

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
Facultad de Medicina
Departamento de Biología Molecular



Estudio de la red de regulación global de R388

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por
Irene del Campo Gutiérrez
Santander, Enero 2016

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria, bajo la dirección del Catedrático Fernando de la Cruz Calahorra, gracias a una beca predoctoral FPI (de Formación de Personal Investigador) concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia durante los años 2006-2010.

D. **Fernando de la Cruz Calahorra**, Catedrático de Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria,

CERTIFICA: Que Dña. **Irene del Campo Gutiérrez** ha realizado bajo mi dirección el trabajo que lleva por título “Estudio de la red de regulación global de R388”.

Considero que dicho trabajo se encuentra terminado y reúne los requisitos necesarios para su presentación como Memoria de Doctorado, al objeto de poder optar al grado de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Santander, 22 de Enero de 2016

Fdo. Fernando de la Cruz Calahorra

AGRADECIMIENTOS

Durante estos años ha pasado mucha gente por el laboratorio y cada uno de ellos ha aportado su granito de arena a este trabajo. Por ello sería muy largo dar las gracias uno a uno y, con lo despistada que soy yo seguro que me dejo a alguien importante, así que a todos vosotros os digo: ¡muchas gracias!

Eso sí, no puedo pasar sin destacar a las personas que con las que he compartido trabajo y que son responsables directas de que esta tesis haya salido adelante. Raúl, mi jefecillo para la familia, que además de un gran compañero ha sido casi como un codirector de tesis. Ana, que sin ella nunca hubiera acabado este trabajo, por su ayuda, por sus ánimos, por todo. Carlos y Lillo, compartir trabajo (y penas) con ellos ha sido un placer. Fernando (el jefe supremo para la familia) por su ayuda y paciencia, que mira que hace años que empezamos con esto. Yera por las jornadas maratónicas de laboratorio compartidas, por todas las conversaciones y cervezas. Y, por supuesto, a Mapi que siempre está ahí para todo lo que haga falta, desde darte de comer hasta describirte todos los plásmidos del mundo. He tenido la suerte de compartir el trabajo con ellos, de tenerles siempre dispuestos para ayudarme y compartir buenos momentos tanto profesionales como personales. Gracias, de verdad.

Venga va, antes de que me riñan, a mis chicas del café que aunque ya deberían saber ellas que tengo mil cosas por las que darles las gracias, sé que Sheila lo primero que va a mirar de la tesis es esta página. Y a mi familia, que no tengo ni que decírselo, pero si no fuese por ellos esto ni siquiera habría empezado.

A mi familia

INTRODUCCIÓN	3
1. CONJUGACIÓN BACTERIANA Y PLÁSMIDOS	3
1.1. Transferencia genética horizontal	3
1.2. La conjugación bacteriana	5
1.3. Plásmidos y grupos de incompatibilidad	8
1.4. El esqueleto IncW	13
1.5. El plásmido R388 como prototipo de la familia IncW	15
2. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL	18
2.1. Motivos de red (Alon, 2007)	18
2.2. Redes de regulación en plásmidos	23
2.3. Estudio de la regulación transcripcional de R388	25
3. MEDIDA DE LA EFICIENCIA DE CONJUGACIÓN	29
OBJETIVOS	35
MATERIALES Y MÉTODOS	39
A. MATERIALES	39
1. CEPAS	39
2. MEDIOS DE CULTIVO, SELECCIÓN Y CONSERVACIÓN	40
3. OLIGONUCLEÓTIDOS	41
4. PLÁSMIDOS	43
B. MÉTODOS	47
1. MÉTODOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR	47
1.1. Extracción y purificación de DNA	47
1.2. Transformación	47
1.3. Amplificación de DNA: PCR	48
1.4. Digestiones enzimáticas	49
1.5. Ligaciones	49
1.6. Secuenciación de DNA	50
1.7. Electroforesis de DNA	50
1.8. Fijación de células	51
2. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS	51
3. MÉTODO DE WANNER Y DATSENKO	53
4. CONJUGACIONES	55
4.1. Conjugaciones en filtro	55
4.2. Conjugaciones en placa	55
5. ENSAYOS CON FLUORESCENCIA	56
5.1. Determinación de la actividad transcripcional	56
5.2. Citometría de flujo	58
6. ENSAYOS DE ESTABILIDAD	59

7. MEDIDA DEL NÚMERO RELATIVO DE COPIAS DE PLÁSMIDO	60
8. TEORÍA: ESTIMACIÓN DE LA TASA DE CONJUACIÓN A TIEMPO FINAL (γ)	61
9. OBTENCIÓN DE CURVAS DE CRECIMIENTO Y CÁLCULO DEL TIEMPO DE GENERACIÓN	63
10. PURIFICACIÓN DE ResP DE R388	64
11. ENSAYOS DE RETARDO EN GEL CON RESP (EMSA)	65
RESULTADOS	69
1. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL PLÁSMIDO R388	69
1.1. Determinación de la actividad transcripcional de los promotores de R388	69
1.2. Actividad de los promotores en presencia de R388	73
1.3. Obtención de un sistema de expresión controlada para los reguladores	75
1.4. Búsqueda combinatoria de reguladores transcripcionales en R388	77
1.5. Deleciones de R388	82
1.6. Aproximación a la caracterización de <i>resP</i>	85
1.7. Efecto de perturbaciones ambientales en la red	91
1.8. Actividad de los promotores en presencia de otros plásmidos genéticamente parecidos a R388	97
2. APROXIMACIÓN AL ESTUDIO DEL FENOTIPO DE LOS IncW	100
2.1. Funcionamiento de la replicación: medida del número de copias por cromosoma.	100
2.2. Ensayos de estabilidad del plásmido R388, plásmidos IncW y derivados R388	102
2.3. Ensayos de conjugación	106
3. SISTEMATIZACIÓN DE LA MEDIDA DE LA CONJUGACIÓN	112
3.1. Puesta a punto de un ensayo de conjugación en el citómetro	112
3.2. Estimación de la cinética de conjugación del <i>oriT</i> de R388	117
3.3. Medida de la conjugación de plásmidos modelo por citometría	121
3.4. Comparación de la capacidad de propagación de los plásmidos modelo	124
DISCUSIÓN	131
1. LA RED DE REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE R388	131
2. EFECTO DE LA VARIACIÓN EN EL GENOMA DE LOS IncW EN LA REGULACIÓN Y EL FENOTIPO	138
3. MEDIDA DE LA CONJUGACIÓN EN EL CITÓMETRO	140
CONCLUSIONES	145
BIBLIOGRAFÍA	149
ANEXO PUBLICACIONES	159



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. CONJUGACIÓN BACTERIANA Y PLÁSMIDOS

1.1. Transferencia genética horizontal

La transferencia genética horizontal (HGT) se define como la transmisión no-genealógica de material genético de un organismo a otro (Goldenfeld & Woese, 2007). Constituye un fenómeno más versátil que la propia reproducción ya que puede producirse entre organismos que no se encuentren estrechamente emparentados evolutivamente hablando, por lo que hace accesible al individuo gran cantidad de información genética más allá del acervo genético propio de su especie. Debido a esta versatilidad, la HGT constituye un fenómeno significativo, con gran importancia desde el punto de vista genético, ecológico y evolutivo.

La HGT puede tener lugar entre distintos reinos en una u otra dirección, habiéndose descrito este proceso entre bacterias (Jain, *et al.*, 1999), desde bacterias a arqueas y viceversa (Rest & Mindell, 2003) (Gophna, *et al.*, 2004), desde arqueas a eucariotas (Andersson, *et al.*, 2005), desde bacterias a eucariotas (Watkins & Gray, 2006), desde eucariotas a bacterias (Guljamow, *et al.*, 2007) e incluso entre eucariotas (Nedelcu, *et al.*, 2008).

Sin embargo, es en el mundo procariota donde los fenómenos de HGT cobran especial importancia ya que contribuye a generar la diversidad genética de la que este reino carecería por la falta de sexualidad, constituyendo el principal mecanismo de evolución de los genomas como se deduce de los análisis filogenéticos (Jain, *et al.*, 1999). Por tanto, la presencia de procesos HGT tiene un papel importante en los fenómenos de adaptación, especiación y evolución bacteriana (Gogarten & Townsend, 2005). La existencia de este flujo de información genética, por ejemplo, permite a los procariotas compartir un pangenoma manteniendo un pequeño “core” genómico conservado dentro de cada especie (Tettelin, *et al.*, 2008). Hay datos que indican que hasta un 24% del genoma de *E.coli* se ha obtenido por transferencia genética horizontal (Lawrence & Ochman, 2002).

Desde un punto de vista aplicado, hoy en día la HGT cobra especial importancia debido a que estos mecanismos son responsables de la diseminación de los genes de resistencia a antibióticos algo que actualmente se ha convertido en un importante problema de salud a nivel mundial (de la Cruz & Davies, 2000).

Existen tres mecanismos principales por los que tiene lugar la HGT en el mundo bacteriano que se resumen en la figura I1. Son los siguientes:

* **Transformación.** Se refiere a la entrada de DNA libre desde el medio ambiente a la célula. La transformación no es un fenómeno ubicuo pero se produce de forma natural en muchos géneros bacterianos (*Acinetobacter*, *Synechocystis*, *Bacillus*, *Neisseria*, o *Helicobacter*). Para que tenga lugar, las bacterias deben estar en un estado de competencia que puede ser inducido bajo ciertas condiciones ambientales. La recombinación homóloga entre el DNA transformado y el genoma de la bacteria pueden conducir a la adquisición de un nuevo fenotipo.

* **Conjugación.** Este proceso implica la transferencia de DNA (normalmente DNA plasmídico) de una célula a otra mediante la formación de una estructura proteica entre ambas llamada pilus conjugativo. Este mecanismo se explica con más detalle en el apartado 2 de la introducción.

