



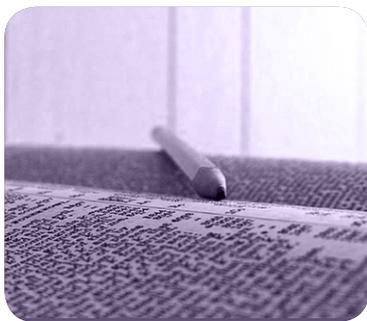
MÁSTERES de la UAM

Facultad de
Ciencias / 16-17

Microbiología



Campus Internacional
excelencia UAM
CSIC+



**Estudio
de la regulación
transcripcional de
los genes del proceso
de conjugación del
plásmido pLS20
de *Bacillus subtilis***
*Daniel González
Álvarez*

978-84-8344-6215



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE MADRID



FACULTAD DE
CIENCIAS

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Estudio de la Regulación Transcripcional de los Genes del Proceso de Conjugación del Plásmido pLS20 de *Bacillus subtilis*

MÁSTER DE MICROBIOLOGÍA (RAMA SANITARIA)
CURSO 2016-17

Autor: Daniel González Álvarez

Director: Wilfried J. J. Meijer

Tutora: María Isabel Sánchez Romero

**Centro/Laboratorio: Centro de Biología Molecular Severo
Ochoa (CBMSO)/402**

Índice

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	1
2.1. Contexto histórico, situación presente y perspectivas futuras de la resistencia a antibióticos	1
2.2. Adquisición y diseminación de formas de resistencia a antibióticos.....	2
2.3. pLS20 como modelo de estudio de la conjugación en bacterias Gram+	4
2.4. Objetivo	6
3. MATERIALES.....	7
3.1. Cepas bacterianas, medios, plásmidos, cebadores y enzimas	7
3.2. Kits comerciales para extracción de plásmidos en <i>E. coli</i> y para purificación de DNA	7
3.3. Filtros	7
4. MÉTODOS	7
4.1. Análisis in silico	7
4.2. Transformación	7
4.2.1. Transformación por choque térmico	8
4.2.2. Transformación por electroporación.....	8
4.2.3. Inducción de competencia natural y transformación.....	8
4.3. Fusiones transcripcionales.....	8
4.3.1. Clonaje de las regiones a fusionar transcripcionalmente al gen <i>gfp</i> presente en el vector de integración pDR110sfGFP	8
4.3.2. Inserción de los casetes con las fusiones transcripcionales en el gen cromosómico <i>amyE</i> de <i>B. subtilis</i>	9
4.3.3. Detección de la capacidad de regulación transcripcional de las secuencias mediante citometría de flujo.....	10
4.4. “Knock out”	10
4.4.1. Construcción de vectores derivado de pMiniMad2 para la eliminación de secuencias en pLS20cat	10
4.4.2. Generación de derivados de pLS20cat con regiones delecionadas	11
4.4.3. Curvas de crecimiento.....	11
4.4.4. Eficiencia de conjugación	12

5. RESULTADOS.....	12
5.1. Análisis <i>in silico</i> sugieren la presencia de un terminador transcripcional intrínseco localizado aguas arriba del gen 28.....	12
5.2. Fusiones transcripcionales confirman que la región predicha corresponde a un terminador transcripcional genuino que no está activo en su emplazamiento nativo	12
5.3. Análisis <i>in silico</i> e <i>in vivo</i> evidencian que el Ter _{up28} no se forma en su emplazamiento nativo debido al establecimiento de una estructura alternativa que secuestra las secuencias que lo constituyen.....	16
5.4. Evidencia de que Ter _{up28} forma parte de un atenuador transcripcional cuya activación depende de la expresión del operón de conjugación	18
5.5. La delección de las secuencias previas al Terup28 disminuye inmensamente la eficiencia de conjugación <i>in vivo</i>	19
6. DISCUSIÓN	21
7. CONCLUSIONES	24
8. BIBLIOGRAFÍA	24
9. MATERIAL COMPLEMENTARIO	26

1. RESUMEN

La emergencia de organismos resistentes a los antibióticos usados convencionalmente supone un problema que compromete los sistemas de salud y la seguridad alimentaria. Esta situación se prevé que alcance una magnitud enorme en las próximas décadas hasta convertirse en una verdadera pandemia. La diseminación de genes de resistencia entre organismos se lleva a cabo mediante transferencia génica horizontal (TGH), principalmente mediante las vías conocidas como transformación, transducción y conjugación. Se estima que esta última ruta es la que mayor contribución aporta a esta situación. Por ello, el estudio de este proceso es fundamental como base para el posible desarrollo de terapias diseñadas para bloquearlo y, en consecuencia, frenar la dispersión de estos genes de resistencia a las poblaciones de microorganismos sensibles. Respecto a lo que se sabe sobre la conjugación en bacterias Gram-negativas (Gram-), el conocimiento de la conjugación en bacterias Gram-positivas (Gram+) es muy limitado, aún teniendo en cuenta que muchos patógenos, que actualmente han adquirido genes de resistencia, pertenecen a este grupo.

En este contexto, en nuestro laboratorio se estudia el plásmido pLS20 de *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) como modelo de conjugación en bacterias Gram+. En él, los genes de conjugación están agrupados en un operón cuya expresión depende del promotor de conjugación, P_c . Estudios previos han revelado que la expresión de los genes de conjugación está regulada mediante un mecanismo sofisticado al nivel de la iniciación de transcripción. Se trata de un sistema de “quorum sensing” que asegura que la conjugación solamente esté activa cuando hay receptores potenciales del plásmido. En este trabajo se ha descubierto la presencia de un segundo nivel de regulación basado en un sistema de elongación de transcripción condicional. Se ha demostrado que la región 5' no traducida (5' UTR) del primer gen del operón de conjugación, el gen 28, posee un atenuador que regula la elongación transcripcional. Se ha comprobado que se trata de un terminador transcripcional muy eficiente que, sin embargo, no es funcional en su emplazamiento nativo. Han sido obtenidas evidencias muy convincentes de que una región de 123 nucleótodos (nt) localizada 5' al terminador es responsable de inactivar el terminador, ya que es capaz de inducir la formación de una estructura secundaria alternativa, energéticamente más favorable, en la que secuencias del bucle en horquilla hibridan con esta zona aguas arriba. Finalmente, se han cosechado indicios preliminares de que la activación del terminador puede ser un mecanismo para limitar la expresión de los genes de conjugación a un marco de tiempo concreto. Este hecho estaría mediado por la transición de estado inactivo a activo del atenuador (formación de la estructura de terminación) derivada de la interacción con algún posible producto del operón de conjugación.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Contexto histórico, situación presente y perspectivas futuras de la resistencia a antibióticos

El descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming (1928) marcó el comienzo de la denominada como “Era de los Antibióticos” (Gogarten, Gogarten y Olendzenski, 2009). Este nombre se debe al efecto que tuvo la introducción de estos antimicrobianos. Por una parte, supuso importantes avances en medicina, tanto de una forma directa por su capacidad de combatir enfermedades infecciosas como de forma indirecta por su capacidad de prevenirlas.

Este último hecho permitió, además, el desarrollo de técnicas que implicaban inmunosupresión o alto riesgo de contagio. Por otra parte, varias de estas propiedades han hecho que adquieran también gran relevancia en los sectores piscícola, agrícola y ganadero, convirtiéndose en uno de los principales pilares que sostienen los sistemas de salud y la seguridad alimentaria en los países desarrollados (World Health Organization, 2017). El descubrimiento y desarrollo de antimicrobianos alcanzó su auge durante las décadas de los 80 y 90. Sin embargo, en los últimos años se encuentra en decadencia por la rápida aparición y diseminación de formas de resistencia a los mismos, amenazando el sistema de bienestar gestado en base a estos productos (Gogarten, Gogarten y Olendzenski, 2009).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la resistencia a antimicrobianos se cobra anualmente alrededor de 700.000 vidas. Según un estudio, esta cifra podría aumentar hasta los 10 millones en 2050, superando incluso las muertes provocadas por el cáncer y convirtiéndose así en la principal causa de muerte a nivel mundial. Además, conllevaría unos costes sanitarios que alcanzarían los 100 trillones de dólares estadounidenses para dicha fecha, y la producción de comida se encontraría comprometida por la aparición de resistencias en patógenos de plantas y animales (O'Neill, 2016). Por esta razón, determinar las bases bajo las que subyace la aparición y diseminación de la resistencia a estos compuestos es fundamental para evitar el incipiente estado de emergencia que conlleva esta situación.

2.2. Adquisición y diseminación de formas de resistencia a antibióticos

Los microorganismos pueden ser intrínsecamente resistentes a antibióticos o adquirir dicha resistencia. La obtención de genes de resistencia puede ocurrir a través de dos mecanismos, la mutación y la TGH (Martinez, 2014). El primero de estos procesos implica la variación de los genes que codifican para las dianas de los antibióticos, sus transportadores o los genes que regulan la expresión de dichos transportadores o de elementos implicados en la descontaminación (Martinez, 2014). El segundo hace referencia al conjunto de mecanismos a través de los cuales se produce la transferencia de material genético entre dos células. Ambos procesos han sido y son fundamentales para la evolución, entendida de forma general, de la vida en la Tierra. La importancia de cada uno de ellos en la adquisición de resistencias a antibióticos es diferente dependiendo tanto del microorganismo como del mecanismo de resistencia de los que se trate (Sabtu, Enoch y Brown, 2015). Estamos hablando, por tanto, de un proceso que se produce de forma natural (World Health Organization, 2017). Sin embargo, numerosas causas antropológicas entre las que destacan el uso excesivo de antimicrobianos, tanto en medicina como en la producción de alimentos, la prescripción incorrecta y falta de adhesión a los tratamientos (Lee Ventola, 2015) ejercen una presión selectiva que ha conllevado al enriquecimiento, tanto en la microbiota comensal como en ambientes naturales, en microorganismos que poseen genes de resistencia a los antibióticos empleados (Martinez, 2014). Estos microorganismos no son patógenos, sino que estas resistencias se suelen asociar a los productores naturales de los mismos (si generan el antibiótico tienen que tener un mecanismo para evitar su efecto) salvo contadas excepciones, siendo la más clara la resistencia a quinolonas, un antibiótico frente al que se han encontrado resistencias pese a ser sintético (Martinez, 2014). Este proceso de selección favorece que haya mayor contacto entre estos microorganismos portadores de resistencias y posibles receptores, favoreciendo los eventos de TGH (Martinez, 2014). Esto los convierte en la forma más rápida y común de la

diseminación de resistencia a antibióticos (Gogarten, Gogarten y Olendzenski, 2009) y la principal causa de la pandemia actual de microorganismos resistentes (von Wintersdorff et al., 2016). Por tanto, estudiar estos mecanismos es fundamental para poder hacer frente a esta situación.

Existen tres métodos principales a través de los que se puede dar la TGH (von Wintersdorff et al., 2016):

- Conjugación (**Figura 1A**): transferencia de DNA entre una célula donadora y una receptora orquestada por los genes de conjugación presentes en la primera y consistente en un proceso multietapa que implica contacto célula-célula a través de pili tipo IV o adhesinas (von Wintersdorff et al., 2016)
- Transformación natural (**Figura 1B**): capacidad para incorporar, integrar y expresar funcionalmente fragmentos de DNA extracelular. A excepción de bacterias del género *Neisseria*, en las que se trata de un proceso constitutivo, el resto de microorganismos que presentan esta capacidad lo hacen de una forma inducible, pudiendo ser uno de estos inductores los antimicrobianos (von Wintersdorff et al., 2016).
- Transducción (**Figura 1C**): transferencia de material genético mediada por bacteriófagos (von Wintersdorff et al., 2016). Puede ser de dos tipos:
 - Generalizada: consecuencia del empaquetamiento erróneo de DNA celular en vez de fágico (von Wintersdorff et al., 2016).
 - Especializada: consecuencia del empaquetamiento de un fragmento híbrido entre el DNA del huésped y del fago formado la introducción de un fragmento de DNA celular en el genoma de este último (von Wintersdorff et al., 2016).

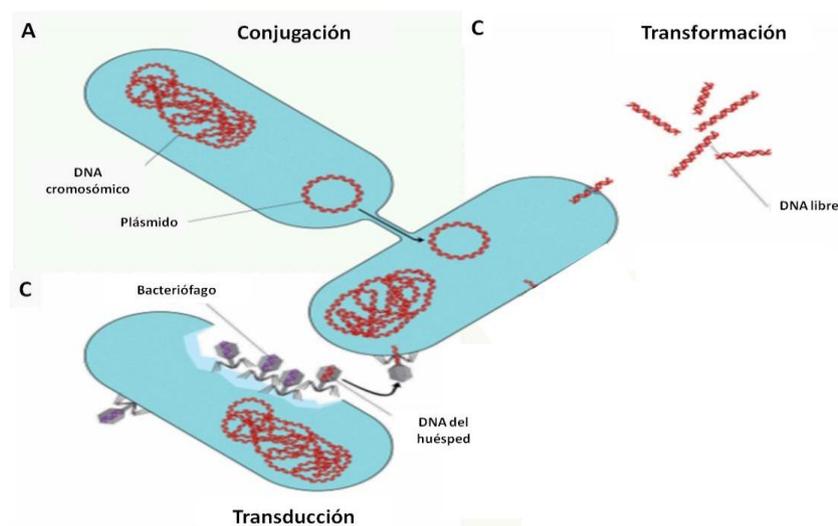


Figura 1. Mecanismos de TGH. A. Conjugación. **B.** Transformación. **C.** Transducción (ver texto) (Modificado de: von Wintersdorff et al., 2016)

Todas las bacterias pueden utilizar los tres métodos de transferencia genética horizontal mencionados anteriormente, sin embargo, existe cierta tendencia a especializarse en el mecanismo que más se emplea (Gogarten, Gogarten y Olendzenski, 2009). Aunque el papel de la transformación y la transducción no debe ser desestimado, la conjugación es el mecanismo

con mayor relevancia en la diseminación de antibióticos (von Wintersdorff et al., 2016). Esta situación se refleja en una mayor afluencia de genes de resistencia en los elementos móviles, para los cuales la conjugación es el mecanismo más probable de transferencia (von Wintersdorff et al., 2016).

