquestes estructures *loop*. Aquesta regió "50s *loop*" interacciona amb l'àtom de nitrogen en posició 5 de la flavina, provocant canvis conformacionals dependents del potencial redox. La densitat dels electrons al llarg d'aquests 50 *loops* no és contínua suggerint flexibilitat conformacional. En estat reduït en canvi, la regió de "50s *loop*" adopta una conformació més oberta deixant al descobert l'anell de isoalloxazina. A més a més, l'Arg25 de NrdF s'orienta molt més cap al C4 a on hi ha l'Arg92 de la flavina i el monòmer NrdF s'uneix mitjançant un pont d'hidrogen amb la Gly50 de NrdI (101).

NrdI és clau perquè es pugui donar la biosíntesi del centre metàl·lic en NrdF i diferenciant-se de les altres classes de RNR que no codifiquen per aquesta proteïna accessòria.

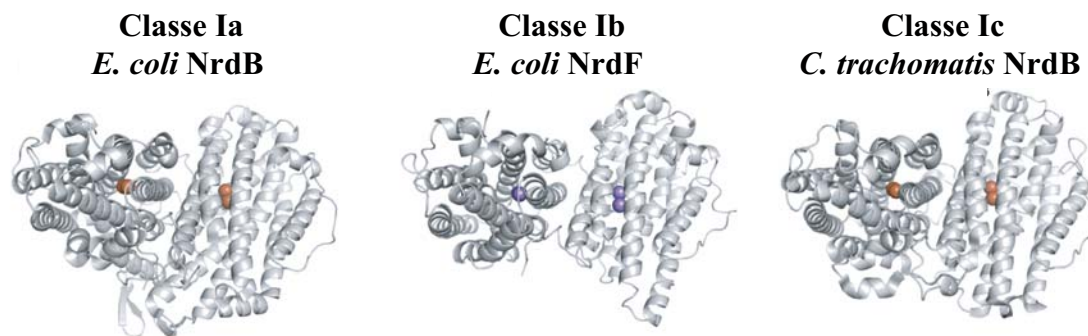
### 3.1.5.3 Classe Ic

Com ja s'ha comentat en altres apartats, la RNR de classe Ic es va descobrir en *Chlamydia trachomatis*. NrdA és la subunitat catalítica i en aquest bacteri consta de 1047 aminoàcids que li donen un pes molecular de 119 kDa, uns 30 kDa més que la NrdA de la RNR de classe Ia d' *E. coli*. Aquest increment en el pes molecular és conseqüència d'una duplicació de 110 aminoàcids l'extrem N-terminal a on hi han tres regions amb seqüència Val-X-Lys-Arg-Asp-Gly que contenen el lloc al·lostèric d'activitat. A més a més, la regió entre 1-248 aminoàcids l'extrem N-terminal de la NrdA de *C. trachomatis* s'ha vist que és necessària per la unió del dATP i que aquest tingui un efecte inhibitori sobre l'enzim (8).

L'any 2011, un estudi va observar que l'extrem C-terminal de NrdA de *C. trachomatis* hi han 7 residus que, a més a més d'interaccionar amb NrdB, també creen unions electrostàtiques amb altres pèptids amb efecte inhibitori per l'enzim. D'aquests 7 residus són Phe577, Lys578, Gln581, Leu979, Trp982 i Lys983 (103).

Per altre banda, la subunitat a on s'origina el radical proteic NrdB consta de 346 aminoàcids, tamany similar a NrdB de la RNR de classe Ia d'*E. coli* amb la qual posseeix un 90% d'homologia aminoacídica. Els residus que no es troben conservats amb la RNR de classe Ia són l'Asp84 en substitució de l'àcid glutàmic i la fenilalanina en lloc de la Tyr122 (8), per aquest motiu el tipus de radical proteic no és tirosil sinó de fenilalanina. El centre metàl·lic es troba coordinat al llarg de quatre hèlix  $\alpha$  en el centre de la proteïna. Tot i així, la proteïna NrdB de *C. trachomatis* comparteix l'estructura helical amb la proteïna NrdB d'*E. coli* encara que li manquen les fulles  $\beta$  que si que es troben presents en la RNR de classe Ia (71).

A la Figura 8 s'hi troben representades les diferents estructures tridimensionals de les subunitats encarregades de generar el radical de la classe Ia (NrdB), Ib (NrdF) i Ic (NrdB).

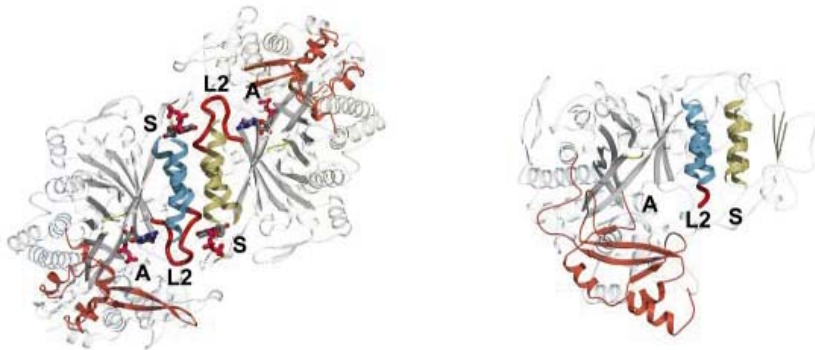


**Figura 8. Representació tridimensional de les subunitat NrdB d'*E. coli*, NrdF d'*E. coli* i NrdB de *C. trachomatis*.** Les esferes taronges representen els ions Fe<sup>III</sup> i les de color lila Mn<sup>II</sup>. (Figura adaptada de Cotruvo JA i Stubbe J 2011 (10))

#### 3.1.5.4 Classe II

L'estructura cristal·lina de la RNR de classe II es va identificar l'any 2002 en el bacteri *L. leichmannii* el qual codifica per una ribonucleòsid trifosfat reductasa. En *L. leichmannii*, la proteïna NrdJ te un pes molecular de 82 kDa amb 738 aminoàcids. Similar a NrdA de la RNR de classe Ia i NrdD de la RNR de classe III, el domini central de NrdJ està composta per 10 làmines  $\alpha/\beta$  en forma de barril. Aquest barril conté dos 2 làmines paral·leles de 5 fulles  $\beta$ , orientades de manera antiparal·lela, amb una estructura *finger loop* en el centre amb dos fulles  $\beta$  antiparal·leles amb el centre actiu on hi ha el radical tiil generat en la Cys408 (numeració de *L. leichamanni*). El centre actiu de la RNR de classe II conserva amb la RNR de classe I, la catàlisi àcid-base amb la Glu410 i el pont d'hidrogen que es crea amb l'Asn406 i el disulfid actiu redox Cys119-Cys419 (corresponent als residus Cys439, Glu441, Asn437 i Cys225-Cys462 de la NrdA d'*E. coli*) (17).

Com s'ha comentat anteriorment, la RNR de classe II requereix de la AdoCbl/vitamina B<sub>12</sub> per generar el radical proteic. L'AdoCbl s'uneix a prop de l'hèlix  $\alpha_{24}$ , en els residus 565-626 concentrats en 3 fulles  $\beta$  i en els residus 685-724 els quals es troben situats en dos hèlix  $\alpha$  en l'extrem C-terminal. La unió de l'AdoCbl genera canvis conformacionals fent que la proteïna es tanqui amb la finalitat de protegir el radical altament reactiu de l'oxigen i també, per posicionar l'AdoCbl a prop de la Cys408 perquè es pugui produir el pont entre el carboni de la Cys408 i el cobalt i es formi el radical tiil S<sup>•</sup> (17) (Figura 9).



### Classe II dimèrica

(*Thermotoga maritima*)

### Classe II monomèrica

(*Lactobacillus leichmannii*)

**Figura 9. Estructura de la RNR de *T. maritima* i de *L. Leichmannii*.** En l'esquema es troben representades els dos tipus d'estructura que pot tenir la RNR de classe II: dimèrica i monomèrica. El *loop2* es troba marcat com a L2, l'A simbolitza el centre actiu de l'enzim, S pel lloc de regulació al·lostèrica d'especificitat i en blau i verd, les cadenes de cada monòmer essencials per la interacció del dímer en el cas de *T. maritima* i a on es troben situades en el cas de *L. leichmannii*. (Figura adaptada de Nordlund P i Reichard P 2006 (3)).

En el cas de *L. leichmannii* el lloc de regulació al·lostèrica d'especificitat es troba formant dos hèlix des dels residus 147-158 i 298-313 de les 10 làmines  $\alpha/\beta$  en forma de barril, juntament amb una inserció simple amb els residus 168-298 del barril  $\alpha/\beta$ . La RNR de classe II conserva les quatre hèlix que es troben en la interfase del dímer en la RNR de classe Ia responsables de la unió dels efectors, en el monòmer NrdJ. La conservació d'aquesta regió de 130 aminoàcids demostra la similitud estructural d'aquestes dos classes de RNR. Altres RNR de classe II que no contenen aquesta regió extra de 130 aminoàcids, com ara la del bacteri *Thermotoga maritima*, és perquè probablement són dimèrics (17). Precisament en el bacteri *T. maritima* és a d'on es va cristal·litzar la primera RNR de classe II dimèrica la qual conserva l'estructura de 10 làmines  $\alpha/\beta$  en forma de barril típica de les RNR, i on es va descriure el mecanisme estructural de regulació d'especificitat de la RNR de classe II. En la RNR de classe II de *T. maritima* la formació del complex efector-substrat dTTP-GDP, la guanosina es troba dins d'una butxaca construïda pel *loop 2*, una curvatura formada entre  $\alpha A$  i  $\beta B$  i el residu Gly161 situat al començament de  $\beta B$  dins del mateix monòmer NrdJ. El grup metil de l'Ala207 és l'encarregat de formar una interacció hidrofòbica amb la base i l'Arg207 del *loop 2* que interaccionen amb el fosfat del

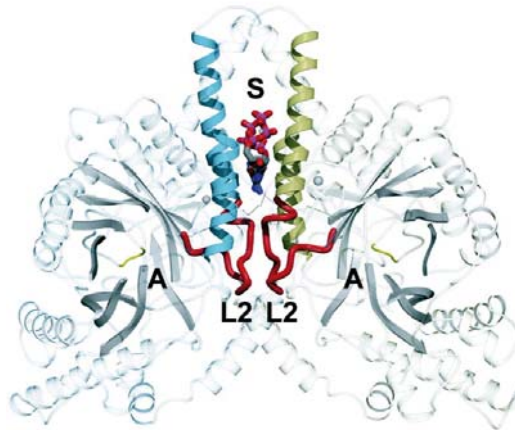
substrat aproximant-lo al centre actiu de l'enzim. La posició de la base és idèntica en tots els complexos del substrat, però el tipus d'interacció amb el *loop 2* dels diferents complexos dGTP-ADP, dATP-UDP i dATP-UDP són diferents. Per tant, l'estructura que es forma quan els diferents complexos interaccionen amb el *loop 2*, és diferent (18).

### 3.1.5.5 Classe III

La RNR anaeròbica d'*E. coli* la formen el monòmer NrdD, amb les funcions de la proteïna catalítica NrdA i NrdJ, i NrdG, essencial en la generació del radical glicil en NrdD. En aquest cas, NrdG té unes dimensions molt reduïdes i se li adjudica el terme d'*activasa* ja que únicament s'encarrega del trencament de l'AdoMet quan contacta amb el clúster de 4Fe-4S per generar el radical (80, 104). L'estructura tridimensional de NrdD del fag T4, primer model per la RNR de classe III, té un pes molecular de 68 kDa amb 608 aminoàcids cada monòmer NrdD. NrdD manté el centre actiu conservat en la mateixa posició que el tenen la classe I i II encara que les seves seqüències que donen lloc a les estructures de barril  $\alpha/\beta$  d'aquestes dos classes no presentin gaire similitud amb la classe III. Per la seva banda, l'*activasa* NrdG té un pes molecular de 34 kDa agrupats en 156 aminoàcids per monòmer de NrdG (105). La RNR anaeròbica comparteix una alta homologia estructural amb l'enzim anaeròbic piruvat format liasa (PFL), el qual també requereix d'un radical proteic glicil per l'activitat de l'enzim (106, 107).

L'estructura de la subunitat NrdD del fag T4 consisteix en dos cadenes de 5 làmines  $\beta$  antiparal·leles que s'uneixen gràcies a una estructura de *finger loop*. Aquest *loop* sobresurt del centre de l'estructura barril la qual es troba flanquejada per una hèlix  $\alpha$ . NrdD dimeritza per les hèlix  $\alpha 4$  i  $\alpha B$  de cada monòmer, sent la unió que confereix l'hèlix  $\alpha 4$  el contacte més important. Aquesta cadena  $\alpha 4$  de NrdD és 22 residus més llarga que la de NrdA i  $\alpha B$  conté 26 residus en comptes dels 12 que té la de NrdA d'*E. coli*. A més a més, els monòmers NrdD es troben orientats de manera molt diferent en comparació amb NrdA, fent que l'axis del dímer es trobi rotat casi en 90°. Aquesta disposició és la que fa que l'espai de la interfase sigui diferent en comparació al que té la RNR de classe Ia (105). En el cas del dímer R1 de la classe III, i a diferència de la RNR de classe Ia, els llocs d'unió dels efectors es troben localitzats

lluny del centre actiu però igualment a la interfase proteica. Una estructura *loop* (*loop* 2) i altres elements estructurals barril  $\alpha/\beta$  fan el lloc d'unió dels efectors i el centre actiu es comuniquin. Molt a prop del centre actiu es troba el residu de glicina que dona lloc al radical glicil (Gly580) enfonsat dins d'un *loop hairpin*  $\beta$  (forquilla  $\beta$ ) (3), aquest *loop*, que conté el radical, s'alinea amb la Tyr581 que es troba al seu costat i és la que s'encarrega de penetrar dins del centre actiu (105). En absència del substrat la Gly580 no contacta mitjançant unions Van der Waals, amb la cisteïna a on es genera el radical tiil (al contrari que passa amb el PFL que sí que està en contacte) (108). La unió del substrat o de l'efector provoca un reajustament fent que es produeixi aquesta unió i es pugui donar la catàlisi (3) (Figura 10).



**Figura 10.** Esquema de l'estructura tridimensional de la RNR de classe III del bacteriòfag T4. L'estructura *loop2* està marcada com a L2, l'A simbolitza el centre actiu de l'enzim, S pel lloc de regulació al·lostèrica d'especificitat i en blau i verd, les cadenes de cada monòmer essencials per la interacció del dímer. (Imatge extreta de Nordlund P i Reichard P 2006 (3)).

En *E. coli* l'holoenzim  $\alpha_2\beta_2$  de la RNR de classe III forma un centre  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$  oxidat a cada subunitat  $\beta$  (NrdG) en presència de ferro, DTT i sulfid. Com s'ha comentat en l'apartat de mecanisme catalític de la RNR de classe III, durant la reducció dels NTP en anaerobiosi, la *S*-adenosylmetionina transfereix un electró per poder formar el clúster reduït  $[4\text{Fe-4S}]^+$  i generar el radical glicil (80). Mitjançant mètodes espectroscòpics (EPR, NMR i espectroscopis Mössbauer) es va veure que en presència d'aire el clúster reduït torna en estat oxidat  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$  passant pels estats  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  i  $[3\text{Fe-4S}]$ . L'estat redox de l'ambient es determinant a l'hora de la interconversió reversible del clúster reduït  $[4\text{Fe-4S}]^+$  a l'oxidat  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$  (78). Per poder-se donar la formació de l'holoenzim  $\alpha_2\beta_2$  es va veure que es requeria de



condicions anaeròbiques estrictes durant tot el procés de cromatografia. Gràcies aquest estudi es va saber que la reducció del CTP venia donada únicament per NrdD i que una vegada NrdG havia activat la subunitat catalítica NrdD i NrdD ja contenia el radical glicil, l'activasa NrdG ja no es requeria més i es dissociava del complex (23).

L'any 2002, un estudi va trobar que la proteïna NrdD del fag T4 posseïa un domini d'unió Zn format per les cisteïnes Cys543, Cys546, Cys561 i Cys564. Aquest domini es troba a l'extrem C-terminal de la proteïna catalítica NrdD i en aquell estudi es va hipotetitzar sobre el possible rol estructural que podia tenir aquest domini organitzant l'extrem C-terminal de la proteïna NrdD i controlant l'accessibilitat del residu reactiu glicil (109). Anys més tard, també es va trobar aquest domini d'unió a Zn, en l'extrem C-terminal de NrdD d'*E. coli*, descrivint-lo com a controlador de l'estructura *loop* que conté el radical glicil protegint-lo de qualsevol reacció de proteòlisi (109, 110).

El dímer NrdG interactua amb un dels monòmers NrdD com a via d'apropament del clúster a on es genera el radical al lloc on es troba el Gly580 (105). Finalment, la unió de R1 (NrdD) i R2 (NrdG) dona lloc a un holoenzim actiu amb estructura quaternària és  $\alpha_2\beta_2$  (62, 104).

### **3.1.6 Evolució de les tres classes de RNR**

En tots els organismes vius, des d'arqueobacteris hipertermòfils fins a l'home, la síntesi dels deoxiribonucleòtids a partir dels ribonucleòtids ve donada per l'enzim RNR. Per tant, la presència d'una RNR primitiva és presentada com a requisit indispensable pel pas d'un món d'ARN, que utilitzava ribonucleòtids, a un món d'ADN (utilitzava deoxiribonucleòtids). Aquest requisit indica un món previ de coexistència entre l'ARN i les proteïnes previ al món d'ADN (20).

Les tres classes de RNR descrites fins al moment, mostren diferències importants tant en estructura proteica com en el tipus de regulació al·lostèrica i la forma de generar el radical. Llavors, es pot parlar d'un ancestre comú "ur-reductasa" on les diferents classes de RNR que hi ha avui en dia han divergit al llarg de l'evolució conseqüència de l'adaptació ambiental? I si és així... Quina de les tres classes és la més propera a aquest ancestre originari? Tot i així, també hi han altres hipòtesis que defensen la teoria de tres enzims completament diferents que han anat convergint al llarg de l'evolució (20).

Les RNR van aparèixer en un món a on l'oxigen no formava part de l'atmosfera, requerint una RNR ancestral anaeròbica. Aquest fet suggereix que tant les RNR de classe II com de classe III són més properes aquesta RNR originària (76). Seria amb l'aparició de l'oxigen a l'atmosfera que el radical glicil de la classe III quedaria inoperatiu requerint-se llavors, de l'aparició d'una nova via per la generació del radical. És en aquest punt on apareixerien les RNR de classe I i II. L'argument més important per creure en la presència d'un ancestre comú originari és el tipus de regulació al·lostèrica d'especificitat de substrat únic d'aquest enzim i la conservació de l'estructura terciària de cada tipus de RNR (20, 76).

Les tres classes de RNR posseeixen el mateix tipus d'activació del substrat a partir d'un radical transitori tiil, i subseqüent reducció del ribonucleòtid. Tant la classe I com II utilitzen el ditiol de tioredoxines i glutaredoxines per la reducció de la ribosa, mentre que la RNR de classe III utilitza el format, una molècula molt més simple que les tioredoxines i glutaredoxines (76). La utilització d'aquesta molècula és un altre argument que indica que la RNR de classe III podria ser més primitiva que la de classe I i la de classe II.

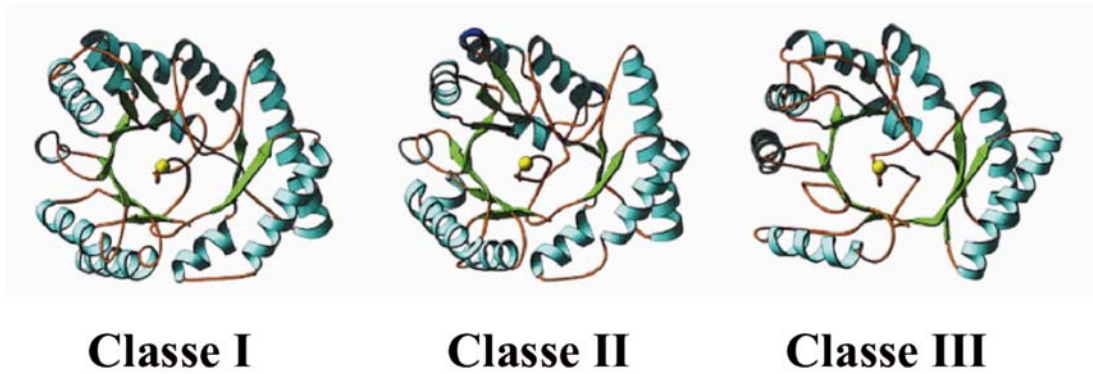
A més a més, el lloc d'unió a pirimidines (equivalent al lloc d'activitat) en la classe III actua unint ATP per estimular l'enzim i dATP per inhibir-lo. El lloc d'unió a purines (corresponent al d'especificitat en R1 de la classe I) actua de la mateixa manera però reduint únicament purines. Per tant, tots dos llocs actuen regulant l'especificitat i l'activitat de l'enzim. Per altre banda, la classe Ia posseeix dos llocs diferenciats per cada funció. Aquest fet també situaria la classe III com a predecessora de la classe I i II ja que la classe II funciona com la RNR de classe Ia quant a la regulació en l'especificitat de substrat (30).

Un altre punt que dona suport a la teoria de la convergència a partir d'un ancestre comú és la composició única de l'estructura terciària proteica entre les tres classes. Aquesta estructura la componen 10 cadenes  $\beta$  i 8  $\alpha$  disposades antiparal·lelament que donen lloc a un barril  $\alpha/\beta$ .

L'homologia estructural entre les estructures proteiques de les tres classes està millor conservada que entre les seves seqüències primàries (111). En el *core* hidrofòbic es troba el centre actiu de l'enzim i a on hi ha el menor grau de diferències estructurals sent la part conservada de l'enzim (28, 76).

La similitud entre les RNR de classe I i II és superior que entre les RNR de classe I i III o II i III (Figura 11). La seqüència primària corresponent al lloc de regulació al·lostèrica d'activitat general de l'enzim, així com el seu centre d'activitat, presenta un seqüència (Val-x-Lys-Arg-Asp-Gly-x<sub>(9)</sub>-Lys-Ile-x<sub>(3)</sub>-Ile) conservada al llarg de l'evolució en el motiu N-terminal. En aquesta seqüència s'hi poden trobar dues situacions diferents: 1) les classes Ia, III i algunes II mantenen aquesta seqüència al llarg del temps en el seu extrem N-terminal conservant el lloc d'activitat general de l'enzim, i 2) la resta de classes II i la classe Ib perden aquests 50 residus en el seu extrem N-terminal, perdent així el lloc d'activitat general de l'enzim (76).

Tots aquests arguments afavoreixen la hipòtesi que a partir de la classe III haurien divergit les altres classes de RNR, tot i així hi han investigadors que creuen que es tres classes també podrien haver divergit a partir de la classe II RNR. Aquesta teoria es fonamenta en la presència d'un centre actiu comú amb estructura conservada entre les tres classes (112).



**Figura 11. Dibuix de comparatiu de les estructures de les RNR de classe I, II i III.** extret de Sintchak MD *et al.*, 2002 (17). En el dibuix es comparen les diferents topologies del domini  $(\alpha/\beta)_{10}$  de les 3 classes de RNR, a on en el centre s'hi troba la Cys activa en forma esfèrica i de color groc. (Imatge extreta de Sintchak MD *et al.*, 2002 (17)).

Observant la reacció química que duen a terme la RNR de classe Ia d'*E. coli* i la classe II de *L. leichmannii* suggereix en un centre actiu molt similar entre les dos classes de RNR (112). Aquesta similitud del centre actiu entre les diferents classes de RNR fonamenten la hipòtesi de que les diferents classes estan evolutivament lligades (113). A més a més, aquesta teoria argumenta que la S-adenosilmetionina per si sola no pot generar el radical necessari per dur a terme la catàlisi sinó que necessita del clúster 4Fe-4S a part del poder reductor necessari per reduir el NTP. En canvi, la classe II utilitza l'AdoCbl com a cofactor, és monomèrica i al·lostèricament regulada (112). A més a més, l'AdoCbl és estructuralment més complex que la S-adenosilmetionina i requereix més passos enzimàtics per a la seva síntesi (114) que la S-adenosilmetionina. Un altre fet que deixaria a la RNR de classe III com a originària és que requereix un clúster Fe-S. Aquest tipus de clúster és un dels grups prostètics biològics més antics que es troben present des de l'origen de la terra (115).

Encara que hi hagin més arguments a favor de la classe III com a enzim originari de les RNR, encara queden caps per lligar fent difícil identificar l'ancestre veritable de l'enzim.

## **3.2 Les diferents classes de RNR d'Escherichia coli: Ia, Ib i III**

### **3.2.1 La RNR de classe I: classe Ia**

#### **3.2.1.1 Organització gènica**

La RNR de classe aeròbica Ia es troba codificada per l'operó *nrdAB*. La regió codificant de *nrdA* va des de la posició 2.324.887 pb a la 2.345.172 pb del genoma bacterià *E. coli*. Per la seva part, *nrdB* es en un fragment de 1131 pb que va des de la posició 2.345.406 pb a la 2.346.536 pb de genoma d'*E. coli* (116). Els dos gens es troben separats per 234 pb però es transcriuen sota el control del mateix promotor. *nrdA* codifica per la subunitat dimèrica catalítica NrdA o R1 i *nrdB* per la subunitat encarregada de generar el radical proteic NrdB ò R2.

#### **3.2.1.2 Regulació transcripcional**

La RNR de classe Ia és la més estudiada ja que va ser la primera en ser descoberta i inicialment, quan es parlava de l'enzim ribonucleotidil reductasa, es feia referència a l'actual classe Ia.

Com ja he esmentat en l'apartat d'introducció, el rati entre l'ADN i la massa cel·lular s'ha de mantenir constant. La privació de timidina, inhibidors de la síntesis d'ADN com per exemple l'àcid nalidíxic, inhibidors de les RNR com la hidroxurea (HU), mutacions en l'ADN, mutacions en gens involucrats en la replicació de l'ADN o mutacions en les tioredoxines o glutaredoxines involucrades en el mecanisme catalític de la RNR poden causar que el rati ADN/massa cel·lular esdevingui anormal (117, 118). És en aquest desequilibri en el rati ADN/massa cel·lular a on s'incrementa l'expressió de la RNR de classe Ia, indicant que l'expressió dels gens *nrdAB* i la iniciació de la replicació de l'ADN es troben coordinats per un sistema de feedback que depèn directament de la síntesi proteica (119).

Factors que regulen la iniciació de la replicació tant en condicions normals com en condicions d'estrès, també apareixen com a reguladors de l'expressió dels gens *nrdAB* ja sigui induint-la o reprimint-la. Durant l'inici de cada forquilla de replicació apareix una síntesis basal de RNR per proveir els dNTP a la nova forquilla recent feta. La regió promotora *nrdAB* posseeix unes regions invertides de 45 pb

riques en A-T (des de la posició -139 a la -124) que actuen en aquesta síntesi basal de RNR (120). Aquesta regió es necessària per a la regulació de l'expressió del gens *nrdAB* durant el cicle cel·lular (121). Per tant, hi ha una relació directe entre l'expressió de l'operó *nrdAB*, la progressió de la forquilla de replicació de l'ADN i el control de la síntesi de l'ADN en l'origen de replicació (*oriC*) (117).

Per la replicació del cromosoma d'*E. coli* és imprescindible de la unió de la proteïna DnaA a la regió de l'*oriC* (122). També s'ha trobat que la proteïna DnaA s'uneix, a més a més, a la regió promotora del gens *nrdAB* a dues caixes de 9 mer de longitud situades immediatament a 5'. Per tant, monòmers de DnaA, units a l'ATP necessari perquè DnaA sigui funcional, s'uneixen a dos caixes consens de 9 pb [TTAT(C/A)CA(C/A/A)A] situades immediatament a 5' de la caixa -35 d'unió de l'ARN polimerasa (centrades a la posició -48 i -36.5 pb des del lloc d'inici de la transcripció) en el promotor *nrdAB*. Així doncs, DnaA promou la inducció de l'expressió dels gens *nrdAB* al mateix temps que s'uneix a l'*oriC* (120, 123-125).

Més recentment ha sortit la hipòtesi que la transcripció de l'operó *nrdAB* comença immediatament després de la unió del DnaA-ATP a l'*oriC*, quan la proteïna Hda hidrolitza l'ATP que es troba unit a DnaA donant lloc a DnaA-ADP. Aquesta hidròlisi de l'ATP donaria la senyal d'activació de la transcripció dels gens *nrdAB*, i fins llavors, es trobaria reprimida. Aquesta conversió de l'ATP a ADP promouria, a més a més, l'elongació de l'ADN. Per tant, seria la hidròlisi de l'ATP que coordinaria la iniciació amb la elongació de l'ADN tot des-reprimint l'expressió dels gens *nrdAB* (126). Aquesta hipòtesi implica una expressió de RNR prèvia a la repressió dels gens *nrdAB* perquè hi pugui haver un subministrament de dNTP suficient per sintetitzar l'ADN (127). A més a més, també s'interposa amb el que es va descriure inicialment afirmant que la unió de DnaA al promotor *nrdAB* n'activava l'expressió (123) mentre que aquesta teoria senyala que DnaA-ATP la reprimeix.

Finalment, i barrejant una mica les dos teories, s'ha arribat a la conclusió que nivells baixos de DnaA-ATP estimulen l'expressió del gens *nrdAB* mentre que nivells alts la reprimeixen, suggerint que *nrdAB* també actua com a repressor de la síntesi de l'ADN quan els nivells de DnaA són molt elevats. DnaA-ATP s'acumula a uns nivells suficients per iniciar la replicació (117, 128). Així doncs, hi ha una regulació en paral·lel, tot i que coordinada, dels gens *nrdAB* i la iniciació de replicació de l'ADN.

La proteïna Fis (*Factor for Inversion Stimulation*) s'uneix al promotor *nrdAB* i n'activa la transcripció, tant *in vitro* com *in vivo*, d'una manera dependent del superenrollament de l'ADN (123, 129). Aquesta proteïna s'uneix a dos caixes en la regió promotora centrades a la posició -156 i -128 pb des del lloc d'inici de la transcripció. Al igual que la proteïna DnaA, Fis no és essencial per la regulació de l'expressió *nrdAB* durant el cicle cel·lular (129).

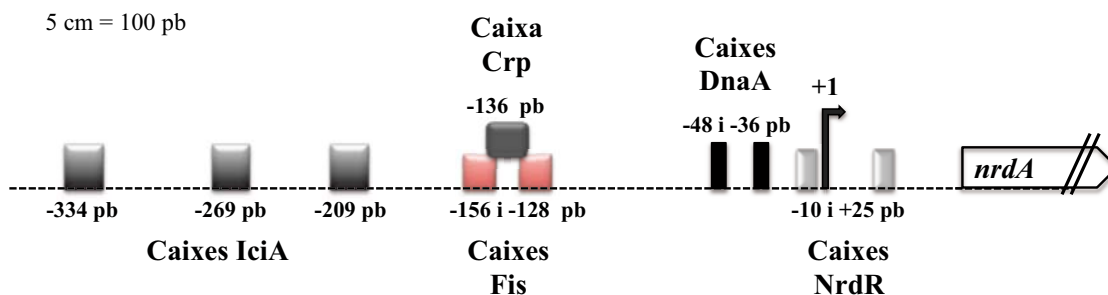
IciA (*Inhibitor of Chromosome Initiation*), igual que la proteïna DnaA, també s'uneix a *oriC* però en aquest cas per reprimir l'inici de la replicació de l'ADN, tal com indica el seu nom (130). IciA s'uneix a tres caixes situades a 5' de les caixes d'unió a la proteïna Fis actuant com a activador transcripcional (centrades a -209, -269 i -334 pb des del lloc d'inici de transcripció *nrdAB*), la seva sobreexpressió incrementa l'expressió *nrdAB* de 4 a 5 vegades. Els seus nivells cel·lulars varien segons el cicle cel·lular ja que requereix i de la manca del fosfat per induir-se (131, 132).

Més recentment s'ha descrit una nova proteïna anomenada NrdR com la primera que és capaç de reprimir l'expressió de les RNR. Aquesta proteïna, identificada inicialment en *Streptomyces coelicolor*, s'uneix a dos caixes tàndem consens [ACACTATATATAGTGT] repetides en el promotor *nrdAB* d'aquest bacteri (133, 134). En *E. coli* també s'ha trobat regulació de l'expressió de la RNR de classe Ia per part d'aquesta proteïna. En aquest bacteri s'ha descrit una caixa d'unió a NrdR solapant la regió -10 d'unió a l'ARN polimerasa i l'altre caixa entre la posició +18 pb i +33 pb des del lloc d'inici de la transcripció (135).

NrdR presenta un domini d'unió a l'ATP que va des del aminoàcid 49 al 139 del seu extrem N-terminal, i un domini *zinc finger* d'unió a l'ADN en el seu extrem C-terminal. Estudis han corroborat com la deleció del gen *nrdR* provoca un augment en la expressió *nrdAB* sobretot en fase estacionària quedant clar el paper repressor d'aquesta proteïna sobre la RNR (135).

En una època a on els avanços tecnològics ens sorprenen cada dia, es normal vagin apareixen estudis que mencionin les RNR sense anar més enllà. Un exemple és l'aparició dels gens *nrdAB* com a part del reguló de la proteïna CRP (*Cyclic AMP Receptor Protein*) (136). En aquest estudi també va identificar un caixa d'unió a CRP a la posició -136 pb respecte al lloc d'inici de transcripció de *nrdAB*. La implicació de CRP en la transcripció de *nrdAB* s'ha d'estudiar en profunditat.

A continuació hi ha l'esquema de la regió promotora de la classe Ia RNR i les diferents caixes d'unió a factors transcripcionals descrites fins al moment (Figura 12):



**Figura 12:** Esquema de la regió promotora de l'operó *nrdAB*. En l'esquema s'hi representen les caixes d'unió als moduladors transcripcionals d'aquesta classe de RNR descrites fins al moment i el primer gen que es transcriu de l'operó de la RNR de classe Ia.

### 3.2.2 La RNR de classe I: classe Ib

#### 3.2.2.1 Organització gènica

La RNR de classe Ib es troba codificada per l'operó *nrdHIEF*, sent aquest l'operó més llarg, fins al moment descrit, que codifica per una RNR. Els fragments d'ADN que transcriuen pels 4 gens tenen una llargada molt variable. En *E. coli* la regió codificant de *nrdH* és 246 pb localitzats entre la posició 2.798.745 pb i 2.797.990 pb del cromosoma, la de *nrdI* de 411 pb localitzats entre la posició 2.798.987 pb a la 2.799.397 pb, la de *nrdE* de 2.145 pb localitzades entre la posició 2.799.370 pb i 2.801.514 pb del genoma, mentre que finalment, la regió que codifica per *nrdF* consta de 960 pb s localitzats entre la posició 2.801.524 pb i 2.802.482 pb del cromosoma (116).

Els dos gens *nrdE* i *nrdF* són els codificants per R1E i R2F respectivament, mentre que *nrdH* tradueix per la tioredoxina encarregada de donar el potencial reductor a R1E i *nrdI* per una flavodoxina-like encarregada de l'activació de l'enzim.

#### 3.2.2.2 Regulació transcripcional

Quan es va descriure la RNR de classe Ib, no es sabia en quines condicions ambientals i fisiològiques s'expressava. Si ja hi havia una classe de l'enzim que tenia



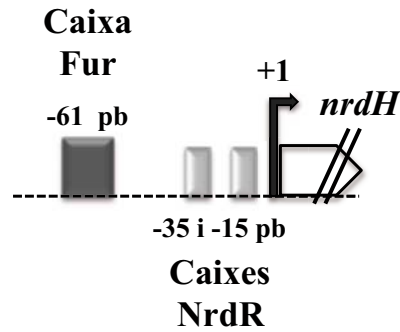
activitat en condicions aeròbiques, com es que hi havien genomes bacterians que codificaven per una segona classe de RNR aeròbica? Es per això que en *E. coli* inicialment es va definir com a una RNR críptica, sense una funció aparent, tant sols es sabia que complementava la deficiència de la RNR de classe Ia quan es trobava en forma de merodiploid (27, 63). En l'actualitat, diferents estudis, incluent part del treball d'aquesta tesi doctoral, han corroborat que aquesta classe s'indueix en condicions ambientals particulars (12, 137).

A l'any 2000, un estudi amb l'objectiu d'identificar gens que formaven part del reguló del factor transcripcional Fur (*Ferric Uptake Regulator*), es va trobar que la regió promotora dels gens *nrdHIEF* posseïa una caixa d'unió a aquest regulador. Aquesta seqüència diana per la unió de Fur té una llargada d'entre 11 i 19 bases i es troba centrada a la posició -61 des de el lloc d'inici de transcripció de l'operó de la classe Ib (138). Fur es una proteïna que es va descobrir com a reguladora dels gens relacionats en la captació del ferro (139), tot i que també participa com a regulador de gens involucrats en la respiració aeròbica, xemotaxis, virulència, etc... (140). En la classe Ib, es va veure com la deleció de Fur, indueix l'expressió *nrdHIEF* conclouent que en condicions salvatges, Fur actua reprimint la seva expressió (138).

A més a més del factor Fur, i igual que en la classe Ia, el repressor NrdR (explicat en l'apartat 3.2.1.2) també reprimeix l'expressió de l'operó *nrdHIEF*. La diferència primordial es que en aquesta classe és on s'ha vist que NrdR té un efecte repressor més important. La deleció del gen codificant per aquesta proteïna indueix l'expressió *nrdHIEF* fins a 75 vegades més en fase exponencial tardana-estacionaria si es compara amb la soca salvatge. En aquest cas, les seqüències d'unió de les dos caixes NrdR es troben: una solapant la regió -10 i l'altre just a 5' de la regió -35 d'unió a l'ARN polimerasa, centrades a la posició -15 i -45 pb respectivament (135).

A continuació hi ha l'esquema de la regió promotora de la classe Ib RNR i s'hi les regions d'unió a factors transcripcionals caracteritzades fins al moment (Figura 13):

5 cm = 100 pb



**Figura 13:** Dibuix esquemàtic de la regió promotora de l'operó de la classe Ib *nrdHIEF*. En el dibuix s'hi representen les caixes dels dos reguladors descrits fins al moment en aquesta classe i també el primer gen que es transcriu de l'operó de la RNR de classe Ib.

Tot i que en els últims anys s'han identificat diferents proteïnes que regulen l'activitat de la classe Ib, els estudis més importants fets fins al moment han estat per descobrir en quines condicions ambientals o fisiològiques feien que aquesta classe de RNR substituís a la RNR aeròbica de classe Ia en el subministrament de dNTPs.

El treball fet per Fernando Monje-Casas a l'any 2001 va ser el primer que va enumerar una llista de condicions ambientals a on la classe Ib tenia una activitat rellevant. En aquest treball es va veure com les condicions de creixement afecten a l'expressió basal dels gens *nrdHIEF*, sent aquests nivells superiors en les fases inicials del creixement exponencial i, a mesura que la densitat òptica va en augment, inferiors. En aquest treball també es va observar que soques d'*E. coli* mutants pels sistemes Trx i també Grx/GSH augmenten els nivells de transcrits *nrdHIEF*, fins arribar a poder induir-se 30 vegades (137). La inactivació d'aquests dos sistemes redox crea un dany cel·lular que fa que el factor transcripcional OxyR (*Oxidative Stress Regulator*) s'activi amb l'objectiu de modular diferents mecanismes contra aquest estrès oxidatiu. Aquest estrès també pot ser causat tant per la presència d'un agent oxidant com ara el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, anions superòxid o radical hidroxils, desequilibrant el rati pro-oxidant/antioxidant, així com per la pèrdua de les defenses antioxidants (141). Quan la cèl·lula s'enfronta als danys causats per aquest estrès oxidatiu, els nivells *nrdHIEF* s'indueixen dràsticament tot i que s'ha demostrat OxyR o altres reguladors involucrats en la resposta contra l'estrès com SoxR/S (142) o RpoS (143) s'activen, no són responsables directes d'aquest increment (137).

Anys més tard es va resoldre el mecanisme que feia induir la classe Ib en condicions d'estrès oxidatiu. La presència H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> interfereix en l'activitat de la classe Ia

RNR de dues maneres diferents: una primera oxidant el Fe<sup>III</sup> de la proteïna NrdB i la segona: oxidant el *pool* tioredoxina/glutaredoxina sent així incapaces de donar el potencial reductor de NrdAB (144). Com ja he esmentat abans, en aquestes condicions el factor OxyR indueix la seva expressió activant els gens que formen part del seu reguló entre ells, el del gen *mntH* codificant per una transportador de manganés. MntH augmenta la seva transcripció augmentant així, el import de manganés a l'interior cel·lular (145). Per tant, en condicions d'estrès oxidatiu a on la classe Ia es veu inhabilitada, el mecanismes cel·lulars impulsen la inducció de la transcripció de l'operó *nrdHIEF*. NrdHIEF, al ser un enzim manganés-depenent (10), reemplaça a NrdAB en l'aportació de dNTPs necessaris per continuar la replicació de l'ADN (12).

A més a més, quan la cèl·lula bacteriana esta patint condicions d'estres causat pel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fa que alguns factors transcripcionals que depenen del ferro cel·lular per dur a terme la seva funció, esdevinguin inoperatius per culpa de l'oxidació d'aquest element. Aquest es el cas de la proteïna Fur, la qual requereix formar complex Fur:Fe<sup>II</sup> per poder unir-se a les zones promotores dels gens que regula i reprimir-les (146). Per tant, en aquestes condicions Fur no és capaç de reprimir promovent l'augment de l'expressió de la classe Ib (12). IscR (*Iron-Sulfur Cluster Regulator*) és una altre proteïna que requereix de la generació del clúster [2Fe-2S] per reprimir els gens que formen part del seu reguló (147), entre ells *nrdHIEF*, mentre que en la seva forma apoproteica actua com activador gènic (148), encara que no hi ha una regió d'unió descrita. La presència de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> trenca el clúster [2Fe-2S] deixant a IscR en la seva forma apoproteica sent incapaç de reprimir la classe Ib (12).

Fins ara, el rol de la classe Ib era la única condició en la qual s'havia descrit la implicació de la classe Ib inicialment descrita com a críptica.

### 3.2.3 La classe III RNR

#### 3.2.3.1 Organització gènica

L'operó que codifica per la RNR anaeròbica de classe III el formen els gens *nrdDG*. La fragment d'ADN que transcriu per *nrdD* codificant va des de la posició 4.458.387 a la 4.457.923 del genoma d'*E. coli* mentre que *nrdG* des de la posició 4.458.397 a la 4.457.923. Aquest és l'únic dels operons que donen lloc a les RNR que

es troba posicionat 3'→5' en el genoma d'*E. coli*. *nrdD* codifica per la subunitat catalítica R1 i consta d'una regió genòmica de 2139 pb, mentre que *nrdG* transcriu en una regió de 465 pb, i dona lloc a l'*activasa* encarregada de generar el radical proteic requerit per la catàlisi.

### **3.2.3.2 Regulació transcripcional**

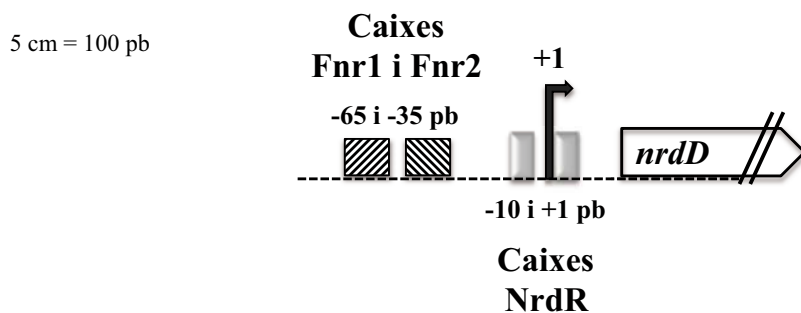
Fins al moment, hi ha molt poca informació de la regulació que pateixen els gens *nrdDG* per induir la seva expressió així com per reprimir-la. La disponibilitat d'oxigen és la senyal més important que afecta la transcripció de la RNR de classe III. Com ja s'ha comentat en altres apartats, aquesta classe només és activa en condicions anaeròbiques. Quan el contingut ambiental d'oxigen és limitant i inclús absent, s'ha demostrat que l'expressió de l'operó *nrdDG* s'indueix (26, 149, 150). A més a més, durant la fase de desacceleració del creixement bacterià (entrada en la fase estacionària), la limitació d'oxigen que apareix en el cultiu també indueix l'expressió dels gens *nrdDG* després de mantenir-se inactius durant la fase exponencial. Per contra, ni els gens *nrdAB* ni *nrdHIEF* presenten cap mena de variació a l'entrar en aquesta fase (150).

En condicions d'anaerobiosi, hi han factors transcripcionals que tenen la seva funció en la repressió de gens que codifiquen per proteïnes amb activitat aeròbica, així com per induir d'altres que codifiquen per enzims amb activitat anaeròbica. El sistema *arc* (*Aerobic Respiration Control*) compost per dos proteïnes: ArcA i ArcB, té un paper important en la repressió d'aquests gens involucrats en el metabolisme aeròbic. Encara que s'ha vist que aquest sistema no té un paper en la regulació directe de la classe III, sí que el posseeix indirectament afectant al factor FNR (*Fumarate and Nitrat Reduction*), regulador amb activitat essencial en la transició aerobiosi a anaerobiosi amb la finalitat d'activar l'expressió de gens amb activitat anaeròbica. FNR va ser el primer modulador directe descrit d'aquesta per la RNR de classe III (150-152). En *E. coli* la proteïna FNR posseeix dues caixes d'unió en la zona reguladora de l'operó *nrdDG*, una situada en posició -65 i l'altre en posició -35 des del lloc d'inici de la transcripció (150), aquestes dos caixes s'anomenen FNR1 i FNR2 i presenten diferent afinitat pel factor FNR. La seqüència de la caixa FNR2 és la que té més homologia amb la seqüència consens descrita (153) i a més a més, és la que

posseeix major afinitat per la unió de FNR. La caixa FNR1 també participa en la inducció de la RNR de classe III tot i que amb menys afinitat (149). La transcripció del gen *fnr* augmenta a mesura que la pressió d'oxigen ambiental disminueix (154). La inducció de *fnr* activa l'expressió dels gens *nrdDG* mitjançant, sobretot, la seva unió en la caixa FNR2 del promotor. La proximitat entre les dos caixes FNR fa pensar en una mena d'interacció entre proteïna FNR formant dímers com a mecanisme d'activació (149).

Igual que passava amb les classes Ia i Ib, la classe III també és veu reprimida pel factor transcripcional NrdR. En aquest cas, la regió promotora posseeix les caixes tàndem d'unió a NrdR una, just per sobre de la regió -10 d'unió a l'ARN polimerasa i l'altre, a la posició +1 a partir del lloc d'inici de transcripció. Tot i que aquest factor regula de la mateixa manera les tres classes de RNR presents en *E. coli*, difereix en les zones d'unió de les regions reguladors a on presenta afinitat. La deleció del gen *nrdR* augmenta l'expressió de la RNR de classe III d'*E. coli* fins a 10 vegades (135).

A continuació hi ha l'esquema de la regió promotora de la classe III RNR amb els llocs d'unió a diferents proteïnes reguladores implicades en la modulació de l'expressió de la classe III (Figura 14):



**Figura 14: Esquema de la regió promotora de l'operó *nrdDG*.** En el dibuix s'hi troben les dos caixes FNR descrites que participen en la regulació de la RNR de classe III, les dos caixes d'unió el repressor transcripcional NrdR i també el primer gen que es transcriu de l'operó de la RNR de classe III.

### 3.3 La proteïna associada al nucleoid H-NS

#### 3.3.1 El regulador global H-NS

La proteïna *Histone-like nucleoid-structuring protein* (H-NS) és una proteïna associada al nucleoid (NAP). Les NAPs són en procariotes, les anàlogues a les histones que es troben en els organismes eucariòtics, sent les encarregades del correcte empaquetament de l'ADN nuclear. A més a més, les proteïnes NAPs tenen la capacitat d'alterar la transcripció gènica ja sigui de manera positiva o negativa. Les proteïnes Lrp, HU, MukB, Fis, IHF, Dps, StpA, CbpA, CbpB, EbfC i MvaT són altres NAPs que tenen acció sobre bacteris gram negatius (155).

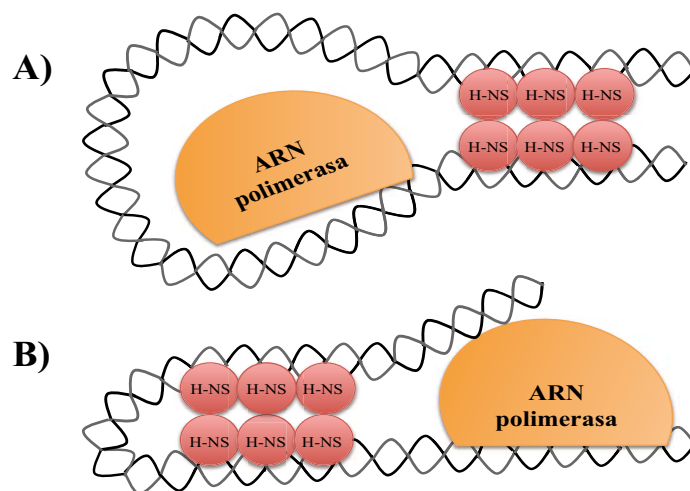
H-NS es va descriure inicialment com a silenciador transcripcional, el qual també posseeix característiques de repressor en la família de les enterobactèries (156). Encara que en aquesta introducció s'explicarà el seu rol de repressor gènic, es necessari esmentar que amb aquesta proteïna també se li ha atribuït un paper d'activador indirecte de l'expressió gènica (157, 158) així com altres estudis li han trobat un rol en la regulació gènica post-transcripcional (159, 160).

Aquesta proteïna s'expressa a totes les etapes del creixement bacterià (161) i està formada per 136 aminoàcids i els quals donen lloc a dos dominis diferenciats. La regió aminoacídica des del residu 1 al 89 conforma el domini N-terminal mentre que del residu 91 al 136, aproximadament, el C-terminal. El domini N-terminal oligomeritza amb el C-terminal mitjançant una regió flexible que es troba entre els dos dominis mentre que el domini C-terminal és el que s'uneix a l'àcid nucleic (162-164). H-NS també es caracteritza per formar dímers en solució mitjançant els residus 22-49 de l'extrem N-terminal (165).

Diferents estudis han vist que H-NS s'uneix a regions corbades i riques amb A-T en el genoma d'*E. coli* (166). A més a més, té especial preferència per la seqüència TCGATATATT unint-si amb més afinitat que en altres seqüències riques en A-T (167). Una vegada s'ha unit a la seva regió diana, s'ha vist com H-NS modula l'estructura del cromosoma d'*E. coli* i la transcripció gènica mitjançant la formació de ponts ADN-H-NS-ADN (168, 169). La curvatura de l'ADN es sensible a estressos ambientals com la temperatura o l'osmolaritat. A temperatures creixents, el grau de curvatura de l'ADN decreix fent així que H-NS perdi la capacitat d'unir-si. L'efecte de la temperatura en l'acció repressora d'H-NS s'ha demostrat amb el gen de virulència

*virF* de *Shigella flexneri* (170). Aquest bacteri utilitza la senyal ambiental d'augment de temperatura fins a 37°C per saber que es troba a l'interior de l'organisme humà i començar a expressar gens de virulència (171). A baixes temperatures, el gen de virulència *virF* es troba reprimint per H-NS en canvi, a mesura que la temperatura augmenta fins arribar 37°C, la curvatura de l'ADN disminueix fent que H-NS perdi la capacitat d'unir-se així com també d'oligomeritzar, des-reprimint la expressió del gen *virF* (172, 173). A més a més, diferents estudis també han vist com a temperatura de 40°C l'oligomerització d'H-NS es desestructura fent que també perdi la capacitat de reprimir l'expressió gènica (170, 174). La temperatura però, no és l'únic factor que afecta en la regulació pel factor transcripcional H-NS, l'osmolaritat del medi també hi té un paper important. Diferents treballs han vist com l'increment de sal en el medi també fa disminuir la curvatura de l'ADN afectant així també a la unió d'H-NS. L'efecte de l'osmolaritat en la repressió d'H-NS s'ha demostrat en el promotor del gen *proU* d'*E. coli* (175). Fins al moment, hi han dos possibles teories de com H-NS reprimeix l'expressió gènica:

1. La nucleoproteïna H-NS-ADN impedeix el moviment de l'ARN polimerasa mitjançant la formació de ponts, la curvatura de les regions on s'uneix H-NS ajuda a la formació d'aquests ponts i atrapant l'ARN polimerasa (Figura 135) (176-178).
2. La unió d'H-NS altera la topologia de l'ADN impedint que l'ARN polimerasa pugui transcriure el gen (Figura 15B) (166).



**Figura 15: Esquema dels dos models de repressió d'H-NS.** A) Model a on H-NS atrapa l'ARN polimerasa i B) Model a on H-NS altera la topologia de l'ADN impedint que el gen es pugui transcriure.

### **3.3.2 StpA i Fis: altres NAPs estudiades en aquest treball**

#### **3.3.2.1 Fis**

La proteïna Fis, ja anomenada en altres apartats de la introducció, és una NAP de 98 aminoàcids amb capacitat d'unió a l'ADN, sobretot en regions intergèniques. Una vegada unida, Fis es capaç de formar ponts ADN-proteïna-ADN (177, 179) tenint un paper important en el superenrollament de l'ADN i en la regulació de l'expressió gènica, sobretot, en la fase exponencial del creixement bacterià, a on Fis té el seu pic d'expressió (155, 179, 180).

Fis té la capacitat tant de reprimir com d'activar l'expressió dels gens que regula depenent del lloc on s'uneix en la regió promotora. Si Fis s'uneix en el mateix lloc d'unió a l'ARN polimerasa, impossibilita que aquesta s'hi pugui unir i transcriure l'ADN, en aquest cas Fis actua com a repressor. Això és el que succeeix quan Fis s'uneix en el promotor dels gens *gyrA* i *gyrB* d'*E. coli* (181, 182). Fis però, també actua com activador transcripcional encara que s'ha vist que la seva delecció no mostra canvis en l'expressió gènica (183). Quan modula positivament l'expressió gènica, ho fa mitjançant connexions amb la ARN polimerasa (184).

Mitjançant estudi de CHIP-Chip es va veure que mentre H-NS s'uneix a zones del genoma que ha estat adquirides mitjançant transferència horitzontal, Fis no ho fa. En aquest mateix estudi també es va descobrir que Fis es pot associar de manera cooperativa amb la proteïna CRP o competir-hi, per unir-se al mateix lloc de l'ADN (185).

#### **3.3.2.2 StpA**

La proteïna *Suppressor of Td phenotype A* (StpA) es una proteïna paràloga a H-NS amb la qual comparteix un 58% de similitud a nivell aminoacídic (186). Aquesta proteïna consta de 134 aminoàcids i es pot dividir en 2 dominis: un N-terminal que va des dels residus 1 al 76 i s'encarrega de formar homo-heterodimerització amb H-NS (187), i un domini C-terminal, el qual comparteix un 76% d'homologia amb el domini C-terminal d'H-NS, que va des dels residus 90-134. Els dos dominis s'uneixen mitjançant un *linker* flexible.



StpA té capacitat d'unió i modulació de l'ADN, fins al moment s'han descrit 3 maneres en les que StpA es capaç d'organitzar l'ADN:

1. Mitjançant la formació d'un filament de proteïna StpA sobre l'ADN (co-filament ADN-StpA) (188).
2. Mitjançant unions entre el co-filament d'ADN-StpA i ADN lliure de proteïna (188).
3. Mitjançant interaccions d'inter-co-filaments d'ADN condensat conseqüència d'un tractament amb magnesi (188).

També s'ha vist com la unió StpA-ADN és insensible a canvis d'osmolaritat, temperatura o pH, contrari a H-NS. A més a més, quan StpA forma el filament proteic al voltant de l'ADN, l'àcid nucleic és insensible a l'enzim DNase I (188). L'expressió de StpA incrementa a alta osmolaritat i temperatura del medi a diferència d'H-NS (189), i mitjançant *Atomic Force Microscopy* (AFM) s'ha vist que StpA pot formar ponts amb l'ADN a baixes concentracions de la proteïna però a altes, forma agregats globulars (190).

Encara que StpA té capacitat d'unió a l'ADN, està millor caracteritzat com a proteïna que s'uneix a l'ARN (187). És en el domini C-terminal el responsable de les unions ADN-ARN i on StpA posseeix l'activitat d'ARN chaperona (191, 192).

### 3.4 **Biofilms bacterians**

#### 3.4.1 **Introducció als biofilms bacterians**

El científic Antoine Van Leewenhoek va ser el descobridor dels biofilms bacterians a finals del 1600. Primerament no va utilitzar el terme biofilm sinó que s'hi va referir com “*animalcules*” que vivien en comunitat sobre una superfície, que en aquell cas, era la seva placa dental. Més endavant ja es va anar desenvolupant aquest coneixement fins arribar a saber que els bacteris no viuen en solitari, sinó que ho fan formant biofilms (193).

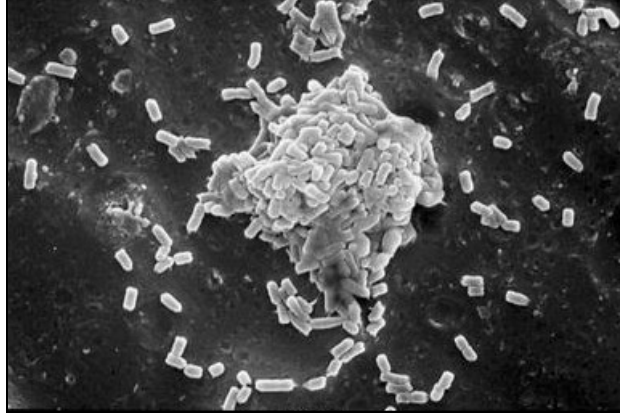
Un biofilm és una comunitat microbiana irreversiblement adherida al substrat dins d'una matriu polimèrica d'exopolisacàrids (EPS). La matriu d'EPS és el component principal perquè es pugui desenvolupar el biofilm. El seu rol és estructural, tot i que, al ser altament hidratada actua prevenint la dessecació i al mateix temps, preservant de la penetració d'agents antimicrobians així com, evitant que el sistema immune sigui capaç de detectar-lo (194, 195). Aquesta matriu està constituïda per substàncies produïdes pels mateixos bacteris, incloent components no cel·lulars o abiòtics amb diferents atributs fisiològics que les cèl·lules planctòniques no tenen. Hi ha una alta presència d'àcids urònics com l'àcid D-glucurònic, D-galacturònic i mannurònic on en bacteris gram negatiu és aniónica mentre que en bacteris gram positius acostuma a ser catiónica (196). La producció de la matriu aniónica permet l'associació de cations divalents com el calci i el magnesi, ajudant a reticular els polímers pel desenvolupament del biofilm (197, 198). Els EPS detectats en la matriu d'*E. coli* són: el polímer  $\beta$ -1,6-N-acetyl-D-glucosamina (PGA), l'àcid colànic i la cel·lulosa. Aquests EPS creen interaccions entre ells així com amb altres components del biofilm com les fimbries curly, que participen en el creixement 3D del biofilm (199). Diferents soques d'*E. coli* produeixen una matriu d'EPS específica segon el seu serotip, variacions en l'estructura d'aquesta capa de polisacàrids pot donar lloc a 170 antígens O i 80 antígens K diferents (194). La producció d'EPS es veu afectada per la disponibilitat de nutrients en el medi: un excés de carboni i la limitació de nitrogen potassi o fosfats en promou la síntesi (200).

La formació de biofilms està associada a la resistència a agents antimicrobians (201). Aquestes comunitats microbianes són de 100 a 1000 vegades més resistents als agents antimicrobians que els bacteris que es troben en estat planctònic (202). Encara

que un bacteri qualsevol no posseeixi mecanismes genètics que li confereixin resistència antimicrobiana, quan aquest es troba formant biofilm la susceptibilitat que hi pateix disminueix. Un exemple és el bacteri  $\beta$ -lactamasa negatiu *Klebsiella pneumoniae* el qual passa d'una MIC de 2  $\mu\text{g/ml}$  a 5000  $\mu\text{g/ml}$  quan es troba formant biofilm (203). La naturalesa multicel·lular dels biofilms dóna lloc a tres possibles hipòtesis per explicar la resistència als antibiòtics: La primera seria que l'antibiòtic és incapaç de penetrar completament dins del muticomplex cel·lular (204). La segona dependria directament de l'ambient químic dins dels biofilm. Per exemple, acumulació d'àcid fa baixar el pH i antagonitza l'efecte de l'antibiòtic, o també els antibiòtics aminoglicòsids els quals perden eficiència en ambients anòxics i en un biofilm a on el gradient d'oxigen és molt marcat, es veuria afectat (205, 206). I la tercera, seria la consideració d'un biofilm bacterià com un complex resistent similar a una espóra (205). Un estudi va investigar l'increment de resistència que anava conferint un biofilm a l'ampicil·lina. Van anar afegint ampicil·lina en diferents etapes de l'expansió del biofilm: en l'adhesió inicial, en la formació de la colònia i en etapes més madures. Van observar que quan s'afegia ampicil·lina en les primeres etapes, aquestes no aconseguien arribar a formar un biofilm complex, mentre que en biofilms madurs, el tractament d'ampicil·lina aconseguia parar la formació de biofilm en un període curt de temps (24 hores) però a mesura que passava el temps si que aconseguien formar un biofilm gruixut i ben estructurat. En aquest experiment van suggerir de la presència de subpoblacions dins d'un biofilm ja madur amb una expressió gènica diferent que les feien resistent a l'ampicil·lina capaces de, al cap del temps, tornar a formar biofilms encara que es continués el tractament antimicrobià. A aquestes subpoblacions se'ls adjudicaria el rol d'espores (207).

Un 65% de les infeccions microbianes estan associades als biofilms conseqüència d'aquesta resistència als agents bactericides (208). Biofilms en aparells mèdics com ara catèters intravenosos o urinaris, o pròtesis ortopèdiques poden esdevenir persistents i causar infeccions nosocomials que poden arribar a ser cròniques (205, 208). Malalties com la periodontitis, cistitis, l'otitis mèdia, la prostatitis bacteriana crònica o la fibrosi quística són un exemple d'infeccions que estan associades a la formació de biofilms bacterians (196, 209, 210).

La Figura 16 mostra l'organització d'un biofilm bacterià d'*E. coli* sota ATCC25922 a on les cèl·lules planctòniques es van adherint poc a poc pel creixement tridimensional d'aquesta macrocomunitat bacteriana.



**Figura 16.** Imatge d'un biofilm d'*E. coli* mitjançant un microscopi electrònic de rastreig. (Imatge extreta de Lianhua Y *et al.*, 2013 (211)).

### 3.4.2 Organització i regulació de la formació de biofilm

La formació d'un biofilm consta de diferents fases. En l'adhesió primària del bacteri al substrat apareixen forces atractives i repel·lents entre el bacteri i el substrat fan que l'adhesió sigui reversible. Aquesta unió es troba influenciada per les condicions ambientals en que es troba sotmès com el pH, la temperatura, força iònica del medi, etc... (194, 212, 213). Aquesta unió bacteri-substrat es torna irreversible quan el bacteri comença a expressar les fimbries. Hi ha tres tipus de fimbries que actuen reforçant aquesta unió: la fimbria de tipus 1, curli i el pili conjugatiu.

En el cas d'*E. coli* la fimbria de tipus 1 consta de 5 a 7 nm de diàmetre i 0.2 a 2 µm d'allargada, i la seva expressió afecta a l'adhesió del bacteri mitjançant l'alteració de la membrana fent créixer l'expressió de proteïnes típiques de la membrana com OmpX, OmpA, BtuB, EF-Tu, Slp o TolC alterant així les seves propietats físicoquímiques (194, 214). El gen *fimA* codifica per la subunitat més gran d'aquest tipus de fimbria. Les fimbries curli van des de 6 a 12 nm de diàmetre i 0.5 a 1 µm d'allargada, tenen un paper important en la formació de biofilms en teixits humans ja que s'adhereixen a proteïnes de la matriu extracel·lular com la fibronectina, laminina o el plasminogen promovent-hi l'adhesió del bacteri (215). Aquestes fimbries promouen

l'adhesió inicial del bacteri al substrat i a més a més les unions entre bacteris (216). L'expressió de curli es pot donar tant a 28°C com a 37°C en el medi. L'operó *csgDEFG* és l'encarregat de codificar pel regulador CsgD i per la maquinària d'exportació de curli CsgEFG mentre que l'operó *csgBA* ho fa pels components estructurals d'aquesta fimbria. I per últim el tercer tipus de fimbria el pili conjugatiu, el qual promou l'adhesió inicial i la maduració del biofilm mitjançant la unió no específica del bacteri a superfícies abiòtiques provocant les conseqüents interaccions entre cèl·lules i fent establir així, l'estructura del biofilm (217, 218).

Les majors diferències es troben en les primeres 4-7 hores de formació de biofilm. Quan els biofilms ja són madurs, les diferències d'expressió gèniques són més subtils (219). Durant el període de 4 a 24 hores inicials, 27.3% dels gens del genoma d'*E. coli* es troben induïts mentre que el 4.9% reprimits més de 2.5 vegades. En aquesta etapa les cèl·lules estan metabòlicament més actives quan es troben en suspensió (219). Gens que es troben induïts en la fase exponencial del creixement bacterià també s'hi troben en les fases inicials de la formació de biofilm i els que ho estan en fase estacionària es troben induïts en el biofilm ja madur. El desenvolupament d'un biofilm madur requereix de gens exclusius involucrats en la formació d'aquest macrocomplex, a més a més gens que s'indueixen en la fase estacionària del creixement bacterià també participen en aquesta maduració (220).

El Quòrum sensing (QS) és un procés de senyalització entre cèl·lules i que té un paper molt important la formació de biofilm en bacteris Gram negatius (221, 222). En *E. coli* s'ha vist com la molècula AI-2 (*Autoinducer 2*) de senyalització del QS augmenta la seva expressió durant la formació de biofilm (223). Aquest increment de AI-2 arriba a ser 6 vegades superior en un biofilm madur mentre que quan les cèl·lules es troben en suspensió, el pic d'expressió és en fase exponencial (219, 224). Tot i així, hi han estudis que corroboren que l'AI-2 no actua directament en la formació de biofilms madurs sinó que és la producció del pilus TraA el que té un paper important en aquesta maduració, a on l'eliminació del gen *traA* elimina completament la maduració del biofilm a estructures més gruixudes i robustes (217). Anàlegs del AI-2 com per exemple l'isobutyl-DPD inhibeixen la formació d'un biofilm madur conseqüència d'això és l'increment de la susceptibilitat als antibiòtics, per exemple: un tractament d'isobutyl-DPD 40 µM fa inhibir en un 70% el creixement bacterià provocant que els biofilms siguin molt menys estructurats, a concentracions creixents

d'aquest compost, el creixement queda inhibit completament (225). Altres compostos inhibidors del QS mitiguen la comunicació entre bacteris provocant una restricció en l'expressió de gens involucrats en la formació de biofilm (210, 225, 226). També s'ha vist com l'eliminació del transportador de l'AI-2 (YdgG) fa incrementar fins a 7000 vegades el gruix d'un biofilm en comparació amb d'una soca salvatge d'*E. coli*, això ve donat per una sobre expressió d'àcid colànic (227). L'àcid colànic s'expressa en els operons *wcaDEC* i *wcaB* i forma part de la matriu extracel·lular. La seva expressió augmenta més de 26 vegades en biofilms madurs, però no és important en les etapes joves de formació. La cel·lulosa és un altre component de la matriu d'exopolisacàrid que es transcriu a l'operó *bscABZC*. Aquest operó és troba al·lostèricament regulat per la molècula cyclic-di-GMP (c-di-GMP). Aquesta molècula controla antagonísticament la motilitat i la virulència en bacteris planctònics i per una altra banda, l'adhesió i la persistència cel·lular en comunitats bacterianes (228, 229). La presència de l'Ag43 (*flu*) és un altre factor que estimula la formació inicial d'un biofilm promovent l'adhesió bacteriana inicial de les cèl·lules planctòniques al substrat i fomentant també, la interacció entre bacteris (217, 230, 231).

La motilitat bacteriana també participa en el desenvolupament d'un biofilm. Hi han 4 operons associats a la motilitat que presenten inducció en diferents etapes d'aquest desenvolupament: *flgBCEF*, *fliJ*, *fliLMQR* i *cheW-motB*. A diferència de *P. aeruginosa*, en *E. coli* el flagell té un rol important en totes les etapes de formació de biofilm mentre que en *Pseudomonas* només ho és en les fases inicials d'adhesió al substrat (219, 232). En *E. coli* patògenes com la EHEC O157:H7 s'ha vist com el factor transcripcional Hha (*High Hemolytic Activity*) controla la formació de biofilm a través dels gens *flhDC* involucrats en la síntesi del flagell (233) i del *csgD* el qual forma part d'una cascada de regulació per l'expressió del gen curli en *E. coli* (234). Un mutant *hha* provoca un augment de la formació de biofilm via inducció de la transcripció de *flhDC* i *csgD*, els quals ajuden a l'adherència bacteriana al substrat i teixits epitelials així com ens la seva colonització (235, 236).

Aquest macrocomplex bacterià consta de moltes parts i diferent etapes en el seu desenvolupament. Hi ha un gradient en quan a la disponibilitat d'oxigen sent les capes més internes més anaeròbiques que les externes, per tant: els biofilms son comunitats heterogènies en quan a la disponibilitat d'oxigen. Gens que es troben induïts en aerobiosi també hi estan quan es troben en un biofilm, aquest es el cas dels gens que participen en el cicle TCA com: *cyo*, *fadB*, *mdh*, *aceB*, *glpD* o *sucAB*. Per

altre banda, gens que es troben reprimits en aquestes condicions oxigèniques també ho estan en un biofilm, aquest és el cas de: *adhE*, *cydAB*, *dcuC*, *focA* i *fumB*. Aquest mateix patró d'inducció o repressió gènica es va trobar també en parts anòxiques demostrant la heterogeneïtat oxigènica que hi ha en una comunitat microbiana (194).

Estudis han demostrat que la major resposta fisiològica d'un biofilm és en resposta a l'estrès ambiental. El gen *cpx* el qual s'indueix amb el pH així com amb la desnaturalització proteica (237) també s'ha trobat altament induït en biofilms madurs. Igualment s'ha trobat amb el gen *spy*, involucrat amb el plegament proteic i amb expressió induïda quan les proteïnes es desnaturalitzen i igualment induït quan el bacteri es troba formant biofilm (220). Com ja s'ha esmentat en un altre apartat de la introducció, el factor RpoS s'indueix en resposta de l'estrès ambiental. Aquest factor també posseeix un paper important durant la formació de biofilm d'*E. coli* (238, 239). La inducció de *rpoS* com a resposta a l'estrès provoca canvis fisiològics que contribueixen a la resistència a agents antimicrobians (202). 33 gens que s'ha trobat que decreixen la seva expressió a mesura que va madurant el biofilm, com ara els involucrats en la síntesi flagel·lar o de metabolisme energètic, es troben reprimits per RpoS el qual augmenta la seva expressió a mesura que madura el biofilm. A més a més, 39 gens positivament regulats per RpoS com gens que codifiquen per *Heat Shock Proteins* (*hslJ*, *dnaJ* i *hslU*), altres que estan involucrats en el metabolisme anaeròbic o d'altres que confereixen resistència als antibiòtics com els *Multidrug Resistance* gens (*yhiU* i *yhiV* o *emrE*) es troben induïts en un biofilm (207).

## *Material i mètodes*

---





## 4 Material i Mètodes

### 4.1 Soques, fags i plasmidis

#### 4.1.1 Soques

Les soques utilitzades en aquest treball es troben detallades en la següent taula:

**Taula 3: Soques utilitzades en aquest treball.**

Soca	Descripció	Referència
<b>AAG1</b>	Soca d' <i>E. coli</i> MG1655 $\Delta$ <i>lacZ</i>	(240)
<b>AAG1 P<sub>fur</sub>::lacZ</b>	AAG1 amb la fusió P <sub>fur</sub> :: <i>lacZ</i> (pUJ8) (Cm <sup>R</sup> )	Aquest treball
<b>AAG1<math>\Delta</math><i>hns</i></b>	AAG1 amb $\Delta$ <i>hns</i> de MC4100 <i>trp</i> ::Tn10 $\Delta$ <i>hns</i> transduït (Km <sup>R</sup> )	Marta Gibert
<b>AAG1<math>\Delta</math><i>nrdR2</i> P<sub>fur</sub>::lacZ</b>	AAG1 amb la deleció HpaI-Bsp119I del gen <i>nrdR</i> i la fusió P <sub>fur</sub> :: <i>lacZ</i> (pUJ8) (Km <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup> )	Aquest treball
<b>Biotin XCell F'</b>	MC1061[F' <i>pro</i> A+B+ <i>lacIqZ</i> $\Delta$ M15::Tn10 (Tc <sup>R</sup> ) <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara,leu</i> )7696 $\Delta$ ( <i>lac</i> )I74 <i>galU galK</i> <i>hsdR2</i> (r <sub>K</sub> -m <sub>K</sub> +) <i>mcrB1 rpsL</i> (Sm <sup>R</sup> ) <i>araP</i> <sub>BAD</sub> :: <i>birA</i>	Lucigen
<b>DH5<math>\alpha</math></b>	<i>recA1 endA1 hsdR17 supE44 thi-1 relA1</i> $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>deoR</i> $\Phi$ 80 <i>dlacZM15</i>	Estoc de laboratoris
<b>E101</b>	<i>thr1 leuB6 fhuA21 lacY1 glnV44 rfbC1 nrdA</i> <sup>ts</sup> <i>thyA6 rpsL67 thi1 deoC1 deoB37</i>	(241)
<b>E2348/69</b>	Soca d' <i>E. coli</i> 0127:H6 E2348/69 enteropatogènica salvatge	(242)
<b>ETS104</b>	Soca d' <i>E. coli</i> MG1655 $\Delta$ <i>nrdE</i> ::Km (Km <sup>R</sup> )	Aquest treball (243)
<b>ETS105</b>	Soca d' <i>E. coli</i> MG1655 $\Delta$ <i>nrdD</i> ::Km (Km <sup>R</sup> )	Aquest treball (243)
<b>ETS106</b>	Soca d' <i>E. coli</i> MG1655 $\Delta$ <i>nrdR</i> ::Km (Km <sup>R</sup> )	Aquest treball (243)
<b>ETS107</b>	Soca d' <i>E. coli</i> MG1655 $\Delta$ <i>nrdE</i> ::Km (Km <sup>R</sup> ) $\Delta$ <i>nrdD</i> ::Cm (Cm <sup>R</sup> )	Aquest treball (243)
<b>ETS108</b>	Soca d' <i>E. coli</i> E2348/69 $\Delta$ <i>nrdE</i> ::Km (Km <sup>R</sup> )	Aquest treball

		(243)
<b>ETS109</b>	Soca d' <i>E. coli</i> E2348/69 $\Delta$ <i>nrdD</i> ::Km (Km <sup>R</sup> )	Aquest treball (243)
<b>ETS110</b>	Soca d' <i>E. coli</i> E2348/69 $\Delta$ <i>nrdR</i> ::Km (Km <sup>R</sup> )	Aquest treball (243)
<b>ETS111</b>	Soca d' <i>E. coli</i> E2348/69 $\Delta$ <i>nrdE</i> ::Km $\Delta$ <i>nrdD</i> ::Cm (Km <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> )	Aquest treball (243)
<b>ETS112</b>	Soca d' <i>E. coli</i> E2348/69 $\Delta$ <i>rpoS</i> ::Km (Km <sup>R</sup> )	Aquest treball (243)
<b>ETS113</b>	Soca d' <i>E. coli</i> MG1655 $\Delta$ <i>rpoS</i> ::Km (Km <sup>R</sup> )	Aquest treball (243)
<b>ETS115</b>	Soca d' <i>E. coli</i> MG1655 $\Delta$ <i>fis</i> ::km (Km <sup>R</sup> )	Aquest treball
<b>ETS116</b>	Soca d' <i>E. coli</i> MG1655 $\Delta$ <i>hnsfis</i> ::km (Tc <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> )	Aquest treball
<b>ETS117</b>	Soca d' <i>E. coli</i> MG1655 $\Delta$ <i>stpA</i> ::km (Km <sup>R</sup> )	Aquest treball
<b>ETS117</b>	Soca d' <i>E. coli</i> MG1655 $\Delta$ <i>hnstrp</i> ::Tn10 $\Delta$ <i>stpA60</i> ::Km (Tc <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> )	Aquest treball
<b>ETS119</b>	AAG1 amb la fusió transcripcional <i>PnrdAB</i> :: <i>lacZ</i> (pUJ8) (Cm <sup>R</sup> )	Aquest treball
<b>ETS121</b>	AAG1 amb la fusió cromosòmica transcripcional <i>PnrdA</i> :: <i>lacZ</i> (delecionant el lloc d'unió d'H-NS) (pUJ8) (Cm <sup>R</sup> )	Aquest treball
<b>ETS122</b>	AAG1 $\Delta$ <i>hns</i> amb la fusió <i>PnrdAB</i> :: <i>lacZ</i> (Cm <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> )	Aquest treball
<b>ETS123</b>	Soca d' <i>E. coli</i> MG1655 $\Delta$ <i>iciA</i> ::km (Km <sup>R</sup> )	Aquest treball
<b>ETS124</b>	Soca d' <i>E. coli</i> MG1655 $\Delta$ <i>hns iciA</i> ::km (Tc <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> )	Aquest treball
<b>JW2650</b>	Soca d' <i>E. coli</i> K-12 BW25113 $\Delta$ <i>nrdE</i> ::Km (Km <sup>R</sup> )	(244)
<b>JW4197</b>	Soca d' <i>E. coli</i> K-12 BW25113 $\Delta$ <i>nrdD</i> ::Km (Km <sup>R</sup> )	(244)
<b>JW5437</b>	Soca d' <i>E. coli</i> K-12 BW25113 $\Delta$ <i>rpoS</i> ::Km (Km <sup>R</sup> )	(244)
<b>LF82</b>	Soca salvatge d' <i>E. coli</i> LF82 adherent i invasiva	(245)
<b>LF82<math>\Delta</math><i>nrdD</i></b>	Soca d' <i>E. coli</i> LF82 $\Delta$ <i>nrdD</i> ::km (Km <sup>R</sup> )	Aquest treball, Dr. N. Dreux
<b>LF82<math>\Delta</math><i>nrdE</i></b>	Soca d' <i>E. coli</i> LF82 $\Delta$ <i>nrdE</i> ::km (Km <sup>R</sup> )	Aquest treball, Dr. N. Dreux
<b>LF82<math>\Delta</math><i>nrdR</i></b>	Soca d' <i>E. coli</i> LF82 $\Delta$ <i>nrdR</i> ::km (Km <sup>R</sup> )	Aquest treball,

		Dr. N. Dreux
<b>MG1655</b>	Soca d' <i>E. coli</i> MG1655 salvatge	Estoc de laboratori
<b>MG1655<math>\Delta</math><i>nrdR1</i></b>	Soca d' <i>E. coli</i> MG1655 amb la deleció HpaI-Bsp119I del gen <i>nrdR</i> (Km <sup>R</sup> )	(135)
<b>MG1655<math>\Delta</math><i>nrdR2</i></b>	Soca d' <i>E. coli</i> MG1655 amb la deleció AjiI-Bsp119I del gen <i>nrdR</i> (Km <sup>R</sup> )	(126)
<b>MG1655<i>hns</i></b>	Soca d' <i>E. coli</i> MG1655 $\Delta$ <i>hns</i> trp::Tn10 (Tc <sup>R</sup> )	Aquest treball
<b>MG1655<math>\Delta</math><i>fur</i></b>	MG1655 <i>fur</i> ::Cm (Cm <sup>R</sup> )	Aquest treball
<b>MG1655<math>\Delta</math><i>nrdR</i> <math>\Delta</math><i>fur</i></b>	MG1655 amb la deleció AjiI-Bsp119I del gen <i>nrdR</i> i <i>fur</i> ::Cm (Km <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup> )	Aquest treball
<b>Rosetta (DE3)</b>	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (R <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm $\lambda$ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (Cm <sup>R</sup> )	Estoc de laboratori
<b>S17 <math>\lambda</math>pir</b>	<i>TpR SmR recA, thi, pro, hsdR</i> -M+RP4: 2-Tc:Mu: Km Tn7 $\lambda$ pir (Sm <sup>R</sup> )	Estoc de laboratori
<b>UA6068</b>	Soca d' <i>E. coli</i> MC1061 $\Delta$ <i>nrdD</i> ::Cm (Cm <sup>R</sup> )	(26)

#### 4.1.2 Fags

Per l'obtenció d'algunes soques utilitzades en aquest treball es va emprar el bacteriòfag lític P1 vir (246).