* **Transducción.** Es la transferencia de DNA mediante la infección por un bacteriófago. En condiciones normales el fago solo contiene DNA vírico pero en ocasiones, cuando se encapsidan los nuevos fagos, DNA del huésped es empaquetado en la cápsida vírica dando lugar a un fago que transporta DNA bacteriano. Este fago puede entonces infectar otra célula bacteriana e insertar el DNA celular que por recombinación homóloga puede establecerse en el nuevo genoma bacteriano.

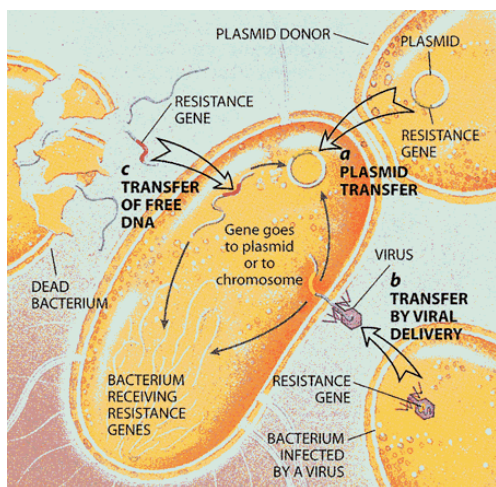


Figura I1. Mecanismos de transferencia genética horizontal.

Se representan en esta figura los tres principales mecanismos por los que se produce intercambio de material genético en el mundo procariota: **1. Transformación.** Captación de DNA libre del entorno. **2. Conjugación.** Paso de una molécula de DNA entre dos células que están en contacto. **3. Transducción.** Transferencia de DNA por medio de virus bacteriófagos.

Tomada de (Levy, 1998)

Generalmente en los fenómenos de HGT, la transferencia de información genética está mediada por lo que se conoce como “elementos genéticos móviles” (MGEs). La primera referencia a los vehículos de transferencia genética horizontal la encontramos en los años 40, cuando Barbara McClintock descubrió la existencia de genes capaces de saltar de un cromosoma a otro, algo sorprendente porque rompía con el dogma de la genética que predicaba que los cromosomas se heredan como unidades discretas y estables. Por este descubrimiento Barbara McClintock, recibió el premio Nobel en 1983. Distinguimos diferentes tipos de elementos:

- a) Elementos transponibles. Son los “genes saltarines” descubiertos por Barbara McClintock. Son segmentos de DNA capaces de moverse de una localización genómica a otra. Incluye los transposones propiamente dichos y las secuencias de inserción. En muchos casos estas regiones codifican genes de resistencia a antibióticos, a metales pesados, o proteínas de degradación de compuestos xenobióticos.
- b) Plásmidos. Son moléculas de DNA extracromosómico de tamaño variable, que se replican y transmiten de forma independiente al cromosoma. Están presentes principalmente en bacterias, y en algunas ocasiones en organismos eucariotas como las levaduras. La mayoría de los plásmidos son moléculas circulares de DNA de doble cadena, aunque existen algunos casos de plásmidos lineales. Aproximadamente la mitad de los plásmidos descritos en proteobacterias hasta la fecha son capaces de transferirse de unas bacterias a otras, siendo la mitad de ellos conjugativos (son capaces de movilizarse por sí mismos) y la otra mitad movilizables (necesitan de la maquinaria de los plásmidos conjugativos para transferirse) (Smillie, *et al.*, 2010).
- c) Fagos. Los fagos son los virus que infectan a las bacterias. Fueron descubiertos en 1913 por Frederick Twort y son los responsables de los procesos de transducción. A pesar de ser ubicuos, se considera que la aportación que hacen a los fenómenos de transferencia en su globalidad es la menos significativa.

1.2. La conjugación bacteriana

La conjugación bacteriana es un proceso de transferencia genética horizontal mediante el cual se transfiere un plásmido trasmisible desde una célula donadora a una célula receptora a través de un contacto célula-célula mediado por una estructura proteica conocida como *pilus*. Este proceso está muy extendido entre las bacterias y va

más allá del mundo procariota, pudiendo ocurrir incluso entre especies muy alejadas filogenéticamente. Por ejemplo, en condiciones de laboratorio se ha observado transferencia de DNA conjugativo de bacterias a levaduras o a células de plantas (Heinemann & Sprague, 1989). En la naturaleza un buen ejemplo de la versatilidad de este proceso es el sistema de transferencia de DNA del género bacteriano *Agrobacterium* al núcleo de células vegetales, mediante una maquinaria de transferencia muy similar al aparato conjugativo de las bacterias Gram-negativas (Lessl & Lanka, 1994).

Se sabe que la conjugación es el mecanismo de transferencia genética horizontal que en mayor medida contribuye al reservorio de genes móviles en el mundo procariota (De la Cruz y Davies, 2000) (Halary, *et al.*, 2010). El DNA transferido por medio de la conjugación puede recombinar e integrarse en el cromosoma si no es capaz de replicar pero también puede ser autónomo, siendo capaz de replicar en la célula receptora, y entonces no requiere de la existencia de un fenómeno de recombinación posterior para estabilizarse en la célula que recibe la molécula, lo que aumenta la eficiencia de la conjugación con respecto a los otros mecanismos de transferencia genética horizontal. (Guglielmini, *et al.*, 2011)

Las bases moleculares del proceso conjugativo han sido ampliamente estudiadas debido a su importancia biológica. Por un lado este fenómeno presenta importantes implicaciones desde el punto de vista evolutivo constituyendo un mecanismo que genera variabilidad genética; por otro lado contribuye de manera determinante a la diseminación de factores de virulencia (Ziebuhr, *et al.*, 1999) y la propagación de genes de resistencia a antibióticos (Mazel & Davies, 1999). Además, debido al peculiar procesamiento del DNA que tiene lugar en la conjugación, se especula sobre la posibilidad de utilizar los elementos que participan en este mecanismo como herramienta biotecnológica (Llosa & de la Cruz, 2005).

La conjugación bacteriana fue descubierta por Lederberg y Tatum en 1946, cuando al realizar estudios en *E.coli* con diversas auxotrofías observaron que los caracteres podían transmitirse de unas a otras, revertiendo las dobles mutaciones a una frecuencia mucho mayor de lo esperado por procesos puramente mutacionales (Lederberg & Tatum, 1946). Por sus descubrimientos en este campo Tatum y Beadle compartieron con Lederberg el premio nobel de medicina en 1958. El mecanismo subyacente en este fenómeno no se descubrió hasta años después, cuando en 1953 se propuso que esta transmisión estaba asociada a un factor que se denominó F (de fertilidad) (Cavalli, *et al.*, 1953) (Hayes, 1953). Este fue el primer plásmido conjugativo

que se descubrió, y se considera el prototipo de los estudios de conjugación. Pasaron muchos años hasta que se descubrió que la conjugación es un mecanismo extendido en la naturaleza, y que los plásmidos conjugativos están presentes en prácticamente todos los microorganismos conocidos. Actualmente el número de plásmidos conjugativos o movilizables que se descubren sigue creciendo día a día.

Hoy en día, se contempla la conjugación como la asociación de dos mecanismos comunes en el entorno bacteriano, como son la replicación por círculo rodante (RCR) y la presencia de un sistema de secreción de macromoléculas tipo IV (T4SS) (Llosa, *et al.*, 2002). Este modelo, conocido como “*shoot and pump*”, se ha convertido en poco tiempo en el modelo aceptado para explicar este proceso biológico (figura I2). Implica la participación de dos complejos proteicos multifuncionales, codificados por dos *clusters* de genes: el responsable del procesamiento conjugativo del DNA (*Dtr*) y el de formación del pilus conjugativo (*Mpf*); la conexión entre ambos sistemas se produce por medio de la proteína acopladora (T4CP).

El modelo propone que el DNA es transportado a la célula receptora en dos pasos diferenciados. Comienza con el reconocimiento de una secuencia de corte (sitio *nic*) en una cadena del origen de transferencia del plásmido por la proteína conocida como relaxasa, formándose el complejo nucleoproteico denominado relaxosoma en el origen de transferencia. La relaxasa cataliza un corte sitio específico en el sitio *nic* del *oriT* y se queda covalentemente unida al extremo 5' de la cadena cortada. El complejo relaxasa-ssDNA interacciona con la proteína denominada acopladora que actúa como una bomba de DNA y guía la transferencia de la hebra a través del sistema de secreción hasta la célula receptora. (figura I2)

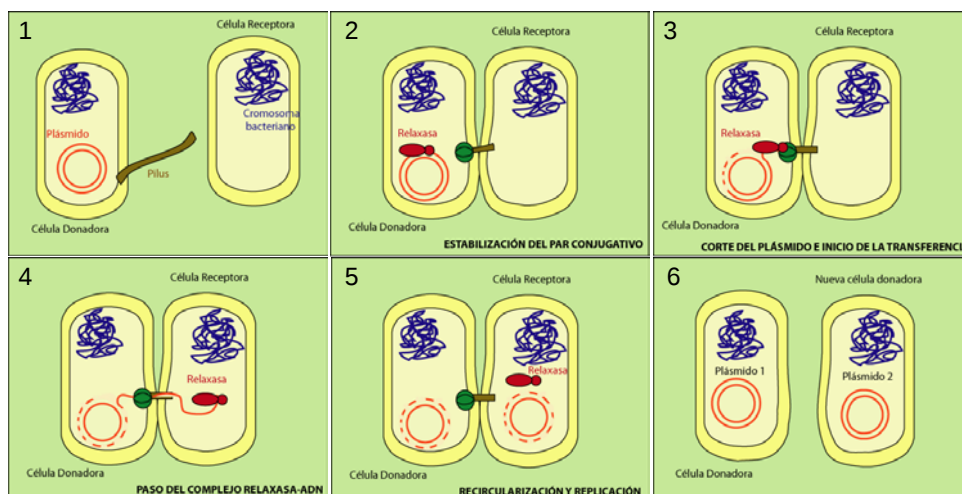


Figura I2. Conjugación bacteriana (modelo “shoot and pump”).