Existen numerosos elementos móviles a través de los cuales puede darse esta transferencia, pero los plásmidos de resistencia han sido identificados en cantidades ingentes. Además, son capaces de portar multitud de estos genes que proporcionan resistencia a diferentes antibióticos y de trasladarse a microorganismos filogenéticamente distantes. Estos hechos los convierten en los principales agentes de diseminación de los genes de resistencia a antibióticos. Descifrar los mecanismos bajo los que rigen su transferencia es fundamental para poder desarrollar nuevos tratamientos dirigidos a inhibir su diseminación (von Wintersdorff et al., 2016). La conjugación en bacterias Gram- ha sido ampliamente más estudiada que en Gram+, de las que actualmente se posee un conocimiento bastante limitado (Singh y Meijer, 2014). Esta situación contrasta con el hecho de que buena parte de los patógenos que la OMS ha declarado como prioritarios para la búsqueda de antibióticos para hacerles frente, precisamente porque han adquirido resistencia a los empleados convencionalmente, son bacterias Gram+. Entre ellos destacan microorganismos de gran relevancia clínica como pueden ser *Enterococcus faecium* o *Staphylococcus aureus* (World Health Organization, 2017).

2.3. pLS20 como modelo de estudio de la conjugación en bacterias Gram+

Con objeto de comprender mejor el proceso de conjugación en bacterias Gram+, en nuestro laboratorio se estudia el plásmido pLS20 de *Bacillus subtilis*, identificado en la cepa IFO3335 de la bacteria *Bacillus subtilis natto* (Tanaka, Kuroda y Sakaguchi K, 1977). pLS20 es un plásmido circular de 64775 pares de bases (pb) que codifica por un total de 92 genes (putativos) (**Figura 2**) y es conjugativo tanto en medio sólido como líquido (Singh et al., 2013). Su importancia no se limita a ser un mero modelo de conjugación en bacterias Gram+ sino que también por sus homólogos en otros géneros como puede ser *Clostridium* o *Listeria* y otras especies de género *Bacillus* como *Bacillus thuringiensis* (información no publicada). Además, se ha demostrado que presenta la capacidad de promover la transferencia de otros plásmidos de resistencia como pueden ser pBC16 (Tc^r) a especies del género *Bacillus* como *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* o *B. thuringiensis* o pUB110 (Km^r) a *Staphylococcus aureus* (Koehler y Thorne, 1987). De esta forma, se trata de un mecanismo de TGH aparentemente común en el filo *Firmicutes*, en el que se encuentran los géneros y especies bacterianas de relevancia clínica, alimenticia o industrial, mencionados en este párrafo y el anterior.

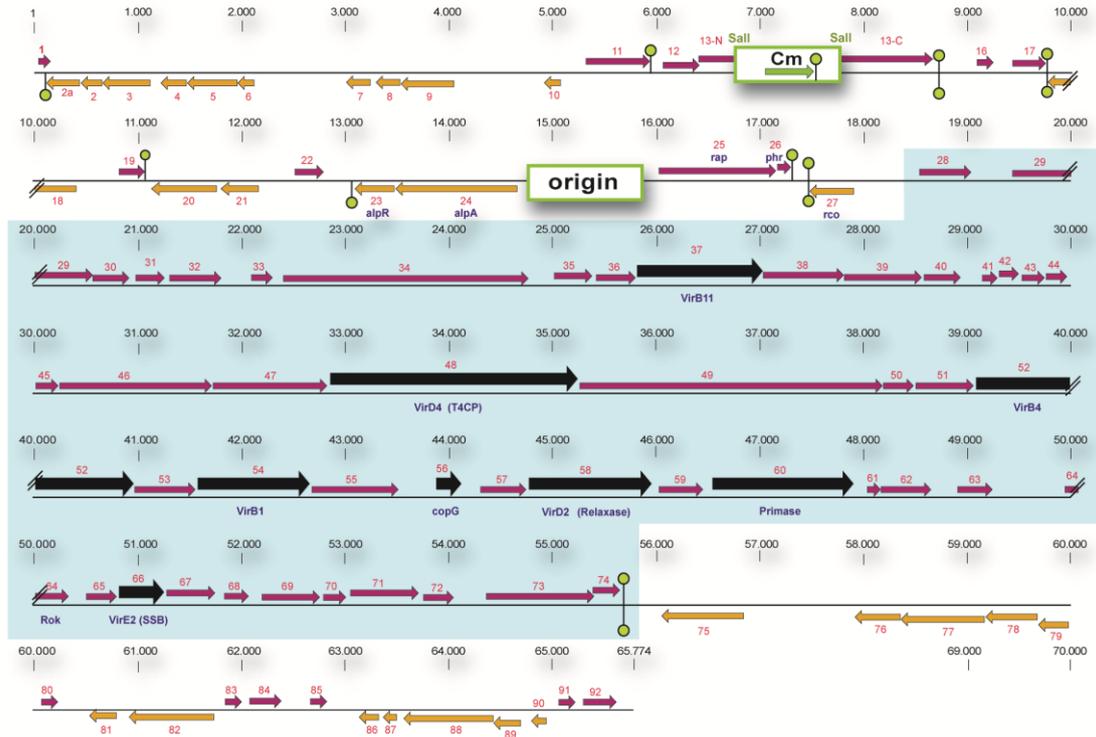


Figura 2. Mapa genético del plásmido pLS20cat. Los genes putativos están señalados con flechas indicando la dirección de transcripción. Los genes pertenecientes al operón de conjugación quedan resaltados en azul (Singh et al., 2013).

Inhibir la diseminación de genes de resistencia a antibióticos es posible interfiriendo sobre la conjugación. Una posible vía para el desarrollo de nuevas estrategias para bloquear este proceso podría consistir en la modulación de los genes que lo regulan. La conjugación involucra muchos genes, la formación de un transferosoma y un sistema de transferencia de muchas kb de DNA desde la célula donadora a la receptora. Esto implica un coste energético alto, por lo que los genes de conjugación están estrictamente regulados. Los estudios realizados hasta el momento han evidenciado que esto también ocurre en pLS20 (Singh et al., 2013).

pLS20 contiene todos los genes necesarios para la conjugación agrupados en un operón de 47 genes (del 28 al 74) (**Figura 2**) cuya expresión está supeditada a un promotor, denominado P_c (promotor de la conjugación) (Singh et al., 2013). P_c es un promotor fuerte que está regulado a nivel transcripcional por un sistema represor-antirrepresor gobernado a través del “quorum sensing”. Dicho sistema está formado por los genes 25 (*rap*, antirrepresor), 26 (*phr*, péptido implicado en “quorum sensing”) y 27 (*rco*, represor), expresándose los dos primeros bajo un promotor constitutivo mientras que la expresión de *rco* está subordinada al promotor débil denominado P_r (promotor de regulación), que solapa con el promotor P_c , respecto al que se transcribe de forma divergente (Singh et al., 2013). *Rco* es capaz de unirse a ocho regiones de DNA circundantes e internas a los promotores P_c y P_r , impidiendo la expresión del primero y, en consecuencia, del operón de conjugación (**Figura 3A**). Además, esta unión es capaz de estimular y reprimir su propia expresión cuando se encuentra a baja y alta concentración, respectivamente. De esta forma, se asegura un nivel de expresión dentro de un rango bajo a la

par que consigue una represión eficiente del promotor P_c . Sin embargo, la proteína Rap es capaz de unirse a al represor y retirarlo de sus sitios de unión, dotando de reversibilidad a este proceso (**Figura 3B**). A su vez, Phr^* es capaz de secuestrar a Rap, manteniendo el sistema de represión establecido por Rco (**Figura 3C**). Esto se realiza mediante un sistema de “quorum sensing” en el que la proteína Phr inmadura (44 aminoácidos) es exportada al exterior celular donde sufre dos procesos proteolíticos hasta formar un pentapéptido maduro (Phr^*), que puede ser absorbido activamente por células. Cuando alcanza una concentración elevada en el medio se acumula en las células, secuestrando Rap y manteniendo la conjugación inhibida (Singh et al., 2013).

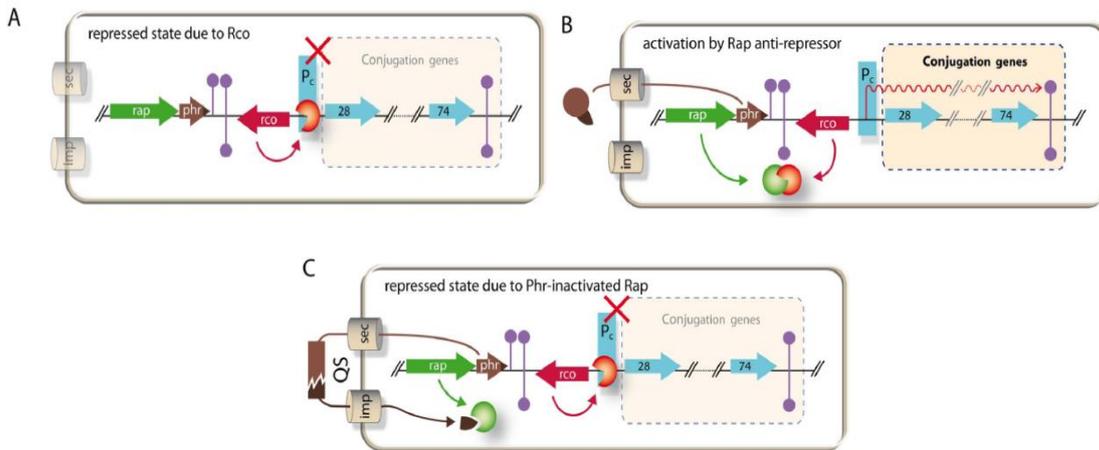


Figura 3. Sistema de regulación de la conjugación por quórum sensing de pLS20. A. Represión de la conjugación por Rco. **B.** Activación de la conjugación por la unión Rco-Rap (represor-antirrepresor). **C.** Inhibición de la actividad antirrepresora de Rap por su unión al pentapéptido Phr (Singh et al., 2013).

Este sistema de regulación tiene como consecuencia que los genes de conjugación se activen cuando potencialmente hay células receptoras presentes en el medio. Cuando las bacterias portadoras del plásmido se encuentran en bajo número se promueve la conjugación (Phr^* está en baja concentración, por lo que se produce la situación mostrada en la **Figura 3B**); mientras que cuando el plásmido se encuentra ampliamente distribuido en la población este proceso se ve inhibido (Phr^* está en alta concentración, por lo que se produce la situación mostrada en la **Figura 3C**) (Singh et al., 2013)

2.4. Objetivo de estudio

Además de este sistema de regulación, cabe la posibilidad de que haya mecanismos adicionales que puedan afectar a la expresión de las proteínas del operón de conjugación. Una observación que apoya esta hipótesis es que el primero de estos genes está precedido por una región larga de 456 pb que aparentemente no codifica para una proteína (5' UTR). En este trabajo se ha estudiado el posible papel de la 5' UTR del mRNA del operón de conjugación en la expresión de los genes situados aguas abajo. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la presencia de un terminador transcripcional precediendo el primer gen del operón. Resultados *in vivo* muestran que se trata de un terminador muy eficiente. Curiosamente, este terminador no se forma cuando está presente en su emplazamiento nativo. Los resultados obtenidos aportan evidencias convincentes de que la región 5'UTR puede plegarse en dos formas distintas y mutuamente excluyentes. En el plegamiento que adquiere

espontáneamente no se forma el terminador debido a que la mayoría de las secuencias que lo forman hibridan con secuencias localizadas aguas arriba. Resultados preliminares sugieren que el operón de conjugación pueda expresar una proteína que causa la formación de la estructura alternativa en que se forma el terminador, impidiendo así la transcripción del operón de conjugación y poniendo fin a este proceso.

3. MATERIALES

3.1. Cepas bacterianas, medios, plásmidos, cebadores y enzimas

Las cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) y *B. subtilis* se crecieron en medio líquido Luria-Bertani (LB) o en placas de dicho medio con 1.5% de agar. Estos medios pueden estar, además, suplementados con ampicilina (100 µg/ml), espectinomicina (100 µg/ml), cloranfenicol (5 µg/ml), eritromicina (1.5 µg/ml) o IPTG (1 mM) (Sigma-Aldrich).