#### 4.1.3 Plasmidis

Els plasmidis utilitzats en aquest treball es troben detallats en la següent taula:

**Taula 4: Plasmidis utilitzats en aquest treball.**

Plasmidis	Descripció	Font
<b>pAviTag-C N-His SUMO Kan</b>	Vector de clonatge genic per l'expressió de proteïnes de fusió d' <i>E. coli</i> biotinitzades i unides a SUMO ( <i>Small Ubiquitin-like Modifier</i> ) (Km <sup>R</sup> )	Lucigen

<b>pBAD18</b>	Vector d'expressió induïble amb arabinosa (Ap <sup>R</sup> )	(247)
<b>pBBR1MCS-5</b>	Vector d'alt número de còpies (Gm <sup>R</sup> )	(248)
<b>pBluescriptSK (+)</b>	Vector d'alt número de còpies (Ap <sup>R</sup> )	Stratagene
<b>pDG</b>	Operó <i>nrdDG</i> clonat per les dianes <i>BamHI</i> del vector d'alt número de còpies pBBR1MCS-5 (Gm <sup>R</sup> )	Aquest treball (243)
<b>pETS130-GFP</b>	Vector d'alt número de còpies que codifica pel gen que expressa la <i>Green fluorescence protein</i> (GFP) (Gm <sup>R</sup> )	(249)
<b>pETS150</b>	Promotor <i>nrdAB</i> clonat per de les dianes <i>BamHI</i> i <i>ClaI</i> del vector pETS130-GFP (Gm <sup>R</sup> )	Aquest treball (243)
<b>pETS151</b>	Promotor <i>nrdDG</i> clonat per de les dianes <i>BamHI</i> i <i>ClaI</i> del vector pETS130-GFP (Gm <sup>R</sup> )	Aquest treball (243)
<b>pETS152</b>	Promotor <i>nrdHIEF</i> clonat per les dianes <i>BamHI</i> i <i>ClaI</i> del vector pETS130-GFP (Gm <sup>R</sup> )	Aquest treball (243)
<b>pETS163</b>	Promotor <i>nrdAB</i> clonat per les dianes <i>BamHI</i> i <i>SmaI</i> del vector pUJ8 (Ap <sup>R</sup> )	Aquest treball
<b>pETS166</b>	<i>PnrdAB::lacZ</i> del pUJ8 clonat per les dianes <i>NotI</i> del vector pUTminiTn5Cm (Cm <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> )	Aquest treball
<b>pETS168</b>	<i>PnrdAB::lacZ</i> (delecionant el lloc d'unió d'H-NS) del pUJ8 clonat per les dianes <i>NotI</i> del pUTminiTn5Cm (Cm <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> )	Aquest treball
<b>pETS169</b>	Promotor <i>nrdDG</i> clonat per les dianes <i>BamHI</i> i <i>SmaI</i> del vector pUJ8 (Ap <sup>R</sup> )	Aquest treball
<b>pETS170</b>	<i>PnrdDG::lacZ</i> del pUJ8 clonat per les dianes <i>NotI</i> del vector pUTminin5Cm (Cm <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> )	Aquest treball
<b>pETS171</b>	Promotor <i>fur</i> clonat per les dianes <i>EcoRI</i> i <i>BamHI</i> del vector pUJ8 (Ap <sup>R</sup> )	Aquest treball
<b>pETS172</b>	<i>Pfur::lacZ</i> del pUJ8 clonat per les dianes <i>NotI</i> del pUTminiTn5Cm (Cm <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> )	Aquest treball
<b>pETS173</b>	Promotor <i>entC</i> clonat per les dianes <i>EcoRI</i> i <i>BamHI</i> del vector pUJ8 (Ap <sup>R</sup> )	Aquest treball
<b>pETS174</b>	<i>nrdR</i> clonat en el vector pAviTag-C N-His SUMO Kan mitjançant recombinació homologa de seqüències (Km <sup>R</sup> )	Aquest treball

<b>pETS174</b>	Operó <i>nrdAB</i> cromosòmic clonat per les dianes <i>EcoRI</i> i <i>XbaI</i> del pBAD18 (Ap <sup>R</sup> )	Aquest treball
<b>pETS175</b>	Operó <i>nrdAB</i> plasmídic clonat per les dianes <i>EcoRI</i> i <i>XbaI</i> del pBAD18 (Ap <sup>R</sup> )	Aquest treball
<b>pGEM-T easy</b>	Vector de clonatge A/T (Ap <sup>R</sup> )	Promega
<b>pIb</b>	Operó <i>nrdHIEF</i> clonat per les dianes <i>BamHI</i> del vector d'alt número de còpies pBluescriptSK(+) (Ap <sup>R</sup> )	Aquest treball (243)
<b>pIb-LF82</b>	Operó <i>nrdHIEF</i> de la soca LF82 clonat per la diana <i>BamHI</i> del pJET1.2 (Ap <sup>R</sup> )	This work
<b>pIII</b>	Operó <i>nrdDG</i> clonat per les dianes <i>BamHI</i> del vector d'alt número de còpies pBluescriptSK(+) (Ap <sup>R</sup> )	Aquest treball (243)
<b>pIII-LF82</b>	Operó <i>nrdDG</i> de la soca LF82 clonat en el vectoro pGEM-T easy (+),(Amp <sup>R</sup> )	This work
<b>pJET1.2</b>	Vector de clonatge de selecció positiva (Ap <sup>R</sup> )	Fermentas
<b>pLG338-30</b>	Vector de baix número de còpies; oripSC101 (Ap <sup>R</sup> )	(250)
<b>pLGHNSEC</b>	<i>hns</i> clonat per les dianes <i>BamHI</i> del pLG338-30 (Ap <sup>R</sup> )	(251)
<b>pR</b>	<i>nrdR</i> clonat per les dianes <i>BamHI</i> del vector d'alt número de còpies pBluescriptSK(+) (Ap <sup>R</sup> )	Aquest treball (243)
<b>pUJ8</b>	Vector que permet fer fusions transcripcionals amb el gen reporter <i>lacZ</i> (Ap <sup>R</sup> )	(252)
<b>pUJ9</b>	Vector que permet fer fusions traduccionals amb el gen reporter <i>lacZ</i> (Ap <sup>R</sup> )	(252)
<b>pUTminiTn5Cm</b>	Transposó Mini-Tn5 Cm en el plasmidi pUT (Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> )	(252)

#### 4.2 Oligonucleòtids

Els oligonucleòtids utilitzats en aquest treball es troben detallats a la **taula I** de l'annex i són de Sigma.

### 4.3 Mètodes microbiològics

#### 4.3.1 Medis i condicions de cultiu

Les diferents soques d'*E. coli* emprades en aquest treball es van fer créixer en condicions normals de laboratori de 37°C en medi líquid LB (Luria-Bertani, Pronadisa) a 200 rpm i en LB-agar (LB amb un 1.5% d'agar bacteriològic). Tot i així, aquestes condicions es van variar quan l'estudi ho va requerir modificant-ne la composició del medi de cultiu o disminuint la temperatura d'incubació a 30°C i també a 25°C. Per simular condicions d'anaerobiosi, els cultius líquids es van créixer en tubs *hungate* completament omplerts amb medi LB tal i com s'ha descrit prèviament (26) mentre que pel creixement en placa es va fer servir el sistema GENbag (Biomérieux).

A continuació es resumeix la composició dels diferents medis de cultiu utilitzats, en tots els casos el solvent va ser aigua bidestil·lada (H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub>, Milli-Q):

**LB (Luria-Bertani):** 5 g/l extracte de llevat, 10 g/l peptona trípica de caseïna, 10 g/l NaCl.

**LB 0 mM:** 5 g/l extracte de llevat, 10 g/l peptona trípica de caseïna.

**LB 500 mM:** 5 g/l extracte de llevat, 10 g/l peptona trípica de caseïna, 29.22 g/l NaCl.

**LB-Agar:** LB + 1.5% agar bacteriològic.

**LB-Agar tou:** LB + 6 g/l d'agar bacteriològic.

**LB SOB (253):** 5 g/l extracte de llevat, 20 g/l peptona trípica de caseïna, 0.58 g/l NaCl, 0.19 g/l KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>/MgSO<sub>4</sub> (partint d'una solució mare d'ambdues sals).

**LB SOC (253):** medi LB SOB + 20 mM glucosa.

**Medi de formació de biofilm:** LB + 0.2% glucosa.

Quan va ser necessari, es van afegir antibiòtics en el medi de cultiu a partir d'una solució concentrada conservada a -20°C. A la taula 5 s'especifiquen els diferents antibiòtics (Sigma i Fluka) i la concentració final utilitzada de cadascun d'ells. Tots els antibiòtics utilitzats van ser preparats segons Sambrook (254).

**Taula 5.** Antibiòtics i concentració a la que han estat utilitzats

<b>Antibiòtic</b>	<b>Solvent</b>	<b>Concentració de l'estoc</b>	<b>Concentració Final utilitzada</b>
<b>Ampicil·lina (Ap)</b>	H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	100 mg/ml	50 µg/ml
<b>Kanamicina (Km)</b>	H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	50 mg/ml	50 i 30 µg/ml*
<b>Cloramfenicol (Cm)</b>	Etanol	100 mg/ml	34 µg/ml
<b>Tetraciclina (Tc)</b>	½ H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub> + ½ Etanol	12.5 mg/ml	15 µg/ml
<b>Estreptomicina (Sm)</b>	H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	100 mg/ml	50 µg/ml
<b>Gentamicina (Gm)</b>	H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	10 mg/ml	10 µg/ml
<b>Rifampicina (Rif)</b>	Metanol	500 mg/ml	50 µg/ml

\* La diferència de concentració final es deguda depenen si el casset de resistència a kanamicina es troba en un plasmidi d'alt número de còpies ò està inserit en el cromosoma bacterià.

#### 4.3.2 Plaques d'agar tou per l'estudi de la motilitat i la xemotaxis bacteriana

Per estudiar la motilitat bacteriana es van utilitzar plaques de LB-agar tou. En canvi, per l'estudi de la xemotaxis es van elaborar les plaques com s'ha descrit prèviament (255).

#### 4.3.3 Plaques CAS per la detecció de sideròfors

Per detectar la producció de sideròfors bacteriana es va utilitzar el mètode descrit per Schwyn i Neidlands l'any 1987 (256).

Es van preparar 100 ml d'un estoc de colorants (60.5 mg de Chrome Azurol S (CAS) (Sigma), 10 ml de FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O 1 mM + HCl 10 mM i 40 ml de 70.9 mg bromur d'hexadeciltrimetilamoni (HDTMA) dissolt en H<sub>2</sub>O), 100 ml d'un estoc de sals (6.76 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g NH<sub>4</sub>Cl i 0.5 g NaCl) i 84 ml d'un estoc de complements (75 ml casaaminoàcis al 4%, 5 ml de glucosa al 40%, 1 ml de tiamina HCl al 0.2% i 3 ml de L-triptòfan a l'1%). L'estoc de colorants i el de sals es van autoclavar per separat, mentre que el de complements es fa esterilitzar mitjançant el mètode de filtració (explica't en l'apartat 4.3.4).



#### Per 100 ml de medi CAS

Es van autoclavar 36 ml d' H<sub>2</sub>O i 1.5 g d'agar juntament amb 35 ml d' H<sub>2</sub>O amb 3 g de Pipes (Sigma) i 1.2 g de NaOH al 50% per separat. Una vegada autoclavades, les dues solucions es van barrejar i s'hi van afegir 10 ml de l'estoc de sals, 8.4 ml de l'estoc de complements i 10 ml de l'estoc de colorants. Una vegada el l'agar CAS va estar preparat, es va procedir a extrendre'l sobre plaques de petri i es va esperar el temps necessari per a que s'assequessin.

#### **4.3.4 Esterilització**

Els medis de cultius, material de vidre i plàstic, i solucions utilitzades en aquest treball es van esterilitzar per calor humit i pressió en un autoclau duran 20 minuts a 121°C i 1 atmosfera de pressió de vapor (Matachana 21E).

Totes les solucions que no permetien ser esterilitzades per aquest mètode, ja sigui per la inactivació o per la precipitació dels seus components, van ser esterilitzades mitjançant la seva filtració en filtres estèrils de 0.22 µm de diàmetre de porus (Millipore®).

Pels experiments amb ARN es va requerir de material lliure de ARNases. Aquest material es va tractar amb SDS 0.1% (p/v) o utilitzant material adquirit directament lliure de nucleases.

#### **4.3.5 Manteniment de microorganismes**

Totes les soques bacterianes que s'han fet servir en aquest treball es van mantenir en placa de LB-Agar, suplementat amb els antibiòtics corresponents quan va ser necessari, es van anar ressebrant periòdicament. Per la seva conservació al llarg del temps, les soques van ser congelades a -80°C en glicerol 15% (v/v).

Els bacteriòfags es van mantenir a 4°C en el mateix sobrenedant del cultiu del qual es va obtenir, en forma de lisat fàgic. Per tal de preservar el lisat fàgic estèril es va mantenir en presència d'unes gotes de cloroform.

#### **4.4 Tècniques experimentals amb ADN**

##### **4.4.1 Aïllament d'ADN plasmídic**

L'aïllament d'ADN plasmídic es va obtenir mitjançant el kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN). Et kit es fonamenta en la lisi alcalina seguida d'una adsorció de l'ADN plasmídic en una matriu de sílice. El protocol que es va utilitzar és el descrit pel fabricant.

##### **4.4.2 Utilització d'enzims de restricció, de lligació i de defosforilació**

Tant els enzims de restricció, la T4 ADN lligasa (utilitzada per la lligació de fragments d'ADN) i el kit *Rapid DNA ligation* kit (utilitzat per la lligació de fragments d'ADN de manera ràpida), van ser adquirits i utilitzats segons el fabricant (Thermo Scientific). Per la defosforilació de l'extrem 5' dels fragments es va utilitzar la fosfatasa FastAp<sup>TM</sup> Thermosensitive Alkaline phosphatase (Thermo Scientific).

##### **4.4.3 Amplificació de fragments d'ADN mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR)**

Per les reaccions d'amplificació de fragments d'ADN per PCR es van seguir dos protocols diferents segons si el que es volia era comprovar el genotip bacterià, ò, si el que es requeria era d'una alta fidelitat d'amplificació d'ADN per poder prosseguir amb diferents manipulacions genètiques.

###### **4.4.3.1 PCR de comprovació**

Per les PCR de comprovació, es va utilitzar la PCR Master Mix 2X (Thermo Scientific). Els reactius d'aquesta solució es troben a una concentració 2X. Normalment es van preparar volums finals de reacció de 25 µl afegint 12.5 µl PCR Master Mix, 10 µl d' H<sub>2</sub>Obd estèril, 0.5 µl de cada oligonucleòtid i 1 µl de mostra (ADN o 1 colònia dissolta en 100 µl H<sub>2</sub>Obd).

#### 4.4.3.2 PCR d'alta fidelitat

Per les PCR d'alta fidelitat, es va utilitzar la Phusion™ High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Scientific). Aquesta ADN polimerasa, a més a més de posseir l'activitat polimerasa 5→3', també posseeix activitat correctora exonucleasa 3'→5'. Es va seguir el protocol indicat pel fabricant.

Les reaccions es van dur a terme en un termociclador T100™ (Bio-Rad) mitjançant un programa bàsic del qual es va anar variant la temperatura d'anellament dels oligonucleòtids, segons la temperatura de fusió (T<sub>m</sub>) dels oligonucleòtids utilitzats i el temps d'amplificació depenen de la llargada del fragment d'ADN a amplificar (1 minut per Kb d'ADN a amplificar). De manera rutinària es feien 30 cicles d'amplificació de PCR.

#### Programa de PCR estàndard utilitzat en aquest estudi

	Temperatura	Temps	
<b>Desnaturalització inicial d'ADN</b>	94°C	3'	
<b>Desnaturalització d'ADN</b>	94°C	45''	← x30 cicles
<b>Anellament dels oligonucleòtids a l'ADN</b>	Variable	45''	
<b>Elongació de l'ADN</b>	72°C	Variable	
<b>Elongació per acabar les cadenes de l'ADN</b>	72°C	7'	
<b>Preservació de l'ADN</b>	4°C°	∞	

#### 4.4.4 Seqüenciació de fragments d'ADN

Els fragments d'ADN es va seqüenciar segons el mètode de Sanger (257) el qual es basa en la síntesi i terminació amb dideoxinucleòtids mitjançant una reacció de PCR. Per fer la reacció de seqüenciació es va utilitzar el kit comercial BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) segons les instruccions del fabricant. En aquest tipus de PCR es requereixen 24 cicles de reacció.

Programa de PCR per seqüenciació d'ADN:

	Temperatura	Temps	
<b>Desnaturalització inicial de l'ADN</b>	96°C	1'	
<b>Desnaturalització de l'ADN</b>	96°C	10''	x24 cicles
<b>Anellament dels oligonucleòtids a l'ADN</b>	Variable	5''	
<b>Elongació de l'ADN</b>	60°C	4'	
<b>Elongació per acabar les cadenes d'ADN</b>	72°C	7'	
<b>Preservació de l'ADN</b>	4°C°	∞	

Un cop acabada la reacció de PCR les diferents mostres van ser analitzades en el seqüenciador ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems) dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona.

#### 4.4.5 Electroforesi de l'ADN en gels d'agarosa

Tant l'ADN plasmídic com qualsevol fragment d'ADN amplificat per PCR es van analitzar mitjançant electroforesi en gels d'agarosa en cubeta horitzontal.

El gel d'agarosa es va preparar en el tampó TAE (Tris-Acetate-EDTA 50X, 20 mM Tris + 20 mM Acetat + 1mM EDTA, Thermo Scientific) 0.5X i el percentatge d'agarosa (Pronadisa) utilitzat va dependre de la llargada dels fragments a analitzar: per plasmidis i fragments superiors a 900 pb es va utilitzar un percentatge del 0.8% (p/v) d'agarosa i per fragments inferiors a 900 pb del 2%. Aquest percentatge es va variar si l'experiment ho requeria.

Per determinar el tamany de l'ADN present en una mostra, es van carregar 0.1 µg de marcadors d'ADN de pes molecular conegut: Generuler™ 1 Kb (Thermo Scientific) per gels d'agarosa al 0.8%, o el Generuler™ 50 bp per gels d'agarosa al 2%.

A la mostra d'ADN a analitzar, se li va afegir de manera rutinària el volum necessari de tampó de càrrega (0.25% blau de bromofenol, 0.25% xilen cianol i 60% glicerol) per tenir una concentració 1X en el volum final de reacció a sotmetre a electroforesi en l'aparell Enduro™ Gel XL (Labnet).

La electroforesi es va dur a terme a temperatura ambient, a un voltatge d'entre 50-100 V i durant un temps variable segons del pes molecular de l'ADN que s'estava analitzant en cada moment, normalment d'uns 35 minuts.

#### **4.4.5.1 Tinció de l'ADN després de l'electroforesi**

La tinció de l'ADN es va poder fer de dos maneres diferents: mitjançant bromur d'etidi o mitjançant Sybr Safe® (Life Technologies).

##### *4.4.5.1.1 Tinció per bromur d'etidi*

La tinció del gel mitjançant bromur d'etidi es va fer submergint el gel, un cop sotmès a la electroforesi, en una solució de bromur d'etidi (Merck) 5 µg/ml en TAE 0.5X durant 20 minuts. Passat el temps de tinció, les bandes d'ADN es van visualitzar i fotografiar sota llum ultraviolada amb l'aparell Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad). Les imatges es van manipular segons el software Image Lab 3.0.1 (Beta 2) (Bio-Rad).

##### *4.4.5.1.2 Tinció per Sybr Safe®*

La tinció del gel mitjançant Sybr Safe® es va fer segons les instruccions del fabricant. Les bandes d'ADN van visualitzar i fotografiar sota llum blava amb observar amb l'aparell Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad). Les imatges es van manipular segons el software Image Lab 3.0.1 (Beta 2) (Bio-Rad).

#### **4.4.6 Aïllament de fragments d'ADN**

Per l'aïllament de fragments d'ADN de gels d'agarosa, el fragment es va visualitzar sota llum ultravioleta o blava (depenent si era un gel tenyit amb bromur d'etidi o amb Sybr Safe®) i es va retallar el fragment interès. L'ADN aïllat es va purificar de manera rutinària mitjançant el kit comercial QIAquick Gel Extraction (Qiagen) segons les instruccions del fabricant.

#### 4.4.7 Assajos d'EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)

Els assajos d'EMSA fets en aquest estudi són del tipus utilitzant ADN "fred". Aquest assaig es va fer servir amb la finalitat de detectar la capacitat d'unió de la proteïna H-NS en els diferents promotors dels gens *nrd*.

Primerament es van amplificar les diferents regions promotores dels gens *nrd* utilitzant els oligonucleòtids detallats en la taula I de l'annex. Tot seguit es va ajustar l'ADN de les diferents amplificacions a 50 ng amb H<sub>2</sub>O, i es va prosseguir barrejant els diferents ADN amb diferents concentracions de la proteïna H-NS. El protocol d'EMSA que es va seguir va ser el descrit (258).

Les diferents reaccions es van sotmetre a electroforesi en un gel d'agarosa al 1% preparat en TBE (Tris-Àcid Bòric-EDTA) 0.5X durant 60 minuts. Una vegada concloua l'electroforesi, es va submergir el gel en solució de tinció de bromur d'etidi durant 20 minuts i a continuació es van visualitzar les bandes mitjançant l'aparell Gel Doc<sup>TM</sup> XR+ System (Bio-Rad). Les imatges es van analitzar mitjançant el software Image Lab 3.0.1 (Beta 2) (Bio-Rad).

#### 4.5 Tècniques experimentals amb ARN

##### 4.5.1 Extracció d'ARN total

Per l'extracció d'ARN bacterià total es va utilitzar el kit comercial RNeasy® mini kit (50) (Qiagen) seguint les instruccions del fabricant. Els ARN van ser extrets a partir d'1 ml de cultiu crescut a la DO<sub>550</sub> volguda i tractats amb 2 ml de RNAprotect® bacteria reagent (Qiagen) per preservar la integritat de l'ARN. El cultiu va ser després centrifugat durant 10 minuts a 5000 rpm i el sediment va ser processat a continuació i congelat a -20°C.

Una vegada obtingut l'ARN total pur, aquest es va sotmetre a un tractament amb l'ADNasa comercial DNase Turbo (Ambion) per eliminar possibles contaminacions d'ADN. Per la comprovació de la no contaminació d'ADN de l'ARN, es realitzava una reacció de PCR mitjançant una combinació d'oligonucleòtids que amplifiquessin un fragment genòmic conegut. Si després de la reacció de PCR l'electroforesi d'ADN no mostrava cap banda, es considerava que l'ARN estava net d'ADN. Si per contra el gel revelava una banda del tamany esperat, es repetia el

tractament amb l'ADNasa i es tornava a fer després, la reacció de PCR per tornar a comprovar.

#### 4.5.2 Quantificació de l'ARN total purificat

L'ARN total extret es va quantificar mitjançant la determinació de la  $DO_{260}$  en l'espectrofotòmetre NanoDrop ND-1000 (NanoDrop). En alguns casos la integritat de l'ARN es va comprovar mitjançant el Bioanalyser (Bio-Rad).

#### 4.5.3 RT-PCR (PCR de Transcripció Reversa)

Per l'anàlisi quantitatiu de l'ARN mitjançant la tècnica de *Real Time PCR* (explicat en l'apartat 4.5.4) primer es va haver de retro-transcriure l'ARN a ADNc (ADN complementari) mitjançant la tècnica de RT-PCR. L'ARN pur i quantificat es va ajustar a 1  $\mu$ g i posteriorment es va fer la reacció de retro-transcripció a ADNc mitjançant la transcriptasa inversa del kit SuperScript® III Reverse transcriptase kit (Life Technologies) seguint les indicacions del fabricant.

Prèviament d'afegir la transcriptasa reversa i els components del kit, l'ARN ajustat a 1  $\mu$ g amb  $H_2O$  lliure de nucleases (Thermo Scientific) juntament amb 1  $\mu$ l d'oligonucleòtid revers 10 nM i 2  $\mu$ l de dNTPs 10 mM (Life Technologies) van ser escalfats durant 5 segons a 65°C en el mateix termociclador T100™. Una vegada temperada la barreja d'ARN amb l'oligonucleòtid i els dNTPs, es va acabar de completar la reacció amb els components del kit de RT-PCR SuperScript III reverse transcriptase i es va prosseguir amb la reacció de retro-transcripció.

Programa de retro-transcripció:

	Temperatura	Temps
<b>Reacció de retro-transcripció</b>	55°C	1h
<b>Inactivació de la reacció</b>	85°C	5'
<b>Preservació de l'ADNc</b>	4°C	$\infty$

#### 4.5.4 PCR a temps real (*Real time PCR*)

Aquest assaig es va fer servir per mesurar els nivells de transcripció del gens en unes condicions determinades.

La tècnica de la *Real Time PCR* permet la monitorització del procés d'amplificació de l'ADNc obtingut després de la reacció de retro-transcripció de l'ARN, i posteriorment, fer una quantificació de l'abundància relativa dels diferents ARNm (ARN missatger). La metodologia de *Real Time PCR* que hem utilitzat en aquest treball va ser pel mètode de sondes TaqMan® i per SYBR® Green.

Quan es va utilitzar la metodologia Taqman, es va procedir a barrejar 1 µl d'ADNc, 10 µl de Taqman® Universal Master Mix II- no UNG (Applied Biosystems) 1 µl de la sonda taqman i 8 µl d' H<sub>2</sub>O lliure de nucleases. Quan va ser la metodologia SYBR green la que es va fer servir, es van barrejar 1 µl d'ADNc, 0.5 µl d'oligonucleòtid direccional, 0.5 µl d'oligonucleòtid revers, 10 µl de Power SYBR® Green PCR Master Mix (2X) (Applied Biosystems) i 8 µl d' H<sub>2</sub>O lliure de nucleases. En ambdues metodologies el volum final a assajar va ser de 20 µl i la reacció es va donar en el termociclador StepOnePlus® Real Time PCR (Life Technologies).

##### 4.5.4.1 Anàlisi de les dades obtingudes en una reacció de *Real Time PCR*

Tots els experiments es van fer per triplicat. Després de la reacció, el termociclador StepOnePlus® Real Time PCR (Life Technologies) genera un full Excel amb les dades de l'experiment.

La fórmula utilitzada en últim terme és :  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  a on  $\Delta\Delta Ct$  és la diferència entre els increments de  $\Delta Ct$  de cada mostra respecte del control intern respecte de la  $\Delta Ct$  de la condició referència respecte del control intern.

Per exemple: utilitzant el gen *nrdE* estudiat en la formació de biofilm, la condició estudiada és l'expressió *nrdE* en formació de biofilm bacterià i la condició de referència és en cèl·lules bacterianes en estat planctònic obtingudes del mateix experiment, per tant:

$$\text{Ratio} = 2^{-(\Delta Ct \text{ nrdE biofilm} - \Delta Ct \text{ gap biofilm}) - (\Delta Ct \text{ nrdE plantònic} - \Delta Ct \text{ gap plantònic})}$$



La fórmula ens indica la inducció en l'expressió del gen *nrdE* en cèl·lules que es troben formant biofilm respecte de cèl·lules bacterianes que es troben en estat planctònic.

#### **4.5.5 Microxips d'ARN (*microarray* d'ARN)**

Per l'estudi transcripcional del modulador NrdR es van utilitzar microxips d'ARN GeneChip *E. coli* Genome 2.0 (Affymetrix). Aquesta tècnica, es va dur a terme per la Functional Genomics Core (Institute for Research in Biomedicine, IRB).

### **4.6 Mètodes de transferència gènica**

#### **4.6.1 Transformació bacteriana**

Per la transformació d'ADN plasmídic a l'interior de la cèl·lula bacteriana es van fer servir dues metodologies diferents: mitjançant tractament amb  $\text{CaCl}_2$  o per electroporació.

#### **4.6.2 Transformació bacteriana de cèl·lules competents obtingudes mitjançant tractament de $\text{CaCl}_2$ segons Cohen (259)**

La transformació bacteriana mitjançant tractament de  $\text{CaCl}_2$  permet l'entrada d'ADN exogen gràcies a que el  $\text{CaCl}_2$  provoca la desestabilització de la membrana cel·lular.

A partir d'un cultiu O/N es va realitzar una dilució 1/100 en medi LB i es va fer créixer a 37°C i amb una agitació de 200 rpm fins a una  $\text{DO}_{550}$  de 0.5-0.6. Una vegada assolida aquest  $\text{DO}_{550}$ , es va mantenir el cultiu en gel durant 10 minuts i a continuació es va centrifugar a 5000 rpm durant 10 minuts. Passada la centrifugació, es va descartar el sobrenedant i el pellet bacterià es va ressuspendre en 1/50 del volum inicial amb  $\text{CaCl}_2$  0.1 M i es va mantenir en gel durant 30 minuts. Passat aquest temps, es va repetir la centrifugació amb molta cura ja que les cèl·lules són altament inestables en aquest pas, i es va ressuspendre en 1/200 del volum inicial amb  $\text{CaCl}_2$

0.1 M i amb una concentració final de glicerol del 15%. Les cèl·lules competents es van utilitzar al mateix moment o es van congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$  en alíquotes de 500  $\mu\text{l}$ .

100  $\mu\text{l}$  de cèl·lules competents es van barrejar d'entre 1-10  $\mu\text{l}$  d'ADN exogen. La barreja es va mantenir en gel durant 30 minuts i posteriorment se li va sotmetre un xoc tèrmic de 1.5 minuts a  $42^{\circ}\text{C}$  en un bany. Ràpidament, se li va afegir 900  $\mu\text{l}$  de LB i es va procedir a incubar la suspensió durant 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$  i 400 rpm d'agitació per permetre l'expressió dels marcadors fenotípics transmesos (expressió de les resistències a antibiòtics). Per últim, es van seleccionar les cèl·lules bacterianes que havien adquirit l'ADN exogen en medi LB agar suplementat amb els antibiòtics corresponents.

#### **4.6.3 Transformació bacteriana per Electroporació cel·lular segons Dower (260)**

La tècnica de transformació per electroporació permet la transferència d'ADN exogen mitjançant la permeabilització de la membrana cel·lular provocada per una descàrrega elèctrica. Aquest tipus de transformació té una eficiència de transformació més elevada que la descrita en l'apartat anterior.

A partir d'un cultiu O/N es va realitzar una dilució 1/100 en LB i es va incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  i agitació de 200 rpm fins que el cultiu va assolir una  $\text{DO}_{550}$  de 0.5-0.6 (igual que en el cas anterior). Una vegada assolida la  $\text{DO}_{550}$ , es va deixar que el cultiu es refredés en gel durant 10 minuts i a continuació es van fer repetides centrifugacions a 4000 rpm durant 8 minuts, ressuspenent successivament en 1; 0.5; 0.1 i finalment en 0.005 volums d' $\text{H}_2\text{O}$ bd (o glicerol 10% en cas que es volguessin congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$ ) freda, amb la finalitat de disminuir la força iònica del cultiu cel·lular.

100  $\mu\text{l}$  de cèl·lules obtingudes per aquest procés, també anomenades electrocompetents, es van barrejar amb 1-5  $\mu\text{l}$  d'una suspensió d'ADN dins d'una cubeta d'electroporació de 2 mm de separació entre elèctrodes (Bio-Rad). Per electroporar les cèl·lules es va utilitzar l'electroporador Gene Pulser Xcell<sup>TM</sup> (Bio-Rad). Un cop feta l'electroporació, es va afegir 900  $\mu\text{l}$  de medi SOC i es va incubar durant 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$  i 400 rpm per, igual que en el cas anterior, permetre l'expressió dels marcadors fenotípics adquirits. Les cèl·lules bacterianes que havien adquirit l'ADN exogen es van seleccionar en medi LB agar suplementat amb els antibiòtics corresponents.

#### 4.6.4 Transducció generalitzada amb el bacteriòfag P1vir segons Miller (246)

En aquest treball es va utilitzar la tècnica de transducció amb el bacteriòfag P1vir per introduir mutacions gèniques per recombinació homòloga a la soca interès de l'estudi. Es va utilitzar el bacteriòfag P1vir, que és un derivat del bacteriòfag P1 que ha perdut la capacitat de lisogenitzar les cèl·lules que infecta.

##### 4.6.4.1 *Obtenció del lisat de P1vir*

Per obtenir un lisat fàgic P1vir es va fer una dilució 1/100 d'un cultiu O/N de la soca donadora de la mutació interès, en LB suplementat amb  $\text{CaCl}_2$  5 mM i es va incubar a 37°C i 200 rpm fins que el cultiu va assolir una  $\text{DO}_{550}$  de 0.5. Una vegada assolida aquesta  $\text{DO}_{550}$ , es va barrejar 1 ml de cultiu de la soca donadora amb 100  $\mu\text{l}$  de 1/100, 1/10<sup>3</sup>, 1/10<sup>4</sup> i 1/10<sup>5</sup> d'un lisat preexistent (10<sup>7</sup> partícules fàgiques) prèviament rentat amb cloroform. Les diferents barreges es van incubar en estàtic durant 20 minuts a 37°C i seguidament se li van afegir 2.5 ml de LB agar tou suplementat amb  $\text{CaCl}_2$  2 mM i glucosa 0.1%. A continuació es van sembrar per separat en una placa de LB agar suplementada altre vegada amb  $\text{CaCl}_2$  2 mM i glucosa 0.1%. Un cop solidificat l'agar tou amb la barreja fàgica, es van incubar les plaques sense invertir a 37°C durant tota la nit.

A l'endemà, es van afegir 2 ml de LB a cada placa i es van recollir les restes de l'agar tou en un tub amb l'ajut d'una nansa de vidre. La suspensió es va centrifugar a 5000 rpm durant 10 minuts juntament amb unes gotes de cloroform i el sobrenedant es va recollir en un altre tub. Aquest sobrenedant obtingut és el corresponent lisat fàgic i es va guardar a 4°C amb unes gotes de cloroform.

##### 4.6.4.2 *Transducció amb el P1vir*

Per dur a terme la transducció de la mutació amb el P1vir, es va partir d'un cultiu O/N de la soca receptora centrifugat a 5000 rpm durant 10 minuts i ressuspès en el mateix volum de tampó MC ( $\text{MgSO}_4$  0.1 M +  $\text{CaCl}_2$  5 mM). A continuació, 100  $\mu\text{l}$  de la suspensió de la soca receptora va ser barrejada amb:

- 100 µl de la solució directe del lisat fàgic
- 100 µl d'una dilució 1/10 del lisat fàgic
- 100 µl d'una dilució 1/100 del lisat fàgic

A més a més, es van fer els controls negatius:

- 100 µl cèl·lules receptores + 100 µl LB
- 100 µl tampó MC + 100 µl lisat fàgic

Cada barreja va ser incubada durant 20 minuts a 37°C en estàtic. Passat aquest temps se li van afegir 200 µl de tampó citrat (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> 0.1 M ajustat a pH 5.5 amb NaOH) i es van centrifugar a 5000 rpm durant 5 minuts. 300 µl del sobrenedant es van descartar i el pellet cel·lular es va ressuspèndre amb els 100 µl restants. La suspensió es va sembrar en LB agar suplementat amb els antibiòtics corresponents per seleccionar les colònies bacterianes que havien adquirit la mutació.

#### 4.6.5 Conjugació bacteriana

En aquest treball es va utilitzar el mètode de conjugació bacteriana per transferir la fusió transcripcional del promotor del gen *nrdA* amb el gen reporter *lacZ* (*P<sub>nrdAB</sub>::lacZ*) (explica't en l'apartat 4.6.6.2) a la soca AAG1 (*E. coli* MG1655  $\Delta lacZ$ ) i a la soca AAG1 $\Delta hns$  per avaluar-ne l'expressió de la classe Ia RNR en diferents condicions ambientals.

##### 4.6.5.1 Conjugació en medi sòlid

Un O/N de la soca donadora es va diluir 1/2 en LB sense suplementar amb antibiòtics i es va incubar en estàtic a 37°C durant 1-2 hores per permetre la formació del pili conjugatiu. Mentrestant, l' O/N de la soca receptora es va mantenir a 37°C i en agitació de 200 rpm. Passat aquest temps, es van barrejar 200 µl de la soca donadora i 200 µl de la receptora en un tub i es va centrifugar a 4000 rpm durant 5 minuts. Tot seguit, es van descartar 300 µl del sobrenedant i els 100 µl restants, que contenia el pellet ressuspès, es van dipositar sobre d'un filtre de nitrat de cel·lulosa (Whatman),

de 0.2 µm diàmetre de porus, sobre una placa de LB agar i es va incubar durant 4-6 hores a 37°C.

Una vegada passat el temps d'incubació, es va ressuspendre el filtre en 2 ml de MgSO<sub>4</sub> 10 mM i es van sembrar 100 µl en una placa LB agar suplementada amb els antibiòtics necessaris per seleccionar els transconjugants.

#### 4.6.6 Construccions gèniques per l'estudi transcripcional dels gens *nrd*

##### 4.6.6.1 Construcció plasmídica per l'estudi transcripcional dels gens *nrd* mitjançant la GFP (Green Fluorescent Protein)

Per estudiar l'expressió dels gens *nrd* d'*E. coli* al llarg d'aquest treball, es va procedir a clonar les regions promotores dels operons *nrdAB*, *nrdHIEF* i *nrdDG* en el vector pETS130-GFP (249) el qual permet fer fusions transcripcional amb el gen reporter *gfp*. Es van amplificar les diferents regions d'ADN dels promotors *nrd* amb els primers PnrDA BamHI up/PnrDA ClaI lw, PnrDD BamHI up/PnrDD ClaI lw i PnrDH BamHI/PnrDH ClaI lw (detallats a la taula I l'annex), i es van lligar, per separat, al vector pGEM®T-easy (Promega) seguint les instruccions del fabricant. Seguidament, es van transformar, per separat, les diferents lligacions en 100 µl de cèl·lules competents de la soca d'*E. coli* DH5α. La selecció es va fer mitjançant plaques de LB agar suplementades amb ampil·lina i X-Gal. Aquest sistema de clonació del pGEM®T-easy conté el *multi cloning site* (MCS) a l'interior de la regió codificant pel gen *lacZ*, per tant, els clons positius seran incapaços d'expressar l'enzim β-galactosidassa i conseqüentment, no podran hidrolitzar el galactopiranòsid X-Gal donant colònies blanques.

Es va seleccionar una colònia blanca de cada transformació i se'n va fer un cultiu O/N per extreure'n l'ADN plasmídic. Una vegada extrets els diferents ADN plasmídics: *PnrDA*-pGEM®T-easy, *PnrDD*-pGEM®T-easy i *PnrDH*-pGEM®T-easy es van tallar amb els enzims de restricció *BamHI* i *ClaI*. Al mateix temps, es va extreure plasmidi del vector pETS130-GFP i també s'hi va fer una restricció amb els mateixos enzims. Els diferents fragments es van separar per electroforesi d'ADN i es van aïllar els fragments tal i com s'explica en l'apartat 4.4.6. A continuació, els diferents fragments dels promotors *nrd* es van lligar, per separat, amb el pET130-GFP mitjançant la T4 ADN lligasa (Thermo Scientific), seguint les instruccions del

fabricant, pels seus extrems *Bam*HI i *Cla*I, donant lloc als plasmidis pETS150, pETS151 i pETS152. Les diferents lligacions es van transformar d'*E. coli* DH5 $\alpha$  i es van seleccionar els que van créixer en LB agar suplementat amb gentamicina.

#### **4.6.6.2 Construcció de les fusions transcripcionals plasmídiques i cromosòmiques *PnrdAB::lacZ*, *PnrdDG::lacZ*, *PentC::lacZ* i *Pfur::lacZ***

Per poder mesurar els nivells d'expressió de l'operó *nrdAB* en diferents fons genètics és va construir una fusió gènica del promotor *nrdAB* (*PnrdAB*) amb el gen reporter *lacZ*.

Inicialment, es van amplificar 702 pb de la regió promotora *nrdAB* amb els oligonucleòtids *PnrdASma*I up i *PnrdABam*HI lw (detallats a la taula I l'annex). El fragment de PCR es va tallar amb els enzims de restricció *Sma*I i *Bam*HI, gràcies a les dianes d'aquests enzims introduïdes amb els oligonucleòtids. El fragment obtingut va ser seguidament lligat, utilitzant la T4 ADN lligassa, al vector pUJ8 (252), també tallat amb els enzims de restricció *Sma*I i *Bam*HI. La lligació va ser llavors transformada a la *E. coli* DH5 $\alpha$  i es van seleccionar les colònies de coloració blava que van créixer en LB agar suplementat amb ampicil·lina. El vector pUJ8 conté el MCS immediatament abans de l'extrem 5' del promotor truncat del gen *lacZ*, i només si la clonació ha estat positiva es podrà expressar l'enzim  $\beta$ -galactosidasa, hidrolitzant el X-Gal present en LB agar i donant coloració blava a les colònies. Aquest vector permet fer fusions transcripcionals per estudiar els nivells d'expressió d'un gen interès, en aquest cas l'operó *nrdAB*, mitjançant l'expressió del gen *lacZ*. Els nivells d'expressió del gen *lacZ* són directament proporcionals a l'activitat del promotor del nostre gen interès. Una vegada construït el vector *PnrdAB*-pUJ8 anomenat pETS163, es van fer estudis transcripcionals directament utilitzant el plasmidi però també és va voler inserir la fusió *PnrdAB::lacZ* en el genoma bacterià.

Per inserir la fusió gènica en el cromosoma bacterià. Es va extreure l'ADN plasmídic de la soca DH5 $\alpha$  pETS163 i es va tallar amb l'enzim de restricció *Not*I, el qual posseeix dos dianes de restricció a 5' i 3' del fragment *PnrdAB::lacZ*. Seguidament, es va lligar el fragment *PnrdAB::lacZ* amb el plasmidi suïcida pUTminiTn5Cm (252) també tallat amb *Not*I. Per evitar l'autolligació del vector al ser tallat només amb un enzim de restricció, es va desfosforilar l'extrem 5' mitjançant la

fosfatassa FastAp<sup>TM</sup> Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific) seguint les instruccions del fabricant. A continuació es van lligar els fragments *PnrDAB::lacZ* i el plasmidi pUTminiTn5Cm pels seus extrems *NotI* amb la T4 ADN lligassa donant lloc al plasmidi pETS166. El plasmidi pUT (261) conté una seqüència que codifica per un transposó i, a més a més, requereix de la proteïna pir ( $\pi$ ) per la seva replicació. Per aquest motiu, el pETS166 va ser transformat a la soca S17 $\lambda$ pir, la qual expressa aquesta proteïna pir. Una vegada obtinguda la soca conjugativa S17 $\lambda$ pir pETS166 es va haver de conjuguar a una soca que no expressés el gen *lacZ* per poder estudiar únicament els nivells d'expressió *lacZ* provinent de la fusió *PnrDAB::lacZ*, i es va utilitzar la soca AAG1.

La soca AAG1, tal com es detalla en la taula 3, no posseeix cap resistència a cap antibiòtic. Per poder dur a terme la selecció dels transconjugants, es necessitava que la soca receptora posseís d'almenys un marcador fenotípic, per aquest motiu, es van fer diferents cultius d'aquesta soca amb 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  i 100  $\mu\text{g/ml}$  de rifampicina. La rifampicina actua sobre l'ARN polimerasa. L'alteració d'un aminoàcid en aquesta subunitat altera la unió de la rifampicina a l'ARN polimerasa fent que la soca bacteriana confereixi resistència a aquest antibiòtic. En un cultiu bacterià a on és poden arribar a tenir  $10^9$  generacions bacterianes, hi han altes probabilitats que es produeixi aquesta mutació aminoacídica (262). La utilització de la rifampicina, era una manera ràpida i fàcil de conferir-li un marcador fenotípic a la soca AAG1 i així poder continuar amb la conjugació.

Selecció amb LB agar suplementat amb cloramfenicol (el marcador fenotípic del vector pUTminiTn5Cm), rifampicina i X-Gal, únicament van poder créixer els transconjugants que van adquirir en el seu cromosoma la fusió *PnrDAB::lacZ*, ja que la soca AAG1 no expressa la proteïna pir. La soca obtinguda es va anomenar ETS119. El no creixement de la soca ETS119 en plaques de LB agar suplementades amb ampicil·lina va servir per corroborar que només la fusió transcripcional, i no el plasmidi, s'havia inserit en el cromosoma.

A més a més, es va voler estudiar l'efecte en l'expressió de l'operó *nrDAB* si es deleccionava la hipotètica regió d'unió a H-NS. Per poder estudiar aquest efecte es va procedir amplificant la regió des de la -575 pb a la -450 pb des del lloc d'inici de la transcripció mitjançant els oligonucleòtids PnrDASmaI up i PA -450 ext lw (detallats a la Taula I de l'annex), i des de la posició -400 pb a la +127 pb des del lloc d'inici de la transcripció *nrDAB* amb els oligonucleòtids PA -400 ext pho up i PnrDABamHI lw

(detallats a la Taula I de l'annex). Els dos fragments es van lligar amb la T4 ADN lligasa gràcies a unes extensions complementàries que van introduir els oligonucleòtids PA -450 ext lw i PA -400 ext pho up. Una vegada lligats els dos fragments, es va obtenir un regió promotora *nrdAB* amb 50 pb delecionats centrats a la posició -425 pb des del lloc d'inici de la transcripció i es va procedir igual com pel promotor salvatge *PnrdAB* (explica't al començament de l'apartat) per acabar obtenint la soca ETS121. Abans de prosseguir amb els estudis d'expressió, es va seqüenciar el fragment per corroborar la seva correcte construcció.

Per la construcció de la fusió *PnrdDG::lacZ* es va seguir el mateix procediment que per *PnrdAB::lacZ*. El fragment de 261 pb de la regió promotora de l'operó *nrdDG* va ser amplificat mitjançant els primers PnrdD-up (*SmaI*) i PnrdD-lw (*BamHI*) (detallats a la taula I de l'annex) i clonat per les dianes *SmaI* i *BamHI* del vector pUJ8 donant el plasmidi pETS169. Per la obtenció del plasmidi pETS170, es va tallar el plasmidi pETS169 mitjançant l'enzim de restricció *NotI* i es va lligar mitjançant la T4 ADN lligasa per les dianes *NotI* del vector pUTminiTn5Cm prèviament desfosforilat el seu extrem 5'. Igual que amb la fusió *PnrdAB::lacZ*, el plasmidi pETS170 es va conjuguar a les soques AAG1 i AAG1 $\Delta$ *hns* per inserir la fusió *PnrdDG::lacZ* en el cromosoma bacterià per fer els estudis d'expressió mitjançant l'assaig  $\beta$ -galactosidassa.

De manera més resumida, ja que el procediment és igual que el de les altres fusions gèniques, per l'obtenció de la fusió transcripcional *PentC::lacZ* i *Pfur::lacZ*, 398 pb del promotor del gen *entC* es va amplificar mitjançant els oligonucleòtids PentC *EcoRI* i PentC *BamHI*, mentre que 430 pb de la regió promotora del gen *fur* va ser amplificada mitjançant els oligonucleòtids *Pfur SmaI* up i *Pfur BamHI* lw respectivament (detallats a la taula I de l'annex). La regió promotora *entC* es va clonar mitjançant les dianes *EcoRI* i *BamHI* mentre que la de *fur* es inserir per les dianes de restricció *SmaI* i *BamHI* del vector pUJ8 donant els plasmidis pETS171 i pETS173. El plasmidi pETS171 es va transformar directament a les soques AAG1 i AAG1 $\Delta$ *fur* per fer estudis d'expressió, per altres banda, el plasmidi pETS171 es va tallar mitjançant l'enzim de restricció *NotI* per ser clonat en el vector pUTminiTn5Cm donant el plasmidi pETS172. El procediment pel plasmidi pETS172 va continuar de la mateixa manera que per les fusions *PnrdAB::lacZ* i *PnrdDG::lacZ* però el receptor final apart de la soca AAG1 va ser la soca AAG1 $\Delta$ *nrdR2*.



#### 4.6.7 Construcció plasmídica per purificació de NrdR: clonació del gen *nrdR* en el vector pAviTag-C N-His Sumo

El clonatge de *nrdR* en el vector pAviTag-C N-His Sumo (Lucigen) va permetre obtenir una sobreproducció de NrdR altament soluble i biotinitzada. A més a més de la biotina, aquest plasmidi incorpora 6 histidines, que en el nostre cas s'incorporaven a l'extrem C-terminal del fragment, per la seva fàcil purificació mitjançant cromatografia d'afinitat.

El fragment *nrdR* es va amplificar per PCR mitjançant els oligonucleòtids *nrdR*-Biotin-up i *nrdR*-Biotin-lw (detallats a la taula I de l'annex) i la clonació amb el vector pAviTag-C N-His Sumo es va fer segons les instruccions del fabricant, donant el plasmidi pETS174. El plasmidi es va transformar a la soca Biotin XCell F' (subministrada pel fabricant Lucigen). La correcta construcció del plasmidi es va corroborar mitjançant seqüenciació amb els oligonucleòtids subministrats pels fabricant.

#### 4.6.8 Contruccions plasmídiques per les complementacions de les mutacions $\Delta nrdE$ , $\Delta nrdD$ , $\Delta nrdR$ i $\Delta nrdDnrdE$ per l'estudi de formació de biofilm

##### 4.6.8.1 Contruccions plasmídiques en el vector pBluescriptSK(+)

Amb l'objectiu de complementar les mutacions  $\Delta nrdE$ ,  $\Delta nrdD$  i  $\Delta nrdR$ , es van amplificar per PCR les regions d'ADN corresponents als operons *nrdHIEF*, *nrdDG* i *nrdR* amb els oligonucleòtids Operon-Ib-up(BHI)/Operon-Ib-lw(BHI), EcoliDG-BHI-up/EcoliDG-BHI-lw i Ecoli *nrdR* up/Ecoli *nrdR* lw (detallats a la taula I l'annex). Les diferents regions amplificades es van lligar, per separat, en el vector pGEM®T-easy i transformar en cèl·lules competents d'*E. coli* DH5 $\alpha$ . Una vegada comprovada la correcta clonació del fragment volgut, es va extreure l'ADN plasmídic d'una colònia blanca crescuda en LB agar suplementat amb ampicil·lina (explica't en apartat 4.6.6.1) i, juntament amb l'ADN plasmídic del vector pBluescriptSK(+) (Stratagene), es va fer una restricció amb l'enzim *Bam*HI. Després de defosforilar el vector (explica't en apartat 4.6.6.2) es van lligar els fragments amb la T4 ADN lligassa i es van transformar en cèl·lules competents d'*E. coli* DH5 $\alpha$ . La transformació es va sembrar en LB agar suplementat amb ampicil·lina i X-Gal seleccionant les colònies blanques,

ja que el MCS del vector pBluescriptSK(+) es troba a l'interior del gen *lacZ* el qual es trenca si se li introdueix un fragment i no es capaç d'expressar l'enzim  $\beta$ -galactosidasa i hidrolitzar el X-Gal. Els plasmidis obtinguts es van anomenar pIb, pIII i pR segons si l'operó clonat en el pBluescriptSK(+) era *nrdHIEF*, *nrdDG* o *nrdR* respectivament.

#### 4.6.8.2 Construcció plasmídica en el vector pBBR1MCS-5

Per poder complementar la doble deleció dels gens *nrdE* i *nrdD*, es va haver d'utilitzar un altre vector per evitar la incompatibilitat de marcadors. Per aquest motiu es va clonar la regió d'ADN codificant pels gens *nrdDG* i es va clonar en el vector pBBR1MCS-5 (248) el qual té com a marcador fenotípic la resistència a l'antibiòtic gentamicina. Per la clonació en el pBBR1MCS-5 es va utilitzar l'ADN plasmídic *nrdDG*-pGEM®T-easy tallat amb *BamHI* i es va lligar amb l'ADN plasmídic pBBR1MCS-5 prèviament tallat amb *BamHI* i defosforilat (explica't en apartat 4.6.6.2) donant lloc al plasmidi pDG. La lligació va ser transformada en cèl·lules competents d'*E. coli* DH5 $\alpha$  i es van seleccionar les colònies que van créixer en LB agar suplementat amb gentamicina.

#### 4.6.9 Construccions plasmídiques per la complementació de les mutacions $\Delta nrdD$ i $\Delta nrdE$ en la soca d'*E. coli* LF82

Amb l'objectiu de complementar les delecions *nrdD* i *nrdE* en la soca LF82, es van amplificar les regions d'ADN corresponents als operons *nrdHIEF* i *nrdDG* amb els oligonucleòtids LF82 PnrdH up BamHI/ Operon-Ib-lw(BHI) i EcoliDG-BHI-up/EcoliDG-BHI-lw (detallats a la Taula I de l'annex), respectivament. L'operó *nrdHIEF* es va clonar per la diana *BamHI* del vector pJET1.2 (Fermentas) i l'operó *nrdDG* en el vector pGEM®T-easy (Promega).

Seqüenciant els fragments i fent anàlisi amb enzims de restricció es va confirmar la correcta clonació dels fragments.

#### **4.6.10 Construccions plasmídiques per l'assaig de complementació en la soca LF82 de la RNR cromosòmica de classe Ia per la RNR plasmídica.**

Per avaluar la funcionalitat de l'operó *nrdAB* plasmídic de la soca LF82 es va amplificar 3573 pb corresponents a la regió d'ADN codificant per la RNR de classe plasmídica (*nrdABp*) mitjançant els oligonucleòtids ABp-pBADup/ABp-pBADlow (detallats a la Taula I de l'annex) i també 3606 pb corresponents a la regió d'ADN codificant per la RNR de classe cromosòmica (*nrdABc*) mitjançant els oligonucleòtids ABC-pBADup/ABC-pBADlow (detallats a la Taula I de l'annex). Tots dos fragments es van clonar per les dianes *EcoRI* i *XbaI* del el vector pBAD18 (247) generant el plasmidi pET174 i pETS175 respectivament.

Seqüenciant els fragment i fent anàlisi amb enzims de restricció és va confirmar la correcta clonació dels fragments.

#### **4.7 Mètodes de mutagènesi bacteriana**

Inactivació de gens cromosòmics utilitzant fragments de PCR segons Datsenko & Wanner (263)

A l'any 2000 els investigadors Kirill A. Datsenko i Barry L. Wanner van dissenyar una metodologia que permet reemplaçar una seqüència cromosòmica per un gen de resistència a un antibiòtic que s'ha generat en una reacció de PCR. Aquest fragment de PCR introdueix unes extensions homòlogues al gen cromosòmic que es vol delectonar fent que la recombinassa Red pugui produir recombinació en les zones que flanquegen aquest. Una vegada seleccionats els mutants, la resistència a l'antibiòtic pot ser eliminada utilitzant un plasmidi que expressa la recombinassa FLP la qual actua en la repetició directe (FRT) adjacent al gen de la resistència, tot i que en aquest treball no l'hem fet servir.

##### **4.7.1 Generació del fragment de PCR que conté el gen de resistència a un antibiòtic**

Es va amplificar el gen de resistència al cloramfenicol (*cat*) del plasmidi pKD3 mitjançant els oligonucleòtids (detallats en la taula I de l'annex). Aquests

oligonucleòtids contenien, en el seu extrem 5' i en l'extrem 3', les seqüències complementaries al plasmidi i també, d'entre 35-40 pb homòlogues a la regió del gen a deletar. D'aquesta manera, es va generar un fragment de PCR que contenia el gen de resistència al cloramfenicol flanquejat pels llocs FRT requerits per la recombinassa.

El fragment amplificat es va digerir amb l'enzim de restricció *DpnI* per eliminar la possible contaminació de l'ADN motlle utilitzat en la PCR. Després el fragment va ser purificat tal i com es descriu en l'apartat 4.4.6.

#### **4.7.2 Substitució al·lèlica**

Per donar lloc a la recombinació al·lèlica, es va utilitzar el plasmidi pKD46 el qual codifica per la recombinassa Red del fag  $\lambda$ . Aquest vector té un origen de replicació termosensible, a temperatures superiors de 28-30°C para de replicar-se, i la seva expressió es troba sota d'un promotor induïble per arabinosa. La recombinassa Red, a més de promoure la recombinació, inhibeix la exonucleasa cel·lular V, permetent l'entrada del fragment de PCR lineal evitant-ne la degradació.

La sòcia interès a mutagenitzar es va transformar amb el vector pKD46. La sòcia resultant es va fer créixer en medi SOB fins a una  $DO_{550}$  de 0.5-0.6, en presència de L-arabinosa 10 mM i d'ampicil·lina 100  $\mu\text{g/ml}$ , a 28°C i en agitació de 200 rpm. Una vegada assolida la  $DO_{550}$ , es van fer electrocompetents (explica't en l'apartat 4.6.3) i es van electroporar 10-100 ng i 1  $\mu\text{g}$  respectivament del fragment generat PCR. La suspensió electroporada va ser ressuspesa en 1 ml de medi SOC (explica't en l'apartat 4.6.3). En aquest cas però, es va incubar durant 1 hora i 30 minuts a 30°C i 400 rpm per afavorir l'acció de la recombinassa Red.

La meitat de la suspensió cel·lular és va sembrar, passat aquest temps d'incubació, en plaques d'agar suplementades amb cloramfenicol 30  $\mu\text{g/ml}$  i es van incubar O/N a 37°C. L'altra meitat de la suspensió cel·lular es va deixar a temperatura ambient i es van sembrar a l'endemà en les mateixes condicions que amb la primera meitat.

La incubació a 37°C va fer eliminar el plasmidi pKD46. Les colònies resistents al cloramfenicol van ser genotipades per PCR.

## **4.8 Tècniques experimentals amb proteïnes**

### **4.8.1 Inducció del pETS174 i purificació de NrdR**

La sobreexpressió de *nrdR* en vector pETS174 es va induir el cultiu amb 0.2% de L-ramnosa i per la biotinització es va afegir biotina en solució a una concentració final de 50 µM, seguint les instruccions del fabricant del kit Expresso Biotin SUMO cloning and Expression System (Lucigen).

La purificació de NrdR es va dur a terme mitjançant immunoprecipitació amb el sistema Pierce<sup>TM</sup> Streptavidin Magnetic Beads (Thermo Scientific) seguint les instruccions del fabricant.

### **4.8.2 Obtenció d'extractes proteics totals**

Per l'obtenció d'un extracte proteic, es va fer créixer la soca objecte de l'estudi proteic en les condicions que marcaven l'estudi fins la DO<sub>550</sub> volguda. Una vegada assolida la DO<sub>550</sub>, es van centrifugar 10 ml del cultiu i es va ressuspendre el sediment bacterià en 100 µl de solució BugBuster® (Novagen) seguint les instruccions del fabricant. Aquest reactiu lisa les cèl·lules fent que tot el contingut cel·lular surti a l'exterior. Les suspensions es van deixar incubar durant 30 minuts a temperatura ambient i a continuació es van centrifugar durant 15 minuts a 15.000 rpm. Després de la centrifugació, es van recuperar els sobrenedants a on es trobava la fracció proteica total cel·lular. Tot seguit, es va prosseguir amb la seva quantificació.

### **4.8.3 Determinació de la concentració proteica pel mètode de Bradford (264)**

Per valorar la concentració proteica de la mostra, es va utilitzar el reactiu *Protein Assay Dye Concentrates* (Bio-Rad) i es va fer servir segons les instruccions del fabricant. Aquesta tècnica és basa en el mètode descrit per Bradford l'any 1976 segons el qual les proteïnes presenten afinitat pel colorant Blau de Coomassie (264).

Es va preparar una solució de BSA de 25 mg/ml a partir de la qual es van fer les dilucions necessàries per construir una corba patró amb 0, 1, 2, 4 i 8 µg/µl de BSA. Per la seva banda, el reactiu de Bradford es va emprar a una dilució d'1/4 en H<sub>2</sub>O.

utilitzant-ne 800 µl per cada mostra. Per determinar la concentració proteica es va afegir d'entre 1-5 µl d'extracte proteic fins que la tonalitat de blau es trobava dins del marge del donat per la corba patró.

A continuació es va prosseguir mesurant l'absorbància de les mostres a DO<sub>595</sub>. La concentració proteica es va calcular extrapolant a partir de la recta patró els valors de l'absorbància de les mostres i fent la correcció segons el volum de mostra assajat.

#### 4.8.4 Electroforesis en gels de poliacrilamida amb SDS

Els gels poliacrilamida amb l'agent desnaturalitzant SDS ens van permetre la separació proteica segons el pes molecular de les proteïnes. Aquest tipus de gels consten de dues fases diferenciades de funció i composició diferent:

##### 4.8.4.1 Fase de compactació

La fase de compactació és la de la zona superior del gel, a on es troben els pous per carregar les mostres que han de ser sotmeses a electroforesis. Està composta per un 5% de poliacrilamida a la qual se li afegeix tampó de compactació 4X (Tris-HCl/SDS) ajustat a pH 6.8.

##### Composició Fase Compactació

	5%
<b>Acrilamida/Bis 30.8% T 2.6% (Bio-rad)</b>	0.65 ml
<b>Tampó de compactació x4</b>	1.25 ml
<b>H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub></b>	3.05 ml
<b>Ammonium Persulfat 10% (Sigma)</b>	25 µl
<b>Temed (Bio-rad)</b>	5 µl

%T: % acrilamida + bisacrilamida

%C: % de bisacrilamida respecte a T

#### 4.8.4.2 Fase de resolució

La fase de resolució es troba a la part inferior del gel. És en aquesta fase a on les proteïnes es van separant segons el seu pes molecular, per això, el percentatge de poliacrilamida varia segons el tamany de les mostres que es volen separar en cada cas. Al volum de poliacrilamida utilitzat se li afegeix tampó de resolució 4X (Tris-HCl/SDS) ajustat a pH de 8.8.

En aquest estudi s'han utilitzat gels al 7.5, 10 i 15% de poliacrilamida. La seva composició es descriu a continuació:

##### Composició Fase Resolució

	<b>7.5%</b>	<b>10%</b>	<b>15%</b>
<b>Acrilamida/Bis 30.8% T 2.6% (Bio-rad)</b>	3.75 ml	5 ml	7.50 ml
<b>Tampó de Resolució x4</b>	3.75 ml	3.75 ml	3.75 ml
<b>H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub></b>	7.50 ml	6.25 ml	3.75 ml
<b>Ammonium Persulfat 10% (Sigma)</b>	50 µl	50 µl	50 µl
<b>Temed (Bio-rad)</b>	10 µl	10 µl	10 µl

%T: % acrilamida + bisacrilamida

%C: % de bisacrilamida respecte a T

#### 4.8.4.3 Preparació del gel de poliacrilamida amb SDS

Es van utilitzar gels de 0.75 mm de gruix preparats en el sistema Mini protean® Tetra system (Bio-Rad).

Primerament es va afegir la fase de resolució fins a 3/4 parts de l'altura dels vidres i tot seguit es va cobrir amb H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub>. Una vegada polimeritzada aquesta fase, es va abocar l'H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> i es va afegir fase de compactació. Abans de que aquesta fase polimeritzés, es va col·locar una pinta per formar els pous requerits per carregar les mostres.

#### **4.8.4.4 Electroforesi del gel de poliacrilamida amb SDS**

Una vegada el gel va estar preparat, es va col·locar a la cubeta d'electroforesi (Bio-Rad) i es va submergir en tampó de correguda (25 mM Tris, 192 mM Glicina i 0.1% SDS). Tot seguit se li va afegir 5 µl de tampó de càrrega (Tris-HCl 0.225 M a pH de 6.8, Glicerol 50%, SDS 5%, Blau de Bromofenol 0.05% i Ditriotretol (DTT) 0.25 M) a cada mostra i es van bullir a 100°C durant 10 minuts per acabar de desnaturalitzar les proteïnes. Passats els 10 minuts, es van centrifugar les mostres i es van carregar en el gel juntament amb 5 µl del marcador de pes molecular Precision Plus Protein™ Standards (Bio-Rad) que conté una mescla de proteïnes amb els següents pesos moleculars: 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 i 10 kDa. Quan el gel va estar carregat, es va aplicar un amperatge de 20 mA.

#### **4.8.5 Tinció dels gels amb PageBlue™ Protein Staining Solution**

Per visualitzar el conjunt de les bandes proteïques separades en el gel, es va prosseguir fent una tinció del gel amb reactiu PageBlue™ Protein Staining (Thermo scientific) segons les indicacions del fabricant.

#### **4.8.6 Immunodetecció proteica**

Quan el que es va voler va ser detectar la proteïna interès d'entre tot l'extracte proteic, es va continuar fent una transferència de les proteïnes, prèviament separades en el gel de poliacrilamida, a una membrana de PVDF (Immuno-Blot™ PVDF membranes, Bio-Rad) i seguidament es va fer una detecció de la proteïna mitjançant antisèrums específics.

##### **4.8.6.1 Transferència de les proteïnes del gel a la membrana de PVDF**

Les proteïnes van ser transferides a la membrana de PVDF mitjançant el sistema de transferència Trans-Blot® SD-Semy-Dry Transfer Cell (Bio-Rad).



La membrana va ser prèviament tractada durant 10 minuts amb metanol (Panreac) amb la finalitat de neutralitzar la hidrofobicitat de la membrana. Una vegada fet aquest pre-tractament, tant la membrana com el gel de poliacrilamida van equilibrar les seves càrregues sent submergits en tampó de transferència (48 mM Tris, 39 mM glicina, 20% Metanol i 1.3 mM SDS) abans de realitzar la transferència.

El gel de poliacrilamida es va dipositar sobre de la membrana de PVDF, i tot el conjunt es va situar entre dos papers de filtres PROTEAN® XL size (Bio-Rad) prèviament submergits en tampó de transferència. El bloc es va col·locar entre el càtode i l'ànode de l'aparell i es va procedir a la transferència de les proteïnes aplicant un voltatge de 15 V durant 30-45 depenent el percentatge de poliacrilamida que contenia el gel.

#### **4.8.6.2 Immunodetecció i revelatge quimioluminiscent mitjançant el sistema ECL™**

Una vegada transferides les proteïnes a la membrana, aquesta es va submergir en solució de bloqueig (PBS 1X i llet en pols desnatada 5% p/v) a 4°C durant tot la nit.

A l'endemà es va prosseguir amb la immunotecció mitjançant la incubació de la membrana amb l'anticòs primari contra la proteïna a detectar. En aquest estudi es van utilitzar anticossos policlonals de conill contra la proteïna NrdA de *Pseudomonas aeruginosa* (249) a una dilució 1/750 en solució de bloqueig, l'anticòs primari contra NrdF de *Bacillus anthracis* (265) a una dilució d'1/1000 en solució de bloqueig i l'anticòs primari contra NrdD del bacteriòfag T4 a una dilució de 1/500 en solució de bloqueig (249). La incubació amb l'anticòs primari va ser de 2 hores a 4°C, seguidament es van fer 3 rentats en PBS 1X amb Tween 0.05% de 15 minuts i, tot seguit, es va prosseguir a la detecció de l'anticòs primari mitjançant l'anticòs secundari contra conill conjugat amb peroxidasa (Bio-Rad) a una dilució d'1/50000 en PBS 1X amb Tween 0.05% durant 1 hora a 4°C. Passat aquest temps, es van fer 3 rentats més en PBS 1X amb Tween 0.05% de 15 minuts cadascun per eliminar les restes d'anticòs secundari.

La proteïna es va detectar mitjançant el sistema quimioluminiscent Amersham™ ECL™ Prime western blotting reagent (GE Healthcare) seguint les instruccions del fabricant i es van visualitzar en l'aparell ImageQuant™ LAS4000

mini (GE Healthcare). Les imatges es van analitzar mitjançant el software ImageQuant TL (GE Healthcare).

## 4.9 Valoració d'activitats enzimàtiques

### 4.9.1 Assaig de la $\beta$ -galactosidassa (246)

L'assaig de la  $\beta$ -galactosidassa es basa en la reacció de hidròlisi de l'anàleg de la lactosa incolor ONPG (o-nitro-fenil-pirogalactòsid) al compost groguenc o-nitrofenol, que duu a terme l'enzim  $\beta$ -galactosidassa. És un sistema que permet l'estudi transcripcional del gen interès utilitzant el gen reporter *lacZ* clonat sota l'activitat del promotor de nostre gen interès (veure apartat 4.6.6.2).

Es va fer una ressebra del cultiu O/N a una dilució 1/1000 en el medi requerit per l'estudi, i es va incubar en agitació de 200 rpm fins assolir la  $DO_{550}$  desitjada (també en les condicions temperatura objectes d'estudi). Una vegada el cultiu va arribar a la  $DO_{550}$  requerida es van agafar 100  $\mu$ l del cultiu i es van barrejar amb 800  $\mu$ l de tampó Z (composició detallada al final de l'apartat) i 5  $\mu$ l de toluè en un tub de vidre. El toluè permeabilitza la membrana permetent que tot el contingut cel·lular surti a l'exterior. La barreja es va agitar utilitzant el vòrtex durant 15 minuts i tot seguit es va incubar a 37°C i 200 rpm durant 45 minuts per promoure l'evaporació del toluè. Als tubs de vidre amb les mostres, se li va afegir un tub control amb 100  $\mu$ l de medi sense cultiu.

Passat el temps d'evaporació del toluè, es van incubar els diferents tubs a 28°C (temperatura a la que es dona la reacció) durant 5 minuts per tal de temperar tots els tubs. A continuació se li van afegir 200  $\mu$ l d'ONPG (4 mg/ml en tampó fosfat 0.1 M, composició detallada al final de l'apartat) a cada tub, se li va sotmetre un toc de vòrtex i es va començar a cronometrar el temps. Quan el contingut dels tubs van començar a virar a color groguenc, es va prosseguir a aturar la reacció afegint 500  $\mu$ l de  $Na_2CO_3$  1 M, una vegada afegit aquest compost, es va aturat el cronòmetre.

Tot seguit es va mesurar la  $DO_{420}$  que és la que ens indica la intensitat de groc deguda a l'absorció de l'*o*-nitrofenol i també a  $DO_{550}$  que ens dona l'absorbància de les possibles restes cel·lulars que han quedat en la suspensió interferint en el resultat. La dispersió a  $DO_{420}$  es 1.75 vegades proporcional a la dispersió a  $DO_{550}$ .

Amb les dades d'absorbància, es va continuar calculant les Unitats Miller, unitats creades per l'investigador que va dissenyar l'assaig i que fan referència a la quantitat d'enzim capaç d'hidrolitzar nmols d'ONPG per minut a 28°C i a pH de 7.

$$\text{Unitats Miller} = \frac{DO_{420} - 1.75 \times DO_{550}}{T \times V \times DO_{550} \text{ del cultiu}}$$

T= temps d'assaig en minuts

V= volum de cultiu que s'ha utilitzat en l'assaig

#### Composició de les Solucions per l'assaig de $\beta$ -galactosidassa

##### **Tampó Z**

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x7 H<sub>2</sub>O 0.6 M

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> xH<sub>2</sub>O 0.6 M

KCl 0.01 M

MgSO<sub>4</sub> x7 H<sub>2</sub>O 0.01 M

$\beta$ -mercaptoetanol 0.05 M

##### **Tampó fosfat 0.1 M pH7**

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 M

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 M

\*Les dos solucions es van barrejar fins assolir un pH de 7

## **4.10 Estudi de la formació de biofilm**

### **4.10.1 Formació de biofilm sobre placa de polivinil**

Per estudiar la capacitat de formació de biofilm bacterià sobre un superfície sintètica, es va ajustar la DO<sub>550</sub> del cultiu O/N a una DO<sub>550</sub> de 0.1 en medi LB suplementat amb glucosa 0.2% i seguidament, es va inocular un volum de 200  $\mu$ l de la suspensió en una placa de 96 pous de polivinil de clorit (PVC, COSTAR). La placa es va incubar a 37°C durant 15 ò 48 hores depenen de l'estudi.

Passat el temps d'incubació, es van fer tres rentats de les plaques en PBS 1X i el biofilm format a les parets dels pous de la placa es van fixar durant 15 minuts amb 200  $\mu$ l de metanol afegit en cada pou. Passats els 15 minuts, es va abocar el metanol i es va deixar assecar la placa a temperatura ambient. A continuació, es va prosseguir afegint 200  $\mu$ l de cristall violeta 1% i es va deixar tenyir durant 5 minuts. Una vegada tenyits, es van afegir 200  $\mu$ l d'àcid acètic glacial al 33% (Panreac) per dissoldre el

biofilm format i poder mesurar absorbància del cristall violeta a DO<sub>570</sub>. L'absorbància es va mesurar en l'espectrofotòmetre de plaques de *microtiter* Infinite® M200PRO (TECAN). Com més biofilm format, més absorbància a DO<sub>570</sub>.

#### **4.10.2 Formació de biofilm sobre superfície de vidre**

Per estudiar la formació de biofilm sobre superfície de vidre es va seguir el protocol descrit pel Prof. O'Toole (266). Primerament es va ajustar la DO<sub>550</sub> del cultiu O/N a una DO<sub>550</sub> de 0.1 en medi 3 ml de LB suplementat amb glucosa 0.2% i es van afegir en tubs de borosilicat els quals contenien un cobreobjectes de vidre de 18 x 18 mm (Menzel-Gläser) i es van incubar durant 48 hores. Passat el temps d'incubació, es van realitzar 3 rentats del cobreobjectes amb PBS 1X, tot seguit es va fixar amb metanol el biofilm que s'hi havia format i finalment es va tenyir amb cristall violeta 1%. Una vegada van estar tenyits, el biofilm format sobre dels cobreobjectes es va dissoldre amb àcid acètic glacial al 33% i es va mesurar de la mateixa manera que en l'apartat anterior



***Objectius***

---



## 5 Objectius

1. Expressió diferencial i funció dels gens *nrd* durant la formació de biofilm de les soques salvatges d'*E. coli* MG1655 i l'enteropatogènica (EPEC) E2348/69. Article: *Biofilm modifies expression of ribonucleotide reductase genes in Escherichia coli*.
2. Efecte regulador del factor transcripcional H-NS sobre els gens que codifiquen per les tres classes de RNR d'*E. coli*. Manuscrit: *H-NS as a novel transcriptional modulator for the ribonucleotide reductase genes in Escherichia coli*.
3. Estudi del reguló NrdR en la soca d'*E. coli* MG1655. Manuscrit: *Genome-wide transcriptional analysis of Escherichia coli NrdR regulon*.
4. Estudi de les diferents classes de RNR de la soca adherent i invasiva d'*Escherichia coli* (AIEC) LF82 i la seva expressió diferencial durant un procés infectiu. Cerca del paper del factor transcripcional NrdR en la regulació. Manuscrit: *Role of ribonucleotide reductase during infection of adherent-invasive Escherichia coli LF82 from Crohn's disease*.