(1) La conjugación comienza cuando se ponen en contacto dos células bacterianas y una de ellas lleva un plásmido conjugativo. (2) Se estabiliza el par conjugativo. (3) La relaxasa corta una cadena del plásmido y se pone en contacto con el sistema de transporte. (4) El complejo covalente relaxasa-ssDNA es transportado a la célula receptora. (5) Se recirculariza el plásmido y se sintetiza la cadena complementaria. También en la célula donadora se sintetiza la hebra desplazada por RCR. (6) Como resultado, cada una de las células se queda con una copia del plásmido original.

A pesar de ser un fenómeno ampliamente estudiado, actualmente aún permanecen sin respuesta varias cuestiones fundamentales sobre el proceso conjugativo como por ejemplo las señales que desencadenan el comienzo de la transferencia conjugativa, la coordinación espaciotemporal del procesamiento del DNA o su reclutamiento hacia el poro conjugativo, etc.

1.3. Plásmidos y grupos de incompatibilidad

El estudio de la conjugación bacteriana ha llevado siempre parejo el estudio de los plásmidos. Como hemos visto, un plásmido es generalmente una molécula circular de DNA extracromosómico de tamaño variable que tiene capacidad de replicación autónoma. Del puñado de plásmidos que se estudiaban inicialmente hemos pasado a más de 6000 totalmente secuenciados. Están presentes en la práctica totalidad de los géneros bacterianos conocidos y presentan una enorme variedad.

Dentro de esta variedad, desde un punto de vista fisiológico los plásmidos comparten una serie de funciones que, aunque no son universales, podemos decir que son comunes. Las funciones que habitualmente se asignan a los plásmidos son:

* **Replicación:** La función de replicación es la función común que comparten todos los plásmidos, de hecho está implícito en su propia definición. En general, los elementos genéticos necesarios para la replicación de un plásmido y el control de su número de copias se encuentran agrupados en una misma región del genoma, a la que se denomina replicón. Diferenciamos tres tipos básicos de mecanismos de replicación: replicación por círculo rodante, replicación por desplazamiento de hebras o replicación Theta (θ) (del Solar, *et al.*, 1998).

* **Mantenimiento estable:** Replicarse dentro del citoplasma de un hospedador a menudo no es suficiente para sobrevivir. La división celular trae consigo el problema de la segregación (hay que dotar a las dos células hijas de copias de plásmido) y para ello los plásmidos han desarrollado varias estrategias. Los plásmidos con bajo número de

copias suelen codificar sistemas de estabilidad destinados a asegurar una correcta segregación entre las células hijas, mientras que los plásmidos con alto número de copias muchas veces confían en una distribución estocástica. Los sistemas de mantenimiento o herencia estable constituyen un conjunto de herramientas moleculares que los plásmidos utilizan para asegurarse de que la probabilidad de que se generen bacterias libres de plásmido en la división celular sea muy baja o de que las pocas que se generen sean eliminadas de la población. Existen tres grupos de mecanismos de herencia estable: los sistemas de resolución de multímeros, los sistemas de adicción molecular y los sistemas de partición activa (Zielenkiewicz & Ceglowski, 2001).

* **Transferencia:** Además de ser capaces de replicarse y mantenerse de forma estable dentro de un hospedador muchos plásmidos son capaces de transferirse, esto es, de pasar de un hospedador a otro. Como ya se ha dicho, el modelo actual del mecanismo conjugativo se basa en la confluencia de dos procesos distintos: un sistema de transporte de macromoléculas y un sistema de movilización del DNA plasmídico. Podemos diferenciar entre plásmidos conjugativos, en los que las proteínas encargadas del proceso de transporte del plásmido son codificadas por él mismo, plásmidos denominados movilizables que solo contienen la región de movilización y utilizan el sistema de secreción codificado por otros plásmidos y plásmidos no movilizables.

Además de estas tres funciones generales, los plásmidos a menudo confieren a sus hospedadores características fenotípicas tales como resistencias a antibióticos o la capacidad de metabolizar compuestos que en determinadas circunstancias constituyen una ventaja adaptativa para células que contienen el plásmido.

Como ya se ha comentado, no todos los plásmidos poseen los mismos sistemas para el desarrollo de sus funciones fisiológicas existiendo plásmidos conjugativos, movilizables o no conjugativos, plásmidos con amplio rango de hospedador o específicos de un solo género o especie bacteriana, plásmidos con alto número de copias o bajo, etc. Por ello, a medida que ha ido aumentando el número de plásmidos conocidos clasificarlos de alguna forma que permita hacer generalizaciones ha sido uno de los problemas fundamentales de la biología de plásmidos.

Los primeros intentos de clasificación de los plásmidos se basaron en su capacidad de conferir al hospedador propiedades como la resistencia a antibióticos, sensibilidad a fagos, o la producción de bacteriocinas. La incapacidad de analizar sus características genéticas hacía imposible distinguir, a comienzos de la investigación en genética bacteriana, más allá de unas pocas características fenotípicas.

El primer criterio aplicado en la clasificación de plásmidos estaba relacionado con la transferencia conjugativa. En sus investigaciones sobre los factores de resistencia a antibióticos Watanabe descubrió que ciertos plásmidos eran capaces de inhibir la transferencia de F cuando coresidían en la misma célula donadora. Suponiendo que ésta era una propiedad fundamental, dividió a los plásmidos en dos grupos (fi+ y fi-) en función de si inhibían o no la fertilidad del plásmido F (Watanabe, 1963). Más adelante Meynell y Datta demostraron que esta característica estaba relacionada con el tipo de *pili* sexual que producía el plásmido (Datta, *et al.*, 1966), designando los dos primeros grupos de incompatibilidad: la clase F (fi+) y la clase I (fi-). La aparición de nuevos tipos de *pili* sexual y el descubrimiento de plásmidos no conjugativos hicieron que la clasificación basada en la inhibición de la fertilidad de F quedase obsoleta, por lo que se buscó un método alternativo.

Se definió entonces el término incompatibilidad, para designar la incapacidad de ciertos plásmidos de coresidir en el mismo hospedador. Se suponía que la incompatibilidad era un signo de proximidad: la presencia de mecanismos comunes de control de la replicación o de partición hacen que dos plásmidos sean incompatibles. La clasificación basada en la incompatibilidad fue desarrollada principalmente por Datta y Hedges a comienzo de los años 1970s. Aquellos plásmidos que resultaban ser incompatibles entre sí se asignaron a un mismo grupo de incompatibilidad, llegando a establecerse hasta 27 grupos de incompatibilidad en enterobacterias, 14 en *Pseudomonas* y unos 15 en *Staphylococcus* (Shintani, *et al.*, 2015).

Que dos plásmidos incompatibles tienden a ser más cercanos es una regla que generalmente se cumple, no obstante, el fenómeno de la incompatibilidad es complejo: los mecanismos por los que se produce son variados y en ocasiones mutaciones puntuales en los orígenes de replicación hacen a dos plásmidos compatibles, aunque compartan una extensa identidad de secuencia (Wilson & Figurski, 2002). Los problemas asociados con la definición de plásmidos incompatibles (distintos mecanismos de incompatibilidad, exclusión de superficie, plásmidos con varios replicones, etc...) y sus dificultades técnicas, han hecho que el método tradicional de clasificación esté actualmente en desuso, habiendo sido sustituido por el tipado del replicón o la comparación directa entre las secuencias de DNA (Couturier, *et al.*, 1988). No obstante, la terminología de grupos de incompatibilidad sigue siendo usada habitualmente en la literatura, especialmente en aquellos grupos en los que existe una buena correlación entre la identidad de secuencia y el grupo de incompatibilidad (grupos IncF, IncP, IncN, IncW, etc...).

El complejo IncF

El complejo IncF comprende siete grupos de incompatibilidad (IncFI-IncFVII) que agrupan una serie de plásmidos propios de enterobacterias. Originalmente formaron un único grupo de incompatibilidad, debido a que todos mostraban sensibilidad a los mismos fagos. Dicha sensibilidad está producida por el *pilus* conjugativo, por lo que todos los plásmidos del complejo de F comparten un sistema conjugativo común. El *pilus* sexual producido por los plásmidos F es flexible y fino, retráctil y capaz de mediar la conjugación en medio líquido. Poseen sistemas *Dtr* similares a los de los grupos de incompatibilidad IncN e IncW.

Respecto al resto de caracteres, los plásmidos de tipo F constituyen un conjunto heterogéneo y, con la salvedad de los grupos IncFI e IncFII, poco caracterizado. Su mecanismo de replicación es variable, pudiendo tener más de un replicón, y lo mismo ocurre con los sistemas de herencia estable.