Las cepas de *B. subtilis* empleadas eran isogénicas a *B. subtilis* 168 y quedan recogidas, junto a las de *E. coli* en la **Tabla 1**. Los plásmidos y los oligonucleótidos (Isogen Life Science, Holanda) empleados quedan recogidos en la **Tabla 2 y 3**, respectivamente.

Los enzimas empleados y quedan recogidos en la **Tabla 4**.

3.2. Kits comerciales para extracción de plásmidos en *E. coli* y para purificación de DNA

La purificación de productos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y digestiones con enzimas de restricción se realizó empleando el kit comercial “PCR and DNA Fragment Purification Kit” de NeoBiotech, Estados Unidos. La extracción del DNA plasmídico contenido en *E. coli* (Miniprep) y su posterior purificación se realizó empleando el kit comercial “High Purification Plasmid Miniprep Kit” de NeoBiotech, Estados Unidos.

3.3. Filtros

Los filtros empleados para la purificación de los oligonucleótidos hibridados entre si y eliminación de sales (ambos procesos por diálisis frente a agua MiliQ) fueron filtros de nitrocelulosa de 0.025 µm de Milipore SA, Irlanda.

4. MÉTODOS

4.1. Análisis *in silico*

El análisis de secuencias de RNA para la localización de estructuras regulatorias se realizó empleando los softwares “RNA motif” y “Erpin”, disponibles “online” en la página de web ARNold (<http://rna.igmors.u-psud.fr/toolbox/arnold/>). La predicción del plegamiento espacial adquirido por el RNA se obtuvo empleando el software “RNA fold” disponible online (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>).

4.2. Transformación

Los métodos empleados para llevar a cabo la transformación fueron el choque térmico (*E. coli* XL1 Blue competentes) (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989), la electroporación (*E. coli* JM101

electrocompetentes) (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989) y la transformación mediada por competencia natural (todas las cepas de *B. subtilis* transformadas) (Singt et al, 2013)

4.2.1. Transformación por choque térmico

100 µl de células competentes fueron incubadas en presencia del DNA a transformar durante un minuto en hielo y, posteriormente, a 42 °C durante 3 minutos (choque térmico). Tras esto, se añadieron 400 µl de medio LB y se incubaron a 37 °C y 750 rpm durante una hora y, después, fueron sembrados en placas de LB selectivas.

4.2.2. Transformación por electroporación

El DNA a electroporar fue dializado frente a agua MiliQ durante 10 min empleando filtros de 0.025 µm para eliminar las sales procedentes del tampón de PCR o de digestión. Dicho DNA se mezcló con 100 µl de células electrocompetentes y se introdujeron en una cubeta de electroporación, donde se les aplicó un pulso eléctrico de 2,5 kv (adaptando los otros parámetros a 25 µF y 200 Ω). Seguidamente, se añadieron 500 µl de medio LB y se incubaron a 37 °C y 750 rpm durante una hora, tras lo cual fueron sembradas en placas de LB selectivas.

4.2.3. Inducción de competencia natural y transformación

A partir de un cultivo “overnight” (o/n) (37 °C y 210 rpm) de las células en las que se quiere inducir la competencia, se hizo una dilución 1:100 en medio mínimo (PC (1 %), glucosa (2 %), L-triptófano (0.005 %), citrato amónico férrico (0.0011 %), L-aspartico pH7 (0.25 %) y sulfato de magnesio (3 mM)) con casaminoácidos (0.1 %) y se incubó a 37 °C y 210 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀) de 1. Tras esto, se diluyeron en un ratio 1:2 en medio mínimo sin casaminoácidos y se incubaron a 37 °C y 210 rpm durante 1 h. 800 µl de estas células (competentes) se incubaron en presencia del DNA a transformar a 37 °C y a 210 rpm durante 20 min y, posteriormente, se añadieron 50 µl de casaminoácidos (10 %) y se incubaron a 37 °C y 210 rpm durante 90 minutos. Finalmente, fueron sembrados en placas de LB selectivas.

4.3. Fusiones transcripcionales

4.3.1. Clonaje de las regiones a fusionar transcripcionalmente al gen *gfp* presente en el vector de integración pDR110sf gfp

Excepto el fragmento de 49 pb, todas las regiones de pLS20 a fusionar transcripcionalmente a *gfp* fueron amplificadas desde pLS20cat mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando para ello la Vent® polimerasa. Los cebadores utilizados poseían extensiones para dianas de *Hind*III o *Nhe*I en su extremo 5', introduciéndolas en los amplicones resultantes en su extremo 5' y 3', respectivamente (se toma como referencia el sentido en que se va a transcribir el DNA en el vector pDR110sfGFP). Los cebadores usados para amplificar las diferentes regiones con sus características están mencionados en la **Tabla 3**. La región de 49 pb, correspondiente a Ter_{up28}, fue generada mediante hibridación de dos oligonucleótidos complementarios, que contienen extensiones en su 5' que generan secuencias sobresalientes que son cohesivos con las secuencias protuberantes generados por los enzimas *Hind*III y *Nhe*I.

Tras esto, fueron purificadas por diálisis frente a agua MiliQ durante 10 min empleando filtros de 0.025 µm.

Para generar los amplicones con mutaciones se llevó a cabo la amplificación de las zonas a mutar con oligonucleótidos que poseían una extensión que incluía las tres mutaciones puntuales. Las mutaciones en el extremo 3' se introdujeron directamente al amplificar empleando los cebadores oDG03 y oDG19. Sin embargo, para introducir las mutaciones en 5' fueron empleadas dos PCRs sucesivas, la primera empleando los cebadores oDG18A y oDG06 para introducir la mutación y la segunda, empleando la anterior como molde, usando los cebadores oDG18B y oDG06 para dotar a la secuencia de un tamaño correcto (en el caso del doble mutante se empleó oDG19 en vez de oDG06 en la segunda PCR)

Todas las secuencias amplificadas por PCR fueron purificadas y fueron digeridas con los enzimas *Hind*III-HF y *Nhe*I-HF a 37 °C durante 5 h, tras lo cual fueron purificadas de nuevo. En paralelo, se digirió y purificó el plásmido pDR100sfGFP con los mismos enzimas.

Todos los fragmentos fueron introducidos en el plásmido por medio de la T4 ligasa® (incubada a 16 °C durante 2 h y 30 min) y, seguidamente, fueron transformadas en la cepa XL1 Blue de *E. coli* mediante choque térmico (selección por ampicilina). Los clones obtenidos fueron analizados para comprobar la presencia de inserto mediante PCR colonial empleando para ello la Taq® polimerasa y cebadores que flaquean el "multicloning site" (MCS) del vector (oPDR111 U_seq y oSeqpPKSGFP_DN). A partir de los clones positivos, se extrajo el DNA, que fue secuenciado para verificar la exactitud de la secuencia clonada. Los transformantes con la secuencia correcta fueron nombrados como se menciona en la **Tabla 1** y conservados a -80 °C (en presencia de glicerol al 20 %).

4.3.2. Inserción de los casetes con las fusiones transcripcionales en el gen cromosómico amyE de B. subtilis

Los plásmidos obtenidos del proceso descrito en el apartado anterior fueron utilizados para transformar células competentes de la estirpe 168 de *B. subtilis*. En los casos en los que había varios lugares donde el plásmido pudiera recombinar además del gen *amyE* (estirpes con pLS20cat o derivados, ya que las secuencias clonadas proceden de dicho plásmido), se usaron derivados de pDR110sfGFP linealizados, digiriéndolos con *Spe*I-HF (diana única) a 37 °C durante 5 horas para forzar que únicamente se pudiese producir recombinación homóloga doble (la simple conduce a la linealización del elemento genético en el que recombina y, por tanto, a su eliminación). Para comprobar que se ha introducido únicamente la secuencia contenida entre el *amyEL* y el *amyER* (recombinación homóloga doble) y no el plásmido completo (recombinación homóloga simple) se determinó la capacidad de varios transformantes para producir amilasa, el producto del gen *amyE*, en placas de almidón. Para ello, se expusieron las placas a vapores de yodo (pone de manifiesto la presencia de este polisacárido en el medio). Las estirpes generadas por doble recombinación homóloga (amilasa negativas) fueron nombradas según indicado en la **Tabla 2** y conservadas a -80 °C (en presencia de glicerol al 20 %).

4.3.3. Detección de la capacidad de regulación transcripcional de las secuencias mediante citometría de flujo

Para determinar la capacidad de regulación transcripcional de las construcciones generadas se diluyeron cultivos o/n (37 °C y 210 rpm) con antibiótico en medio LB fresco (ratio 1:100) y fueron inducidas con 1 mM de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (concentración saturante para el promotor P_{spank}). La expresión del gen reportero *gfp* fue monitorizada midiendo los niveles de fluorescencia de las células mediante citometría de flujo (FACScalibur®). Los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos fueron analizados mediante el programa FlowJo.

4.4. “Knock out”

4.4.1. Construcción de vectores derivado de pMiniMad2 para la eliminación de secuencias en pLS20cat

En primer lugar, se clonaron dos regiones adyacentes a la secuencia a eliminar desde pLS20cat mediante PCR empleando para ello la Vent® polimerasa. Estas reacciones se denominaron PCR_L y PCR_R por su situación aguas arriba (“Left”) y aguas abajo (“Right”) respecto a la región a eliminar, respectivamente, con objeto de formar un híbrido carente de dicha región (**Figura 4A**).

El cebador “forward” de la PCR_R incluía una extensión a su extremo 5’ cuya secuencia es igual a la del extremo 3’ de la PCR_L, permitiendo así la hibridación entre ambos fragmentos (**Figura 4A**). Además, el cebador “forward” de la PCR_L y el “reverse” de la PCR_R presentan extensiones en su extremo 5’ con las dianas para *Hind*III y *Bam*HI, respectivamente.

Seguidamente, se juntaron los dos fragmentos en un ratio 1:1 y se ejecutó con esta mezcla una PCR de 13 ciclos en ausencia de cebadores para obtener el fragmento híbrido (**Figura 4B**) que, posteriormente, fue amplificado por PCR empleando los cebadores forward de la PCR_L y reverse de la PCR_R (flanqueantes del híbrido generado) (**Figura 4C**).

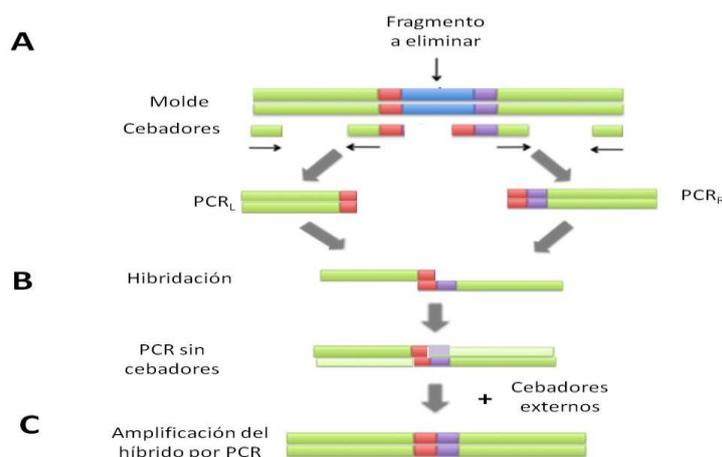


Figura 4. Delección de un fragmento por PCR solapante. A. Clonaje de dos fragmentos flanqueantes a la zona a eliminar. **B.** PCR sin cebadores para producir la hibridación y formar el híbrido por amplificación empleando como cebador el extremo 3’ libre. **C.** Amplificación del híbrido empleando como cebadores el “forward” de la PCR_L y el “reverse” de la PCR_R (cebadores externos).

Tanto el vector pMiniMad2 como los híbridos fueron digeridos con *Hind*III y *Bam*HI a 37 °C durante 5 h y, posteriormente, ligados entre sí a 16 °C durante 2 h y 30 min. Tras esto, fueron transformadas en la cepa XL1 Blue de *E. coli* mediante choque térmico (selección por ampicilina). Los clones obtenidos fueron analizados para comprobar la presencia de inserto mediante PCR colonial empleando para ello la Taq® polimerasa y cebadores que flanquean el MCS del vector (M13_Fw-21_ext y M13RevExt). A partir de los clones positivos, se extrajo el DNA plasmídico que fue secuenciado para verificar la exactitud clonada. Los transformantes con la secuencia correcta fueron nombrados según indicado en la **Tabla 1** y conservados a -80 °C (en presencia de glicerol al 20 %).

4.4.2. Generación de derivados de pLS20cat con regiones deletionadas

Los vectores obtenidos del proceso descrito en el apartado anterior fueron transformados por electroporación en la cepa JM101 de *E. coli*, ya que los plásmidos generados por esta estirpe tienen mayor rendimiento en este proceso (selección con ampicilina). Los clones positivos fueron nombrados y conservados a -80 °C (en presencia de glicerol al 20 %).