Resultats i discussions: articles i manuscrits



## **6 Resultats-discussió**

### **6.1 Expressió diferencial i funció dels gens *nrd* durant la formació de biofilm de les soques salvatges d’*E. coli* MG1655 i l’enteropatogènica (EPEC) E2348/69. Article: *Biofilm modifies expression of ribonucleotide reductase genes in Escherichia coli***

Tal i com s’ha comentat en la introducció, la capacitat que tenen alguns bacteris en formar biofilm és un atribut virulent que contribueix a que malalties infeccioses esdevinguin cròniques. *E. coli* posseeix diferents fílums que tenen alta capacitat de formació de biofilms, responsables de malalties infeccioses cròniques intestinals i extra-intestinals a conseqüència de la capacitat que tenen en formar biofilm.

En base a l’essencialitat de l’enzim RNR i en el fet que, tal i com s’ha explica’t en la introducció, *E. coli* codifica per tres classes diferents de RNR, es va voler estudiar la expressió diferencial de les tres classes diferents de RNR quan el bacteri es troba formant biofilm i, si alguna de les tres classes presentava una inducció diferencial en aquestes condicions. Tanmateix es va voler estudiar quina classe de RNR era important en aquesta forma de creixement bacterià.

L’estudi es va dur a terme amb dos *E. coli* diferents: amb la soca salvatge no patogènica MG1655 i la entero-patogènica (EPEC) E2348/69, ambdues soques descrites com a productores de biofilm (220, 267).

#### **6.1.1 Les RNR de classe Ib i III són importants en la formació de biofilm**

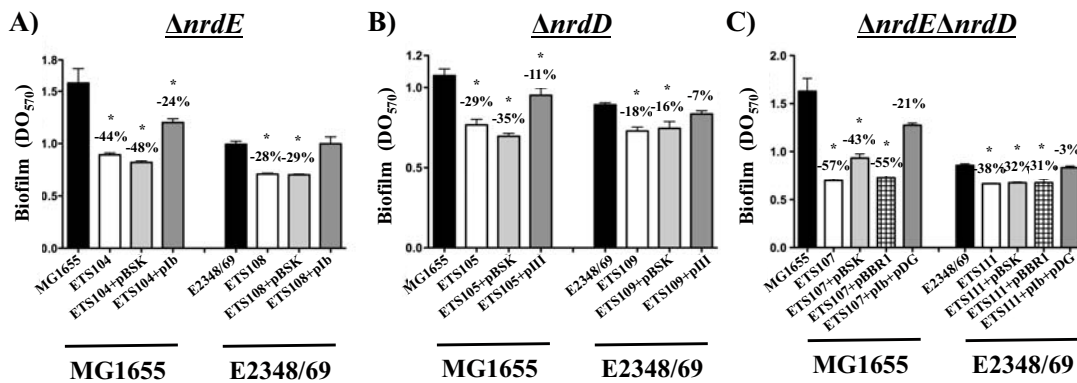
(Veure Taula 4 en Material i Mètodes per qualsevol dubte amb la nomenclatura de les soques i/o plasmidis)

Per poder estudiar el requeriment diferencial de les diferents classes de RNR que posseeix les soques d’*E. coli* MG1655 i E2348/69 durant la formació de biofilm, primer de tot es van construir els mutants individuals dels gens que codifiquen les subunitats catalítiques de la RNR de classe Ib i III i també el doble mutant de les dos

**Resultats-discussió: “Biofilm modifies expression of ribonucleotide reductase genes in *Escherichia coli*”**

classes, en la soca MG1655 i la E2348/69. Una vegada les soques van estar construïdes i comprovades mitjançant PCR (oligonucleòtids detallats a la taula I de l’annex) es van fer estudis de formació de biofilm per avaluar la capacitat que tenien les diferents soques mutant en formar biofilm sobre una superfície de PVC durant 48 hores a 37°C (Material i Mètodes). El mutant de la RNR de la classe Ia no és viable sota condicions normals de laboratori, per això es va haver de limitar l’estudi del seu paper en la formació de biofilm a estudis d’expressió gènica.

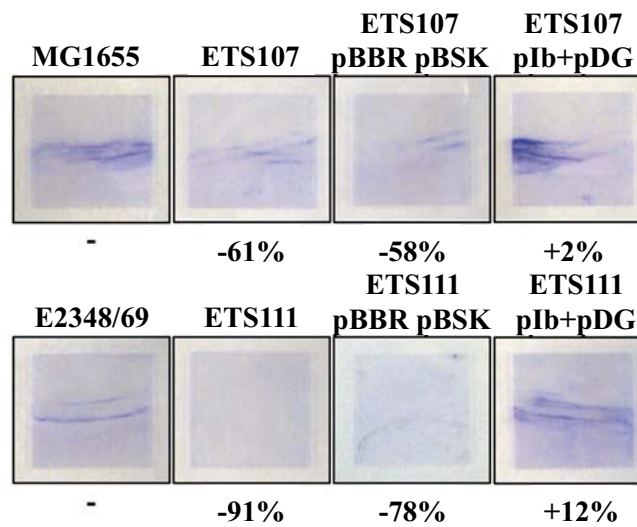
Els resultats van revelar una disminució en el biofilm format en les soques mutants simples pels gens *nrdD* i *nrdE* en ambdues soques (MG1655 i E2348/69), reducció que és complementava quan les soques mutants van ser transformades amb els plasmidis que portaven clonades les regions codificant dels gens deletionats en qüestió (pIb i pIII). Sorprenentment, es va veure que la doble mutació dels gens *nrdD* i *nrdE*, provocava una disminució en més de la meitat la capacitat de biofilm en la soca no patògena MG1655. L’efecte reductor causat per la doble mutació  $\Delta nrdD\Delta nrdE$  també es restituïa quan es complementava amb els plasmidis pIb i pDG, per evitar la coincidència d’antibiòtics, el gen *nrdD* es va clonar en el plasmidi pBBR1MCS-5 el qual porta la resistència a l’antibiòtic gentamicina (Figura 17 i Figura 1A-1C de l’article).



**Figura 17.** Biofilm formats de la soca MG1655 i E2348/69. A) Efecte de la deleció del gen *nrdE* en la formació biofilm de la soca MG1655 i E2348/. B) Efecte de la deleció del gen *nrdD* en la formació biofilm de la soca MG1655 i E2348/69. C) Efecte de la doble deleció *nrdE* i *nrdD* en la formació biofilm de la soca MG1655 i E2348/69. En els diferents gràfics es mostra la restauració del biofilm amb les respectives complementacions, i el % diferencial de formació de biofilm respecte de la soca salvatge de cada soca marcant-se amb un asterisc les estadísticament significatives. En els gràfics es mostra la desviació estàndard de tres experiments independents.

**Resultats-discussió: “Biofilm modifies expression of ribonucleotide reductase genes in *Escherichia coli*”**

A més a més, es va voler estudiar si aquest efecte en la reducció de biofilm es reproduïa en altres substrats. És per això que es va procedir a avaluar la capacitat de la MG1655 i E2348/69 amb els seu respectius dobles mutants *nrdE* i *nrdD* en formar biofilm sobre vidre. Després d’incubar les diferents soques i també amb les corresponents complementacions, es va observar que la mateixa tendència que la que s’havia vist en les plaques de polivinil. Les doble deleció gènica *nrdE* i *nrdD* va provocar una reducció del 61 i 91% respectivament a la soca MG1655 i E2348/69, en comparació a la soca salvatge, reducció que es recuperava amb les corresponents complementacions plasmídiques (Figura 18 i Figura 2 de l’article).

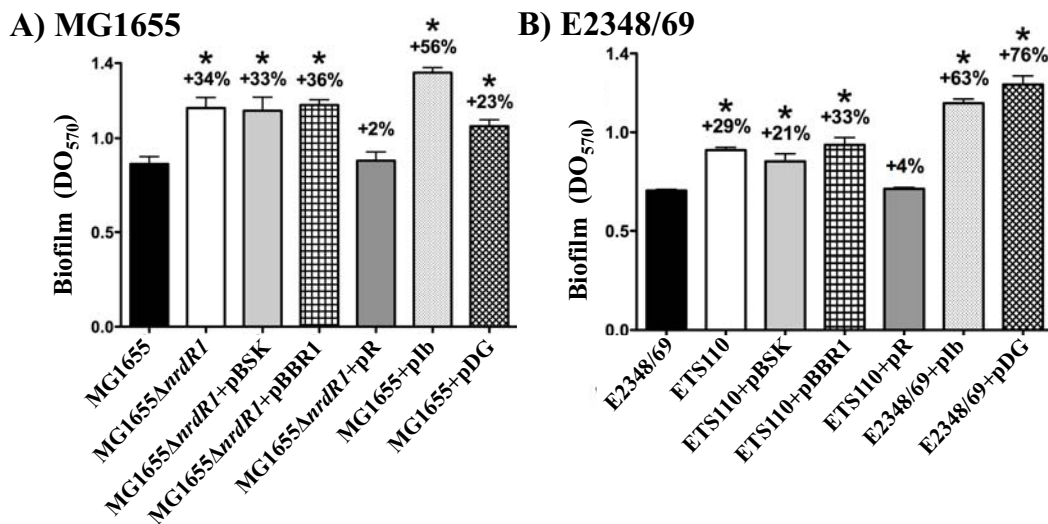


**Figura 18. Efecte de la doble mutació  $\Delta nrdD$  i  $\Delta nrdE$  en la formació de biofilm sobre superfície de vidre.** La figura mostra la tinció del biofilm format de la soca doble  $\Delta nrdD\Delta nrdE$  i les respectives complementacions plasmídiques i controls. La imatge pertany a la millor foto de tres experiments independents i es marca el percentatge diferencial respecte a les respectives soques salvatges: MG1655 i E2348/69.

Per corroborar aquest efecte i la importància de la RNR de classe Ib i III, es van fer estudis de formació de biofilm utilitzant la soca mutant del factor transcripcional NrdR (MG1655 $\Delta nrdR1$  i ETS110), descrit, com ja s’ha comentat en altre apartats d’aquesta tesi, com a repressor transcripcional de les RNR d’*E. coli* (135). Si en les soques mutants pels gens *nrdD* i *nrdE* s’observava una disminució en la formació de biofilm tant amb la soca patògena com amb la no patògena, per contra, si l’expressió d’aquestes dos classes de RNR es troba des-reprimida com a conseqüència de la deleció del gen *nrdR*, s’esperaria obtenir més formació de biofilm en la soca mutant en comparació amb les respectives salvatges. Aquest resultat és el

**Resultats-discussió: “Biofilm modifies expression of ribonucleotide reductase genes in *Escherichia coli*”**

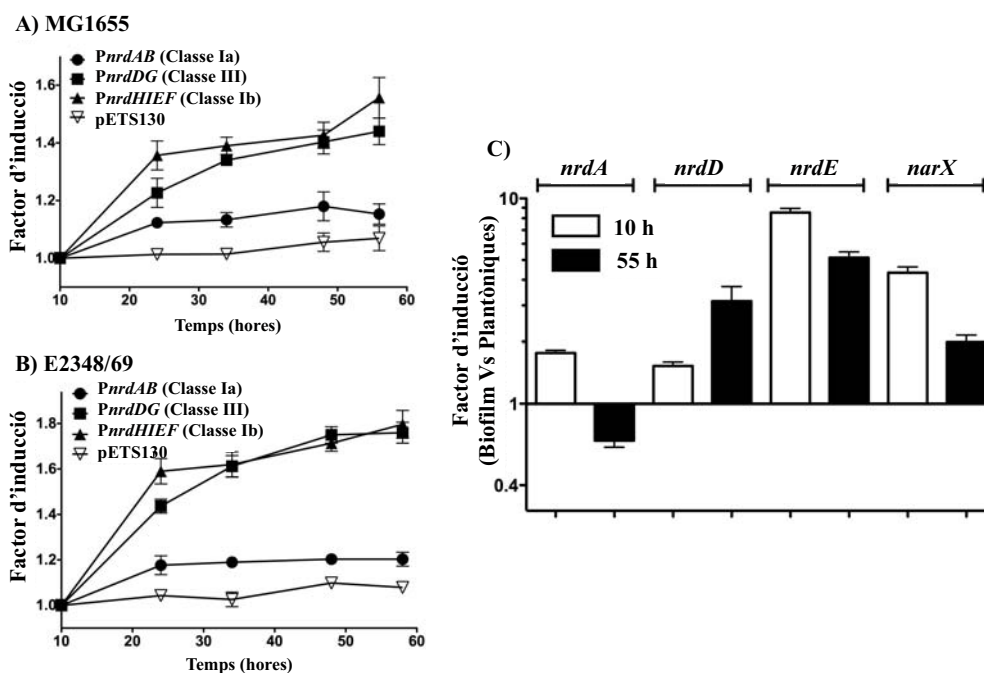
que es va obtenir. En ambdues soques, la formació de biofilm que es detectava era d'un 34% i un 29% més elevat en la soca MG1655 $\Delta$ *nrdR1* i la ETS110, respectivament, comparada amb la soca WT, increment que es restaurava quan es va complementar la mutació amb el plasmidi pR transformat en ambdues soques  $\Delta$ *nrdR* (Figura 19 i Figura 3 de l'article). La sobre-expressió de les RNR de classe Ib i III, mitjançant els plasmidis pIb i pDG transformats a les soques MG1655 i E2348/69, també va rebel·lar un increment en la formació de biofilm comparat amb la soca salvatge. En aquest cas, l'efecte observat en la soca d'*E. coli* EPEC va ser molt important detectant un 63% més de biofilm quan es sobre-expressava la RNR de classe Ib i fins a un 76% quan la que es sobre-expressava era la RNR de classe III després d'haver incubat les plaques 48 hores a 37°C. Per la complementació de les mutacions, així com per la sobre-expressió de les dues classes de RNR, es va utilitzar les seqüències que codifiquen pels gens *nrdR*, *nrdD* i *nrdE* de la soca MG1655 degut a l'alt grau de similitud que posseeixen amb la soca E2348/69 (Figura 19A i 19B i Figura 3 de l'article).



**Figura 19. Efecte del factor transcripcional NrdR correlacionat amb la sobre-expressió de les RNR de classe Ib i III en la capacitat de formació de biofilm de la soca MG1655 i E2348/49.** A) Formació de biofilm detectada en la soca MG1655, MG1655 $\Delta$ *nrdR1* i les sobre-expressions de les classes Ib i III en la soca MG1655. La corresponent complementació i control plasmídic també són mostrats, juntament amb la desviació estàndard de tres experiments independents. B) Formació de biofilm detectada en la soca E2348/69, ETS110 i les sobre-expressions de les classes Ib i III en la soca E2348/69. La corresponent complementació i control plasmídic també són mostrats, juntament amb la desviació estàndard de tres experiments independents.

**Resultats-discussió: “Biofilm modifies expression of ribonucleotide reductase genes in *Escherichia coli*”**

Tot seguit es van fer estudis d'expressió gènica mitjançant la utilització de fusions gèniques transcripcionals *gfp* de les regions promotores de les RNR de classe Ia, Ib i III tant de la MG1655 com de la E2348/69 per avaluar els canvis d'expressió a mesura que s'anava formant biofilm. Tal com s'esperava, els promotors de les RNR de classe Ib i III van reflectir una inducció en l'expressió a mesura que el biofilm anava sent madur (60 hores), mentre que el promotor de la RNR de classe Ia va mantenir el seu nivell d'activitat al llarg de gairebé les 60 hores d'incubació del biofilm a 37°C. A mesura que el biofilm va creixent tridimensionalment, va creant un gradient d'oxigen, produint condicions d'anaerobiosi estricta en les parts més interiors. Aquest gradient explicaria l'augment d'expressió de les RNR de classe Ib i III i també, el manteniment de l'activitat de la RNR de classe Ia ja que en les parts superficials del biofilm, la disponibilitat d'oxigen que posseeixen les cèl·lules que s'acaben d'adherir al complex, encara expressen aquesta classe de RNR. Aquests resultats es van corroborar mitjançant *Real Time PCR* a on es va comparar l'ARN dels gens *nrdA*, *nrdD* i *nrdE* en cèl·lules formadores de biofilms respecte de les que es trobaven en estat planctònic a 10 hores i a 48 hores d'incubació, o sigui, en un biofilm primerenc i en un altre madur de la soca MG1655 (Figura 20 i Figura 4 i 5 de l'article). El gen *narX* es va utilitzar com a control per formar part del reguló del factor transcripcional d'anaerobiosi FNR (268).





**Resultats-discussió: “Biofilm modifies expression of ribonucleotide reductase genes in *Escherichia coli*”**

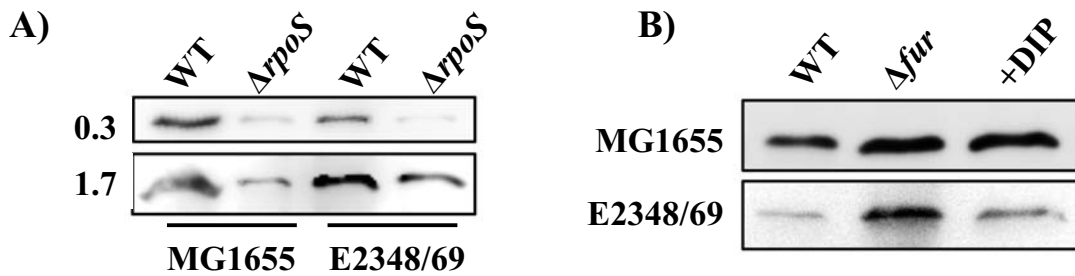
**Figura 20. Expressió de les diferents RNR al llarg de la formació de biofilm.** A) Expressió de les RNR mitjançant el gen reporter *gfp* sota el control dels diferents promotors *nrd* al llarg de 58 hores de formació de biofilm de la soca MG1655. B) Expressió mitjançant el gen reporter GFP dels diferents promotors *nrd* al llarg de 54 hores de formació de biofilm de la soca E2348/69. C) Inducció de l'expressió dels gens *nrdA*, *nrdD* i *nrdE* de la soca MG1655 a 10 i 50 hores de formació de biofilm en comparació a les cèl·lules que es troben en estat planctònic. Al gràfic es mostra la desviació estàndard de tres experiments de *Real Time PCR* diferents.

### **6.1.2 Mecanismes transcripcionals que indueixen l'expressió de les RNR de classe Ib i III durant la formació de biofilm**

Com s'ha comentat en l'apartat anterior, a mesura que el biofilm va creixent en dimensió, el gradient oxigènic va augmentant així com també ho fa el dèficit de nutrients i l'estrès oxidatiu (269). Àmpliament descrita és la inducció del factor transcripcional RpoS en aquestes condicions d'estrès oxidatiu (270) i la inactivació de Fur proteïna que regula negativament l'operó *nrdHIEF* (138). La inactivació de Fur ve donada per la oxidació del seu cofactor de Fe<sup>II</sup> a Fe<sup>III</sup> limitant així el seu rol repressor de la transcripció gènica (12, 271). Per tant, en aquestes condicions d'estrès oxidatiu presents en un biofilm, Fur es veuria incapaç de reprimir la transcripció de la RNR de classe Ib. Aquesta hipòtesi es va corroborar detectant, mitjançant Western-Blot, la proteïna NrdE en la soca salvatge (WT), la soca mutant pel gen *fur* (WT $\Delta$ *fur*) i en la soca salvatge (WT) crescuda en presència de l'agent quelant de ferro 2-2 dipiridil (DIP), tant de la soca d'*E. coli* MG1655 com de la EPEC E2348/69. El resultat del Western-Blot va mostrar clarament l'efecte de la presència de ferro o no en la inducció de NrdE, ja que la banda tant de la soca  $\Delta$ *fur* com en presència de DIP era més intensa que la comparada amb la de la soca salvatge (Figura 21B i Figura 21C de l'article). Per una altra banda, la proteïna RpoS augmenta la seva expressió en aquestes condicions d'estrès oxidatiu, per induir el seu reguló i combatre els danys cel·lulars causats per aquest estrès. Amb aquesta premissa, també es va voler estudiar el possible efecte d'aquest factor transcripcional en l'increment de la RNR de classe Ib. Per fer-ho es van fer estudis d'expressió, mitjançant *Real Time PCR*, amplificant el gen *nrdE* d'ARN extret de la soca no patogènica MG1655 i de seu mutant isogènic  $\Delta$ *rpoS* a DO<sub>550</sub> de 0.3 i 0.8, estadis en el creixement bacterià a on està descrit que *rpoS* posseeix la màxima expressió. Els resultats van assenyalar una forta inducció de

**Resultats-discussió: “Biofilm modifies expression of ribonucleotide reductase genes in *Escherichia coli*”**

*nrde* de 2.61 i 9.44 vegades, a DO<sub>550</sub> de 0.3 i 0.8 respectivament, resultats que es van corroborar mitjançant Western-Blot detectant la proteïna NrdE (Figura 21A i Figura 6A de l'article). Per tant, encara que sense saber si és de manera directa o indirecta, el factor RpoS es trobaria induint la RNR de classe Ib a mesura que l'estrès oxidatiu augmenta en un biofilm. Aquesta inducció es veuria reforçada per la inactivació del metal·loreular FUR en les mateixes condicions d'estrès, sent incapaç de reprimir la transcripció dels gens *nrDHIEF*.



**Figura 21. Eexpressió de la RNR de classe Ib depen de les proteïnes RpoS i Fur.** Detecció de la proteïna NrdE mitjançant Western-Blot en A) MG1655 i E2348/69  $\Delta rpoS$  i B) MG1655 i E2348/69  $\Delta fur$  i en presència de l'agent quelant DIP.

La forta inducció que pateix la RNR de classe III vindria donada per la limitació d'oxigen que gradualment va apareixent a mesura que creix un biofilm bacterià. En aquestes condicions estrictament anaeròbiques en les parts més endinsades del biofilm i microaeròfiles en les parts intermèdies d'aquest complex bacterià, el factor anaeròbic FNR es trobaria activant els gens dels seu reguló, entre ells, l'operó *nrddG* (Figura 22 i Figura 7 de l'article). Aquesta hipòtesi es corrobora amb l'experiment explica't a l'apartat superior amb l'amplificació dels gens *nrdd* i *narX*, tots dos descrits com a part del reguló FNR (150, 268), d'ARN extret de cèl·lules formadores de biofilm a 10 i 55 hores d'incubació a 37°C. En aquest experiment, *nrdd* va rebel·lar una expressió de 1.5 vegades en un biofilm primerenc (a hi han menys part anòxiques) que va augmentar fins a 3.2 vegades a 55 hores d'incubació, estadi a on el biofilm ja és madur i el gradient d'oxigen és més marcat. L'amplificació del gen control *narX* també va donar induït en cèl·lules que es troben formant biofilm respecte de les planctòniques, donant suport a la hipòtesi de l'acció del factor transcripcional FNR.

*Resultats-discussió: “Biofilm modifies expression of ribonucleotide reductase genes in Escherichia coli”*

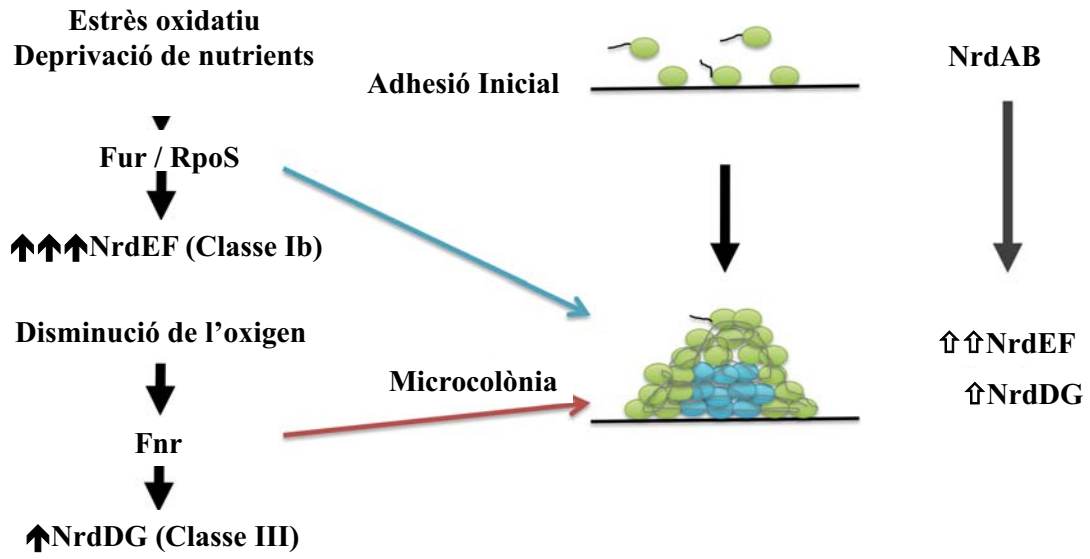


Figura 22. Model d'expressió de les diferents classes de RNR d'*E. coli* al llarg d'un procés de formació de biofilm.

### 6.1.3 Article: “Biofilm modifies expression of Ribonucleotide Reductase genes in *Escherichia coli*”

OPEN ACCESS Freely available online



## Biofilm Modifies Expression of Ribonucleotide Reductase Genes in *Escherichia coli*

Maria del Mar Cendra<sup>1</sup>, Antonio Juárez<sup>1,2</sup>, Eduard Torrents<sup>1\*</sup>

**1** Cellular Biotechnology, Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), Barcelona, Spain, **2** Department of Microbiology, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

#### Abstract

Ribonucleotide reductase (RNR) is an essential enzyme for all living organisms since is the responsible for the last step in the synthesis of the four deoxyribonucleotides (dNTPs) necessary for DNA replication and repair. In this work, we have investigated the expression of the three-RNR classes (Ia, Ib and III) during *Escherichia coli* biofilm formation. We show the temporal and spatial importance of class Ib and III RNRs during this process in two different *E. coli* wild-type strains, the commensal MG1655 and the enteropathogenic and virulent E2348/69, the prototype for the enteropathogenic *E. coli* (EPEC). We have established that class Ib RNR, so far considered cryptic, play and important role during biofilm formation. The implication of this RNR class under the specific growth conditions of biofilm formation is discussed.

**Citation:** Cendra Mdm, Juárez A, Torrents E (2012) Biofilm Modifies Expression of Ribonucleotide Reductase Genes in *Escherichia coli*. PLoS ONE 7(9): e46350. doi:10.1371/journal.pone.0046350

**Editor:** Ulrich Dobrindt, University of Würzburg, Germany

**Received:** February 7, 2012; **Accepted:** September 2, 2012; **Published:** September 26, 2012

**Copyright:** © 2012 Cendra et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by grants from the “ERA-NET Pathogenomics-BIO2008-04362-E” and from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (PI081062) and (BFU2011-24066) to ET and Consolider-Intermods (CDS2008-00013) from the Spanish MICINN to ET and AJ. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: etorrents@ibecbarcelona.eu

#### Introduction

*Escherichia coli* biofilm development is a complex molecular process that involves a large number of genetic factors and genes. When the global gene expression profiles of biofilm and planktonic *E. coli* cells are compared, very significant differences are apparent [1]. Biofilm formation is underlying catheter-associated urinary tract infections (CAUTIs), urinary tract infections (UTIs) caused by uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC), and the various types of diarrhea caused by enterohemorrhagic, enteroinvasive and enteroaggregative *E. coli*. The persistence of these biofilms may contribute to such infections becoming chronic conditions [2].

The complexity of biofilm formation makes it difficult to precisely identify the regulatory networks and the processes of alteration of gene expression which account for its development. In this context, it is important to understand how DNA synthesis is regulated and which factors participate in this process.

Although *E. coli* K-12 is not as proficient in making biofilms as other *E. coli* isolates, it has nonetheless been used in many studies, for instance to elucidate changes in transcriptomic profiles between planktonic cells and biofilm [1,3,4,5]. Confocal analysis has evidenced a well-defined three-dimensional colonial structure with a mushroom form in K-12 strains and also the enteroaggregative E2348/69 *E. coli* strain [3,6].

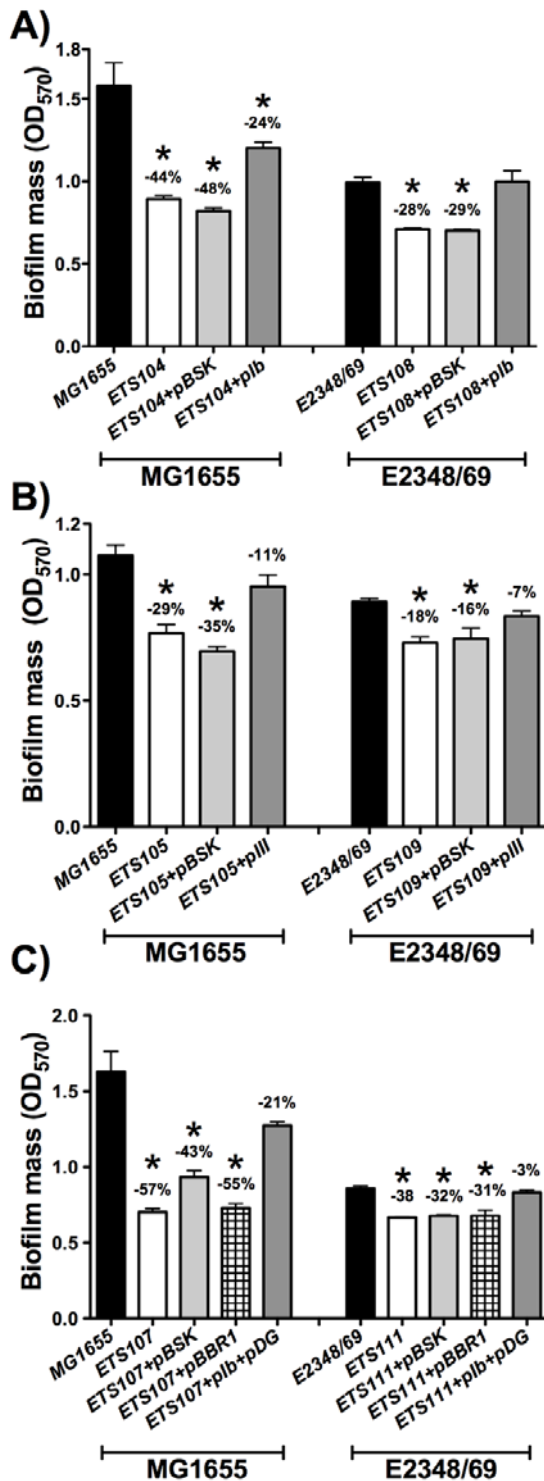
Ribonucleotide reductases (RNR) are essential enzymes in all living cells. These proteins catalyze the reduction of ribonucleotides (NTPs) to the corresponding deoxyribonucleotides (dNTPs), thus providing the building blocks for DNA synthesis and repair [7]. The three known RNR classes (I, II and III) use free radicals for catalysis but rely on different metal cofactors for the initiation of the radical reduction process, each exhibiting a different behavior towards oxygen [8]. Class I RNRs contain a stable

tyrosyl radical and an oxygen-linked di-iron center required for the production of free radicals, and class I enzymes are only functional under aerobic conditions. This class of RNRs is further subdivided into classes Ia and Ib, because of significant differences in allosteric regulation and gene organization. Class Ia RNRs are encoded by the *nrdA-nrdB* genes, whereas class Ib RNRs are encoded by the *nrdH-nrdI-nrdE-nrdF* genes. It has been recently shown that class Ib small subunit (NrdF) stabilizes the tyrosyl radical by a dimanganese-oxo center [9,10]. Class II RNRs are coenzyme B12-dependent and can be active under both aerobic and anaerobic conditions. Lastly, class III RNRs, encoded by the *nrdD-nrdG* genes, carry a stable but oxygen-sensitive glycy radical, and are only functional under anaerobic conditions. While almost all eukaryotic organisms encode exclusively class I RNRs, prokaryotes are known to encode more than one RNR class [8]. And additional protein, termed NrdR, was recently described as a novel transcriptional regulator capable of modulating the expression of all RNRs present in one organism [11].

*E. coli* and all enterobacteria encode three different RNR classes in their genome: Ia, Ib and III. While in *E. coli* class Ia RNR is active during aerobiosis and class III is active during anaerobiosis [12,13], class Ib RNR has been considered a cryptic enzyme with no apparent function [7,14]. However, a physiological role during growth of *E. coli* under iron starvation conditions has been assigned to class Ib. This enzyme requires manganese for tyrosyl radical generation and can replace the iron-dependent class Ia RNR [15]. A yet unanswered question is why *E. coli* encodes so many different RNRs which are apparently redundant. A hypothesis to be tested is that the different RNR classes present in *E. coli* are differentially expressed when cells deal with specific environmental signals, such as those found within the host or

Article: “Biofilm modifies expression of Ribonucleotide Reductase genes in *Escherichia coli*”

Ribonucleotide Reductases in Biofilm Formation



**Figure 1. The *Escherichia coli* *nrdE* and *nrdD* mutants are defective in biofilm formation.** Biofilms of the wild-type *E. coli* strains (MG1655 and E2348/69) are compared to their isogenic *nrdE* mutant in A), *nrdD* mutant in B) and *ΔnrdEΔnrdD* double mutant in C). The values shown are the means of at least 4–5 independent experiments with six wells in each and the error bars represent standard deviations. Differences with respect to the wild-type strain were statistically significant for all the pairs of strains (\*,  $P < 0.05$  by the Mann-Whitney test). Plots and statistics were generated using GraphPad Prism 5.0 software.  
doi:10.1371/journal.pone.0046350.g001

during biofilm formation. In this paper we evidence that when *E. coli* cells develop biofilms, expression of the different RNR enzymes is different to that observed in planktonic cells.

**Results and Discussion**

*E. coli* class Ib (*nrdE*) and class III (*nrdD*) RNR genes are key enzymes in biofilm formation

In this work we have used two different *E. coli* wild-type strains: the commensal MG1655 [16] and the enteropathogenic (EPEC) and virulent E2348/69 [17], this latter being the prototype for the EPEC *E. coli* strains involved in human disease and that still remains as the leading cause of infantile diarrhea in developing countries. EPEC colonize the proximal small intestine, where they adhere to epithelial cells forming microcolonies. Typically, EPEC strains form biofilms more complex in structure than MG1655 [6,17]. Since class Ia RNR mutants are non-viable under normal laboratory growth conditions [14] we have studied only class Ib (*nrdE*) and III (*nrdD*) mutants. These mutants have been used to assay surface-associated biofilm formation on polyvinyl chloride (PVC) 96-well plates as described in the methods section.

Deletion of the *nrdE* gene in strains MG1655 and E2348/69 (ETS104 and ETS108) reduced by about 44% and 28% biofilm formation with respect to parental wild-type strains (Fig.1A). Quantification of viable cells in the *ΔnrdE* mutant revealed a 13.6% and 20.1% increase of planktonic cells when compared to parental wild-type strains, thus corroborating the noted decrease in biofilm formation (data not shown).

With respect to the *nrdD* gene, mutants lacking this enzyme (ETS105 and ETS109) produced in both strains 29% less biofilm formation than the corresponding parental wild-type strains (Fig.1B). To correlate loss of function of *nrdD* and *nrdE* genes and alterations in biofilm formation, these mutations were complemented with the corresponding wild-type alleles and biofilm formation was tested. When plasmids containing the *nrdHIEF* and *nrdDG* operon (pIb and pIII) were transformed in the ETS104/ETS108 (Fig.1A) and ETS105/ETS109 strains (Fig.1B), the biofilm formation level was restored to levels comparable to those observed in the corresponding wild-type strains (MG1655 and E2348/69). We decided next to combine the two mutations. A double *ΔnrdEΔnrdD* mutation (ETS107 and ETS111) produced biofilm formation levels that were 57% and 38% lower than the wild-type strains (Fig.1C).

The absorbance levels of biofilm formation on a microtiter plate of strains MG1655 and E2348/69 are not high, but they proved to be highly reproducible. To corroborate the microtiter biofilm formation data, we performed additional assays in a glass tube, testing thus biofilm formation on a different surface. Fig.2 shows the biofilm formation of both wild-type *E. coli* strains and their corresponding double *nrdE* and *nrdD* mutant derivatives growing under aerobic conditions. Simultaneous deletion of the *nrdE* and *nrdD* genes in strains MG1655 or E2348/69 results either in a drastic reduction of biofilm (61% in strain ETS107) or almost

# Article: “Biofilm modifies expression of Ribonucleotide Reductase genes in *Escherichia coli*”

Ribonucleotide Reductases in Biofilm Formation

completely abolishing it (91% in strain ETS111). When the double mutants ETS107 and ETS111 were complemented with plasmids pIb and pDG the biofilm formation level was restored to levels comparable to those of the corresponding parent strains (MG1655 and E2348/69). Glass tube biofilm formation was also checked by growing the different strains under microaerophilic conditions but significant biofilm growth could not be observed (data not shown).

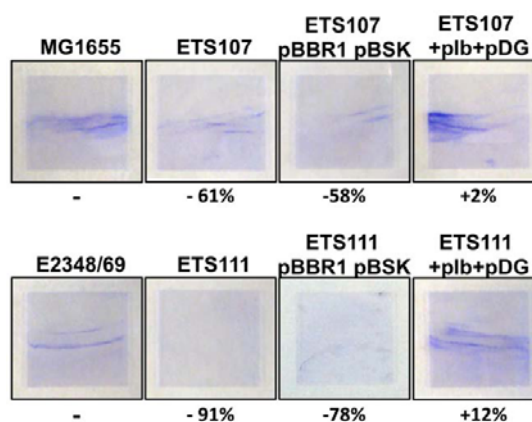
All these results evidence that both class Ib and class III RNRs play a significant role during *E. coli* biofilm formation.

## The transcriptional factor *nrdR* induces biofilm formation through the activation of class Ib and III genes

The transcriptional factor NrdR acts as a repressor of the three-*nrd* genes in *E. coli* [11]. We decided to test if this protein plays a role in biofilm formation. To this purpose,  $\Delta nrdR$  mutant derivatives were constructed in both MG1655 and E2348/69 strains. When compared to the corresponding parent strains, biofilm formation was higher (by 34% and 29%) in the  $\Delta nrdR$  mutant derivatives (MG1655 $\Delta nrdR1$  and ETS110) (Fig3a and 3b). This suggests *nrdE* and *nrdD* up-regulation in  $\Delta nrdR$  cells. Furthermore, a complementation test using pR plasmid (Table1) restored the biofilm levels to those of the wild-type strains. With respect to the mechanism by which NrdR enhances *E. coli* biofilm formation, it should be commented here that it had previously been shown that NrdR deficiency strongly increases class Ib RNR transcription from 25 to 50 times and class III RNR from 6 to 10 times in strain MG1655 depending on the growth phase [11]. We decided to measure transcription of *nrdE* in *E. coli* E2348/69 strain and verify the results in the MG1655 strain by RT-PCR in cells grown at OD<sub>550</sub> = 0.2 and 0.8. The expression level of the *nrdE* (class Ib) gene resulted to be 15.24 and 23.84 fold higher (means of three different experiments) in the E2348/69 $\Delta nrdR$  mutant compared to the wild-type E2348/69 cells. To test whether the increased biofilm formation in an *nrdR* mutant was due either to class Ib or III RNR, we independently overexpressed the entire class Ib operon (*nrdHIEF*) and class III operon (*nrdDG*) in wild-type strains MG1655 and E2348/69 by using plasmids pIb and pIII (see Table1). We found a 56% and 63% higher level of biofilm formation compared to that produced with the  $\Delta nrdR$  mutant when class Ib RNR was overproduced and 23% and 76% when is overproduced class III RNR. Again, these results corroborate the importance of both RNR classes (Ib and III) during biofilm formation.

## Differential expression of *E. coli* RNR genes during biofilm formation

Previously published data (NCBI GEO dataset; GDS2768, GDS2753, GSE18362, GSE13418) have rendered contradictory results with respect to the differential expression of the *nrd* genes in *E. coli* biofilms vs. planktonic cells: some of the *nrd* genes have been found to be up-regulated in some studies and down-regulated in others. Due to these contradictory observations we decided to carry out gene expression analysis of each *nrd* promoter during the course of the biofilm formation. We used *E. coli* MG1655 and E2348/69 cells transformed with plasmids carrying the transcriptional fusion of each *nrd* promoter to the *green fluorescent protein* (pETS150, pETS151 and pETS152) and the control plasmid pETS130 as described in the material and methods section. Fig.4 shows induction of expression of different *nrd* genes indicated as a fold-change compared to the 10 h biofilm formation. In this experiments we clearly see the *in vivo* RNR class expression shift during the course of biofilm formation. We observed that *E. coli* MG1655 (Fig.4A) and E2348/69 (Fig.4B) exhibited the lowest



**Figure 2. Biofilm formation in glass surface also shows that double  $\Delta nrdE\Delta nrdD$  mutants are defective in biofilm formation.** Biofilm formation was compared in wild-type *E. coli* MG1655 and E2348/69 strains to their isogenic double  $\Delta nrdE$  and  $\Delta nrdD$  mutants. Complementation experiment and controls are also shown. doi:10.1371/journal.pone.0046350.g002

expression of *PwdAB* along the biofilm formation. However, the *PwdHIEF* operon exhibited the highest increase of expression in the first hours of the biofilm formation. In a mature biofilm ( $\approx 55$  h) both the *PwdHIEF* and *PwdDG* construction are significantly induced (1.6 and 1.8 fold induction in the *E. coli* MG1655 and E2348/69 respectively) and (1.4 and 1.8 fold induction in the *E. coli* MG1655 and E2348/69 respectively). In contrast the expression of the *PwdAB* promoter remained the same along the time, thus demonstrating the scarce importance of this operon during the biofilm formation. Control plasmid did not show any expression variation along the experiment.

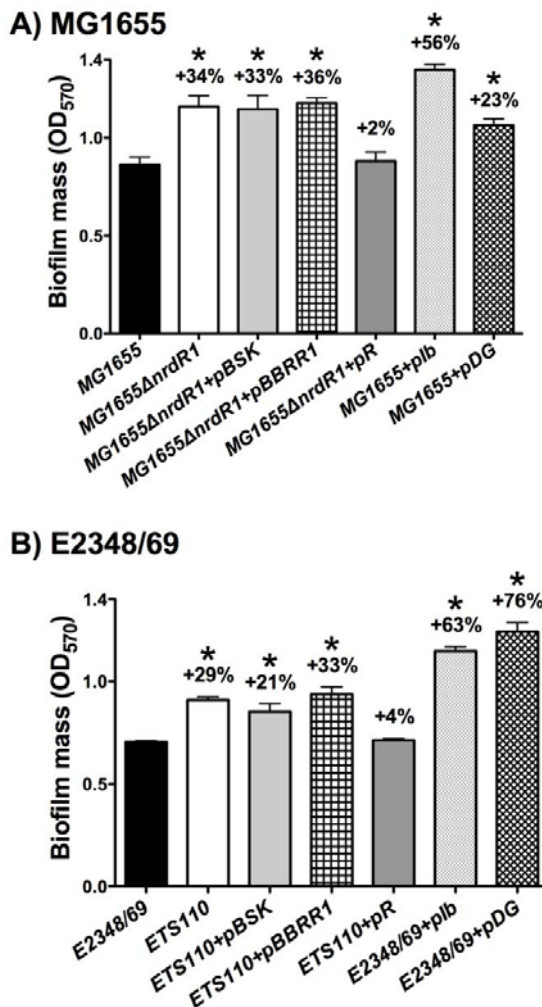
To corroborate these data we measured expression of *nrdA*, *nrdD* and *nrdE* by real-time PCR with probes from *nrdA*, *nrdD* and *nrdE* [11] in RNA samples extracted from biofilms and from planktonic MG1655 *E. coli* cells grown for 10 h and 55 h. Figure5 shows the differential expression pattern for each of the *nrd* genes. Biofilm formation led to *nrdA* (class Ia) gene repression along the biofilm formation (1.55 fold repression in cells collected at 55 h). In contrast, when compared to the level in planktonic cells, expression of *nrdE* (class Ib) and *nrdD* (class III) was higher in biofilm forming cells (from 1.5- to 9-fold). The highest expression level takes place in the *nrdE* gene at any time interval. It is important to note that the expression level of the *nrdD* gene is moderate (only 1.5 fold higher) at the beginning of biofilm formation (10 h) but increases considerably (to 3.2 fold) in a mature biofilm (55 h) in which there are areas where conditions are microaerophilic. To confirm microaerophilic conditions, expression of the *narX* gene, which is controlled by *fir* a key transcription regulator in cells growing in anaerobic conditions and is up regulated under microaerophilic/anaerobic environments, was tested. *narX* expression was up regulated during biofilm growth, consistent with the development of microaerophilic conditions in the inner layers of *E. coli* biofilms (4.34 and 2 fold induction in 10 h and 55 h cultures).

## Expression of class Ib genes depends on the Fur and RpoS proteins

Several studies have described an increased expression of various genes affected by oxidative stress or nutrient starvation

Article: “Biofilm modifies expression of Ribonucleotide Reductase genes in *Escherichia coli*”

Ribonucleotide Reductases in Biofilm Formation



**Figure 3. The *E. coli*  $\Delta nrdR$  mutant enhances biofilm formation through the class Ib and III RNR classes.** Biofilms of the wild-type *E. coli* strains MG1655 in panel A and E2348/69 in panel B are compared to their isogenic  $\Delta nrdR$  mutant. The values shown are the means of at least 7–8 independent experiments with six wells in each and the error bars represent standard deviations. Differences with respect to the wild-type strain were statistically significant for all the pairs of strains (\*,  $P < 0.05$  by the Mann-Whitney test). Plots and statistics were generated using GraphPad Prism 5.0 software. doi:10.1371/journal.pone.0046350.g003

during biofilm formation [18]. Previous studies have suggested that the expression of class Ib RNR is up-regulated under nutrient starvation and oxidative stress [19]. Nevertheless the molecular mechanisms triggering their expression remain to be elucidated. Considering that our results showed that class Ib RNR was required and highly expressed during biofilm formation and especially during the initial steps, we decided to explore the factor(s) inducing the expression of this particular RNR class. RpoS has been shown to be upregulated in biofilms [20]. Furthermore, it has been evidenced in different global transcrip-

omic analysis that expression of class Ib RNRs is RpoS dependent [21,22]. We decided to further correlate RpoS with class Ib RNR expression during biofilm formation. We performed RT-PCR analysis of *nrdE* expression on *E. coli* MG1655 and E2348/69 wild-type cells and their corresponding isogenic *rpoS* mutant strain ETS112 and ETS113 at different points on the exponential growth curve ( $OD_{550} = 0.3$  and  $0.8$ ). Expression levels of the *nrdE* (class Ib) gene were found to be 2.61 and 9.44 fold higher (means of three different experiments) in the wild-type MG1655 cells than in the *rpoS* mutant derivative and 3.56 and 10.11 in the wild-type E2348/69 cells than in its *rpoS* mutant derivative (data not shown). To further confirm these results we used western-blot analysis to measure the NrdF expression (class Ib) in cells grown exponential and stationary growth phases in *E. coli* MG1655 and E2348/69 wild-type and *rpoS* mutants. In Fig6A is shown the dependence of class Ib on the presence of the RpoS protein. Both *E. coli* strains showed a reduced class Ib RNR expression in the  $\Delta rpoS$  mutant compared to the wild-type strain at exponential and stationary growth phases, thus demonstrating the potential role of RpoS as an activator of the class Ib RNR and especially in biofilm formation where *rpoS* gene is highly induced [1,20]. The precise mechanisms by which induces RpoS induces class Ib transcription needs to be further analysed.

It has been recently shown that oxidative stress induces the expression of class Ib genes (*nrdHIEF*) by inactivating of the ferric uptake regulator protein (FUR) [15]. This has also been extensively studied in other stress environments [23,24]. A fur box was previously described in class Ib RNR promoter region [25]. This effect of class Ib activation through FUR inactivation is further supports the role class Ib RNR expression in biofilm formation where a high level of oxidative stress occurs [26]. This result was previously described for the *E. coli* MG1655 strain but we also tested if the pathogenic *E. coli* E2348/69 strain showed the same induction in the *nrdHIEF* expression as the commensal MG1655 strain [15,25] and response to the FUR transcriptional regulator. Bioinformatics analysis of the *E. coli* E2348/69 class Ib promoter region revealed an 8 mer FUR box (CGTAATCA) at the same position as previously described in the *E. coli* MG1655 [25]. In Fig6B we described the repressor behaviour of the FUR transcriptional regulator on the class Ib expression. Band quantification shows that the addition of an specific iron-chelator DIP (see Material and methods) into the medium created a condition of iron deficiency and led the expression of class Ib (1.6 and 1.7 times in *E. coli* MG1655 and E2348/69 respectively) as well as the one found in the *fur* mutant (1.7 and 2.5 times in *E. coli* MG1655 and E2348/69 respectively) demonstrating the dependence of the class Ib transcription on the FUR regulatory protein as was also previously demonstrated in strain MG1655 [25,27].

All together, it seems clear that class Ib RNR genes are highly induced during biofilm formation, as the cells cope with nutrient starvation (iron deficiency) and oxidative stress, and we can hypothesize that the molecular mechanism that triggers its expression is mediated directly through the Fur transcriptional factor and by the *rpoS* sigma factor which is highly induced under these metabolic conditions. Any direct participation of the RpoS protein or an indirect effect through another transcriptional factor remains to be investigated.

**Model for roles of ribonucleotide reductase classes in *Escherichia coli* biofilm formation**

In this paper, we evidence that the hitherto cryptic class Ib RNR is expressed when *E. coli* cells form biofilms (see Fig.1, 4 and 5). Class Ia is active during standard laboratory growth conditions and also in planktonic cells, and down-regulated when cells switch

**Article: “Biofilm modifies expression of Ribonucleotide Reductase genes in  
*Escherichia coli*”**

Ribonucleotide Reductases in Biofilm Formation

**Table 1.** Strains, plasmids and bacteriophages used in this study.

Strain or plasmids	Description	Source
<b>Plasmids</b>		
pGEM-T easy	A/T cloning vector (Amp <sup>R</sup> )	Promega
pBluescriptSK	High-copy number cloning vector (Amp <sup>R</sup> )	Stratagene
pBBR1MCS-5	High-copy number cloning vector (Gm <sup>R</sup> )	[36]
pETS130-GFP	Promoterless GFP (Gm <sup>R</sup> )	[34]
pIb	<i>nrdHIEF</i> operon cloned into BamHI site of pBluescriptSK(+)	This work
pIII	<i>nrdDG</i> operon cloned into BamHI site of pBluescriptSK(+)	This work
pR	<i>nrdR</i> cloned into BamHI site of pBluescriptSK(+)	This work
pDG	<i>nrdDG</i> operon cloned into BamHI site pBBR1MCS-5	This work
pETS150	pETS130 derivative carrying <i>nrdA</i> promoter	This work
pETS151	pETS130 derivative carrying <i>nrdH</i> promoter	This work
pETS152	pETS130 derivative carrying <i>nrdD</i> promoter	This work
<b>Strains</b>		
DH5 $\alpha$	<i>recA1 endA1 hsdR17 supE44 thi-1 relA1 <math>\Delta</math>(lacZYA-argF)U169 deoR <math>\Phi</math>80dlacZM15</i>	Laboratory stock
JW2650	<i>E. coli</i> K-12 strain BW25113 $\Delta$ <i>nrdE::kan</i> (Kan <sup>R</sup> )	[30]
JW4197	<i>E. coli</i> K-12 strain BW25113 $\Delta$ <i>nrdD::kan</i> (Kan <sup>R</sup> )	[30]
JW5437	<i>E. coli</i> K-12 strain BW25113 $\Delta$ <i>rpoS::kan</i> (Kan <sup>R</sup> )	[30]
UA6068	<i>E. coli</i> MC1061 $\Delta$ <i>nrdD::Cm</i> (Cm <sup>R</sup> )	[14]
MG1655	<i>E. coli</i> MG1655 wild type	
MG1655. <i>AnrdR1</i>	<i>E. coli</i> MG1655 with a HpaI-Bsp119I <i>nrdR</i> deletion	[11]
ETS104	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta$ <i>nrdE::kan</i> (Kan <sup>R</sup> )	This work
ETS105	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta$ <i>nrdD::kan</i> (Kan <sup>R</sup> )	This work
ETS106	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta$ <i>nrdR::kan</i> (Kan <sup>R</sup> )	This work
ETS107	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta$ <i>nrdE::kan</i> (Kan <sup>R</sup> ) $\Delta$ <i>nrdD::Cm</i> (Cm <sup>R</sup> )	This work
ETS113	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta$ <i>rpoS::kan</i> (Kan <sup>R</sup> )	This work
E2348/69	<i>E. coli</i> 0127:H6 E2348/69 wild type enteropathogenic	[17]
ETS108	<i>E. coli</i> E2348/69 $\Delta$ <i>nrdE::kan</i> (Kan <sup>R</sup> )	This work
ETS109	<i>E. coli</i> E2348/69 $\Delta$ <i>nrdD::kan</i> (Kan <sup>R</sup> )	This work
ETS110	<i>E. coli</i> E2348/69 $\Delta$ <i>nrdR::kan</i> (Kan <sup>R</sup> )	This work
ETS111	<i>E. coli</i> E2348/69 $\Delta$ <i>nrdE::kan</i> (Kan <sup>R</sup> ) $\Delta$ <i>nrdD::Cm</i> (Cm <sup>R</sup> )	This work
ETS112	<i>E. coli</i> E2348/69 $\Delta$ <i>rpoS::kan</i> (Kan <sup>R</sup> )	This work
<b>Phages</b>		
P1vir Phage		Laboratory stock

doi:10.1371/journal.pone.0046350.t001

to a biofilm state (Fig.5). Our results evidence an induction of RNR classes Ib and III during biofilm conditions. Hence, a physiological role for class Ib RNR is shown in these conditions for the first time (Figs. 1,2,3,4,5). The need for simultaneous expression of RNR classes Ib and III has also been addressed. It is likely that during the early stages of attachment, planktonic cells express RNR class Ia (Fig.7). After attachment, *E. coli* strains and especially enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolates form microcolonies that develop into three-dimensional structures within which some regions are microaerophilic [6,18]. Under these circumstances, with conditions of nutrient starvation and oxidative stress [26] class Ib expression is triggered, probably directly by the inactivation of the FUR protein or indirectly by RpoS, and is enzymatically functional. In these conditions, parts of this structure can result in a nutrient and oxygen limitation creating parts of

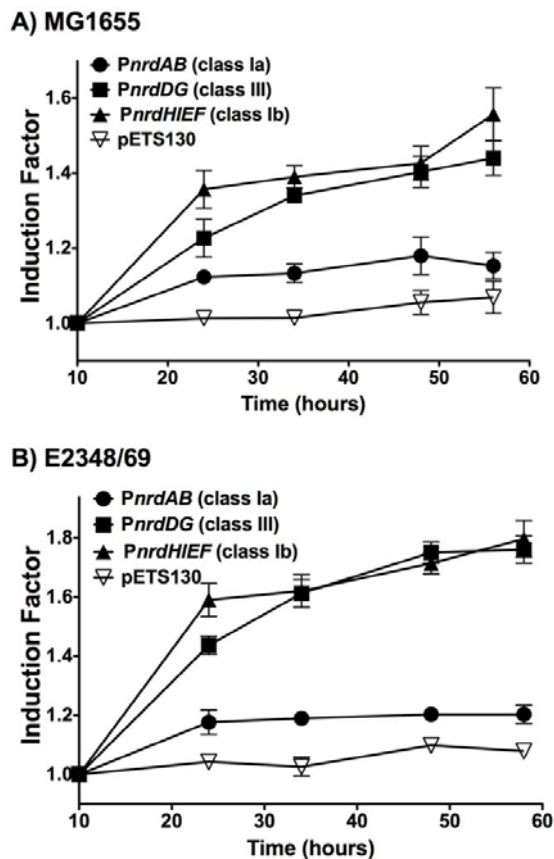
microaerophilic areas. Class III RNR is fully enzymatically active under microaerophilic conditions [14] and it is highly expressed anaerobically by the FNR protein, as already described [12,13]. Note that in *E. coli* E2348/69 strain, which forms more complex biofilms where more anaerobic environments can be created and in which expresses more *nrdD* protein (Fig.4) compared to the *E. coli* MG1655 strain which forms less structured biofilms. Other types of cells located at the inner parts of the biofilm might express class Ib RNR which can be active under these conditions [28] and favour its expression under oxidative stress and nutrient starvation as specified before.

For the first time, we have established a significant physiological role for class Ib and III RNR in *E. coli* and particularly in context of the formation of biofilms. Accordingly, class Ib and III RNR should be considered as a target for new anti-proliferative agents.



Article: “Biofilm modifies expression of Ribonucleotide Reductase genes in *Escherichia coli*”

Ribonucleotide Reductases in Biofilm Formation



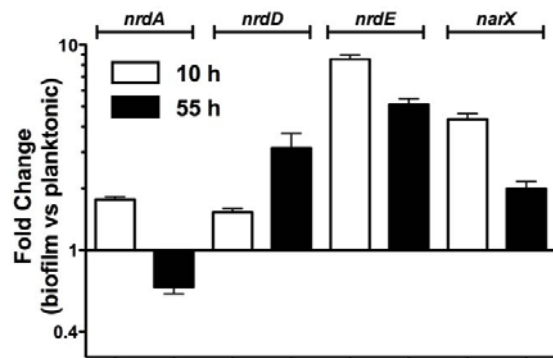
**Figure 4. Expression of *E. coli* RNR classes during biofilm formation.** Curves show fold changes expression of the different RNR promoter classes (*PnrdAB* – class Ia; *PnrdDG* – class III; *PnrdHIEF* – class Ib; pETS130 as a empty vector) from different times points during the biofilm formation of MG1655 (A) and E2348/69 (B) *E. coli* strains. All values are normalized respect the expression detected in biofilm after 10 h. The values shown are the means of three independent experiments with six wells in each and the error bars represent standard deviations. doi:10.1371/journal.pone.0046350.g004

Such agents might be useful in combined therapies to reduce and eliminate biofilms, making the chronic colonization/infection by certain pathogenic *E. coli* cells less virulent.

**Materials and Methods**

**Bacterial strains, plasmids and culture conditions**

All strains and plasmids used in this study are listed in Table1. *Escherichia coli* cells were grown in Luria-Bertani (LB) at 37°C. Antibiotics and chromogenic substrates were used at the following final concentrations: 50 µg ampicillin ml<sup>-1</sup>, 50 µg kanamycin ml<sup>-1</sup>, 30 µg chloramphenicol ml<sup>-1</sup>, 30 µg X-Gal ml<sup>-1</sup>. Bacterial growth was measured by reading OD<sub>550</sub>. In order to create iron-limiting conditions, the iron chelator 2,2'-dipyridyl (DIP) (SIGMA) was added at 150 µM to LB liquid cultures.



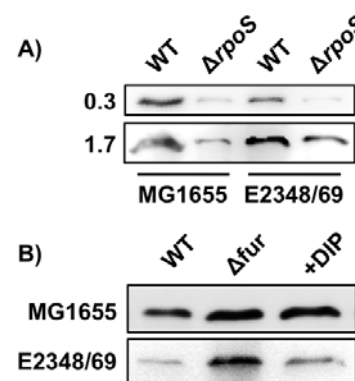
**Figure 5. Relative expression ratio of RNR genes in biofilm versus planktonic cells.** The expression level of the indicated genes was measured in cDNA samples derived from 10- and 55-h old *E. coli* MG1655 biofilms grown at 37°C in PVC plates. For each gene the relative expression was defined as the level in cells from biofilm compared to those from planktonic cells. The 16S rRNA sequence was used as an internal standard. Error bars represent the SD from n=3 independent replicates. doi:10.1371/journal.pone.0046350.g005

**Strain and plasmid construction**

Plasmid DNAs were isolated using the QIAprep miniprep kit (Qiagen). PCRs were carried out using High-Fidelity PCR enzyme mix (Fermentas) according to the manufacturer’s instruction. Other molecular biology techniques were carried out by standard procedures [29].

Different *nrd* mutant strains were constructed by introducing certain mutations (Table1) from the Keio collection *E. coli* strains [30] to the MG1655 and E2348/69 strains by P1 transduction [31] followed by selection of an appropriate drug resistance marker. All mutations were tested by PCR using a combination of gene-specific and transposon specific primers (Table2).

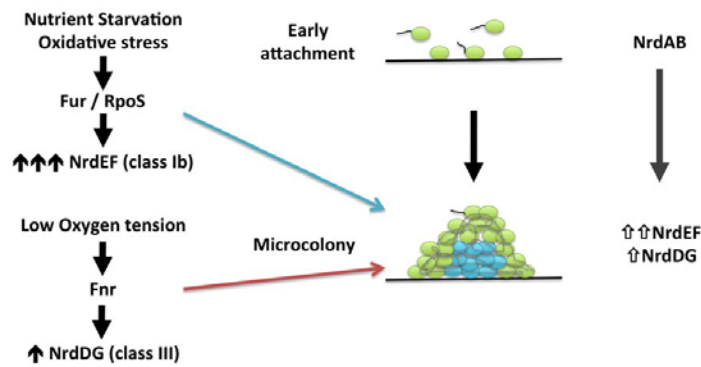
To construct plasmids pETS154, pETS155, pETS156 and pETS157 the *nrdHIEF* (class Ib), *nrdDG* (class III) and *nrdR* operons



**Figure 6. Class Ib RNR expression depend on the Fur and RpoS proteins.** Western-blot analysis of the NrdF protein (class Ib RNR) in *E. coli* MG1655 and E2348/69 wild-type cells in A) *rpoS* mutant at stationary and exponential growth and B) *fur* mutant. doi:10.1371/journal.pone.0046350.g006

*Article: “Biofilm modifies expression of Ribonucleotide Reductase genes in Escherichia coli”*

Ribonucleotide Reductases in Biofilm Formation



**Figure 7. Proposed model for expression of ribonucleotide reductases in *E. coli* biofilm formation.**  
doi:10.1371/journal.pone.0046350.g007

were cloned into plasmids pBluescriptSK(+) and pBBR1MCS-5 under the control of their respective native promoters (Table 1 and 2).

Comparison of the growth curves of the wild type, mutants and complemented strains did not show any significant differences (data not shown).

**Biofilm formation**

Biofilm formation was tested on polyvinyl chloride (PVC) 96-well plates using crystal violet staining as previously described [32]. Briefly, strains from an overnight culture were inoculated at an OD<sub>550</sub> of 0.01 in LB with 0.2% glucose into wells of PVC microtiter plates (COSTAR) and incubated at 37°C, without agitation, for 48 h. The attached cells were stained with 0.1%

**Table 2. Primers and probes used in this study.**

Name	Sequence (5'→3')	Application
EcoliDG-BHI-up	AAGGATCCGCCGTGAATGGAAG	Cloning
EcoliDG-BHI-lw	AAGGATCCTCGACATTCTGGTCGGTCAG	Cloning
Ecoli nrdR up	AAGGATCCAGTCTTGCCGGTGTTCG	Cloning
Ecoli nrdR lw	AAGGATCCGCAACGCGTACTTCGGC	Cloning
Operon-1b-up (BHI)	AAAGGATCCGCATGGTCTACTCGCGTCC	Cloning
Operon-1b-lw (BHI)	AAAGGATCCATTATTTCCCTGCTGCGGGTAGTG	Cloning
pBBR1-up	CATCGCAGTCGGCCTATTGG	Check-Cloning
pBBR1-lw	CACTTTATGCTTCCGGCTCG	Check-Cloning
M13 dir	GTTTCCAGTCACGAC	Check-Cloning
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC	Check-Cloning
k1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	Check-Cloning
kt	CGGCCACAGTCGATGAATCC	Check-Cloning
k2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	Check-Cloning
EcA-lw	TCAGATCTTACATGCGCCGC	Reverse transcription
EcD-lw	GGCTTCATCGCCTTTTGCTTCC	Reverse transcription
EcR-lw	GCGCGATCTCTCGCCAAATTC	Reverse transcription
EcE-lw	AAAGTGACAGGAGACGCAG	Reverse transcription
EcGAP-lw	GATGATGTTCTGGGAAGCGC	Reverse transcription
PnrdA BamHI up	AAAGGATCCATCATTTTCTATAAGACGG	Promoter-probe cloning
PnrdA Clal lw	AAAATCGATCACCAGCAGATTCTGATTCTAG	Promoter-probe cloning
PnrdD BamHI up	AAAGGATCCTTGAGGCTGTCTGGTGTAC	Promoter-probe cloning
PnrdD Clal lw	AAAATCGATGCACTTTCAGCCGTCTCG	Promoter-probe cloning
PnrdH BamHI up	AAAGGATCCAAAATGATAATAAATACCGC	Promoter-probe cloning
PnrdH Clal lw	AAAATCGATGTAATAGTAATGCGCATG	Promoter-probe cloning

doi:10.1371/journal.pone.0046350.t002

# Article: “Biofilm modifies expression of Ribonucleotide Reductase genes in *Escherichia coli*”

Ribonucleotide Reductases in Biofilm Formation

crystal violet and biofilm formation was quantified by dissolving the CV in ethanol and measuring the absorbance at 570 nm ( $A_{570}$ ).

To study biofilm development on glass surface, we followed basically the method described previously by O’Toole [33]. 3 mL aliquot of diluted culture was added to a borosilicate glass tube containing a sterile 18×18 mm glass cover slip (Menzel-Gläser) and incubated at 37°C for 48 h. Excess of broth was removed and washed three times in PBS and attached cells were fixed in methanol and stained with 0.1% crystal violet. Biofilm was quantified by dissolving the attached cells in ethanol and absorbance was measured as described above.

## RNA preparation and quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from *E. coli* cells using the RNeasy Mini kit (Qiagen) according the manufacturer’s instruction. RNA quantity was measured using a NanoDrop spectrophotometer (ND-1000, NanoDrop). RNA samples were treated for DNA digestion with DNase I (Turbo DNA-free, Ambion) and 1 µg was reverse-transcribed with the SuperScript<sup>®</sup> III Reverse transcriptase kit (Invitrogen). Real-time PCR measurements were carried out using TaqMan primers and probes, and detection was performed using and ABI Prism 7700 Sequence Detection System from Applied Biosystems as described previously [11]. The 16S rRNA sequence was used as an internal standard.

## Construction of GFP fusions

Transcriptional fusions in *E. coli* were constructed by PCR amplification of the promoter region of the *nrdA* (706 bp), *nrdH* (268 bp) and *nrdD* (462 bp) and cloning of these regions upstream of the promoterless *gfp* gene in pETS130-GFP [34]. Primers used for these cloning are described in Table 2. Sequencing and PCR

analysis confirmed the orientation and correctness of the inserts. GFP fluorescence was measured on an FLx800 Fluorescence microplate reader (BioTek). All assays were averages of at least three independent trials.

## Detection of NrdE by Western blot analysis

SDS-page and immunoblotting were performed as described previously [34]. Briefly, protein crude extracts were extracted with the BugBuster<sup>®</sup> extraction reagent (Novagen) from *E. coli* culture samples. 5 µg of protein from each condition were resolved on a 7.5% polyacrylamide gel and transferred to PVDF membranes (Immun-Blot<sup>™</sup> PVDF membranes, Bio-Rad). The immunodetection of proteins was performed using rabbit polyclonal antibodies against NrdF protein [35] at dilution 1/1000 (Agrisera, Sweden). The detection of primary antibodies was performed using donkey anti-rabbit (Bio-Rad) horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibodies at 1/50000 dilution, and visualized using the Amersham<sup>™</sup> ECL<sup>™</sup> Prime western blotting reagent (GE Healthcare) according the manufacturer’s protocol. The membrane was visualized and analyzed with an ImageQuant<sup>™</sup> LAS4000 mini (GE Healthcare). The polyclonal antibodies cross-reacted with few proteins which was used as internal control for equal protein loading.

## Acknowledgments

We are grateful to Maria del Carmen Jaramillo for her technical assistance.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MC AJ ET. Performed the experiments: MC ET. Analyzed the data: MC AJ ET. Contributed reagents/materials/analysis tools: MC AJ ET. Wrote the paper: ET.

## References

- Schembri MA, Kjaergaard K, Klemm P (2003) Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* 48: 253–267.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318–1322.
- Domka J, Lee J, Bansal T, Wood TK (2007) Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Environ Microbiol* 9: 332–346.
- Ren D, Bedzyk LA, Thomas SM, Ye RW, Wood TK (2004) Gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol* 64: 515–524.
- Beloin C, Valle J, Latour-Lambert P, Faure P, Kzreminski M, et al. (2004) Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol Microbiol* 51: 659–674.
- Moreira CG, Palmer K, Whiteley M, Sircili MP, Trabulsi LR, et al. (2006) Bundle-forming pili and EspA are involved in biofilm formation by enteropathogenic *Escherichia coli*. *JBacteriol* 188: 3952–3961.
- Torrents E, Sahlin M, Sjöberg B-M (2008) The Ribonucleotide Reductase Family- Genetics and Genomics. In: *Ribonucleotide Reductases* (ed KK Andersson) Nova Science Publishers: pp. 17–77.
- Lundin D, Torrents E, Poole AM, Sjöberg B-M (2009) RNRdb, a curated database of the universal enzyme family ribonucleotide reductase, reveals a high level of misannotation in sequences deposited to Genbank. *BMC Genomics* 10: 589.
- Cotruvo JA, Stubbe J (2011) *Escherichia coli* class Ib ribonucleotide reductase contains a dimanganese(III)-tyrosyl radical cofactor in vivo. *Biochemistry* 50: 1672–1681.
- Boal AK, Cotruvo JA Jr, Stubbe J, Rosenzweig AC (2010) Structural basis for activation of class Ib ribonucleotide reductase. *Science* 329: 1526–1530.
- Torrents E, Grinberg I, Gorovitz-Harris B, Lundstrom H, Borovok I, et al. (2007) NrdR controls differential expression of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase genes. *JBacteriol* 189: 5012–5021.
- Boston T, Atlung T (2003) FNR-mediated oxygen-responsive regulation of the nrdDG operon of *Escherichia coli*. *JBacteriol* 185: 5310–5313.
- Roca I, Ballana E, Panosa A, Torrents E, Gibert I (2008) Fumarate and nitrate reduction (FNR) dependent activation of the *Escherichia coli* anaerobic ribonucleotide reductase *nrdDG* promoter. *Int Microbiol* 11: 49–56.
- Garriga X, Eliasson R, Torrents E, Jordan A, Barbe J, et al. (1996) *nrdD* and *nrdG* genes are essential for strict anaerobic growth of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 229: 189–192.
- Martin JE, Imlay JA (2011) The alternative aerobic ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*, NrdEF, is a manganese-dependent enzyme that enables cell replication during periods of iron starvation. *Mol Microbiol* 80: 319–334.
- Blattner FR, Plunkett G 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, et al. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453–1462.
- Iguchi A, Thomson NR, Ogura Y, Saunders D, Ooka T, et al. (2009) Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. *JBacteriol* 191: 347–354.
- Stewart PS, Franklin MJ (2008) Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 6: 199–210.
- Monje-Casas F, Jurado J, Prieto-Alamo MJ, Holmgren A, Pueyo C (2001) Expression analysis of the *nrdHEF* operon from *Escherichia coli*. Conditions that trigger the transcript level in vivo. *JBiol Chem* 276: 18031–18037.
- Ito A, May T, Taniuchi A, Kawata K, Okabe S (2009) Localized expression profiles of rpoS in *Escherichia coli* biofilms. *Biotechnol Bioeng* 103: 975–983.
- Dong T, Kirchhof MG, Schellhorn HE (2008) RpoS regulation of gene expression during exponential growth of *Escherichia coli* K12. *Mol Genet Genomics* 279: 267–277.
- Weber H, Polen T, Heuveling J, Wendisch VF, Hengge R (2005) Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *JBacteriol* 187: 1591–1603.
- Varghese S, Wu A, Park S, Imlay KR, Imlay JA (2007) Submicromolar hydrogen peroxide disrupts the ability of Fur protein to control free-iron levels in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 64: 822–830.
- Horinouchi T, Tamaoka K, Furusawa C, Ono N, Suzuki S, et al. (2010) Transcriptome analysis of parallel-evolved *Escherichia coli* strains under ethanol stress. *BMC Genomics* 11: 579.
- Vassinova N, Kozyrev D (2000) A method for direct cloning of fur-regulated genes: identification of seven new fur-regulated loci in *Escherichia coli*. *Microbiology* 146 Pt 12: 3171–3182.
- Boles BR, Singh PK (2008) Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 12503–12508.
- McHugh JP, Rodriguez-Quinones F, Abdul-Tehrani H, Svistunenko DA, Poole RK, et al. (2003) Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis. *JBiol Chem* 278: 29478–29486.

# Article: “Biofilm modifies expression of Ribonucleotide Reductase genes in *Escherichia coli*”

## Ribonucleotide Reductases in Biofilm Formation

28. Torrents E, Jordan A, Karlsson M, Gibert I (2000) Occurrence of multiple ribonucleotide reductase classes in gamma-proteobacteria species. *Curr Microbiol* 41: 346–351.
29. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
30. Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, et al. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2: 2006 0008.
31. Silhavy TJ, Berman ML, Enquist LW (1984) *Experiments with gene fusions*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
32. Weiss-Muszkat M, Shakh D, Zhou Y, Pinto R, Belausov E, et al. (2010) Biofilm formation by and multicellular behavior of *Escherichia coli* O55:H7, an atypical enteropathogenic strain. *Appl Environ Microbiol* 76: 1545–1554.
33. O'Toole GA, Pratt LA, Watnick PI, Newman DK, Weaver VB, et al. (1999) Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol* 310: 91–109.
34. Sjöberg BM, Torrents E (2011) Shift in Ribonucleotide Reductase Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa* during Infection. *Infect Immun* 79: 2663–2669.
35. Torrents E, Sjöberg BM (2010) Antibacterial activity of radical scavengers against class Ib ribonucleotide reductase from *Bacillus anthracis*. *Biol Chem* 391: 229–234.
36. Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, et al. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166: 175–176.

***Resultats-discussió: “H-NS as a novel transcriptional modulator for the ribonucleotide reductase genes in Escherichia coli”***

**6.2 Efecte regulador del factor transcripcional H-NS sobre els gens que codifiquen per les tres classes de RNR d’*E. coli*. Manuscrit: *H-NS as a novel transcriptional modulator for the ribonucleotide reductase genes in Escherichia coli***

Els gens que codifiquen per les RNR, igual com tots els gens, es troben regulats per factors transcripcionals. Els factors transcripcionals responen a canvis ambientals o cel·lulars i activen o reprimeixen l’expressió gènica dels gens del seu reguló. Aquesta regulació pot venir donada per unió directa del factor transcripcional amb la regió promotora del gen o, indirectament, tot modulant altres factors que participen en la regulació del gen en qüestió.

H-NS, com ja s’ha detallat en l’apartat d’introducció, està àmpliament descrit com a regulador global de l’expressió gènica el qual respon a canvis ambientals. La topologia de l’ADN és part del mecanisme que posseeix H-NS per dur a terme el seu paper repressor. En base d’alguns articles que han assenyalat que la regulació de la RNR de classe Ia és dependent de la topologia de l’ADN (272), es va voler estudiar una possible relació del regulador H-NS en la modulació de les RNR d’*E. coli*.