El grupo de incompatibilidad IncN

La clase IncN comprende varios plásmidos de amplio rango de hospedador que comparten una gran homología de secuencia (Konarska-Kozłowska & Iyer, 1983) y que tienen un sistema conjugativo muy similar al de los plásmidos IncW, aunque difieren de estos en sus funciones de replicación y herencia estable. La replicación de los plásmidos IncN es de tipo Theta, su prototipo, pCU1, contiene tres orígenes de replicación distintos, uno *pol-I* dependiente y otros dos independientes (Zoueva, *et al.*, 2003). No se ha descrito ningún sistema de partición activa, aunque cuentan con un sistema de adición molecular de tipo C (*ccgC*) (Belogurov, *et al.*, 1992) y un sistema de resolución de multímeros del grupo de las serín-recombinasas (*per*). Además, en pKM101 se ha descrito la participación en estabilidad del locus *stbABC* (Paterson, *et al.*, 1999)

El grupo de incompatibilidad IncP

El grupo de incompatibilidad IncP de enterobacterias, que se corresponde con el grupo IncP-1 en *Pseudomonas*, comprende una gran cantidad de plásmidos de amplio rango de hospedador. En este grupo se han descrito actualmente hasta doce subdivisiones (α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , θ , κ) (Norberg, *et al.*, 2014) aunque las más estudiadas son IncP α e IncP β , cuyos representantes principales son RP4/RK2 y R751, respectivamente. Ambas subfamilias comparten los mecanismos de replicación, partición y transferencia, presentando diferencias en los transposones y marcadores de

resistencia que portan así como en algunas funciones de la región de herencia estable (Schluter, *et al.*, 2007).

Los plásmidos IncP son capaces de replicar en la práctica totalidad de las bacterias Gram-negativas, siendo capaces de transferirse por conjugación a bacterias Gram-positivas y a células eucariotas (Heinemann & Sprague, 1989). Sus mecanismos de replicación, partición, transferencia y red de regulación han sido exhaustivamente estudiados, por lo que constituyen uno de los grupos de incompatibilidad mejor conocidos. Tienen un bajo número de copias (5-7) y su replicón es de tipo Theta pol-independiente. Los plásmidos IncP α poseen sistemas de partición activa, resolución de multímeros y adicción molecular, mientras que los IncP β carecen de los dos últimos sistemas. En cuanto a su sistema de transferencia, los plásmidos IncP codifican un *pilus* sexual grueso y rígido, y solo conjugan con buena eficiencia sobre medio sólido. (Bradley, 1980)

El grupo IncW

Los plásmidos IncW toman su nombre de su descubridor, T. Watanabe, quien describió el primer miembro de este grupo, el plásmido pSa (Watanabe, *et al.*, 1968).

El grupo de incompatibilidad IncW engloba dos tipos básicos de plásmidos que, además de mantener un sistema común de replicación (y probablemente por ello ser incompatibles) tienen poco que ver a nivel evolutivo. Por un lado encontramos plásmidos “tipo pSa/R388”, que mantienen una identidad de secuencia cercana al 100% en el armazón genético básico, diferenciándose en los transposones y secuencias de inserción presentes en sus genomas. Por otro lado encontramos plásmidos cuya homología respecto a R388 se restringe a la proteína Rep. Estos plásmidos pertenecen al grupo de incompatibilidad porque son de hecho, incompatibles con los plásmidos “tipo R388”, pero desde un punto de vista evolutivo no pueden considerarse miembros de una misma familia (Fernandez-Lopez, *et al.*, 2006).

Los plásmidos IncW reunían algunas características que los hacían un interesante modelo de estudio: fueron durante mucho tiempo los plásmidos conjugativos conocidos de menor tamaño, tienen un amplio rango de hospedador y en el caso de pSa se demostró que posee la habilidad inusual de inhibir la oncogenicidad del plásmido pTi de *Agrobacterium tumefaciens* (Close & Kado, 1991).

Estudios tempranos en pSa, R388 y R7K (Bradley & Cohen, 1976) determinaron que los *pili* IncW son filamentos rígidos, de 10–12nm de ancho, con una longitud media

de unos 450 nm. En los géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* y *Pseudomonas*, el *pilus W* está presente a una frecuencia media de hasta 3 *pili* por célula. Junto a los plásmidos IncP e IncN se los considera a los IncW prototipo de los plásmidos conjugativos que conjugan preferentemente sobre medio sólido, presentando baja eficiencia de conjugación en líquido (a diferencia de las clases IncF, IncH e IncI, que son capaces de conjugarse con alta eficiencia en medio líquido).

1.4. El esqueleto IncW

T. Watanabe describió en 1968 el primer miembro de la familia IncW, el plásmido pSa aislado de *Shigella* (Watanabe, *et al.*, 1968). Algo después, Hedges & Datta (Datta & Hedges, 1971) en *E. coli* y Kontomichalou (Kontomichalou, 1971) en *Providencia rettgeri* aislaron R388 y R7K respectivamente. Aunque posteriormente se fueron describiendo otros plásmidos pertenecientes al grupo IncW ((Datta & Hedges, 1972); (Coetzee, *et al.*, 1972); (Pattishall, *et al.*, 1977); (Shinagawa, *et al.*, 1982); (Dorokhina & Korotiaev, 1984)) solo estos tres fueron caracterizados físicamente y son los integrantes “clásicos” de la familia IncW.

De los tres plásmidos IncW caracterizados originalmente tan solo pSa y R388 fueron estudiados posteriormente. Los estudios sobre el mecanismo de conjugación de esta familia se llevaron a cabo principalmente en R388, mientras que el plásmido pSa fue utilizado fundamentalmente en estudios sobre el mecanismo de inhibición de la oncogenicidad del pTi y del replicón IncW. Actualmente R388 es el miembro del grupo estudiado en más detalle y su secuencia completa se ha empleado para inferir muchas de las características de la familia (Fernandez-Lopez, *et al.*, 2006).

Aunque sus principales representantes fueron identificados en enterobacterias, se han encontrado plásmidos IncW en gran cantidad de géneros de proteobacterias (Fernandez-Lopez, *et al.*, 2006), aunque su distribución natural y epidemiología ha sido poco estudiada, por lo que se desconoce su incidencia en poblaciones naturales.

La realización de experimentos de producción de heteroduplex y análisis por microscopía electrónica, junto con el mapeo por enzimas de restricción, pusieron de manifiesto la existencia de una alta identidad de secuencia entre estos plásmidos, excepto por la existencia de ciertas zonas no homólogas que fueron atribuidas a los distintos determinantes de resistencia a antibióticos que poseen (Gorai, *et al.*, 1979). Más adelante, la comparación de las secuencias disponibles en la bases de datos para pSa ((Close & Kado, 1991), (Close & Kado, 1992); (Okumura & Kado, 1992); (Belogurov,

et al., 2000)), R7K (GeneBank AM901564) y R388 (GeneBank BR000038) puso de manifiesto que los plásmidos IncW mantienen una identidad a nivel de secuencia del DNA superior al 95%.

El análisis de secuencia y la utilización de un array desarrollado en el laboratorio han permitido el estudio de la evolución y diversidad del armazón IncW. Los datos obtenidos muestran un alto grado de conservación de secuencia y la presencia de inserciones recientes de elementos genéticos móviles, lo que parece indicar que el grupo IncW es una familia homogénea y relativamente joven de plásmidos. (Revilla, et al., 2008)

En este trabajo se analizaron las secuencias de pSa, R7K y R388 disponibles en las bases de datos, junto con los datos obtenidos de la secuenciación y análisis de dos IncW aislados más recientemente, pIE321 y pIE522. De los cinco plásmidos analizados R388, pSa y pIE522 son plásmidos prácticamente idénticos, con un 100% de homología de secuencia en las zonas de armazón analizadas y un integrón insertado exactamente en el mismo punto, mostrando diferencias únicamente en los genes de resistencia incluídos en dicho integrón. R7K y pIE321, sin embargo, evolutivamente hablando, debieron separarse antes, no tienen integrón sino otros MGEs insertados en su genoma y muestran una homología de secuencia un poco más baja, de alrededor del 97%, con pequeñas pero significativas diferencias en el armazón, las más llamativas en la zona correspondiente a *trwA* (Revilla, et al., 2008).

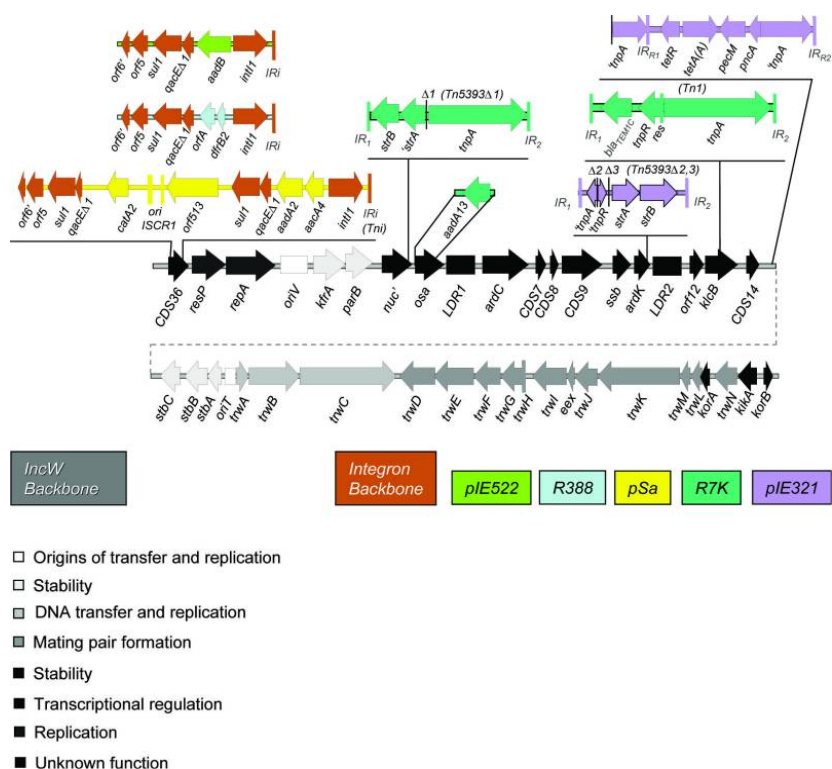


Figura I3. Estructura del armazón y diferentes inserciones de MGEs en los cinco IncW analizados (R388, pSa, pIE522, pIE321 y R7K).