Posteriormente, se extrajo el DNA a partir de un cultivo o/n (37 °C y 210 rpm) en presencia de ampicilina y fue empleado para transformar células competentes de la estirpe *B. subtilis* PKS9 (selección por eritromicina). El plásmido pMiniMad2 posee un gen de replicación con una mutación que causa que la proteína Rep sea termosensible. Como consecuencia pMiniMad2 y sus derivados no pueden replicar de forma autónoma a 37 °C. La única forma de mantenerse y, por tanto, dotar a la bacteria de resistencia a eritromicina, es insertarse en el plásmido pLS20cat por recombinación homóloga simple. Una vez obtenidos transformantes en que el derivado de pMiniMad2 se ha integrado en pLS20cat, se seleccionaron varios de estos clones que se crecieron o/n a 25 °C, temperatura a la que la proteína Rep es funcional y provoca la replicación de pMiniMad2. Esta situación genera inestabilidad en pLS20cat, de forma que se tiende a expulsar el derivado de pMiniMad2, lo que puede ocurrir de la misma forma en la que se introdujo, dando lugar al genotipo de partida; o por doble recombinación homóloga, dando lugar al genotipo “knock out”. La estirpe PKS9 posee en su genoma un casete en que el gen *rco* de pLS20 está bajo control del promotor P_{spank}, inducible por IPTG. Como medida de seguridad ante la posible letalidad del proceso, se crecieron en presencia de 100 µM de IPTG para que la conjugación se mantuviese apagada por el represor Rco.

Posteriormente, se comprobó la sensibilidad a eritromicina de los clones obtenidos (seleccionados por cloranfenicol) para cerciorarse de que se había producido la expulsión y pérdida del plásmido. Los clones sensibles fueron analizados por PCR colonial empleando la Taq® polimerasa para examinar si se había producido o no el acortamiento de la zona deseada. Los clones positivos fueron nombrados según mencionado en la **Tabla 2** y conservados a -80 °C.

4.4.3. Curvas de crecimiento

A partir de un cultivo o/n (37 °C y 210 rpm) de las estirpes con cloranfenicol se realizaron diluciones en medio fresco estimando la cantidad necesaria para que la OD₆₀₀ inicial fuera de 0.01. Se monitorizó el crecimiento a lo largo del tiempo (37 °C y 210 rpm) mediante un seguimiento de este parámetro hasta alcanzar una OD₆₀₀ en torno a 3, donde se considera que

las células ya han alcanzado la fase estacionaria de crecimiento. Los experimentos se realizaron por triplicado.

4.4.4. Eficiencia de conjugación

A partir de cultivos o/n (37 °C y 210 rpm) de células donadoras y receptoras, se hizo una dilución 1:100 en medio LB sin antibiótico y se dejó crecer hasta que la cepa donadora alcanzaba la OD₆₀₀ en que se quería hacer la conjugación, presentando su máximo cuando OD₆₀₀ es igual a 1. La eficiencia de conjugación se determinó como el ratio entre transconjugantes (selección con los antibióticos cuyas resistencias están en el plásmido a transferir y en el genoma de la célula receptora) frente a los donadores y los propios transconjugantes en conjunto (selección con el antibiótico cuya resistencia está en el plásmido a transferir). Los experimentos se realizaron por triplicado.

5. RESULTADOS

5.1. Análisis *in silico* sugieren la presencia de un terminador transcripcional intrínseco localizado aguas arriba del gen 28

La regulación de los promotores divergentes y solapantes P_c y P_r involucra la unión de Rco a dos regiones operadoras distintas, separadas entre sí por 75 pb. Una de estas regiones solapa con los promotores mientras que la otra se encuentra aguas abajo del promotor P_c (**Figura 6A**). Debido a esta configuración, la región 5' del mRNA derivado del promotor P_c corresponde, en el DNA, a las secuencias de unión a Rco. Sin embargo, la 5'UTR se extiende 270 nt aguas abajo de los lugares de unión a Rco hasta llegar al primer gen del operón de la conjugación, el gen 28.

El hecho de que esta región larga de 270 pb aparentemente no ha sido eliminada durante la evolución sugiere que posee un papel biológico relevante. Las 5' UTR pueden tener un rol regulatorio en la expresión de genes localizados aguas abajo (Naville y Gautheret, 2009). Existen numerosos mecanismos a través de los cuales se puede llevar a cabo esta regulación. La formación de estructuras secundarias en el RNA de la 5' UTR que provocan la terminación prematura de la transcripción es uno de ellos, y será el mecanismo estudiado en este trabajo.

Para examinar si la 5' UTR del gen 28 podría afectar a la elongación transcripcional se llevaron a cabo análisis *in silico* con objeto de comprobar la posible presencia de un terminador transcripcional intrínseco. Dos algoritmos diferentes ("RNA motif" y "Erpin") predijeron la presencia de un posible terminador transcripcional localizado de 32 a 70 pb aguas arriba del codón de inicio del gen 28, que detendría la transcripción en la dirección de expresión del promotor P_c. La predicción indica la formación de un bucle en horquilla ($\Delta G^\circ = -13.3$ kCal/mol) precediendo una región de Us (**Figura 6A, B y E**).

5.2. Fusiones transcripcionales confirman que la región predicha corresponde a un terminador transcripcional genuino que no está activo en su emplazamiento nativo

El vector de integración en el gen *amyE* de *B. subtilis*, pDR110sfgfp, ha sido construido de tal manera que el gen reportero *gfp* está bajo el control del promotor P_{spank}, inducible por IPTG. Entre la secuencia del promotor y del reportero hay un MCS que permite clonar fragmentos de

DNA de tal forma que la expresión de *gfp* queda transcripcionalmente fusionada a la de dichos fragmentos. Este vector fue empleado para construir una cepa de *B. subtilis*, denominada AND101, que incorpora en el locus *amyE* de su genoma una copia del casete P_{spank}-*gfp*. Ésta es fluorescente cuando crece en medio LB suplementado con IPTG (1 mM) pero no en ausencia de dicho inductor (el promotor no tiene escape detectable en *B. subtilis*).

Para estudiar si la región identificada en el apartado anterior efectivamente contenía un terminador transcripcional intrínseco, se ligó a pDR110sfgfp un fragmento de 49 pb que abarcaba la secuencia predicha como tal y se usó la mezcla de ligación para transformar células competentes de *E. coli* (ver Métodos). Al ubicar las colonias en un transiluminador de luz UV, la mayoría de los transformantes eran blancos mientras que había una minoría verde. El DNA plasmídico de algunas colonias blancas y verdes fue secuenciado para determinar la exactitud de la secuencia introducida. Si bien todos los clones contenían el inserto, los blancos carecían de mutaciones mientras que los verdes presentaban una mutación puntual (guanina por adenina) como se muestra en la **Figura 6B** y **E**. Estos resultados muestran que esta mutación puntual afecta la expresión del gen *gfp*, localizado aguas abajo, en *E. coli*. Ambos vectores fueron empleados para transformar células competentes de *B. subtilis* 168, dando lugar a las cepas DGA05 (168, *amyE*::P_{spank}-F1-*gfp*) y DGA06 (168, *amyE*::P_{spank}-F1**-gfp*), en los cuales F1 y el F1* corresponden a la secuencia de 49 pb correcta y mutada, respectivamente. Ambas cepas, junto a AND101 inducido (control positivo) y sin inducir (control negativo), fueron crecidas en LB con IPTG y analizadas mediante citometría de flujo (FACS) como se describe en Métodos. Los controles positivo y negativo obtuvieron niveles altos y bajos de fluorescencia, respectivamente (100 % y 4 % de fluorescencia relativa, **Figura 5**). En el caso de DGA05, se obtuvieron niveles muy bajos de fluorescencia (**Figura 5**), lo que es indicativo de que la secuencia clonada actúa previniendo la expresión del *gfp*. Este hecho apoya intensamente la predicción de que en dicha región está contenido un terminador transcripcional intrínseco. Además, esta conclusión está avalada por los resultados de la cepa DGA06, donde fue posible observar expresión de *gfp* (aunque en niveles claramente más bajos que el control positivo, **Figura 5**). Esto pone de manifiesto que una mutación puntual es capaz de sortear parcialmente el bloqueo ejercido sobre la expresión de *gfp*. Los algoritmos empleados por la página web ARNold indican la formación de terminador únicamente en el caso de la secuencia silvestre (no mostrado). En conjunto, estos resultados suponen una evidencia de que la región de 49 pb que antecede al gen 28 es un terminador transcripcional genuino, al que denominaremos Ter_{up28}.

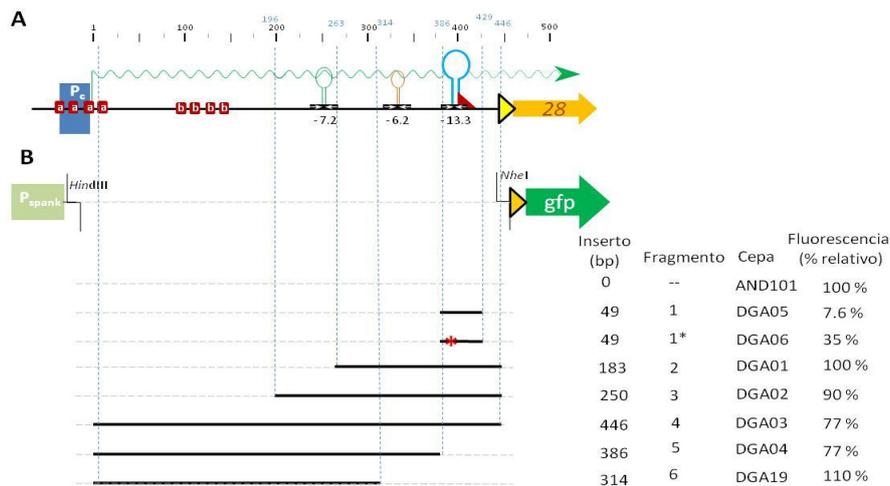


Figura 5. Efectos de las diferentes regiones de la 5' UTR que precede al gen 28 en la expresión de *gfp* cuando está fusionado transcripcionalmente delante de este reportero. A. Características de la 5' UTR que precede al gen 28. La posición del promotor P_c se indica con una caja azul, y el transcrito derivado del mismo con una flecha ondeante verde. Los lugares de unión de Rco se muestran con pequeñas cajas rojas denominadas “a” y “b” según correspondan al operador I y II, respectivamente, que están separados 75 pb. La posición del terminador transcripcional predicho está mostrada mediante un bucle en horquilla seguido de un triángulo rojo, que representa la región de uridinas. La posición de las estructuras con -7.2 y -6.2 kCal/mol está indicada con 2 bucles en horquilla, verde y naranja, respectivamente. La posición 1 en la numeración situada sobre la representación indica el lugar de inicio de la transcripción derivada del promotor P_c . **B.** Representación esquemática del casete “ P_{spark} -Inserto-*gfp*”, donde el inserto corresponde a las diferentes regiones de la 5' UTR del gen 28. El asterisco rojo representa una mutación puntual (G por A). Los detalles sobre la longitud de los fragmentos clonados, su nombre y el de las estirpes en las que se ha introducido se presentan a la derecha junto a la fluorescencia que presentan cada cepa bajo idénticas condiciones. Los datos reflejan la media de tres experimentos independientes.

Como se explica arriba, la 5' UTR comienza 380 nt antes del Ter_{up28} . Si bien no se han predicho terminadores transcripcionales adicionales, esta región contiene 2 secuencias con repeticiones invertidas que, una vez transcritas, podrían formar horquillas en bucle con una energía libre de -7.2 y 6.2 kCal/mol (**Figura 6A, B, C y D**). Posiblemente, estas secuencias podrían actuar modulando la capacidad regulatoria del Ter_{up28} . Para comprobarlo, se empleó pDR110sfgfp para construir cinco nuevas estirpes, en las que fueron clonadas diferentes partes de la 5' UTR, citadas como fragmentos del 2 al 6 (F2-F6) (**Figura 5**) delante del gen reportero *gfp*. En las tres primeras estirpes, DGA03, DGA04 y DGA19, se introdujo la región 5' UTR completa a excepción del lugar de unión del ribosoma (RBS) del gen 28 (F4), el Ter_{up28} (F5) y la región 3' comprendida hasta el bucle en horquilla de -6.2 kCal/mol (F6), respectivamente (**Figura 5**). Las otras 2 estirpes, DGA01 y DGA02, incluyen las regiones comprendidas entre el Ter_{up28} y las horquillas en bucle de -6.2 (F2) y -7.2 kCal/mol (F3), respectivamente.