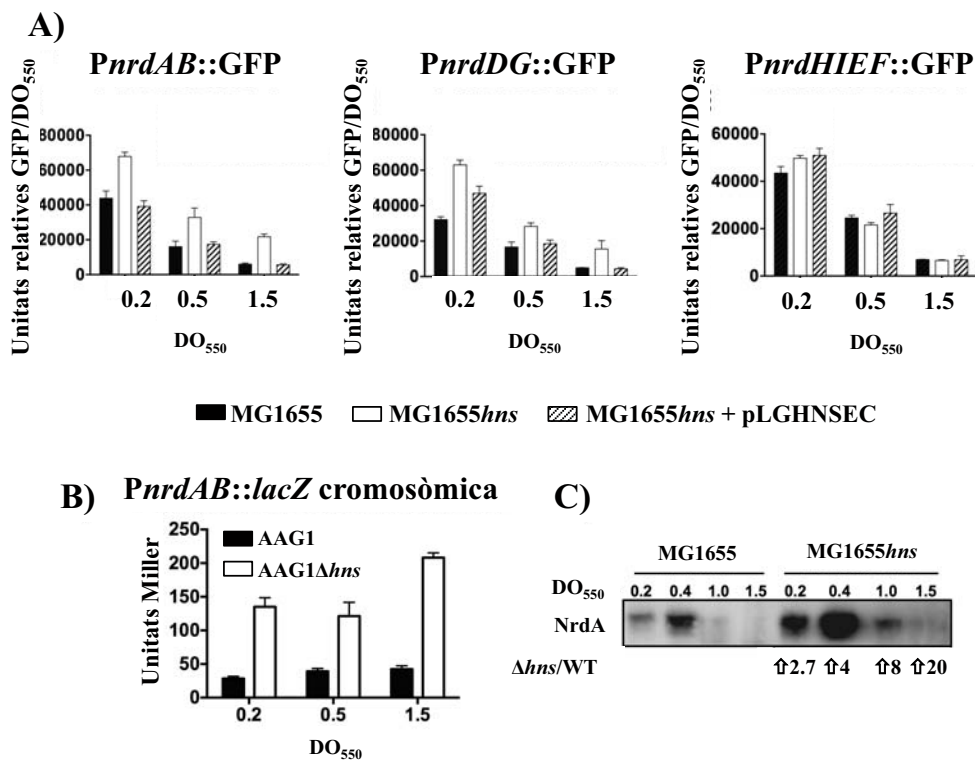
**6.2.1 H-NS reprimeix la transcripció de les RNR de classe Ia i III d’*E. coli***

(Veure Taula 4 en Material i Mètodes per qualsevol dubte amb la nomenclatura de les soques i/o plasmidis)

Per poder avaluar l’acció transcripcional d’H-NS sobre els gens *nrd* d’*E. coli* es van dur a terme estudis d’expressió, mitjançant el gen reporter *gfp*, dels tres promotors *nrd*: *PnrdA*, *PnrdH* i *PnrdD* a diferents punts del creixement bacterià en la soca MG1655 mutant per l’al·lel *hns*, MG1655*hns*, comparat amb la soca salvatge MG1655. L’estudi va resultar en un increment de l’expressió del gen reporter *gfp* que es trobava sota el control del promotor *PnrdA* i *PnrdD* sobretot quan la soca arribava a la fase estacionària del creixement bacterià i la qual, tornava a nivells similar a la soca salvatge quan la mutació és complementada amb el plasmidi pLGHNSEC, que porta clonat el gen *hns* (Figura 23A i Figura 1A del manuscrit). Ens varem centrar

**Resultats-discussió: “H-NS as a novel transcriptional modulator for the ribonucleotide reductase genes in *Escherichia coli*”**

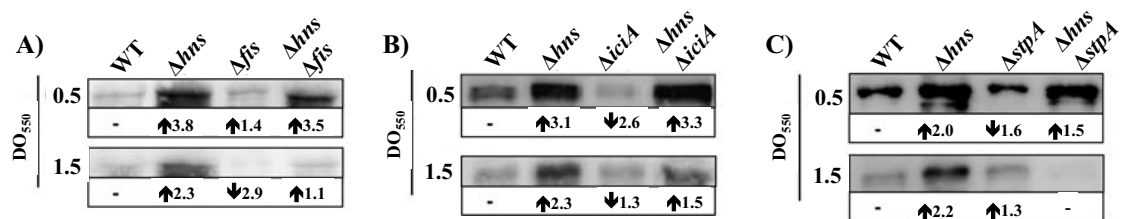
llavors en la RNR aeròbica de classe Ia i aquesta des-regulació es va acabar de comprovar fent estudis de  $\beta$ -galatosidassa mitjançant una fusió transcripcional del *PnrDA::lacZ* (pETS166) i també mitjançant Western Blot detectant proteïna la NrdA en una soca salvatge i mutant *hns* a diferents punts del creixement bacterià. Tots dos experiments van resultar en una inducció de la RNR de classe Ia en absència d’H-NS, sobretot en fase estacionària del creixement, a on la detecció de NrdA en la soca  $\Delta hns$  a  $DO_{550}$  va ser de 20 vegades superior a la soca salvatge. Aquesta clara inducció de l’expressió *nrdAB* en fase estacionària va fer pensar en un possible paper d’H-NS en la regulació de la RNR de classe Ia durant a la transició de fase exponencial a fase estacionària, a on s’ha comprovat que *nrdAB* disminueix molt la seva expressió i en canvi la RNR de classe III l’incrementa (135). Per contra, la RNR de classe Ib no va mostrar cap diferència en la seva expressió en absència d’H-NS (Figura 23B-23C i Figura 1B-1C del manuscrit).



**Figura 23. Efecte de la proteïna H-NS en l’expressió de les RNR d’*E. coli*.** A) expressió mitjançant reporter GFP de les diferents classes de RNR al llarg del creixement bacteri en la soca MG1655, MG1655*hns* i la complementació de la mutació *hns*. A la figura és assenyalada la desviació estàndard de tres experiments independents. B) Expressió de la RNR de classe Ia mitjançant de la fusió cromosòmica amb el gen reporter *lacZ* al llarg del creixement bacterià. La desviació estàndard de tres experiments independent és assenyalada. C) Detecció de NrdA en una soca mutant *hns*. El valors d’inducció respecte a la soca salvatge MG1655 són assenyalats.

**Resultats-discussió: “H-NS as a novel transcriptional modulator for the ribonucleotide reductase genes in *Escherichia coli*”**

En aquesta des-regulació en l'expressió del gens *nrdAB*, es va voler estudiar un possible efecte antagonitzador d'H-NS sobre la proteïna Fis (123), descrita com activador transcripcional de la classe Ia, o també de la proteïna IciA (132). A més a més, es va voler evaluar una possible acció de la proteïna paràloga d'H-NS, StpA, la qual, com s'ha comentat en la introducció, pot compensar el seu efecte repressor en absència d'H-NS (273). Per estudiar aquesta possible xarxa reguladora, es van realitzar diferents Western Blot per detectar els nivells de proteïna NrdA en una soca mutant *hns*, així com en una soca  $\Delta fis$  (ETS115),  $\Delta iciA$  (ETS123) i  $\Delta stpA$  (ETS117) i també en les soques dobles mutants  $\Delta hns\Delta fis$  (ETS116),  $\Delta hns\Delta iciA$  (ETS124) i  $\Delta hns\Delta stpA$  (ETS118) (Figura 24A-24C i Figura 2 i 3 del manuscrit). Els nivells de proteïna NrdA només es mostraven des-regulats en absència d'H-NS, així com en els dobles mutant els valors eren comparables als del mutant simple *hns* corroborant l'acció individual d'H-NS sobre l'expressió de la RNR de classe Ia.

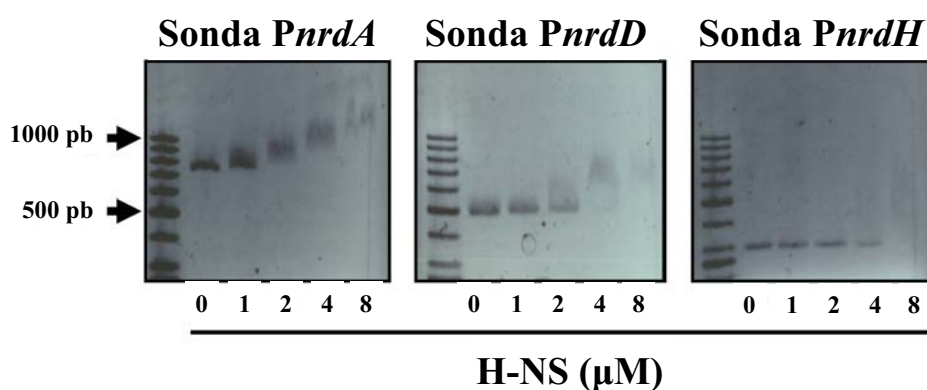


**Figura 24. La regulació de H-NS sobre els gens *nrdAB* no es troba influenciada per Fis, IciA i StpA.** Detecció de NrdA, mitjançant Western-blot, en fase exponencial i estacionària de la soca MG1655, MG1655*hns*, A)  $\Delta fis$ , B)  $\Delta iciA$  i C)  $\Delta stpA$ , juntament amb els dobles mutants corresponents. A la figura es mostren els valors d'inducció de proteïna NrdA detectada en cada mutant respecte de la soca salvatge. La millor imatge de tres experiments independents ha estat l'escollida per ser mostrada.

El pas següent va ser estudiar si l'efecte d'H-NS sobre l'expressió dels gens *nrd* era de manera directa o indirecta, per això es va estudiar la possible unió d'H-NS sobre les regions promotores dels gens *nrd*. Per portar-ho a terme, es van amplificar, mitjançant PCR, les regions promotores de les tres classes de RNR d'*E. coli* i es van fer gels de retard amb proteïna purificada H-NS. Del promotor de l'operó *nrdAB* es van amplificar 703 pb (des de la posició -575 pb a la +127 pb des del lloc d'inici de la transcripció), del promotor dels gens *nrdHIEF* es van amplificar 441 pb (des de la posició -419 pb a la +22 pb des del lloc d'inici de la transcripció) i del promotor de la RNR de classe III *PnrdDG* es van amplificar 261 pb (des de la posició -244 pb a la

**Resultats-discussió: “H-NS as a novel transcriptional modulator for the ribonucleotide reductase genes in *Escherichia coli*”**

+17 pb des del lloc d'inici de la transcripció) mitjançant la tècnica de PCR (oligonucleòtids detallats a la taula I de l'annex). Una vegada fets els retards es va veure com els promotors de les RNR de classe Ia i III presentaven un retard a concentracions creixents de proteïna H-NS mentre que el de la classe Ib no mostrava cap retard del complex H-NS-*PnrDHIEF* (Figura 25 i Figura 4 del manuscrit). Per tant, només les regions d'ADN corresponents a les regions promotores de la RNR de classe Ia i III formaven complex amb H-NS, corroborant també els resultats obtinguts en l'estudi d'expressió mitjançant el gen reporter *gfp* (veure Figura 23).



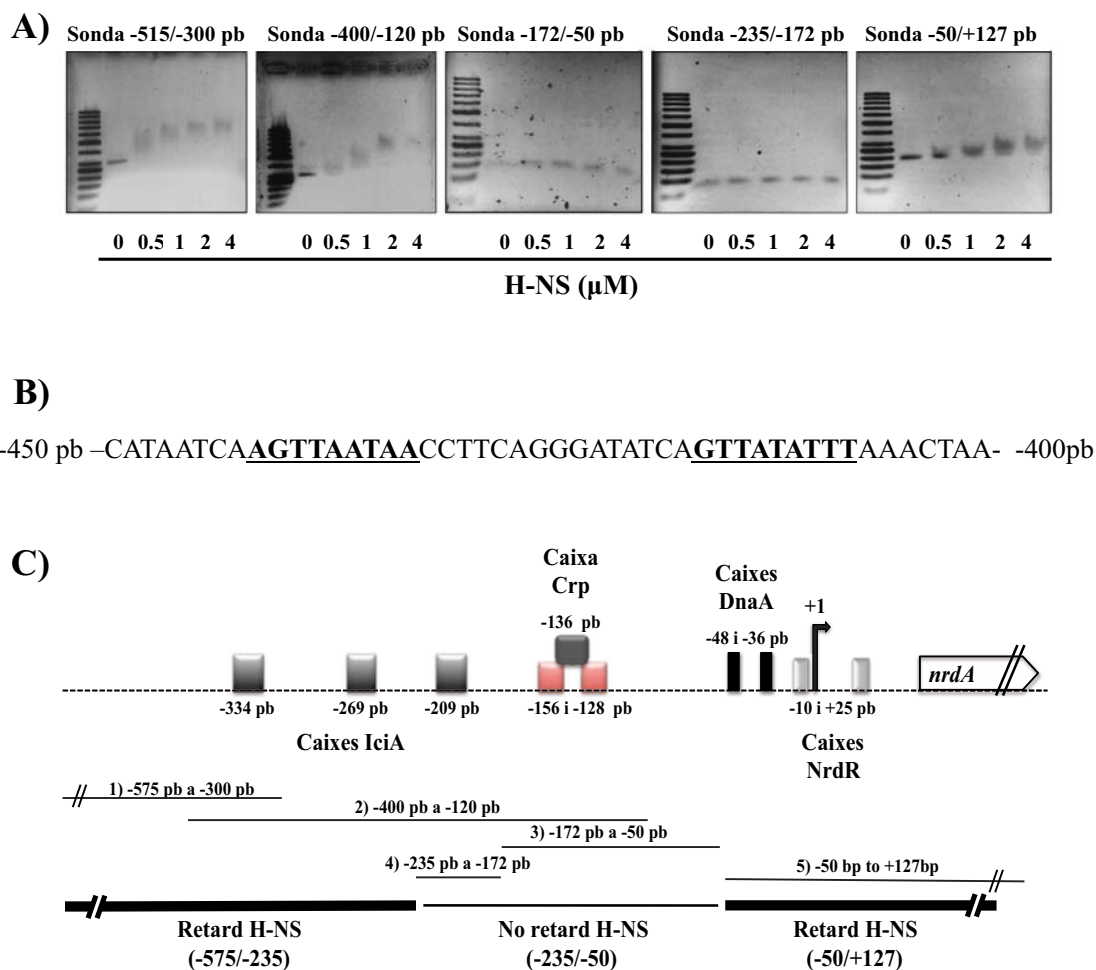
**Figura 25. H-NS s'uneix a les regions promotores de RNR de classe Ia i III.** 0, 1, 2, 4 i 8  $\mu\text{M}$  de proteïna purificada H-NS va ser utilitzada per fer assajos d'EMSA juntament amb les diferents regions promotores *nrd* (*PnrDAB*, *PnrDDG* i *PnrDHIEF*). La millor fotos de tres experiments independents va ser la escollida per ser mostrada. (Assajos d'EMSA fets amb col·laboració amb la Dra. Cristina Madrid).

Observada la interacció directe de la proteïna H-NS sobre els promotors *nrdAB* i *nrdDG*, ens vem centrar amb la RNR aeròbica de classe Ia i es va procedir a intentar delimitar la regió d'unió del factor transcripcional en la seva regió promotora. Es van construir diferents sondes, superposades, que ocupaven des de la posició -575 pb a la +127 pb des del lloc d'inici de transcripció de l'operó *nrdAB* i es va prosseguir fent gels de retard mitjançant proteïna purificada H-NS. Fets el gels de retard, es van obtenir dues zones diferenciades que presentaven retard del complex ADN-H-NS, aquestes dos regions es trobaven des de la posició -575 pb a la -235 pb i des de la posició -50 pb fins a la +127 pb, deixant al centre una regió de 185 pb que no forma complex nucleoproteic amb H-NS (Figura 26 i Figura 5 del manuscrit). Tal com s'ha anomenat en la introducció, fins al moment s'han descrit dos mecanismes de repressió d'H-NS, els quals ambdós requereixen la unió d'H-NS en dos llocs



**Resultats-discussió: “H-NS as a novel transcriptional modulator for the ribonucleotide reductase genes in *Escherichia coli*”**

separat (un més a 5' i un altre a més 3') de l'ADN (Figura 15 en l'apartat d'introducció) sent les dues regions que també s'han trobat en el promotor de la RNR de classe Ia. A més a més, mitjançant un estudi bioinformàtic es va veure que la regió més a 5' de la regió promotora dels gens *nrdAB* posseeix un 70% de A-T i coincideix amb les regions d'unió d'H-NS que es van trobar en l'estudi fet per Lang B *et al.*, al 2007 (167) (Figura 26B).

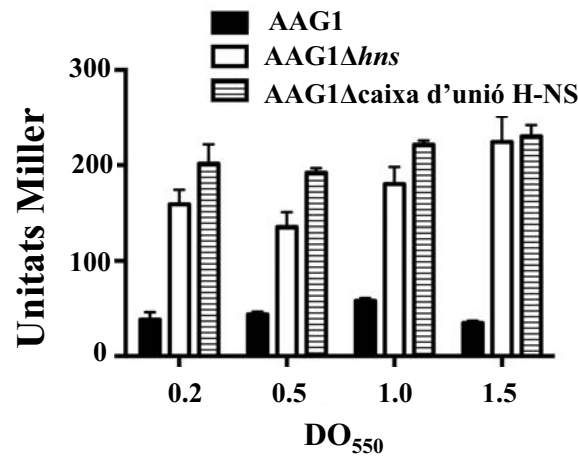


**Figura 26. H-NS s'uneix a dues regions del promotor *nrdAB* per dur a terme la repressió gènica.**

A) 0, 1, 2, 4 i 8 μM de proteïna purificada H-NS va ser utilitzada per fer assajos d'EMSA amb diferents fragments de la regió promotora de la RNR de classe Ia. (Assajos d'EMSA fets amb col·laboració amb la Dra. Cristina Madrid). B) 50 pb de la seqüència hipotètica d'unió a H-NS en la regió promotora del gen *nrdA*. En negreta i subratllat s'assenyala la seqüència idèntica a la ja descrita per Lang B *et al.* 2007 (167) C) Dibuix de la regió promotora de l'operó *nrdAB* a on s'assenyalen els tamany i posicions de les diferents sondes construïdes per fer els retards amb proteïna H-NS. En el dibuix es mostren la posició de les dues regions que presenten retard en presència d'H-NS.

**Resultats-discussió: “H-NS as a novel transcriptional modulator for the ribonucleotide reductase genes in *Escherichia coli*”**

La importància de les regions que es van trobar per la unió d’H-NS es va corroborar mitjançant estudis d’expressió mitjançant la fusió *PnrDAB::lacZ* però delectant 50 pb centrades en posició -425 pb des del lloc d’inici de transcripció (ETS121). Els nivells d’expressió *lacZ* que va donar aquesta fusió van ser els mateixos que es van trobar en la soca  $\Delta hns$  (Figura 27 i Figura 5D del manuscrit). Per tant, sense aquesta regió de la regió promotora de la RNR de classe Ia, H-NS no es pot unir fent que no pugui reprimir l’expressió de l’operó *nrdAB*.



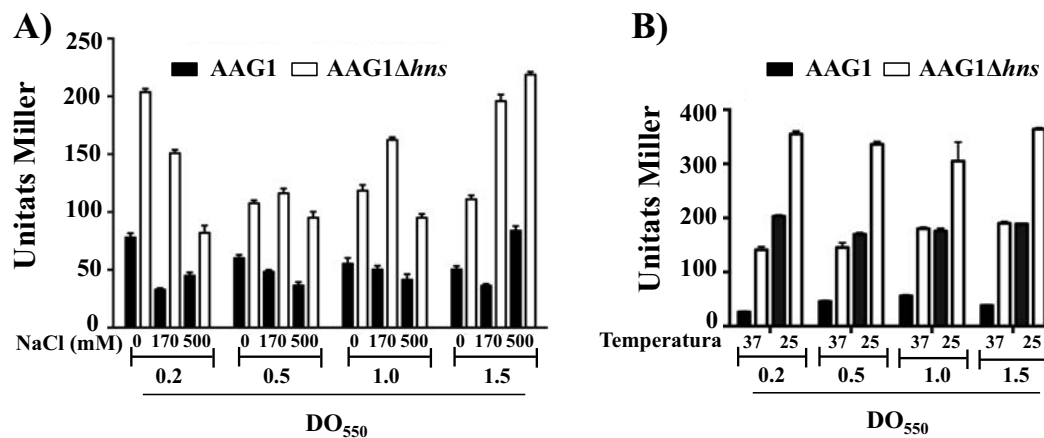
**Figura 27.** Efecte de la delectió de la hipotètica regió d’unió d’H-NS en l’expressió *nrdAB*. Expressió *PnrDAB::lacZ* cromosòmica en la soca AAG1, AAG1 $\Delta hns$  i AAG1 $\Delta$ caixa d’unió H-NS a diferents punts del creixement bacterià aeròbic. La desviació estàndard de tres experiments independents és assenyalada a la figura.

### 6.2.2 Efecte ambiental en la regulació d’H-NS sobre els gens *nrdAB*

Tenint en compte el paper descrit de regulació d’H-NS en resposta a canvis ambientals, es va voler estudiar si era en resposta d’alguna especificitat ambiental quan H-NS s’unia a *PnrDAB* reprimint-ne la transcripció. Contràriament al que s’esperava, els estudis d’expressió de la fusió *PnrDAB::lacZ* en la soca  $\Delta hns$  no van mostrar una des-regulació destacada quan es van variar les condicions d’osmolaritat del medi a 0 mM de NaCl (osmolaritat baixa), 127 mM de NaCl (osmolaritat normal del medi LB) i a 500 mM de NaCl (osmolaritat alta), ni quan l’assaig  $\beta$ -galactosidassa es va fer a partir de mostres crescudes a 25°C (baixa temperatura) a on la reducció de la taxa de creixement fa augmentar l’expressió de *nrdAB*. En tots els

**Resultats-discussió: “H-NS as a novel transcriptional modulator for the ribonucleotide reductase genes in *Escherichia coli*”**

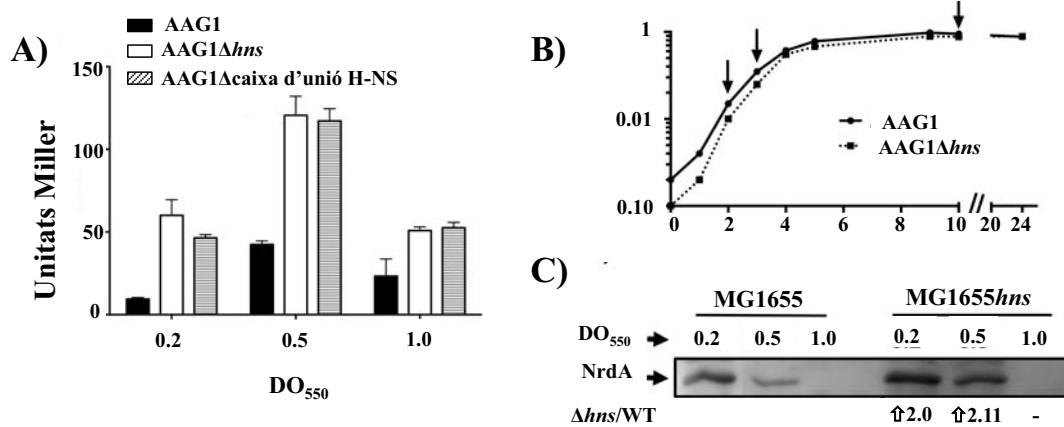
casos, els nivells d'inducció del *PnrdAB* en la soca  $\Delta hns$  mantenen el mateix patró referent a la soca salvatge que a condicions normals de creixement de 37°C de temperatura i osmolaritat normal de 127 mM de NaCl (Figura 28A-28B i Figura 6A i 6B del manuscrit). Respecte a la temperatura, cal destacar que el paper d'H-NS s'ha descrit en gens que disminueixen la seva expressió quan la temperatura baixa no sent el cas de l'operó *nrdAB*, igual com s'ha demostrat que l'osmolaritat no afecta a la transcripció de la RNR de classe Ia, es lògic no trobar cap inducció destacada en aquesta condició ambiental.



**Figura 28.** Efecte de la temperatura i la osmolaritat en la regulació d'H-NS sobre la RNR de classe Ia. de la hipotètica regió d'unió d'H-NS en l'expressió *nrdAB*. A) Expressió *PnrdAB::lacZ* cromosòmica en la soca AAG1 i AAG1Δhns a 0, 170 i 500 mM de NaCl. B) Expressió *PnrdAB::lacZ* cromosòmica en la soca AAG1 i AAG1Δhns a 37 i 25°C. Ambdós gràfiques mostren la desviació estàndard de tres experiments independents.

A més a més, sabent que la necessitat de l'oxigen és un tret que caracteritza les RNR es va voler estudiar la possible implicació d'H-NS en la repressió de la classe Ia en condicions anaeròbiques. Per elucidar-ho es van fer tant estudis d'expressió *PnrdAB::lacZ* en la soca salvatge com en la  $\Delta hns$  i caixa d'unió H-NS en les mateixes condicions anaeròbiques així com també es va realitzar Western Blot per detectar proteïna NrdA en limitació d'oxigen (Figura 29A i 29C i Figura 7A i 7C del manuscrit). El resultat, igual com en els casos anteriors, va donar des-regulació de l'expressió *nrdAB* en la soca mutant, així com sense la hipotètica caixa d'unió a H-NS, sobretot a DO<sub>550</sub> 0.5 a on el bacteri, en condicions d'anaerobiosi, ja està entrant en fase estacionària del creixement (Figura 29B i 7B del manuscrit).

**Resultats-discussió: “H-NS as a novel transcriptional modulator for the ribonucleotide reductase genes in *Escherichia coli*”**

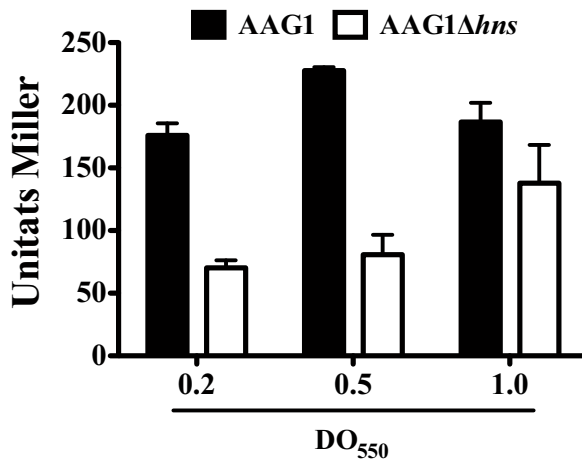


**Figura 29. H-NS reprimeix la RNR de classe Ia en condicions anaeròbiques.** A) Expressió anaeròbica de la fusió transcripcional *PnrDAB::lacZ* cromosòmica en la soca AAG1, AAG1Δ*hns* i AAG1Δcaixa d'unió H-NS a diferents punts del creixement bacterià. La desviació estàndard de tres experiments independents és assenyalada a la figura. B) Corba de creixement de la soca AAG1 i AAG1Δ*hns* en condicions anaeròbiques. En la figura es mostren els punts d'on s'ha tret mostra per fer els diferents assajos d'expressió així com per fer els Westerns-blot. C) Detecció de proteïna NrdA en la soca salvatge MG1655 i el seu mutant isogenic *hns* a diferents punts del creixement anaeròbic. Els valors d'inducció de NrdA en MG1655*hns* en relació a la soca salvatge MG1655 són mostrats a la figura. La millor imatge de tres experiments independents ha estat la escollida per ser mostrada.

Amb aquests resultats en anaerobiosi, i havent observat l'efecte d'H-NS sobre la RNR de classe III, es van voler fer estudis d'expressió d'aquesta classe en aquestes condicions. Estudis de β-galactosidassa utilitzant la fusió transcripcional cromosòmica del *PnrD<sub>DG</sub>*, provinent del pETS170, en la AAG1 i en la AAG1Δ*hns* van resultar en una disminució de l'expressió de *nrd<sub>DG</sub>* en la AAG1Δ*hns*. Aquest resultat que es va corroborar detectant la proteïna NrdD, mitjançant Western Blot, en mostres crescudes anaeròbicament a diferents etapes del creixement bacterià i a on la mutació del gen *hns* també va fer disminuir els nivells de proteïna NrdD (Figura 30A i 30B).

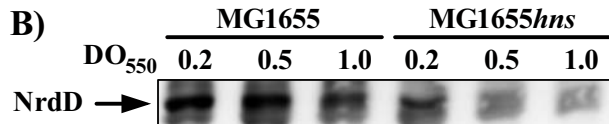
*Resultats-discussió: “H-NS as a novel transcriptional modulator for the ribonucleotide reductase genes in Escherichia coli”*

**A) *PnrD::lacZ* cromosòmica**



**Figura 30. Expressió anaeròbica de la RNR de classe III en una soca mutant per l'al·lel *hns*.**

**A)** Expressió *PnrD::lacZ* cromosòmica en condicions d'anaerobiosi en una soca Δ*hns* comparada amb la soca salvatge a diferents punts del creixement bacterià. El gràfic mostra la desviació estàndard de tres experiments independents. **B)** Western Blot detectant proteïna NrdD en condicions d'anaerobiosi en una soca Δ*hns* comparada amb la soca salvatge a diferents punts del creixement bacterià. Clàrament es mostra la poca detecció de NrdD en la soca mutant comparada amb la salvatge.



Aquest estudi suggereix un paper regulador d'H-NS de l'expressió de la RNR de classe Ia a la RNR de classe III durant la transició de fase exponencial a estacionària a on els nivells requerits de dNTP disminueixen dràsticament ja que la replicació bacteriana minva, així com de medi aeròbic a anaeròbic. Aquesta modulació vindria donada per les alteracions topològiques de l'ADN que causa l'absència d'oxigen (162, 274, 275) permetent la unió del factor transcripcional.

*Article “H-NS as a novel transcriptional modulator for the ribonucleotide reductase genes in Escherichia coli”*

**6.2.3 Article: “H-NS as a novel transcriptional modulator for the ribonucleotide reductase genes in *Escherichia coli*”** *Journal of Bacteriology* (2013) 195: *In press.*

## **H-NS is a novel transcriptional modulator of the ribonucleotide reductase genes in *Escherichia coli.***

**Maria del Mar Cendra<sup>1</sup>, Antonio Juárez<sup>1,2</sup>, Cristina Madrid<sup>2</sup>, Eduard Torrents<sup>1,#</sup>.**

<sup>1</sup>Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), Cellular Biotechnology. Baldiri Reixac 15-21, 08028, Barcelona, Spain. <sup>2</sup>Dept. de Microbiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, 08028, Barcelona, Spain.

Keywords: gene regulation, histone-like

Running title: H-NS regulation of *E. coli* ribonucleotide reductase.

<sup>#</sup>Correspondent footnote: Dr. Eduard Torrents. Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), Cellular Biotechnology. Baldiri Reixac 15-21, 08028, Barcelona, Spain. Telf: +344034756, FAX: +34934020183. Email: [etorrents@ibecbarcelona.eu](mailto:etorrents@ibecbarcelona.eu)

**Article “H-NS as a novel transcriptional modulator for the ribonucleotide reductase genes in *Escherichia coli*”**

**ABSTRACT**

Ribonucleotide reductases (RNRs) are essential enzymes for DNA synthesis because they are responsible for the production of the four deoxyribonucleotides (dNTPs) from their corresponding ribonucleotides. *Escherichia coli* contains two classes of aerobic RNRs, encoded by the *nrdAB* (class Ia) and *nrdHIEF* (class Ib) operons, and a third RNR class, which is functional under anaerobic conditions and is encoded by the *nrdDG* (class III) operon. Because cellular imbalances in the amounts of the four dNTPs cause an increase in the rate of mutagenesis, the activity and the expression of RNRs must be tightly regulated during bacterial chromosome replication. The transcriptional regulation of these genes requires several transcription factors (including DnaA, IciA, FIS, Fnr, Fur, and NrdR), depending on the RNR class; however, the factors that dictate the expression of some RNR genes in response to different environmental conditions are not known.

We show that H-NS modulates the expression of the *nrdAB* and *nrdDG* operons. H-NS represses expression. Repression occurs at the exponential phase of growth as well as at the transition from the exponential to the stationary phase, a period when no dNTPs are needed. H-NS also significantly repressed *nrdAB* under anaerobic conditions, thus demonstrating the relevance of this global modulator in the shift in *nrd* expression during the transition from an aerobic to an anaerobic environment. Electrophoretic mobility assays performed with two DNA fragments from the regulatory region of the *nrdAB* operon demonstrated the direct interaction of H-NS with these sequences.

**INTRODUCTION**

Ribonucleotide reductases (RNRs) are essential enzymes, both for prokaryotes and eukaryotes, that are responsible for the production of the four deoxyribonucleotides (dNTPs) from their corresponding ribonucleotides. Three classes of RNRs have been described to date, differing in the mechanism used for radical generation, structural differences and oxygen dependence (3). The class I RNRs consist of two homodimeric proteins: a large subunit ( $\alpha$ ) that contains the catalytic site and the binding site for allosteric effectors, and a smaller subunit ( $\beta$ ) harboring the metallo radical cofactor that stabilizes the free tyrosyl radical linked to a diiron-oxo center that initiates cysteine activation for enzymatic function. Class I enzymes function only under aerobic conditions and are found in all eukaryotes and some prokaryotes. Class I is further subdivided into classes Ia and Ib, which are encoded by the *nrdAB* and *nrdHIEF* genes, respectively. A third subclass, class Ic, was established because some RNRs, such as those from *Chlamydia trachomatis*, lack the tyrosyl radical. The class II enzymes require S-adenosylcobalamin (AdoCob) as a radical generator and do not depend on oxygen for activity, thereby functioning in aerobic or anaerobic environments. Class II RNRs consist predominantly of homodimers encoded by the *nrdJ* gene. This RNR class is found in prokaryotes, archaeobacteria and some lower eukaryotes. Lastly, the class III RNR reductases, encoded by the *nrdDG* operon, use S-adenosylmethionine (SAM) and an iron-sulfur cluster to generate a glycy radical that is extremely sensitive to oxygen. Therefore, enzymes belonging to this class are strictly anaerobic and are found only in prokaryotes able to grow under anaerobic conditions (3, 276).

## ***Article “H-NS as a novel transcriptional modulator for the ribonucleotide reductase genes in Escherichia coli”***

An unsolved paradigm is the reason why several RNR classes are encoded in the genome of a single organism. Whereas almost all eukaryotes encode only class Ia RNRs, prokaryotes contain genes encoding single copies of different RNR classes (Ia or Ib; II or III) or encoding combinations of different RNR classes (Ia+Ib, Ib+II or Ia+Ib+III). In some instances, all classes (Ia+II+III) are present simultaneously (277). The simultaneous presence of different RNR classes in some microorganisms raises the necessity for a fine-tuning of RNR activity. It is well known that the activity of RNRs is tightly regulated by the cell cycle and environmental triggers to generate and maintain proper dNTP pools that ensure the fidelity of DNA synthesis and repair (117, 127, 276).

*Escherichia coli* is a good example of a microorganism expressing several RNRs. Enzymes belonging to classes Ia, Ib and III are expressed from the *nrdAB*, *nrdDG* and *nrdHIEF* operons, respectively (116, 243, 278). In this bacterium, the expression of RNR genes can be positively or negatively regulated at the transcriptional level; *nrdAB* expression is repressed by the NrdR protein, whereas the DnaA, IciA and FIS transcriptional regulators induce the expression of this operon (for a review, see (117)). Other cis-acting sites and an AT-rich region located in the promoter region are important for coupling the transcription of the gene to the cell cycle (120, 279). Recently, we have discovered a new transcriptional factor (NrdR) that is a repressor of the three different *nrd* genes in aerobically growing *E. coli* cells (278).

The nucleoid-associated protein H-NS is a global transcriptional repressor that controls the expression of several environmentally regulated genes. This protein is widespread in Gram-

negative bacteria (275, 280) and has been best characterized in *Escherichia coli* and related genera. H-NS plays a dual role, both as an architectural protein that contributes to nucleoid structure and as a global modulator of gene expression (see (162, 281) for reviews). The *E. coli hns* gene encodes a 137-amino acid protein with a molecular mass of 15.4 kDa. H-NS consists of an N-terminal dimerization domain and a C-terminal DNA-binding domain that are separated by a linker domain. H-NS is a highly abundant protein that binds to DNA in a non-sequence-specific manner but has a preference for intrinsically curved AT-rich regions. The H-NS protein is capable of interacting with itself and other proteins in addition to DNA. Indeed, the generation of homodimers and -oligomers appears to be a key process that allows H-NS to modulate gene expression (162, 282, 283). The mechanism of transcriptional repression by H-NS involves binding to high-affinity DNA sequences to initiate the oligomerization of H-NS along the DNA, resulting in a higher-order nucleoprotein complex. This nucleoprotein structure leads to the repression of transcription either by occluding the binding of RNA polymerase or by trapping RNA polymerase (165, 176).

In this study, we provide evidence indicating that H-NS modulates the expression of the *E. coli* class Ia (*nrdAB*) and class III (*nrdDG*) RNRs in the transition from the exponential to the stationary growth phase and under anaerobic conditions.

### **MATERIALS AND METHODS**

#### ***Bacterial strains, plasmids and growth conditions***

All of the strains and plasmids used in this study are described in Table 1. To test the effect of either temperature or osmolarity on *nrdA*



## ***Article “H-NS as a novel transcriptional modulator for the ribonucleotide reductase genes in Escherichia coli”***

expression, cells were grown either in Luria-Bertani (LB) broth at 25°C or 37°C or in modified LB broth containing NaCl at final concentrations of 170 or 500 mM. The cells were grown with continuous shaking at 150 rpm. When required, LB broth was supplemented with 10 µg ml<sup>-1</sup> gentamicin, 50 µg ml<sup>-1</sup> kanamycin, 50 µg ml<sup>-1</sup> ampicillin, 30 µg ml<sup>-1</sup> chloramphenicol and 17 µg ml<sup>-1</sup> tetracycline. Anaerobic growth was carried out in hungate tubes, as described previously (26).

To construct the AAG1Δ*hns*, ETS114, ETS115, ETS116, ETS117 and ETS118 strains, P1vir-mediated transduction was performed as described previously (246) using lysates obtained from the strains BSN27 (157), JW3229 (244) or BSN28 (157).

### *DNA manipulation*

Restriction endonucleases, T4 DNA ligase, alkaline phosphatase, DNA polymerase (Klenow fragment) and DNA-modifying enzymes were purchased from Fermentas and used according to the manufacturer's instructions. Plasmid DNA was isolated using the QIAprep spin miniprep kit (Qiagen), as described by the manufacturer.

Polymerase chain reaction (PCR) amplifications were performed using high-fidelity polymerase (Fermentas); 2X PCR master mix was used for screening assays, according to the manufacturer's specifications (Fermentas), with the primers described in Table 2. The other molecular assays and manipulations were performed using standard procedures (254).

### *Expression analysis of GFP*

Overnight cultures of *E. coli* wild-type MG1655 and its isogenic *hns* mutant derivative transformed with pETS130, pETS150, pETS151

or pETS152 were adjusted to an OD<sub>550</sub> of 0.05 in 10 ml LB broth and incubated at 37°C. At different points of the growth curve, 1 mL of bacterial cells was collected by centrifugation and resuspended in 1 ml of fixing solution (1 x PBS and 4% formaldehyde) for 10 minutes on ice. The fixed cultures were subsequently washed twice with 1x PBS. Samples in triplicate were plated in 96-wells solid polystyrene plates (Fisher Scientific), and the fluorescence was measured using an FLx800 Fluorescence microplate reader (BioTek).

### *Construction of lacZ transcriptional fusions*

Transcriptional fusions were constructed by inserting the promoter fragments into plasmid pUJ8 to generate transcriptional *lacZ* fusions (252). To construct the *PnrDA-lacZ* fusion, a 702-bp fragment encompassing the *nrdA* promoter region was amplified by PCR using primers PnrdABamHI-up and PnrdASmaI-lw (Table 2) and cloned into plasmid pUJ8 using the *BamHI-SmaI* sites to generate the pETS163 plasmid. This plasmid DNA was sequenced to ensure that the fragments were inserted in the correct orientation and that no mutation had been introduced during amplification and cloning.

pETS168 (*PnrDA-lacZ*ΔH-NS binding site) was constructed by amplification of the *nrdA* promoter region from -575 nt to -450 nt and from -400 nt to +127 nt using primers PnrdABamHI-up and PA-450ext-lw for the upstream region and PA-400extpho-up and PnrdASmaI-lw for the more proximal region. Both amplified regions were extracted from 2% agarose gels and ligated. PCR amplification using the *PnrdABamHI-up* and *PnrdASmaI-lw* primers generated an *nrdA* promoter region band (652 bp) without the putative H-NS binding site of approximately 50 bp located at a position centered at -425 nt. The

## ***Article “H-NS as a novel transcriptional modulator for the ribonucleotide reductase genes in Escherichia coli”***

amplified region was cloned into pUJ8 using the *Bam*HI-*Sma*I sites.

To transfer the *lacZ* fusions into the *E. coli* chromosome as a single copy, the recombinant plasmids pETS163 and pETS165 were digested with *Not*I, and the fragments containing the promoter fusion were subcloned into the suicide plasmid pUTminiTn5Cm (252), generating pETS166 and pETS168, respectively. The recombinant plasmids were transferred by conjugation using S17.1 ( $\lambda$ -pir) to a Rif<sup>R</sup> derivative of *E. coli* MG1655, and kanamycin-resistant transconjugants were screened for the loss-of-vector-mediated ampicillin resistance, as described (252). The presence of the desired fusion (ETS119 and ETS121) in the chromosome of several independent exconjugants was established by PCR analysis and  $\beta$ -galactosidase production (data not shown).

### *$\beta$ -Galactosidase assay*

Overnight cultures were subcultured in fresh LB media with the appropriate antibiotics and grown with shaking. Samples were collected at the times specified in each individual experiment, and the  $\beta$ -galactosidase activities were determined independently at least three times, as described previously (246). Unless otherwise indicated, the standard deviations were less than 10%.

### *Band-shift assays*

To investigate the binding of regulatory proteins to the three *nrd* promoters, electrophoretic band-shift assays were performed, as described previously (258). DNA fragments of different lengths and comprising different sites were synthesized and purified (the primers are listed in Table 2). H-NS-DNA binding was performed in 20  $\mu$ l of 40 mM Tris-HCl (pH 8.0),

100 mM KCl, 1 mM DTT, 5 mM K phosphate, 5% glycerol and 50 mM EDTA, with increasing concentrations of purified H-NS (258) (0.5 to 4  $\mu$ M) and 30 ng of DNA. After incubation for 20 min at 25°C, the protein-DNA complexes were subjected to electrophoretic separation at 100 V through 0.8% agarose gels in 0.5X TBE buffer. The DNA was visualized by ethidium bromide staining.

### *Western blotting*

Crude *E. coli* protein extracts were prepared using the BugBuster® extraction reagent (Novagen). The protein extracts were loaded onto 7.5% mini-gels (5  $\mu$ g of protein per lane) and separated by electrophoresis using the Bio-Rad mini-gel apparatus (Bio-Rad). The proteins were electroblotted onto PVDF membranes (Immun-Blot™ PVDF membranes, Bio-Rad) using a semidry transfer system (Bio-Rad), and the membranes were blocked overnight at 4°C in 5% skimmed milk in phosphate-buffered saline (PBS). The membranes were probed with a 1:10 000 dilution of Rabbit anti-*Pseudomonas aeruginosa* NrdA (284). The detection of primary antibodies was performed using donkey anti-rabbit (Bio-Rad) horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibodies at a 1/50000 dilution and visualized using the Amersham™ ECL™ Prime western blotting reagent (GE Healthcare) according the manufacturer's protocol. Imaging was performed using an ImageQuant™ LAS4000 mini (GE Healthcare) with the chemiluminescence high-sensitivity setting. The protein concentrations were determined using the Bio-Rad Bradford assay.

## Article “H-NS as a novel transcriptional modulator for the ribonucleotide reductase genes in *Escherichia coli*”

### RESULTS

*H-NS represses expression of class Ia and III RNRs.*

Several genes involved in modifying DNA architecture (e.g., those encoding FIS and DnaA) have been shown to be involved in the transcriptional regulation of *E. coli nrdAB* genes (117). These factors appear to respond to nutritional changes (FIS (123)) or the DnaA concentration itself (285). Taking into account that *nrd* genes are also environmentally regulated and that H-NS influences DNA architecture and modulates gene expression in response to environmental factors (286-288), we hypothesized that H-NS might participate in the modulation of the expression of some of the *nrd* operons. To test this hypothesis, we measured the expression of the different *nrd* promoters in strains MG1655 and MG1655 $\Delta$ *hns* using plasmids carrying transcriptional fusions of each *nrd* promoter region with the green fluorescent protein (GFP), as previously described (243). In exponentially growing cells, GFP expression from the plasmid pETS150 (*Pnrda*::GFP) was twice as high in the  $\Delta$ *hns* cells than in the wild-type cells. The difference in GFP expression increased to 3.5 fold in cells entering the stationary phase (Fig. 1A). The same effect of the  $\Delta$ *hns* allele was found in cells carrying the plasmid pETS152 (*Pnrdd*::GFP) (Fig. 1A). Complementation with an *hns*<sup>+</sup> gene cloned into the plasmid pLGHNSEC (Table 1) returned the expression of GFP protein to the level of the wild-type cells. No change in expression was found when the cells carrying the *PnrDHIEF* promoter region (pETS151) were depleted of the H-NS protein (Fig. 1A). These results suggest that class Ia (*nrdAB*) and III (*nrdDG*) but not Ib (*nrdHIEF*) RNR genes could be modulated by H-NS.

We then focused our study on the aerobic RNRs (class Ia) and constructed a transcriptional fusion of the *nrdAB* promoter region to  $\beta$ -galactosidase as a reporter gene (see Materials and Methods). The use of the transcriptional  $\beta$ -galactosidase fusion inserted as a single chromosomal copy provided results comparable to those obtained using GFP fusions (Fig. 1B). When comparing strains AAG1 (ETS119) and AAG1 $\Delta$ *hns* (ETS122), the transcriptional *Pnrda*::*lacZ* chromosomal fusion showed, 4.2- and 3.1-fold induction, respectively, in the exponential phase of growth and a somewhat higher induction (6.6-fold) at the onset of the stationary phase (Fig. 1B).

To correlate the transcriptional data with protein expression, we measured the levels of NrdA protein in wild-type MG1655 cells and its isogenic  $\Delta$ *hns* mutant by Western blotting (Fig. 1C). Compared to the wild-type strain, the NrdA protein was expressed at higher levels in the *hns* mutant, both in the exponential and stationary growth phases.

*H-NS modulation of NrdA is FIS and IciA independent and is not influenced by StpA.*

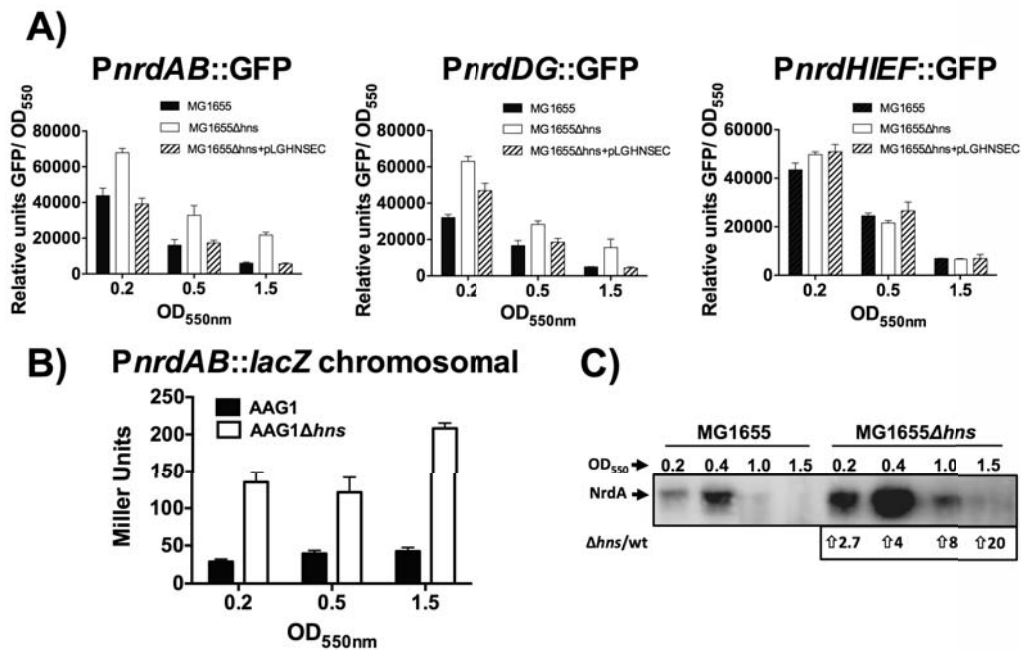
Considering that FIS and IciA modulate *nrdAB* expression (123, 132), we decided to test whether H-NS modulation of these genes was FIS or IciA dependent. To this end, the NrdA levels were detected by Western blotting in the wild-type MG1655 strain and its  $\Delta$ *hns*,  $\Delta$ *fis* and  $\Delta$ *fis $\Delta$ *hns* or  $\Delta$ *iciA $\Delta$ *hns* derivatives, with the results indicating that FIS (Fig. 2A) and IciA (Fig. 2B) do not influence the H-NS regulation of NrdA.**

It has been reported that the overexpression of the StpA paralogue in *hns* mutants partially compensates for the loss of H-NS (273). We also tested whether NrdA expression was further

*Article “H-NS as a novel transcriptional modulator for the ribonucleotide reductase genes in Escherichia coli”*

deregulated in a double  $\Delta hns \Delta stpA$  genetic background. Western blotting detection of NrdA in the wild-type and  $\Delta hns$ ,  $\Delta stpA$  and  $\Delta hns\Delta stpA$

mutant cells showed that StpA does not attenuate NrdA expression in either exponential or stationary growth-phase cells (Fig. 3).



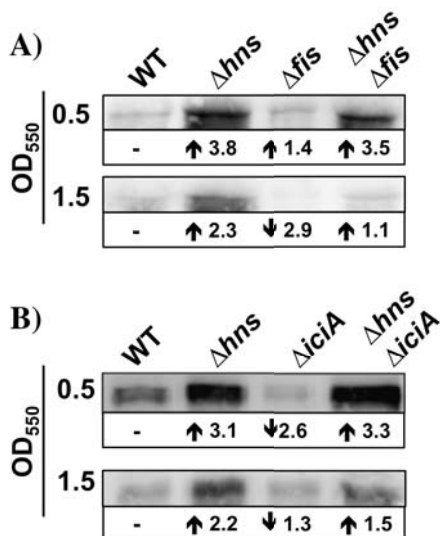
**Figure 1. H-NS modulates the expression of class I and III RNRs.** A) Fluorescence was measured in strains MG1655 and MG1655Δhns harboring plasmids pETS150 (*PnrAB*-GFP), pETS152 (*PnrDG*-GFP) and pETS151 (*PnrHIEF*-GFP). *Hns*<sup>+</sup> gene cloned into plasmid pLGHNSEC were used to complement *hns* deficiency in strain MG1655Δhns. The measurements at different points of growth at 37°C in LB were background subtracted using the normalized fluorescence from a culture of MG1655 at the different points indicated ( $A_{550}$  0.2, 0.5 and 1.5). The fluorescence was normalized to the optical density at 550 nm ( $A_{550}$ ) and is given in relative units. The points represent the mean of three independent experiments, and the error bars denote the standard deviations. B) Expression of the *PnrAB::lacZ* transcriptional fusion inserted as a single chromosomal copy (ETS119 and ETS122).  $\beta$ -galactosidase activity was determined in strains ETS119 and ETS122 harboring the chromosomal fusion. Samples were collected at different stages of growth in LB medium at 37°C. The values are given as Miller units. The points represent the mean of three independent experiments, and the error bars denote the standard deviations. C) Immunodetection of NrdA protein in aerobic cultures of strains MG1655 and MG1655Δhns.

*H-NS protein binds specifically to two DNA regions in the promoter and coding nrdA region*

The finding that H-NS is able to repress the expression of *nrdAB* and *nrdDG* *in vivo* prompted us to investigate its interaction with the *nrdA*, *nrdH* and *nrdD* promoters. To this end, DNA fragments corresponding to the entire *nrdA*,

*nrdD* and *nrdH* promoters (703 bp, -575 to +127 nt; 261 bp, -244 nt to + 17 nt and 441 bp, -419 nt to + 22 nt, respectively) were used for band shift assays in the presence of purified H-NS protein. As observed in Fig. 4, when the *PnrDA* and *PnrDD* DNA fragments were used in the presence of increasing H-NS concentrations, protein-DNA

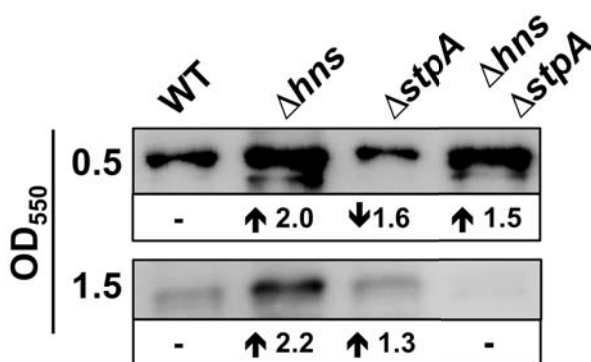
*Article: “H-NS as a novel transcriptional modulator for the ribonucleotide reductase genes in Escherichia coli”*



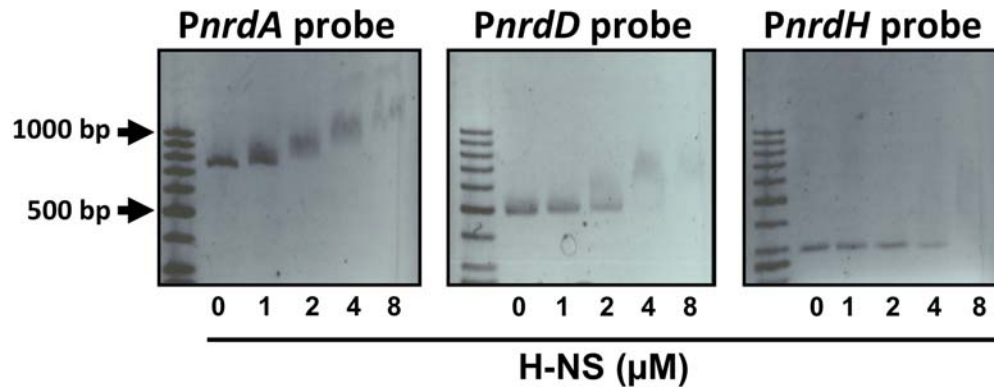
**Figure 2. Modulation of NrdA by H-NS is not influenced by FIS or IciA.** Immunodetection of the NrdA protein in aerobically growing cells of the wild-type (MG1655) strain and its *hns* (MG1655Δ*hns*), *fis* (ETS115) and double *hns fis* (ETS116) mutant derivatives in A) and wild-type (MG1655) strain and its *hns* (MG1655Δ*hns*), *iciA* (ETS123) and double *hns iciA* (ETS124) mutant derivatives in B).

complexes exhibiting decreased mobility were detected, thus suggesting the progressive occupancy of multiple binding sites by H-NS. However, low-mobility protein-DNA complexes were not observed when a fragment corresponding to the *PnrDH* promoter was used, thus indicating that this fragment contains no binding site for H-NS. We next performed a fine mapping of the putative H-NS binding sites in the

*PnrDA* operon by using several overlapping DNA fragments from the promoter region and from the *nrdA* coding sequence. H-NS preferentially binds to two DNA regions, one of which includes sequences that map upstream of the known binding sites for the transcription factors that regulate the expression of *nrdA* (FIS and IciA) (Fig. 5b).



**Figure 3. Specific H-NS repression of NrdA is not influenced by StpA.** Immunodetection of the NrdA protein in aerobically growing cells of the wild-type strain MG12655 and its corresponding *hns* (MG1655Δ*hns*), *stpA* (ETS117) and double *hns stpA* (ETS118) mutant derivatives.



**Figure 4. The H-NS protein binds to class Ia and III DNA promoter regulatory regions.** EMSAs performed with purified H-NS protein and promoter regulatory regions of different RNR class genes encoded by the *E. coli* genome (*PnrDA*, class Ia; *PnrDD*, class III and *PnrDH*, class Ib). H-NS protein was added at the concentration indicated at the bottom.

The 3' end of the fragment to which H-NS binds preferentially is located 235 bp upstream of the *nrdA* transcriptional start site (117). The deletion analysis of this fragments shows that the putative H-NS binding site of approximately 50 bp is located at a position centered at -425 nt. This sequence is AT-rich (68.4%), feature typically found in other well-characterized H-NS binding regions. In addition this region contains two sequences (AGTTAATAA and GTTATATTT) that are highly similar to the H-NS consensus sequence described by Lang et al (34). The second region includes sequences within the *nrdA* structural gene, 127 bp downstream of the *nrdA* transcriptional start site (Fig. 5b). Its AT content is as well high (58.6%), but it does not contain any of the two H-NS consensus sequences.

To verify that the identified upstream H-NS binding region is functional *in vivo*, we constructed a transcriptional *PnrDA::lacZ* fusion with a deletion in the putative H-NS binding region (see Material and Methods). The expression of the chromosomal *PnrDA::lacZ* fusion in strain ETS121 ( $\Delta$ HNS binding site) was

similar to that of the corresponding  $\Delta$ *hns* mutant (Fig. 5C), indicating the relevance of these sequences to the ability of H-NS to modulate the expression of the *PnrDAB* operon.

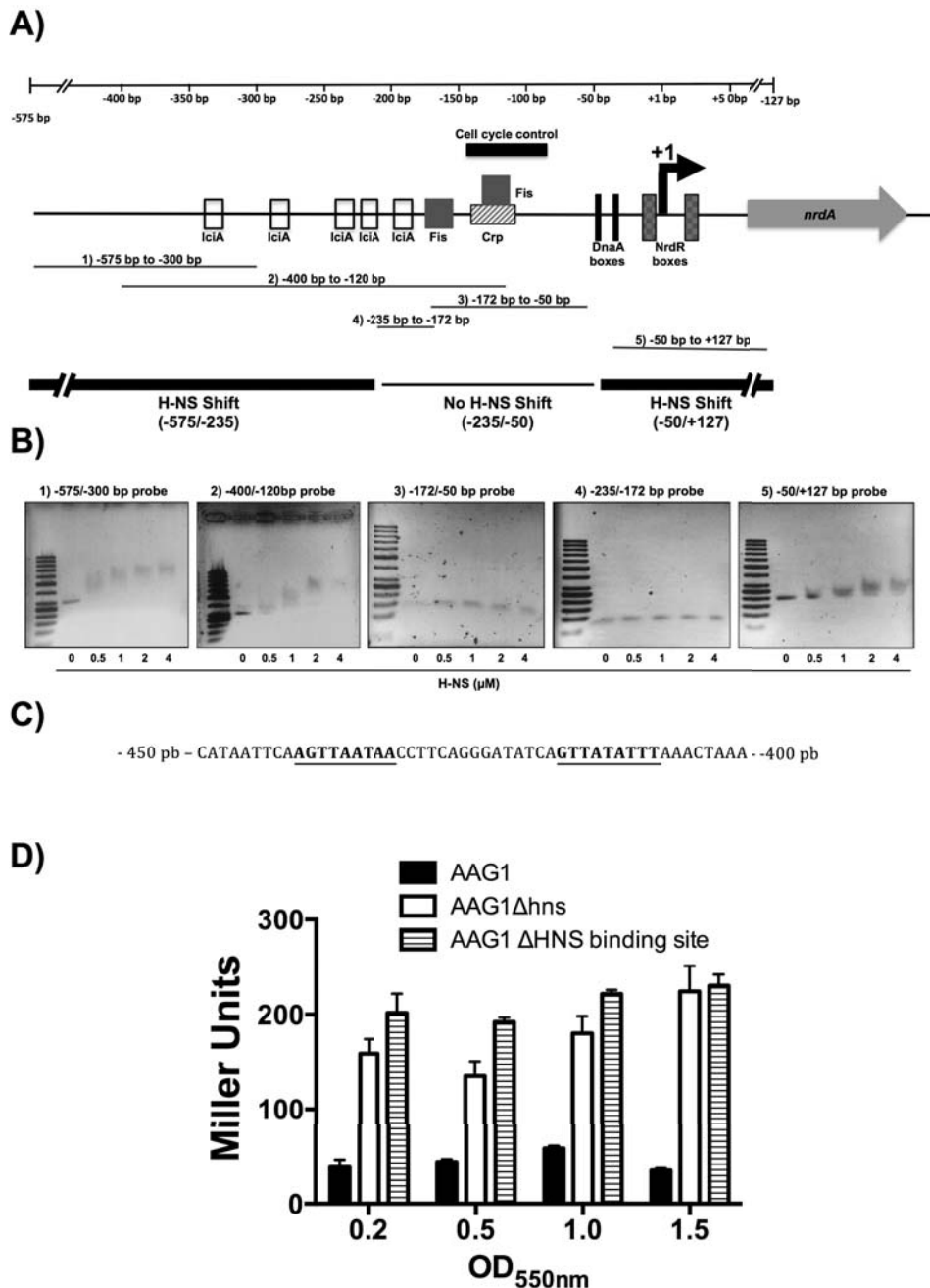
#### *Osmolarity, temperature and anaerobiosis: the H-NS modulatory role of the nrdAB operon.*

Considering that H-NS modulates gene expression in response to environmental factors, we then analyzed whether this protein modulates the expression of the *nrdAB* operon in response to specific environmental stimuli. For these studies, we evaluated temperature, osmolarity and anaerobiosis. We tested first whether *nrdA* expression is sensitive to osmolarity and temperature using strains ETS119 and ETS122 (*nrdAB::lacZ*). To assess the effect of osmolarity, we evaluated the  $\beta$ -galactosidase activity in cells growing in LB broth containing either 0, 170 or 500 mM NaCl. The values of *nrdA* expression in cells grown under low (0 M NaCl) and high (500 mM NaCl) osmolarity conditions were related to those obtained from cells grown in standard LB broth (170 mM), which was taken as the reference (Fig. 6A). Osmolarity did not influence

*Article “H-NS as a novel transcriptional modulator for the ribonucleotide reductase genes in Escherichia coli”*

*nrdA* expression; accordingly, the modulatory role of H-NS on *nrdA* was not affected by the osmolarity of the growth medium. With respect to temperature, the evaluation of  $\beta$ -galactosidase showed that *nrdA* expression is upregulated when

cells are grown at a low temperature (Fig. 6B). H-NS does not participate in the temperature-dependent regulation of *nrdA*, as shown by evaluating  $\beta$ -galactosidase in strain ETS119 at high and low temperatures.



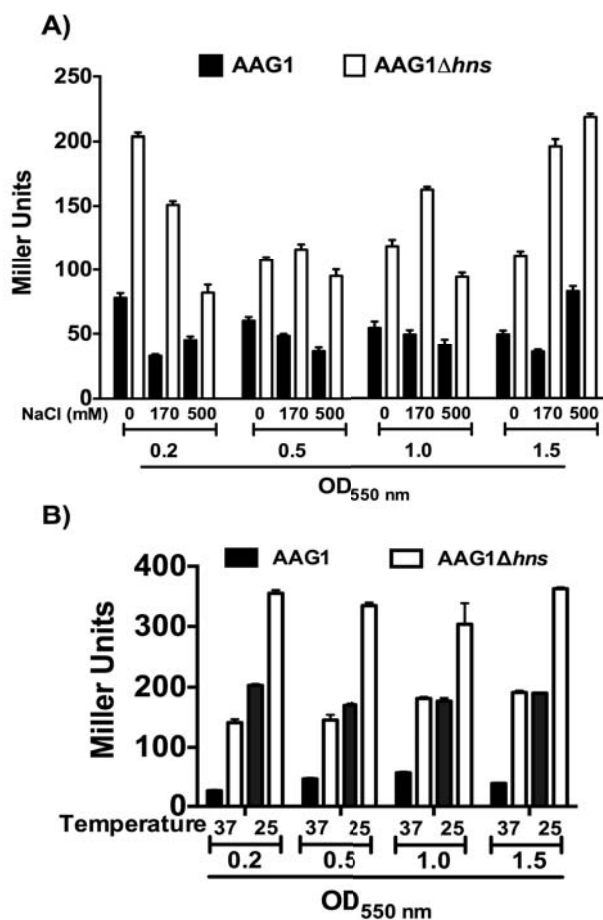
**Figure 5. The H-NS protein binds to two DNA regions in the promoter and coding *nrdA* regions of the gene.** A) Schematic representation of the *E. coli nrdAB* promoter region (*PnrdA*). *PnrdA* contains multiple transcription factor binding sites; the locations and scale are based both on the complete description available in the EcoCyc database ([www.ecocyc.org](http://www.ecocyc.org)) (289) and on available experimental data (123, 132). The positions indicated are based on the +1 start site of *PnrdA* transcription, 110 bp

**Article “H-NS as a novel transcriptional modulator for the ribonucleotide reductase genes in *Escherichia coli*”**

upstream of the ATG codon of *nrdA* (121). Short DNA fragments of the *Pnrda* region (bands 1 to 5) were used for the EMSA analysis in B. B) EMSAs with purified H-NS protein and different short DNA fragments of the *Pnrda* promoter region, as indicated in A. H-NS was added at the concentration indicated at the bottom. C) Putative H-NS 50 bp binding sequence in the *nrdAB* promoter region. In bold and underlined is shown the putative DNA sequences identical to the H-NS consensus sequence region described previously (167). D) Effect of the deletion of the putative *Pnrda* H-NS binding site on *nrdA* expression.  $\beta$ -galactosidase activity was determined in strains ETS119 (AAG1), ETS122 (AAG1 $\Delta$ *hns*) and ETS121 (*Pnrda*::*lacZ*,  $\Delta$ H-NS binding site). Cells were grown aerobically in LB medium at 37°C, and samples were collected at different points of growth. The  $\beta$ -galactosidase values are given in Miller units. The points represent the mean of three independent experiments, and the error bars denote the standard deviations.

As indicated in the Introduction section, class Ia RNRs are not active under anaerobic conditions, although other RNRs (class III RNRs) can function under these conditions. Hence, it was interesting to evaluate whether H-NS plays a role in *nrdAB* repression when *E. coli* cells are

growing anaerobically. Therefore, an expression analysis was performed with strains ETS119, ETS121 and ETS122 (Fig. 7A) at different stages of growth (OD<sub>550</sub> of 0.2, 0.5 and 1) according to the growth curve shown in Fig. 7B.



**Figure 6. Effects of osmolarity and temperature on *nrdAB* expression.**

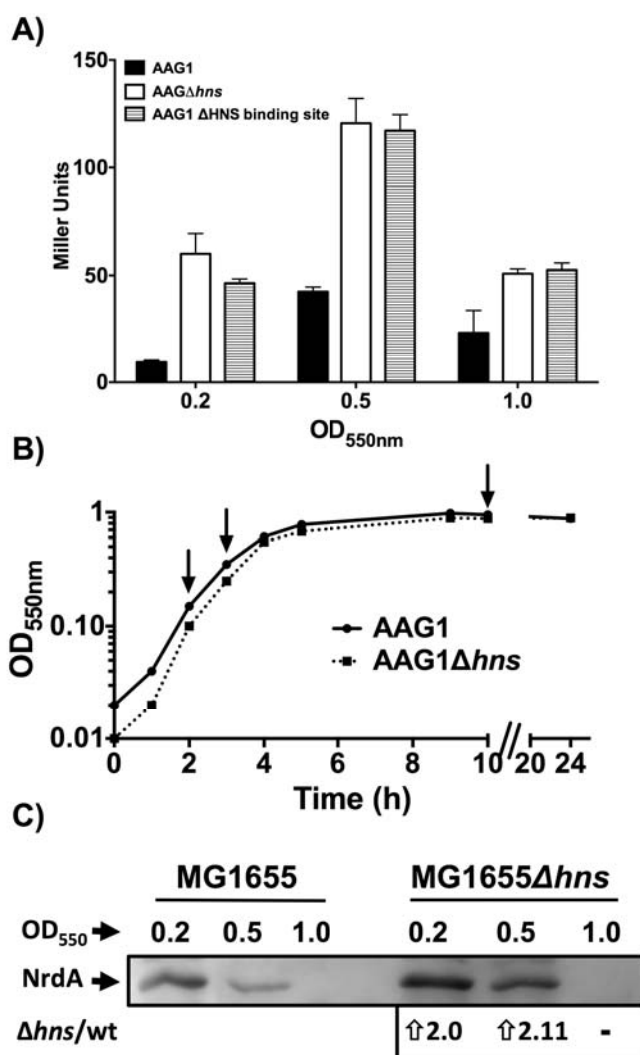
The effects of osmolarity (A) and temperature (B) on the expression of the *PnrdaAB*::*lacZ* transcriptional fusion with  $\beta$ -galactosidase were measured in strains ETS119 and ETS122. Samples at different NaCl concentrations were collected at different stages of growth in LB medium at 37°C. For temperature dependence expression, cells were grown at 25°C and 37°C. The values are given as Miller units. The points represent the mean of three independent experiments, and the error bars denote the standard deviations.



**Article “H-NS as a novel transcriptional modulator for the ribonucleotide reductase genes in *Escherichia coli*”**

Compared with the wt strain, the expression of *nrd* in the  $\Delta hns$  mutant was increased in both exponentially growing cells (6.4 and 2.9 times) and stationary-phase cells (2.2 times). To corroborate the transcriptional data, we measured the anaerobic levels of the NrdA

protein in wild-type MG1655 cells and its isogenic  $\Delta hns$  mutant by Western blotting (Fig. 7C). Compared to the wild-type strain, the NrdA protein was expressed at higher levels in the *hns* mutant in both the exponential and early stationary growth phases.



**Figure 7. H-NS is required for anaerobic repression of classes I RNRs.** A)  $\beta$ -galactosidase was measured in strains harboring chromosomal *Pnr**rdAB::lacZ* transcriptional fusions.  $\beta$ -galactosidase activity was determined in strains ETS119 (AAG1), ETS122 (AAG1 $\Delta hns$ ) and ETS121 (*Pnr**rdA::lacZ*,  $\Delta$ H-NS binding site). Cells were grown anaerobically in LB medium at 37°C, and samples were collected at different points of the growth curve. The points represent the mean of three independent experiments, and the error bars denote the standard deviations. B) Anaerobic growth curves of strains ETS119 and ETS122 indicating the points of sample collection and corresponding assay for  $\beta$ -galactosidase (in A) and for NrdA immunodetection (in C). C) Immunodetection of NrdA protein in anaerobically growing cells of strains MG1655 and (MG1655 $\Delta hns$ ).

**Discussion**

Oxygen availability is an important signal for many pathogenic bacteria to be able to colonize their hosts and cause intestinal and extra-intestinal infections in human and animals (290). For this reason, several bacterial genes associated with colonization and infection need to respond and adapt to a shift from an aerobic to an anaerobic environment. Oxygen availability,

also influences the expression of several housekeeping functions that are essential for adaptation to anaerobic niches: RNRs are one such example. The *Escherichia coli* genome encodes two aerobic class I RNRs (class I, encoded by *nrdAB*, and class Ib, encoded by *nrdHIEF*) and one class III RNR (*nrdDG*). Remarkably, class Ia RNR expression is repressed in anaerobic conditions; enzyme

**Article “H-NS as a novel transcriptional modulator for the ribonucleotide reductase genes in *Escherichia coli*”**

activity is also repressed under these conditions (26). In contrast, class III RNR enzyme expression is induced and fully active only under anaerobic conditions (26, 150).

RNR expression is affected by other physiological stimuli in addition to oxygen availability, and several factors have been shown to control the transcriptional regulation of the different RNR genes (117, 276). The *nrdAB* operon is transcriptionally activated by FIS, IciA and DnaA and is cell cycle regulated; furthermore, its expression is not dependent on Arc or Fnr (150). However, the activation of Fnr-dependent transcriptional regulation triggers the expression of *nrdDG* during anaerobic growth (149, 150). The expression of the *nrdHIEF* operon is activated by Fur, but it is not sensitive to the regulatory mechanisms reported to influence *nrdAB* expression. It has recently been described that this operon can substitute for the enzymatic activity of class Ia RNRs when Mn ions are present instead of Fe (12).

In spite of the available information, the factors that dictate the expression of some RNR genes in response to certain specific environmental conditions remain to be elucidated. Examples are the repression of *nrdAB* operon expression under anaerobic conditions and the down-regulation of *nrdAB* expression at the transition from the exponential to the stationary phase. At the onset of the stationary phase, dNTPs are not required because DNA replication is inhibited.

In this study, we identified some aspects of the regulatory mechanisms modulating the expression of *E. coli* *nrd* genes. We assigned a role to the H-NS protein as a modulator of the expression of the *nrdAB* and *nrdDG* genes. The expression of the *nrdAB* and *nrdDG* operons is upregulated in an *hns* mutant under several growth conditions. Furthermore, using the *nrdAB*

operon as a model, we demonstrated the specific interaction of H-NS with two DNA fragments of the operon, one of which maps upstream of the promoter and the other of which is located within the *nrdA* coding sequence. The DNA sequences of both fragments are AT-rich and, in addition, the upstream fragment includes DNA sequences identical to the H-NS consensus sequence region described previously (167). H-NS binding to two target sequences located at a distance apart has been reported for most H-NS-modulated operons (176, 291), and it is not uncommon that one of the binding sites maps downstream of the promoter, as is the case for the *bgl* operon (292). *In vivo* assays of *nrdAB* expression in cells lacking the upstream H-NS binding site confirm the role of these sequences as H-NS targets. Our findings prompted us to search previous global transcriptomic studies to assess if these approaches provided evidence that the *nrdAB* operon is targeted by H-NS both in *E. coli* and in *Salmonella*. This is the case (185, 293).

In aerobically growing *E. coli* cells, H-NS represses *nrdAB* expression under all conditions tested. Osmolarity does not influence expression of this operon and, accordingly, this environmental factor did not modify the effect of the *hns* allele on *nrdAB* expression. With respect to temperature, it should be noted that the temperature-dependent modulation of gene expression by H-NS usually occurs in genes or operons that are downregulated at low temperature, which is not the case for the *nrdAB* operon, which is up regulated at low temperature. Hence, it is not surprising that H-NS does not play a role in the temperature-dependent regulation of this operon. It should be pointed out here that H-NS has also been associated to chromosome replication. It has been suggested that H-NS, directly or indirectly, facilitates the

**Article “H-NS as a novel transcriptional modulator for the ribonucleotide reductase genes in *Escherichia coli*”**

initiation of chromosome replication (294). The H-NS concentration appears to play a significant role in chromosome replication (295). Therefore, H-NS may extend its role in chromosome replication by modulating the *nrdAB* operon. The intracellular amount of free H-NS protein (not bound to other target sequences) may be critical both in influencing chromosome replication and in dictating *nrdAB* transcription.

The role of the H-NS-mediated repression of gene expression when cells grow anaerobically is well documented (274, 296), and we show here that anaerobiosis is one of the environmental factors to which H-NS responds to modulate *nrdAB* expression. Although we cannot rule out the possibility that the H-NS modulation of *nrdAB* may respond to other environmental factors, the data obtained in this study show that H-NS participates in the silencing of *nrdAB* under anaerobic conditions. Because anaerobiosis is known to alter DNA topology (274, 275, 281), it may be hypothesized that alterations in the topology of the *nrdAB* regulatory region may favor H-NS interaction when *E. coli* cells grow anaerobically, resulting in the repression of the expression of this operon.

The results provided here show that the global modulator H-NS plays a relevant role in the regulatory circuits that dictate the expression of the different RNR operons in *E. coli* in response to physiological conditions, such as the transition from aerobic to anaerobic growth.

#### **Acknowledgments**

This work was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad with grant BFU2011-24066 and ERA-NET PathoGenoMics (BIO2008-04362-E) to ET, BFU2010-21836-C02-02 to CM, BFU2010-21836-C02-01 to AJ and CSD2008-00013 grant to AJ, CM and ET.

This work was also supported by the Generalitat de Catalunya 2009SGR66. ET was supported by the Ramón y Cajal and I3 program from the Ministerio de Ciencia e Innovación.

#### **REFERENCES**

1. **Nordlund P, Reichard P.** 2006. Ribonucleotide Reductases. *Annu Rev Biochem* **75**:681-706.
2. **Torrents E, Sahlin M, Sjöberg B-M.** 2008. The Ribonucleotide Reductase Family- Genetics and Genomics. In: *Ribonucleotide Reductases*. (ed. K.K. Andersson) Nova Science Publishers.:pp. 17-77.
3. **Lundin D, Torrents E, Poole AM, Sjöberg B-M.** 2009. RNRdb, a curated database of the universal enzyme family ribonucleotide reductase, reveals a high level of misannotation in sequences deposited to Genbank. *BMC Genomics* **10**:589.
4. **Herrick J, Sclavi B.** 2007. Ribonucleotide reductase and the regulation of DNA replication: an old story and an ancient heritage. *Mol Microbiol* **63**:22-34.
5. **Mathews CK.** 2006. DNA precursor metabolism and genomic stability. *FASEB J* **20**:1300-1314.
6. **Torrents E, Grinberg I, Gorovitz-Harris B, Lundstrom H, Borovok I, Aharonowitz Y, Sjöberg BM, Cohen G.** 2007. NrdR controls differential expression of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase genes. *J Bacteriol* **189**:5012-5021.
7. **Blattner FR, Plunkett G, 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453-1462.
8. **Cendra Mdel M, Juarez A, Torrents E.** 2012. Biofilm Modifies Expression of Ribonucleotide Reductase Genes in *Escherichia coli*. *PLoS One* **7**:e46350.
9. **Jacobson BA, Fuchs JA.** 1998. Multiple cis-acting sites positively regulate *Escherichia coli* *nrd* expression. *Mol Microbiol* **28**:1315-1322.
10. **Jacobson BA, Fuchs JA.** 1998. A 45 bp inverted repeat is required for cell cycle regulation of the *Escherichia coli* *nrd* operon. *Mol Microbiol* **28**:1307-1314.
11. **Bertin P, Benhabiles N, Krin E, Laurent-Winter C, Tendeng C, Turlin E, Thomas A, Danchin A, Brasseur R.** 1999. The structural and functional organization of H-NS-like proteins is evolutionarily conserved in gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* **31**:319-329.