Los distintos elementos que componen el armazón IncW se muestran en blanco y negro, mientras que los genes específicos de cada uno de los plásmidos aparecen destacados en colores. Tomado de (Revilla, *et al.*, 2008).

Como se muestra en la figura I3, todas estas inserciones de MGEs en los distintos plásmidos se encuentran en la zona correspondiente a las funciones identificadas como de mantenimiento estable del plásmido, no afectando en ningún momento a los genes de la región *tra*. Además, estas inserciones no producen grandes reorganizaciones en el armazón, conservándose en todos los casos la sintonía. En el caso de los plásmidos con el integrón In1 (R388/pSa/pIE522) éste se encuentra insertado en el CDS36. En el caso de los otros dos plásmidos, en R7K las inserciones afectan a los genes *nuc*, *osa* y *klcB*, mientras que en pIE321 las inserciones afectan al extremo terminal de *ardK*.

1.5. El plásmido R388 como prototipo de la familia IncW

R388 constituye el elemento central de trabajo de nuestro grupo y de este trabajo. Es un plásmido perteneciente al grupo de incompatibilidad IncW que fue aislado originalmente en *E. coli* (Datta & Hedges, 1971). Se trata de un plásmido de amplio rango de hospedador, habiéndose comprobado la transferencia de R388 a diferentes especies de proteobacterias como *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa* (Bradley & Cohen, 1976) y *A. tumefaciens* (Loper & Kado, 1979). Codifica para las resistencias a sulfonamida y trimetoprim (Datta & Hedges, 1972) y produce unos *pili* rígidos (Bradley, 1980) que hacen que se transfiera mejor en medio sólido que en líquido.

Se conoce la secuencia completa del plásmido (GenBank accession no. BR000038), lo que ha permitido el estudio detallado de su organización genética. Es uno de los plásmidos conjugativos más pequeños estudiados, consta de 33913 pb y se han identificado 43 hipotéticos ORFs mayores de 50 aminoácidos (Fernandez-Lopez, *et al.*, 2006). En base a la homología con bases de datos y/o datos experimentales, se ha atribuido una función a cada uno de estos ORFs excepto a 6 de ellos. La estructura genética del plásmido es compacta, con una pronunciada ausencia de regiones no codificantes excepto por dos repeticiones directas de 558 pares de bases (Ldr1 y Ldr2).

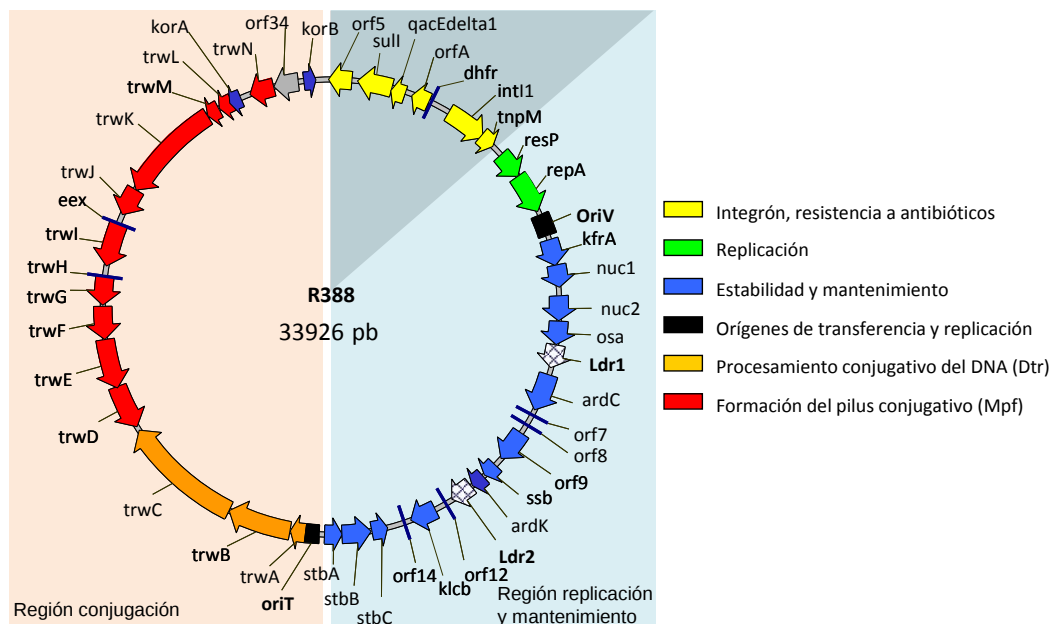


Figura I4. Mapa genético del plásmido R388.

Se representan los genes identificados en R388 (con una flecha que indica el sentido de la transcripción). Los orígenes de replicación (*oriV*) y transferencia (*oriT*) están representados como rectángulos. Se ha dividido el plásmido en regiones funcionales, y se le ha asignado un color a cada una de ellas. En la leyenda se detalla el código de colores que se ha utilizado. Modificado de (Fernandez-Lopez, *et al.*, 2006).

En base a las funciones asignadas a los ORFs, los genes de R388 se dividen en 5 grupos funcionales que se localizan en regiones discretas del genoma que denominamos módulos. Estos módulos se organizan en dos sectores mayores: un sector contiene las funciones de mantenimiento general del plásmido (fondo azul en la figura I4) y el otro contiene los genes dedicados a la conjugación (fondo rojo en la figura I4); en gris se acota la región correspondiente al integrón.

Las funciones de mantenimiento general están dedicadas a la supervivencia del plásmido en el hospedador y se encuentran divididas en tres módulos principales: replicación, estabilidad y establecimiento en el hospedador. La zona de conjugación ocupa 14,9 Kb, está dividida en la región de transferencia y replicación del DNA (*Dtr*) que contiene los ORFs implicados en el metabolismo conjugativo del DNA, y la de formación del poro conjugativo (*Mpf*) que incluye los genes implicados en formar el *pilus* de conjugación.

El análisis filogenético de los ORFs del plásmido revela la existencia de un gran mosaicismo genético. En los módulos de la región de mantenimiento estable, nos encontramos con ORFs de distinto origen agrupados dentro del mismo operón, dando lugar organizaciones genómicas no conservadas en ningún otro grupo de plásmidos

fuera de los IncW. Cada gen presenta historias evolutivas distintas y se habrían incorporado al genoma a tiempos diferentes, procedentes de fuentes diferentes (Fernandez-Lopez, *et al.*, 2006).

R388 es un plásmido de bajo número de copias, que presenta de 2 a 3 copias por célula. El replicón de R388 está formado por *oriV* más un operón que contiene dos ORFs *resP* y *repA*. *resP* codifica para una proteína de 218 aa homóloga de la resolvasa del transposón *Tn21* (24% identidad), mientras que RepA, de 323 aa, corresponde a la proteína iniciadora de la replicación (Fernandez-Lopez, *et al.*, 2006). La replicación de R388 funciona de manera bidireccional desde el origen lo que, junto con la presencia de una zona de iterón en *oriV* compuesta por 6 repeticiones directas de 15 bp, sugieren un mecanismo θ de replicación (del Solar, *et al.*, 1998).

Dado que R388 tiene solo 2-3 copias por célula, parece poco probable que el plásmido carezca de sistemas que garanticen su correcta segregación, sin embargo, en el análisis de la secuencia no se identificaron ATPasas características de ninguno de los principales sistemas de estabilidad, ni tampoco ninguna evidencia de locus toxina-antitoxina, encontrándose únicamente un sistema de resolución de dímeros codificado por la resolvasa ResP. Se han identificado algunos genes sueltos que codifican para homólogos de proteínas conocidas por jugar un papel secundario en distintos sistemas de herencia estable (*kfrA*, *nuc1*, *nuc2* y *osa*) y que se encuentran agrupados en un mismo operón (Chen & Kado, 1994) y sería posible que estos genes junto con algunos situados en su vecindad constituyan algún tipo de sistema de herencia estable aun no conocido. En los últimos años, el trabajo llevado a cabo por Guynet *et al* (Guynet, *et al.*, 2011) sugiere que el operón *stbABC* de R388 tiene un papel importante en la estabilidad del plásmido, constituyendo un sistema atípico de estabilidad ligado a la transferencia conjugativa. StbA es una proteína de unión al DNA (ParB-like) que es estrictamente necesaria para la estabilidad de R388. Se une a una serie de iterones presentes en el plásmido (IT-B) y se cree que podría actuar emparejando el plásmido al cromosoma para utilizar de forma indirecta el sistema de partición bacteriano. StbB tiene un motivo ATPasa de tipo Walker (ParA-like) pero no parece ser necesaria para la estabilidad del plásmido, sin embargo, se ha visto que favorece la conjugación. Se ha propuesto que el sistema StbA-StbB pueda actuar como un interruptor entre los mecanismos de transferencia vertical y horizontal, constituyendo la primera evidencia de interrelación entre los procesos de segregación y conjugación plasmídica (Guynet, *et al.*, 2011).

2. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL

De los distintos pasos en los que es controlado el flujo de información desde un gen a su correspondiente proteína, la regulación transcripcional es un mecanismo fundamental observado en todos los organismos. Esta forma de regulación, típicamente está mediada por una proteína de unión al DNA (factor de transcripción) que se une a sitios de unión en el genoma (operadores) y, ya sea solo o en combinación con otros factores, regula la expresión de uno o más genes diana. La suma total de las interacciones transcripcionales en un organismo pueden ser conceptualizadas en forma de red, es a lo que se denominada red de regulación transcripcional. En dicha red los nodos representan los genes y los vectores representan las interacciones regulatorias (de activación o represión) que ejerce el producto de un gen sobre otro.