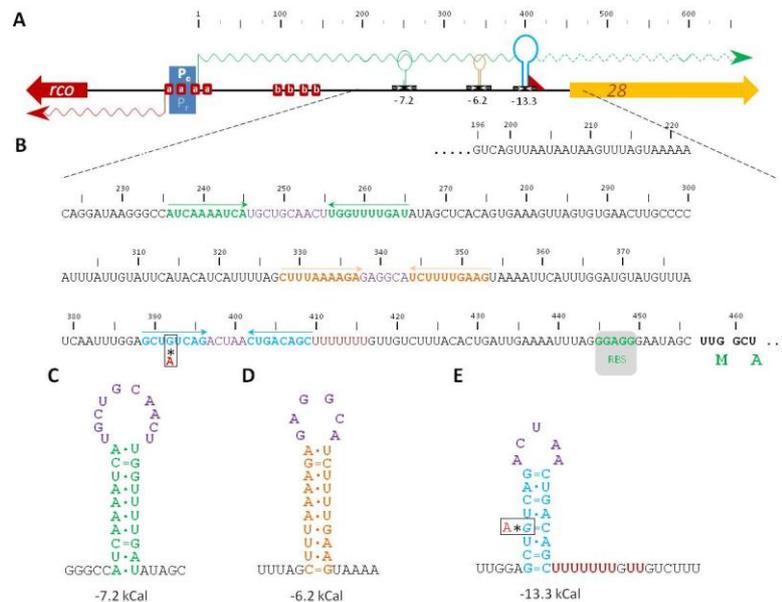


Figura 6. El mRNA que codifica los genes de conjugación está precedido por una UTR larga que está predicho que contenga un regulador transcripcional intrínseco y 2 horquillas en bucle. **A.** Representación esquemática de la región intergénica comprendida entre los genes *rco* y *28*. Los genes están indicados con flechas en el sentido en que se transcriben. La posición de los promotores solapantes P_c y P_r se muestra con una caja azul. Los transcritos derivados de los promotores P_c y P_r se indican con una flecha ondeante verde y roja, respectivamente el resto de estructuras se indican igual que en la **Figura 5A**. **B.** Estructura primaria de la 5' UTR desde el nucleótido 196 respecto al inicio de transcripción del promotor P_c . Incluye la región predicha como terminador transcripcional, los bucles en horquilla y las secuencias flanqueantes, que están marcadas según el código de colores empleado en "A", y enfatizadas con una flecha. Las secuencias predichas para formar el bucle están marcadas en morado mientras que la región de uridinas lo está en rojo. El RBS del gen 28 y los dos primeros codones (UUG y GCU) de dicho gen que codifican para residuos de metionina (M) y alanina (A) están indicados. La mutación puntual que consiste en un cambio de una guanina (G) por una adenina (A) en la posición 392 (ver texto) está recuadrada y marcada con un asterisco. **C.** Estructura secundaria predicha para las repeticiones invertidas con $\Delta G = -7.2$ kCal/mol (1). -6.2 kCal/mol (2) y por el terminador transcripcional putativo (3) situados aguas arriba del gen 28. El código de color es el mismo que el empleado en "A" y "B".

Las células de las cepas DGA04 y DGA19, en las que el *gfp* estaba unido a fragmentos que no contienen el Ter_{up28} , presentaban niveles de fluorescencia del mismo orden que los mostrados por el control positivo (sin ningún fragmento clonado, **Figura 5**). Teniendo en cuenta que en dichas estirpes estaban contenidos los bucles en horquilla de -6.2 (solo en DGA04) y -7.2 kCal (en ambas estirpes), se asumió que estas estructuras no son terminadores transcripcionales intrínsecos, como cabría de esperar partiendo de la base de que no están seguidos por una región de uridinas y que, además, no han sido predichos por los análisis *in silico*. Sorprendentemente, los niveles de fluorescencia de las estirpes DGA01, DGA02 y DGA03 cuyos insertos incluían el terminador Ter_{up28} fueron similares al nivel de fluorescencia del control positivo (AND101) en que no había un inserto antes del gen *gfp*.

5.3. Análisis *in silico* e *in vivo* evidencian que el Ter_{up28} no se forma en su emplazamiento nativo debido al establecimiento de una estructura alternativa que secuestra las secuencias que lo constituyen

La región de 49 pb localizada 40 pb aguas arriba del gen 28 contiene una estructura con repeticiones invertidas seguida de una secuencia de timinas. Cuando se transcribe, está predicho que el RNA de dicha región adquiera una conformación en horquilla en bucle antecediendo una región de uridinas. Estas características son típicas de los terminadores transcripcionales intrínsecos. Los análisis *in silico* anteriormente realizados apoyan esta hipótesis y los análisis *in vivo* la confirman. Sin embargo, los últimos resultados presentados en el apartado anterior indican que cuando se encuentra en su emplazamiento nativo el Ter_{up28} no es capaz de evitar la expresión de *gfp*, siendo las 123 pb aguas arriba de esta Ter_{up28} (presentes en F2) suficientes para inactivarlo.

La regulación transcripcional ejercida por el Ter_{up28} es dependiente de la formación de la estructura de horquilla en bucle seguida de una región de uridinas. Por ello, la presencia de las 123 pb aguas arriba podría haber actuado inhibiendo la formación de esta configuración mediante el establecimiento de una estructura alternativa. Para predecir si el Ter_{up28} se formaba cuando se transcribía junto a las secuencias aguas arriba en la 5' UTR se empleó el programa "RNAfold". Este software permitió analizar las secuencias en un rango de tamaño mayor que los empleados anteriormente. Las secuencias analizadas fueron la 5' UTR completa (F4) y la región mínima capaz de inactivar Ter_{up28} (F2). Como se muestra en la **Figura 7**, en ninguna de estas estructuras se predijo la formación de Ter_{up28}. De hecho, en ambos casos se produjo un plegamiento alternativo que es energéticamente más favorable que la estructura de Ter_{up28}. En esta estructura alternativa, la región 5' del Ter_{up28} hibridaba con los nucleótidos 281-296 de la 5' UTR que están localizados aguas arriba de Ter_{up28}, mientras que buena parte de la región 3' lo hacía con las bases 417-422 (situadas justo después de la región de timidinas a la que antecede el Ter_{up28}, **Figura 7**).

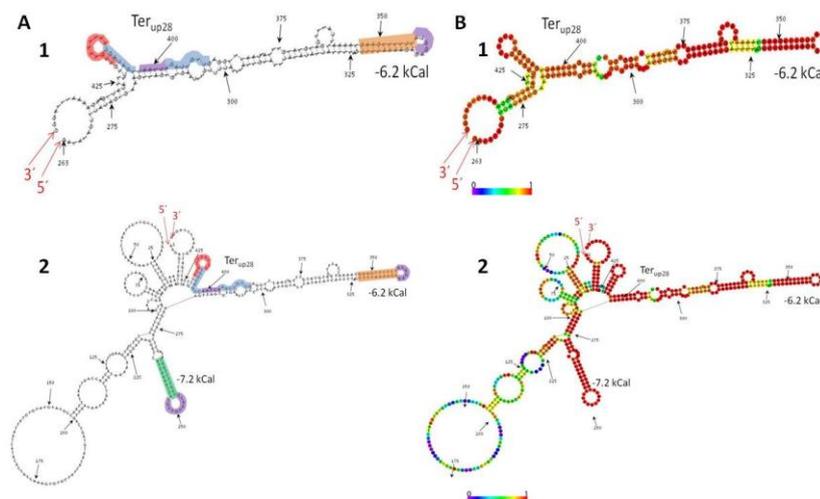


Figura 7. Plegamiento espacial del RNA predicha para F2 y F4. A. Localización de las secuencias del Ter_{up28} y las horquillas en bucle en la estructura secundaria predicha para F2 (1) y F4 (2). El código de colores es el empleado en la **Figura 6A** y **B**. **B.** Expectativa de que se establezca la estructura secundaria acorde con la predicción para F2 (1) y F4 (2) según el código de colores indicado en la parte abajo.

De confirmarse esta predicción, sería de esperar que alteraciones en las regiones aguas arriba y/o aguas abajo, especialmente en los residuos en las posiciones anteriormente mencionadas, conllevaran la alteración de esta estructura a favor de la formación del Ter_{up28}. Por ello, se emplearon dos estrategias para alterar estas secuencias. En la primera, se construyeron derivados de F2 en los que se introdujeron tres mutaciones puntuales en la región aguas arriba (F2A), aguas abajo (F2B) y en ambas a la vez (F2C) (**Figura 8B**). En la segunda, se introdujeron cambios más bruscos mediante deleciones 5' de 33 y 69 pb (F2D y F2E, respectivamente) (**Figura 8B**). Todos estos fragmentos se fusionaron transcripcionalmente al gen *gfp* y se emplearon para construir estirpes de *B. subtilis* que posean una copia de este casete en su genoma (**Figura 8B**).

El análisis de estas estirpes mediante citometría de flujo (FACS) mostró que los cambios introducidos afectaban de forma diferencial a la eficiencia de terminación. El efecto observado en la fluorescencia se puede ordenar, de mayor a menor fluorescencia, como sigue: F2B, F2C, F2A, F2D y F2E, siendo la fluorescencia de F2B similar a la del control AND101 y la de F2A parecida a la de F2C. De estos resultados se puede sacar dos conclusiones importantes. Primero, mutaciones fuera de las secuencias predichas de formar Ter_{up28} afectan a su funcionalidad. Segundo, sólo las mutaciones presentadas en la región aguas arriba tienen un verdadero efecto sobre la funcionalidad/eficiencia del terminador Ter_{up28}. La importancia de esa región se ve corroborada por el hecho de que al ir acortándola por el extremo 5', la fluorescencia cayó hasta alcanzar los mismos valores que con Ter_{up28}. Estos resultados apoyan la predicción de que la región de RNA de, aproximadamente, 200 nt situada aguas arriba del gen 28 forma una estructura secundaria que energéticamente es más favorable que la formación de Ter_{up28}. En esta estructura alternativa las secuencias para formar Ter_{up28} están secuestradas por regiones localizadas aguas arriba del mismo.

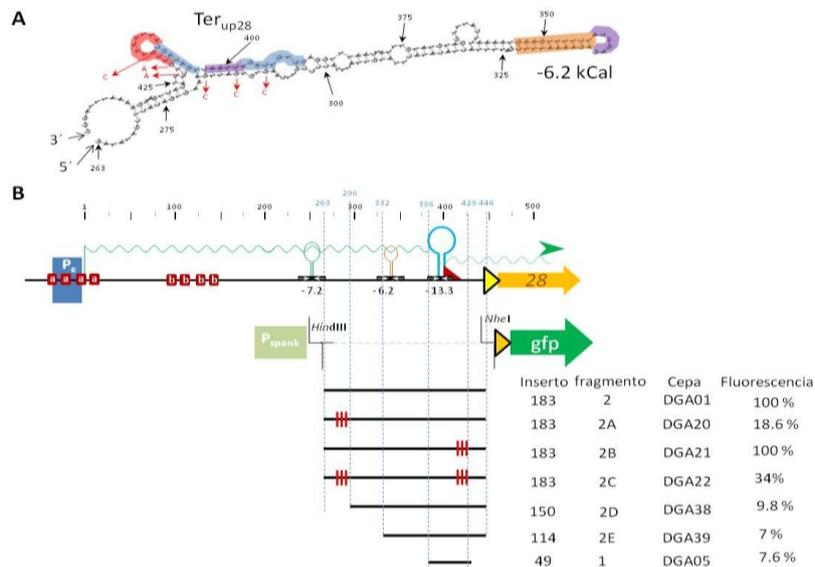


Figura 8. Evidencia de que la formación del Ter_{up28} es evitada en la 28 5' UTR debido a la formación de una estructura alternativa en la que las regiones del Ter_{up28} quedan secuestradas. A. Estructura predicha para el fragmento de 182 pb (F2). Los extremos 5' y 3' están indicados con flechas. El código de colores es el empleado en la **Figura 5A**. Las mutaciones introducidas que dan lugar a los fragmentos F2A-C están indicadas en rojo. En el fragmento F2A se introdujeron cambios en las posiciones 282 (de G

a C), 420 (de G a A) y 422 (de C a A); en el fragmento F2B en las posiciones 417 (de G a C), 420 (de G a A) y 422 (de C a A); y en el fragmento F2C ambos juegos de mutaciones. **B.** En la parte superior se muestra una visión esquemática de la 28 5' UTR (explicación en la **Figura 6**) mientras que en la inferior proporciona una visión esquemática de F2 (control positivo), sus derivados y F1 (control negativo), fusionados al gen reportero *gfp* para testar la eficiencia del Ter_{up28} en estas construcciones. Las mutaciones puntuales introducidas en F2A, F2B y F2C están representadas mediante líneas rojas verticales. Los Fragmentos F2D y F2E contienen deleciones de 33 y 69 pb respectivamente.

5.4. Evidencia de que Ter_{up28} forma parte de un atenuador transcripcional cuya activación depende de la expresión del operón de conjugación

Los resultados presentados hasta el momento demuestran que el primer gen del operón de la conjugación está precedido por un terminador transcripcional intrínseco, Ter_{up28}. Sin embargo, este terminador no es funcional cuando se transcribe junto a las secuencias de su emplazamiento nativo, probablemente por la formación de estructuras secundarias alternativas mediante la hibridación con parte de las secuencias del terminador, previniendo así su formación.

La regulación de la expresión génica a través de dos estructuras alternativas de RNA mutuamente excluyentes que permiten o impiden la formación de un terminador intrínseco se denomina atenuación transcripcional. La transición de la configuración energéticamente más favorable a la estructura alternativa requiere de un sistema que estabilice esta última. Como se explica en la discusión, la función biológica de Ter_{up28} podría ser de limitar la síntesis de transcritos derivados del promotor P_c a una ventana de tiempo máximo. En otras palabras, que podría existir un sistema que al “encender” la producción de proteínas de conjugación ponga en marcha este mecanismo para “apagarlo” y, de esta forma, acotar el proceso a una ventana de tiempo concreta. Si fuese correcta esta hipótesis, sería esperable que un gen localizado dentro del operón de conjugación produjera la proteína responsable de activar Ter_{up28}. Se construyeron dos derivados de la estirpe DGA03 (168, *amyE::P_{spank}-F4-gfp*), DGA09 y DGA25 que poseían, respectivamente, el plásmido pLS20cat, o un derivado, pLS20Δ28, en que el operón de conjugación no se expresa (**Figura 9**)(ver Métodos), y se analizaron estas estirpes con FACS para determinar sus niveles de fluorescencia. En el caso de que la hipótesis fuese correcta se esperarían niveles de fluorescencia más baja en las células de la estirpe DGA25, ya que posee pLS20cat y el casete en que el fragmento F4 está fusionado transcripcionalmente a *gfp*.