*Article “H-NS as a novel transcriptional modulator for the ribonucleotide reductase genes in Escherichia coli”*

12. **Tendeng C, Bertin PN.** 2003. H-NS in Gram-negative bacteria: a family of multifaceted proteins. *Trends Microbiol* **11**:511-518.
13. **Dorman CJ.** 2004. H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat Rev Microbiol* **2**:391-400.
14. **Rimsky S.** 2004. Structure of the histone-like protein H-NS and its role in regulation and genome superstructure. *Curr Opin Microbiol* **7**:109-114.
15. **Rimsky S, Zuber F, Buckle M, Buc H.** 2001. A molecular mechanism for the repression of transcription by the H-NS protein. *Mol Microbiol* **42**:1311-1323.
16. **Dorman CJ, Deighan P.** 2003. Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr Opin Genet Dev* **13**:179-184.
17. **Dame RT, Wyman C, Wurm R, Wagner R, Goosen N.** 2002. Structural basis for H-NS-mediated trapping of RNA polymerase in the open initiation complex at the *rrnB* P1. *J Biol Chem* **277**:2146-2150.
18. **Esposito D, Petrovic A, Harris R, Ono S, Eccleston JF, Mbabaali A, Haq I, Higgins CF, Hinton JC, Driscoll PC, Ladbury JE.** 2002. H-NS oligomerization domain structure reveals the mechanism for high order self-association of the intact protein. *J Mol Biol* **324**:841-850.
19. **Garriga X, Eliasson R, Torrents E, Jordan A, Barbe J, Gibert I, Reichard P.** 1996. *nrdD* and *nrdG* genes are essential for strict anaerobic growth of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **229**:189-192.
20. **Miller JH.** 1992. A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
21. **Johansson J, Dagberg B, Richet E, Uhlin BE.** 1998. H-NS and StpA proteins stimulate expression of the maltose regulon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**:6117-6125.
22. **Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H.** 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* **2**:2006 0008.
23. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
24. **de Lorenzo V, Herrero M, Jakubzik U, Timmis KN.** 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* **172**:6568-6572.
25. **Madrid C, Nieto JM, Paytubi S, Falconi M, Gualerzi CO, Juarez A.** 2002. Temperature- and H-NS-dependent regulation of a plasmid-encoded virulence operon expressing *Escherichia coli* hemolysin. *J Bacteriol* **184**:5058-5066.
26. **Sjöberg BM, Torrents E.** 2011. Shift in Ribonucleotide Reductase Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa* during Infection. *Infect Immun* **79**:2663-2669.
27. **Augustin LB, Jacobson BA, Fuchs JA.** 1994. *Escherichia coli* Fis and DnaA proteins bind specifically to the *nrd* promoter region and affect expression of an *nrd-lac* fusion. *J Bacteriol* **176**:378-387.
28. **Olliver A, Saggio C, Herrick J, Sclavi B.** 2010. DnaA-ATP acts as a molecular switch to control levels of ribonucleotide reductase expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **76**:1555-1571.
29. **White-Ziegler CA, Davis TR.** 2009. Genome-wide identification of H-NS-controlled, temperature-regulated genes in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **191**:1106-1110.
30. **Stella S, Falconi M, Lammi M, Gualerzi CO, Pon CL.** 2006. Environmental control of the in vivo oligomerization of nucleoid protein H-NS. *J Mol Biol* **355**:169-174.
31. **Forns N, Juarez A, Madrid C.** 2005. Osmoregulation of the HtrA (DegP) protease of *Escherichia coli*: an Hha-H-NS complex represses HtrA expression at low osmolarity. *FEMS Microbiol Lett* **251**:75-80.
32. **Han JS, Kwon HS, Yim JB, Hwang DS.** 1998. Effect of IciA protein on the expression of the *nrd* gene encoding ribonucleoside diphosphate reductase in *E. coli*. *Mol Gen Genet* **259**:610-614.
33. **Sonden B, Uhlin BE.** 1996. Coordinated and differential expression of histone-like proteins in *Escherichia coli*: regulation and function of the H-NS analog StpA. *EMBO J* **15**:4970-4980.
34. **Jones SA, Gibson T, Maltby RC, Chowdhury FZ, Stewart V, Cohen PS, Conway T.** 2011. Anaerobic respiration of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Infect Immun* **79**:4218-4226.
35. **Boston T, Atlung T.** 2003. FNR-mediated oxygen-responsive regulation of the *nrdDG* operon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**:5310-5313.
36. **Roca I, Ballana E, Panosa A, Torrents E, Gibert I.** 2008. Fumarate and nitrate reduction (FNR) dependent activation of the *Escherichia coli* anaerobic ribonucleotide reductase *nrdDG* promoter. *Int Microbiol* **11**:49-56.
37. **Martin JE, Imlay JA.** 2011. The alternative aerobic ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*, NrdEF, is a manganese-dependent enzyme that enables cell replication during periods of iron starvation. *Mol Microbiol* **80**:319-334.
38. **Lang B, Blot N, Bouffartigues E, Buckle M, Geertz M, Gualerzi CO, Mavathur R, Muskelishvili G, Pon CL, Rimsky S, Stella S, Babu MM, Travers A.** 2007. High-affinity DNA binding sites for H-NS provide a molecular basis for selective

*Article “H-NS as a novel transcriptional modulator for the ribonucleotide reductase genes in Escherichia coli”*

- silencing within proteobacterial genomes. *Nucleic Acids Res* **35**:6330-6337.
39. **Fang FC, Rimsky S.** 2008. New insights into transcriptional regulation by H-NS. *Curr Opin Microbiol* **11**:113-120.
40. **Dole S, Nagarajavel V, Schnetz K.** 2004. The histone-like nucleoid structuring protein H-NS represses the *Escherichia coli* *bgl* operon downstream of the promoter. *Mol Microbiol* **52**:589-600.
41. **Navarre WW, Porwollik S, Wang Y, McClelland M, Rosen H, Libby SJ, Fang FC.** 2006. Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science* **313**:236-238.
42. **Kahramanoglou C, Seshasayee AS, Prieto AI, Ibberson D, Schmidt S, Zimmermann J, Benes V, Fraser GM, Luscombe NM.** 2011. Direct and indirect effects of H-NS and Fis on global gene expression control in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **39**:2073-2091.
43. **Katayama T, Takata M, Sekimizu K.** 1996. The nucleoid protein H-NS facilitates chromosome DNA replication in *Escherichia coli* *dnaA* mutants. *J Bacteriol* **178**:5790-5792.
44. **Atlung T, Hansen FG.** 2002. Effect of different concentrations of H-NS protein on chromosome replication and the cell cycle in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**:1843-1850.
45. **Krishnan HH, Ghosh A, Paul K, Chowdhury R.** 2004. Effect of anaerobiosis on expression of virulence factors in *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **72**:3961-3967.
46. **Kim MJ, Lim S, Ryu S.** 2008. Molecular analysis of the *Salmonella typhimurium* *tdc* operon regulation. *J Microbiol Biotechnol* **18**:1024-1032.
47. **Stoker NG, Fairweather NF, Spratt BG.** 1982. Versatile low-copy-number plasmid vectors for cloning in *Escherichia coli*. *Gene* **18**:335-341.
48. **Garcia J, Madrid C, Cendra M, Juarez A, Pons M.** 2009. N9L and L9N mutations toggle Hha binding and hemolysin regulation by *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* H-NS. *FEBS Lett* **583**:2911-2916.
49. **Aberg A, Shingler V, Balsalobre C.** 2008. Regulation of the *fimB* promoter: a case of differential regulation by ppGpp and DksA in vivo. *Mol Microbiol* **67**:1223-1241.
50. **Keseler IM, Collado-Vides J, Santos-Zavaleta A, Peralta-Gil M, Gama-Castro S, Muniz-Rascado L, Bonavides-Martinez C, Paley S, Krummenacker M, Altman T, Kaipa P, Spaulding A, Pacheco J, Latendresse M, Fulcher C, Sarker M, Shearer AG, Mackie A, Paulsen I, Gunsalus RP, Karp PD.** 2011. EcoCyc: a comprehensive database of *Escherichia coli* biology. *Nucleic Acids Res* **39**:D583-590.
51. **Tuggle CK, Fuchs JA.** 1986. Regulation of the operon encoding ribonucleotide reductase in *Escherichia coli*: evidence for both positive and negative control. *EMBO J* **5**:1077-1085.

**Article: “H-NS as a novel transcriptional modulator for the ribonucleotide reductase genes in *Escherichia coli*”**

**Table 1.** Strains, plasmids and bacteriophages used in this study.

Strain or plasmid	Description	Source
<b>Plasmid</b>		
pGEM-T easy	A/T cloning vector, Ap <sup>R</sup>	Promega
pLG338-30	Low-copy number vector; oripSC101, Ap <sup>R</sup>	(250)
pETS130-GFP	Green fluorescence protein gene cloned into a high-copy number cloning vector, Gm <sup>R</sup>	(284)
pUJ8	Promoterless vector for transcriptional <i>lacZ</i> fusions, Ap <sup>R</sup>	(252)
pUTminiTn5Cm	Mini-Tn5 Cm in plasmid pUT, Ap <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup>	(252)
pLGHNSEC	<i>hns</i> cloned into the <i>Bam</i> HI site of pLG338-30	(251)
pETS150	<i>nrdA</i> promoter cloned into the <i>Bam</i> HI site of pETS130-GFP, Gm <sup>R</sup>	(243)
pETS152	<i>nrdD</i> promoter cloned into the <i>Bam</i> HI site of pETS130-GFP, Gm <sup>R</sup>	(243)
pETS151	<i>nrdH</i> promoter cloned into the <i>Bam</i> HI site of pETS130-GFP, Gm <sup>R</sup>	(243)
pETS163	<i>nrdA</i> promoter cloned into the <i>Bam</i> HI and <i>Sma</i> I site of pUJ8, Ap <sup>R</sup>	This work
pETS166	<i>PnrDA::lacZ</i> from pUJ8 cloned into the <i>Not</i> I site of pUTminiTn5Cm, Cm <sup>R</sup>	This work
pETS168	<i>PnrDA::lacZ</i> (ΔHNS binding site) from pUJ8 cloned into the <i>Not</i> I site of pUTminiTn5Cm, Cm <sup>R</sup>	This work
<b>Strain</b>		
DH5α	<i>recA1 endA1 hsdR17 supE44 thi-1 relA1 Δ(lacZYA-argF)U169deoRΦ80dlacZM15</i>	Laboratory stock
MG1655	F-, <i>ilvG</i> , <i>rph1</i> – Wild-type	Laboratory stock
MG1655Δ <i>hns</i>	MG1655 <i>trp::Tn10 Δhns</i>	This work
AAG1	MG1655 Δ <i>lacZ</i>	(240)
AAG1Δ <i>hns</i>	AAG1 <i>trp::Tn10 Δhns</i>	Marta Gibert
S17λpir	<i>TpRSmRrecA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> -M+RP4: 2-Tc:Mu: Km Tn7 λpir	Laboratory strain
ETS114	MG1655 <i>trp::Tn10Δhns</i>	(157)
ETS115	MG1655 <i>fis::km</i>	(244), This work
ETS116	MG1655Δ <i>hns fis::km</i>	(244), This work
ETS117	MG1655 <i>trp::Tn10 ΔstpA60::Km</i>	(157), This work
ETS118	MG1655Δ <i>hns trp::Tn10 stpA60::Km</i>	(157), This work
ETS119	AAG1 with a <i>PnrDA::lacZ</i>	This work
ETS121	AAG1 with a <i>PnrDA::lacZ</i> (ΔHNS binding site)	This work
ETS122	AAG1Δ <i>hns</i> with a <i>PnrDA::lacZ</i>	This work
ETS123	MG1655 <i>iciA::km</i>	(244), This work
ETS124	MG1655Δ <i>hns iciA::km</i>	(244), This work
<b>Phage</b>		
P1vir Phage		Laboratory stock

**Article “H-NS as a novel transcriptional modulator for the ribonucleotide reductase genes in *Escherichia coli*”**

**Table 2.** Primers used in this study.

<b>Name</b>	<b>Description Sequence (5'→3')</b>	<b>Application Source</b>
Gfp-mut3-rev	GAATTGGGACAACCTCCAGTG	Cloning assessment
Gfp-mut3-rev	GAATTGGGACAACCTCCAGTG	Cloning assessment
PnrdABamHI-up	ACCCGGGATCATTCTATAAGACGG	Cloning/ Probe amplification
PnrdASmaI-lw	AGGATCCAGCAGATTCTGATTCATG	Cloning
PA-450 ext-lw	CGCATGCATTGCACCGGGTTGAACAAT	Cloning
PA-400 extpho-up	GTACGCTTAAAGTCATGAATAATTTTCTTATAA TATAAGG	Cloning
PnrdA-50pb-up	ATCCACAAAGTTATGCACTTGC	Probe amplification
PnrdA-50pb-lw	TAATCAGGAAGGAAAAAGTGG	Probe amplification
PnrdA-300pb-lw	TTGTTGATGGCGAATGGTTGTT	Probe amplification
PnrdA-400pb-up	TTAAAGTCATGAATAATTTTCTTATAATATAAG	Probe amplification
PnrdA-120pb-lw	AGAGAAAAATTTGTTAAAAATAACTGTTCCG	Probe amplification
PnrdA-172pb-up	AGGTTAGATAAATTGATATAGATGGC	Probe amplification
PnrdA-235pb-up	TAGATCAATTTTGGCAATCATTAGCAA	Probe amplification
StpA-up	GATCGCTTACACTACGCGACG	Mutation assessment
StpA-lw	CAGCGACATCCGGCCTC	Mutation assessment
<i>E. coli</i> fis-up	GCGTAAATTCTGACGTACTGAC	Mutation assessment
<i>E. coli</i> fis-lw	TTTACGCAGCGTACCACGG	Mutation assessment
PBR-E	ATTATCATGACATTAACC	Cloning assessment
HNS-3	CCACCCAATATAAGTTTGAG	Mutation assessment
HNSBDist	CCGGATCCTAAAAAATCCCCG	Mutation assessment
M13-dir	GTTTTCCCAGTCACGAC	Cloning assessment
M13-rev	CAGGAAACAGCTATGAC	Cloning assessment
kT	CGGCCACAGTCGATGAATCC	Cloning assessment
k1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	Cloning assessment
k2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	Cloning assessment

### 6.3 Estudi del reguló NrdR en la soca d’*E. coli* MG1655. Manuscrit: *Genome-wide transcriptional analysis of Escherichia coli NrdR regulon*

(Veure Taula 4 en Material i Mètodes per qualsevol dubte amb la nomenclatura de les soques i/o plasmidis)

Poc es sap del factor transcripcional NrdR. El seu rol repressor en l’expressió de les RNR (134) és, de moment, l’únic paper modulador que se li ha descrit. Amb la intenció d’esbrinar si aquesta proteïna es troba reclosa en la regulació de les RNR es va fer un estudi transcripcional mitjançant l’anàlisi de la transcripció global de la soca salvatge comparada amb la soca mutant pel gen *nrdR* (MG1655Δ*nrdR2*). L’estudi es va realitzar en aquestes DO<sub>550</sub> diferents ja que en un estudi previ (135) es va veure l’efecte de NrdR sobre la transcripció gènica de les diferents classes de RNR d’*E. coli* en aquestes dos fases del creixement bacterià.

Una vegada realitzats els experiments de transcriptòmica (realitzades al Functional Genomics Core, IRB) es van analitzar les dades bioinformàticament. Es va observar com 312 gens mostraven des-regulació en la seva expressió en fase exponencial en absència del factor transcripcional NrdR mentre que en fase estacionària ho feien 597 amb una inducció o repressió igual o superior de logFC +/- 1.5 (Taula 6 i Taula 3 del manuscrit). Com a control es va observar una forta inducció dels gens que codifiquen per la RNR en la soca MG1655Δ*nrdR2* (135), a on l’operó *nrdH-I-E-F* va mostrar un increment de 0.652, 3.652, 3.168 i 3.354 logFC, respectivament, a DO<sub>550</sub> de 0.5 i 6.197, 5.655, 4.442, 5.010 logFC a DO<sub>550</sub> de 1.5.

**Taula 6.** Gens que presenten des-regulació en la soca MG1655Δ*nrdR2* comparada amb la salvatge.

Clúster Gènic	Gens	+	-
<b>DO<sub>550</sub> 0.5</b>			
<b>Motilitat Bacteriana i Taxis</b>	<i>flhE flgI flgJ flgK flgL flhB fliC fliE fliF fliG fliH fliL fliM fliR motA fimG fimH fimB ydeQ ydeR</i>	18	2
<b>Metabolisme Nucleotídic</b>	<i>guaA guaB purB purP purC purD purE purF purH purK purL purM purN purT pyrB pyrI codA codB nrdH nrdI nrdE nrdF nrdD yeeR yeeS yeeT</i>	5	16
<b>Plegament Proteic i Xaperones</b>	<i>clpB dnaJ dnaK groL groS grpE hslO hslU hslV htpG yhcA lon ibpA ibpB mdtJ mdtI</i>	16	-
<b>Metabolisme Aminoacídic</b>	<i>gltB gltD hisA hisB hisC hisD hisF hisG hisH hisI leuC leuD livM metA pheA thrA thrB tnaA tnaB tnaC trpE trpL glnA glnG glnH glnP</i>	26	-



Resultats-discussió: “Genome wide transcriptional analysis of NrdR regulon”

<b>Transportadors</b>	<i>dppD dppF pstA pstB kdpA kdpC nupG nupC mglB mglA mglC xylG yeeE</i>	7	6
<b>Membrana Cel·lular i Orgànuls</b>	<i>dppB dppC entD fdnI narU oppC pgaA pgaB pgaC uhpB uhpC uidC ydhC yjeM cvpA emrA emrB glpC kdpA kdpC xanP ygiM nagE</i>	14	9
<b>Resposta a estímuls abiòtics</b>	<i>cspG hslR ygaY fel katE</i>	3	2
<b>Transcripció</b>	<i>atoC hha mcbR putA soxS ycaN yihL stpA</i>	3	5
<b>DO<sub>550</sub> 1.5</b>			
<b>Motilitat Bacteriana i Taxis</b>	<i>flgF flgK fliA fliZ fliP flhD motA cheA tar fimG hofB yraK</i>	9	3
<b>Metabolisme Nucleotídic</b>	<i>apt gpt guaA guaC nrdA nrdB nrdH nrdI nrdE nrdF nrdD nrdG nupC tdk udk dnaA dnaC dnaT mioC dinD dinI sbmC exoX yeeS yeeR</i>	20	5
<b>Sideròfors i gens involucrats en la captació del Ferro</b>	<i>entA entB <b>entC</b> entE entF fecA fecC fecI fepB fes fhuA fhuC fhuD fhuF fiu fnb efeO efeB efeU</i>	18	1
<b>Metabolisme Aminoacídic</b>	<i>gltB gltD leuL leuO melA hisL mmuM tdcA tdcB tdcC tdcD aroH astA astD avtA dada gdhA lysA metA metK pabB pheP proB proY pth sstT yadB yneH</i>	20	8
<b>Membrana Cel·lular i Orgànuls</b>	<i>narU ydhC abrB dcuC evgS fucP hybC kefB napC narG nikC yfiB zraS actP ampG aqpZ bcr chaA emtA focA frlA fsr fxsA mdtJ setB shiA spr tolQ trkG ydda ydeE yebQ yeeO yhiI yojI znuB frdC amiA amiC dacB</i>	29	11
<b>Respiració Anaeròbica</b>	<i>des dmsC fdnG fdnH fdnI frdC glpE hyaB hybB hybD hybO hypE napB napC napG napH narH narI narJ nikD nikE nrfA nrfB nrfC nrfD nrfG ugpA yjjW</i>	26	2
<b>Transcripció</b>	<i>ascG caiF csgD deoR hcaR idnR marR melR mhpR pdhR rstA sdiA ycjW ydcI yedW yihW yjiR slyA tdcR metR</i>	16	4

\* En negreta es troben marcats els gens escollits dels 3 clústers gènics escollits per continuar amb l'estudi per corroborar els resultats obtinguts en l'array.

El que més va destacar va ser la participació del factor transcripcional NrdR en la repressió dels gens involucrats en la motilitat bacteriana, també en la modulació de gens que codifiquen per xaperones i proteases, i en gens que s'encarreguen de codificar per proteïnes implicades en la captació del ferro. Per corroborar els resultats obtingut en l'array es va avaluar, mitjançant *Real Time PCR*, l'expressió d'un dels gens de cada clúster gènic escollit per l'estudi: *fliC* (motilitat bacteriana i taxis), *clpB* (plegament proteic i xaperones) i *entC* (sideròfors i gens involucrats en la captació del ferro) (veure gens marcats en negreta en la Taula 6), així com altres gens escollits a l'atzar que mostraven una clara des-regulació en absència del factor transcripcional a la DO<sub>550</sub> en què es detectava. En tots els casos els valors de la inducció que es va detectar va ser igual o superior als obtinguts en l'estudi transcriptòmic global (Taula 7 i Taula 4 del manuscrit).

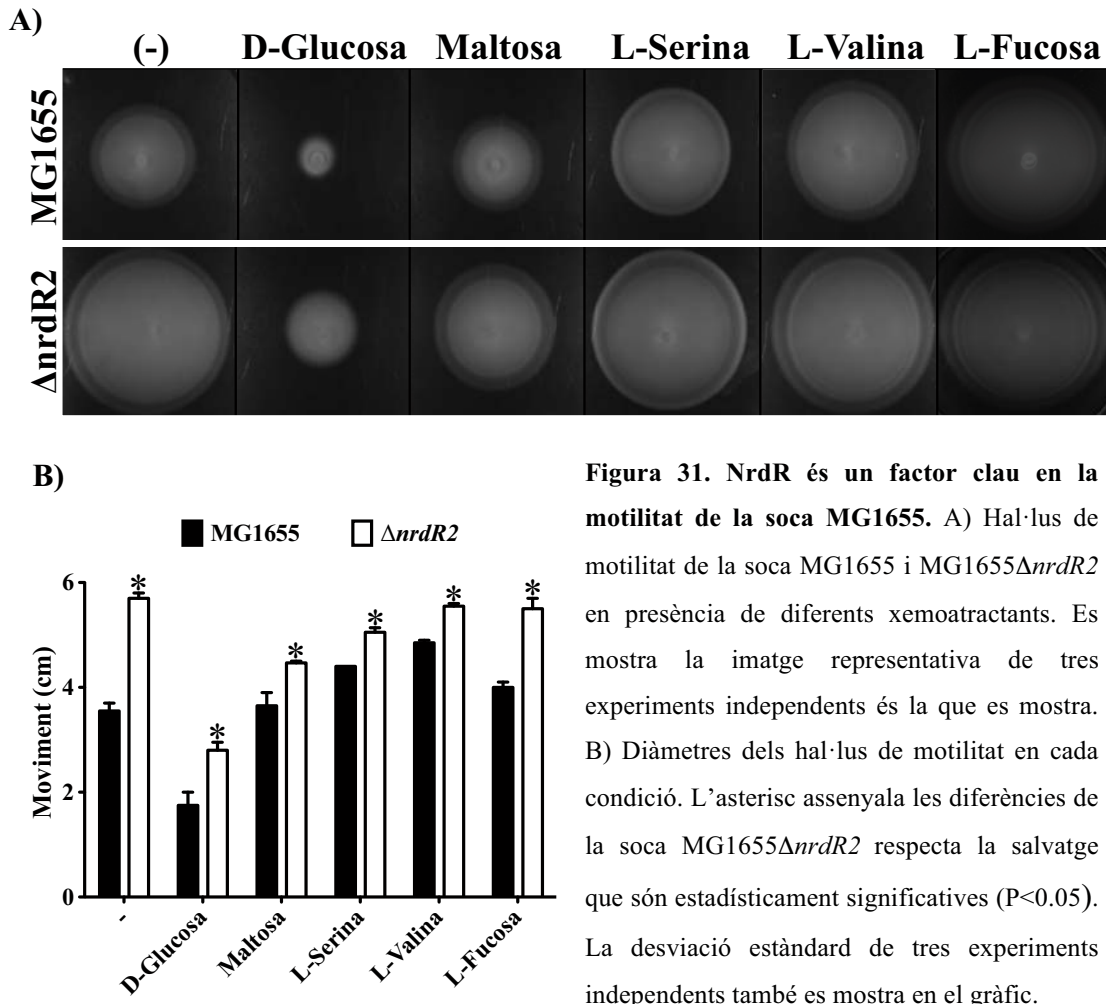
**Taula 7. Confirmació dels resultats obtinguts en l'estudi transcriptòmic de *NrdR*.**

<i>Gen</i>		
<b>DO<sub>550</sub> 0.5</b>	<b>Microarray logFC</b>	<b>Real Time PCR</b>
<i>yeeR</i>	-2.71	-18.86
<i>flu</i>	-2.76	-5.00
<i>purD</i>	-2.28	-1.44
<i>fliC</i>	0.65	1.21
<i>clpB</i>	0.64	1.88
<i>xylG</i>	0.73	3.31
<i>nrdE</i>	3.19	6.54
<b>DO<sub>550</sub> 1.5</b>		
<i>flu</i>	-2.37	-17.85
<i>caiF</i>	-1.13	-1.516
<i>gltB</i>	0.85	1.16
<i>entC</i>	3.47	1.57
<i>nrdE</i>	4.44	71.70

Encara que aquest estudi es centri en l'efecte de *NrdR* sobre aquests tres clústers gènics (motilitat bacteriana i taxis, plegament proteic i xaperones i, sideròfors i gens involucrats en la captació del ferro). És interessant destacar que, tant en fase exponencial com en estàcionària, s'ha observat la des-regulació de gens involucrats en el metabolisme de nucleòtids i que hi ha una predominança de gens que indueixen la seva expressió en absència de *NrdR* (actuant *NrdR* com a repressor) corelacionant-se amb la única regulació que se li havia atribuït fins al moment: la repressió de la RNR (enzim que també es troba inclòs en el clúster de metabolisme de nucleòtids). Tot i així, l'estudi transcriptòmic també va reflectir la repressió d'alguns gens en la soca MG1655Δ*nrdR2*, com ara l'operó involucrat en el metabolisme nucleotídic *yeeR-S-T* (tot i que seria es necessitarien d'estudis per veure si aquest efecte regulatori és directe o producte d'una antagonització a un altre repressor gènic). A més a més, l'*array* d'ARN va mostrar la participació de *NrdR* en el metabolisme aminoacídic, a on la deleció de *nrdR* del genoma bacterià comporta la des-regulació dels operons per la biosíntesi de la histidina i de la triptofanasa, entre d'altres (veure Taula 6 o Taula 3 del manuscrit).

### 6.3.1 NrdR reprimeix la motilitat d'*E. coli*

Per corroborar fenotípicament la implicació de NrdR en la motilitat de la soca MG1655, es va estudiar la capacitat de moviment sobre placa d'agar tou de la soca MG1655 $\Delta$ nrdR2 comparada amb la soca salvatge. Els experiments es van fer en presència de diferents xemoatractants com: D-glucosa, maltosa i L-serina així com del xemorepel·lent L-valina (297). En totes les condicions provades, la motilitat de la soca mutant pel factor transcripcional NrdR va mostrar una capacitat de moviment inferior a la que va presentar la soca salvatge MG1655 (Figura 31A i 31B i Figura 1A i 1B del manuscrit).

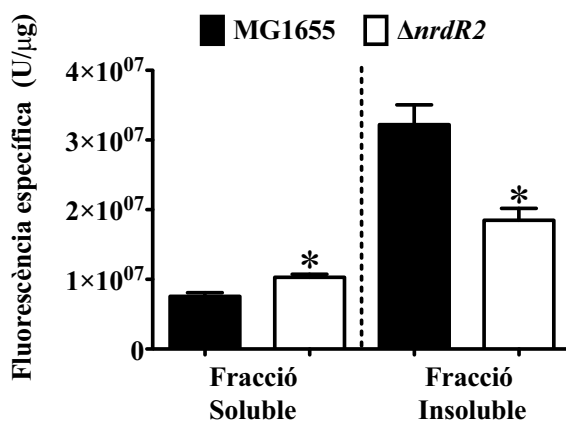


Tota la maquinària necessària pel moviment del flagell requereix de la unió d'ATP i, tal com s'ha explicat en la introducció, NrdR és una proteïna que té la possibilitat d'unir ATP i/o de dATP. Una hipòtesi podria ser que NrdR capturaria

l'ATP lliure no deixant-ne de disponible i limitant el moviment flagel·lar, d'una manera similar a l'efecte ATPasa que provoca el carvacrol en la síntesis del flagell de l'*E. coli* patògena O157:H7 (298). D'altra banda, s'ha de tenir en compte que un bacteri es mou amb la intenció de trobar una font d'energia i que un cop hi arriba, li convé quedar-s'hi per treure'n el major profit. Quan el bacteri arriba a una zona energèticament favorable amb gran disponibilitat de nutrients, els nivells cel·lulars d'ATP augmenten (299), podent actuar com a censor perquè NrdR reprimeixi el moviment i permetent així, que el bacteri pugui treure el major benefici de la zona (Aquesta hipòtesi necessita ser demostrada experimentalment).

### 6.3.2 Implicació de NrdR en el plegament proteic i en la viabilitat cel·lular durant un xoc tèrmic

Per la corroboració fenotípica de la implicació de NrdR en la solubilitat proteica es va utilitzar el vector pVTP1GFP, el qual codifica per una GFP modificada (GFPm) completament funcional i capaç d'emetre fluorescència inclús quan forma cossos d'inclusió (300). Aquest vector es va fer servir per poder detectar l'emissió de fluorescència de la part soluble i insoluble de la soca d'*E. coli* MG1655 i del seu mutant isogènic pel gen *nrdR* (MG1655 $\Delta$ *nrdR2*). L'emissió de fluorescència del vector detectada en la soca MG1655 $\Delta$ *nrdR2* va ser superior en la fracció soluble de la cèl·lula, mentre que en la fracció insoluble ho va ser la soca salvatge MG1655 (Figura 32 i Figura 2 del manuscrit). Per tant es corroboraria fenotípicament que la presència de NrdR és negativa per la solubilitat proteica.



**Figura 32. NrdR està involucrat en la solubilitat proteica.** En el gràfic s'hi troba representada la fluorescència específica GFPm emesa en la part soluble i insoluble de la M1655 i el seu mutant MG1655 $\Delta$ *nrdR2*. La desviació standard així com la significància estadística marcada amb un asterisk, també hi són representades (P<0.05).

D’altre banda, com gens que codifiquen per *Heat Shock Proteins* (HSP) (gens que expressen proteïnes per combatre l’estrès causat per un xòc tèrmic) com ara *ipbA-B* o *htpG* i *grpE* també van reflectir un increment en la seva transcripció en absència de NrdR, es va estudiar la possible implicació d’aquest factor transcripcional en la viabilitat cel·lular a diferents temperatures ambientals. La viabilitat que es va obtenir de la soca MG1655 $\Delta$ *nrdR2* incubada a 42°C va ser 4 vegades superior que en la soca salvatge a la mateixa temperatura. El recompte de viables de la soca salvatge a 42°C va ser  $1.09 \cdot 10^9$  UFC mentre que en la soca MG1655 $\Delta$ *nrdR2* va ser de  $4.23 \cdot 10^9$  UFC (Taula 7 i Taula 5 del manuscrit).

**Taula 7.** Recompte de viables (UFC) de la soca MG1655 i MG1655 $\Delta$ *nrdR2* després de ser incubades a 30, 37 i 42°C.

	30°C	37°C	42°C
<b>MG1655</b>	$1.10 \cdot 10^8 \pm 7.10 \cdot 10^6$	$1.89 \cdot 10^9 \pm 4.15 \cdot 10^7$	$1.09 \cdot 10^9 \pm 2.13 \cdot 10^7$
<b>MG1655<math>\Delta</math><i>nrdR2</i></b>	$6.25 \cdot 10^9 \pm 1.60 \cdot 10^7$	$1.04 \cdot 10^{10} \pm 8.53 \cdot 10^8$	$4.23 \cdot 10^9 \pm 6.70 \cdot 10^7$

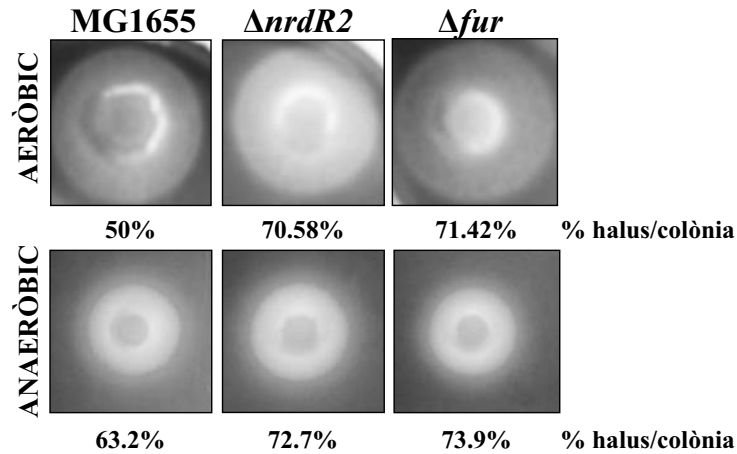
Els valors d’UFC són de 5 experiments independents

NrdR podria estar formant part d’una ret reguladora, juntament amb factor sigma RpoH, a on NrdR reprimiria l’expressió dels gens que codifiquen per xaperones i proteases dependents d’ATP quan la cèl·lula no està patint cap estrès tèrmic. En canvi, en un increment de temperatura a 42°C, RpoH es trobaria induint la transcripció de xaperones i proteases (301), augmentant aquestes en número i capturant tot l’ATP disponible i inhabilitant, conseqüentment, a NrdR. Tot i així, gels de retard mitjançant proteïna purificada NrdR amb els diferents fragments d’ADN de les regions reguladores serien necessaris per corroborar una possible regulació directe.

### 6.3.3 NrdR participa en la captació del ferro

Un dels clúster gènics clarament alterat en l’anàlisi transcripcional és la dels gens involucrats en la captació del ferro i síntesi de sideròfors. La implicació de NrdR en la producció de sideròfors es va corroborar mitjançant la utilització de plaques CAS (256). Aquesta avaluació es va fer tant en condicions aeròbiques com anaeròbiques tenint en compte que l’estat redox del ferro varia segons la disponibilitat de l’oxigen: Fe<sup>III</sup> es troba en condicions oxigèniques i Fe<sup>II</sup> en ambients

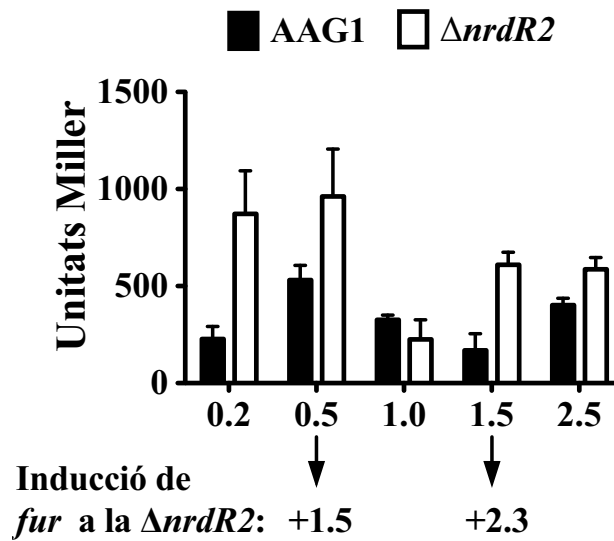
anòxics.  $Fe^{II}$  és més soluble i fàcil de captar pels microorganismes que l'estat de  $Fe^{III}$ . Tant en condicions aeròbiques com anaeròbiques, l'halus que representa la formació de sideròfors va ser superior en la soca MG1655 $\Delta nrdR2$  que en la MG1655. Com a control es va utilitzar la soca d' *E. coli* MG1655 mutant pel gen *fur* (MG1655 $\Delta fur$ ) el qual codifica pel metal·lorepressor Fur: principal repressor descrit dels gens implicats en la captació de ferro (302) (Figura 33 i Figura 3 del manuscrit).



**Figura 33. *NrdR* participa en la captació de ferro cel·lular.** Imatges de la MG1655, MG1655 $\Delta nrdR2$  i MG1655 $\Delta fur$  (utilitzat com a control) sembrades en plaques CAS i incubades en condicions d'aerobiosi i anaerobiosi. Els % de l'hal·lus indicatiu de la producció de sideròfors respecte de la colònia és assenyalat en la figura. Imatge representativa de tres experiments independents ha estat l'escollida per ser mostrada.

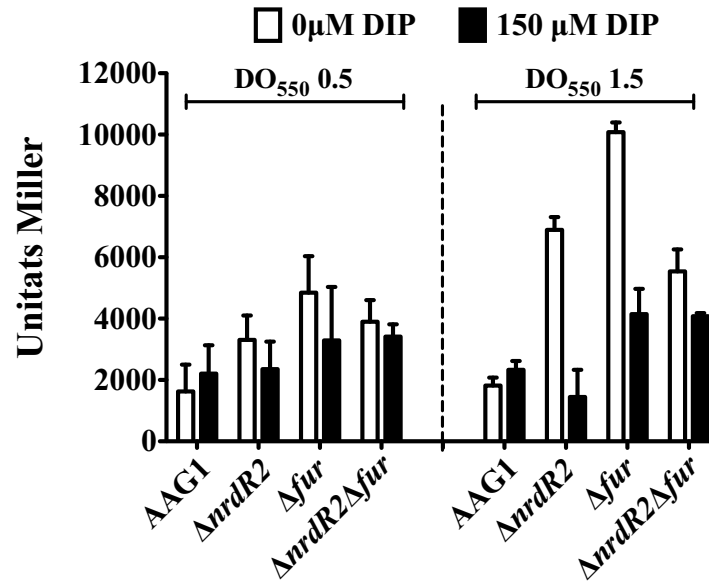
Sabent l'efecte de la proteïna Fur sobre els gens implicats en la captació del ferro, primerament es va procedir a estudiar una possible regulació conjunta de *NrdR* amb el modulador transcripcional Fur. Estudis d'expressió mitjançant el gen reporter *lacZ* van revelar una inducció en l'expressió de *fur* en una soca  $\Delta nrdR2$ , inducció que es va corroborar mitjançant l'amplificació del gen *fur* per *Real Time PCR* d'ARN extret de la soca MG1655 i MG1655 $\Delta nrdR2$  a les mateixes  $DO_{550}$  que es va realitzar l'estudi transcriptòmic global: 0.5 i 1.5 (Figura 34 i Figura 4 del manuscrit).

La inducció de *fur* en la soca mutant *nrdR* corrobora el paper repressor de *NrdR* sobre l'expressió del gen *fur*. Tot i així, una possible regulació conjunta Fur-*NrdR* sobre els gens implicats en la captació del ferro encara quedaria pendent a demostrar.



**Figura 34.** NrdR regula l'expressió del metal·loregulador Fur.  $\beta$ -galactosidassa de la construcció *P<sub>fur</sub>::lacZ* en la soca AAG1 i AAG1 $\Delta nrdR2$  a diferents punts del creixement aeròbic bacterià. La desviació standard de tres cultius independents es assenyalada. A més a més, el grau d'inducció de l'expressió del gen *fur* una soca  $\Delta nrdR2$  mitjançant *Real Time PCR* a  $DO_{550}$  0.5 i 1.5 també és mostrada.

Amb la intenció de descobrir el mecanisme d'una possible regulació conjunta Fur-NrdR, es va procedir a avaluar l'expressió diferencial del gen *entC* (gen involucrat en la síntesi del sideròfor d'enterobactina) en les soques WT,  $\Delta nrdR2$ ,  $\Delta fur$  i  $\Delta nrdR2\Delta fur$  mitjançant estudis de  $\beta$ -galactosidassa. A més a més, aquest estudi es va fer simulant condicions limitants de ferro tot afegint l'agent quelant DIP en el medi. L'expressió de sideròfors s'indueix quan no hi ha ferro en el medi, fet que es va visualitzar amb l'expressió *lacZ* que va donar la fusió *PentC::lacZ* en presència de DIP: superior tant en fase exponencial com en estacionària, que l'expressió que va donar sense l'agent quelant (Figura 35 i Figura 5 del manuscrit).



**Figura 35. Fur i NrdR regulen coordinadament l’expressió de *entC*.** Expressió *PentC::lacZ* en WT,  $\Delta nrdR2$ ,  $\Delta fur$  i  $\Delta nrdR2\Delta fur$  en presència de 0 i 150  $\mu M$  de DIP en fase exponencial i estacionària del creixement aeròbic bacterià. La desviació estàndard de tres experiments independents és assenyalada en el gràfic.

Per altre banda, la  $\Delta fur$  no va fer incrementar els nivells d’expressió de *PentC::lacZ* en presència de l’agent quelant tal i com s’esperava. Aquests resultats són comparables als que es van trobar en un estudi transcriptòmic de Fur en el bacteri *Bacillus subtilis* a on la presència de DIP produïa una disminució de la transcripció dels gens que codifiquen pel sideròfor de tipus Bacillibactin (303). L’expressió de *PentC::lacZ* va donar el mateix patró en la soca  $\Delta fur$  i  $\Delta nrdR2$ , per tant aquests resultats donarien suport a l’acció reguladora de NrdR en la regulació de *entC* encara es necessitarien de més experiments per acabar-ho de corroborar. Per contra, la doble mutació  $\Delta nrdR2\Delta fur$  va resultar en una disminució de l’expressió *PentC::lacZ* en comptes de la inducció sumatòria que s’esperava obtenir en absència dels dos factors transcripcionals. Aquests resultats es van corroborar mitjançant *Real Time PCR* amplificant *entC* d’ARN extret de les soques WT,  $\Delta nrdR2$ ,  $\Delta fur$  i  $\Delta nrdR2\Delta fur$  a DO<sub>550</sub> de 0.5 i 1.5 i tenint com a referència el gen *nrdE*, el qual es troba regulat tant per Fur com per NrdR de manera independent l’un de l’altre (138) (Taula 8 i Taula 6 del manuscrit). Els resultats pel gen *entC* van revelar el mateix patró d’expressió que els obtinguts en els assajos de  $\beta$ -galactosidassa, en canvi, *nrdE* si que va presentar un efecte sumatori en seva transcripció en la soca  $\Delta nrdR2\Delta fur$ .



**Taula 8.** Valors d’inducció donats per *Real Time PCR* de l’expressió *entC* i *nrdE* (control) en  $\Delta nrdR2$ ,  $\Delta fur$  i  $\Delta nrdR2\Delta fur$  respecte la soca salvatge a DO<sub>550</sub> 0.5 i DO<sub>550</sub> 1.5.

<b>DO<sub>550</sub> 0.5</b>	<b><math>\Delta nrdR2</math></b>	<b><math>\Delta fur</math></b>	<b><math>\Delta nrdR2\Delta fur</math></b>
<i>entC</i>	2.62	271.15	8.62
<i>nrdE</i>	8.18	43.22	1.19
<b>DO<sub>550</sub> 1.5</b>			
<i>entC</i>	12.169	1154.78	534.38
<i>nrdE</i>	70.64	60.06	173.50

Un estudi transcriptòmic de la proteïna Fur en *Salmonella enterica* va revelar una inducció de *nrdR* en condicions anaeròbiques en absència del metal·lorepressor (304), per aquest motiu, que es va intentar buscar una caixa consens d’unió del factor Fur en la regió promotora del gen *nrdR* de la soca d’*E. coli* MG1655. Mitjançant la base de dades Colibri ([www.genolist.fr/Colibri/](http://www.genolist.fr/Colibri/)), es va trobar la seqüència consens per la unió del factor Fur en la regió promotora del gen *nrdR*. D’altre banda, un altre estudi va corroborar l’any 2011 el paper repressor de NrdR en condicions d’estrès oxidatiu (12), condicions a on el ferro es troba majoritàriament en estat de Fe<sup>III</sup> i per tant, Fur es troba inactiu sent incapaç de reprimir l’expressió del gen *entC* (mecanisme de regulació de Fur explica’t a l’apartat 3.2.2.2 de la introducció i en la referència (146)).

Ficant tots els resultats junts, en condicions aeròbiques NrdR es trobaria reprimint l’expressió de *fur* mentre que la transcripció basal que hi pogués haver d’aquest factor es veuria inactiva per l’estat del ferro a Fe<sup>III</sup>. Per altre banda, en condicions riques de Fe<sup>II</sup> així com en condicions anaeròbiques, la transcripció basal de Fur seria activa i el complex Fur-Fe<sup>II</sup> revertiria la repressió de NrdR, a més a més de reprimir l’expressió de *entC* (Figura 36 i Figura 6 del manuscrit). Aquest entramat regulador explicaria els nivells similars d’expressió d’*entC* en els mutants simples  $\Delta nrdR2$  i  $\Delta fur$  així com, l’expressió en la soca doble mutant  $\Delta nrdR2\Delta fur$  sense DIP, a on la disponibilitat de ferro no es important ni per Fur ni per NrdR ja que no hi son.

S’ha de tenir en compte que en la natura, i exceptuant ambient extrems, el ferro no es troba totalment limitat, per tant la repressió i des-repressió de Fur i NrdR es donaria de forma gradual, no del tot o res.

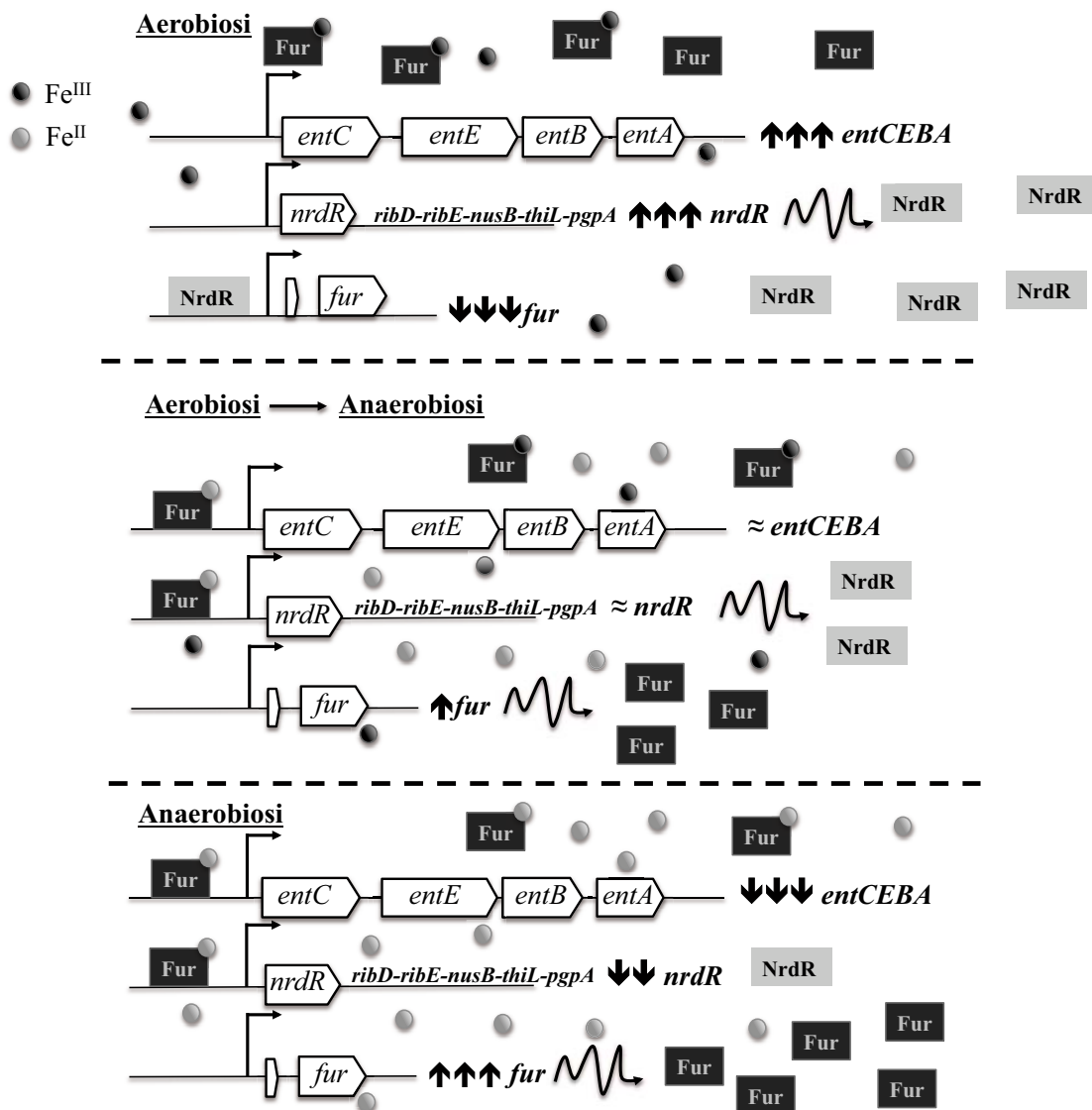


Figura 36. Esquema regulatori proposat per la regulació conjunta del factor transcripcional NrdR amb el metal·loregulador Fur per la modulació de la transcripció de l'operó *entCEBA*. Les esferes gris fosc i gris clar simbolitzen  $Fe^{III}$  i  $Fe^{II}$  respectivament, mentre que el rectangle gris fosc representa el regulador Fur i el gris clar, NrdR.

### 6.3.4 Interaccions directes del factor NrdR sobre els gens transcripcionalment alterats

Abans de procedir a fer estudis d'EMSA per intentar detectar una possible de NrdR sobre els gens que es van trobar transcripcionalment alterats, es va fer un estudi bioinformàtic mitjançant el programa informàtic Colibri World-Wide Web Server ([www.genolist.fr/Colibri/](http://www.genolist.fr/Colibri/)). Gràcies a aquest programa informàtic, es va trobar una

caixa hipotètica d'unió a NrdR (134) en posició -23 pb de la regió promotora de l'operó que codifica per les xaperones *dnaK-J*, així com a la posició -127 pb des del lloc d'inici de transcripció de *grpE*. Seqüències d'unió a NrdR també es van localitzar en els promotors dels gens que codifiquen per les proteases GroS-L i HtpG, a -299 i -47 pb, respectivament, des del lloc d'inici de transcripció gènica indicant una possible regulació directe de NrdR. A més a més, també es va localitzar una caixa amb seqüència AATATCGTTTGT en la regió promotora dels gens implicats en la síntesi del flagell *flhB-A-E* en posició -413 pb des del lloc d'inici de la transcripció.

En canvi, de tots els gens implicats en la captació de ferro que presentaven des-regulació en absència de *nrdR*, només es va poder localitzar una caixa consens d'unió a NrdR en el promotor del gen *fecI* amb seqüència CCACATCATGAGT en posició -191 pb des del lloc d'inici de la transcripció del gen.

**6.3.5 Manuscript: “Genome wide transcriptional analysis of NrdR regulon”**

# **Genome-wide transcriptional analysis of *Escherichia coli* NrdR regulon**

**Maria del Mar Cendra<sup>1</sup>, Eduard Torrents<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Bacterial infection: antimicrobial therapies group, Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC),  
Barcelona, Spain

Keywords: gene regulation, transcriptional factor

Running title: NrdR global *Escherichia coli* gene regulation.

Corresponding authors:

Dr. Eduard Torrents. Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), Cellular Biotechnology. Baldiri Reixac 15-21, 08028, Barcelona, Spain. Tel: +344034756, FAX: +34934020183. Email: [etorrents@ibecbarcelona.eu](mailto:etorrents@ibecbarcelona.eu)

## Abstract

*Escherichia coli* transcriptional profiling of the NrdR protein has been performed. This gene modulator, first described as a transcriptional repressor of Ribonucleotide Reductase (RNR) encoding genes, has revealed an important role on protein folding and degradation, bacterial movement and iron acquisition when MG1655 and its isogenic *nrdR* mutant were checked for a transcriptomic study. For the first time it has been unveiled different NrdR regulatory mechanisms and different genes that belong to it regulon.

## Introduction

Gene expression from all living cells is in continuously modulation in response of environmental changes, it is cooperatively regulated between the physiological state of the cell and transcriptional factors (TF), or other regulators. Transcriptional factors respond to environmental signals and then recognize target DNA sequences on the gene regulatory region and bind to it activating or repressing the transcription initiation, either by controlling their activity or by controlling their expression (305). *Escherichia coli*, the most studied microorganism, encode in its genome for more than 300 genes that are predicted to be transcriptional factors (306), one of them, is the aim of this study: the transcriptional factor NrdR.

NrdR was first identified in 2004 in the bacterium *Streptomyces coelicolor* for regulating the transcription of the two-ribonucleotide reductase (RNR) genes present in this bacterium (133). The prediction of a consensus sequence for NrdR binding on the gene promoters was

discover one year after by Rodionov (134), and more studies of the negative role of its regulation or the description of its presence in other bacteria, has been done since then (135, 307-309). Later on, it was described the NrdR regulatory role on the three-different RNR classes presents in *E. coli* (135). Although there are several studies demonstrating the regulation of different RNR by the NrdR little is known which other genes could be part of the NrdR regulon in *enterobacteriaceae*. Is NrdR regulator restricted on the modulation of RNR gene transcription or it possesses more global regulatory network?

Global transcriptome analysis was performed in the *E. coli* MG1655 $\Delta$ *nrdR2* mutant (135) compared to the wild-type strain with RNA extracted from bacteria growth at exponential and stationary phase. Microarray data revealed a point it out the global character of the NrdR protein to regulate the expression of different genes involved in different biochemical pathways specially those involve in the energy metabolism of the cell, protein solubility and folding and iron acquisition. It has been identified a special role of NrdR transcriptional factor on iron homeostasis and also the importance of the environmental ATP availability for its regulatory action.

## Material and methods

### *Bacterial strains, plasmids and growth conditions*

Strains and plasmids used in this study are described in Table I. *Escherichia coli* MG1655 was used as the wild type for this study. The MG1655 *nrdR* knockout gene was the MG1655 $\Delta$ *nrdR2* described previously (135). MG1655 $\Delta$ *fur* (*fur*::Cm<sup>r</sup>) was constructed by

Datsenko & Wanner method (263) by using the primers listed in table 2 and the MG1655 $\Delta$ *nrdR2* $\Delta$ *fur* was constructed by P1vir mediated transduction (246) by using lysate obtained from MG1655 $\Delta$ *fur*. Strains were grown in Luria-Bertani (LB) (Difco) in standard laboratory conditions of 37°C and 200 rpm. When required, the LB broth was supplemented with kanamycin 30  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, chloramphenicol 30  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, gentamicin 10  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, rifampicin 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> and ampicillin 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>. For the anaerobic experiments, plates were incubated into the GENbag system (Biomerieux). To generate iron restricted conditions, 2-2'-dipyridyl (DIP) 150  $\mu$ M was added to the LB medium.

#### *DNA manipulations*

Plasmid DNA isolation was performed by using the QIAprep spin miniprep Kit (Qiagen) following the manufacturer specifications. Restriction enzymes, T4 DNA ligase, alkaline phosphatase, DNA polymerase (Klenow fragment), DNA-modifying enzymes and 2X PCR master mix for DNA amplifications were purchased from Thermo Scientific and used according to the manufacturer's recommendations.

#### *Plasmids and gene reporter fusions*

To evaluate differential gene expression between strains, promoter DNA fragments were cloned into pUJ8 plasmid to generate transcriptional *lacZ* fusions (252). 398 pb from *entC* promoter were amplified by PCR using PentC EcoRI up and PentC BamHI lw primers (Table 2) and cloned into *EcoRI*-*BamHI* sites of pUJ8 generating the pETS173 (*PentC*-pUJ8) plasmid. For the *fur* gene, 430 pb from its promoter regions were amplified by using P*fur* SmaI up and P*fur* BamHI lw (Table 2) and

cloned into the *SmaI*-*BamHI* sites of pUJ8 generating the pETS171 (P*fur*-pUJ8) plasmid. Both plasmids were checked by sequencing of the DNA construction. For *entC::lacZ* expression studies, *PentC*-pUJ8 was directly transferred to the  $\Delta$ *lacZ* *E. coli* strain AAG1 (Table 1) and other AAG1 knockout genes by transformation. For *fur::lacZ* expression studies, the fragment was inserted into the chromosome. DNA from P*fur*-pUJ8 was isolated and digested with *NotI* and the P*fur::lacZ* fragment was subcloned into the *NotI* sites of the suicide vector pUTminiTn5-Cm (261) previous 5' ending dephosphated in order to avoid autoligation and generating the pETS172 (P*fur::lacZ*-pUTminiTn5Cm). This plasmid was transferred by transformation to the *E. coli* S17 ( $\lambda$ -pir) which expresses the pir protein required for the vector replication. The Rif<sup>r</sup> derivative AAG1 strain was the final recipient of the P*fur::lacZ* fragment transferred from S17 + pETS172 by conjugation. Transconjugants were checked by PCR analysis.

#### *RNA preparation and isolation*

RNA was isolated from three independent aerobic cultures of the MG1655 and the isogenic MG1655 $\Delta$ *nrdR2* grown at an OD<sub>550</sub> of 0.5 and 1.5 (exponential and stationary phase) by using the RNeasy Mini kit (Qiagen) according the manufacturer's instruction. RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen) was used to stabilize and preserve the total RNA before the extraction following the manufacturer's specifications (Qiagen). RNA quantification was done with a NanoDrop spectrophotometer (ND-1000, NanoDrop) and the integrity of the RNA was checked using the Bioanalyser (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions.

#### *Microarray studies and data analysis*

The Affymetrix GeneChip *E. coli* Genome 2.0 Array (Affymetrix) was used to study the *nrdR* profile in the MG1655 strain related to its isogenic  $\Delta nrdR$  mutant. Microarray experiments were performed for triplicate. The microarray data were normalised and processed, genes whose ORFs expression changed 2 or more fold change in the  $\Delta nrdR2$  mutant and presents a  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

#### *Real time PCR*

In order to validate the results of the microarray analysis, Real Time PCR was carried out using specific primers (Table 2) from the mRNA targets and from the *gapA* gene which was used as an internal control. 1  $\mu$ g of total RNA from MG1655 and MG1655 $\Delta nrdR2$  mutant was retrotranscribed to cDNA using the SuperScript<sup>TM</sup> III Reverse transcriptase kit (Invitrogen) following the manufacturer's specifications. 1  $\mu$ l of cDNA was mixed with 1  $\mu$ l of TaqMan designed probe (Applied Biosystems), 12  $\mu$ l of TaqMan<sup>®</sup> universal master mix II no UNG (Applied Biosystems) and 10  $\mu$ l of nuclease free water. When SYBR green protocol was used, 1  $\mu$ l of cDNA was mixed with 0.5  $\mu$ l of reverse primer and 0.5  $\mu$ l forward primer, 12  $\mu$ l of Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 10  $\mu$ l of nuclease free water. The 20  $\mu$ l reaction was placed into a MicroAmp plate and the detection was performed using the StepOnePlus<sup>TM</sup> Real-Time PCR System (Life Technologies).

#### *Motility*

Motility was evaluated using soft-LB agar (Difco) plates. 0.25% agar with the the following chemoattractants: 2 mM D-glucose, 2 mM maltose, 2 mM L-serine and 2 mM L-

glucose, and the chemorepellent 2 mM L-valine. Overnight cultures of both strains were adjusted at OD<sub>550</sub> of 1 and 5  $\mu$ l of each culture was spotted onto de surface of the soft-agar plate. Motility plates were incubated for 12 hours at 30°C, after the incubation, the diameter of the motility halus from the WT and its isogenic  $\Delta nrdR$  were measured. Three independent experiments were performed for statistical significance.

#### *Protein folding*

To explore the differential control of solubility of MG1655 and MG1655  $\Delta nrdR2$ , the plasmid pVTP1GFP (310) was transformed into both strains. This plasmid encodes for a misfolding-prone fusion version of GFP (mGFP), which can only emit fluorescence when is properly folded and mature. MG1655 and  $\Delta nrdR$  carrying pVTP1GFP plasmid were grown at 37°C and 200 rpm at OD<sub>550</sub> of 0.5. At this point, 1 ml of each culture was centrifuged and the supernatant was discarded and the pellets were lysed using the BugBuster<sup>®</sup> extraction reagent (Novagen) following the manufacturer instructions. After the lysis protocol, samples were centrifuged for 15 minutes at 14.000 rpm and the supernatants were separated carefully from the pellets. Fluorescence emission was measured in the supernatant and in the pellet part from both strains. Three independent experiments were done for statistical deviations.

#### *Bacterial viability at different temperatures*

Serial dilutions from MG1655 and MG1655 $\Delta nrdR2$  overnight cultures were plated in LB-agar and incubated at 30, 37 and 42°C for 12 hours. After incubations the colony forming units (CFU) from each plate were counted.

#### *NrdR* protein overexpression

*nrdR* gene was amplified by using *nrdR*-Biotin-up and *nrdR*-Biotin-lw listed in table 2 and cloned into the C-terminal of the pAviTag-C N-His SUMO Kan vector (Lucigen) following the manufacturer instructions resulting the pETS174 (pAviTag-*nrdR*) plasmid (Table 1). This vector allowed the expression of biotinylated and C-terminal 6xHis tagged *NrdR* called AviTag, which is easily to purify either by using Pierce<sup>TM</sup> Streptavidin Magnetic Beads (Thermo scientific) for its high affinity to streptavidin or by using a FPLC. Moreover a SUMO target also is added to the construction allowing an On-column cleavage of the recombinant protein with SUMO Express protease. The recombinant *NrdR* construction on pAviTag-C N-His SUMO Kan vector was *NrdR*-SUMO-AviTag-Biotin.

#### *ATP and dATP binding to NrdR* evaluation

Exponential and stationary phase from aerobic and anaerobic cultures of Biotin XCell F'-pAVITag-*nrdR* were centrifuged and lysed using BugBuster<sup>TM</sup> Protein extraction Reagent (Novagen). *NrdR* protein from each environmental condition was purified from the collected supernatants by using Pierce<sup>TM</sup> Streptavidin Magnetic Beads following the manufacturer recommendations. Elution of *NrdR*-SUMO-AviTag-biotin from streptavidin was done with glycine pH 2 and neutralized with K<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub> to a pH of 6-7. ATP/dATP evaluation from each sample was carried out by analytic chromatography.

#### *Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)* (pendent to be performed)

Gel electrophoretic mobility shift assay was performed using DNA probes obtained by PCR

amplification by using primers listed in Table 2 containing 441 nt of *nrdHIEF* (used as a positive control), 426 nt of *entCEBA* and 326 nt of *nrdR* (used as a negative control) promoter regions and adjusted at 50 ng/μl, 1μl of each DNA was used for the assay. Binding reactions were carried out at 37°C and at the same conditions as described previously (135) in binding buffer (20 mM Tris-HCl, 5 % glycerol, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM KCl and 1 mM DTT) at 0, 1, 2.5 and 5 μg of *NrdR* purified protein in a 20 mM Tris-HCL, 50 μl glycerol and 50 μl ZnCl<sub>2</sub> protein buffer. The binding complexes were resolved on a 1 % agarose gel in TBE (Tris-borate-EDTA) 0.5X buffer at 4°C. After ethidium bromide stain, retarded DNA was visualised by using the Gel Doc<sup>TM</sup> XR+System (Bio-Rad) and the images were analysed by Image Lab 3.0.1 (Beta 2) software (Bio-Rad).

#### *Siderophore production*

For siderophore production evaluation, Chrome Azurol S (CAS) plates were prepared as described previously (256). Bacterial overnight cultures of MG1655 and MG1655Δ*nrdR2* were adjusted to an OD<sub>550</sub> of 1 and 5 μl from each culture was spotted onto the CAS plates and incubated for 12 hours at 37°C. The siderophore chelates the Fe<sup>III</sup> from the agar, promoting a change from blue colour to orange on the surrounding where the culture was spotted. The diameter of the siderophore produced halo was measured from three independent experiments were performed for standard deviations and statistical significance.

#### *β-galactosidase activity assay*

Overnight cultures were 1/100 diluted in fresh LB medium and grown aerobically at 37°C with shaking at 200 rpm. 100 μl of sample



from each strain grown at the required OD<sub>550</sub> was used for the  $\beta$ -galactosidase assay as described previously (246). Values for *lacZ* activities were calculated as reported in Miller units from three independent cultures.

## Results and discussion

### *Transcriptional analysis of NrdR regulon in the E. coli MG1655*

A comparison between the transcriptomic profiles of the MG1655 $\Delta$ *nrdR2* mutant compared to parental the wild-type strain was performed in order to check the role of NrdR on the *E. coli* MG1655 gene expression at exponential and stationary phase of the bacterial growth. *E. coli* whole-genome Affymetrix GeneChips (Material and Methods) were used throughout this study. The GeneChip *E. coli* Genome 2.0 Array contains approximately 10.000 probe sets for the 20.366 genes presents in the *E. coli* K-12 MG1655 strains and the three following pathogenic *E. coli* strains: the uropathogenic CFT073, the enterohemorrhagic O157:H7 EDL933 and the enterohemorrhagic O157:H7 Sakai strain. Our results show that among 312 open reading frames changes their expression in absence of *nrdR* at exponential phase with 176 genes up-regulated and 136 down-regulated. In contrast, at stationary phase 597 genes were found to have altered transcription with 268 up-regulated and 329 down-regulated. Our results demonstrate the importance of NrdR in regulating global genomic expression. *E. coli* RNR genes are known to be regulated by NrdR (135) as a control, we obtain the RNR transcriptional operon *nrdH-I-E-F* up-regulated 3.652, 3.312, 3.168 and 3.354 at OD<sub>550</sub> of 0.5 and 6.172, 5.655, 4.442 and 5.010 at OD<sub>550</sub> of 1.5 for *nrdH-I-E-F* respectively.

As is detailed in table 3, distinguished amino acid metabolism clustered genes change their expression in MG1655 $\Delta$ *nrdR2*. The entire *tnaCAP* operon for tryptophanase synthesis show an important up-regulation of 2.078, 2.357 and 1.289 logFC respectively in absence of NrdR. Moreover, NrdR reflect a role on the whole histidine biosynthesis operon *hisGDCBHAFI* that increases their expression. Nucleotide metabolism clustered genes as *yeeR*, *yeeS* and *yeeT* for DNA repair RADC family protein were affected for the *nrdR* deletion decreasing their transcription -2.7, -1.923 and -0.834 logFC and being the few genes negatively affected by NrdR. At stationary phase, genes involved in DNA replication are deregulated, the initiator replication protein encoding gene *dnaA*, moreover the primosomal protein I and the helicase DnaD, encoded in the operon *dnaT-C*, up-regulate their expression in MG1655 $\Delta$ *nrdR2* strain. It is also very significant the induction reflected on the *flu* gene in both grow stages of the growth, where microarray data indicate the positive regulation of NrdR since it deletion promotes a -2.756 and -2.37 logFC gene expression repression at exponential and stationary phase respectively. At stationary phase, it is also remarkable the 26 down-regulated genes involved in anaerobic respiration suggesting a possible inducing role of NrdR in oxygen limitation. Nevertheless all this interesting de-regulated gene clusters, the present study will be focused in the motility involved ORFs, chaperone and protein folding related genes and finally in the siderophore synthesis and iron related genes cluster and the relation between NrdR and the iron.

Genes involved in taxis exhibited an up-regulation on their expression in MG1655 $\Delta$ *nrdR2*. The flagellum assembly genes

*fliL*, *fliM*, *fliR*, *fliC*, *fliG*, *fliH*, *fliE*, *fliC*, *motA*, *flgK-L*, *flgI* *flgJ* and *flhB-A-E* exhibited and up-regulation at exponential phase whereas at stationary phase *flgF*, *flgK*, *fliA*, *fliZ* and *fliP* where the ones that present down-regulation. Any gene repressed at exponential phase was found repeated at stationary phase in absence of NrdR. *motA* encodes for the proton-conducting channel and is the responsible to apply the force for the flagellar rotation, moreover participates in the switching from clockwise (CW) to counterclockwise (CCW) rotation (311, 312), displayed reduced expression on either exponential and stationary phase in the microarray data.

The cytosolic chaperones and proteases *clpB*, *dnaK-J*, *groS-L*, *clpB*, *hslO*, *hslV-U* and *lon* moreover of the *heat shock proteins* (HSP) *ibpA-B*, *hspG* and *grpE* show an up-regulation in their expression when NrdR is not present at the exponential phase. Instead the induced transcription levels of that protein metabolism involved genes are not high at all, the fact that all of them increases their expression let us to think the involvement of NrdR on the protein solubility and degradation. Interestingly, *dnaK-J*, *groS-L*, *clpB*, *hspG*, *lon* and *hslV-U* translated

proteins that also requires from the ATP binding to play their roles on protein refolding and facilitating the proteolysis of missfolded and unstable proteins (313-317).

The microarray data also revealed that the entire operon for enterobactin siderophore biosynthesis operon *entCEBA* is affected when NrdR is not present. The whole operon increases, with a clearly polar effect, 1.537, 1.388, 1.2, 0.903 logFC respectively, their expression in an  $\Delta nrdR2$  at stationary phase. Moreover, genes involved in the two ABC-type transporter systems for Fe-siderophore, from the three existed, uptake: FhuACD for ferrichrome transport and FecABCDE for ferric-citrate uptake (318), exhibited an up-regulation in the MG1655 $\Delta nrdR$  (Table 3). The third ABC transport system FepBDGC, which mediates the transport of periplasmic ferric-enterobactin to the cytoplasm have not show de-regulation on its transcription in absence of NrdR but *fes*, which encode for a protein accused to hydrolysed the ferric-enterobactin, revealed a variation in its expression in that condition.

**Table 3. Differentially expressed genes in MG1655 $\Delta nrdR$**

<b>OD<sub>550</sub> 0.5</b>			
<b>Bacterial Motility and Taxis</b>	<i>flhE flgI flgJ flgK flgL flhB fliC fliE fliF fliG fliH fliL fliM fliR motA fimG fimH fimB ydeQ ydeR</i>	18	2
<b>Nucleotide Metabolism</b>	<i>guaA guaB purB purP purC purD purE purF purH purK purL purM purN purT pyrB pyrI codA codB nrdH nrdI nrdE nrdF nrdD yeeR yeeS yeeT</i>	5	16
<b>Protein Folding and Chaperones</b>	<i>clpB dnaJ dnaK groL groS grpE hslO hslU hslV htpG yhcA lon ibpA ibpB mdtJ mdtI</i>	16	-
<b>Amino Acid Metabolism</b>	<i>gltB gltD hisA hisB hisC hisD hisF hisG hisH hisI leuC leuD livM meta pheA thrA thrB tnaA tnaB tnaC trpE trpL glnA glnG glnH glnP</i>	26	-
<b>Transporters</b>	<i>dppD dppF pstA pstB kdpA kdpC nupG nupC mglB mglA mglC xylG yeeE</i>	7	6
<b>Cell Wall and</b>	<i>dppB dppC entD fdnI narU oppC pgaA pgaB pgaC uhpB uhpC uidC ydhC yjeM cvpA emrA emrB glpC</i>	14	9

<b>Organelle</b>	<i>kdpA kdpC xanP ygiM nagE</i>		
<b>Response to Abiotic Stimulus</b>	<i>cspG hslR ygaY fel kate</i>	3	2
<b>Transcription</b>	<i>atoC hha mcbR putA soxS ycaN yihL stpA</i>	3	5
<b>OD<sub>550</sub> 1.5</b>			
<b>Cell Motility and Taxis</b>	<i>flgF flgK fliA fliZ fliP flhD motA cheA tar fimG hofB yraK</i>	9	3
<b>Nucleotide Metabolism</b>	<i>apt gpt guaA guaC nrdA nrdB nrdH nrdI nrdE nrdF nrdD nrdG nupC tdk udk dnaA dnaC dnaT mioC dinD dinI sbmC exoX yeeS yeeR</i>	20	5
<b>Siderophore and Iron related genes</b>	<i>entA entB entC entE entF fecA fecC fecI fepB fes fhuA fhuC fhuD fhuF fiu ftnB efeO efeB efeU</i>	18	1
<b>Amino Acid Metabolism</b>	<i>gltB gltD leuL leuO melA hisL mmuM tdcA tdcB tdcC tdcD aroH astA astD avtA dada gdhA lysA meta metK pabB pheP proB proY pth sstT yadB yneH</i>	20	8
<b>Cell Wall and Organelles</b>	<i>narU ydhC abrB dcuC evgS fucP hybC kefB napC narG nikC yfiB zraS actP ampG aqpZ bcr chaA emtA focA frlA fsr fxsA mdtJ setB shiA spr tolQ trkG ydda ydeE yebQ yeeO yhiI yojI znuB frdC amiA amiC dacB</i>	29	11
<b>Anaerobic Respiration</b>	<i>des dmsC fdnG fdnH fdnI frdC glpE hyaB hybB hybD hybO hypE napB napC napG napH narH narI narJ nikD nikE nrfA nrfB nrfC nrfD nrfG ugpA yijW</i>	26	2
<b>Transcription</b>	<i>ascG caiF csgD deoR hcaR idnR marR melR mhpR pdhR rstA sdiA ycjW ydcI yedW yihW yjiR slyA tdcR metR</i>	16	4

#### Validation of *NrdR* microarray data

In order to validate the microarray data, real time PCR using Taqman and SYBR green system was performed. *cplB* was selected for the xaperones and proteases cluster, *fliC* for motility genes cluster and *entC* as a representation of the iron related genes. These three clusters were chosen to continue the study. Additionally, to completely ratify the *NrdR* microarray data,

randomly genes were selected to be validated by real time PCR: *yeeR*, *xylG*, *purD* and *flu* were chosen for validate OD<sub>550</sub> 0.5 condition and *flu*, *caiF* and *gltB* for OD<sub>550</sub> 1.5. cDNA of *nrdE* was amplified from total RNA at both OD<sub>550</sub> as a positive control. As is shown in table 4, real time experiment shows the same gene induction pattern in the MG1655Δ*nrdR2* as compared to the microarray data.

**Table 4. Real time PCR results from the differentially expressed genes in MG165Δ*nrdR2***

OD <sub>550</sub> 0.5	Microarray logFC	Real Time PCR
<i>yeeR</i>	-2.706	-18.86
<i>flu</i>	-2.756	-5
<i>purD</i>	-2.284	-1.44
<i>fliC</i>	0.646	1.21
<i>clpB</i>	0.6392	1.88
<i>xylG</i>	0.7299	3.306

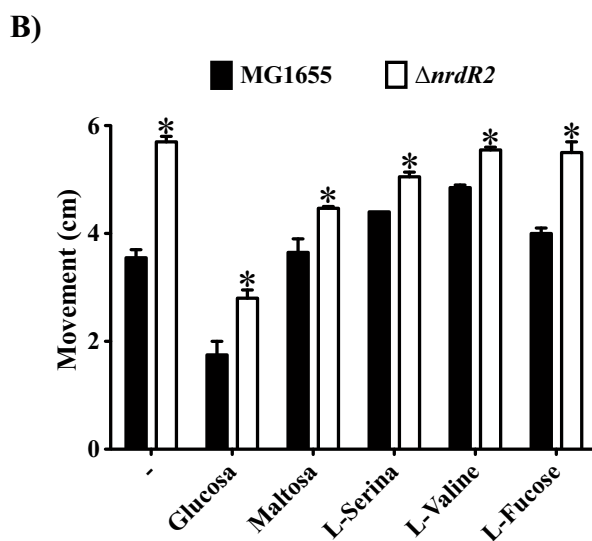
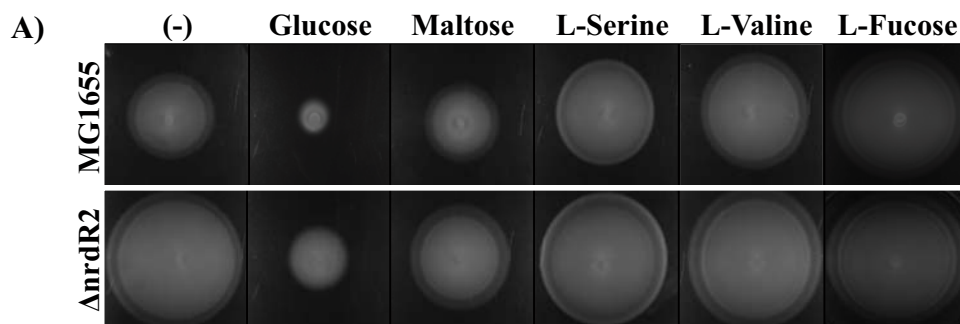
<i>nrdE</i>	3.185	6.54
<b>OD<sub>550</sub> 1.5</b>		
<i>flu</i>	-2.37	-17.85
<i>caiF</i>	-1.128	-1.516
<i>gltB</i>	0.85	1.16
<i>entC</i>	3.47	1.573
<i>nrdE</i>	4.442	71.699

#### Role of NrdR in *E. coli* MG1655 motility

To further corroborate the NrdR implication on MG1655 motility, swimming patterns on semi-solid agar plates were compared between both strains. The phenotypic experiment was performed in presence of four different chemoattractants D-glucose, maltose, L-serine, L-fucose moreover of the chemorepellent L-valine. When bacteria encountered a chemoattractant they swim towards the attractant, whereas when a chemorepellent is present, bacteria tumbles in order to prevent the swimming into the repellent (297). As is represented in figure 1A, in all conditions tested, the MG1655 shows more impaired motility than its isogenic *nrdR* mutant, after 12 hours incubation at 30°C. We are not able to explain the effect with the repellent Valine, but in the other conditions our results are in complete agreement with the microarray data and the effect of NrdR in bacterial motility. Energy generation is an essential process required for all living cells. Cells take the substrate and they enzymatically transform it to ATP, the energetic molecule used for the biological processes (319). Bacteria can sense an energy source via

different sensor called *Methyl-accepting Chemotaxis Proteins* (MCP), and mediating target motility genes, they start to rotate their flagella to move through them (320).

Other motility clustered genes show down-regulation when NrdR is not present in the cell, and it has been clearly shown the phenotypic effect of MG1655Δ*nrdR2* related to the WT on soft-agar movement demonstrating the NrdR effect on that conditions. The machinery for flagellum rotation requires the ATP, which is also sensed by NrdR, in a WT strain, when the transcriptional factor is playing their role on transcriptional regulation, could be capturing the available ATP provoking a limitation for the flagella movement somehow like the effect of ATPase activity of carvacrol on the flagellum synthesis on the *E. coli* O157:H7 (298). Also, bacterium senses energy sources in order to swim towards and taking up them, therefore once the bacteria is on the energy source zone it is important to stop the flagella to stay. While bacteria are approaching to that zone, intracellular ATP starts to increase (299) may being the signal for NrdR to capture them and resulting in a repression of bacterial motility.