Las entradas (*inputs*) a la red son señales que llevan información de condiciones del medio externo o de la concentración de los propios componentes de la red, mientras que las salidas (*outputs*) son respuestas, producidas por variaciones en la tasa de transcripción de un conjunto de genes dado. En definitiva, la red es un sistema de procesamiento de la información, tanto interna como externa, que se encuentra continuamente ajustando la tasa de síntesis de los componentes de la maquinaria celular en base a las señales que recibe (Albert, 2005).

Se ha encontrado que las redes de transcripción presentan en sus interacciones una serie de circuitos recurrentes a los que se ha denominado motivos de red. Se describieron por primera vez en la red de regulación de *E. coli*, donde se detectó que existían patrones que se repetían con mucha más frecuencia de lo que sería esperable en una organización aleatoria (Shen-Orr, *et al.*, 2002). Posteriormente los mismos motivos han sido encontrados en distintos organismos, desde bacterias y levaduras (Eichenberger, *et al.*, 2004) (Lee, *et al.*, 2002) a plantas y animales (Boyer, *et al.*, 2005) (Milo, *et al.*, 2004). Cada motivo de red presenta distintas funciones de procesamiento de la información que han sido analizadas mediante el empleo de modelos matemáticos y experimentos en célula viva.

2.1. Motivos de red (Alon, 2007)

a) Regulación simple.

El ejemplo más sencillo de interacción transcripcional tiene lugar cuando un factor de transcripción Y, normalmente activado por una señal S, regula un gen X sin

interacciones adicionales. Cuando comienza la transcripción, la concentración del gen X aumenta hasta alcanzar un estado estacionario cuyo nivel será igual a la proporción entre las tasas de producción y degradación del sistema. El tiempo de respuesta del sistema, que es definido como el tiempo que lleva alcanzar la mitad entre los niveles inicial y final, es igual a la vida media del producto génico de manera que cuanto mayor sea la tasa de degradación menor será el tiempo de respuesta. En el caso de proteínas que no sean activamente degradadas, el tiempo de respuesta será el correspondiente a un tiempo de generación.

Dentro de los sistemas de regulación simple existen otros motivos en los que el factor de transcripción actúa controlando su propia producción estableciéndose una autorregulación que podrá ser positiva o negativa según se trate de un activador o un represor.

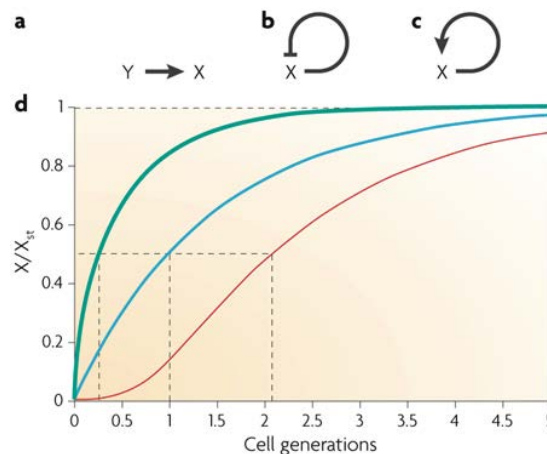


Figura I5. Motivos de regulación simple.

Representación esquematizada de los tipos de regulación simple: **a)** regulación simple, **b)** autorregulación negativa y **c)** autorregulación positiva. La gráfica **d)** muestra las diferencias en el tiempo de respuesta de cada uno de los motivos esquematizados: en azul la regulación simple, en verde autorregulación negativa y en rojo autorregulación positiva. Tomado de (Alon, 2007).

*** Autorregulación negativa (NAR):** en este caso un factor de transcripción X reprime su propia síntesis (Figura I5). Este motivo de red se encuentra aproximadamente en la mitad de los represores en *E. coli* así como en muchos represores eucariotas. Presenta dos propiedades importantes: acelera el tiempo de respuesta de los circuitos genéticos y reduce las variaciones célula - célula de los niveles de producción de la proteína. Una demostración de la aceleración del tiempo de respuesta en un contexto natural se llevó a cabo en el sistema SOS de reparación del DNA de *E. coli* cuyo regulador central LexA reprime su propio promotor (Camas, *et al.*, 2006).

* **Autorregulación positiva (PAR):** tiene lugar cuando un factor de transcripción activa su propia producción (Figura I5). Los efectos en este caso son los contrarios a los del NAR: los tiempos de respuesta se ralentizan y se aumenta la variabilidad, pudiendo producirse distribuciones bimodales.

b) Feedforward loops (FFL)

La segunda familia de motivos de red consiste en un circuito con tres genes: un regulador X que regula a otro regulador Y y un gen Z regulado por ambos (X e Y). Dado que cada una de las interacciones del circuito puede ser de activación o represión, hay 8 posibles tipos de FFL (4 coherentes y 4 incoherentes) (Figura I6). En las redes de regulación de *E. coli* y levaduras, se ha encontrado que dos de los 8 FFL posibles ocurren con mucha más frecuencia que los otros seis: el FFL coherente 1 (C1-FFL) y el FFL incoherente 1 (I1-FFL).

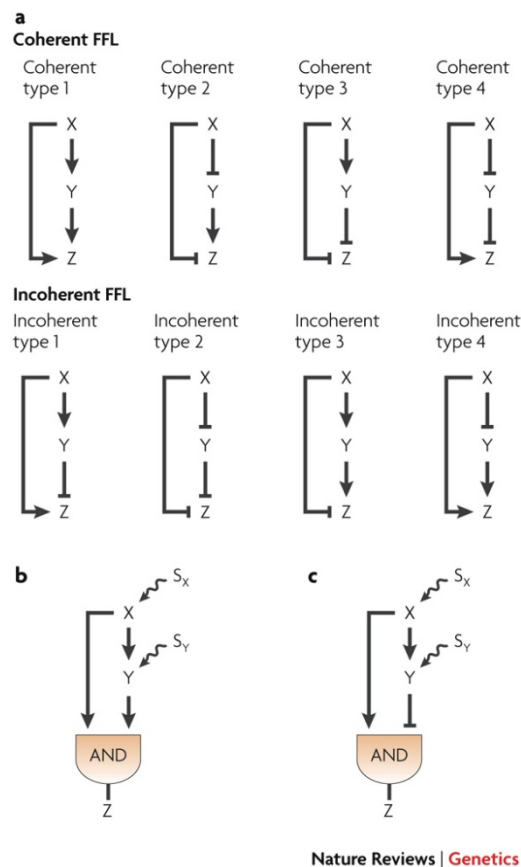


Figura I6. Feedforward loops.

a) Representación esquematizada de los 8 tipos de FFL. En los coherentes, el signo de la interacción directa X-Z es el mismo que el signo global de la interacción indirecta a través de Y, mientras que en los incoherentes presentan signos contrarios.

b) Representación del C1-FFL con lógica AND y el I1-FFL también con lógica AND. Tomado de (Alon, 2007).

* **C1-FFL:** en este caso X e Y actúan como activadores transcripcionales del gen Z. Cuando funciona con una función de entrada AND, el C1-FFL actúa como un filtro de activación mientras que cuando la función es OR ocurre al contrario y funciona como un

filtro de desactivación. La presencia de un filtro de activación producirá un retraso en el desencadenamiento de la respuesta tras la aparición de la señal S (adición de S; señal ON) pero no habrá ningún retraso cuando ésta se elimina (eliminación de S; señal OFF) lo que permite evitar que se produzca la respuesta ante pequeños pulsos espurios de señal. Un filtro de desactivación, por el contrario, no genera retraso tras la aparición de la señal sino al desaparecer ésta, evitando en este caso que el sistema se desactive en respuesta a pérdidas momentáneas de la señal.

Las propiedades de este motivo han sido demostradas experimentalmente en el sistema de utilización de arabinosa de *E. coli* (Mangan & Alon, 2003) donde se observa un retraso de unos 20 minutos en la activación del sistema tras la administración de la señal cAMP pero no tras su eliminación. El estudio del sistema con una lógica OR se ha llevado a cabo en el sistema del flagelo de *E. coli* (Kalir, *et al.*, 2005); en este caso se comprobó que el FFL prolongaba la expresión de los genes del flagelo un tiempo después de desaparecer la señal.

*** I1-FFL:** este motivo presenta las propiedades de actuar como un generador de pulsos y acelerador de respuesta. En este caso los dos brazos del FFL actúan en oposición de manera que X activa Z pero al mismo tiempo lo reprime a través de Y.

Su capacidad para generar pulsos ha sido demostrada mediante la construcción de un I1-FFL sintético, donde el activador LuxR (X) producía la activación de un reportero GFP (Z) y el represor λ C1 (Y) que, a su vez, reprimía el promotor Z (Basu, *et al.*, 2004). La capacidad para acelerar respuestas de este motivo se ha observado experimentalmente en el sistema de utilización de galactosa de *E. coli* (Mangan, *et al.*, 2006).

Los FFL ocasionalmente pueden integrar motivos NAR y PAR, generalmente en el regulador Y. La presencia de estos lazos regulatorios puede contribuir a acelerar o retrasar el tiempo de respuesta, potenciando de esta manera el comportamiento del FFL. También podemos encontrar FFL con salida múltiple, en los que X e Y regulan simultáneamente a varios Z. En este caso se pueden llegar a generar patrones temporales de activación e inactivación de los genes mediante el establecimiento de una jerarquía en los umbrales de respuesta de los distintos promotores, algo que se comprobó experimentalmente en los genes del flagelo de *E. coli* (Kalir & Alon, 2004).

c) Módulos de entrada simple (SIM)

En un motivo SIM un regulador X controla la transcripción de un grupo de genes diana y además, normalmente X regula su propia síntesis (Figura 17). La principal

función de este motivo de red es permitir la expresión coordinada de un grupo de genes con función compartida, pudiendo generar programas de expresión temporal de manera similar al FFL de salida múltiple.