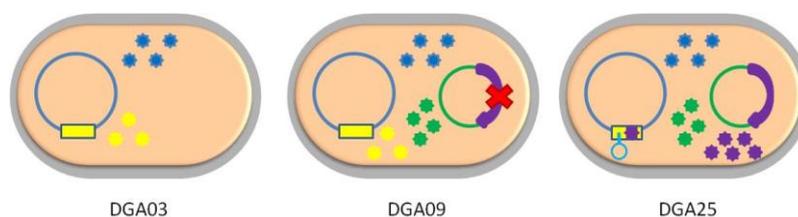


Figura 9. Representación del funcionamiento sistema de regulación propuesto para el atenuador transcripcional en las estirpes DGA03, DGA09 y DGA25. El círculo azul hace referencia al cromosoma bacteriano en el que está insertado el casete P_{spank}-F4-*gfp* (amarillo). El círculo verde representa el plásmido pLS20cat y la flecha morada la expresión o no (cruz roja) del operón de conjugación. Con asterisco se representan los productos de la expresión del casete (GFP, amarillo), del cromosoma bacteriano (azul), de los genes accesorios del plásmido pLS20 (verde) y de los genes del operón de

conjugación (morado). El terminador se muestra con una estructura de horquilla en bucle azul, y solo se forma por la interacción de un producto del operón de conjugación con la estructura del fragmento F4.

Los resultados obtenidos en los ensayos de FACS mostraban de que la presencia de pLS20cat o pLS20Δ28 no aportaba diferencias significativas en los niveles de fluorescencia en relación a la estirpe homóloga sin plásmido cuando se analizaron los cultivos en el momento que tenían un OD₆₀₀ de 1. Sin embargo, cuando se analizaron muestras de cada cultivo una hora más tarde, los niveles de fluorescencia de las estirpes DGA03 (*P_{spank}-F4-gfp*) y DGA09 (*P_{spank}-F4-gfp*, pLS20Δ28) subieron 38 y 70%, respectivamente (las diferencias entre ambas podrían explicarse por un crecimiento diferente en los dos cultivos, lo significativo es que se produce aumento en la fluorescencia en ambos casos). Sin embargo, el nivel de fluorescencia de la estirpe DGA25 que posee el plásmido pLS20cat sólo subió 6%. Estudios cuantitativos realizados en el laboratorio han puesto de manifiesto que el nivel de fluorescencia está directamente relacionado con la cantidad de GFP celular. Análisis por FACS de la estirpe AND101 (*P_{spank}-gfp*) mostraron que los niveles de fluorescencia aumentan moderadamente durante la fase exponencial (OD₆₀₀ de 0,4 hasta 0,9) mientras que se produce un aumento más pronunciado cuando entran en la fase estacionaria. Durante ésta última, se ralentiza la división celular, lo que probablemente causa que se acumule el GFP en la célula explicando el aumento de fluorescencia. La observación que el nivel de fluorescencia apenas aumenta en presencia de pLS0cat apoya la hipótesis que un gen presente en el operón de conjugación codifica una proteína que pueda activar Ter_{up28}. Es importante destacar que hacen falta experimentos adicionales para confirmar esta hipótesis.

5.5. La delección de las secuencias previas al Ter_{up28} disminuye inmensamente la eficiencia de conjugación *in vivo*

En el laboratorio se ha puesto a punto un protocolo que permite introducir delecciones “en fase” en el plásmido pLS20cat sin dejar cicatriz alguna. Para estudiar el papel del atenuador transcripcional *in vivo* se usó esta técnica para construir tres estirpes, DGA35, DGA36 y DGA37, en la que se deleccionaron el atenuador, la región aguas arriba del Ter_{up28} y el Ter_{up28}, respectivamente (ver **Figura 10**). Los derivados de pLS20cat construidos se denominaron pLS20catΔAt_{up28} (delección de la región del atenuador), pLS20catΔTer_{up28} (delección de la región Ter_{up28}) y pLS20catΔ5'At_{up28} (delección de la región aguas arriba del terminador)

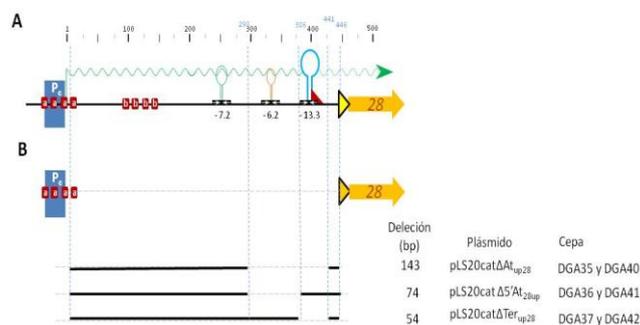


Figura 10. Representación de los fragmentos deleccionados por “knock out” en la 28 5’ UTR. A. Esquema de la 28 5’ UTR silvestre. **B.** Esquema de las 28 5’ UTR derivadas del “knock out”. Las regiones deleccionadas se indican mediante una línea de puntos. El código de colores es el mismo que en la **Figura 5**.

A *priori*, no podíamos descartar la posibilidad de que la delección de Ter_{up28} pueda tener efectos letales; por ejemplo, porque si no se detiene la expresión del operon de conjugación la cantidad de proteínas de membrana puede afectar a la viabilidad. Esta ha sido la razón por la que se utilizó la estirpe PKS9 para construir los tres derivados de pLS20cat. PKS9 posee pLS20cat y tiene en su genoma un casete en que el gen *rco* está bajo control del promotor P_{spank} . La inducción de *rco* bloquea por completo la expresión de los genes de conjugación (Singh et al, 2013). Aunque el promotor P_{spank} está bien reprimido en ausencia de IPTG, preferimos pasar los derivados de delección construidos en una estirpe sin una copia del gen *rco* ectópico. Por eso, una vez obtenidos, se transfirieron mediante conjugación los plásmidos construidos a la estirpe PKS7 que es un derivado de 168 resistente a eritromicina. Las estirpes generadas de esta manera se llamaron DGA40 (pLS20cat ΔAt_{up28}), DGA41 (pLS20cat $\Delta 5' At_{up28}$) y DGA42 (pLS20cat ΔTer_{up28}). Antes de estudiar los efectos de las delecciones sobre la eficiencia de conjugación, se comprobó si estos plásmidos afectaban el “fitness” bacteriano. Para eso se realizaron curvas de crecimiento, empleando como controles las estirpes PKS11 (168 con pLS20cat) y PS110 (168 sin pLS20cat). Los resultados obtenidos (**Figura 11**) mostraron que las diferentes delecciones implicando a la región de Ter_{up28} no afectaron significativamente al crecimiento de su huésped indicando de que no producían un efecto perjudicial sobre el desarrollo de estas células.

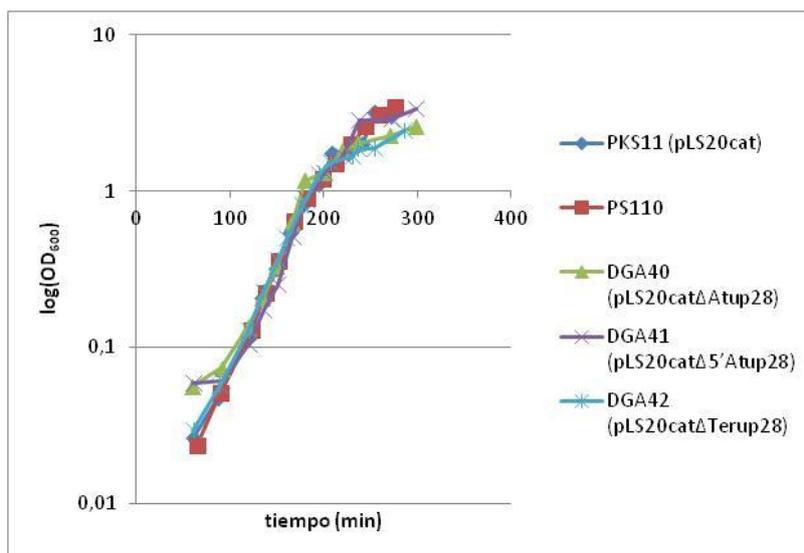


Figura 11. Curva de crecimiento de las estirpes PKS11, PS110, DGA40, DGA41 y DGA42. Se representa el logaritmo decimal de la OD₆₀₀ frente al tiempo para cada estirpe, diferenciadas por colores según lo indicado en la leyenda a la derecha del gráfico.

Como ya se ha comentado en los apartados anteriores, teniendo en cuenta la posición del atenuador es probable que cumpla un papel importante en la regulación de la transcripción de los genes de conjugación. Para estudiarlo, se realizaron experimentos para medir la eficiencia de conjugación de las tres estirpes construidas respecto a PKS11, empleando como recipiente PS110. Las medidas se realizaron a diferente OD₆₀₀ (0.6, 1, 1.5 y 2), obteniéndose los resultados mostrados en la **Figura 12**.

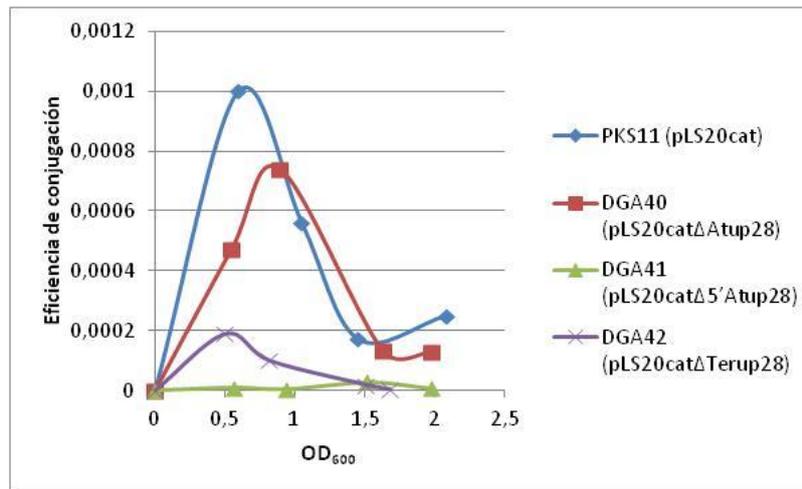


Figura 12. Eficiencia de conjugación de las estirpes PKS11, DGA40, DGA41 y DGA42. Se representa eficiencia frente a la OD₆₀₀ para cada estirpe, diferenciadas por colores según lo indicado en la leyenda a la derecha del gráfico.

Los resultados mostraron que DGA41 presentaba una eficiencia de conjugación alrededor de dos órdenes de magnitud menor que el control. Este hecho puso de manifiesto que las secuencias anteriores al Ter_{up28} actúan regulando la formación del terminador transcripcional y que, efectivamente, éste está implicado en la regulación transcripcional de los genes del operón ubicados aguas abajo. Llama la atención que también se observó una bajada destacable en la eficiencia de conjugación para el plásmido pLS20catΔTer_{up28}. Teniendo en cuenta que dos de las estirpes presentaban un plásmido derivado de pLS20cat con el terminador eliminado, hubiese sido de esperar un efecto similar en ambas. Por ello, no supimos cómo explicar este resultado, pero es posible que la delección en pLS20catΔTer_{up28} afectase a la estabilidad de RNA más que la delección de la región en el plásmido pLS20catΔAt_{up28}. Para determinar si esta hipótesis es correcta, es necesario complementar estos resultados con experimentos adicionales como pueden ser una qPCR de genes de conjugación o RNAseq. Otra posible razón es que la estructura adquirida por la 28 5' UTR de pLS20catΔTer_{up28} hubiera provocado que el RBS dejara de ser accesible. En cualquier caso, los efectos observados en la eficiencia de conjugación de DGA41 fueron mucho más severos que los observados por las otras 2 estirpes, lo que puso de manifiesto la potente capacidad reguladora del Ter_{up28}.

6. DISCUSIÓN

La terminación condicional de la transcripción o atenuación transcripcional es un fenómeno común en bacterias (Merino y Yanofsky, 2005). Generalmente, esta regulación se ejerce a través de la secuencia 5' UTR de genes u operones. Existen diferentes variantes (**Figura 13**) pero todos tienen en común que la región 5' UTR puede plegarse en dos formas mutuamente excluyentes, en una de las cuales, se forma un terminador transcripcional que previene la transcripción del/de los gen(es) aguas abajo. La formación de una u otra estructura depende de señales celulares. Es decir, una región 5' UTR adoptará una configuración preferente correspondiente a la energéticamente más favorable y se requiere un mecanismo activo para promover la transición hasta la estructura alternativa (Naville y Gautheret, 2009). La evolución ha provisto de varios mecanismos distintos que permiten hacer esto. Todos ellos tienen en

común que los permite percibir señales intracelulares y reaccionar en consecuencia, regulando la transcripción de los genes ubicados aguas abajo en función de la necesidad. La **Figura 13** muestra un resumen de los diferentes sistemas de atenuación transcripcional.