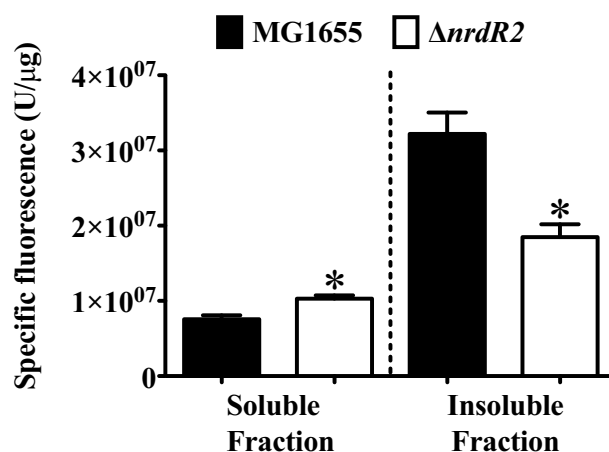
**Figure 1. MG1655 and MG1655 $\Delta nrdR2$  movement on soft-agar.** **A)** Changes between the halus motility of the WT and its isogenic *nrdR2* mutant in different chemo-attractant/repellent condition are represented. **B)** Diameters of MG1655 and MG1655 $\Delta nrdR2$  movement on soft-agar plates. Centimetres values of each motility halus diameter in presence of D-glucose, maltose, L-serine, L-valine, L-fucose from three independent experiments are shown. Statistically significance is marked with an asterisk \* ( $P < 0.05$ ).

*NrdR* regulates genes involved in protein solubility and heat protection

If *NrdR* plays a role on the regulation of genes involved in protein solubility, according to the microarray data, in *nrdR* mutant it is expected to obtain more missfolding and unstable proteins in the cell, being them aggregated in the insoluble fraction from the cell. To corroborate that hypothesis, the vector pVTP1GFP was used (300). This vector encodes for an engineered GFP protein and its emission was successfully used to check the differential conformational and mature quality of the proteins. That vector was transferred to the MG1655 and to its isogenic  $\Delta nrdR2$  mutant with

the finality to measure the GFP fluorescence emission from the soluble and the insoluble part of both strains. In figure 2 it is shown the GFP fluorescence emission from each soluble and inclusion bodies states. In the soluble part the fluorescence detected from MG1655 $\Delta nrdR2$  was higher and, however, much less diminished than the emission detected on the insoluble part.

The results phenotypically confirm the effect of *NrdR* in the transcriptional regulation of cytosolic chaperones and proteases as DnaK, GroL, GroS, GprE, or ClpB, which are crucial for the proper folding of the proteins (315, 316, 321-323).



**Figure 2.** Specific mGFPs fluorescence of the pVTP1GFP from the soluble and insoluble part of MG1655 and MG1655Δ*nrdR2* is presented in the graph. Statistically significance is marked with an asterisk ( $P<0.05$ ) and standard deviations from three independent experiments are shown in the plot.

This protein also showed its activity in heat shock stress due to the up-regulation of the genes encoding for the heat shock proteins IpbA, IpbB, HtpG and GrpE and others chaperones involved in the thermo stabilization of proteins in absence of NrdR. Several dilutions of MG1655 and MG1655Δ*nrdR2* were plate and incubated a

different temperature: 30, 37 and 42°C in order to study the possible induced action of the heat shock proteins (Table 3). Table 5 shows the viable WT and Δ*nrdR2* cells (CFU) grown at 30, 37 and 42°C.

**Table 5.** Number of MG1655 and MG1655Δ*nrdR2* CFU counted after incubation at 30, 37 and 42°C.

	30°C	37°C	42°C
<b>MG1655</b>	$1.10 \cdot 10^8 \pm 7.10 \cdot 10^6$	$1.89 \cdot 10^9 \pm 4.15 \cdot 10^7$	$1.09 \cdot 10^9 \pm 2.13 \cdot 10^7$
<b>MG1655Δ<i>nrdR2</i></b>	$6.25 \cdot 10^9 \pm 1.60 \cdot 10^7$	$1.04 \cdot 10^{10} \pm 8.53 \cdot 10^8$	$4.23 \cdot 10^9 \pm 6.70 \cdot 10^7$

Results of CFU showed are obtained from five independent experiments.

When cells are suffering a heat shock stress at 42°C the synthesis of heat shock proteins increases, driven through the RpoH ( $\sigma^{32}$ ). This protein is implicated in the transcription of more than 30 genes from its regulon to combat the heat stress (301, 324-326). In this experiment,  $4.23 \cdot 10^9$  cells (CFU) were found in the mutant strain at 42°C compared to the WT ( $1.09 \cdot 10^9$  CFU). Generally, the experiment revealed a

tendency of more viability of MG1655Δ*nrdR2* strain than the WT.

It is known the regulatory network between the sigma factor RpoH and chaperone system DnaK-DnaJ-GprE and between RpoH-GroSL on the heat shock response with a feedback regulation. The sigma factor enhances the transcription of that HSP and they quickly turnover RpoH levels by sequestering the chaperones away from the sigma factor (301, 323, 327, 328). Moreover, a

set of cytosolic proteases as HslV-U, Lon or ClpP which also present induction in an MG1655 $\Delta nrdR2$ , additionally participate on RpoH degradation when the cellular heat stress is gone (327, 329). *In vivo* studies have shown the limited levels of DnaK-DnaJ proteins at normal physiologic conditions (330). One hypothesis could be that NrdR take part in the regulatory network to maintain the levels of the heat shock proteins in those homeostatic conditions. In all this regulatory system, ATP is the limitant molecule: DnaK and GroEL are a type of Hsp70 chaperones which bind ATP at the N-terminal producing conformational changes in the C-terminal domain altering their affinity to the substrate (313). GprE is a thermosensor protein that decreases its efficiency in ATP/ADP turnover at high temperature and together with DnaJ control the ATP turnover to ADP from DnaK (331). NrdR could be acting by repressing the transcription of the different operon sets of chaperone and proteases ATP dependent when cell is not suffering any thermo shock, when, temperature shifted to 42°C, RpoH activates the expression of chaperones and proteases which start to capture all the ATP available, avoiding the NrdR to bind it and de-activating the transcriptional factor, promoting the de-repression of their regulon and helping the HSP and protease transcription to combat the stress.

#### *ATP effect on NrdR regulatory action.*

Analysis of NrdR purified protein was performed in order to evaluate the preferred NrdR cofactor: ATP or dATP. NrdR protein from aerobic and anaerobic *E. coli* cultures carrying the pETS174 plasmid grown at exponential and stationary phase was analysed.

#### *NrdR effect on iron adquisition: Siderophore production*

Bacterial metabolism requires iron. In nature, iron can be found into two different oxidation states: Fe<sup>III</sup> in aerobic conditions and, into Fe<sup>II</sup> under anaerobic conditions. Fe<sup>III</sup> is poorly soluble in water and produces difficulties for bacteria to uptake it, for this reasons is required from chelator proteins, named siderophores, for its incorporation. Instead, ferrous iron is more soluble and easily to take (332, 333). The capacity to secrete a siderophore, is also a virulent attribute for pathogen bacteria which capture iron from the iron containing proteins from the host (334). As it has been mentioned above, there are described three different Fe<sup>III</sup> siderophore receptors: FepA, a ferric enterobactin transport, FhuA, a ferric hydroxamate transporter, and FecA, a ferric citrate transporter. In Gram-negative bacteria and few Gram-positive its secreted the enterobactin siderophore (335) this siderophore is transcribed in the operon *entCEBA*. Surprisingly this operon up-regulated in the  $\Delta nrdR2$ . In that genotypic background the *fecABCDE* iron transporter operon, moreover of its regulator expression *fecI* (336), were also affected presenting induction on their transcription. In order to find out the implication of NrdR on iron acquisition system, phenotypically studies started evaluating the different capacity of MG1655 and its isogenic *nrdR* mutant on siderophore production on CAS-agar plates. In this experiment, and knowing the importance of oxygen in the iron oxidation state, aerobic and anaerobic condition of plates incubation were tested. The siderophore halus dimension was compared in the MG1655 $\Delta nrdR2$  relative to the MG1655 in different oxygen condition and as is shown in figure 3, siderophore halus obtained after 12 hours

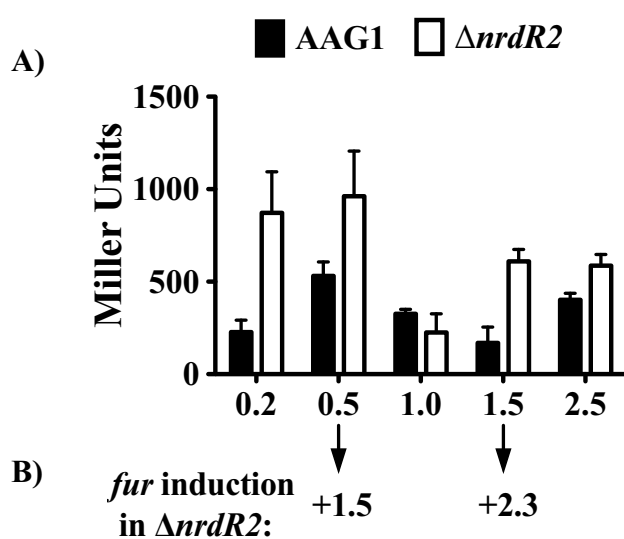
incubations is more than 20% higher in the mutant than in the WT both aerobic and anaerobic conditions. MG1655 $\Delta fur$  was taken as a control for the universal knowledge of the implication of the *ferric uptake regulator* (*Fur*) on the regulation of iron acquisition in bacteria (302), resulting in the same result.

*NrdR* effect on iron acquisition: via *fur* regulation?

*Fur* is a metalloregulator that in iron replete environment binds to  $Fe^{II}$  with high affinity in order to repress the transcription of the genes from its regulon. As it has been commented above, *Fur* is the principal regulator of the iron acquisition of the cell preventing of the iron overload (302, 337). We next wanted to asses a possible collaborative of *Fur* and *NrdR* regulation for iron homeostasis.

*Pfur::lacZ* reporter fusion was constructed in order to test the possible effect of *NrdR* on *fur* expression.  $\beta$ -galactosidase assay revealed induced levels of *Pfur::lacZ* expression in

$\Delta nrdR2$  strain related to the WT at different points of the bacterial growth (Figure 4A). It is interesting to remark two picks of induction at initial exponential phase and at mid stationary phase where the Miller units detected for *Pfur::lacZ* are almost the triple in the mutant. RNA was extracted at  $OD_{550}$  of 0.5 and 1.5 from both strains in order to corroborate the reporter expression results. cDNA amplification by *Real Time PCR* using SYBR green reaction revealed a 1.5 and 2.3 *fur* induction in  $\Delta nrdR2$  strain at exponential and stationary phase, respectively, compared to the WT (Figure 4B). According to those results, *NrdR* modulates *fur* expression even though this does not mean that *Fur* is implicated on *NrdR* regulation of iron related genes. *entC* was chosen as a representative gene from iron homeostasis because of its whole *entCEBA* operon significance deregulation in  $\Delta nrdR2$  strain.

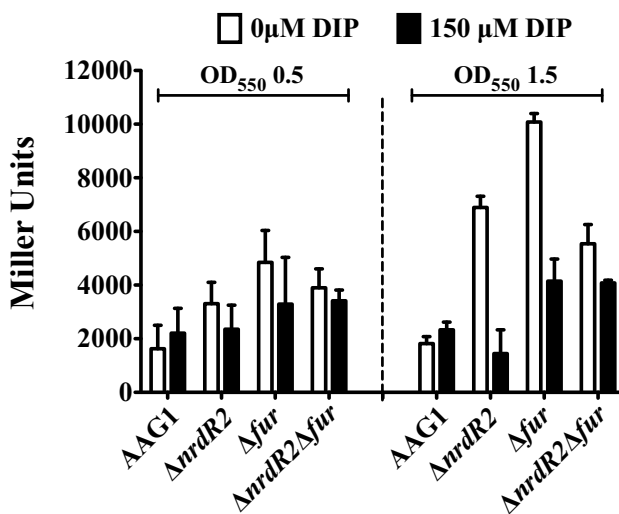


**Figure 4. *NrdR* modulates *fur* transcription.** **A)**  $\beta$ -galactosidase values of *Pfur::lacZ* in WT (black bars) and in  $\Delta nrdR2$  (white bars) at different points of bacterial growth. **B)** Real Time PCR results: *fur* induction values in  $\Delta nrdR2$  related to the WT at  $OD_{550}$  0.5 and 1.5. Induction factor is from an average from three independent experiments results.



To evaluate *entC* expression on that mutant background, promoter region from *entC* was cloned into the pUJ8 carrying the *lacZ* reporter gene (Material and Methods) and then, the plasmid was transferred to the AAG1, AAG1 $\Delta$ *nrdR2*,  $\Delta$ *fur* and  $\Delta$ *nrdR2* $\Delta$ *fur* strains. The experiment was carried out by inducing the cultures with 150  $\mu$ M of the iron chelator DIP for 30 minutes at OD<sub>550</sub> of 0.3 and 1, to finally check the *lacZ* reporter expression at OD<sub>550</sub> of 0.5 and 1.5 under iron restriction conditions. When all the iron is chelated from the environment, bacteria induce siderophore expression and this is corroborated in figure 5 where *lacZ* expression corresponding of *PentC::lacZ* of the AAG1 is higher either at exponential as at stationary phase in presence of the chelator agent. As it was expected, in  $\Delta$ *fur* strain *entC* expression was

strongly induced, especially at stationary phase. Higher *entC* expression was expected to obtain in presence of the chelator than without it when Fur, its principal described repressor, was not present but clearly, the results revealed the opposite. That result is comparable with the results obtained in a Fur microarray in *Bacillus subtilis* where the presence of DIP also revealed down-regulation of *dhbACEBF* encoding for Bacillibactin Siderophore (303). The data obtained for *PentC::lacZ* expression in  $\Delta$ *nrdR2* follows the same pattern than for  $\Delta$ *fur* strain in all conditions checked and also, being less expressed in presence of DIP. According to those results, NrdR will be playing an important role on *entC* expression because of the induced expression obtained in  $\Delta$ *nrdR2* where Fur is regulating properly.



**Figure 5. Fur and NrdR protein role on *PentC::lacZ* expression in different iron availability conditions.** Miller values from pETS173 plasmid in WT,  $\Delta$ *nrdR2*,  $\Delta$ *fur* and  $\Delta$ *nrdR2* $\Delta$ *fur* background in presence of the chelator DIP (black bars) or not (white bars) are plotted.  $\beta$ -galactosidase assayed samples were taken aerobically at OD<sub>550</sub> 0.5 and 1.5. Expression deviation values from three independent experiments are marked in the plot.

When *entC* expression was checked in the double mutant  $\Delta$ *nrdR2* $\Delta$ *fur* an additive induction effect was anticipated to obtain, unexpectedly, double mutation promoted a decrease on *PentC::lacZ* expression. *lacZ* reporter expression results were corroborated by doing a Real Time PCR *entC* from RNA

extracted at OD<sub>550</sub> of 0.5 and 1.5 in all that mutants strains moreover of the WT. *nrdE* was used as a control because our previous knowledge of Fur and NrdR independent regulation on its expression (138) (Table 6). As it was expected, *nrdE* expression showed an additive de-regulatory effect in absence of NrdR

and Fur proteins, on the other hand, and according to the results obtained with the *PentC::lacZ* studies, *entC* presented more diminished expression in the double mutant

strain than in the simple and independently *nrdR* and *fur* mutant.

Moreover, sequence target of Fur binding was found on *nrdR* promoter by using Colibri

**Table 6. Real Time PCR gene induction values.**

<b>OD<sub>550</sub>0.5</b>	<b><math>\Delta nrdR2</math></b>	<b><math>\Delta fur</math></b>	<b><math>\Delta nrdR2\Delta fur</math></b>
<i>entC</i>	2.62	271.15	8.62
<i>nrdE</i>	8.18	43.22	1.19
<b>OD<sub>550</sub>1.5</b>			
<i>entC</i>	12.169	1154.78	534.38
<i>nrdE</i>	70.64	60.06	173.50

database ([www.genolist.fr/Colibri/](http://www.genolist.fr/Colibri/)). and other microarray studies revealed an *nrdR* up-regulation in a  $\Delta fur$  *Salmonella enterica* under anaerobic conditions were the is more soluble iron Fe<sup>II</sup> (304). Additionally, studies have corroborated the active NrdR repressive role during H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (12) oxidative condition where environmental iron is predominantly Fe<sup>III</sup>, in a situation where Fur is not functional, NrdR is. As it had not possible to find a NrdR box on *entC* promoter by informatics methodes (EMSA assay with purified NrdR from pAviTag-NrdR construction is pendent to be performed with *PentC* DNA fragment), and as it has been corroborated a NrdR effect in *fur* expression, a possible a feed-back regulation between the two transcriptional factors it is more than probable hypothesis. Under aerobic conditions Fe<sup>III</sup> state is predominant on the environment provoking a de-activation of Fur regulatory action, in that oxygenic condition, NrdR will be acting by re-forcing that repression, whereas under anaerobic or, in a plenty iron conditions, Fur-Fe<sup>II</sup> will repress *entC* expression, increasing its own expression and furthermore, reverting the repression NrdR is doing on its expression by modulating *nrdR* transcription (Figure 6). This

result will explain the similar *entC* expression pattern of the two simple mutants and also the comparable *entC::lacZ* expression found in the double mutant  $\Delta nrdR2\Delta fur$  in presence of DIP related of without DIP condition, where the different availability of iron is not important neither for Fur or NrdR. It is important to keep in mind, that in nature, and excepting the extreme environments, iron is not limited at all, an repression or de-repression of Fur and NrdR, as in other genetic regulations, is gradually and not of all or nothing.

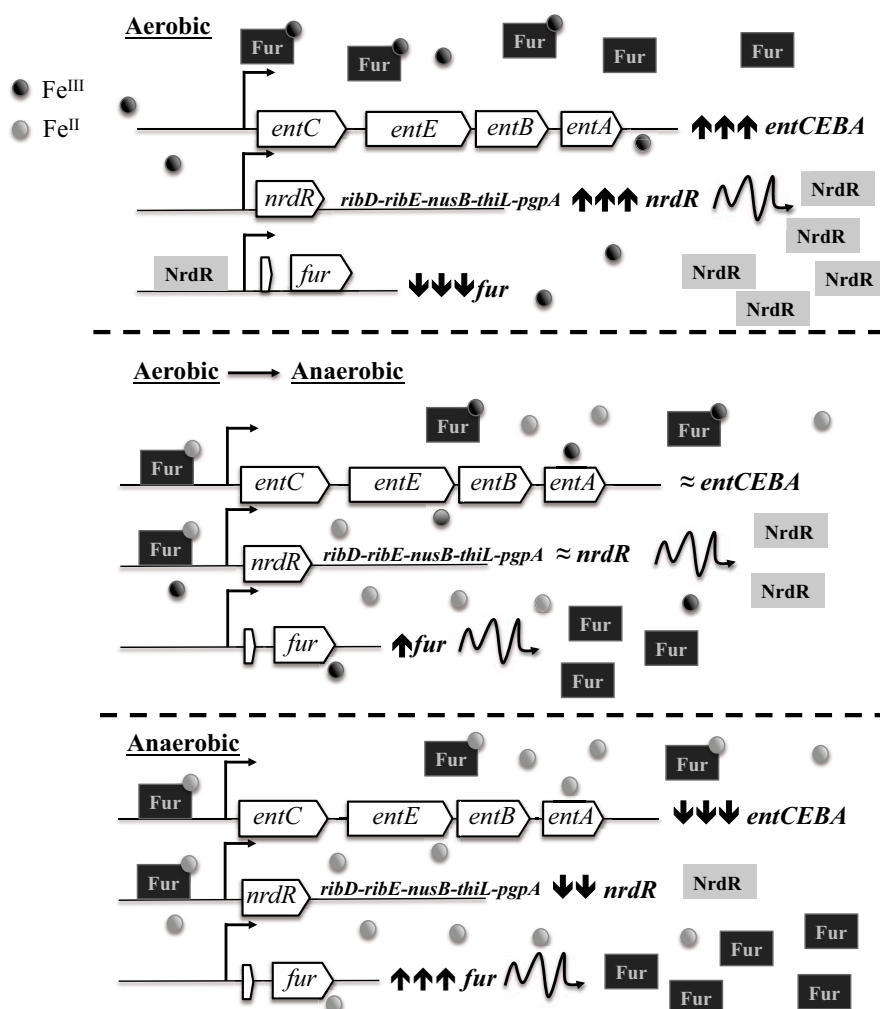
#### *Direct NrdR interaction on the gene promoter*

In order to evaluate a possible NrdR interaction between NrdR protein and the promoter regions from the de-regulated genes revealed in the MG1655 $\Delta nrdR2$ , hypothetical NrdR binding boxes (4) were bioinformatic checked by using the Colibri database ([www.genolist.fr/Colibri/](http://www.genolist.fr/Colibri/)).

Colibri database revealed and hypothetical NrdR box with CCACATCATGAGT sequence at the position -191 bp from the *fecl* promoter. Hypothetic NrdR boxes were virtually found in some promoter regions from protein solubility involved genes. NrdR boxes were localized at -

23 bp of *dnaK-J* promoter, at -299 bp of the *groS-L* operon and at the position -47 pb of *htpG* from the transcription start site (tss). Moreover, a hypothetical *NrdR* box, with AATATCGTTTGT sequence, was also found on the promoter region of *flhB-A-E* at the position -413 pb from tss.

*NrdR* could be able to bind directly to its consensus sequence on the regulatory regions of the genes to modulate their transcription. EMSA experiments are required to corroborate the bioinformatic results.



**Figure 6. Scheme of the regulatory network proposed between Fur and NrdR transcriptional factor to regulate *entCEBA* expression.** Dark and grey spheres symbolize  $\text{Fe}^{\text{III}}$  and  $\text{Fe}^{\text{II}}$  redox state respectively, Fur is represented as a dark grey box whereas NrdR protein are the light grey boxes. The scheme shows the different regulatory state of the *entCEBA* regulation under aerobic, anaerobic and during the transition of both oxygen condition

#### References

1. **Ishihama A.** 2012. Prokaryotic genome regulation: a revolutionary paradigm. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci **88**:485-508.
2. **Browning DF, Busby SJ.** 2004. The regulation of bacterial transcription initiation. Nat Rev Microbiol **2**:57-65.
3. **Borovok I, Gorovitz B, Yanku M, Schreiber R, Gust B, Chater K, Aharonowitz Y, Cohen G.** 2004. Alternative oxygen-dependent and oxygen-independent ribonucleotide reductases in Streptomyces: cross-regulation and physiological role in response to oxygen limitation. Mol Microbiol **54**:1022-1035.
4. **Rodionov DA, Gelfand MS.** 2005. Identification of a bacterial regulatory system for ribonucleotide reductases by phylogenetic profiling. Trends Genet **21**:385-389.

5. **Case ED, Akers JC, Tan M.** 2011. CT406 encodes a chlamydial ortholog of *NrdR*, a repressor of ribonucleotide reductase. *J Bacteriol* **193**:4396-4404.
6. **Torrents E, Grinberg I, Gorovitz-Harris B, Lundstrom H, Borovok I, Aharonowitz Y, Sjoberg BM, Cohen G.** 2007. *NrdR* controls differential expression of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase genes. *J Bacteriol* **189**:5012-5021.
7. **Mowa MB, Warner DF, Kaplan G, Kana BD, Mizrahi V.** 2009. Function and regulation of class I ribonucleotide reductase-encoding genes in mycobacteria. *J Bacteriol* **191**:985-995.
8. **Panosa A, Roca I, Gibert I.** 2010. Ribonucleotide reductases of *Salmonella typhimurium*: transcriptional regulation and differential role in pathogenesis. *PLoS One* **5**:e11328.
9. **Datsenko KA, Wanner BL.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6640-6645.
10. **Miller JH.** 1992. A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
11. **de Lorenzo V, Herrero M, Jakubzik U, Timmis KN.** 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* **172**:6568-6572.
12. **Herrero M, de Lorenzo V, Timmis KN.** 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **172**:6557-6567.
13. **Garcia-Fruitos E, Gonzalez-Montalban N, Morell M, Vera A, Ferraz RM, Aris A, Ventura S, Villaverde A.** 2005. Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins. *Microb Cell Fact* **4**:27.
14. **Schwyn B, Neilands JB.** 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* **160**:47-56.
15. **Kojima S, Blair DF.** 2001. Conformational change in the stator of the bacterial flagellar motor. *Biochemistry* **40**:13041-13050.
16. **Berg HC.** 2003. The rotary motor of bacterial flagella. *Annu Rev Biochem* **72**:19-54.
17. **Bukau B, Horwich AL.** 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**:351-366.
18. **Jordan R, McMacken R.** 1995. Modulation of the ATPase activity of the molecular chaperone DnaK by peptides and the DnaJ and GrpE heat shock proteins. *J Biol Chem* **270**:4563-4569.
19. **Liberek K, Marszalek J, Ang D, Georgopoulos C, Zylicz M.** 1991. *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:2874-2878.
20. **Calloni G, Chen T, Schermann SM, Chang HC, Genevaux P, Agostini F, Tartaglia GG, Hayer-Hartl M, Hartl FU.** 2012. DnaK functions as a central hub in the *E. coli* chaperone network. *Cell Rep* **1**:251-264.
21. **Liberek K, Skowyra D, Zylicz M, Johnson C, Georgopoulos C.** 1991. The *Escherichia coli* DnaK chaperone, the 70-kDa heat shock protein eukaryotic equivalent, changes conformation upon ATP hydrolysis, thus triggering its dissociation from a bound target protein. *J Biol Chem* **266**:14491-14496.
22. **Guerinot ML.** 1994. Microbial iron transport. *Annu Rev Microbiol* **48**:743-772.
23. **Maki N, Gestwicki JE, Lake EM, Kiessling LL, Adler J.** 2000. Motility and chemotaxis of filamentous cells of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**:4337-4342.
24. **Harold FM.** 1972. Conservation and transformation of energy by bacterial membranes. *Bacteriol Rev* **36**:172-230.
25. **Schweinitzer T, Josenhans C.** 2010. Bacterial energy taxis: a global strategy? *Arch Microbiol* **192**:507-520.
26. **Burt SA, van der Zee R, Koets AP, de Graaff AM, van Knapen F, Gaastra W, Haagsman HP, Veldhuizen EJ.** 2007. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **73**:4484-4490.
27. **Kahru A, Vilu R.** 1983. On characterization of the growth of *Escherichia coli* in batch culture. *Arch Microbiol* **135**:12-15.
28. **Garcia-Fruitos E, Martinez-Alonso M, Gonzalez-Montalban N, Valli M, Mattanovich D, Villaverde A.** 2007. Divergent genetic control of protein solubility and conformational quality in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **374**:195-205.
29. **Leichert LI.** 2011. Proteomic methods unravel the protein quality control in *Escherichia coli*. *Proteomics* **11**:3023-3035.
30. **Schroder H, Langer T, Hartl FU, Bukau B.** 1993. DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *EMBO J* **12**:4137-4144.

31. **Morita MT, Kanemori M, Yanagi H, Yura T.** 2000. Dynamic interplay between antagonistic pathways controlling the sigma 32 level in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A **97**:5860-5865.
32. **Straus DB, Walter WA, Gross CA.** 1989. The activity of sigma 32 is reduced under conditions of excess heat shock protein production in *Escherichia coli*. Genes Dev **3**:2003-2010.
33. **Guisbert E, Herman C, Lu CZ, Gross CA.** 2004. A chaperone network controls the heat shock response in *E. coli*. Genes Dev **18**:2812-2821.
34. **Yura T, Guisbert E, Poritz M, Lu CZ, Campbell E, Gross CA.** 2007. Analysis of sigma32 mutants defective in chaperone-mediated feedback control reveals unexpected complexity of the heat shock response. Proc Natl Acad Sci U S A **104**:17638-17643.
35. **Narberhaus F.** 1999. Negative regulation of bacterial heat shock genes. Mol Microbiol **31**:1-8.
36. **Yura T, Nakahigashi K.** 1999. Regulation of the heat-shock response. Curr Opin Microbiol **2**:153-158.
37. **Gamer J, Bujard H, Bukau B.** 1992. Physical interaction between heat shock proteins DnaK, DnaJ, and GrpE and the bacterial heat shock transcription factor sigma 32. Cell **69**:833-842.
38. **Kanemori M, Yanagi H, Yura T.** 1999. Marked instability of the sigma(32) heat shock transcription factor at high temperature. Implications for heat shock regulation. J Biol Chem **274**:22002-22007.
39. **Tomoyasu T, Ogura T, Tatsuta T, Bukau B.** 1998. Levels of DnaK and DnaJ provide tight control of heat shock gene expression and protein repair in *Escherichia coli*. Mol Microbiol **30**:567-581.
40. **Grimshaw JP, Jelesarov I, Siegenthaler RK, Christen P.** 2003. Thermosensor action of GrpE. The DnaK chaperone system at heat shock temperatures. J Biol Chem **278**:19048-19053.
41. **Neilands JB.** 1981. Iron absorption and transport in microorganisms. Annu Rev Nutr **1**:27-46.
42. **Grass G.** 2006. Iron transport in *Escherichia coli*: all has not been said and done. Biometals **19**:159-172.
43. **Klebba PE.** 2003. Three paradoxes of ferric enterobactin uptake. Front Biosci **8**:s1422-1436.
44. **Raymond KN, Dertz EA, Kim SS.** 2003. Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. Proc Natl Acad Sci U S A **100**:3584-3588.
45. **Miethke M, Marahiel MA.** 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. Microbiol Mol Biol Rev **71**:413-451.
46. **Hantke K.** 2001. Iron and metal regulation in bacteria. Curr Opin Microbiol **4**:172-177.
47. **Lee JW, Helmann JD.** 2007. Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. Biometals **20**:485-499.
48. **Baichoo N, Wang T, Ye R, Helmann JD.** 2002. Global analysis of the *Bacillus subtilis* Fur regulon and the iron starvation stimulon. Mol Microbiol **45**:1613-1629.
49. **Vassinova N, Kozyrev D.** 2000. A method for direct cloning of fur-regulated genes: identification of seven new fur-regulated loci in *Escherichia coli*. Microbiology **146 Pt 12**:3171-3182.
50. **Troxell B, Fink RC, Porwollik S, McClelland M, Hassan HM.** 2011. The Fur regulon in anaerobically grown *Salmonella enterica* sv. Typhimurium: identification of new Fur targets. BMC Microbiol **11**:236.
51. **Martin JE, Imlay JA.** 2011. The alternative aerobic ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*, NrdEF, is a manganese-dependent enzyme that enables cell replication during periods of iron starvation. Mol Microbiol **80**:319-334.
52. **Aberg A, Shingler V, Balsalobre C.** 2008. Regulation of the fimB promoter: a case of differential regulation by ppGpp and DksA in vivo. Mol Microbiol **67**:1223-124

**Table 1.** Strains, plasmids and bacteriophages used in this study.

Strain or plasmid	Description	Source
<b>Plasmids</b>		
pAviTag-C N-His SUMO Kan	Vector de clonatge genic per l'expressió de proteïnes de fusió d' <i>E.coli</i> biotinitzades i unides a SUMO ( <i>Small Ubiquitin-like Modifier</i> ) (Km <sup>R</sup> )	Lucigen
pAviTag-C N-His SUMO Kan	Vector to clone target genes for high efficiency expression of biotinylated, SUMO-tagged fusion proteins in <i>E. coli</i> , Km <sup>R</sup>	Lucigen
pAviTag-nrdR	<i>nrdR</i> clonat en el vector pAviTag-C N-His SUMO Kan mitjançant recombinació homòloga de seqüències (Km <sup>R</sup> )	This work
pETS171	<i>fur</i> promoter region cloned into <i>EcoRI</i> and <i>BamHI</i> sites of pUJ8, Ap <sup>R</sup>	This work
pETS172	<i>Pfur::lacZ</i> from pUJ8 cloned into <i>NotI</i> sites of pUTmini-Tn5 Cm, Ap <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup>	This work
pETS173	<i>entC</i> promoter region cloned into <i>EcoRI</i> and <i>BamHI</i> sites of pUJ8, Ap <sup>R</sup>	This work
pGEM-T easy	A/T cloning vector, Ap <sup>R</sup>	Promega
pUJ8	Promoterless vector for making transcriptional <i>lacZ</i> fusions	(252)
pUTminiTn5Cm	Mini-Tn5-Cm cloned into pUT plasmid, Ap <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup>	(252)
<b>Strains</b>		
AAG1	MG1655 <i>lacZ::Km</i>	(240)
AAG1 <i>Pfur::lacZ</i>	AAG1 with <i>Pfur::lacZ</i> from pUJ8, Cm <sup>R</sup>	This Work
AAG1Δ <i>nrdR2</i> <i>Pfur::lacZ</i>	AAG1 with a <i>HpaI</i> - <i>Bsp119I</i> <i>nrdR</i> deletion and <i>Pfur::lacZ</i> from pUJ8, Km <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup>	This Work
Biotin XCell F'	MC1061[F' <i>pro</i> A+B+ <i>lacIqZΔM15::Tn10</i> (Tc <sup>R</sup> ) <i>araD139 Δ(ara,leu)7696 Δ(lac)174 galU galK hsdR2(r<sub>K</sub>.m<sub>K</sub>+) mcrB1 rpsL (Sm<sup>R</sup>) araP<sub>BAD</sub>::birA</i>	Lucigen
DH5α	F <sup>-</sup> <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>)</i> , λ-	Laboratory Stock
MG1655	<i>E. coli</i> WT strain, F <sup>-</sup> λ <sup>-</sup> <i>ilvG- rfb-50 rph-1</i>	Laboratory Stock
MG1655Δ <i>fur</i>	MG1655 <i>fur::Cm</i>	This Work
MG1655Δ <i>nrdR2</i>	MG1655 with a <i>HpaI</i> - <i>Bsp119I</i> <i>nrdR</i> deletion, Km <sup>R</sup>	(135)
MG1655Δ <i>nrdR2Δfur</i>	MG1655 with a <i>HpaI</i> - <i>Bsp119I</i> <i>nrdR</i> deletion and <i>fur::Cm</i> , Km <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup>	This Work
Rosetta (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(R<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE</i> , Cm <sup>R</sup>	Laboratory Stock

**Table 2.** Primers used in this study.

Name	Sequence (5'→3')	Application
T7-pro	AATACGACTCACTATAGG	Check-clonning
T7-ter	CAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAGAGGCC CCAAGGGGTTAT	Check-clonning
kT	CGGCCACAGTCGATGAATCC	Check-clonning
Ecoli PlacZ lw	CCATTCGCCATTCAGGCTGC	Check-clonning
Ecoli fur up	GTGAACCGCTTAGTAACAGGACAG	Check-mutation
Ecoli fur lw	CCCGCAGGTTGGCTTTTCTCG	Check-mutation
PentC EcoRI up	AAGAATTCGTGAGGGGAACAGCCAGC	Clonning
PentC BamHI lw	AAGGATCCATCGAAGCGGGCGAAACATCC	Clonning
Pnrdr EcorI up	AAGAATTCGCGTCATCTCCTGGTTCAGC	Clonning
Pnrdr BamHI lw	AAGGATCCCAGACACTGCCGACGGCG	Clonning
Pfur SmaI up	AACCCGGGGCATCTCGACGAAATTCTCAATGC	Clonning
Pfur BamHI lw	AAGGATCCCTTCCGCACTGACGTGATGG	Clonning
nrdR-For	CATATGCATTGCCATTCTGTTTCGC	Clonning
nrdR-Rev	CTCGAGGTCCTCCAGGCGCGGATC	Clonning
nrdR-Biotin-up	CGCGAACAGATTGGAGGTCATTGCCATTCT CTTTCGCCGTG	Clonning
nrdR-Biotin-lw	CGGCGGGGTGGATAAGCTGTCTCCAGGCGC GCGATCTC	Clonning
fur-P1	GATACCAATACCGCCCTAAAGAAAGCTGGCC TGAAAGTAACGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Gene deletion
fur-P2	GCCTTCGTGCGCATGTTTCATCTTCGCGGCAA TCGCCTTCGGCCATATGAATATCCTCCTTAGT	Gene deletion
RT fur up	CGCGTACTGAACCAGTTTG	PCR amplification
clpB-up	GGCAGACAACCAATTTATC	PCR amplification
yeeR-up	CTGCATTAGTGACGCTGCTA	PCR amplification
flu-up	CCTGGAATATCCCCGATAAC	PCR amplification
purD-up	GCTTTATCGTGATGGTGGAC	PCR amplification
xylG-up	CTCACTTTGTGGGAAAATG	PCR amplification
gltB-up	AACCGATGACGATCTGAAAA	PCR amplification
Ec-GapA-Ia-Forward	GGCCAGGACATCGTTTCCA	PCR amplification
PclpB up	GACCTCATTTAATCTCCAGTAGCAACTTTG	Probe amplification
PclpB lw	TGATTGGGCATCGGCAAGAGC	Probe amplification
PentC up	GGTTAAGGGCGTAATGACAAATTCG	Probe amplification
Pentc lw	GCGACATAAAGAAAAAGCGATTGGG	Probe amplification
PfliA up	CAAGTTGAATTGCAATTTATTGAATTTGCAC	Probe amplification
PfliA lw	CGCACCAGCGGGACATAAC	Probe amplification
Pnrdr BamHI up	AAAGGATCCAAAAATGATAATAAATACGCG	Probe amplification
Pnrdr ClaI lw	AAAATCGATGTAAATAGTAATGCGCATG	Probe amplification
Pnrdr-up(SmaI)	ACCCGGGTGTTTCATCTGTCTGCAC	Probe amplification
Pnrdr-lw(BamHI)	AGGATCCGACGGCGGCGTACGGATGAAC	Probe amplification
EcE-lw	AAAGTGCACAGGAGACGCAG	Reverse transcriptase
RT fliC lw	GCCATTTGTATCTTTAAGCGCATATGTATC	Reverse transcriptase
RT-caiF lw	CCGACTAATTTTTCCCGACT	Reverse transcriptase
RT-PCR entC lw	CCAGAGTCAGTGCGTTTTCT	Reverse transcriptase
RT fur lw	GCTTCGATGGAATCATCACT	Reverse transcriptase/ CR amplification
clpB-lw	CCACCAGTACCTTCAACCTG	Reverse transcriptase/ PCR amplification
yeeR-lw	CAGTGAGTCAGGAAGGCTGT	Reverse transcriptase/

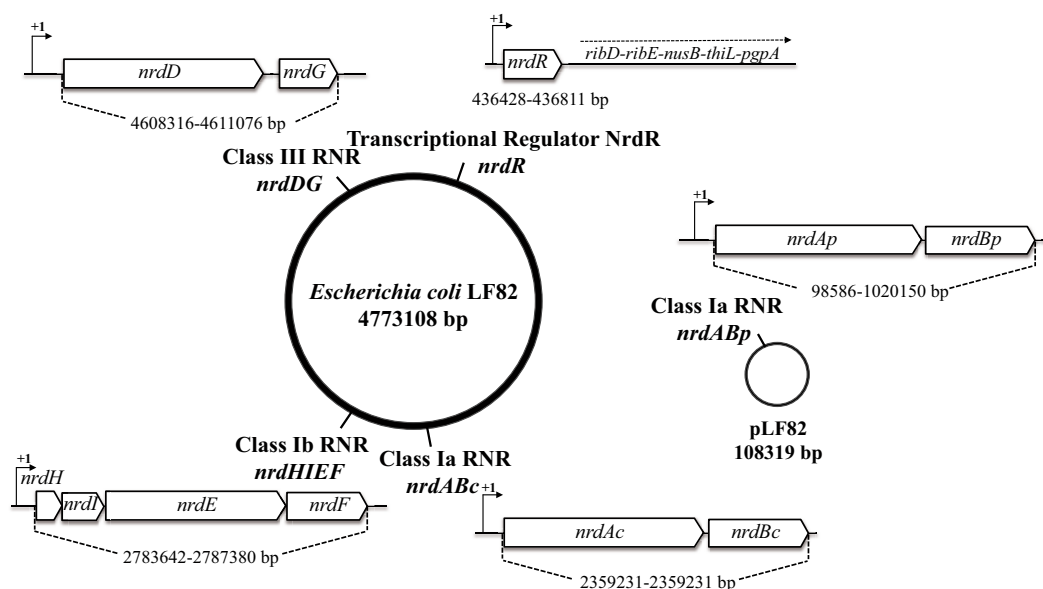
flu-lw	CTGTCAGCATTGTTCTGTGC	PCR amplification Reverse transcriptase/ PCR amplification
purD-lw	CACGGTTGGCCAGATAATAC	Reverse transcriptase/ PCR amplification
xylG-lw	GAATGATGGCGATACCTTTG	Reverse transcriptase/ PCR amplification
gltB-lw	CCACCAGTACCTTCAACCTG	Reverse transcriptase/ PCR amplification
Ec-GapA-Ia-Reverse	TCGATGATGCCGAAGTTATCGTT	Reverse transcriptase/ PCR amplification
SUMO Forward	ATTCAAGCTGATCAGACCCCTGAA	Sequencing
pETite Reverse	GAGTTCTGGGCAAATCTCCG	Sequencing



**6.4 Estudi de les diferents classes de RNR de la soca adherent i invasiva d’*Escherichia coli* (AIEC) LF82 i la seva expressió diferencial durant un procés infectiu. Cerca del paper del factor transcripcional NrdR en la regulació. Manuscrit: *Role of ribonucleotide reductase during infection of adherent-invasive Escherichia coli* LF82 from Crohn’s disease**

(Estudi fet amb col·laboració amb el laboratori del Dr. Nicolas Barnich de la Universitat d’Auvergne. El treball realitzat pel Dr. Nicolas Barnich no s’inclouran en aquest apartat de resultats-discussió sinó que es referenciaran únicament al manuscrit inclòs al final de l’apartat)

La soca patògena d’*Escherichia coli* LF82 és la soca d’*E. coli* del tipus adherent i invasiva (AIEC) que més s’ha aïllat de la mucosa de l’ili intestinal de malalts de Chron (338). Com a *E. coli* que és, aquest soca codifica en el seu genoma per les tres classes de RNR Ia, Ib i III. Sorprenentment el que fa que aquesta soca sigui diferent a altres soques d’*E. coli* i a les enterobactèries en general és la presència d’una còpia extra de l’operó *nrdAB* en un plasmidi anomenat pLF82 (245). En la Figura 37 es mostra la localització de les diferents RNR d’aquest bacteri (Figura 37 i Figura 1 del manuscrit).



**Figura 37. Localització de les diferents classes de RNR presents en la soca d’*E. coli* LF82.** En la figura s’assenyala la localització de les tres classes de RNR i del gen *nrdR* en el cromosoma i també la

*Resultats-discussió: “Role of ribonucleotide reductase during infection of adherent-invasive Escherichia coli LF82 isolated from Crohn’s disease”*

de l’operó *nrdAB* en el plasmidi pLF82. Les diferents distàncies de les unitats transcripcionals també són assenyalades.

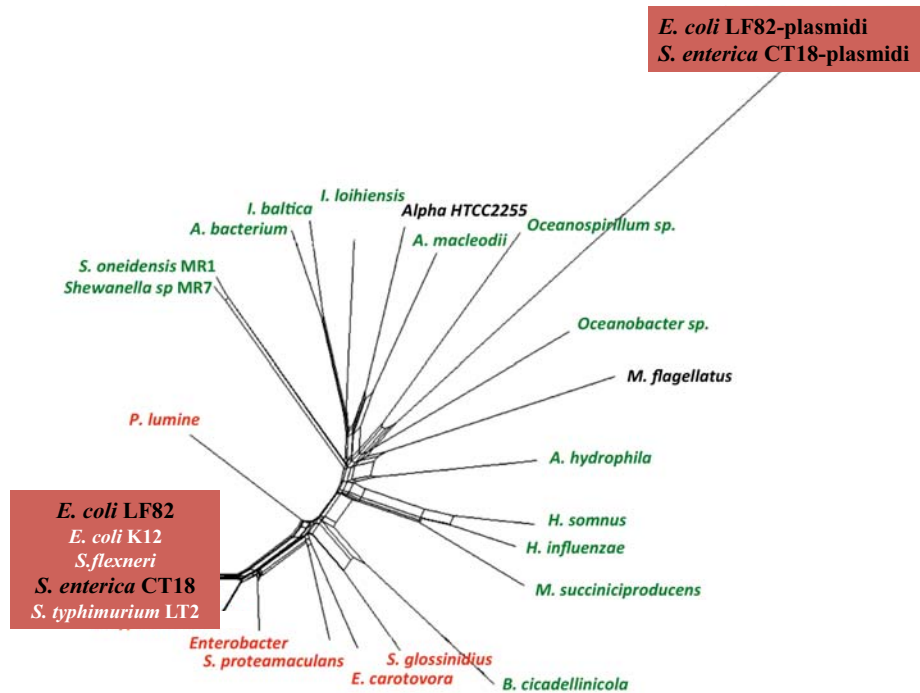
Aquest estudi es va iniciar amb l’objectiu d’investigar la funcionalitat d’aquesta còpia extra plasmídica codificant per la RNR de classe Ia, que fins al moment només s’havia trobat en el plasmidi pHCM2 de *Salmonella enterica* subs. *enterica* serovar Typhi soca CT18 i en el plasmidi pMT1 de diferents biovars de *Yersinia pestis* (6). A més a més, es va voler elucidar la possible expressió diferencial de les diferents classes de RNR i la seva importància durant el procés infectiu d’aquest soca.

#### **6.4.1 La còpia plasmídica de l’operó *nrdAB* del plàsmid pLF82 codifica per una RNR enzimàticament no activa**

(Veure Taula 4 en Material i Mètodes per qualsevol dubte amb la nomenclatura de les soques i/o plasmidis)

Mitjançant anàlisis bioinformàtics d’alineaments de les seqüències codificants per la NrdABc (cromosòmica) i la NrdABp (plasmídica), es va observar que aquestes només posseïen un 59% d’identitat i un 75% de similitud. Aquest resultat és curiós ja que si es comparen diferents seqüències NrdABc entre altres enterobactèries mostren un grau d’identitat del 97% i 98% de similitud. A més a més, fent una reconstrucció filogenètica a nivell de proteïna (339) de la còpia plasmídica *nrdABp* (Figura 38 i Figura 2 del manuscrit) es va veure que aquesta clarament divergeix si es compara amb la seqüència d’altres NrdABc (cromosòmiques) properes a *E. coli*, sent més propera a altres seqüències provinents a altres enterobactèries i  $\gamma$ -proteobactèries, suggerint una altra via evolutiva pròpia de l’adquisició de gens per transferència horitzontal d’origen desconegut.

Resultats-discussió: “Role of ribonucleotide reductase during infection of adherent-invasive *Escherichia coli* LF82 isolated from Crohn’s disease”



**Figura 38.** Arbre filogenètic de les subunitats NrdA i NrdB. Mitjançant el sistema NeighborNet es va fer una red filogenètica a partir d’una col·lecció dels 26 bacteris amb les RNR de classe Ia més propers a la *E. coli* LF82 i la *S. enterica* CT18 tant cromosòmiques com plasmídiques. Les enterobactèries estan marcades en vermell, les  $\gamma$ -proteobactèries en verd i els altres en negre. Enquadrades es troben els grups *E. coli* LF82 i la *S. enterica* CT18.

Posteriorment es va estudiar si aquesta còpia NrdAB plasmídica era activa o no. Una manera d’estudiar-ho es mesurant directament l’activitat enzimàtica del complex encara que en aquest estudi es va fer mitjançant la complementació enzimàtica en una soca d’*E. coli* que conte una mutació termosensible en la RNR cromosòmica (E101). Aquesta soca pot créixer a 30°C de temperatura però quan s’incrementa a 42°C produeix una RNR de classe Ia inactiva fent que el bacteri no pugui créixer. Utilitzant els plasmidis pETS174 i pETS175 es va observar la no complementació per part dels *nrdABp* quan s’incubaven a 42°C (Taula 9 i Figura 3 del manuscrit), indicant que la còpia *nrdABp* present en el plàsmid pLF82 no és funcionalment activa.

**Taula 9.** Taula amb els valors de complementació dels NrdABc amb els NrdABp.

	Arabinosa 0.2%		Glucosa 0.2%	
	30°C	42°C	30°C	42°C
<b>E101+pETS174</b>	$3.1 \times 10^9 \pm 1.2 \times 10^7$	$2.9 \times 10^9 \pm 3.2 \times 10^7$	$2.9 \times 10^9 \pm 4.2 \times 10^6$	<10
<b>E101+pETS175</b>	$5.2 \times 10^9 \pm 7.2 \times 10^6$	<10	$3.1 \times 10^9 \pm 1.2 \times 10^7$	<10
<b>E101+pBAD18</b>	$2.1 \times 10^9 \pm 1.2 \times 10^6$	<10	$3.1 \times 10^9 \pm 1.2 \times 10^7$	<10

#### 6.4.2 Avaluació del rol de les diferents classes de RNR i del factor transcripcional NrdR de la soca LF82 durant la infecció cel·lular

Per poder avaluar la importància de cada RNR durant el procés infectiu de la soca AIEC LF82, es van construir les diferents soques mutants pels gens *nrdD*, *nrdE* i també pel gen que codifica per factor transcripcional *nrdR* en la soca LF82. Es van fer créixer les diferents soques mutants en medi DMEM (Seromed, Biochrom KG) durant 8 hores, per estudiar si es veia afectat el creixement cel·lular. Veient-se que les diferents deleccions gèniques no afectaven en el creixement de la soca LF82 (Figura 3A del manuscrit).

Un dels objectius més volguts a assolir, i ja no només en aquesta línia d’estudi de les RNR de la AIEC LF82, sinó com a objectiu global per entendre perquè la evolució ha mantingut diferents operons gènics que codifiquen pel mateix enzim per dur a terme la mateixa funció, és en quines condicions s’expressen les diferents classes de RNR, i, si algunes es troben especialment induïdes durant un procés infecció. És per això, que es va voler estudiar l’expressió diferencial dels gens *nrdA*, *nrdD* i *nrdE* cromosòmics, *nrdA* plasmídic, així com del gen *nrdR* mitjançant *Real Time PCR* a partir d’ARN extret de la LF82 durant un període d’infecció de cèl·lules epitelials T-84 en comparació amb ARN extret de la soca LF82 crescuda en medi DMEM. Sorprenentment, els nivells d’ARNm corresponent al gen *nrdR* van reflectir un clar augment durant el contacte bacteri-cèl·lula, l’ARNm del *nrdAp* també va mostrar un lleuger increment durant el contacte bacteri-cèl·lula, encara que els nivells d’expressió són extremadament baixos, mentre que els *nrd* cromosòmics no van mostrar una variació important de la seva expressió en l’ARN extret de la infecció (Figura 4 del manuscrit).

*Resultats-discussió: “Role of ribonucleotide reductase during infection of adherent-invasive Escherichia coli LF82 isolated from Crohn’s disease”*

En base aquests resultats, es va prosseguir a avaluar la capacitat dels diferents mutants LF82 $\Delta$ *nrdAc*, LF82 $\Delta$ *nrdAp*, LF82 $\Delta$ *nrdD*, LF82 $\Delta$ *nrdE* i LF82 $\Delta$ *nrdR* en l’adhesió a cèl·lules epiteials T-84, observant-se una disminució important de la capacitat d’adhesió en el mutant  $\Delta$ *nrdR* (Figura 5A del manuscrit), a més a més experiments estudis *in vivo* dels diferents mutant sobre mucosa intestinal de ratolí van resultar en un índex de competitivitat de  $0.65\pm 0.15$  del mutant LF82 $\Delta$ *nrdR* mentre que pels mutants *nrdD* i *nrdE* era proper a 1, indicant la importància del gen *nrdR* en l’adhesió de la LF82 al teixit (Figura 5B del manuscrit). Aquest resultat es va corroborar quantificant la LF82 de la femta de ratolins transgènics CEABA10, a on el mutant LF82 $\Delta$ *nrdR* i el mutant LF82 $\Delta$ *nrdD* es van quantificar 80 i 87.8 vegades menys UFC en gram de femta analitzada després de dos dies d’infecció i 93 i 93.2 vegades menys després de 3 dies d’infecció, confirmant la importància d’aquests gens en l’adhesió i persistència de la LF82 (Figura 6 del manuscrit). El mutant LF82 $\Delta$ *nrdE* no va mostrar canvis significants en comparació a la soca salvatge.

#### **6.4.3 Mecanismes pels quals NrdR pot ser important per la infecció de la AIEC LF82**

A més a més, es va voler observar fenotípicament el possible efecte de les diferents delecions dels gens *nrd* així com del gen *nrdR* en la cèl·lula bacteriana. Mitjançant microscopia electrònica es va observar la superfície bacteriana de les soques LF82 $\Delta$ *nrdD* i LF82 $\Delta$ *nrdE* es va observar que totes expressaven flagell i pili de tipus 1 en canvi mentre que en la soca LF82 $\Delta$ *nrdR* el número de flagells observats era molt menor en comparació amb la soca salvatge LF82 (Figura 3B del manuscrit).

A l’observar la importància del factor NrdR en el procés infectiu de la LF82 i en l’expressió del flagell i pili de tipus 1, es va decidir fer un estudi transcriptòmic del factor transcripcional NrdR en la soca salvatge d’*E. coli* LF82 comparada amb la soca mutant pel gen *nrdR* (LF82 $\Delta$ *nrdR*) amb la finalitat d’entendre els mecanismes que donaven lloc al fenotip que s’observava. És va aïllar ARN de la soca LF82 i del seu mutant isogènic LF82 $\Delta$ *nrdR* a  $DO_{550}$  de 0.5 i es va hibridar en el GeneChip *E. coli* Genome 2.0 Array (Affymetrix) (Functional Genomics Core, IRB). Una vegada fet l’estudi transcriptòmic global es va procedir a analitzar les dades bioinformàticament

*Resultats-discussió: “Role of ribonucleotide reductase during infection of adherent-invasive Escherichia coli LF82 isolated from Crohn’s disease”*

a on els gens que van presentar una des-regulació igual o superior de logFC 1.5 es van considerar afectats per la deleció del factor NrdR. L’anàlisi de les dades van revelar que només 33 gens mostraven des-regulació en absència del factor transcripcional NrdR, dels quals 7 presentaven inducció en la seva expressió mentre que en els 26 restants es mostraven reprimits indicant l’efecte activador de NrdR (Taula 10 i Taula 4 del manuscrit). Aquests resultats que varien del trobats en l’estudi transcripcional del factor NrdR en la soca MG1655 a on es va trobar un paper repressor del modulador més important

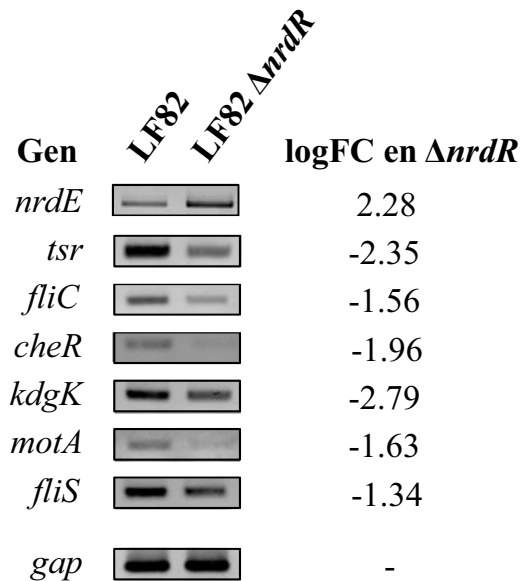
**Taula 10.** Gens des-regulats en la soca LF82Δ*nrdR*.

<b>Gen</b>	<b>Unitat Transcripcional</b>	<b>Log FC</b>	<b>Producte gènic</b>
<i>nrdH</i>	<b><i>nrdHIEF</i></b>	2.29	Proteïna Glutaredoxina-like
<i>nrdI</i>		2.32	Flavodoxina
<i>nrdE</i>		2.28	Ribonucleotidil-difosfat reductasa subunitat alpha
<i>nrdF</i>		1.92	Ribonucleotidil-difosfat reductasa subunitat beta
<i>dicB</i>	<i>dicB ydfDE insD intQ</i>	1.15	Proteïna d’inhibició de la divisió cel·lular
<i>ydfD</i>		1.44	Proteïna hipotètica
<i>yieI</i>	<i>yieIJ</i>	1.13	Proteïna de membrana interna
<i>ycgR</i>	<i>ycgR</i>	-1.08	Proteïna amb funció flagel·lar
<i>fliD</i>	<b><i>fliDST</i></b>	-1.21	Proteïna del filament flagel·lar
<i>fliS</i>		-1.34	Proteïna de biosíntesi del fragell FliS
<i>fliT</i>		-1.39	Proteïna de biosíntesi del fragell FliT
<i>aer</i>	<i>aer</i>	-1.47	Receptor Aerotaxis
<i>fliC</i>	<b><i>fliC</i></b>	-1.56	Flagel·lina
<i>motA</i>	<b><i>motAB cheAW</i></b>	-1.63	Conducte de protons en el motor del flagell
<i>motB</i>		-1.75	Proteïna del motor del flagell: rotació del motor flagel·lar
<i>cheA</i>		-1.82	Proteïna xemotàctica; Histidina quinasa
<i>cheW</i>		-2.06	Proteïna xemotàctica d’unió de purines
<i>tar</i>	<i>tar tap cheRBYZ</i>	-2.26	Receptor de xemotaxis II (MCP)
<i>tap</i>		-2.36	Receptor de xemotaxis V (MCP)
<i>cheR</i>		-1.96	Regulador xemotàctic
<i>cheB</i>		-2.01	Regulador xemotàctic: metil-transferasa específica de xemotaxis
<i>cheY</i>		-2.18	Regulador xemotàctic: transmissor de senyal
<i>cheZ</i>		-2.01	Regulador xemotàctic: fosfatasa de CheY
<i>tsr</i>	<i>tsr</i>	-2.35	Receptor de xemotaxis I (MCP)
<i>ymdA</i>	<i>ymdA</i>	-1.31	Proteïna hipotètica
<i>yjcZ</i>	<i>yjdAZ</i>	-1.88	Proteïna hipotètica
<i>yhjG</i>	<i>yhjG</i>	-1.48	Proteïna hipotètica
<i>yhjH</i>	<i>yhjH</i>	-2.26	Proteïna amb un domini EAL
<i>kdgK</i>	<i>kdgK</i>	-2.79	2-dehydro-3-deoxygluonoquinasa

\* En negreta es marquen els gens escollits per validar els resultats obtinguts en l’array.

*Resultats-discussió: “Role of ribonucleotide reductase during infection of adherent-invasive Escherichia coli LF82 isolated from Crohn’s disease”*

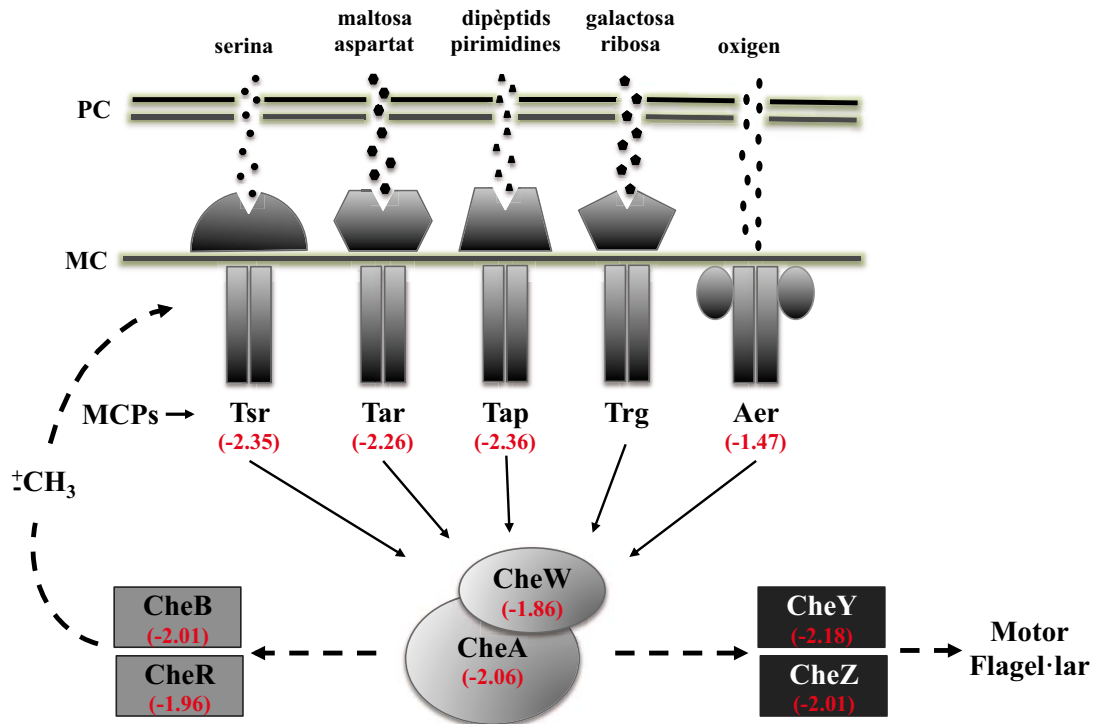
Posteriorment es va validar fent un anàlisi de RT-PCR els resultats obtinguts en l’anàlisi transcripcional global del gen *nrdE* (com a gen referència) i d’un gen representant de cada unitat transcripcional des-regulada: *tsr*, *fliC*, *cheR*, *kdgK*, *motA*, *fliS* (veure Taula 10) i com a control de l’experiment es va utilitzar el gen *gap* (Figura 39 i Figura 7 del manuscrit), en tots els casos es va donar el mateix grau de des-regulació que s’havia trobat en l’array.



**Figura 39. Corroboració dels resultats obtinguts de l’estudi transcriptòmic del factor NrdR en la soca LF82.** ADNc de l’ARN estret de la soca LF82 i LF82 $\Delta$ *nrdR* va ser amplificat mitjançant 25 cicles de PCR.

Els nostres resultats demostren que dels 26 gens que mostraven repressió de la seva expressió sense NrdR es van trobar 8 unitats transcripcionals senceres, que corresponen a 18 gens, que codificaven per gens involucrats en la motilitat bacteriana i en la xemotaxis (Taula 9 i Taula 4 del manuscrit), dels qual 4 dels 5 receptors xemotàctics anomenats *Methyl accepting Chemotactic Proteins* (MCP) es mostraven afectats en l’absència de NrdR (Figura 40).

Resultats-discussió: “Role of ribonucleotide reductase during infection of adherent-invasive *Escherichia coli* LF82 isolated from Crohn’s disease”

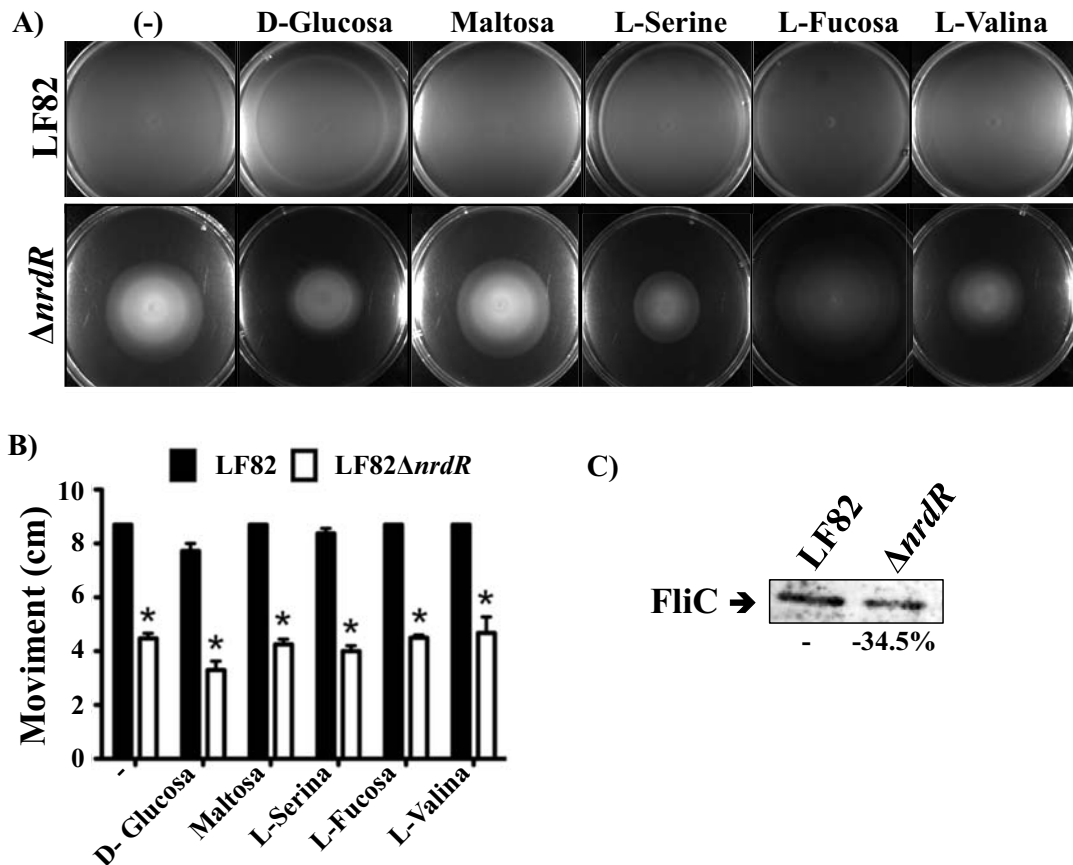


**Figura 40.** Esquema del circuit de senyalització de la xemotaxis bacteriana. En el dibuix es mostren els 4 MCP i el MCP-like Aer adherits a la membrana cel·lular (MC), així com els complements proteics que intervenen en la senyalització. En vermell s’han assenyalat el log FC de repressió que presenta la soca LF82Δ*nrdR* respecte a la soca salvatge trobat en l’*array*. (Dibuix adaptat del laboratori del Prof. Sandy Parkinson: [http://chemotaxis.biology.utah.edu/Parkinson\\_Lab/](http://chemotaxis.biology.utah.edu/Parkinson_Lab/)).

Aquesta repressió en els gens involucrats en la motilitat es va observar fenotípicament fent estudis de motilitat i xemotaxis en agar tou suplementat amb 4 xemoatractants diferents: D-glucosa, maltosa, L-serina i L-fucosa, i el xemorepel·lent L-valina. En tots els casos la motilitat que es va observar en la soca salvatge LF82 va ser molt superior a la LF82Δ*nrdR* (Figura 41A i Figura 8A del manuscrit) i la mesura dels diàmetres de tres experiments independents també ho van corroborar (Figura 41B i Figura 8B del manuscrit). A més a més, la detecció de proteïna FliC en la soca LF82Δ*nrdR* va ser 34.5 vegades inferior que la que es va detectar en la soca salvatge, corroborant, a més a més del factor NrdR, la importància dels gens *nrd* en la motilitat bacteriana (Figura 41C).



Resultats-discussió: “Role of ribonucleotide reductase during infection of adherent-invasive *Escherichia coli* LF82 isolated from Crohn’s disease”

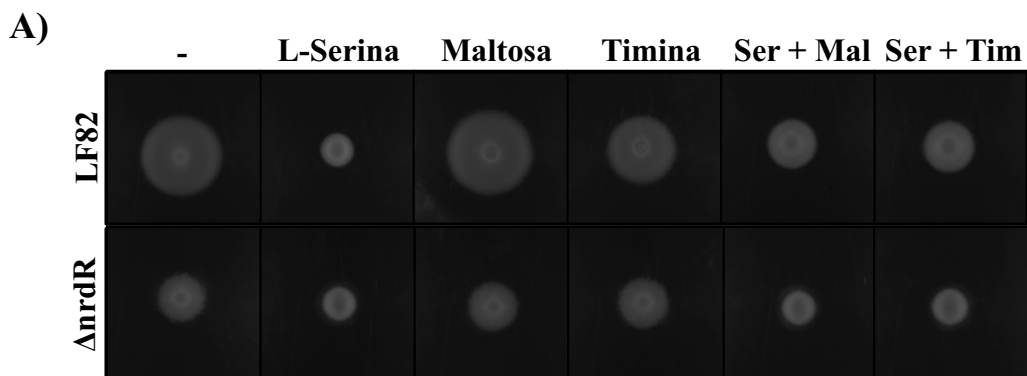


**Figura 41. El factor NrdR és clau per la motilitat de la soca LF82.** A) Motilitat de la LF82 i del seu mutant isogènic  $\Delta nrdrR$  sobre agar tou i en presència de diferents atractants i un repel·lent (L-Valina). B) diferències entre el diàmetres dels hal·lus de motilitat de la soca LF82 amb la LF82 $\Delta nrdrR$ . La desviació estàndard de tres experiments independents és assenyalada en el gràfic així com la significança estadística marcada amb un asterisc ( $P < 0.05$ ). C) Detecció mitjançant Western-Blot de la proteïna FliC en la soca LF82 i el seu mutant isogènic  $\Delta nrdrR$  a  $DO_{550}$  del creixement bacteriana. El % de disminució de FliC respecte a la soca salvatge és representat en la figura.

També es van elaborar plaques especials d’agar tou (explicades en l’apartat 4.3.2 del Material i Mètodes) suplementades amb timina, serina i maltosa per avaluar la repressió els diferents receptors Tsr, Tar i Tap xerotàctics. L’efecte observat en les plaques suplementades amb maltosa van ser les que es van visualitzar abans, fet normal si es te en compta que el receptor Tar, juntament amb el Tsr, és molt més abundant en la cèl·lula que el Tap (340) (Figura 42B i Figura 9B del manuscrit). Les plaques suplementades amb serina van rebel·lar una resposta xerotàctica similar en la soca LF82 $\Delta nrdrR$  comparada amb la salvatge, fet que va provocar l’estudi de l’efecte conjunt de la serina amb la maltosa o la timina. En ambdues combinacions, la

*Resultats-discussió: “Role of ribonucleotide reductase during infection of adherent-invasive Escherichia coli LF82 isolated from Crohn’s disease”*

serina provoca una reducció del moviment bacterià que no s’observa quan s’avaluen per separat (Figura 42A i Figura 9A del manuscrit).



B)

Atractant	(h)	LF82		LF82 $\Delta$ nrdR	
		cm	cm/h	cm	cm/h
-	4	0.03	-	0.04	-
	8	0.07	0.0100	0.04	-
	12	0.12	0.0125	0.04	-
	24	0.23	0.0092	0.08	0.0033
L-Serina	4	0.04	-	0.04	-
	8	0.04	-	0.05	0.0025
	12	0.04	-	0.07	0.0050
	24	0.09	0.0042	0.14	0.0058
Maltosa	4	0.04	-	0.04	-
	8	0.06	0.0050	0.05	0.0025
	12	0.14	0.0200	0.08	0.0075
	24	0.23	0.0075	0.13	0.0042
Timina	4	0.05	-	0.04	-
	8	0.05	-	0.05	0.0025
	12	0.1	0.0125	0.05	-
	24	0.17	0.0058	0.13	0.0067
L-Ser + Mal	4	0.05	-	0.05	-
	8	0.07	0.005	0.05	-
	12	0.08	0.0025	0.06	0.0025
	24	0.12	0.0033	0.11	0.0042
L-Ser + Tim	4	0.06	-	0.05	-
	8	0.07	0.0025	0.06	0.0025
	12	0.08	0.0025	0.07	0.0025
	24	0.13	0.0042	0.12	0.0042

**Figura 42. Rol de NrdR en la xemotaxis de la soca LF82.** A) Hal·lus xemotàctics de la soca LF82 i LF82 $\Delta$ nrdR, en plaques especials d’agar tou, en presència de tres atractants diferents per avaluar els MCP: Tar, Tsr i Tap. La millor imatge de tres experiments independents ha estat l’escollida per ser mostrada. B) Velocitats de creixement de la LF82 i LF82 $\Delta$ nrdR al llarg de 24 hores d’aval·luació de la xemotaxis.

El flagell té un paper important en la invasió de la soca LF82. Estudis han demostrat que la soca no motil LF82 ( $\Delta$ fliC o  $\Delta$ fliA), redueix la capacitat d’adhesió i l’habilitat invasora de la soca (341, 342) i igual com s’ha vist també amb el mutant  $\Delta$ nrdR, tal i com s’ha explicat a l’apartat superior i com es veu en la figura 5A del manuscrit. Els gens que codifiquen per les proteïnes MotA i MotB, *motA* i *motB*, també són part dels gens que mostren repressió per la deleció de NrdR (Taula 10 i Taula 4 del manuscrit). Aquests dos proteïnes apliquen la força necessària a la proteïna FliG perquè es doni la rotació del flagell (311). Aquesta rotació es pot donar en sentit de les agulles del rellotge (CW) fent que el bacteri es mogui cap a l’atractant

*Resultats-discussió: “Role of ribonucleotide reductase during infection of adherent-invasive Escherichia coli LF82 isolated from Crohn’s disease”*

o sigui, augmentant la xerotàxis cap a ell, o en contra (CCW), repel·lent-lo (312). La interacció entre les proteïnes MotA i MotB amb FliG, és dependent de la molècula de senyalització c-di-GMP (343). En les dades obtingudes de l'*array* també es va observar que el gen codificant per la fosfodiesterasa YhjH, la qual conté un domini EAL, presentava una repressió de 2.26 logFC en la soca LF82 $\Delta$ *nrdR*. El fet que aquesta fosfodiesterasa estigui reprimida, promou que el nivells cel·lulars de la molècula de senyalització c-di-GMP augmentin, tal i com s'ha descrit (344). C-di-GMP s'uneix a la proteïna YcgR, promovent el gir CCW i conduint al bacteri a la retracció i no xerotaxis (343). El gen codificant per YcgR, també mostra una desregulació en la soca LF82 $\Delta$ *nrdR* tot i que no és significativa. Aquest augment de c-di-GMP, a més a més de promoure el no moviment bacterià, podria ser també el responsable de la disminució de l'adhesió i invasió observada en la soca LF82 $\Delta$ *nrdR* (Figura 5A i 5B del manuscrit) ja que com ha estat descrit en la soca LF82 (342) nivells baixos de c-di-GMP promou la síntesi del pili tipus 1, el qual també s'ha observat en la superfície del bacteri LF82 $\Delta$ *nrdR* (Figura 3B del manuscrit), promovent l'adhesió cel·lular, per tant, l'augment del nivells de c-di-GMP la inhibeix, sent per tant clau per la virulència de la soca LF82.

*Manuscript: “Role of ribonucleotide reductase during infection of adherent-invasive Escherichia coli LF82 isolated from Crohn’s disease”*

**6.4.4 Manuscript: “Role of ribonucleotide reductase during infection of adherent-invasive *Escherichia coli* LF82 isolated from Crohn’s disease”**

**Role of ribonucleotide reductase during infection of adherent-invasive *Escherichia coli* LF82 isolated from Crohn’s disease**

Nicolas Dreux<sup>1,2,‡</sup>, **Maria del Mar Cendra**<sup>3,‡</sup>, Arlette Darfeuille-Michaud<sup>1-2-4\*</sup>, Nicolas Barnich<sup>1-2-4\*</sup>, Eduard Torrents<sup>3\*</sup>.

<sup>1</sup>Clermont Université, M2iSH « Microbe intestin inflammation et Susceptibilité de l’Hôte », UMR 1071 Inserm/Université d’Auvergne; <sup>2</sup>Unité Sous Contrat Institut National de la Recherche Agronomique 2018, Clermont-Ferrand F-63001, France; <sup>3</sup>Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), Cellular Biotechnology. Baldiri Reixac 15-21, 08028, Barcelona, Spain. <sup>4</sup>Institut Universitaire de Technologie, Génie Biologique, Aubière F-63172, France.

**‡ both authors contributed equally.**

Keywords: gene regulation, DNA synthesis, infection,

Running title: Ribonucleotide reductases in *Escherichia coli* LF82.

\*Corresponding authors:

Dr. Eduard Torrents. Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), Cellular Biotechnology. Baldiri Reixac 15-21, 08028, Barcelona, Spain. Tel: +344034756, FAX: +34934020183. Email: etorrents@ibecbarcelona.eu

Dr. Nicolas Barnich. Clermont Université, M2iSH « Microbe intestin inflammation et Susceptibilité de l’Hôte », UMR 1071 Inserm/Université d’Auvergne; Clermont-Ferrand F-63001, France. Tel: +33473178376, FAX: +33473178371

Email: nicolas.barnich@udamail.fr

## **Abstract**

Ribonucleotide Reductase (RNR) is an essential enzyme unique responsible to provide the DNA building blocks for the DNA synthesis and repair. Three classes of RNR have been described to be encoded in the genome: Class I (Class Ia and Class Ib), Class II and Class III but also plasmidic RNR have been identified in some bacteria with a possible *horizontal gene transfer* (HGT) evolution.

The Adherent-Invasive *Escherichia coli* (AIEC) strain LF82 is the principal bacteria associated to the inflammatory bowel disease: Chron's Disease (CD). This AIEC strain expresses three different RNR classes but it is characterized for encoding one extra class Ia RNR copy in a plasmid called pLF82.

In this study we have been evaluated the differential expression of each RNR expression during LF82 infection process. The transcriptional RNR repressor NrdR it has also been checked so as to assess its role in the adherence and invasion of this pathogenic *E. coli* strain. Our results evidenciate the importance of RNR for LF82 infectivity and the leading role of NrdR in all infection process and becoming a key for the LF82 virulence.