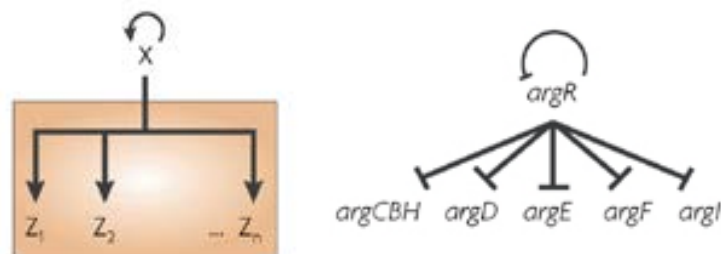


Figura I7. El módulo de entrada simple (SIM)

Representación esquemática de un SIM y un ejemplo, la regulación del sistema de biosíntesis de arginina. Tomado de (Alon, 2007).

La propiedad más interesante de este motivo es su capacidad para generar un programa de expresión temporal, con un orden definido de activación para cada promotor diana. De acuerdo a las distintas constantes de unión que el factor de transcripción X tenga por cada uno de los promotores, activará o desactivará sus genes diana en un orden concreto, a medida que su concentración aumenta. De manera inversa, cuando la señal desaparece y las concentraciones de X comienzan a decrecer, la inactivación comienza por los promotores con una mayor constante de disociación y termina por el promotor con la constante más baja. A este tipo de orden se le denomina *last-in-first-out* (LIFO): el último que entra, es el primero que sale (Alon, 2006). Este diseño participa en la regulación de la transcripción de rutas metabólicas (Zaslaver, *et al.*, 2004) y de procesos de reparación del daño al DNA como la respuesta SOS (Ronen, *et al.*, 2002).

d) Regulones densamente solapados (DOR)

Constan de varios reguladores que controlan varios promotores de manera combinatoria. Su principal característica es la integración de varias señales en una respuesta (Figura 8). Cada gen Z responderá a los distintos reguladores de acuerdo a una función de entrada multidimensional: su activación o desactivación dependerá de la presencia o ausencia de muchos factores distintos y con frecuencia alcanzará niveles de actividad distintos (Yuh, *et al.*, 1998), (Setty, *et al.*, 2003). Los DOR elaboran respuestas complejas que dependen de múltiples factores, y la propia red transcripcional

de *E. coli* que conocemos se organiza en torno a unos cuantos DOR fundamentales, que engloban centenares de genes distintos (Shen-Orr, *et al.*, 2002).

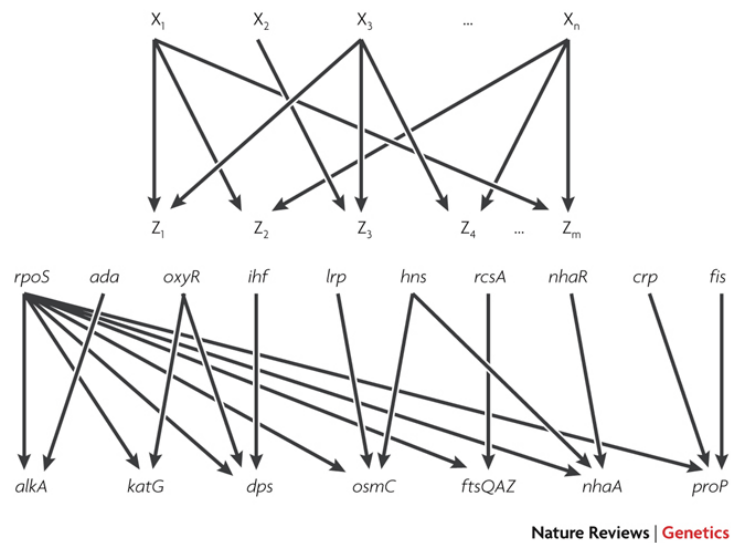


Figura I8. El motivo DOR.

Representación esquemática de un motivo DOR y un ejemplo, el sistema de respuesta a estrés de *E. coli*. Tomado de (Alon, 2007).

2.2. Redes de regulación en plásmidos

Una pregunta importante en la biología de plásmidos es si los éstos deben ser considerados como genomas coherentes o como una colección aleatoria de genes útiles. Un factor importante a determinar en este aspecto es el estudio de la existencia o no de una regulación global, lo que indicaría si los genomas tienden a comportarse de forma integrada o si, por el contrario, cada módulo funciona de manera independiente.

Los plásmidos parecen estar a medio camino entre los fagos y los cromosomas en su organización genética y la existencia de una regulación coordinada podría ser una consecuencia de la existencia de esqueletos plasmídicos estables. El estudio de las redes de regulación de los distintos plásmidos conjugativos vendría a confirmar la existencia de una organización global estable en sus genomas frente a la mera yuxtaposición de módulos independientes.

Estudios detallados en varios genomas plasmídicos en busca de circuitos regulatorios, han revelado la presencia de redes regulatorias complejas. Este es el caso, por ejemplo, de la red CUP en pKM101 (Delver & Belogurov, 1997) o el regulón kil-kor de los plásmidos IncP (Kornacki, *et al.*, 1990).

*** Regulación CUP de pKM101:**

Controla la expresión de nueve ORFs implicados en el establecimiento del plásmido. Los elementos CUP consisten en 8 secuencias repetidas situadas inmediatamente antes de cada ORF regulado (figura I9). La proteína ArdK_pKM101, que se une a la secuencia consenso en los elementos CUP, que se piensa que tienen un papel tanto en recombinación e incorporación de nuevos genes, como en el establecimiento de una red de regulación coordinada (Delver & Belogurov, 1997).

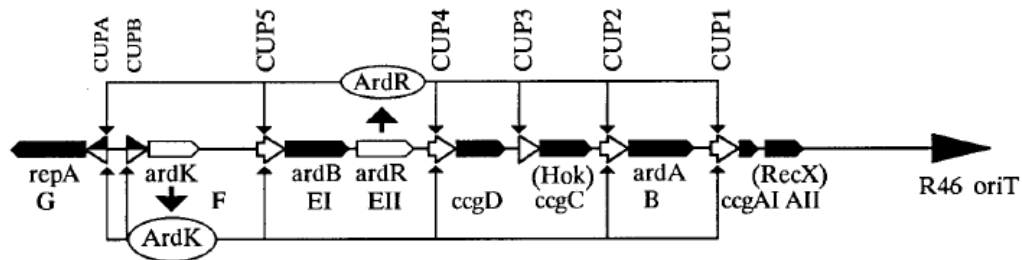


Figura I9. Modelo para la regulación de los genes ccg controlados por elementos CUP en pKM101.

Las proteínas regulatorias ArdK and ArdR (en los círculos) se unirían a las regiones CUP de los promotores inhibiendo la expresión de los genes ccg que llevan estas secuencias. Los dos reguladores (ArdK y ArdR) actúan como represores de su propia síntesis. Tomado de (Delver & Belogurov, 1997).

*** Regulación global en RP4**

En el genoma IncP encontramos cuatro reguladores globales (*korA*, *korB*, *korC* y *trbA*) que ejercen una regulación coordinada de las funciones de transferencia y conjugación del plásmido (Zatyka, *et al.*, 1994) (Macartney, *et al.*, 1997) (figura I10)

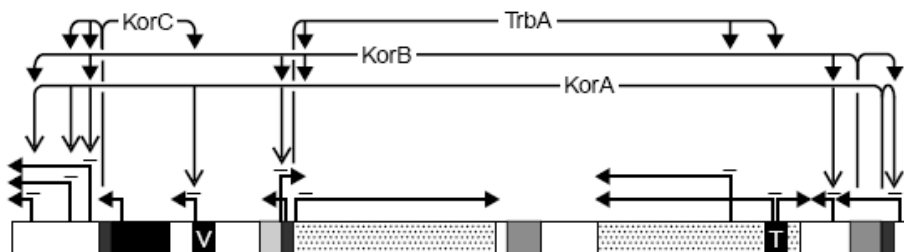


Figura I10: Regulación global de las funciones plasmídicas en RK2.

Se muestran los 4 reguladores globales del plásmido (KorA, KorB, KorC y TrbA) y la localización de las 6 secuencias de unión que se ha comprobado experimentalmente que tienen actividad reguladora. Los tonos de gris indican el tipo de funciones codificadas en cada región: las zonas punteadas contienen las funciones de transferencia; en gris claro las de replicación; en gris más oscuro las

funciones de mantenimiento y en negro se representa un transposón. Las flechas horizontales indican los promotores. Tomado de (Bingle & Thomas, 2001).

El regulador central de este sistema es KorB que reconoce 12 secuencias palindrómicas de 13 pb distribuidas por el genoma plasmídico (Balzer, *et al.*, 1992) (Dostal, *et al.*, 2003). Seis de estos sitios están en o cerca de promotores de genes requeridos para la replicación (*trfA*), herencia estable (*kfrA* y *klc*) y transferencia conjugativa (*trbB* y *traG*). A través de estos sitios KorB reprime la transcripción de estos genes, trabajando cooperativamente con KorA o TrbA.

La existencia de una red de regulación integrada puede ser anticipada por la abundancia de secuencias de DNA repetidas en las regiones intergénicas, algo que también se ha puesto de manifiesto en R388 y otros plásmidos, lo que parece indicar la presencia también en ellos de redes de regulación coordinadas. Siguiendo los paradigmas pKM101 y RP4 se llevó a cabo el análisis de secuencia de R388 en busca de señales con un potencial rol regulatorio en las regiones intergénicas, encontrándose distintos tipos de secuencias repetidas en diferentes regiones del plásmido, que sugerían la existencia de una red de regulación global (Fernandez-Lopez, *et al.*, 2006).