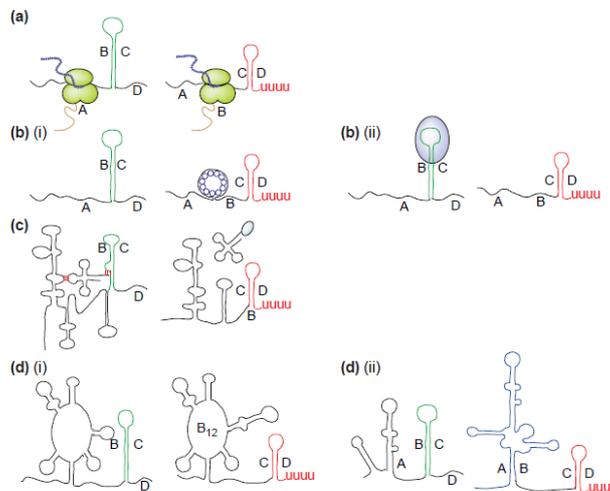


Figura 13. Mecanismos de regulación transcripcional. **a.** Atenuador transcripcional mediada por ribosoma (péptido líder). La parada del ribosoma durante la síntesis del péptido líder permite al RNA adoptar una conformación alternativa antiterminación. **b.** Atenuación transcripcional mediada por proteínas. La unión de proteínas a la 5' UTR puede estabilizar la formación de un terminador (i) o un antiterminador (ii). **c.** Atenuación mediada por tRNA. Los tRNA no cargados con un aminoácido pueden hibridar con secuencias específicas de la 5' UTR estabilizando la estructura del antiterminador. Cuando el tRNA sí está cargado esta interacción no ocurre y se forma un terminador. **d.** Atenuación mediada por moléculas pequeñas (vitaminas, purinas, aminoácidos, etc). La molécula es capaz de interaccionar con la 5' UTR causando (i) o evitando (ii) la formación de la estructura de antiterminación (Merino y Yanofsky, 2005)

Excepto el primer mecanismo, los otros han sido frecuentemente descritos en bacteria Gram positivas, incluyendo *B. subtilis*. Todos los sistemas de atenuación transcripcional conocidos regulan la transcripción de genes que se pueden clasificar en 3 categorías funcionales: (I) regulación de biosíntesis e importación de nutrientes (aminoácidos, ácidos nucleicos, homeostasis de iones metálicos, etc) (II) fluidez de procesos celulares de mantenimiento (regulación de sintetisas de tRNAs y operones ribosomales, incluyendo la regulación del balance entre rRNA y proteínas ribosomales), y (III) respuesta a estrés global (sensores de temperatura, regulación de sistemas de dos componentes sensitivos a señales medioambientales particulares, etc.) (Merino y Yanofsky, 2005; Naville y Gautheret, 2009)

Hasta la fecha de hoy no se ha descrito la existencia de un sistema de atenuación transcripcional involucrado en la conjugación. Los resultados obtenidos en este trabajo han proporcionado evidencias convincentes de que los genes de conjugación del plásmido pLS20 están bajo control de un sistema de atenuación transcripcional.

En este caso, resultados preliminares identificaron que el inicio de la transcripción del mRNA derivado del promotor P_{σ} , que lidera la expresión de todas las proteínas de conjugación, comenzaba 456 pb antes del codón de inicio del primer gen, el gen 28. En otras palabras, el mRNA que codifica el operón de conjugación está precedido por una región 5' UTR larga. El

análisis *in silico* de esta región puso de manifiesto la posible presencia de un terminador transcripcional al que se ha denominado Ter_{up28}. Se demostró que esta secuencia no solo es funcional *in vivo*, sino que, además, es un terminador muy eficiente, ya que al fusionarlo transcripcionalmente delante del gen reportero *gfp* es capaz de provocar un decaimiento de los niveles de fluorescencia hasta casi alcanzar el mismo nivel que se obtuvo con la estirpe AND101 en la que no se induce el promotor. Sin embargo, también se ha demostrado que no se forma un terminador funcional en su emplazamiento nativo. La región 5' del Ter_{up28} necesaria para evitar la formación de esta estructura se ha delimitado a 123 nt. Según predicciones *in silico*, el terminador no se forma en presencia la región de 123 nt situada inmediatamente aguas arriba del Ter_{up28}, sino que está predicha la formación una estructura alternativa energéticamente más favorable. En ella, las secuencias del 5' de la horquilla y del bucle hibridan con secuencias aguas arriba mientras que las secuencias 3' de la horquilla lo hacen con los nucleótidos situados después de la región de timinas. Según predicciones *in silico*, la formación de esta estructura se vería alterada al modificar cualquiera de estas 2 regiones. Sin embargo, esto no ocurría en la región 3' ya que, como cabría esperar, cuando la RNAPol sintetiza la secuencia de uridinas se pausa y, en ese momento es cuando puede o caer- si se forma la horquilla en bucle- o continuar la transcripción, de forma que las bases situadas aguas debajo de la región de Us no influían sobre el proceso de terminación. Sin embargo, el hecho de que los algoritmos empleados hubieran predicho lo contrario sugiere que ambas estructuras son energéticamente similares, es decir, que se requiere poca variación en la energía libre para la transición de una a otra. En cambio, el análisis de la región 5', realizado por métodos suaves (mutaciones puntuales) y bruscos (deleciones), demostró que estas secuencias estaban implicadas en la reclusión del Ter_{up28}, ya que las construcciones con fragmentos mutados/deleccionados eran capaces de impedir la síntesis de GFP. Estos resultados soportaban la hipótesis de que la 5' UTR puede adquirir 2 conformaciones alternativas y mutuamente excluyentes. Además, las predicciones y los resultados *in vivo* pusieron de manifiesto que la conformación más favorable es la de antiterminación, al menos en las condiciones experimentales empleadas.

De momento se desconoce cuál es la función *in vivo* de este sistema de atenuación transcripcional. La presencia de un terminador que previene la síntesis de proteínas de conjugación podría tener varias funciones, entre las que favorecemos dos posibilidades. En primer lugar, además de una regulación sofisticada al nivel de iniciación de transcripción, el sistema podría funcionar como un nivel adicional para asegurar que la síntesis de proteínas de conjugación sólo ocurre cuando las condiciones son óptimas para que haya un alto nivel de éxito de conjugación. Por ejemplo, se puede pensar que el terminador se forma bajo condiciones fisiológicas que no son adecuadas para este proceso. En segundo lugar, se podría pensar que un producto del operón de conjugación induce la formación del terminador. Así, se asegura que solo se produce la cantidad de proteínas adecuadas para hacer la conjugación. Los resultados preliminares obtenidos a partir de experimentos diseñados para estudiar la segunda hipótesis sugieren que pueda tratarse de la correcta. El indicio que apunta a esta posibilidad es que la estirpe con pLS20 no acumulaba prácticamente GFP cuando llegaba a la fase estacionaria, mientras que las estirpes con pLS20 Δ 28 y sin plásmido si lo hacían, lo que indicaba que podría haber algo en el operón de conjugación capaz de promover la activación del terminador. En el caso de tratarse de la hipótesis correcta, sería de esperar un modelo

como el que se ilustra en la **Figura 13bi**, en el que una proteína del operón de conjugación podría interactuar al RNA, provocando la formación del terminador. Sin embargo, análisis *in silico* (no mostrados) indican que en el operón de conjugación no se codifican proteínas con dominios de unión a ácidos nucleicos, al menos entre los descritos actualmente. En cualquier caso, se trata de resultados preliminares. Son necesarios más estudios a la par que es necesario investigar la primera hipótesis, por ejemplo, estudiando como varían los niveles de fluorescencia cuando las células se crecen en distintas condiciones. En ella, se podrían encuadrar varios de los sistemas de atenuación transcripcional propuestos en la **Figura 13**, por ejemplo, mediante la unión de proteínas inducidas por estrés térmico (**bi**) o de metabolitos pequeños derivados de otros tipos de estrés (**di**). Aunque no se ha llegado a desentrañar completamente el mecanismo de este sistema, si se han obtenido resultados muy convincentes de que el operón de conjugación de pLS20 está bajo el control de un sistema de atenuación transcripcional, que como se ha mencionado anteriormente es algo totalmente nuevo.

Resultaría de gran interés determinar el mecanismo bajo el cual se rige el funcionamiento de este atenuador, ya que permitiría el desarrollo de mecanismos para intervenir sobre el mismo. De esta forma, se podría interferir sobre el proceso de conjugación, que como se menciona en la introducción es la ruta principal a través de la cual se diseminan los genes de resistencia a antibióticos.

7. CONCLUSIONES

- La transcripción del operón de conjugación del plásmido pLS20 está regulada por un sistema de atenuación transcripcional, presente en la 5' UTR del gen 28.
- El atenuador transcripcional está formado por un terminador, Ter_{up28} , que se encuentra inactivo en su emplazamiento nativo.
- La región ubicada 123 pb aguas arriba del Ter_{up28} es la responsable de su inactivación al secuestrar parte de la estructura que forma el bucle en horquilla del terminador.
- Posiblemente, algún derivado del operón de conjugación sea el responsable de estabilizar la estructura alternativa en la que se forma el terminador.
- La identificación del agente responsable de este "switch" y el desarrollo de compuestos capaces de imitar esta función podría suponer un paso importante en la elaboración de terapias dirigidas a evitar la diseminación de genes de resistencia a antibióticos por conjugación.
- El rol biológico de este atenuador podría estar relacionado con mantener la expresión del operón de conjugación una ventana de tiempo limitada.

8. BIBLIOGRAFÍA

Bullock, W.O., Fernandez, J.M. and Short, J.M. (1987). XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* Escherichia coli with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5. pp.376-379.

Gogarten, M., Gogarten, J. and Olendzenski, L. (2009). *Horizontal gene transfer*. 1st ed. New York: Springer, pp.397-411.

- Kunst, F., Ogasawara, M., Moszer, I., Alberini, A.M., Alloni, G., et al. (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390 pp 249-256
- Koehler, T. and Thorne, C. (1987). *Bacillus subtilis* (natto) plasmid pLS20 mediates interspecies plasmid transfer. *Journal of Bacteriology*, 169(11), pp.5271-5278.
- C. Lee Ventola, M. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis Part 1: Causes and Threats. *P&T*, 40(4).
- Martinez, J. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*, 11, pp.33-39.
- Merino, E. and Yanofsky, C. (2005). Transcription attenuation: a highly conserved regulatory strategy used by bacteria. *Trends in Genetics*, 21(5), pp.260-264.
- Naville, M. and Gautheret, D. (2009). Transcription attenuation in bacteria: theme and variations. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 8(6), pp.482-492.
- O'Neill, J. (2016). *Tackling drug-resistant infections globally*. 1st ed.
- Tanaka T, Kuroda M, Sakaguchi K (1977). *Isolation and characterization of four plasmids from Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 129: 1487–1494.
- Sabtu, N., Enoch, D. and Brown, N. (2015). Antibiotic resistance: what, why, where, when and how?. *British Medical Bulletin*, 116, pp(105-113).
- Sambrook J., Fritsch E. F., and Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Singh, P., Ramachandran, G., Ramos-Ruiz, R., Peiró-Pastor, R., Abia, D., Wu, L. and Meijer, W. (2013). Mobility of the Native *Bacillus subtilis* Conjugative Plasmid pLS20 Is Regulated by Intercellular Signaling. *PLoS Genetics*, 9(10), p.e1003892.
- Singh, P. and Meijer, W. (2014). Diverse regulatory circuits for transfer of conjugative elements. *FEMS Microbiology Letters*, 358(2), pp.119-128.
- von Wintersdorff, C., Penders, J., van Niekerk, J., Mills, N., Majumder, S., van Alphen, L., Savelkoul, P. and Wolffs, P. (2016). Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- World Health Organization. (2017). *Antibiotic resistance*. [online] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/> [Último acceso 4 Jun. 2017].
- World Health Organization. (2017). *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed*. [online] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/> [Último acceso: 4 Jun. 2017].