## **Introduction**

Ribonucleotide reductases (RNR) is an essential enzyme for every living organism catalysing the reduction of ribonucleotide (NTP) to their corresponding 2'-deoxyribonucleotide (dNTPs) and therefore play an essential role in DNA synthesis and repair. There are three classes of RNR (class Ia, II and III) with different primary structures, subunit cofactor requirements, and quaternary 3D structure, but all of them are allosterically regulated and share similar catalytic mechanisms (3, 276). Class I

RNRs is oxygen dependent enzymes that occur in eubacteria, eukaryotes, and some viruses. This class comprise two main subgroups (class Ia and Ib). Class Ia RNR is encoded in operons containing *nrdA* and *nrdB* genes that specify the NrdA subunit, possessing catalytic and allosteric regulation, and the NrdB subunit, possessing radical-generating activity. Class Ib RNRs are encoded in operons containing *nrdH*, *nrdI*, *nrdE* and *nrdF* genes that encode for the corresponding specific redoxin NrdH, the activating NrdI, the catalytic NrdE subunit and radical-generating NrdF subunit. Class II RNRs are oxygen-independent enzymes that occur in aerobic and anaerobic bacteria and in archaeobacteria. This class is encoded by the *nrdJ* gene and mainly consist of one polypeptide that generates a transient 5'-deoxyadenosyl radical through homolytic cleavage of adenosylcobalamin (AdoCob, coenzyme B12). Class III RNRs are present in anaerobic microorganisms and use S-adenosylmethionine and an iron-sulfur cluster on an accessory protein called NrdG to create a stable glycyl radical. *nrdD* and *nrdG* forms and operon and encode for the catalytic NrdD subunit and the activating protein NrdG. This system only works under strict anaerobic conditions since oxygen is poison for the enzyme (3, 276).

Surprisingly the distribution of the different classes of RNRs are difficult to understand not showing any common RNRs combination for the different bacterial phylogenetic groups and seems that a possible RNR distribution will follow the environmental conditions the bacteria is growing. We have bacteria that encode in its genome for one RNR class, some other bacteria encode for more than class of RNR, and exist any combination of RNR in nature (277, 345). In *Escherichia coli* and all enterobacteria encode three different RNR classes in their genome;

*Manuscript: "Role of ribonucleotide reductase during infection of adherent-invasive Escherichia coli LF82 isolated from Crohn's disease"*

class Ia, Ib and III (26, 243). While in *E. coli* class Ia RNR is active during aerobic growth and class III RNR is active under anaerobic growth, class Ib RNR is active under some special circumstances, like iron deficiency medium or biofilm formation. However, the rules of the different RNR classes in pathogenic *E. coli* remain unknown.

Crohn's disease (CD) is an inflammatory bowel disease occurring in individuals with a genetic predisposition in whom an environmental or infectious trigger cause an abnormal immune response (346-348). *E. coli* has been assigned a putative role in CD, and most *E. coli* strains isolated from the ileal mucosa of CD patients are able to adhere to and invade intestinal epithelial cells (349-351), and belong to the pathogenic group of adherent invasive *E. coli* (AIEC) (338). The prototype strain for AIEC pathovar is *E. coli* strain LF82. This reference AIEC strain is included in most, if not all, of the studies analysing of *E. coli* strains associated with Crohn's disease. AIEC are highly associated with ileal mucosa in CD patients (349-357). CD-associated AIEC adhere to the brush border of primary ileal enterocytes isolated from CD patients but not from controls without IBD via the recognition between variant FimH adhesin motifs located on the top of type 1 pili expressed on the bacterial surface and carcarcinoembryonic antigen-related cell-adhesion molecule 6 (CEACAM6) abnormally expressed in the ileal epithelial cells of CD patients (358, 359). AIEC colonize and induce strong gut inflammation in CEABAC10 transgenic mice expressing human CEACAMs (359, 360).

In this study, we gained insights into the role of the different RNR classes during the infection course of AIEC LF82 using intestinal cells and in vivo model of infection. Interestingly, a

transcriptional regulator NrdR regulates virulence in this bacterium through the regulation of LF82 motility and chemotaxis.

## **Material and methods**

### *Bacterial Strains, plasmids and growth conditions.*

Adherent invasive *Escherichia coli* (AIEC) was used throughout this study, and for constructing gene knockouts. Bacterial and plasmids used are listed in Table 1. Bacterial cells were routinely grown in LB medium at 37°C supplemented when used at the following final concentrations: 50 µg ampicillin ml<sup>-1</sup>, 50 µg kanamycin ml<sup>-1</sup>, 30 µg chloramphenicol ml<sup>-1</sup>, 30 µg X-Gal ml<sup>-1</sup>. Bacterial growth was measured by reading OD<sub>550</sub>.

### *DNA manipulations*

Restriction endonucleases, T4 DNA ligase, alkaline phosphatase, DNA polymerase (Klenow fragment) and DNA-modifying enzymes were purchased from Fermentas and used according to the manufacturer's instruction. Plasmid DNA was isolated using the QIAprep spin miniprep kit (Qiagen) as described by manufacturer.

PCR amplifications were performed using High fidelity polymerase (Fermentas) and for screening assays using 2X PCR master mix according to the manufacturer's specifications (Fermentas) using primers described in Table 2. Other molecular assays and manipulations were performed by standard procedures (254).

### *Construction of E. coli LF82 nrd mutants and complementation plasmids*

Isogenic mutants were generated using PCR products, as described by Datsenko *et al.* (263), and modified by Chaveroche, *et al.* (361).

*Manuscript: "Role of ribonucleotide reductase during infection of adherent-invasive Escherichia coli LF82 isolated from Crohn's disease"*

The basic strategy was to replace a chromosomal sequence with a selectable antibiotic resistance gene (kanamycin or chloramphenicol) generated by PCR. For the *nrd* mutants, this PCR product was generated using primers with 50-nt extensions that are homologous to regions adjacent to the target gene and template *E. coli* strain harbouring the kanamycin resistance gene on the pKD4 plasmid. In parallel, *E. coli* AIEC strain LF82 was transformed with pKD46 plasmid, a plasmid that encoded Red proteins from phage  $\lambda$ , synthesized under the control of an L-arabinose inducible promoter. This plasmid was maintained in bacteria at 30°C with 25 µg/ml of chloramphenicol, and was eliminated at 37°C. Strain LF82/pKD46 was grown at 30°C with 1mM L-arabinose to induce Red expression. When OD<sub>620</sub> nm reached 0.6, the bacterial culture was incubated for 20 min at 42°C to eliminate the plasmid. Bacteria were washed three times with 10% glycerol, and PCR products were electroporated. Isogenic mutants were selected on LB agar containing 50 µg/ml kanamycin. Replacement of the gene by the kanamycin resistance cassette in mutants was confirmed by PCR (Primers in Table 2).

Complementation plasmids (pIb-LF82 and pIII-LF82) were constructed by cloning the *nrdHIEF* (class Ib RNR; 4119 pb) and *nrdDG* (class III RNR; 3491 pb) operons under their respective promoters into plasmid pJET1.2 and pGEM-T-easy respectively using primer pair LF82 PnrDH BamHI up – opero Ib-lw (BamHI) and EcoliDG-BHI-up - EcoliDG-BHI-lw primers (see Table 2). Sequencing and restriction analysis confirmed the correct cloning and orientation of the inserts.

*Motility and swim-plate chemotaxis assay*

Bacterial motility was evaluated by using soft-LB agar (Difco). Four different

chemoattractants (glucose, maltose, L-serine and L-fucose) and one chemorepellent (L-valine) (Sigma) were added to the 0.25% LB-agar plates to a final concentration of 2 mM. LF82 and the LF82-*AnrdR* overnight cultures were adjusted to an OD<sub>550</sub> of 1.0 and 5-µl spotted onto the plate surface. Motility plates were incubated for 12 h at 30°C, at which time the diameter from the bacterial movement was measured. Three independent experiments were done and significant differences on the motility diameter were determined and plotted.

The swim-plates for chemotaxis assays were prepared as described previously (255). The chemoattractants were added at a final concentration of 2 µM for L-serine, 1 µM for thymine and 100 µM for maltose. As in motility plates, overnight cultures of the LF82 and the LF82 *AnrdR* were adjusted to an OD<sub>550</sub> of 1.0 and spotted (5µl) onto the surface of the plates. The plates were incubated at 30°C and the chemotaxis expansion halus was measured at 4h, 8h, 12h and 24h of incubation. For statistic validation, three independent experiments were done.

*RNA isolation*

RNA was isolated from three-independent *E. coli* wild-type LF82 strain and LF82-*AnrdR* cultures grown aerobically at 37°C to an OD<sub>550</sub> of 0.5 using the RNAeasy (Qiagen). Cultures were treated with RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen) to stabilize and preserve the RNA before to extract and concentrate the total RNA as described by the manufacturer's instruction. The integrity, quality and quantity of RNA was checked in the Bioanalyser (Bio-Rad) and NanoDrop spectrophotometer (ND-1000, NanoDrop).

*Manuscript: "Role of ribonucleotide reductase during infection of adherent-invasive Escherichia coli LF82 isolated from Crohn's disease"*

*RT-PCR and Real Time-PCR*

1 µg of total RNA mixed with 1 pmol of reverse primers (listed in Table 2) and 2 µl dNTPs 10 mM in a 12 µl of volume filled with sterile and distilled water. The mixture was heated to 65°C and incubated on ice for 1 minute. 4µl of 5x First-Strand buffer, 1µl of DTT 0.1 M, 1µl RNaseOUT™ (Invitrogen), 1µl of SuperScript™ RT (200 units/µl) (Invitrogen) and 1 µl of DPEC-treated Water (Invitrogen) were added to the mix. PCR reaction was performed as manufacturer's recommendations. 1µl of each reverse transcriptase reaction was used as a template for the cDNA amplification using 2X PCR master mix (Fermentas) according to the manufacturer's instruction. Primers used for cDNA amplification are listed in Table 2.

For the real-Time PCR, the RNAs were reverse transcribed and amplified using specific primers to *nrdR*, *nrdAp*, *nrdAc*, *nrdD*, *nrdE* or 16S rRNA (Table 2). Amplification of a single expected PCR product was confirmed by electrophoresis on a 2% agarose gel. RT-PCR was performed using an Eppendorf Realplex and the RNA levels were quantified using RNA master SYBRGreen I (Roche Diagnostic) with 0.25 mg of total RNA.

*Microarray studies and data analysis*

For the *nrdR* microarray study was used the Affymetrix GeneChip *E. coli* Genome 2.0 Array (Affymetrix). The microarray samples were analysed in order to determine the *nrdR* expression profile in the LF82. The resulting data were normalized and compared to calculate the significance of the expression log ratios and standard deviations for ORFs presenting at least 2 fold change and  $p < 0.05$ . Genes whose expression ratios in the  $\Delta nrdR$  changed more than 2 fold were considered up- or down-regulated compared to the wild-type strain.

*Ribonucleotide reductase complementation assay:*

The entire chromosomal encoded LF82 *E. coli* wild-type *nrdAB* genes (*nrdABc*) and plasmidic *nrdAB* genes (*nrdABp*) were amplified from genomic DNA by PCR using the following combination of primers pair ABC-pBADup / ABC-pBADlow and ABp-pBADup / ABp-pBADlow respectively. The primers were designed to generate an *EcoRI* and *XbaI* restriction site, respectively, at the start and end of the resulting amplified fragment. All amplified fragments were cloned into the pGEM-T Easy vector as described by the manufacture's protocol (Promega). The *EcoRI-XbaI* digested DNA fragments ABC (3606 bp) and ABp (3573 bp) were cloned into the pBAD18 generating pETS174 and pETS175 respectively. Both plasmids were sequenced in both directions and transformed into *E. coli* E101 strain. This recipient strain contains conditional lethal mutations in the *nrdA* (Ts), which results in a temperature- sensitive phenotype. As a result, E101 strain will not be able to grow at 42°C only if a complementary NrdAB activity is supplied in *trans*.

Complementation was determined by plating serial dilutions of liquid cultures on LB agar plates supplemented with thymine (50 µg/ml) and either 0.2 % L-arabinose or 0.2 % D-glucose, to induce and repress the *Para* promoter respectively, at both 30 and 42°C for 24 to 48 hours. As a positive control, the LF82 *nrdAB* chromosomal copy cloned into the pBAD18 vector (plasmid pETS174) was used, and as a negative control, the pBAD18 vector, both then transformed into the E101 strain.



*Manuscript: "Role of ribonucleotide reductase during infection of adherent-invasive Escherichia coli LF82 isolated from Crohn's disease"*

*Cell culture and infections:*

T-84 cells were purchased from Flow Laboratories, Inc., McLean, Va. Cultured cells were maintained in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37°C in DMEM/Ham's F12 medium (Seromed, Biochrom KG, Berlin, Germany) supplemented with 10% (vol/vol) fetal calf serum (FCS, Seromed), 1% nonessential amino acids (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France), 1% L-glutamine (Life Technologies), 200 U of penicillin, 50 mg of streptomycin, and 0.25 mg of amphotericin B per liter, and 1% minimal essential medium (EMEM) vitamin mix X-100 (Life Technologies). Monolayers were seeded in 24-well tissue culture plate (Polylabo, Strasbourg, France) with 4x10<sup>5</sup> cells/well and incubated for 48 h. Monolayers were then infected in 1 ml of the cell culture medium without antibiotics and with heat-inactivated Foetal Bovine Serum at a multiplicity of infection (MOI) of 10 bacteria per epithelial cell. After a 3 h incubation period at 37°C, monolayers were washed five times in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2). The epithelial cells were then lysed with 1% Triton X-100 (Sigma Chemical Company, St Louis, Mo.) in deionised water. Samples were diluted and plated onto Mueller-Hinton agar plates to determine the number of CFU corresponding to the total number of cell-associated bacteria (adherent and intracellular bacteria). The bacterial invasion was measured using the gentamicin protection assay (338). After a 3 h incubation period at 37°C, monolayers were washed three times in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2). To determine the number of intracellular bacteria, fresh cell culture medium containing 100 mg/ml gentamicin (Sigma) was added for 1 h to kill extracellular bacteria. Monolayers were then lysed with 1% Triton X-100, and the intracellular

bacteria were quantified as described above. When needed, the infected monolayers were centrifuged for 10 min at 1000 g before the 3 h infection period.

*Animal model of infection:*

Twelve-week-old FVB/N CEABAC10 transgenic male mice (body weight, ≈ 26-28 g) were pretreated by oral administration of the broad-spectrum antibiotic streptomycin (5 mg intragastric per mouse) to disrupt normal resident bacterial flora in the intestinal tract (362) and were orally challenged with 10<sup>9</sup> bacteria 24 h later. Animals received a very low dose of 0.25% (wt/vol) of dextran sulfate sodium (DSS; molecular mass = 36,000-50,000 Daltons; MP Biomedicals) in drinking water starting 3 days before infection to increase the accessibility of bacteria to the surface of the epithelial layer.

One, 2, 3 and 6 days after bacterial infection, fresh faecal pellets (100-200 mg) were collected from individual mice and resuspended in PBS. After serial dilution, bacteria were enumerated by plating on LB agar medium containing ampicillin (50 mg/μL) and erythromycin (20 mg/μL) to isolate AIEC LF82 bacteria and isogenic mutants, and incubated at 37°C overnight.

Bacteria interactions were also studied using mouse colonic loops as previously described (363). Mice were starved for 12 H before surgery, with water available ad libitum. They were anesthetized and their intestines exteriorized through a midline incision. Two colonic segments (approximately 1 cm) were ligated and inoculated by approximately 5.10<sup>7</sup> bacteria. After a 4-hour period, mice were anesthetized with isoflurane and then euthanized by cervical dislocation. Colonic loops were removed and associated bacteria were numbered onto agar plate containing appropriate antibiotics.

*Manuscript: “Role of ribonucleotide reductase during infection of adherent-invasive Escherichia coli LF82 isolated from Crohn’s disease”*

*Yeast agglutination titers*

Commercial baker’s yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) was suspended in PBS (20 mg/mL). Bacterial strains were grown overnight at 37°C without agitation on LB broth, washed, and resuspended in PBS at an optical density of 0.5 at 620 nm. The bacterial suspension was diluted and 50 µL were deposited on a 96-well microplate (Greiner). Equal volumes of yeast cell suspension were added to each well. Aggregation was monitored visually, and the titer was recorded as the last dilution of bacteria giving a positive aggregation reaction.

*Transmission Electron Microscopy*

Bacteria were grown overnight in Luria-Bertani broth without shaking and were fixed and negatively stained with 1% ammonium molybdate on carbon-Formvar copper grids. A washed bacterial suspension was placed on carbon-Formvar copper grids and the grids were negatively stained with 1% ammonium molybdate for 1 min.

*Statistical Analysis*

Values are expressed as mean±SEM or median. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) software package for PC. Single comparisons were performed by unpaired Mann-Whitney test. Correlation analyses were performed using non parametric correlation Spearman test. A value of p<0.05 was considered as statistically significant.

*Ethics statement*

This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the University of Clermont-Ferrand France. Animal protocol was approved by the committee for Research and Ethical Issues of Auvergne department (CEMEA Auvergne) following international directive 86/609/CEE (n°CE16-09).

**Table 1. Strains, plasmids and bacteriophages used in this study.**

Strain or plasmids	Description	Source
<b>Plasmids</b>		
pGEM-T easy	A/T cloning vector (Amp <sup>R</sup> )	Promega
pJET1.2	Positive selection cloning vector (Amp <sup>R</sup> )	Fermentas
pIb-LF82	LF82 <i>nrdHIEF</i> operon cloned into <i>Bam</i> HI site of pJET1.2 (Amp <sup>R</sup> )	This work
pIII-LF82	LF82 <i>nrdDG</i> operon cloned into pGEM-T easy (+),(Amp <sup>R</sup> )	This work
pBAD18	Arabinose-inducible expression vector (Amp <sup>R</sup> )	(247)
pETS174	Chromosomal <i>nrdAB</i> operon cloned into <i>Eco</i> RI and <i>Xba</i> I sites of pBAD18 (Amp <sup>R</sup> )	This work
pETS175	Plasmidic <i>nrdAB</i> operon cloned into <i>Eco</i> RI and <i>Xba</i> I sites of pBAD18 (Amp <sup>R</sup> )	This work
<b>Strains</b>		
DH5α	<i>recA1 endA1 hsdR17 supE44 thi-1 relA1 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR Φ80dlacZM15</i>	Laboratory stock
LF82	<i>E. coli</i> LF82 wild type adherent-invasive	(245)
LF82 Δ <i>nrdR</i>	<i>E. coli</i> LF82 Δ <i>nrdR</i> :: <i>kan</i> (Kan <sup>R</sup> )	This work
LF82 Δ <i>nrdE</i>	<i>E. coli</i> LF82 Δ <i>nrdE</i> :: <i>kan</i> (Kan <sup>R</sup> )	This work
LF82 Δ <i>nrdD</i>	<i>E. coli</i> LF82 Δ <i>nrdD</i> :: <i>kan</i> (Kan <sup>R</sup> )	This work

*Manuscript: “Role of ribonucleotide reductase during infection of adherent-invasive  
Escherichia coli LF82 isolated from Crohn’s disease”*

E101 *thr1 leuB6 fhuA21 lacY1 glnV44 rfbC1 nrdA<sup>ts</sup> thyA6 rpsL67 thi1* (241)  
*deoC1 deoB37*

**Table 2. Primers used in this study**

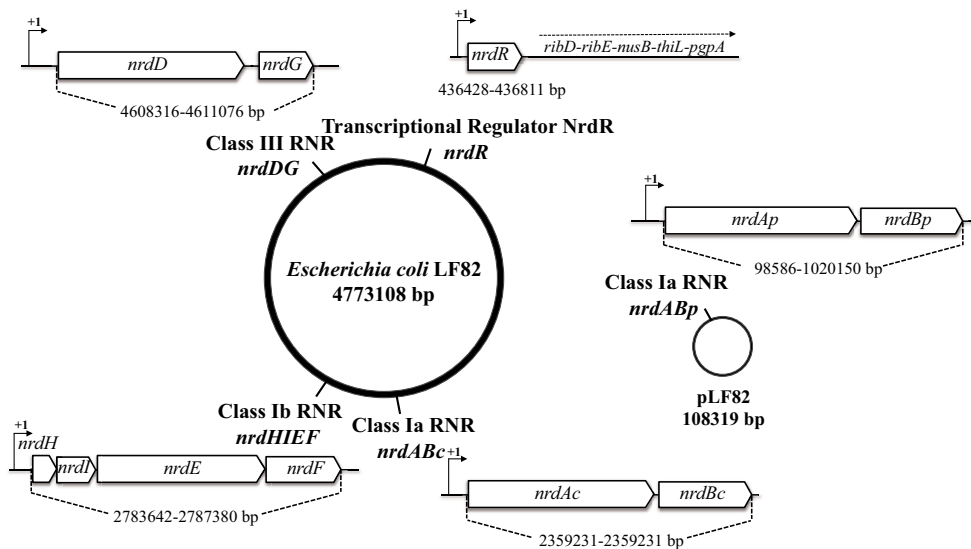
Name	Sequence (5'→3')	Application
EcoliDG-BHI-up	AAGGATCCGCCGTGAATGGAAGGGGC	Cloning
EcoliDG-BHI-lw	AAGGATCCTCGACATTCTGGTCGGTCAG	Cloning
LF82 PnrDH BamHI	AAGGATCCGAATCGGTAACCGAATTG	Cloning
opero Ib-lw (BamHI)	AAAGGATCCATTATTTCCCTGCTGCGGGTAGTG	Cloning
M13 dir	GTTTTCCCAGTCACGAC	Check-Cloning
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC	Check-Cloning
EcE-up	CCGATGAACGCATTCGCAA	cDNA
EcE-lw	AAAGTGACAGGAGACGCAG	Reverse
EcGAP-up	GGCCAGGACATCGTTTCCA	cDNA
EcGAP-lw	GATGATGTTCTGGGAAGCGC	Reverse
LF82 fliS RT up	GCAAGGCAAAGGCGTCTCTTTGTC	cDNA
LF82 fliS RT lw	GACATCGTTGCGTAAATTGGCTTGC	Reverse
LF82 motA RT up	CAATACCAAACGCCGGAAGTGAGTC	cDNA
LF82 motA RT lw	GATAGCGTCATGCTTGAATTTATCGTCG	Reverse
LF82 cheR RT up	GCTCCTGACGCACGCGTAC	cDNA
LF82 cheR RT lw	CAGCATAGCGATGACGCTGGC	Reverse
LF82 kdgK RT up	CGAAGCCGCCGCAAATTTCTGG	cDNA
LF82 kdgK RT lw	GTCTCTTCTTTGCTGGCCACAG	Reverse
LF82 tsr RT up	GCTGGCGGAGCTGATACAACTG	cDNA
LF82 tsr RT lw	GCCTACCAGAATCCACATCGCC	Reverse
LF82 fliC RT up	CGGCAAATACCGCTGATACGTC	cDNA amplificati
LF82 fliC RT lw	GACTGCATCAGTCACGATGGGG	Reverse
ABc-pBADup	AAGAATTCGGAGTGAAAGCATGAATCAGAATCTGCTG	pBAD cloning
ABc-pBADlow	AATCTAGAGGGCCATTCAGAGCTGGAAG	pBAD cloning
ABp-pBADup	AAGAATTCGGAGTGATACATGATAAGCATCGTAAAACGTAAC	pBAD cloning
ABp-pBADlow	AATCTAGATCGGTTTACAGGTCAGCAAAC	pBAD cloning

**Results**

*AIEC LF82 strain harboured four RNR classes in their genome*

Interestingly, this strain harboured also in the plasmid called pLF82 an additional class Ia (*nrdAB*) copy. As all *Enterobacteria*, the AIEC strain *E. coli* LF82, encodes in its genome

the three different RNR classes (class Ia, Ib and III) In Figure 1 is shown the position of the different ribonucleotide reductase genes in the LF82 chromosome and plasmid. Alignment comparison between LF82 *E. coli* chromosomal and plasmid NrdAB proteins showed only 59% identities and 75% similarities. On the other hand, comparison between the LF82



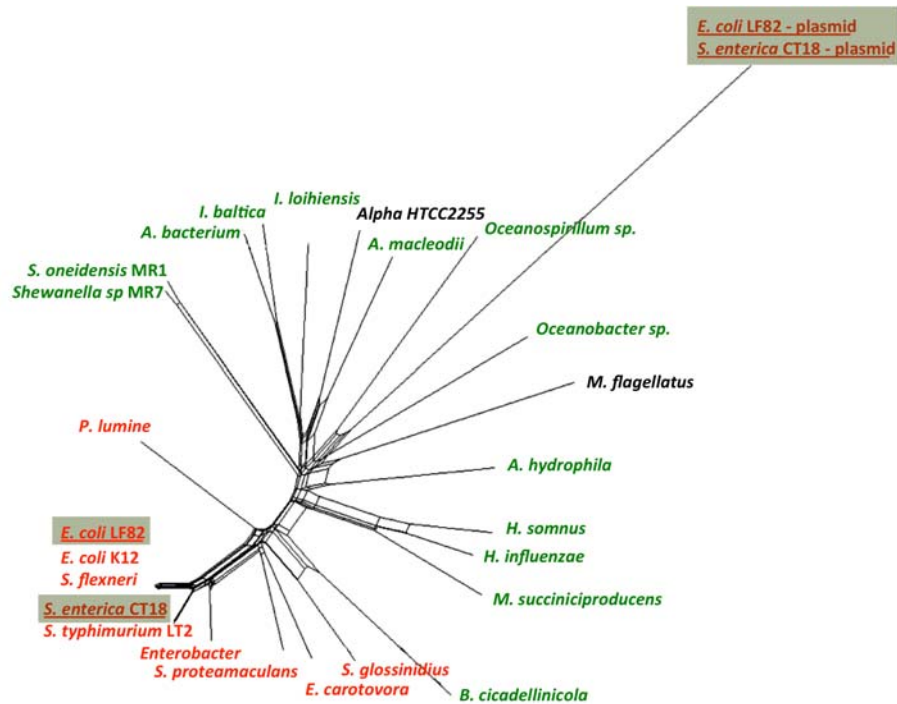
**Figure 1. Chromosomal and plasmidic RNR operon organization of the AIEC strain LF82.** *nrdABC*, *nrdHIEF*, *nrdDG* and *nrdABp* size and genome localization are shown in the scheme. The transcriptional factor encoding gene *nrdR* is also marked.

chromosomal NrdAB proteins to other chromosomal NrdAB from different enterobacteria showed 97% of identities and 98% of similarities. An alignment of the plasmidic NrdAB amino acid sequences of AIEC LF82 to the corresponding chromosomal sequences of the *E. coli* K12 strain, considered the prototype of all class Ia RNR class (data not shown). Class Ib and III RNRs proteins encoded in the chromosome showed around 99-100% identities/similarities to other similar RNR class in enterobacteria.

*Plasmid encoded NrdAB is acquired by horizontal gene transfer and is not functional.*

A comparison of the LF82 *E. coli* plasmidic *nrdAB* copy encoded in the pLF82 plasmid with other bacterial class Ia proteins and especially to the enterobacteriaceae family gives surprising results. In a phylogenetic reconstruction represented in Figure 2 clearly is

shown the sequence diverge of the plasmidic NrdAB proteins compared to the closed phylogenetic sequence of other *E. coli* strains. This plasmidic encoded NrdAB proteins, which only have been detected in *Salmonella enterica* subs *enterica* serovar Typhi str CT18 and several *Yersinia pestis* biovars, but never in other members of the *E. coli* species so far sequenced. All this sequences are located in plasmids (pLF82, pHCM2 and pMT1) that share common plasmid structure, sequence and genes (245, 277, 345). It is quite evident that the plasmid-encoded copy (NrdABp) is very different from the chromosomal copy (NrdABc). The latter is very much closer to other enterobacterial and  $\gamma$ -proteobacteria sequences. This suggests that plasmid copies have a different rate of evolution from their corresponding chromosomal copies and that the acquisition of this copy could occurs by horizontal gene transfer.



**Figure 2. Plasmidic NrdAB are acquired by horizontal gene transfer.** NrdA and NrdB aerobic class Ia catalytic subunits. NeighborNet phylogenetic network from a representative collection of the 26 closest BLAST neighbours in RNRdb to *E. coli* LF82 and *S. enterica* CT18 chromosomal and plasmid encoded. Enterobacterias are highlighted on red,  $\gamma$ -proteobacteria on green and others on black.

In order to determine whether the NrdA and NrdB plasmidic copies harboured in the pLF82 are functional or not in the AIEC LF82 strain, a complementation enzymatic test was performed. The entire *nrdAB* sequences from the chromosome and plasmid copy were cloned into and arabinose inducible pBAD18 vector as described in the material and methods section. As expected, the positive control pETS174 allowed complementation of the *nrdA*<sup>ts</sup> deficiency

demonstrating that these proteins are fully functional and active (Table 3). The absent of bacterial growth using the pETS175 construction at 42°C in arabinose LB plates (but with a lower rate with glucose) revealed absence of complementation of the temperature-sensitive phenotype and thus, indicated that plasmidic class Ia RNR (*nrdABp*) is not enzymatically functional in the condition of our experiment.

**Table 3. Plasmid NrdAB proteins are not enzymatically active in a heterologous complementation assay.**

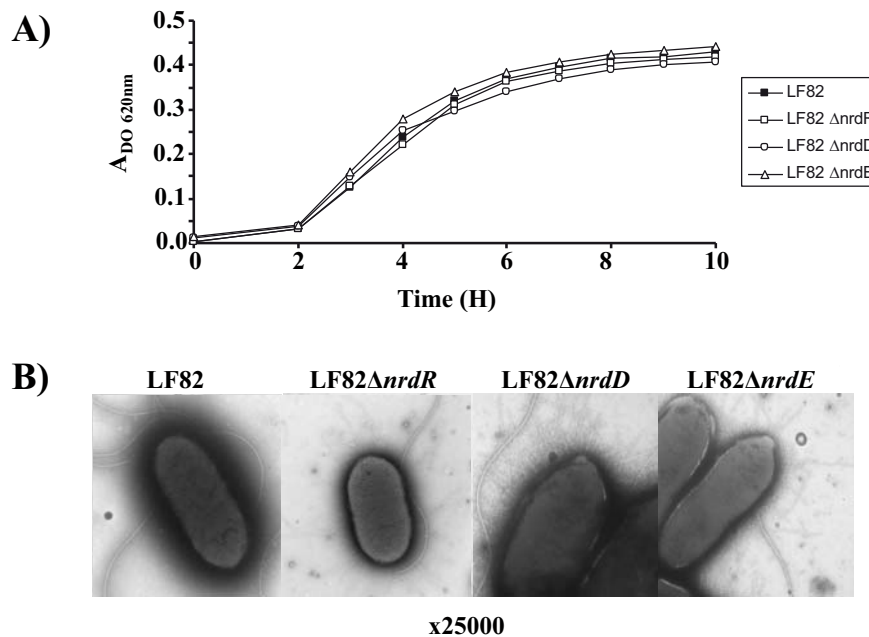
	Arabinose 0.2 %		Glucose 0.2 %	
	30°C	42°C	30°C	42°C
<b>E101+pETS174</b>	3.1x10 <sup>9</sup> ±1.2x10 <sup>7</sup>	2.9x10 <sup>9</sup> ±3.2x10 <sup>7</sup>	2.9x10 <sup>9</sup> ±4.2x10 <sup>6</sup>	<10
<b>E101+pETS175</b>	5.2x10 <sup>9</sup> ±7.2x10 <sup>6</sup>	<10	3.1x10 <sup>9</sup> ±1.2x10 <sup>7</sup>	<10
<b>E101+pBAD18</b>	2.1x10 <sup>9</sup> ±1.2x10 <sup>6</sup>	<10	3.1x10 <sup>9</sup> ±1.2x10 <sup>7</sup>	<10

Values cfu/ml are based on results of at least six independent experiments.

#### Characterization of LF82 $\Delta nrd$ mutants

In order to evaluate the role different RNR in the ability of AIEC strain LF82 to infect or adhere to T-84 cells, insertion mutants interrupted *nrd* genes were constructed. Growth curves during an 8-hour period in DMEM growth medium of the *nrd* negative mutants (*nrdR*, *nrdD* and *nrdE* mutants) were similar to those of wild-

type LF82 strain (Figure 3). Analysis of the *nrd* mutants by electron microscopy examination indicated that their expressed flagella and type 1 pili at the surface of the bacteria (Figure 3). However, the mean number of flagella produced by bacteria is decreased in the *nrdR* mutant compared to wild-type bacteria.



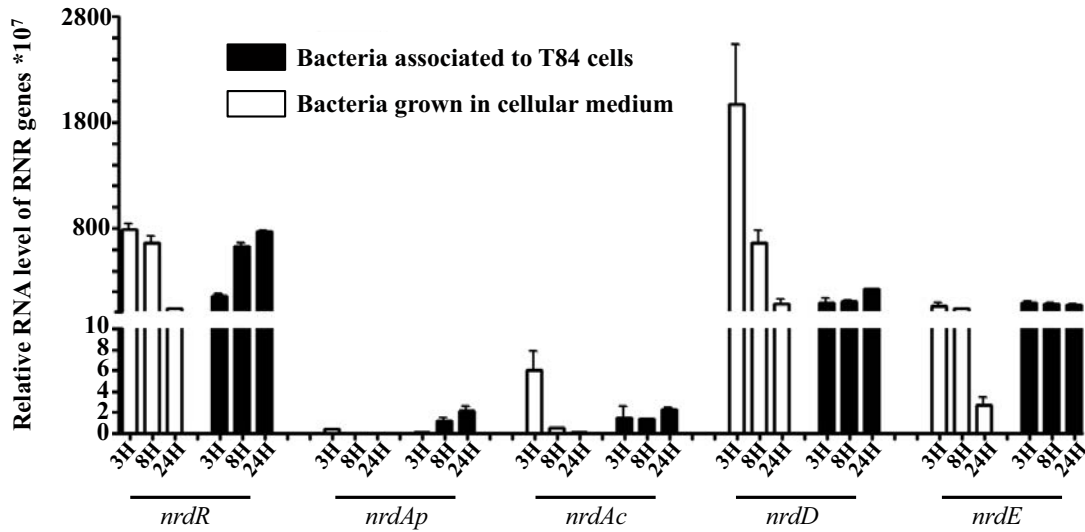
**Figure 3. Characterization of LF82 *E. coli* *nrd* mutants.** In A) is shown the aerobic growth curves for the different *nrd* mutants. In B) is shown the negatively stained AIEC LF82 and the different *nrd* mutants observed using transmission electron micrograph of, magnification  $\times 25000$ .

#### Expression of RNR genes during cell infection

To explore the involvement of the different RNR proteins in the ability of AIEC bacteria to adhere to intestinal epithelial cells, we measured the levels of *nrdR*, *nrdAp*, *nrdAc*, *nrdD* and *nrdE* mRNA by RT-PCR in LF82 bacteria after different infection periods of T-84 epithelial cells or after bacterial growth in DMEM during similar periods (Figure 4). Concerning *nrdR*, the levels of mRNA increased during bacteria-cell interaction, whereas the level of *nrdR* mRNA

decreased when bacteria grown in DMEM during similar period. *nrdAp* is not expressed during bacterial growth in DMEM medium, but increased in mRNA was observed after contact with T-84 cells. Finally, concerning *nrdAc*, *nrdD* and *nrdE*, we observed a decreased of gene expression when bacteria grown in DMEM, whereas a similar mRNA level of these 3 genes were detected during bacteria/cell interaction. All together, these results indicated that *nrd* family proteins should play a crucial role during

infection of intestinal epithelial cells by AIEC  
 bacteria.



**Figure 4: Expression of the different *nrd* genes depends on cell interaction** mRNA levels of *nrdR*, *nrdAp*, *nrdAc*, *nrdD* and *nrdE* genes in associated (after a 3h , 8h or 24h infection period) relative to those of AIEC LF82 bacteria grown during similar periods in MEM cell culture medium using real-time RT-PCR. As controls, 16S rRNA levels were measured. Only experiments showing the same levels of 16S rRNA for each sample were taken into account. Data represent means of at least three separate experiments and bars SEM.

*Behaviour in epithelial intestinal T-84 cells and ileal loops*

A significant decrease in adhesion was observed only for the LF82- $\Delta$ *nrdR* mutant (Figure 5A). The decrease in the ability of this mutant to adhere was type 1 pili-independent since the LF82  $\Delta$ *nrdR* mutant still expressed functional type 1 pili on the bacterial surface as assessed by the ability of the bacteria to aggregate yeast cells via binding to D-mannose residues located on the yeast surface (data not shown).

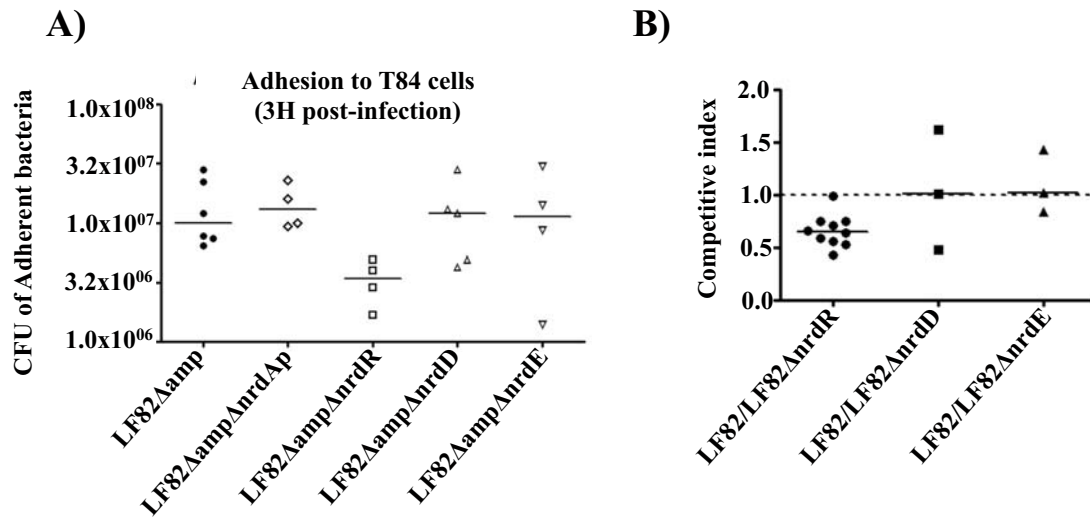
The bacterial interaction of LF82, LF82  $\Delta$ *nrdR*, LF82  $\Delta$ *nrdD* and LF82  $\Delta$ *nrdE* was investigated using *in vivo* mouse ileal loop assays. Determination of the competitive index for LF82  $\Delta$ *nrdD* and  $\Delta$ *nrdE* isogenic mutants compared to wild type bacteria LF82 showed a mean competitive index close to 1. In contrast, for LF82  $\Delta$ *nrdR*, the mean competitive index was

$0.65 \pm 0.15$  (Figure 5B). These suggest that *nrdR* was important in ileal mucosal interaction and this absence reduce the ability of LF82 to interact with ileal mucosa.

*nrdD and nrdR important in persistence in CEABAC10 mice*

To investigate the role of Nrd proteins in gut colonization by AIEC LF82, CEABAC10 transgenic mice expressing human CEACAM molecules (CEACAM3, CEACAM5, CEACAM6 and CEACAM7) were challenged with LF82, LF82- $\Delta$ *nrdR*, LF82- $\Delta$ *nrdD* or LF82- $\Delta$ *nrdE* bacteria. Quantification of AIEC LF82 bacteria in stool samples on post-infection day 2 revealed a 80.0 and 87.8 fold decrease ( $P = 0.05$ ) respectively in LF82-  $\Delta$ *nrdR* ( $5.0 \times 10^7$  CFU/g of feces) and in LF82-  $\Delta$ *nrdD* ( $3.6 \times 10^7$  CFU/g of feces) compared with LF82-  $\Delta$ *fimH/fimH* LF82

( $3.0 \times 10^8$  CFU/g of feces, Figure 6), a 93.0 and 93.2 fold decrease at day 3 post-infection  $4.0 \times 10^6$  for (LF82-  $\Delta nrdR$ ;  $3.9 \times 10^6$  for LF82-  $\Delta nrdR$  vs  $5.7 \times 10^7$  CFU/g of feces, respectively;  $P = 0.01$



**Figure 5: Adhesion of LF82-*nrd* mutants using T-84 cells or ileal loop.** (A) Cell-associated bacteria were quantified using non differentiated T-84 cells after a 3H infection. (B) Competitive index of LF82 with LF82-  $\Delta nrdR$ , LF82-  $\Delta nrdD$  and LF82-  $\Delta nrdE$ . Intestinal ileal loops were inoculated by mixed inoculum comprising equivalent numbers of two bacterial strains, and their presence was compared after 5 h by competitive index analysis, which provides a sensitive measurement of the relative degree of attenuation.

and  $P=0.05$ ) and a 95.6 and 83.2 fold decrease at day 6 post-infection ( $6.7 \times 10^4$  for LF82-  $\Delta nrdR$ ;  $2.5 \times 10^6$  for LF82-  $\Delta nrdR$  vs  $1.5 \times 10^6$  CFU/g of feces, respectively;  $P = 0.01$  and  $P=0.05$ ). No significant difference in bacterial persistence in gut of CEABAC10 mice was observed for LF82-  $\Delta nrdE$  compared to the wild-type LF82.

These results suggest that the deletion of *nrdR* and *nrdD* genes in the AIEC LF82 genome decreased dramatically the ability of bacteria to persist in the gut of CEABAC10 mice (Figure 6).

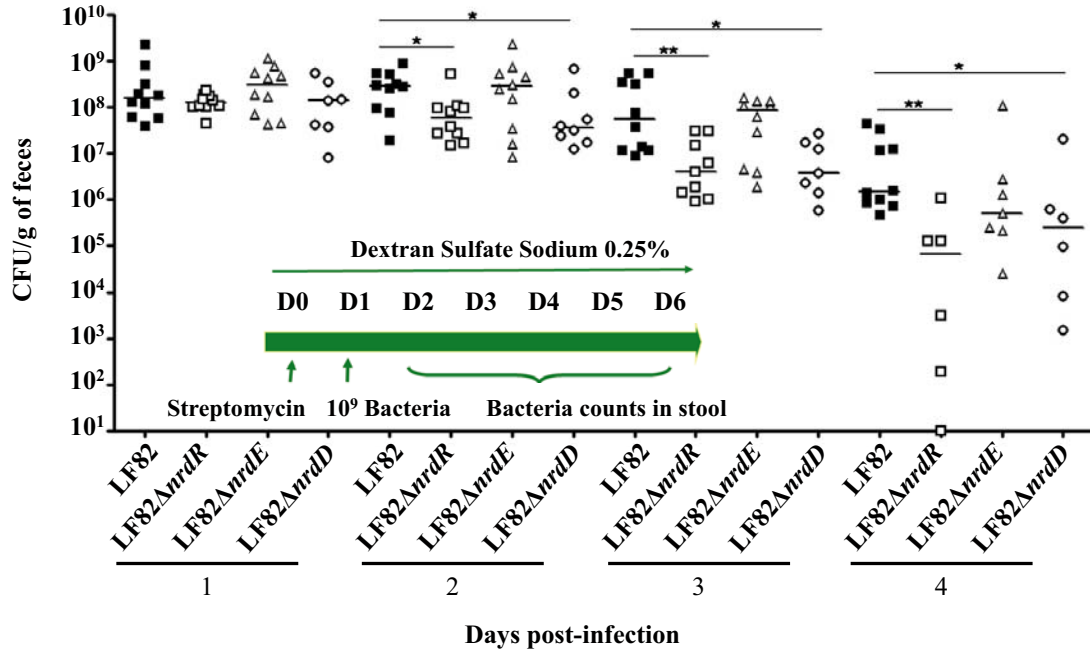
#### *nrdR* regulon

We demonstrated that NrdR was involved in the LF82 adhesion and persistence. Thus we decided to investigate the mechanisms leading to these phenotypes. RNA from aerobic LF82 and LF82-

*nrdR* cultures were extracted in order to obtain an *nrdR* expression profile in the AIEC LF82 strain. The microarray data from this transcriptomic analysis showed a differential expression of 33 genes in a  $\Delta nrdR$  mutant relative to the WT. Of those deregulated genes, only 7 showed a positive induced expression in absence of *nrdR* in whereas 26 genes indicated a down-regulation of their expression in the  $\Delta nrdR$  mutant (Table 4). As we expected for previous studies (278) the operon for the class Ib RNR expression, *nrdHIEF*, was induced in the *nrdR* mutant strain. This RNR encoding genes, together with two other genes involved in cell division *dicB* and *ydfD* were the few up-regulated genes obtained in the LF82  $\Delta nrdR$  microarray. Interestingly, 8 entirely transcriptional units (*ycgR*; *fliDST*; *aer*; *tsr*; *motAB* *cheAW*; *tar* *tap*



*cheRBYZ*; *fliC* and *yhjH*) from those 26 repressed genes are related to the bacterial motility and chemotaxis (Table 4). Four, genes encoding the chemotaxis receptors known as methyl-accepting chemotaxis proteins (MCPs): *aer*, *tsr*, *tar* and *tap*



**Figure 6: Bacterial persistence in gut of CEABAC10 mice.** Quantification of LF82, LF82-ΔnrdR, LF82-ΔnrdE, LF82-ΔnrdD bacteria in the feces of CEABAC10 mice receiving 0.25% DSS in drinking water after oral infection with 10<sup>9</sup> bacteria at day 0. \* P<0.05; and \*\* P<0.01.

**Table 4. NrdR-dependent expression of genes identified by transcriptomic analysis.**

Gene	Operon arrangement	Log FC	Gene product
<i>nrdH</i>	<i>nrdHIEF</i>	2.29	Glutaredoxine-like protein
<i>nrdI</i>		2.32	Ribonucleotide reductase stimulatory protein: flavodoxine
<i>nrdE</i>		2.28	Ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha
<i>nrdF</i>		1.92	Ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta
<i>dicB</i>	<i>dicB ydfDE insD intQ</i>	1.15	Cell division inhibition protein
<i>ydfD</i>		1.44	Hypothetical protein
<i>yieI</i>	<i>yieIJ</i>	1.13	Putative inner membrane protein
<i>ycgR</i>	<i>ycgR</i>	-1.08	Flagellar function protein
<i>fliD</i>	<i>fliDST</i>	-1.21	Flagellar filament capping protein
<i>fliS</i>		-1.34	Flagellar biosynthesis protein FliS
<i>fliT</i>		-1.39	Flagellar biosynthesis protein FliT
<i>aer</i>	<i>aer</i>	-1.47	Aerotaxis receptor
<i>fliC</i>	<i>fliC</i>	-1.56	Flagelline
<i>motA</i>	<i>motAB cheAW</i>	-1.63	Flagellar motor protein; proton conduct

Manuscript: “Role of ribonucleotide reductase during infection of adherent-invasive *Escherichia coli* LF82 isolated from Crohn’s disease”

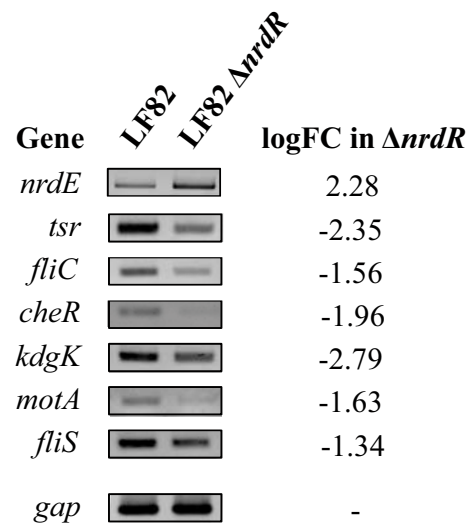
<i>motB</i>		-1.75	Flagellar motor protein; motor rotation
<i>cheA</i>		-1.82	Chemotaxis protein; chemotactic sensory histidine kinase
<i>cheW</i>		-2.06	Purine-binding chemotaxis protein
<i>tar</i>	<i>tar tap cheRBYZ</i>	-2.26	Methyl-accepting chemotaxis protein II
<i>tap</i>		-2.36	Methyl-accepting chemotaxis protein IV
<i>cheR</i>		-1.96	Chemotaxis methyltransferase; regulator
<i>cheB</i>		-2.01	Chemotaxis-specific methylesterase; chemotaxis regulator
<i>cheY</i>		-2.18	Chemotaxis regulator transmitting signal
<i>cheZ</i>		-2.01	Chemotaxis protein phosphatase for CheY; chemotaxis regulator
<i>tsr</i>	<i>tsr</i>	-2.35	Methyl-accepting chemotaxis protein I
<i>ymdA</i>	<i>ymdA</i>	-1.31	Hypothetical protein
<i>yjcZ</i>	<i>yjdAZ</i>	-1.88	Hypothetical protein
<i>yhjG</i>	<i>yhjG</i>	-1.48	Hypothetical protein
<i>yhjH</i>	<i>yhjH</i>	-2.26	EAL domain-containing protein
<i>kdgK</i>	<i>kdgK</i>	-2.79	2-dehydro-3-deoxygluconokinase

and also the 6 *che* loci (*cheA*, *cheB*, *cheR*, *cheZ*, *cheY* and *cheW*) responsible of chemotactic movements of *E. coli* decrease their expression around 2 log FC in a *nrdR* mutant. The genes involve in the flagellar biosynthesis *fliDST*, the flagelline *fliC* and flagelar function *ycgR* show a repression in an *nrdR* mutant, demonstrating the possible implication of this transcriptional regulator in the LF82 motility. The EAL domain-containing phosphodiesterase YhjH encoding gene, *yhjH*, has been found also to be repressed 2.26 log FC in a *AnrdR* LF82 related to the wild-type strain.

These results were confirmed by quantitative PCR picking some of the genes described in Table 4 (Figure 7).

#### *nrdR* regulates LF82 motility and chemotaxis

In order to corroborate phenotypically our microarray data suggesting a possible role of NrdR in motility and chemotaxis, we proceed evaluating the behaviour of LF82 and LF82 $\Delta$ *nrdR* on semisolid agar supplemented with four different chemoattractants (D-glucose,



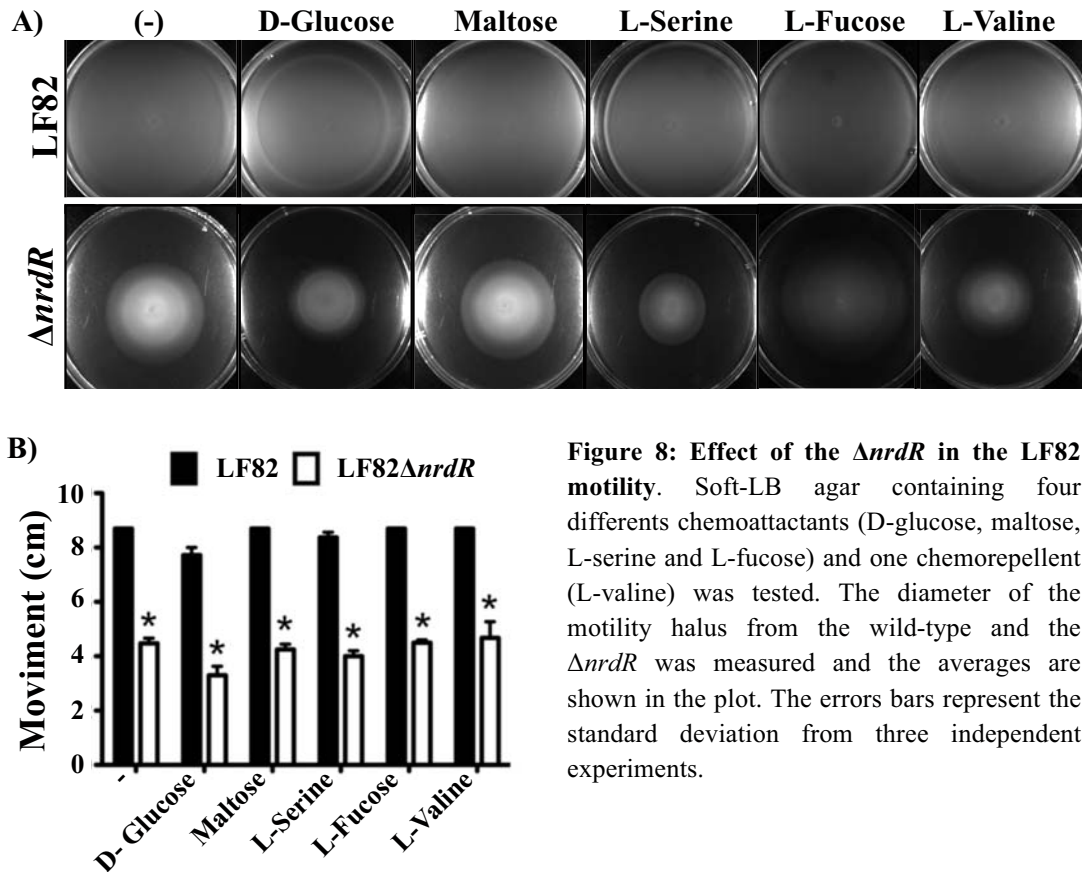
**Figure 7: RT-PCR analysis of transcription of the *nrdE*, *tsr*, *fliC*, *cheR*, *kdgK*, *motA*, *fliS* genes from *Escherichia coli* LF82 (wt) and LF82  $\Delta$ *nrdR*. *gap* gene was used as a control to confirm that equivalent quantities of templates were loaded. logFC values from the array are shown. PCR cycles were in all cases 25.**

maltose, L-serine and L-fucose) and one chemorepellent (L-valine). After 12 h incubation at 30°C in all conditions the LF82 *AnrdR* presented a reduced colony motility compared to

its wild-type strain (Figure 8A). The diameters of the motility halus in the LF82  $\Delta nrdR$  were half of the halus produced by the wild-type strain (Figure 8B).

To study the effect of the *nrdR* mutation in chemotaxis, we perform specific chemotactic

soft-agar plates supplemented with serine, maltose and thymine to check the respectively repressed MCP receptors Tsr, Tar and Tap (see material and methods). As we expected, the swim patterns of the *nrdR* mutant after 24h incubation were more reduced in the mutant compared to the



**Figure 8: Effect of the  $\Delta nrdR$  in the LF82 motility.** Soft-LB agar containing four different chemoattractants (D-glucose, maltose, L-serine and L-fucose) and one chemorepellent (L-valine) was tested. The diameter of the motility halus from the wild-type and the  $\Delta nrdR$  was measured and the averages are shown in the plot. The errors bars represent the standard deviation from three independent experiments.

corresponding wild-type strain (Figure 9). The effect of maltose supplemented plates were early visualised than thymine plates (from 12 to 24h) being consistent with the fact that Tar receptor, together with Tsr, is more abundant in the cell than Tgr receptor (340). The latest chemotactic response was observed in the thymine plates where the chemotactic expansion was visible after 24h incubation in the  $\Delta nrdR$  and the WT only needed 12h, (Figure 9B).

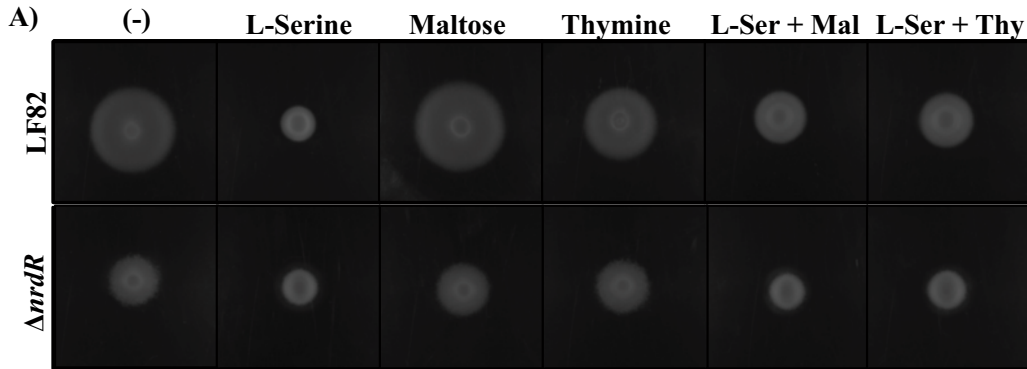
Unexpectedly, serine supplemented plates showed a similar chemotactic response in the

wild-type and in the mutant. To further investigate this result, we assessed the chemotactic pattern of each strain to serine in combination with maltose or thymine. In both cases, the addition of serine in the medium reduces the bacterial swim on the agar related when maltose and thymine are checked separately.

## Discussion

Ribonucleotide reductases operate under a range of environmental conditions suggesting

that, while the propensity to synthesise deoxyribonucleotides is an essential function, the type of RNR present will have an impact on the adaptability of microorganisms to different environments. In addition is important to understand which RNR is important during the adherence, colonization and persistence in pathogenic bacteria when more that one class is encoded in its genome. The case of LF82 is of



B)

Attractant	(h)	LF82		LF82 $\Delta$ nrdR	
		cm	cm/h	cm	cm/h
-	4	0.03	-	0.04	-
	8	0.07	0.0100	0.04	-
	12	0.12	0.0125	0.04	-
	24	0.23	0.0092	0.08	0.0033
L-Serine	4	0.04	-	0.04	-
	8	0.04	-	0.05	0.0025
	12	0.04	-	0.07	0.0050
	24	0.09	0.0042	0.14	0.0058
Maltose	4	0.04	-	0.04	-
	8	0.06	0.0050	0.05	0.0025
	12	0.14	0.0200	0.08	0.0075
	24	0.23	0.0075	0.13	0.0042
Thymine	4	0.05	-	0.04	-
	8	0.05	-	0.05	0.0025
	12	0.1	0.0125	0.05	-
	24	0.17	0.0058	0.13	0.0067
L-Ser + Mal	4	0.05	-	0.05	-
	8	0.07	0.005	0.05	-
	12	0.08	0.0025	0.06	0.0025
	24	0.12	0.0033	0.11	0.0042
L-Ser + Thy	4	0.06	-	0.05	-
	8	0.07	0.0025	0.06	0.0025
	12	0.08	0.0025	0.07	0.0025
	24	0.13	0.0042	0.12	0.0042

**Figure 9. NrdR effect on LF82 chemotaxis receptors Methyl-accepting Chemotaxis Proteins (MCP).** A) Chemotaxis halus of LF82 and LF82 $\Delta$ nrdR. Special chemotactic soft-agar plates contained 2  $\mu$ M of L-serine, 100  $\mu$ M of maltose, 1  $\mu$ M thymine and different combinations of maltose and thymine with L-serine. B) Table where the different diameter of the chemotaxis halus and the expansive velocity of LF82 and LF82 $\Delta$ nrdR on the chemotactic-agar plate are shown at each attractant condition. Mesures were taken at 4, 8, 12 and 24 hours of incubation.

particular interest. This strain is exceptional against the different *E. coli* species and in enterobacteriaceae since present an additional RNR class of plasmidic origin. This bacteria posses four different RNR classes, three encoded in the chromosome (class Ia, Ib and III) and additional copy (class Ib) encoded in the plasmid pFL82. Due to the complicate gene regulation to

achieve balanced pools of the different dNTPs necessaries for DNA replication tight gene regulation need to be achieve not to alter the dNTPs pools. For these reason it is important to understand which RNR is essential during LF82 absorption, persistence and infection. In this study we have unravel the role of the different RNR during LF82 infections.

*Manuscript: "Role of ribonucleotide reductase during infection of adherent-invasive Escherichia coli LF82 isolated from Crohn's disease"*

Interestingly, the plasmidic *nrdA* revealed a null expression in normal cellular DMEM medium whereas in contact to the T-84 cells, its transcription was induced. We can, thus, expect horizontal transfer to occur as a result of variations in oxygen content in the environment of an organism. However, this is not the only evidence for horizontal mobility of RNR genes. There are several cases of plasmid and prophage encoded RNRs among bacteria. These constitute evidences for association of RNR genes with mobile vectors, and integrated plasmid and phage provide direct evidence for transfer, thus contributing to the view that RNR genes are horizontally mobile. An example of this latter type of HGT leading to redundancy concerns the presence of the plasmid in *E. coli* LF82, which encodes a second copy of class Ia RNR as explained previously.

The comparison of NrdA encoded in the pLF82 and the NrdA prototype sequence from the K12 strain showed only one amino acid (K246) of the important residues in *E. coli* K12 NrdA does not match with the corresponding *E. coli* LF82 plasmid amino acid. This amino acid is located at the specificity allosteric site. When comparing the important residues of *E. coli* K12 NrdB also only one residue (L233) is mismatching with the corresponding plasmid NrdB amino acid. This second amino acid is a hydrophobic pocket that interacts with NrdA. These differences are not important since both *E. coli* K12 amino acids do not act on the active site, so the enzymatic activities of the NrdA and NrdB proteins of the LF82 plasmid is not affected.

Much is not known about these plasmid RNRs, which is their exact function, how do they act and how did they evolve to the plasmid. In this study it has been demonstrate the nonfunctionality of the plasmidic class Ia RNR of the LF82 under

normal laboratory conditions and also during the infection process but it still be possible than in other, more specific, environmental conditions induces their expression because otherwise, why evolution have maintain them? More experiments will be necessary to try to clarify its role.

During this study, NrdR has become the leading protein for its increased expression during the infection process and its evidently contribution to the bacteria adherence an invasion. The NrdR transcriptomic analysis clearly shows an important effect of this transcriptional factor related to the regulation of genes involved in the bacterial swim, where flagella is the major component and it has been described that play an important role in the adhesion to an invasion of strain LF82. The nonmotile aflagellar LF82 mutants ( $\Delta$ *fliC* or  $\Delta$ *fliA*) show a drastic reduction in adherence and invasion abilities (341, 342). *motA* and *motB* encode of the proton-conducting ion channel MotAB. MotA and MotB together apply the required force to FliG for flagellar rotation (311). MotA interaction with FliG has an essential role in switching the flagellar direction alternating the clockwise (CW) movement and stimulating cell tumble, to the counter-clockwise (CCW) state and promoting the forward movement of the bacteria (312). The effect of the deletion of *motA* and *motB* conducting to the CCW movement and reducing the bacteria chemotaxis is well known (364-366) but moreover of MotA/MotB-FliG interaction, the flagellar motor can be also controlled by the signalling molecule c-di-GMP (343). The EAL domain-containing phosphodiesterase YhjH encoding gene, *yhjH*, and presents a repression of 2.26 logFC in a  $\Delta$ *nrdR* related to the WT. In agreement to other authors (344) this reduction of *yhjH* expression increases the levels of c-di-GMP molecule, which bounded to YcgR protein,

interacts with the flagellar rotor promoting the CCW bias (343). *ycgR*, which its deletion does not reduce motility whereas the *yhjH* deletion does (344), also appears on our microarray data but without any significance deregulation for *nrdR* deletion.

The same result was previously shown in LF82 describing the decrease of associated and intracellular bacteria in a strain deficient in *fliA* (342). It was described that lower levels of c-di-GMP molecule promote Type 1 Pili expression therefore, in LF82 *AnrdR* the increasment of this signalling molecule consequence of *yhjH* down-regulation could be the responsible of the adhesion and invasion mitigation of LF82 and that it has observed in Figure 5. According to this

data, this study presents the *NrdR* transcriptional factor as a crucial protein for the LF82 virulence.

#### Acknowledgement

This work was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad with grant BFU2011-24066, CSD2008-00013 and ERA-NET PathoGenoMics (BIO2008-04362-E) to ET. This work was also supported by the Generalitat de Catalunya 2009SGR66. ET was supported by the Ramón y Cajal and I3 program from the Ministerio de Ciencia e Innovación.

#### References

1. Nordlund P, Reichard P. 2006. Ribonucleotide Reductases. *Annu Rev Biochem* **75**:681-706.
2. Torrents E, Sahlin M, Sjöberg B-M. 2008. The Ribonucleotide Reductase Family-Genetics and Genomics. In: Ribonucleotide Reductases. (ed. K.K. Andersson) Nova Science Publishers.:pp. 17-77.
3. Lundin D, Gribaldo S, Torrents E, Sjöberg BM, Poole AM. 2010. Ribonucleotide reduction - horizontal transfer of a required function spans all three domains. *BMC Evol Biol* **10**:383.
4. Lundin D, Torrents E, Poole AM, Sjöberg B-M. 2009. RNRdb, a curated database of the universal enzyme family ribonucleotide reductase, reveals a high level of misannotation in sequences deposited to Genbank. *BMC Genomics* **10**:589.
5. Garriga X, Eliasson R, Torrents E, Jordan A, Barbe J, Gibert I, Reichard P. 1996. *nrdD* and *nrdG* genes are essential for strict anaerobic growth of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **229**:189-192.
6. Cendra Mdel M, Juarez A, Torrents E. 2012. Biofilm modifies expression of ribonucleotide reductase genes in *Escherichia coli*. *PLoS One* **7**:e46350.
7. Strober W, Fuss I, Mannon P. 2007. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* **117**:514-521.
8. Xavier RJ, Podolsky DK. 2007. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **448**:427-434.
9. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. 2010. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol* **28**:573-621.
10. Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, Gambiez L, Joly B, Cortot A, Colombel JF. 1998. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **115**:1405-1413.
11. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H. 2002. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **122**:44-54.
12. Martin HM, Campbell BJ, Hart CA, Mpfu C, Nayar M, Singh R, Englyst H, Williams HF, Rhodes JM. 2004. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* **127**:80-93.
13. Boudeau J, Glasser AL, Masseret E, Joly B, Darfeuille-Michaud A. 1999. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun* **67**:4499-4509.
14. Conte MP, Schippa S, Zamboni I, Penta M, Chiarini F, Seganti L, Osborn J, Falconieri P, Borrelli O, Cucchiara S. 2006. Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **55**:1760-1767.

15. **Kotlowski R, Bernstein CN, Sepehri S, Krause DO.** 2007. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut* **56**:669-675.
16. **Neut C, Bulois P, Desreumaux P, Membre JM, Lederman E, Gambiez L, Cortot A, Quandalle P, van Kruiningen H, Colombel JF.** 2002. Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* **97**:939-946.
17. **Baumgart M, Dogan B, Rishniw M, Weitzman G, Bosworth B, Yantiss R, Orsi RH, Wiedmann M, McDonough P, Kim SG, Berg D, Schukken Y, Scherl E, Simpson KW.** 2007. Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *Isme J* **1**:403-418.
18. **Sasaki M, Sitaraman SV, Babbin BA, Gerner-Smidt P, Ribot EM, Garrett N, Alpern JA, Akyildiz A, Theiss AL, Nusrat A, Klapproth JM.** 2007. Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease. *Lab Invest* **87**:1042-1054.
19. **Martinez-Medina M, Aldeguer X, Lopez-Siles M, Gonzalez-Huix F, Lopez-Oliu C, Dahbi G, Blanco JE, Blanco J, Garcia-Gil LJ, Darfeuille-Michaud A.** 2009. Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: New ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*.
20. **Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL, Darcha C, Jantschke P, Allez M, Peeters H, Bommelaer G, Desreumaux P, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A.** 2007. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest* **117**:1566-1574.
21. **Dreux N, Denizot J, Martinez-Medina M, Mellmann A, Billig M, Kisiela D, Chattopadhyay S, Sokurenko E, Neut C, Gower-Rousseau C, Colombel JF, Bonnet R, Darfeuille-Michaud A, Barnich N.** 2013. Point Mutations in FimH Adhesin of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Enhance Intestinal Inflammatory Response. *PLoS Pathog* **9**:e1003141.
22. **Carvalho FA, Barnich N, Sivignon A, Darcha C, Chan CH, Stanners CP, Darfeuille-Michaud A.** 2009. Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J Exp Med* **206**:2179-2189.
23. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
24. **Datsenko KA, Wanner BL.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6640-6645.
25. **Chaverocche MK, Ghigo JM, d'Enfert C.** 2000. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res* **28**:E97.
26. **Adase CA, Draheim RR, Manson MD.** 2012. The residue composition of the aromatic anchor of the second transmembrane helix determines the signaling properties of the aspartate/maltose chemoreceptor Tar of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **51**:1925-1932.
27. **Stecher B, Robbiani R, Walker AW, Westendorf AM, Barthel M, Kremer M, Chaffron S, Macpherson AJ, Buer J, Parkhill J, Dougan G, von Mering C, Hardt WD.** 2007. *Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biol* **5**:2177-2189.
28. **Chassaing B, Etienne-Mesmin L, Bonnet R, Darfeuille-Michaud A.** 2013. Bile salts induce long polar fimbriae expression favouring Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* interaction with Peyer's patches. *Environ Microbiol* **15**:355-371.
29. **Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J.** 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* **177**:4121-4130.
30. **Miquel S, Peyretailade E, Claret L, de Vallee A, Dossat C, Vacherie B, Zineb el H, Segurens B, Barbe V, Sauvanet P, Neut C, Colombel JF, Medigue C, Mojica FJ, Peyret P, Bonnet R, Darfeuille-Michaud A.** 2010. Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* strain LF82. *PLoS One* **5**.
31. **Wechsler JA, Gross JD.** 1971. *Escherichia coli* mutants temperature-sensitive for DNA synthesis. *Mol Gen Genet* **113**:273-284.
32. **Torrents E, Grinberg I, Gorovitz-Harris B, Lundstrom H, Borovok I, Aharonowitz Y, Sjöberg BM, Cohen G.** 2007. NrdR controls differential expression of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase genes. *J Bacteriol* **189**:5012-5021.
33. **Stewart RC, Dahlquist FW.** 1988. N-terminal half of CheB is involved in methylesterase

*Manuscript: "Role of ribonucleotide reductase during infection of adherent-invasive Escherichia coli LF82 isolated from Crohn's disease"*

- response to negative chemotactic stimuli in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **170**:5728-5738.
34. **Barnich N, Boudeau J, Claret L, Darfeuille-Michaud A.** 2003. Regulatory and functional co-operation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Mol Microbiol* **48**:781-794.
35. **Claret L, Miquel S, Vieille N, Ryjenkov DA, Gomelsky M, Darfeuille-Michaud A.** 2007. The flagellar sigma factor FliA regulates adhesion and invasion of Crohn disease-associated *Escherichia coli* via a cyclic dimeric GMP-dependent pathway. *J Biol Chem* **282**:33275-33283.
36. **Kojima S, Blair DF.** 2001. Conformational change in the stator of the bacterial flagellar motor. *Biochemistry* **40**:13041-13050.
37. **Berg HC.** 2003. The rotary motor of bacterial flagella. *Annu Rev Biochem* **72**:19-54.
38. **Zhou J, Sharp LL, Tang HL, Lloyd SA, Billings S, Braun TF, Blair DF.** 1998. Function of protonatable residues in the flagellar motor of *Escherichia coli*: a critical role for Asp 32 of MotB. *J Bacteriol* **180**:2729-2735.
39. **Morimoto YV, Che YS, Minamino T, Namba K.** 2010. Proton-conductivity assay of plugged and unplugged MotA/B proton channel by cytoplasmic pHluorin expressed in *Salmonella*. *FEBS Lett* **584**:1268-1272.
40. **Parkinson JS, Houts SE.** 1982. Isolation and behavior of *Escherichia coli* deletion mutants lacking chemotaxis functions. *J Bacteriol* **151**:106-113.
41. **Paul K, Nieto V, Carlquist WC, Blair DF, Harshey RM.** 2010. The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a "backstop brake" mechanism. *Mol Cell* **38**:128-139.
42. **Girgis HS, Liu Y, Ryu WS, Tavazoie S.** 2007. A comprehensive genetic characterization of bacterial motility. *PLoS Genet* **3**:1644-1660.





## *Conclusions*

---



## 7 Conclusions

1. Les RNR de classe Ib i III són important en la formació de biofilm de les soques d'*E. coli* MG1655 i E2348/69. A més a més, s'observa un increment de la seva expressió a mesura que el biofilm es va fent madur tant en la soca no patògena d'*E. coli* MG1655 com en la patògena E2348/69 en comparació a les cèl·lules que es troben en estat planctònic. La RNR de classe Ia, manté la seva expressió durant la formació del biofilm.
2. El gradient oxigènic i les condicions d'estrés que van apareixent a mesura que un biofilm va creixent tridimensionalment serien els dos factors claus que donen lloc aquest increment de les RNR de classe Ib i III. El factor transcripcional FNR promouria l'increment de l'expressió de la RNR de classe III.
3. La inducció del factor transcripcional RpoS a mesura que va incrementant l'estrés oxidatiu dins de l'estructura del biofilm, induiria la transcripció de la RNR de classe Ib encara que sense saber si de manera directa o indirecta. La inactivació del factor transcripcional Fur en les mateixes condicions d'estrès, faria incrementar l'expressió de la RNR de classe Ib.
4. El regulador global H-NS reprimeix l'expressió de la RNR de classe Ia i III. La RNR de classe Ib no mostra cap alteració en la seva transcripció en absència del modulador H-NS.
5. H-NS s'uneix a dues regions en el promotor de la RNR de classe Ia, també en el promotor de la classe III però no en el de la RNR de classe Ib.
6. La regió promotora dels gens *nrdaB* posseeix dues regions d'unió a H-NS. Una regió situada a 5' del promotor que va des de la posició -575 pb a la -235 pb i una altre que va desde la posició -50 pb a la -127 pb des del lloc d'inici

de la transcripció, deixant al centre una regió de no unió i concordant amb el mecanisme de repressió d'H-NS.

7. H-NS actua reprimint la transcripció de la RNR de classe Ia, sobretot en la fase estacionària del creixement bacterià. En anaerobiosi la màxima repressió es dona en fase exponencial, ambdues condicions, a on ja no es necessiten dNTP per la síntesi de l'ADN.
8. Ni la temperatura ni l'osmolaritat afecten l'acció reguladora del modulador H-NS en la transcripció dels gens *nrdAB*.
9. NrdR no es troba restringit en la repressió del gens que codifiquen per la RNR. L'absència del factor transcripcional NrdR de la cèl·lula bacteriana, des-regula l'expressió de 268 gens en fase exponencial i 597 en fase estacionària del creixement bacterià de l'*E. coli* MG1655 ja sigui de manera directa o indirecta.
10. NrdR reprimeix la motilitat de l'*E. coli* MG1655. A més a més, la seva deleció del cromosoma afavoreix el correcte plegament proteic i la viabilitat cel·lular durant un xòc tèrmic.
11. S'ha observat una acció de NrdR en l'adquisició de ferro. Un model de regulació conjunta amb el metal·loregulador Fur s'ha suggerit per la modulació de l'expressió de l'operó que codifica pel sideròfor del tipus enterobactina (*entCEBA*) s'ha suggerit atentent als resultats dels experiments.
12. La segona còpia de l'operó *nrdAB* codificat en el plasmidi pLF82 de la soca LF82 no es funcionalment activa, ja que no és capaç de proveir dels dNTP necessaris quan l'operó *nrdAB* cromosòmic es troba mutat.
13. El gen *nrdR* incrementa la seva expressió quan la soca LF82 es troba en un procés infecció. La seva deleció disminueix la capacitat d'adhesió cel·lular de la soca LF82 tant in vitro com in vivo així com la persistència en l'intestí de ratolins CEABAC10.

14. La deleció del gen *nrdR* en la soca LF82 provoca la repressió transcripcional de 26 gens, 20 dels quals es troben relacionats amb la motilitat i xemotaxis bacteriana. Fenotípicament, la soca LF82 $\Delta$ *nrdR* mostra una motilitat més reduïda que la soca salvatge.
  
15. NrdR mostra un paper clau en la virulència de la soca LF82 i li és donada, per primera vegada, una funció d'activador transcripcional.



## ***Bibliografia***

---





## 8 Bibliografia

1. **Reichard P, Rutberg L.** 1960. Formation of deoxycytidine 5'-phosphate from cytidine 5'-phosphate with enzymes from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **37**:554-555.
2. **Akerlund T, Nordstrom K, Bernander R.** 1995. Analysis of cell size and DNA content in exponentially growing and stationary-phase batch cultures of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**:6791-6797.
3. **Nordlund P, Reichard P.** 2006. Ribonucleotide Reductases. *Annu Rev Biochem* **75**:681-706.
4. **Sun L, Fuchs JA.** 1992. *Escherichia coli* ribonucleotide reductase expression is cell cycle regulated. *Mol Biol Cell* **3**:1095-1105.
5. **Gon S, Beckwith J.** 2006. Ribonucleotide reductases: influence of environment on synthesis and activity. *Antioxid Redox Signal* **8**:773-780.
6. **Lundin D, Torrents E, Poole AM, Sjoberg BM.** 2009. RNRdb, a curated database of the universal enzyme family ribonucleotide reductase, reveals a high level of misannotation in sequences deposited to Genbank. *BMC Genomics* **10**:589.
7. **Jordan A, Gibert I, Barbe J.** 1995. Two different operons for the same function: comparison of the *Salmonella typhimurium* nrdAB and nrDEF genes. *Gene* **167**:75-79.
8. **Roshick C, Iliffe-Lee ER, McClarty G.** 2000. Cloning and characterization of ribonucleotide reductase from *Chlamydia trachomatis*. *J Biol Chem* **275**:38111-38119.
9. **Eriksson M, Uhlin U, Ramaswamy S, Ekberg M, Regnstrom K, Sjoberg BM, Eklund H.** 1997. Binding of allosteric effectors to ribonucleotide reductase protein R1: reduction of active-site cysteines promotes substrate binding. *Structure* **5**:1077-1092.
10. **Cotruvo JA, Stubbe J.** 2011. Class I ribonucleotide reductases: metallofactor assembly and repair in vitro and in vivo. *Annu Rev Biochem* **80**:733-767.
11. **Jordan A, Aslund F, Pontis E, Reichard P, Holmgren A.** 1997. Characterization of *Escherichia coli* NrdH. A glutaredoxin-like protein with a thioredoxin-like activity profile. *J Biol Chem* **272**:18044-18050.
12. **Martin JE, Imlay JA.** 2011. The alternative aerobic ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*, NrdEF, is a manganese-dependent enzyme that enables cell replication during periods of iron starvation. *Mol Microbiol* **80**:319-334.
13. **Eliasson R, Pontis E, Jordan A, Reichard P.** 1996. Allosteric regulation of the third ribonucleotide reductase (NrdEF enzyme) from *enterobacteriaceae*. *J Biol Chem* **271**:26582-26587.
14. **Jiang W, Xie J, Norgaard H, Bollinger JM, Jr., Krebs C.** 2008. Rapid and quantitative activation of *Chlamydia trachomatis* ribonucleotide reductase by hydrogen peroxide. *Biochemistry* **47**:4477-4483.
15. **Roy B, Lepoivre M, Henry Y, Fontecave M.** 1995. Inhibition of ribonucleotide reductase by nitric oxide derived from thionitrites: reversible modifications of both subunits. *Biochemistry* **34**:5411-5418.
16. **Gaudu P, Niviere V, Petillot Y, Kauppi B, Fontecave M.** 1996. The irreversible inactivation of ribonucleotide reductase from *Escherichia coli* by superoxide radicals. *FEBS Lett* **387**:137-140.
17. **Sintchak MD, Arjara G, Kellogg BA, Stubbe J, Drennan CL.** 2002. The crystal structure of class II ribonucleotide reductase reveals how an allosterically regulated monomer mimics a dimer. *Nat Struct Biol* **9**:293-300.