9. MATERIAL COMPLEMENTARIO

Tabla 1. Plásmidos empleados		
Plásmido	Descripción	Referencia
pLS20cat y derivados		
pLS20cat	Derivado del plásmido pLS20 de <i>B. subtilis</i> natto en el que se ha clonado el gen de resistencia a cloranfenicol procedente del plásmido pC194 (cloranfenicol acetil transferasa, <i>cat</i>) en la diana única <i>Sall</i>	Stock del laboratorio
pLS20catΔ28	Derivado de pLS20cat en que se ha deleciónado el gen 28	Stock del laboratorio
pLS20catΔAt _{up28}	Derivado de pLS20cat con la región del atenuador 143 pb) de la 28 5' UTR deleciónada	Elaboración propia
pLS20catΔTer _{up28}	Derivado de pLS20cat con la región del terminador (54 pb) de la 28 5' UTR deleciónada	Elaboración propia
pLS20catΔ5'At _{up28}	Derivado de pLS20cat con la región del aguas arriba del terminador (74 pb) de la 28 5' UTR deleciónada	Elaboración propia
pDR110sfgfp y derivados		
pDR110sfgfp	Vector de integración en el locus <i>amyE</i> del genoma de <i>B. subtilis</i> . Presenta el origen de replicación Cole1 en <i>E. coli</i> , <i>amp^R</i> , y el casete de integración: <i>amyEL-spec^R-P_{spank}-MCS-sfgfp-lacI-amyER</i>	Stock del laboratorio
pDGA01	Derivado de PCR110sfgfp con el fragmento F2 incorporado en el MCS	Elaboración propia
pDGA02	Derivado de PCR110sfgfp con el fragmento F3 incorporado en el MCS	Elaboración propia
pDGA03	Derivado de PCR110sfgfp con el fragmento F4 incorporado en el MCS	Elaboración propia
pDGA04	Derivado de PCR110sfgfp con el fragmento F5 incorporado en el MCS	Elaboración propia
pDGA05	Derivado de PCR110sfgfp con el fragmento F1 incorporado en el MCS	Elaboración propia
pDGA06	Derivado de PCR110sfgfp con el fragmento F1* incorporado en el MCS	Elaboración propia
pDGA07	Derivado de PCR110sfgfp con el fragmento F6 incorporado en el MCS	Elaboración propia
pDGA08	Derivado de PCR110sfgfp con el fragmento F2A incorporado en el MCS	Elaboración propia
pDGA13	Derivado de PCR110sfgfp con el fragmento F2B incorporado en el MCS	Elaboración propia
pDGA15	Derivado de PCR110sfgfp con el fragmento F2C incorporado en el MCS	Elaboración propia
pDGA17	Derivado de PCR110sfgfp con el fragmento F2D incorporado en el MCS	Elaboración propia
pDGA18	Derivado de PCR110sfgfp con el fragmento F2E incorporado en el MCS	Elaboración propia
pMiniMad2 y derivados		
pMiniMad2	Vector para eliminar o introducir secuencias del DNA sin dejar cicatriz alguna en el genoma o plásmidos de <i>B. subtilis</i> . . Replica en <i>E. coli</i> basado en el origen de replicación de pUC19 (resistencia a ampicilina).	Stock del laboratorio

	También es capaz de replicar en <i>B. subtilis</i> (resistencia a eritromicina) pero solo a temperatura baja (25 °C) dado que está basado en el sistema de replicación del plásmido tipo circulo rodante de pE194 en que el gen de replicación tiene una mutación causando que la proteína codificante sólo es funcional a temperatura baja.	
pDGA09	Derivado de pMiniMad2 con la secuencia para delecionar el atenuador de la 28 5' UTR incorporado en el MCS	Elaboración propia
pDGA12	Derivado de pMiniMad2 con la secuencia para delecionar la región aguas arriba del terminador de la 28 5' UTR incorporado en el MCS	Elaboración propia
pDGA16	Derivado de pMiniMad2 con la secuencia para delecionar el terminador de la 28 5' UTR incorporado en el MCS	Elaboración propia

Tabla 2. Estirpes utilizadas		
Estirpe	Propiedades	Referencia
<i>E. coli</i>		
XL1-Blue	F'::Tn, <i>proA+B+</i> , <i>lacIq</i> , $\Delta(lacZ)M15$, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> (<i>Nalr</i>), <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> , (<i>rk-mk+</i>), <i>supE44</i>	(Bullock <i>et al.</i> , 1987)
K12 JM101	F', <i>traD36</i> , <i>proA⁺B⁺</i> , <i>lacIq</i> , $\Delta(lacZ)M15$, $\Delta(lac-proAB)$, <i>glnV</i> , <i>thi</i>	Stock del laboratorio
<i>B. subtilis</i>		
168	Especie silvestre secuenciada. <i>trpC2</i> .	(Kunst <i>et al.</i> , 1997)
PKS11	Estirpe 168 con pLS20cat	Stock del laboratorio
PKS11Δ28	Estirpe 168, pLS20cat Δ 28 (no conjugativa)	Stock del laboratorio
PKS9	Estirpe 168, <i>amyE::P_{spank}-rco_{LS20}-spec</i> , pLS20cat	Stock del laboratorio
PKS7	Estirpe 168, <i>lacA::Em</i>	Stock del laboratorio
PS110	Estirpe 168, <i>amyE::spec</i>	Stock del laboratorio
DGA01	Estirpe 168 transformada con pDGA01, doble recombinante. Genotipo: 168, <i>amyE::P_{spank}-F2-sfgfp-lacI-spec^R</i>	Elaboración propia
DGA02	Estirpe 168 transformada con pDGA02, doble recombinante. Genotipo: 168, <i>amyE::P_{spank}-F3-sfgfp-lacI-spec^R</i>	Elaboración propia
DGA03	Estirpe 168 transformada con pDGA03, doble recombinante. Genotipo: 168, <i>amyE::P_{spank}-F4-sfgfp-lacI-spec^R</i>	Elaboración propia
DGA04	Estirpe 168 transformada con pDGA04, doble recombinante. Genotipo: 168, <i>amyE::P_{spank}-F5-sfgfp-lacI-spec^R</i>	Elaboración propia

DGA05	Estirpe 168 transformada con pDGA05, doble recombinante. Genotipo: 168, <i>amyE::P_{spank}-F1-sfgfp-lacI-spec^R</i>	Elaboración propia
DGA06	Estirpe 168 transformada con pDGA06, doble recombinante. Genotipo: 168, <i>amyE::P_{spank}-F1*-sfgfp-lacI-spec^R</i>	Elaboración propia
DGA09	Estirpe PKS11Δ28 transformada con pDGA03, doble recombinante. Genotipo: PKS11Δ28, <i>amyE::P_{spank}-F4-sfgfp-lacI-spec^R</i>	Elaboración propia
DGA19	Estirpe 168 transformada con pDGA07, doble recombinante. Genotipo: 168, <i>amyE::P_{spank}-F6-sfgfp-lacI-spec^R</i>	Elaboración propia
DGA20	Estirpe 168 transformada con pDGA13, doble recombinante. Genotipo: 168, <i>amyE::P_{spank}-F2A-sfgfp-lacI-spec^R</i>	Elaboración propia
DGA21	Estirpe 168 transformada con pDGA15, doble recombinante. Genotipo: 168, <i>amyE::P_{spank}-F2B-sfgfp-lacI-spec^R</i>	Elaboración propia
DGA22	Estirpe 168 transformada con pDGA18, doble recombinante. Genotipo: 168, <i>amyE::P_{spank}-F2C-sfgfp-lacI-spec^R</i>	Elaboración propia
DGA25	Estirpe PKS11 transformada con pDGA03, doble recombinante. Genotipo: PKS11, <i>amyE::P_{spank}-F4-sfgfp-lacI-spec^R</i>	Elaboración propia
DGA35	Genotipo: 168, <i>amyE::P_{spank}-rco</i> , pLS20ΔAt _{up28}	Elaboración propia
DGA36	Genotipo: 168, <i>amyE::P_{spank}-rco</i> , pLS20catΔ5'At _{up28}	Elaboración propia
DGA37	Genotipo: 168, <i>amyE::P_{spank}-rco</i> , pLS20catΔTer _{up28}	Elaboración propia
DGA38	Estirpe 168 transformada con pDGA17, doble recombinante. Genotipo: 168, <i>amyE::P_{spank}-F2D-sfgfp-lacI-spec^R</i>	Elaboración propia
DGA39	Estirpe 168 transformada con pDGA18, doble recombinante. Genotipo: 168, <i>amyE::P_{spank}-F2E-sfgfp-lacI-spec^R</i>	Elaboración propia
DGA40	168, pLS20catΔAt _{up28} (Estirpe PS110 en la que se ha introducido pLS20catΔAt _{up28} por conjugación desde DGA35)	Elaboración propia
DGA41	168, pLS20catΔ5'At _{up28} (Estirpe PS110 en la que se ha introducido pLS20catΔ5'At _{up28} por conjugación desde DGA36)	Elaboración propia
DGA42	168, pLS20catΔTer _{up28} (Estirpe PS110 en la que se ha introducido pLS20catΔTer _{up28} por conjugación desde DGA37)	Elaboración propia

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados. En negrita se muestran las extensiones de los oligonucleótidos, en rojo las dianas de restricción, subrayadas las mutaciones y en formato estándar la parte que hibrida con la secuencia molde. Dentro de “objetivo” se explica el uso al que se han destinado y, entre paréntesis, si son “Forward” (F) o “Reverse” (R)

Nombre	Secuencia (orientación 5'-3')	Objetivo
oDG01	AGCTAATTTGGAGCTGTCTAGACTAA CTGACAGCTTTTTTTGTTGTCTTTACA C	Generar por hibridación F1 (F)
oDG02	CTAGGTGTAAGACAACAAAAAAG CTGTCAGTTAGTCTGACAGCTCCAAA TT	Generar por hibridación F1 (R)
oDG03	TTTTAAGCTTGATATAGCTCACAGTG AAAGTTAGTGTG	Clonar F2 y F2B (F)
oDG04	TTTTAAGCTTGTCAGTTAATAATAAG TTTAGTAAAAACAGG	Clonar F3 (F)
oDG05	TTTTAAGCTTAAGAGTCAGTGAAAA AAATGCAGAATAAGG	Clonar F4, F5 y F6 (F)
oDG06	TTTTGCTAGCCCTAAATTTTCAATCA GTGTAAAGACAAC	Clonar F2, F2A, F3 y F4 y generar el molde para clonar F2A y F2C (R)
oDG09	TTTTGCTAGCCAAATTGATAAACATA CATCCA	Clonar F5 (R)
oDG10	TTTTGCTAGCAAGTTCACACTAACTT TCACTGTGAGCT	Clonar F6 (R)
oDG11	TTTTAAGCTTGCTGTATCTTAGTG AAAGAGTCAGTGAAAAAATGCAG	Generar los fragmentos híbridos para delecionar el terminador, el atenuador y la secuencia aguas arriba al mismo y amplificarlos (PCR _L , F)
oDG12	GGCAAGTTCACACTAACTTTCACTGT GAGCT	Generar los fragmentos híbridos para delecionar el atenuador y la secuencia aguas arriba al mismo (PCR _L , R)
oDG13	CCAAATTGATAAACATACATCCAAAT G	Generar los fragmentos híbridos para delecionar el terminador (PCR _L , T)
oDG14A	GTGAAAGTTAGTGTGAACCTGCCTT TAGGGAGGGAATAGCTTGGCTAAA GTT	Generar los fragmentos híbridos para delecionar el atenuador (PCR _R , F)
oDG14B	GGATGTATGTTTATCAATTTGGTTTA GGGAGGGAATAGCTTGGCTAAAGTT	Generar los fragmentos híbridos para delecionar el terminador (PCR _R , F)
oDG15	GTGAAAGTTAGTGTGAACCTGCCTA TGTTTATCAATTTGGAGCTGTCTAGAC TAAC	Generar los fragmentos híbridos para delecionar el terminador, el atenuador y la secuencia aguas arriba al mismo y amplificarlos (PCR _R , F)
oDG18A	CAGTGAAACTTACTGTCAACTTGCCC CATTTATTGTATTCATACATC	Generar el molde para clonar F2A y F2C (F)
oDG18B	TTTTAAGCTTGATATAGCTCACAGTG AACTTACTGTCAACTTGCCCC	Clonar F2A y F2C (F)
oDG19	TTTTGCTAGCCCTAAATTTTCAATCA GTGTAAATATAAGAAAAAAGCTGT CAGTTAGTCTG	Clonar F2B y F2C (R)
oDG23	TTTTAAGCTTGCCCCATTTATTGTATT CATACATCATTTTAGCTTTA	Clonar F2D (F)
oDG24	TTTTAAGCTTTAAAAGAGAGGCATC TTTTGAAGTAAAATTCATTTGG	Clonar F2E (F)
pDR111_U_use q	TGACTTTATCTACAAGGTGTGGC	Comprobar tamaño de fragmentos por PCR colonial (F) y secuenciar insertos en pDR110sfgfp

oSeqpPKSGFP_DN	TTCCGGCATGGCGGACTTGAAGAAG TC	Comprobar tamaño de fragmentos por PCR colonial (R) y secuenciar insertos en pDR110sfgrp
M13_Fw-21_ext	ACGTTGTAAAACGACGGCCAGTG	Comprobar tamaño de fragmentos por PCR colonial (F) y secuenciar insertos en pMiniMad2
M13RevExt	CACAGGAAACAGCTATGACCATG	Comprobar tamaño de fragmentos por PCR colonial (R) y secuenciar insertos en pMiniMad2
oRG17	TTTTGGATCC GGATGACAAACGATA GCAATGCCTCTGCTTGTG	Generar los fragmentos híbridos para delecionar el terminador, el atenuador y la secuencia aguas arriba al mismo y amplificarlos (PCR _L , R)

Tabla 4. Enzimas utilizados			
Enzima	Casa comercial	Actividad	Material asociado
<i>HindIII</i> -HF	NEB	Endonucleasa con diana A'AGCTT (extremos cohesivos)	Tampón CutSmart®
<i>NheI</i> -HF	NEB	Endonucleasa con diana G'CTAGC (extremos cohesivos)	Tampón CutSmart®
<i>SpeI</i> -HF	NEB	Endonucleasa con diana A'CTAGT (extremos cohesivos)	Tampón CutSmart®
<i>BamHI</i> -HF	NEB	Endonucleasa con diana G'GATCC (extremos cohesivos)	Tampón CutSmart®
T4 ligasa	NEB	DNA ligasa	T4 ligase Buffer®
Vent	NEB	DNA polimerasa, 3'-5' exonucleasa	dNTPs, Vent pol buffer®
Taq	BIOTOOLS	DNA polimerasa, 5'-3' exonucleasa	dNTPs, Taq pol buffer®, MgCl ₂