18. **Larsson KM, Jordan A, Eliasson R, Reichard P, Logan DT, Nordlund P.** 2004. Structural mechanism of allosteric substrate specificity regulation in a ribonucleotide reductase. *Nat Struct Mol Biol* **11**:1142-1149.
19. **Ashley GW, Stubbe J.** 1985. Current ideas on the chemical mechanism of ribonucleotide reductases. *Pharmacol Ther* **30**:301-329.
20. **Reichard P.** 1993. From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases? *Science* **260**:1773-1777.
21. **Sun X, Eliasson R, Pontis E, Andersson J, Buist G, Sjoberg BM, Reichard P.** 1995. Generation of the glycyl radical of the anaerobic *Escherichia coli* ribonucleotide reductase requires a specific activating enzyme. *J Biol Chem* **270**:2443-2446.
22. **Ollagnier S, Mulliez E, Gaillard J, Eliasson R, Fontecave M, Reichard P.** 1996. The anaerobic *Escherichia coli* ribonucleotide reductase. Subunit structure and iron sulfur center. *J Biol Chem* **271**:9410-9416.
23. **Torrents E, Eliasson R, Wolpher H, Graslund A, Reichard P.** 2001. The anaerobic ribonucleotide reductase from *Lactococcus lactis*. Interactions between the two proteins NrdD and NrdG. *J Biol Chem* **276**:33488-33494.
24. **Sun X, Ollagnier S, Schmidt PP, Atta M, Mulliez E, Lepape L, Eliasson R, Graslund A, Fontecave M, Reichard P, Sjoberg BM.** 1996. The free radical of the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli* is at glycine 681. *J Biol Chem* **271**:6827-6831.
25. **Reichard P.** 1993. The anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **268**:8383-8386.
26. **Garriga X, Eliasson R, Torrents E, Jordan A, Barbe J, Gibert I, Reichard P.** 1996. nrdD and nrdG genes are essential for strict anaerobic growth of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **229**:189-192.
27. **Jordan A, Reichard P.** 1998. Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem* **67**:71-98.
28. **Hofer A, Crona M, Logan DT, Sjoberg BM.** 2012. DNA building blocks: keeping control of manufacture. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **47**:50-63.
29. **Brown NC, Reichard P.** 1969. Role of effector binding in allosteric control of ribonucleoside diphosphate reductase. *J Mol Biol* **46**:39-55.
30. **Reichard P.** 2002. Ribonucleotide reductases: the evolution of allosteric regulation. *Arch Biochem Biophys* **397**:149-155.
31. **Eliasson R, Pontis E, Jordan A, Reichard P.** 1999. Allosteric control of three B12-dependent (class II) ribonucleotide reductases. Implications for the evolution of ribonucleotide reduction. *J Biol Chem* **274**:7182-7189.
32. **Thelander L.** 1973. Physicochemical characterization of ribonucleoside diphosphate reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **248**:4591-4601.
33. **Rofougaran R, Crona M, Vodnala M, Sjoberg BM, Hofer A.** 2008. Oligomerization status directs overall activity regulation of the *Escherichia coli* class Ia ribonucleotide reductase. *J Biol Chem* **283**:35310-35318.
34. **Ingemarson R, Thelander L.** 1996. A kinetic study on the influence of nucleoside triphosphate effectors on subunit interaction in mouse ribonucleotide reductase. *Biochemistry* **35**:8603-8609.
35. **Kasrayan A, Birgander PL, Pappalardo L, Regnstrom K, Westman M, Slaby A, Gordon E, Sjoberg BM.** 2004. Enhancement by effectors and substrate nucleotides of R1-R2 interactions in *Escherichia coli* class Ia ribonucleotide reductase. *J Biol Chem* **279**:31050-31057.
36. **Birgander PL, Kasrayan A, Sjoberg BM.** 2004. Mutant R1 proteins from *Escherichia coli* class Ia ribonucleotide reductase with altered responses to dATP inhibition. *J Biol Chem* **279**:14496-14501.
37. **Stubbe J.** 2003. Di-iron-tyrosyl radical ribonucleotide reductases. *Curr Opin Chem Biol* **7**:183-188.

38. **Holmgren A.** 1976. Hydrogen donor system for *Escherichia coli* ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. Proc Natl Acad Sci U S A **73**:2275-2279.
39. **Meyer Y, Buchanan BB, Vignols F, Reichheld JP.** 2009. Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. Annu Rev Genet **43**:335-367.
40. **Laurent TC, Moore EC, Reichard P.** 1964. Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides. Iv. Isolation and Characterization of Thioredoxin, the Hydrogen Donor from *Escherichia Coli* B. J Biol Chem **239**:3436-3444.
41. **Holmgren A, Soderberg BO, Eklund H, Branden CI.** 1975. Three-dimensional structure of *Escherichia coli* thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution. Proc Natl Acad Sci U S A **72**:2305-2309.
42. **Aberg A, Hahne S, Karlsson M, Larsson A, Ormo M, Ahgren A, Sjoberg BM.** 1989. Evidence for two different classes of redox-active cysteines in ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*. J Biol Chem **264**:12249-12252.
43. **Lillig CH, Berndt C, Holmgren A.** 2008. Glutaredoxin systems. Biochim Biophys Acta **1780**:1304-1317.
44. **Aslund F, Ehn B, Miranda-Vizuete A, Pueyo C, Holmgren A.** 1994. Two additional glutaredoxins exist in *Escherichia coli*: glutaredoxin 3 is a hydrogen donor for ribonucleotide reductase in a thioredoxin/glutaredoxin 1 double mutant. Proc Natl Acad Sci U S A **91**:9813-9817.
45. **Prinz WA, Aslund F, Holmgren A, Beckwith J.** 1997. The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. J Biol Chem **272**:15661-15667.
46. **Gon S, Faulkner MJ, Beckwith J.** 2006. In vivo requirement for glutaredoxins and thioredoxins in the reduction of the ribonucleotide reductases of *Escherichia coli*. Antioxid Redox Signal **8**:735-742.
47. **Lin AI, Ashley GW, Stubbe J.** 1987. Lactobacillus leichmannii and Escherichia coli ribonucleotide reductases: chemical and structural similarities. Cold Spring Harb Symp Quant Biol **52**:587-596.
48. **Padovani D, Mulliez E, Fontecave M.** 2001. Activation of class III ribonucleotide reductase by thioredoxin. J Biol Chem **276**:9587-9589.
49. **Lu J, Vlamis-Gardikas A, Kandasamy K, Zhao R, Gustafsson TN, Engstrand L, Hoffner S, Engman L, Holmgren A.** 2013. Inhibition of bacterial thioredoxin reductase: an antibiotic mechanism targeting bacteria lacking glutathione. FASEB J **27**:1394-1403.
50. **Nocentini G.** 1996. Ribonucleotide reductase inhibitors: new strategies for cancer chemotherapy. Crit Rev Oncol Hematol **22**:89-126.
51. **Holmgren A, Lu J.** 2010. Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease. Biochem Biophys Res Commun **396**:120-124.
52. **Holmgren A.** 1985. Thioredoxin. Annu Rev Biochem **54**:237-271.
53. **Holmgren A.** 1979. Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Characterization of the enzymatic mechanism of *Escherichia coli* glutaredoxin. J Biol Chem **254**:3672-3678.
54. **Nordstrand K, slund F, Holmgren A, Otting G, Berndt KD.** 1999. NMR structure of *Escherichia coli* glutaredoxin 3-glutathione mixed disulfide complex: implications for the enzymatic mechanism. J Mol Biol **286**:541-552.
55. **Holmgren A.** 1989. Thioredoxin and glutaredoxin systems. J Biol Chem **264**:13963-13966.
56. **Holmgren A, Sengupta R.** 2010. The use of thiols by ribonucleotide reductase. Free Radic Biol Med **49**:1617-1628.
57. **Bushweller JH, Aslund F, Wuthrich K, Holmgren A.** 1992. Structural and functional characterization of the mutant *Escherichia coli* glutaredoxin (C14----S) and its mixed disulfide with glutathione. Biochemistry **31**:9288-9293.

58. **Stehr M, Schneider G, Aslund F, Holmgren A, Lindqvist Y.** 2001. Structural basis for the thioredoxin-like activity profile of the glutaredoxin-like NrdH-redoxin from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **276**:35836-35841.
59. **Thelander L, Reichard P.** 1979. Reduction of ribonucleotides. *Annu Rev Biochem* **48**:133-158.
60. **Ehrenberg A.** 2001. Free radical transfer, fluctuating structure and reaction cycle of ribonucleotide reductase. *Biosystems* **62**:9-12.
61. **Stubbe J, Nocera DG, Yee CS, Chang MC.** 2003. Radical initiation in the class I ribonucleotide reductase: long-range proton-coupled electron transfer? *Chem Rev* **103**:2167-2201.
62. **Zhang Z, Yang K, Chen CC, Feser J, Huang M.** 2007. Role of the C terminus of the ribonucleotide reductase large subunit in enzyme regeneration and its inhibition by Sml1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:2217-2222.
63. **Jordan A, Aragall E, Gibert I, Barbe J.** 1996. Promoter identification and expression analysis of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* nrdEF operons encoding one of two class I ribonucleotide reductases present in both bacteria. *Mol Microbiol* **19**:777-790.
64. **Cotruvo JA, Jr., Stubbe J.** 2008. NrdI, a flavodoxin involved in maintenance of the diferric-tyrosyl radical cofactor in *Escherichia coli* class Ib ribonucleotide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:14383-14388.
65. **Cotruvo JA, Jr., Stubbe J.** 2010. An active dimanganese(III)-tyrosyl radical cofactor in *Escherichia coli* class Ib ribonucleotide reductase. *Biochemistry* **49**:1297-1309.
66. **Stubbe J, Cotruvo JA, Jr.** 2011. Control of metallation and active cofactor assembly in the class Ia and Ib ribonucleotide reductases: diiron or dimanganese? *Curr Opin Chem Biol* **15**:284-290.
67. **Huque Y, Fieschi F, Torrents E, Gibert I, Eliasson R, Reichard P, Sahlin M, Sjöberg BM.** 2000. The active form of the R2F protein of class Ib ribonucleotide reductase from *Corynebacterium ammoniagenes* is a diferric protein. *J Biol Chem* **275**:25365-25371.
68. **Oka T, Udagawa K, Kinoshita S.** 1968. Unbalanced growth death due to depletion of Mn<sup>2+</sup> in *Brevibacterium ammoniagenes*. *J Bacteriol* **96**:1760-1767.
69. **Que Q, Helmann JD.** 2000. Manganese homeostasis in *Bacillus subtilis* is regulated by MntR, a bifunctional regulator related to the diphtheria toxin repressor family of proteins. *Mol Microbiol* **35**:1454-1468.
70. **Cox N, Ogata H, Stolle P, Reijerse E, Auling G, Lubitz W.** 2010. A tyrosyl-dimanganese coupled spin system is the native metalloradical cofactor of the R2F subunit of the ribonucleotide reductase of *Corynebacterium ammoniagenes*. *J Am Chem Soc* **132**:11197-11213.
71. **Hogbom M, Stenmark P, Voevodskaya N, McClarty G, Graslund A, Nordlund P.** 2004. The radical site in chlamydial ribonucleotide reductase defines a new R2 subclass. *Science* **305**:245-248.
72. **Jiang W, Saleh L, Barr EW, Xie J, Gardner MM, Krebs C, Bollinger JM, Jr.** 2008. Branched activation- and catalysis-specific pathways for electron relay to the manganese/iron cofactor in ribonucleotide reductase from *Chlamydia trachomatis*. *Biochemistry* **47**:8477-8484.
73. **Coves J, Delon B, Climent I, Sjöberg BM, Fontecave M.** 1995. Enzymic and chemical reduction of the iron center of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase protein R2. The role of the C-terminus. *Eur J Biochem* **233**:357-363.
74. **Bollinger JM, Jr., Jiang W, Green MT, Krebs C.** 2008. The manganese(IV)/iron(III) cofactor of *Chlamydia trachomatis* ribonucleotide reductase: structure, assembly, radical initiation, and evolution. *Curr Opin Struct Biol* **18**:650-657.

75. **Tollinger M, Konrat R, Hilbert BH, Marsh EN, Krautler B.** 1998. How a protein prepares for B12 binding: structure and dynamics of the B12-binding subunit of glutamate mutase from *Clostridium tetanomorphum*. *Structure* **6**:1021-1033.
76. **Torrents E, Aloy P, Gibert I, Rodriguez-Trelles F.** 2002. Ribonucleotide reductases: divergent evolution of an ancient enzyme. *J Mol Evol* **55**:138-152.
77. **Andersson J, Westman M, Sahlin M, Sjoberg BM.** 2000. Cysteines involved in radical generation and catalysis of class III anaerobic ribonucleotide reductase. A protein engineering study of bacteriophage T4 NrdD. *J Biol Chem* **275**:19449-19455.
78. **Mulliez E, Ollagnier-de Choudens S, Meier C, Cremonini M, Luchinat C, Trautwein AX, Fontecave M.** 1999. Iron-sulfur interconversions in the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Inorg Chem* **4**:614-620.
79. **Tamarit J, Mulliez E, Meier C, Trautwein A, Fontecave M.** 1999. The anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. The small protein is an activating enzyme containing a [4Fe-4S](2+) center. *J Biol Chem* **274**:31291-31296.
80. **Ollagnier S, Mulliez E, Schmidt PP, Eliasson R, Gaillard J, Deronzier C, Bergman T, Graslund A, Reichard P, Fontecave M.** 1997. Activation of the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. The essential role of the iron-sulfur center for S-adenosylmethionine reduction. *J Biol Chem* **272**:24216-24223.
81. **Uhlin U, Eklund H.** 1994. Structure of ribonucleotide reductase protein R1. *Nature* **370**:533-539.
82. **Birgander PL, Bug S, Kasrayan A, Dahlroth SL, Westman M, Gordon E, Sjoberg BM.** 2005. Nucleotide-dependent formation of catalytically competent dimers from engineered monomeric ribonucleotide reductase protein R1. *J Biol Chem* **280**:14997-15003.
83. **Uppsten M, Farnegardh M, Jordan A, Eliasson R, Eklund H, Uhlin U.** 2003. Structure of the large subunit of class Ib ribonucleotide reductase from *Salmonella typhimurium* and its complexes with allosteric effectors. *J Mol Biol* **330**:87-97.
84. **Ahluwalia D, Bienstock RJ, Schaaper RM.** 2012. Novel mutator mutants of *E. coli* nrdAB ribonucleotide reductase: insight into allosteric regulation and control of mutation rates. *DNA Repair (Amst)* **11**:480-487.
85. **Nordlund P, Eklund H.** 1993. Structure and function of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase protein R2. *J Mol Biol* **232**:123-164.
86. **Nordlund P, Sjoberg BM, Eklund H.** 1990. Three-dimensional structure of the free radical protein of ribonucleotide reductase. *Nature* **345**:593-598.
87. **Eklund H, Uhlin U, Farnegardh M, Logan DT, Nordlund P.** 2001. Structure and function of the radical enzyme ribonucleotide reductase. *Prog Biophys Mol Biol* **77**:177-268.
88. **Uppsten M, Davis J, Rubin H, Uhlin U.** 2004. Crystal structure of the biologically active form of class Ib ribonucleotide reductase small subunit from *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS Lett* **569**:117-122.
89. **Climent I, Sjoberg BM, Huang CY.** 1992. Site-directed mutagenesis and deletion of the carboxyl terminus of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase protein R2. Effects on catalytic activity and subunit interaction. *Biochemistry* **31**:4801-4807.
90. **Tong W, Burdi D, Riggs-Gelasco P, Chen S, Edmondson D, Huynh BH, Stubbe J, Han S, Arvai A, Tainer J.** 1998. Characterization of Y122F R2 of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase by time-resolved physical biochemical methods and X-ray crystallography. *Biochemistry* **37**:5840-5848.
91. **Sjoberg BM, Karlsson M, Jornvall H.** 1987. Half-site reactivity of the tyrosyl radical of ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **262**:9736-9743.
92. **Mao SS, Holler TP, Yu GX, Bollinger JM, Jr., Booker S, Johnston MI, Stubbe J.** 1992. A model for the role of multiple cysteine residues involved in ribonucleotide reduction: amazing and still confusing. *Biochemistry* **31**:9733-9743.

93. **Ando N, Brignole EJ, Zimanyi CM, Funk MA, Yokoyama K, Asturias FJ, Stubbe J, Drennan CL.** 2011. Structural interconversions modulate activity of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:21046-21051.
94. **Ormo M, Sjoberg BM.** 1990. An ultrafiltration assay for nucleotide binding to ribonucleotide reductase. *Anal Biochem* **189**:138-141.
95. **Zimanyi CM, Ando N, Brignole EJ, Asturias FJ, Stubbe J, Drennan CL.** 2012. Tangled up in knots: structures of inactivated forms of *E. coli* class Ia ribonucleotide reductase. *Structure* **20**:1374-1383.
96. **Jordan A, Pontis E, Atta M, Krook M, Gibert I, Barbe J, Reichard P.** 1994. A second class I ribonucleotide reductase in *Enterobacteriaceae*: characterization of the *Salmonella typhimurium* enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:12892-12896.
97. **Van Laer K, Dziewulska AM, Fislage M, Wahni K, Hbeddou A, Collet JF, Versees W, Mateos LM, Tamu Dufe V, Messens J.** 2013. NrdH-redoxin of *Mycobacterium tuberculosis* and *Corynebacterium glutamicum* dimerizes at high protein concentration and exclusively receives electrons from thioredoxin reductase. *J Biol Chem*.
98. **Martin JL.** 1995. Thioredoxin--a fold for all reasons. *Structure* **3**:245-250.
99. **Roca I, Torrents E, Sahlin M, Gibert I, Sjoberg BM.** 2008. NrdI essentiality for class Ib ribonucleotide reduction in *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* **190**:4849-4858.
100. **Johansson R, Torrents E, Lundin D, Sprenger J, Sahlin M, Sjoberg BM, Logan DT.** 2010. High-resolution crystal structures of the flavoprotein NrdI in oxidized and reduced states--an unusual flavodoxin. *Structural biology. FEBS J* **277**:4265-4277.
101. **Boal AK, Cotruvo JA, Jr., Stubbe J, Rosenzweig AC.** 2010. Structural basis for activation of class Ib ribonucleotide reductase. *Science* **329**:1526-1530.
102. **Kauppi B, Nielsen BB, Ramaswamy S, Larsen IK, Thelander M, Thelander L, Eklund H.** 1996. The three-dimensional structure of mammalian ribonucleotide reductase protein R2 reveals a more-accessible iron-radical site than *Escherichia coli* R2. *J Mol Biol* **262**:706-720.
103. **Ohrstrom M, Popovic-Bijelic A, Luo J, Stenmark P, Högbon M, Graslund A.** 2011. Inhibition of chlamydial class Ic ribonucleotide reductase by C-terminal peptides from protein R2. *J Pept Sci* **17**:756-762.
104. **Young P, Andersson J, Sahlin M, Sjoberg BM.** 1996. Bacteriophage T4 anaerobic ribonucleotide reductase contains a stable glycy radical at position 580. *J Biol Chem* **271**:20770-20775.
105. **Logan DT, Andersson J, Sjoberg BM, Nordlund P.** 1999. A glycy radical site in the crystal structure of a class III ribonucleotide reductase. *Science* **283**:1499-1504.
106. **Knappe J, Sawers G.** 1990. A radical-chemical route to acetyl-CoA: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* **6**:383-398.
107. **Wagner AF, Frey M, Neugebauer FA, Schafer W, Knappe J.** 1992. The free radical in pyruvate formate-lyase is located on glycine-734. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:996-1000.
108. **Becker A, Kabsch W.** 2002. X-ray structure of pyruvate formate-lyase in complex with pyruvate and CoA. How the enzyme uses the Cys-418 thiyl radical for pyruvate cleavage. *J Biol Chem* **277**:40036-40042.
109. **Logan DT, Mulliez E, Larsson KM, Bodevin S, Atta M, Garnaud PE, Sjoberg BM, Fontecave M.** 2003. A metal-binding site in the catalytic subunit of anaerobic ribonucleotide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:3826-3831.
110. **Luttringer F, Mulliez E, Dublet B, Lemaire D, Fontecave M.** 2009. The Zn center of the anaerobic ribonucleotide reductase from *E. coli*. *J Biol Inorg Chem* **14**:923-933.
111. **Chothia C, Lesk AM.** 1986. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J* **5**:823-826.

112. **Stubbe J.** 2000. Ribonucleotide reductases: the link between an RNA and a DNA world? *Curr Opin Struct Biol* **10**:731-736.
113. **Leppanen VM, Parast CV, Wong KK, Kozarich JW, Goldman A.** 1999. Purification and crystallization of a proteolytic fragment of *Escherichia coli* pyruvate formate-lyase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55**:531-533.
114. **Frey PA, Reed GH.** 1993. Lysine 2,3-aminomutase and the mechanism of the interconversion of lysine and beta-lysine. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **66**:1-39.
115. **Beinert H, Holm RH, Munck E.** 1997. Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* **277**:653-659.
116. **Blattner FR, Plunkett G, 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453-1462.
117. **Herrick J, Sclavi B.** 2007. Ribonucleotide reductase and the regulation of DNA replication: an old story and an ancient heritage. *Mol Microbiol* **63**:22-34.
118. **Filpula D, Fuchs JA.** 1977. Regulation of ribonucleoside diphosphate reductase synthesis in *Escherichia coli*: increased enzyme synthesis as a result of inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis. *J Bacteriol* **130**:107-113.
119. **Hanke PD, Fuchs JA.** 1984. Requirement of protein synthesis for the induction of ribonucleoside diphosphate reductase mRNA in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **193**:327-331.
120. **Jacobson BA, Fuchs JA.** 1998. Multiple cis-acting sites positively regulate *Escherichia coli* *nrd* expression. *Mol Microbiol* **28**:1315-1322.
121. **Tuggle CK, Fuchs JA.** 1986. Regulation of the operon encoding ribonucleotide reductase in *Escherichia coli*: evidence for both positive and negative control. *EMBO J* **5**:1077-1085.
122. **Fuller RS, Kaguni JM, Kornberg A.** 1981. Enzymatic replication of the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**:7370-7374.
123. **Augustin LB, Jacobson BA, Fuchs JA.** 1994. *Escherichia coli* Fis and DnaA proteins bind specifically to the *nrd* promoter region and affect expression of an *nrd-lac* fusion. *J Bacteriol* **176**:378-387.
124. **Langer U, Richter S, Roth A, Weigel C, Messer W.** 1996. A comprehensive set of DnaA-box mutations in the replication origin, *oriC*, of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **21**:301-311.
125. **Fuller RS, Funnell BE, Kornberg A.** 1984. The *dnaA* protein complex with the *E. coli* chromosomal replication origin (*oriC*) and other DNA sites. *Cell* **38**:889-900.
126. **Gon S, Camara JE, Klungsoyr HK, Crooke E, Skarstad K, Beckwith J.** 2006. A novel regulatory mechanism couples deoxyribonucleotide synthesis and DNA replication in *Escherichia coli*. *EMBO J* **25**:1137-1147.
127. **Mathews CK.** 2006. DNA precursor metabolism and genomic stability. *FASEB J* **20**:1300-1314.
128. **Katayama T, Ozaki S, Keyamura K, Fujimitsu K.** 2010. Regulation of the replication cycle: conserved and diverse regulatory systems for DnaA and *oriC*. *Nat Rev Microbiol* **8**:163-170.
129. **Sun L, Jacobson BA, Dien BS, Sreenc F, Fuchs JA.** 1994. Cell cycle regulation of the *Escherichia coli* *nrd* operon: requirement for a cis-acting upstream AT-rich sequence. *J Bacteriol* **176**:2415-2426.
130. **Lee YS, Kim H, Hwang DS.** 1996. Transcriptional activation of the *dnaA* gene encoding the initiator for *oriC* replication by IciA protein, an inhibitor of in vitro *oriC* replication in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **19**:389-396.
131. **Zhou P, Bogan JA, Welch K, Pickett SR, Wang HJ, Zaritsky A, Helmstetter CE.** 1997. Gene transcription and chromosome replication in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**:163-169.



132. **Han JS, Kwon HS, Yim JB, Hwang DS.** 1998. Effect of IciA protein on the expression of the *nrd* gene encoding ribonucleoside diphosphate reductase in *E. coli*. *Mol Gen Genet* **259**:610-614.
133. **Borovok I, Gorovitz B, Yanku M, Schreiber R, Gust B, Chater K, Aharonowitz Y, Cohen G.** 2004. Alternative oxygen-dependent and oxygen-independent ribonucleotide reductases in *Streptomyces*: cross-regulation and physiological role in response to oxygen limitation. *Mol Microbiol* **54**:1022-1035.
134. **Rodionov DA, Gelfand MS.** 2005. Identification of a bacterial regulatory system for ribonucleotide reductases by phylogenetic profiling. *Trends Genet* **21**:385-389.
135. **Torrents E, Grinberg I, Gorovitz-Harris B, Lundstrom H, Borovok I, Aharonowitz Y, Sjoberg BM, Cohen G.** 2007. NrdR controls differential expression of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase genes. *J Bacteriol* **189**:5012-5021.
136. **Zheng D, Constantinidou C, Hobman JL, Minchin SD.** 2004. Identification of the CRP regulon using in vitro and in vivo transcriptional profiling. *Nucleic Acids Res* **32**:5874-5893.
137. **Monje-Casas F, Jurado J, Prieto-Alamo MJ, Holmgren A, Pueyo C.** 2001. Expression analysis of the *nrdHIEF* operon from *Escherichia coli*. Conditions that trigger the transcript level in vivo. *J Biol Chem* **276**:18031-18037.
138. **Vassinova N, Kozyrev D.** 2000. A method for direct cloning of fur-regulated genes: identification of seven new fur-regulated loci in *Escherichia coli*. *Microbiology* **146 Pt 12**:3171-3182.
139. **Stojiljkovic I, Baumler AJ, Hantke K.** 1994. Fur regulon in gram-negative bacteria. Identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a fur titration assay. *J Mol Biol* **236**:531-545.
140. **Panina EM, Mironov AA, Gelfand MS.** 2001. Comparative analysis of FUR regulons in gamma-proteobacteria. *Nucleic Acids Res* **29**:5195-5206.
141. **Aslund F, Zheng M, Beckwith J, Storz G.** 1999. Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:6161-6165.
142. **Demple B.** 1996. Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* soxRS oxidative stress regulon--a review. *Gene* **179**:53-57.
143. **Battesti A, Majdalani N, Gottesman S.** 2011. The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* **65**:189-213.
144. **Hristova D, Wu CH, Jiang W, Krebs C, Stubbe J.** 2008. Importance of the maintenance pathway in the regulation of the activity of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase. *Biochemistry* **47**:3989-3999.
145. **Kehres DG, Janakiraman A, Slauch JM, Maguire ME.** 2002. Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *mntH* transcription by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fe<sup>2+</sup>, and Mn<sup>2+</sup>. *J Bacteriol* **184**:3151-3158.
146. **Braun V, Hantke K, Koster W.** 1998. Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation. *Met Ions Biol Syst* **35**:67-145.
147. **Yeo WS, Lee JH, Lee KC, Roe JH.** 2006. IscR acts as an activator in response to oxidative stress for the *suf* operon encoding Fe-S assembly proteins. *Mol Microbiol* **61**:206-218.
148. **Jang S, Imlay JA.** 2010. Hydrogen peroxide inactivates the *Escherichia coli* Isc iron-sulphur assembly system, and OxyR induces the Suf system to compensate. *Mol Microbiol* **78**:1448-1467.
149. **Roca I, Ballana E, Panosa A, Torrents E, Gibert I.** 2008. Fumarate and nitrate reduction (FNR) dependent activation of the *Escherichia coli* anaerobic ribonucleotide reductase *nrdDG* promoter. *Int Microbiol* **11**:49-56.
150. **Boston T, Atlung T.** 2003. FNR-mediated oxygen-responsive regulation of the *nrdDG* operon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**:5310-5313.
151. **Tolla DA, Savageau MA.** 2010. Regulation of aerobic-to-anaerobic transitions by the FNR cycle in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **397**:893-905.

152. **Gunsalus RP, Park SJ.** 1994. Aerobic-anaerobic gene regulation in *Escherichia coli*: control by the ArcAB and Fnr regulons. *Res Microbiol* **145**:437-450.
153. **Spiro S, Gaston KL, Bell AI, Roberts RE, Busby SJ, Guest JR.** 1990. Interconversion of the DNA-binding specificities of two related transcription regulators, CRP and FNR. *Mol Microbiol* **4**:1831-1838.
154. **Weber KD, Vincent OD, Kiley PJ.** 2005. Additional determinants within *Escherichia coli* FNR activating region 1 and RNA polymerase alpha subunit required for transcription activation. *J Bacteriol* **187**:1724-1731.
155. **Dillon SC, Dorman CJ.** 2010. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat Rev Microbiol* **8**:185-195.
156. **Dorman CJ.** 2007. H-NS, the genome sentinel. *Nat Rev Microbiol* **5**:157-161.
157. **Johansson J, Dagberg B, Richet E, Uhlin BE.** 1998. H-NS and StpA proteins stimulate expression of the maltose regulon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**:6117-6125.
158. **Germer J, Becker G, Metzner M, Hengge-Aronis R.** 2001. Role of activator site position and a distal UP-element half-site for sigma factor selectivity at a CRP/H-NS-activated sigma(s)-dependent promoter in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **41**:705-716.
159. **Park HS, Ostberg Y, Johansson J, Wagner EG, Uhlin BE.** 2010. Novel role for a bacterial nucleoid protein in translation of mRNAs with suboptimal ribosome-binding sites. *Genes Dev* **24**:1345-1350.
160. **Dole S, Kuhn S, Schnetz K.** 2002. Post-transcriptional enhancement of *Escherichia coli* bgl operon silencing by limitation of BglG-mediated antitermination at low transcription rates. *Mol Microbiol* **43**:217-226.
161. **Dorman CJ.** 2013. Genome architecture and global gene regulation in bacteria: making progress towards a unified model? *Nat Rev Microbiol*.
162. **Dorman CJ.** 2004. H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat Rev Microbiol* **2**:391-400.
163. **Dorman CJ, Hinton JC, Free A.** 1999. Domain organization and oligomerization among H-NS-like nucleoid-associated proteins in bacteria. *Trends Microbiol* **7**:124-128.
164. **Ueguchi C, Seto C, Suzuki T, Mizuno T.** 1997. Clarification of the dimerization domain and its functional significance for the *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. *J Mol Biol* **274**:145-151.
165. **Esposito D, Petrovic A, Harris R, Ono S, Eccleston JF, Mbabaali A, Haq I, Higgins CF, Hinton JC, Driscoll PC, Ladbury JE.** 2002. H-NS oligomerization domain structure reveals the mechanism for high order self-association of the intact protein. *J Mol Biol* **324**:841-850.
166. **Lucchini S, Rowley G, Goldberg MD, Hurd D, Harrison M, Hinton JC.** 2006. H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria. *PLoS Pathog* **2**:e81.
167. **Lang B, Blot N, Bouffartigues E, Buckle M, Geertz M, Gualerzi CO, Mavathur R, Muskhelishvili G, Pon CL, Rimsky S, Stella S, Babu MM, Travers A.** 2007. High-affinity DNA binding sites for H-NS provide a molecular basis for selective silencing within proteobacterial genomes. *Nucleic Acids Res* **35**:6330-6337.
168. **Dame RT, Noom MC, Wuite GJ.** 2006. Bacterial chromatin organization by H-NS protein unravelled using dual DNA manipulation. *Nature* **444**:387-390.
169. **Maurer S, Fritz J, Muskhelishvili G.** 2009. A systematic in vitro study of nucleoprotein complexes formed by bacterial nucleoid-associated proteins revealing novel types of DNA organization. *J Mol Biol* **387**:1261-1276.
170. **Prosseda G, Falconi M, Giangrossi M, Gualerzi CO, Micheli G, Colonna B.** 2004. The virF promoter in *Shigella*: more than just a curved DNA stretch. *Mol Microbiol* **51**:523-537.
171. **Falconi M, Colonna B, Prosseda G, Micheli G, Gualerzi CO.** 1998. Thermoregulation of *Shigella* and *Escherichia coli* EIEC pathogenicity. A

- temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of virF promoter to transcriptional repressor H-NS. *EMBO J* **17**:7033-7043.
172. **Colonna B, Casalino M, Fradiani PA, Zagaglia C, Naitza S, Leoni L, Prosseda G, Coppo A, Ghelardini P, Nicoletti M.** 1995. H-NS regulation of virulence gene expression in enteroinvasive *Escherichia coli* harboring the virulence plasmid integrated into the host chromosome. *J Bacteriol* **177**:4703-4712.
173. **Ono S, Goldberg MD, Olsson T, Esposito D, Hinton JC, Ladbury JE.** 2005. H-NS is a part of a thermally controlled mechanism for bacterial gene regulation. *Biochem J* **391**:203-213.
174. **Arold ST, Leonard PG, Parkinson GN, Ladbury JE.** 2010. H-NS forms a superhelical protein scaffold for DNA condensation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:15728-15732.
175. **Bouffartigues E, Buckle M, Badaut C, Travers A, Rimsky S.** 2007. H-NS cooperative binding to high-affinity sites in a regulatory element results in transcriptional silencing. *Nat Struct Mol Biol* **14**:441-448.
176. **Dame RT, Wyman C, Wurm R, Wagner R, Goosen N.** 2002. Structural basis for H-NS-mediated trapping of RNA polymerase in the open initiation complex at the *rrnB* P1. *J Biol Chem* **277**:2146-2150.
177. **Grainger DC, Hurd D, Goldberg MD, Busby SJ.** 2006. Association of nucleoid proteins with coding and non-coding segments of the *Escherichia coli* genome. *Nucleic Acids Res* **34**:4642-4652.
178. **Herring CD, Raffaele M, Allen TE, Kanin EI, Landick R, Ansari AZ, Palsson BO.** 2005. Immobilization of *Escherichia coli* RNA polymerase and location of binding sites by use of chromatin immunoprecipitation and microarrays. *J Bacteriol* **187**:6166-6174.
179. **Schneider R, Lurz R, Luder G, Tolksdorf C, Travers A, Muskhelishvili G.** 2001. An architectural role of the *Escherichia coli* chromatin protein FIS in organising DNA. *Nucleic Acids Res* **29**:5107-5114.
180. **Ali Azam T, Iwata A, Nishimura A, Ueda S, Ishihama A.** 1999. Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J Bacteriol* **181**:6361-6370.
181. **Schneider R, Travers A, Kutateladze T, Muskhelishvili G.** 1999. A DNA architectural protein couples cellular physiology and DNA topology in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **34**:953-964.
182. **Bradley MD, Beach MB, de Koning AP, Pratt TS, Osuna R.** 2007. Effects of Fis on *Escherichia coli* gene expression during different growth stages. *Microbiology* **153**:2922-2940.
183. **Cho BK, Knight EM, Barrett CL, Palsson BO.** 2008. Genome-wide analysis of Fis binding in *Escherichia coli* indicates a causative role for A-/AT-tracts. *Genome Res* **18**:900-910.
184. **McLeod SM, Aiyar SE, Gourse RL, Johnson RC.** 2002. The C-terminal domains of the RNA polymerase alpha subunits: contact site with Fis and localization during co-activation with CRP at the *Escherichia coli* proP P2 promoter. *J Mol Biol* **316**:517-529.
185. **Kahramanoglou C, Seshasayee AS, Prieto AI, Ibberson D, Schmidt S, Zimmermann J, Benes V, Fraser GM, Luscombe NM.** 2011. Direct and indirect effects of H-NS and Fis on global gene expression control in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **39**:2073-2091.
186. **Shi X, Bennett GN.** 1994. Plasmids bearing hfq and the hns-like gene *stpA* complement hns mutants in modulating arginine decarboxylase gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **176**:6769-6775.
187. **Mayer O, Rajkowitsch L, Lorenz C, Konrat R, Schroeder R.** 2007. RNA chaperone activity and RNA-binding properties of the *E. coli* protein StpA. *Nucleic Acids Res* **35**:1257-1269.

188. **Lim CJ, Whang YR, Kenney LJ, Yan J.** 2012. Gene silencing H-NS paralogue StpA forms a rigid protein filament along DNA that blocks DNA accessibility. *Nucleic Acids Res* **40**:3316-3328.
189. **Free A, Dorman CJ.** 1997. The *Escherichia coli* stpA gene is transiently expressed during growth in rich medium and is induced in minimal medium and by stress conditions. *J Bacteriol* **179**:909-918.
190. **Dame RT, Luijsterburg MS, Krin E, Bertin PN, Wagner R, Wuite GJ.** 2005. DNA bridging: a property shared among H-NS-like proteins. *J Bacteriol* **187**:1845-1848.
191. **Cusick ME, Belfort M.** 1998. Domain structure and RNA annealing activity of the *Escherichia coli* regulatory protein StpA. *Mol Microbiol* **28**:847-857.
192. **Doetsch M, Gstrein T, Schroeder R, Furtig B.** 2010. Mechanisms of StpA-mediated RNA remodeling. *RNA Biol* **7**:735-743.
193. **Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM.** 1995. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**:711-745.
194. **Beloin C, Roux A, Ghigo JM.** 2008. *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**:249-289.
195. **Donlan RM.** 2000. Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO J* **46**:S47-52.
196. **Donlan RM, Costerton JW.** 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**:167-193.
197. **Sutherland IW.** 2001. The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* **9**:222-227.
198. **Flemming HC, Wingender J.** 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* **8**:623-633.
199. **White AP, Gibson DL, Collinson SK, Banser PA, Kay WW.** 2003. Extracellular polysaccharides associated with thin aggregative fimbriae of *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *J Bacteriol* **185**:5398-5407.
200. **Sutherland IW.** 2001. Exopolysaccharides in biofilms, flocs and related structures. *Water Sci Technol* **43**:77-86.
201. **Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP.** 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**:1318-1322.
202. **Mah TF, O'Toole GA.** 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* **9**:34-39.
203. **Anderl JN, Franklin MJ, Stewart PS.** 2000. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:1818-1824.
204. **Costerton JW.** 2001. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends Microbiol* **9**:50-52.
205. **Stewart PS, Costerton JW.** 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**:135-138.
206. **Zhang X, Bishop PL.** 2003. Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances. *Chemosphere* **50**:63-69.
207. **Ito A, Taniuchi A, May T, Kawata K, Okabe S.** 2009. Increased antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms. *Appl Environ Microbiol* **75**:4093-4100.
208. **Costerton JW, Stewart PS.** 2001. Battling biofilms. *Sci Am* **285**:74-81.
209. **Darveau RP.** 2010. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol* **8**:481-490.
210. **Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ, Greenberg EP.** 2000. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* **407**:762-764.
211. **Lianhua Y, Yunchao H, Geng X, Youquang Z, Guangqiang Z, Yujie L.** 2013. Effect of Brominated Furanones on the Formation of Biofilm by *Escherichia coli* on Polyvinyl Chloride Materials. *Cell Biochem Biophys*.

212. **Danese PN, Pratt LA, Kolter R.** 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol* **182**:3593-3596.
213. **Dunne WM, Jr.** 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* **15**:155-166.
214. **Vidal O, Longin R, Prigent-Combaret C, Dorel C, Hooreman M, Lejeune P.** 1998. Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new ompR allele that increases curli expression. *J Bacteriol* **180**:2442-2449.
215. **Ben Nasr A, Olsen A, Sjobring U, Muller-Esterl W, Bjorck L.** 1996. Assembly of human contact phase proteins and release of bradykinin at the surface of curli-expressing *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **20**:927-935.
216. **Uhlich GA, Cooke PH, Solomon EB.** 2006. Analyses of the red-dry-rough phenotype of an *Escherichia coli* O157:H7 strain and its role in biofilm formation and resistance to antibacterial agents. *Appl Environ Microbiol* **72**:2564-2572.
217. **Reisner A, Haagenzen JA, Schembri MA, Zechner EL, Molin S.** 2003. Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Mol Microbiol* **48**:933-946.
218. **Molin S, Tolker-Nielsen T.** 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr Opin Biotechnol* **14**:255-261.
219. **Domka J, Lee J, Bansal T, Wood TK.** 2007. Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Environ Microbiol* **9**:332-346.
220. **Beloin C, Valle J, Latour-Lambert P, Faure P, Kzreminski M, Balestrino D, Haagenzen JA, Molin S, Prensier G, Arbeille B, Ghigo JM.** 2004. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol Microbiol* **51**:659-674.
221. **Sauer K, Camper AK.** 2001. Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *J Bacteriol* **183**:6579-6589.
222. **Heydorn A, Ersboll B, Kato J, Hentzer M, Parsek MR, Tolker-Nielsen T, Givskov M, Molin S.** 2002. Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. *Appl Environ Microbiol* **68**:2008-2017.
223. **Gonzalez Barrios AF, Zuo R, Hashimoto Y, Yang L, Bentley WE, Wood TK.** 2006. Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). *J Bacteriol* **188**:305-316.
224. **Xavier KB, Bassler BL.** 2005. Regulation of uptake and processing of the quorum-sensing autoinducer AI-2 in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**:238-248.
225. **Roy V, Meyer MT, Smith JA, Gamby S, Sintim HO, Ghodssi R, Bentley WE.** 2013. AI-2 analogs and antibiotics: a synergistic approach to reduce bacterial biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**:2627-2638.
226. **Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP.** 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**:295-298.
227. **Herzberg M, Kaye IK, Peti W, Wood TK.** 2006. YdgG (TqsA) controls biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 through autoinducer 2 transport. *J Bacteriol* **188**:587-598.
228. **Romling U.** 2002. Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Res Microbiol* **153**:205-212.
229. **Da Re S, Ghigo JM.** 2006. A CsgD-independent pathway for cellulose production and biofilm formation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**:3073-3087.
230. **Kjaergaard K, Schembri MA, Ramos C, Molin S, Klemm P.** 2000. Antigen 43 facilitates formation of multispecies biofilms. *Environ Microbiol* **2**:695-702.

231. **Holden NJ, Gally DL.** 2004. Switches, cross-talk and memory in *Escherichia coli* adherence. *J Med Microbiol* **53**:585-593.
232. **Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG.** 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* **184**:1140-1154.
233. **Wang S, Fleming RT, Westbrook EM, Matsumura P, McKay DB.** 2006. Structure of the *Escherichia coli* FlhDC complex, a prokaryotic heteromeric regulator of transcription. *J Mol Biol* **355**:798-808.
234. **Gualdi L, Tagliabue L, Landini P.** 2007. Biofilm formation-gene expression relay system in *Escherichia coli*: modulation of sigmaS-dependent gene expression by the CsgD regulatory protein via sigmaS protein stabilization. *J Bacteriol* **189**:8034-8043.
235. **Uhlich GA, Keen JE, Elder RO.** 2002. Variations in the csgD promoter of *Escherichia coli* O157:H7 associated with increased virulence in mice and increased invasion of HEp-2 cells. *Infect Immun* **70**:395-399.
236. **Zhao K, Liu M, Burgess RR.** 2007. Adaptation in bacterial flagellar and motility systems: from regulon members to 'foraging'-like behavior in *E. coli*. *Nucleic Acids Res* **35**:4441-4452.
237. **Raivio TL, Silhavy TJ.** 2001. Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu Rev Microbiol* **55**:591-624.
238. **Corona-Izquierdo FP, Membrillo-Hernandez J.** 2002. A mutation in rpoS enhances biofilm formation in *Escherichia coli* during exponential phase of growth. *FEMS Microbiol Lett* **211**:105-110.
239. **Ito A, May T, Kawata K, Okabe S.** 2008. Significance of rpoS during maturation of *Escherichia coli* biofilms. *Biotechnol Bioeng* **99**:1462-1471.
240. **Aberg A, Shingler V, Balsalobre C.** 2008. Regulation of the fimB promoter: a case of differential regulation by ppGpp and DksA in vivo. *Mol Microbiol* **67**:1223-1241.
241. **Wechsler JA, Gross JD.** 1971. *Escherichia coli* mutants temperature-sensitive for DNA synthesis. *Mol Gen Genet* **113**:273-284.
242. **Iguchi A, Thomson NR, Ogura Y, Saunders D, Ooka T, Henderson IR, Harris D, Asadulghani M, Kurokawa K, Dean P, Kenny B, Quail MA, Thurston S, Dougan G, Hayashi T, Parkhill J, Frankel G.** 2009. Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. *J Bacteriol* **191**:347-354.
243. **Cendra Mdel M, Juarez A, Torrents E.** 2012. Biofilm modifies expression of ribonucleotide reductase genes in *Escherichia coli*. *PLoS One* **7**:e46350.
244. **Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H.** 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* **2**:2006 0008.
245. **Miquel S, Peyretailade E, Claret L, de Vallee A, Dossat C, Vacherie B, Zineb el H, Segurens B, Barbe V, Sauvanet P, Neut C, Colombel JF, Medigue C, Mojica FJ, Peyret P, Bonnet R, Darfeuille-Michaud A.** 2010. Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* strain LF82. *PLoS One* **5**.
246. **Miller JH.** 1992. A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
247. **Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J.** 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* **177**:4121-4130.
248. **Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, 2nd, Peterson KM.** 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**:175-176.
249. **Sjoberg BM, Torrents E.** 2011. Shift in ribonucleotide reductase gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* during infection. *Infect Immun* **79**:2663-2669.

250. **Stoker NG, Fairweather NF, Spratt BG.** 1982. Versatile low-copy-number plasmid vectors for cloning in *Escherichia coli*. *Gene* **18**:335-341.
251. **Garcia J, Madrid C, Cendra M, Juarez A, Pons M.** 2009. N9L and L9N mutations toggle Hha binding and hemolysin regulation by *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* H-NS. *FEBS Lett* **583**:2911-2916.
252. **de Lorenzo V, Herrero M, Jakubzik U, Timmis KN.** 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* **172**:6568-6572.
253. **Hanahan D, Jessee J, Bloom FR.** 1991. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* **204**:63-113.
254. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
255. **Adase CA, Draheim RR, Manson MD.** 2012. The residue composition of the aromatic anchor of the second transmembrane helix determines the signaling properties of the aspartate/maltose chemoreceptor Tar of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **51**:1925-1932.
256. **Schwyn B, Neilands JB.** 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* **160**:47-56.
257. **Sanger F.** 1981. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* **214**:1205-1210.
258. **Madrid C, Nieto JM, Paytubi S, Falconi M, Gualerzi CO, Juarez A.** 2002. Temperature- and H-NS-dependent regulation of a plasmid-encoded virulence operon expressing *Escherichia coli* hemolysin. *J Bacteriol* **184**:5058-5066.
259. **Cohen SN, Chang AC, Hsu L.** 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**:2110-2114.
260. **Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**:6127-6145.
261. **Herrero M, de Lorenzo V, Timmis KN.** 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **172**:6557-6567.
262. **Wehrli W.** 1983. Rifampin: mechanisms of action and resistance. *Rev Infect Dis* **5 Suppl 3**:S407-411.
263. **Datsenko KA, Wanner BL.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6640-6645.
264. **Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
265. **Torrents E, Sjoberg BM.** 2010. Antibacterial activity of radical scavengers against class Ib ribonucleotide reductase from *Bacillus anthracis*. *Biol Chem* **391**:229-234.
266. **O'Toole GA, Pratt LA, Watnick PI, Newman DK, Weaver VB, Kolter R.** 1999. Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol* **310**:91-109.
267. **Moreira CG, Palmer K, Whiteley M, Sircili MP, Trabulsi LR, Castro AF, Sperandio V.** 2006. Bundle-forming pili and EspA are involved in biofilm formation by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**:3952-3961.
268. **Constantinidou C, Hobman JL, Griffiths L, Patel MD, Penn CW, Cole JA, Overton TW.** 2006. A reassessment of the FNR regulon and transcriptomic analysis of the effects of nitrate, nitrite, NarXL, and NarQP as *Escherichia coli* K12 adapts from aerobic to anaerobic growth. *J Biol Chem* **281**:4802-4815.
269. **Stewart PS, Franklin MJ.** 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* **6**:199-210.
270. **Ito A, May T, Taniuchi A, Kawata K, Okabe S.** 2009. Localized expression profiles of rpoS in *Escherichia coli* biofilms. *Biotechnol Bioeng* **103**:975-983.

271. **Varghese S, Wu A, Park S, Imlay KR, Imlay JA.** 2007. Submicromolar hydrogen peroxide disrupts the ability of Fur protein to control free-iron levels in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **64**:822-830.
272. **Peter BJ, Arsuaga J, Breier AM, Khodursky AB, Brown PO, Cozzarelli NR.** 2004. Genomic transcriptional response to loss of chromosomal supercoiling in *Escherichia coli*. *Genome Biol* **5**:R87.
273. **Sonden B, Uhlin BE.** 1996. Coordinated and differential expression of histone-like proteins in *Escherichia coli*: regulation and function of the H-NS analog StpA. *EMBO J* **15**:4970-4980.
274. **Krishnan HH, Ghosh A, Paul K, Chowdhury R.** 2004. Effect of anaerobiosis on expression of virulence factors in *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **72**:3961-3967.
275. **Bertin P, Benhabiles N, Krin E, Laurent-Winter C, Tendeng C, Turlin E, Thomas A, Danchin A, Brasseur R.** 1999. The structural and functional organization of H-NS-like proteins is evolutionarily conserved in gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* **31**:319-329.
276. **Torrents E, Sahlin M, Sjöberg B-M.** 2008. The Ribonucleotide Reductase Family-Genetics and Genomics. In: Ribonucleotide Reductases. (ed. K.K. Andersson) Nova Science Publishers.:pp. 17-77.
277. **Lundin D, Torrents E, Poole AM, Sjöberg B-M.** 2009. RNRdb, a curated database of the universal enzyme family ribonucleotide reductase, reveals a high level of misannotation in sequences deposited to Genbank. *BMC Genomics* **10**:589.
278. **Torrents E, Grinberg I, Gorovitz-Harris B, Lundstrom H, Borovok I, Aharonowitz Y, Sjöberg BM, Cohen G.** 2007. NrdR controls differential expression of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase genes. *J Bacteriol* **189**:5012-5021.
279. **Jacobson BA, Fuchs JA.** 1998. A 45 bp inverted repeat is required for cell cycle regulation of the *Escherichia coli* nrd operon. *Mol Microbiol* **28**:1307-1314.
280. **Tendeng C, Bertin PN.** 2003. H-NS in Gram-negative bacteria: a family of multifaceted proteins. *Trends Microbiol* **11**:511-518.
281. **Rimsky S.** 2004. Structure of the histone-like protein H-NS and its role in regulation and genome superstructure. *Curr Opin Microbiol* **7**:109-114.
282. **Rimsky S, Zuber F, Buckle M, Buc H.** 2001. A molecular mechanism for the repression of transcription by the H-NS protein. *Mol Microbiol* **42**:1311-1323.
283. **Dorman CJ, Deighan P.** 2003. Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr Opin Genet Dev* **13**:179-184.
284. **Sjöberg BM, Torrents E.** 2011. Shift in Ribonucleotide Reductase Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa* during Infection. *Infect Immun* **79**:2663-2669.
285. **Olliver A, Saggioro C, Herrick J, Sclavi B.** 2010. DnaA-ATP acts as a molecular switch to control levels of ribonucleotide reductase expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **76**:1555-1571.
286. **White-Ziegler CA, Davis TR.** 2009. Genome-wide identification of H-NS-controlled, temperature-regulated genes in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **191**:1106-1110.
287. **Stella S, Falconi M, Lammi M, Gualerzi CO, Pon CL.** 2006. Environmental control of the in vivo oligomerization of nucleoid protein H-NS. *J Mol Biol* **355**:169-174.
288. **Forns N, Juarez A, Madrid C.** 2005. Osmoregulation of the HtrA (DegP) protease of *Escherichia coli*: an Hha-H-NS complex represses HtrA expression at low osmolarity. *FEMS Microbiol Lett* **251**:75-80.
289. **Keseler IM, Collado-Vides J, Santos-Zavaleta A, Peralta-Gil M, Gama-Castro S, Muniz-Rascado L, Bonavides-Martinez C, Paley S, Krummenacker M, Altman T, Kaipa P, Spaulding A, Pacheco J, Latendresse M, Fulcher C, Sarker M, Shearer AG, Mackie A, Paulsen I, Gunsalus RP, Karp PD.** 2011. EcoCyc: a comprehensive database of *Escherichia coli* biology. *Nucleic Acids Res* **39**:D583-590.



290. **Jones SA, Gibson T, Maltby RC, Chowdhury FZ, Stewart V, Cohen PS, Conway T.** 2011. Anaerobic respiration of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Infect Immun* **79**:4218-4226.
291. **Fang FC, Rimsky S.** 2008. New insights into transcriptional regulation by H-NS. *Curr Opin Microbiol* **11**:113-120.
292. **Dole S, Nagarajavel V, Schnetz K.** 2004. The histone-like nucleoid structuring protein H-NS represses the *Escherichia coli* *bgl* operon downstream of the promoter. *Mol Microbiol* **52**:589-600.
293. **Navarre WW, Porwollik S, Wang Y, McClelland M, Rosen H, Libby SJ, Fang FC.** 2006. Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science* **313**:236-238.
294. **Katayama T, Takata M, Sekimizu K.** 1996. The nucleoid protein H-NS facilitates chromosome DNA replication in *Escherichia coli* *dnaA* mutants. *J Bacteriol* **178**:5790-5792.
295. **Atlung T, Hansen FG.** 2002. Effect of different concentrations of H-NS protein on chromosome replication and the cell cycle in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**:1843-1850.
296. **Kim MJ, Lim S, Ryu S.** 2008. Molecular analysis of the *Salmonella typhimurium* *tdc* operon regulation. *J Microbiol Biotechnol* **18**:1024-1032.
297. **Maki N, Gestwicki JE, Lake EM, Kiessling LL, Adler J.** 2000. Motility and chemotaxis of filamentous cells of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**:4337-4342.
298. **Burt SA, van der Zee R, Koets AP, de Graaff AM, van Knapen F, Gaastra W, Haagsman HP, Veldhuizen EJ.** 2007. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **73**:4484-4490.
299. **Kahru A, Vilu R.** 1983. On characterization of the growth of *Escherichia coli* in batch culture. *Arch Microbiol* **135**:12-15.
300. **Garcia-Fruitos E, Martinez-Alonso M, Gonzalez-Montalban N, Valli M, Mattanovich D, Villaverde A.** 2007. Divergent genetic control of protein solubility and conformational quality in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **374**:195-205.
301. **Guisbert E, Herman C, Lu CZ, Gross CA.** 2004. A chaperone network controls the heat shock response in *E. coli*. *Genes Dev* **18**:2812-2821.
302. **Hantke K.** 2001. Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**:172-177.
303. **Baichoo N, Wang T, Ye R, Helmann JD.** 2002. Global analysis of the *Bacillus subtilis* *Fur* regulon and the iron starvation stimulon. *Mol Microbiol* **45**:1613-1629.
304. **Troxell B, Fink RC, Porwollik S, McClelland M, Hassan HM.** 2011. The *Fur* regulon in anaerobically grown *Salmonella enterica* sv. *Typhimurium*: identification of new *Fur* targets. *BMC Microbiol* **11**:236.
305. **Ishihama A.** 2012. Prokaryotic genome regulation: a revolutionary paradigm. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **88**:485-508.
306. **Browning DF, Busby SJ.** 2004. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Microbiol* **2**:57-65.
307. **Case ED, Akers JC, Tan M.** 2011. CT406 encodes a chlamydial ortholog of *NrdR*, a repressor of ribonucleotide reductase. *J Bacteriol* **193**:4396-4404.
308. **Mowa MB, Warner DF, Kaplan G, Kana BD, Mizrahi V.** 2009. Function and regulation of class I ribonucleotide reductase-encoding genes in mycobacteria. *J Bacteriol* **191**:985-995.
309. **Panosa A, Roca I, Gibert I.** 2010. Ribonucleotide reductases of *Salmonella typhimurium*: transcriptional regulation and differential role in pathogenesis. *PLoS One* **5**:e11328.
310. **Garcia-Fruitos E, Gonzalez-Montalban N, Morell M, Vera A, Ferraz RM, Aris A, Ventura S, Villaverde A.** 2005. Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins. *Microb Cell Fact* **4**:27.

311. **Kojima S, Blair DF.** 2001. Conformational change in the stator of the bacterial flagellar motor. *Biochemistry* **40**:13041-13050.
312. **Berg HC.** 2003. The rotary motor of bacterial flagella. *Annu Rev Biochem* **72**:19-54.
313. **Bukau B, Horwich AL.** 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**:351-366.
314. **Jordan R, McMacken R.** 1995. Modulation of the ATPase activity of the molecular chaperone DnaK by peptides and the DnaJ and GrpE heat shock proteins. *J Biol Chem* **270**:4563-4569.
315. **Liberek K, Marszalek J, Ang D, Georgopoulos C, Zylicz M.** 1991. Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:2874-2878.
316. **Calloni G, Chen T, Schermann SM, Chang HC, Genevoux P, Agostini F, Tartaglia GG, Hayer-Hartl M, Hartl FU.** 2012. DnaK functions as a central hub in the E. coli chaperone network. *Cell Rep* **1**:251-264.
317. **Liberek K, Skowyra D, Zylicz M, Johnson C, Georgopoulos C.** 1991. The Escherichia coli DnaK chaperone, the 70-kDa heat shock protein eukaryotic equivalent, changes conformation upon ATP hydrolysis, thus triggering its dissociation from a bound target protein. *J Biol Chem* **266**:14491-14496.
318. **Guerinot ML.** 1994. Microbial iron transport. *Annu Rev Microbiol* **48**:743-772.
319. **Harold FM.** 1972. Conservation and transformation of energy by bacterial membranes. *Bacteriol Rev* **36**:172-230.
320. **Schweinitzer T, Josenhans C.** 2010. Bacterial energy taxis: a global strategy? *Arch Microbiol* **192**:507-520.
321. **Leichert LI.** 2011. Proteomic methods unravel the protein quality control in Escherichia coli. *Proteomics* **11**:3023-3035.
322. **Schroder H, Langer T, Hartl FU, Bukau B.** 1993. DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *EMBO J* **12**:4137-4144.
323. **Morita MT, Kanemori M, Yanagi H, Yura T.** 2000. Dynamic interplay between antagonistic pathways controlling the sigma 32 level in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:5860-5865.
324. **Straus DB, Walter WA, Gross CA.** 1989. The activity of sigma 32 is reduced under conditions of excess heat shock protein production in Escherichia coli. *Genes Dev* **3**:2003-2010.
325. **Yura T, Guisbert E, Poritz M, Lu CZ, Campbell E, Gross CA.** 2007. Analysis of sigma32 mutants defective in chaperone-mediated feedback control reveals unexpected complexity of the heat shock response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:17638-17643.
326. **Narberhaus F.** 1999. Negative regulation of bacterial heat shock genes. *Mol Microbiol* **31**:1-8.
327. **Yura T, Nakahigashi K.** 1999. Regulation of the heat-shock response. *Curr Opin Microbiol* **2**:153-158.
328. **Gamer J, Bujard H, Bukau B.** 1992. Physical interaction between heat shock proteins DnaK, DnaJ, and GrpE and the bacterial heat shock transcription factor sigma 32. *Cell* **69**:833-842.
329. **Kanemori M, Yanagi H, Yura T.** 1999. Marked instability of the sigma(32) heat shock transcription factor at high temperature. Implications for heat shock regulation. *J Biol Chem* **274**:22002-22007.
330. **Tomoyasu T, Ogura T, Tatsuta T, Bukau B.** 1998. Levels of DnaK and DnaJ provide tight control of heat shock gene expression and protein repair in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **30**:567-581.
331. **Grimshaw JP, Jelesarov I, Siegenthaler RK, Christen P.** 2003. Thermosensor action of GrpE. The DnaK chaperone system at heat shock temperatures. *J Biol Chem* **278**:19048-19053.

332. **Neilands JB.** 1981. Iron absorption and transport in microorganisms. *Annu Rev Nutr* **1**:27-46.
333. **Grass G.** 2006. Iron transport in *Escherichia coli*: all has not been said and done. *Biometals* **19**:159-172.
334. **Klebba PE.** 2003. Three paradoxes of ferric enterobactin uptake. *Front Biosci* **8**:s1422-1436.
335. **Raymond KN, Dertz EA, Kim SS.** 2003. Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:3584-3588.
336. **Miethke M, Marahiel MA.** 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**:413-451.
337. **Lee JW, Helmann JD.** 2007. Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biometals* **20**:485-499.
338. **Boudeau J, Glasser AL, Masseret E, Joly B, Darfeuille-Michaud A.** 1999. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun* **67**:4499-4509.
339. **Bryant D, Moulton V.** 2004. Neighbor-net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Mol Biol Evol* **21**:255-265.
340. **Stewart RC, Dahlquist FW.** 1988. N-terminal half of CheB is involved in methylesterase response to negative chemotactic stimuli in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **170**:5728-5738.
341. **Barnich N, Boudeau J, Claret L, Darfeuille-Michaud A.** 2003. Regulatory and functional co-operation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Mol Microbiol* **48**:781-794.
342. **Claret L, Miquel S, Vieille N, Ryjenkov DA, Gomelsky M, Darfeuille-Michaud A.** 2007. The flagellar sigma factor FliA regulates adhesion and invasion of Crohn disease-associated *Escherichia coli* via a cyclic dimeric GMP-dependent pathway. *J Biol Chem* **282**:33275-33283.
343. **Paul K, Nieto V, Carlquist WC, Blair DF, Harshey RM.** 2010. The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a "backstop brake" mechanism. *Mol Cell* **38**:128-139.
344. **Girgis HS, Liu Y, Ryu WS, Tavazoie S.** 2007. A comprehensive genetic characterization of bacterial motility. *PLoS Genet* **3**:1644-1660.
345. **Lundin D, Gribaldo S, Torrents E, Sjoberg BM, Poole AM.** 2010. Ribonucleotide reduction - horizontal transfer of a required function spans all three domains. *BMC Evol Biol* **10**:383.
346. **Strober W, Fuss I, Mannon P.** 2007. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* **117**:514-521.
347. **Xavier RJ, Podolsky DK.** 2007. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **448**:427-434.
348. **Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS.** 2010. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol* **28**:573-621.
349. **Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, Gambiez L, Joly B, Cortot A, Colombel JF.** 1998. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **115**:1405-1413.
350. **Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H.** 2002. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **122**:44-54.
351. **Martin HM, Campbell BJ, Hart CA, Mpofu C, Nayar M, Singh R, Englyst H, Williams HF, Rhodes JM.** 2004. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* **127**:80-93.
352. **Conte MP, Schippa S, Zamboni I, Penta M, Chiarini F, Seganti L, Osborn J, Falconieri P, Borrelli O, Cucchiara S.** 2006. Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **55**:1760-1767.

353. **Kotlowski R, Bernstein CN, Sepehri S, Krause DO.** 2007. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut* **56**:669-675.
354. **Neut C, Bulois P, Desreumaux P, Membre JM, Lederman E, Gambiez L, Cortot A, Quandalle P, van Kruiningen H, Colombel JF.** 2002. Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* **97**:939-946.
355. **Baumgart M, Dogan B, Rishniw M, Weitzman G, Bosworth B, Yantiss R, Orsi RH, Wiedmann M, McDonough P, Kim SG, Berg D, Schukken Y, Scherl E, Simpson KW.** 2007. Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *Isme J* **1**:403-418.
356. **Sasaki M, Sitaraman SV, Babbitt BA, Gerner-Smidt P, Ribot EM, Garrett N, Alpern JA, Akyildiz A, Theiss AL, Nusrat A, Klapproth JM.** 2007. Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease. *Lab Invest* **87**:1042-1054.
357. **Martinez-Medina M, Aldeguer X, Lopez-Siles M, Gonzalez-Huix F, Lopez-Oliu C, Dahbi G, Blanco JE, Blanco J, Garcia-Gil LJ, Darfeuille-Michaud A.** 2009. Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: New ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.*
358. **Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL, Darcha C, Jantscheff P, Allez M, Peeters H, Bommelaer G, Desreumaux P, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A.** 2007. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest* **117**:1566-1574.
359. **Dreux N, Denizot J, Martinez-Medina M, Mellmann A, Billig M, Kisiela D, Chattopadhyay S, Sokurenko E, Neut C, Gower-Rousseau C, Colombel JF, Bonnet R, Darfeuille-Michaud A, Barnich N.** 2013. Point Mutations in FimH Adhesin of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Enhance Intestinal Inflammatory Response. *PLoS Pathog* **9**:e1003141.
360. **Carvalho FA, Barnich N, Sivignon A, Darcha C, Chan CH, Stanners CP, Darfeuille-Michaud A.** 2009. Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J Exp Med* **206**:2179-2189.
361. **Chaveroche MK, Ghigo JM, d'Enfert C.** 2000. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res* **28**:E97.
362. **Stecher B, Robbiani R, Walker AW, Westendorf AM, Barthel M, Kremer M, Chaffron S, Macpherson AJ, Buer J, Parkhill J, Dougan G, von Mering C, Hardt WD.** 2007. *Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biol* **5**:2177-2189.
363. **Chassaing B, Etienne-Mesmin L, Bonnet R, Darfeuille-Michaud A.** 2013. Bile salts induce long polar fimbriae expression favouring Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* interaction with Peyer's patches. *Environ Microbiol* **15**:355-371.
364. **Zhou J, Sharp LL, Tang HL, Lloyd SA, Billings S, Braun TF, Blair DF.** 1998. Function of protonatable residues in the flagellar motor of *Escherichia coli*: a critical role for Asp 32 of MotB. *J Bacteriol* **180**:2729-2735.
365. **Morimoto YV, Che YS, Minamino T, Namba K.** 2010. Proton-conductivity assay of plugged and unplugged MotA/B proton channel by cytoplasmic pHluorin expressed in *Salmonella*. *FEBS Lett* **584**:1268-1272.
366. **Parkinson JS, Houts SE.** 1982. Isolation and behavior of *Escherichia coli* deletion mutants lacking chemotaxis functions. *J Bacteriol* **151**:106-113.



*Annex*

---



## 9 Annex

### 9.1 Taula I. Llistat d'oligonucleòtids utilitzats en aquest treball

Nom	Seqüència (5'→3')	Aplicació
clpB-up	GGCACGACAACCAATTTATC	Amplificació ADNc
flu-up	CCTGGAATATCCCCGATAAC	Amplificació ADNc
purD-up	GCTTTATCGTGATGGTGGAC	Amplificació ADNc
RT fur up	CGCGTACTGAACCAGTTTG	Amplificació ADNc
xylG-up	CTCACTTTGTGGGGAAAATG	Amplificació ADNc
yeeR-up	CTGCATTAGTGACGCTGCTA	Amplificació ADNc
LF82 motA RT up	CAATACCAAACGCCGGAAGTGAGTC	Amplificació ADNc
LF82 cheR RT up	GCTCCTGACGCACGCGTAC	Amplificació ADNc
LF82 kdgK RT up	CGAAGCCGCCGCCAAATTCTGG	Amplificació ADNc
LF82 tsr RT up	GCTGGCGGAGCTGATACAAC TG	Amplificació ADNc
LF82 fliC RT up	CGGCAAATACCGCCTGATACGTC	Amplificació ADNc
LF82 fliS RT up	GCAAGGCAAAGGCGTCTCTTTGTC	Amplificació ADNc
PnrDA -120pb lw	AGAGAAAAATTTGTTAAAAATAACTGTT CG	Amplificació Sonda
PnrDA -172pb up	AGGTTAGATAAATTGATATAGATGGC	Amplificació Sonda
PnrDA -235pb up	TAGATCAATTTTGTCAATCATTAGCAA	Amplificació Sonda
PnrDA -300pb lw	TTGTTGATGGCGAATGGTTGTT	Amplificació Sonda
PnrDA -400pb up	TTAAAGTCATGAATAATTTTCTTATAATA TAAG	Amplificació Sonda
PnrDA -50pb lw	TAACTCAGGAAGGAAAAAGTGG	Amplificació Sonda
PnrDA -50pb up	ATCCACAAAGTTATGCACTTGC	Amplificació Sonda
PclpB lw	TGATTGGGCATCGGCAAGAGC	Amplificació sonda
PclpB up	GACCTCATTTAATCTCCAGTAGCAACTTT G	Amplificació sonda
Pentc lw	GCGACATAAAGAAAAAGCGATTGGG	Amplificació sonda
PentC up	GGTTAAGGGCGTAATGACAAATTCG	Amplificació sonda
PfliA lw	CGCACCAGCGGGACATAAC	Amplificació sonda
PfliA up	CAAGTTGAATTGCAATTTATTGAATTTGC AC	Amplificació sonda
PnrDR-up(SmaI)	ACCCGGGTGTTTCATCTGTGCGCAC	Amplificació sonda
PnrDR-lw(BamHI)	AGGATCCGACGGCGGCGTACGGATGAAC	Amplificació sonda
Ecoli nrdR up	AAGGATCCCAGTCTTGCCGGTGTTCG	Clonació
EcoliDG-BHI-lw	AAGGATCCTCGACATTCTGGTCGGTCAG	Clonació
EcoliDG-BHI-up	AAGGATCCGCGTGAATGGAAG	Clonació
New PA-GFP ClaI lw	AAAATCGATCACCAGCAGATTCTGATTC ATG	Clonació
nrdR-Biotin-lw	CGGCGGGGTGGATAAGCTGTCCTCCAGG CGCGCGATCTC	Clonació
nrdR-Biotin-up	CGCGAACAGATTGGAGGTCATTGCCCAT TCTCTTTCGCCGTG	Clonació
nrdR-For	CATATGCATTGCCATTCTGTTTCGC	Clonació
nrdR-Rev	CTCGAGGTCTCCAGGCGCGGATC	Clonació
Operon-Ib-lw (BHI)	AAAGGATCCATTATTTCCCTGCTGCGGGT AGTG	Clonació



Operon-Ib-up (BHI)	AAAGGATCCGCATGGTCGTA CTCGCGTC	Clonació
PA -400 ext pho up	GTACGCTTAAAGTCATGAATAATTTTCTT ATAATATAAGG	Clonació
PA -450 ext lw	CGCATGCATTGCACCGGGTTGAACAAT	Clonació
PentC BamHI lw	AAGGATCCATCGAAGCGGGCGAAACATC C	Clonació
PentC EcoRI up	AAGAATTCGTGAGGGGAACAGCCAGC	Clonació
Pfur BamHI lw	AAGGATCCCTCCGCACTGACGTGATGG	Clonació
Pfur SmaI up	AACCCGGGGCATCTCGACGAAATTCTCA ATGC	Clonació
PnrDA BamHI up	AAAGGATCCATCATTTTCTATAAGACGG	Clonació
PnrDD BamHI up	AAAGGATCCTTGAGGCTGTCTGGTGGTT AC	Clonació
PnrDD ClaI lw	AAAATCGATGCACTTTGCAGCCGTCTCG	Clonació
PnrDH BamHI up	AAAGGATCCAAAAATGATAATAAATACG CG	Clonació
PnrDH ClaI lw	AAAATCGATGTAAATAGTAATGCGCATG	Clonació
PnrDR BamHI lw	AAGGATCCAGACACTGCCGACGGCG	Clonació
PnrDR EcorI up	AAGAATTCGCGTCATCTCCTGGTTCAGC	Clonació
ABc-pBADup	AAGAATTCGGAGTGAAAGCATGAATCAG AATCTGCTG	Clonació
ABc-pBADlow	AATCTAGAGGGCCATTCAGAGCTGGAAG	Clonació
ABp-pBADup	AAGAATTCGGAGTGACATGATAAGCAT CGTAAAACGTAAC	Clonació
ABp-pBADlow	AATCTAGATCGGTTTACAGGTCAGCAA C	Clonació
PnrDA-lw (BamHI)	AGGATCCAGCAGATTCTGATTCATG	Clonació/ Amplificació Sonda
PnrDA-up (SmaI)	ACCCGGGATCATTTTCTATAAGACGG	Clonació/ Amplificació Sonda
PnrDD-lw (BamHI)	AGGATCCACGGCACTTTGCAGCCGTCTC	Clonació/ Amplificació Sonda
PnrDD-up (SmaI)	ACCCGGGAGGCTGTCTGGTGGTTACAGA AG	Clonació/ Amplificació Sonda
PnrDH-lw (BamHI)	AGGATCCGTAAATAGTAATGCGCATG	Clonació/ Amplificació Sonda
PnrDH-up (SmaI)	ACCCGGGAAAAATGATAATAAATACGCG	Clonació/ Amplificació Sonda
Eco-lacZrev1	GCTATTACGCCAGCTGGCGAACGG	Comprovació clonació
Ecoli PlacZ lw	CCATTCGCCATTCAGGCTGC	Comprovació clonació
GFPmut3-rev	GAATTGGGACAACCTCCAGTG	Comprovació clonació
k1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	Comprovació clonació
k2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	Comprovació clonació
kT	CGGCCACAGTCGATGAATCC	Comprovació clonació

M13 dir	GTTTTCCCAGTCACGAC	Comprovació clonació
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC	Comprovació clonació
pBBR1-lw	CACTTTATGCTTCCGGCTCG	Comprovació clonació
pBBR1-up	CATCGCAGTCGGCCTATTGG	Comprovació clonació
PBR-E	ATTATCATGACATTAACC	Comprovació clonació
T7-pro	AATACGACTCACTATAGG	Comprovació clonació
T7-ter	CAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAGAG GCCCAAGGGGTTAT	Comprovació clonació
E.coli fis lw	TTTACGCAGCGTACCACGG	Comprovació Mutació
E.coli fis up	GCGTAAATTCTGACGTACTGAC	Comprovació Mutació
Ecoli fur lw	CCCGCAGGTTGGCTTTTCTCG	Comprovació Mutació
Ecoli fur up	GTGAACCGCTTAGTAACAGGACAG	Comprovació Mutació
HNS-3	CCACCCCAATATAAGTTTGAG	Comprovació Mutació
HNSBDist	CCGGATCCTAAAAAATCCCGC	Comprovació Mutació
StpA lw	CAGCGACATCCGGCCTC	Comprovació Mutació
StpA up	GATCGCTTACACTACGCGACG	Comprovació Mutació
fur-P1	GATACCAATACCGCCCTAAAGAAAGCTG GCCTGAAAGTAACGGTGTAGGCTGGAGC TGCTTC	Deleció gènica
fur-P2	GCCTTCGTGCGCATGTTTCATCTTCGCGGC AATCGCCTTCGGCCATATGAATATCCTCC TTAGT	Deleció gènica
gltB-up	AACCGATGACGATCTGAAAA	PCR amplification
SUMO Forward	ATTCAAGCTGATCAGACCCCTGAA	Seqüenciació
pETite Reverse	GAGTTCTGGGCAAATCTCCG	Seqüenciació
EcA-lw	TCAGATCTTACATGCGCCGC	Transcripció Reversa
EcD-lw	GGCTTCATCGCCTTTTGCTTCC	Transcripció Reversa
EcE-lw	AAAGTGCACAGGAGACGCAG	Transcripció Reversa
EcGAP-lw	GATGATGTTCTGGGAAGCGC	Transcripció Reversa
EcR-lw	GCGCGATCTCTTCGCCAAATTC	Transcripció Reversa
RT fliC lw	GCCATTTGTATCTTTAAGCGCATATGTAT C	Transcripció reversa
RT-caiF lw	CCGACTAATTTTTCCCGACT	Transcripció reversa
RT-PCR entC lw	CCAGAGTCAGTGCGTTTTCT	Transcripció reversa
xylG-lw	GAATGATGGCGATACCTTTG	Transcripció reversa/amplificació ADN amplification

clpB-lw	CCACCAGTACCTTCAACCTG	Transcripció reversa/amplificació ADNc
flu-lw	CTGTCAGCATTGTTCTGTGC	Transcripció reversa/amplificació ADNc
gltB-lw	CCACCAGTACCTTCAACCTG	Transcripció reversa/amplificació ADNc
purD-lw	CACGGTTGGCCAGATAATAC	Transcripció reversa/amplificació ADNc
RT fur lw	GCTTCGATGGAATCATCACT	Transcripció reversa/amplificació ADNc
yeeR-lw	CAGTGAGTCAGGAAGGCTGT	Transcripció reversa/amplificació ADNc
LF82 fliS RT lw	GACATCGTTGCGTAAATTGGCTTGC	Transcripció reversa/amplificació ADNc
LF82 motA RT lw	GATAGCGTCATGCTTGAATTTATCGTCG	Transcripció reversa/amplificació ADNc
LF82 cheR RT lw	CAGCATAGCGATGACGCTGGC	Transcripció reversa/amplificació ADNc
LF82 kdgK RT lw	GTCTCTTCTTTGCTGGCCCCACAG	Transcripció reversa/amplificació ADNc
LF82 tsr RT lw	GCCTACCAGAATCCACATCGCC	Transcripció reversa/amplificació ADNc
LF82 fliC RT lw	GACTGCATCAGTCACGATGGGG	Transcripció reversa/amplificació ADNc