Aunque se encontraron posibles secuencias regulatorias en todo el genoma de R388, se observa una diferencia en su distribución entre el módulo de conjugación y el resto del plásmido, no encontrándose sitios de unión compartidos entre la región *tra* y otras regiones del plásmido (Fernandez-Lopez, *et al.*, 2006).

2.3. Estudio de la regulación transcripcional de R388

a) Señales de regulación

Mediante el análisis informático de la secuencia genética de R388 se identificaron cinco familias de señales de secuencia, cuya posición en el genoma así como su secuencia y conservación se muestran en la figura I11. De las cinco familias identificadas dos son grupos de iterones (IT-A, IT-B), mientras que las otras tres corresponden a repeticiones directas (SDR-A, SDR-B, SDR-C) (Fernandez-Lopez, *et al.*, 2006)

- .IT-B4: formado por dos repeticiones, situado en la región intergénica entre *klcB* y *ORF14*.
- IT-B5, formado por 10 repeticiones, situado en la región *oriT* del plásmido adyacente al operón *stbABC*.

La familia SDR-A se compone de cuatro repeticiones de 24 pb presentes en cuatro regiones intergénicas de la zona de establecimiento: entre la primera LDR y *ardC* (SDR-A1); entre *ardC* y *orf7* (SDR-A2); entre *ORF9* y *ssb* (SDR-A3) y entre la segunda LDR y *ORF12* (SDR-A4).

La familia SDR-C se compone de ocho repeticiones de 14 pb presentes en los módulos de mantenimiento y establecimiento: entre la primera LDR y *ardC*; entre *ORF7* y *ORF8*; entre *ORF8* y *ORF9*; entre *ORF9* y *ssb*; entre la segunda LDR y *ssb*; entre *klcB* y *ORF14* y dos de ellas entre el *oriV* y *kfrA*.

Por último, la familia SDR-B se compone de cinco repeticiones de 20 bp presentes en las regiones promotoras de los operones implicados en la expresión y ensamblaje del pilus conjugativo. Se localizan entre *kikA* y *korB*; dos de ellas entre *trwN* y *korA* y otras dos entre *trwI* y *trwH*.

b) Proteínas reguladoras en R388

Al menos 6 de los ORFs identificados en la secuencia de R388 (*ardK*, *klcB*, *stbA*, *trwA*, *korA* y *korB*) fueron designados como posibles reguladores transcripcionales (Fernandez-Lopez, 2007), aunque cabe la posibilidad de que entre los ORFs pequeños sin función conocida pueda haber otros que presenten función reguladora.

Se ha comprobado experimentalmente que *ArdK* se une y reprime la transcripción de promotores que contienen las secuencias SDR-A, no presentando ningún efecto sobre promotores que no contenían dichas secuencias. Esto, junto a los datos obtenidos de la comparación con *ArdK_pKM101*, llevó a proponer su función como represor transcripcional de los promotores con secuencias SDR-A. El circuito de regulación de *ArdK* (figura I12) adquiere la configuración típica de un módulo SIM en el que el regulador reprime su propia síntesis y la del resto de promotores diana. (Fernandez-Lopez, 2007)

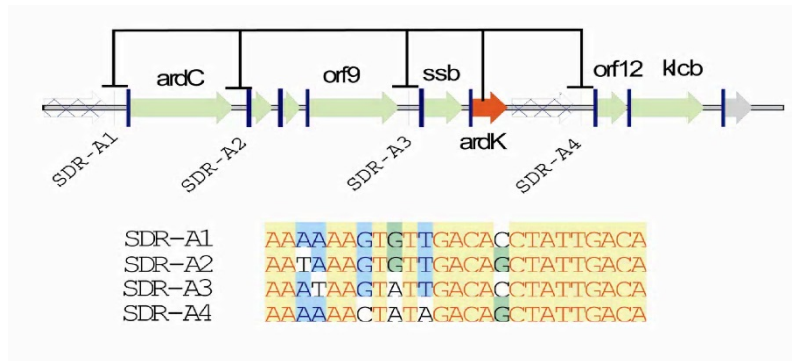


Figura I12. Esquema de la red de regulación propuesta para ArdK y alineamiento de las secuencias de la familia SDR-A.

Las flechas coloreadas en verde indican los ORFs detectados en esta región. Las flechas marcadas en rayas representan las dos repeticiones directas largas presentes en el genoma de R388. Se indica la posición de ArdK (flecha roja) así como su circuito de represión. En la parte inferior se muestra un alineamiento de las secuencias SDR-A. Tomado de (Fernandez-Lopez, 2007).

También se ha comprobado *in vitro* que la proteína StbA de R388 es capaz de unirse al DNA de los promotores que contienen los iterones IT-B (Fernandez-Lopez, 2007), por lo que probablemente las secuencias que forman los iterones de la familia IT-B constituyen el sitio de unión de esta proteína. En base a estos resultados, el circuito de regulación de StbA sería el mostrado en la figura I13. Como puede observarse, corresponde a un represor transcripcional autorregulado negativamente, que a su vez reprime la expresión de una serie de operones, diseño que corresponde también a un módulo SIM.

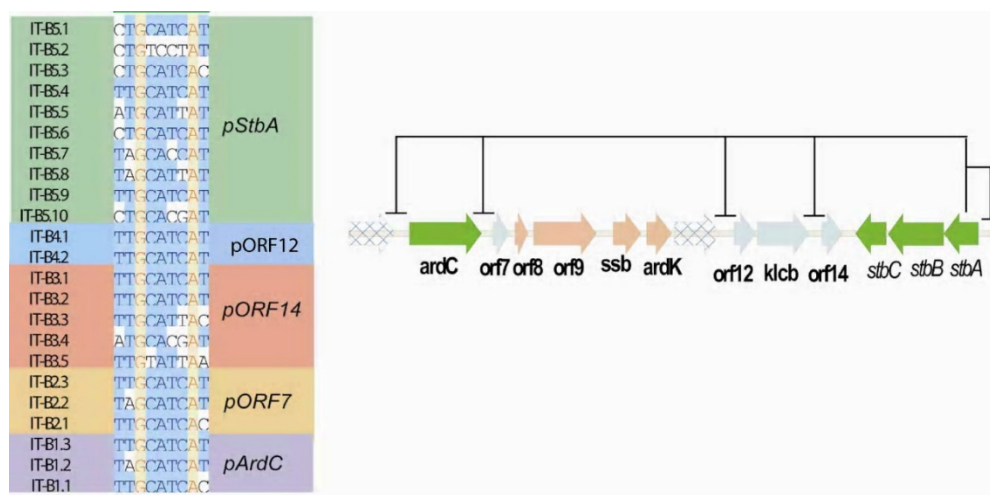


Figura I13. Esquema del módulo SIM de StbA.

A la izquierda se muestra un alineamiento de los iterones de la familia IT-B, junto a los promotores en los que se sitúan. En el dibujo de la derecha se muestra la organización general del circuito de StbA. Los ORFs mostrados en verde corresponden a genes con un papel asignado dentro de la fisiología del plásmido, y regulados por StbA. Los ORFs en

azul corresponden a genes regulados por StbA, pero que no tienen una función conocida. Los genes de la región en los que no se detectó la presencia de iterones IT-B y que por tanto no estarían regulados por StbA, se muestran en color anaranjado. Las flechas transparentes con fondo de cuadros indican las dos repeticiones largas (LDRs) presentes en el genoma de R388. Tomado de (Fernandez-Lopez, 2007).

Por último, se ha determinado que las secuencias SDR-B corresponden a sitios de unión de KorA estableciéndose como regulador transcripcional de los operones de la región *Mpf*, al comprobarse que su presencia es capaz de reprimir la expresión de los promotores que contienen estas secuencias (Fernandez-Lopez, 2007).

Además de estos circuitos más complejos, en R388 está descrita la función reguladora de *trwA*, primer gen del operón *trwABC* que codifica las funciones de procesamiento conjugativo del DNA. La proteína TrwA se une a dos sitios en el *oriT*, formados por una repetición directa (*sbaA*) y otra invertida (*sbaB*) del hexanucleótido CACTAC y actúa como represor transcripcional del operón estableciendo un circuito de autorregulación negativa (Moncalian, *et al.*, 1997).

3. MEDIDA DE LA EFICIENCIA DE CONJUGACIÓN

Como ya se comentó anteriormente, la conjugación es una de las fuerzas principales que contribuyen al modelado de los genomas bacterianos (de la Cruz & Davies, 2000), pero además es la responsable de la rápida propagación de las resistencias a antibióticos entre las bacterias patógenas, algo que en los últimos años ha sido responsable de un importante aumento en la mortalidad de pacientes afectados por enfermedades infecciosas (Boucher, *et al.*, 2009). El análisis de los elementos móviles presentes en las poblaciones bacterianas (plásmidos, bacteriófagos, transposones, etc) así como del flujo de genes de resistencia entre ellas, requiere de métodos que permitan una determinación cuantitativa precisa de las tasas de conjugación (Levin, *et al.*, 1997). Estos datos cuantitativos proporcionarán los parámetros esenciales para el desarrollo de modelos matemáticos que expliquen la diseminación de las resistencias a antibióticos entre las poblaciones bacterianas y el efecto de la conjugación en la propagación de las resistencias (Garcillan-Barcia, *et al.*, 2011).

Se han utilizado diferentes aproximaciones para tratar de determinar la eficiencia de la transferencia de los plásmidos. El indicador más extendido actualmente es la

frecuencia de conjugación, esto es, la tasa entre el número de transconjugantes (T) respecto al número de donadores (D) o receptores (R).

En un intento por establecer un parámetro universal de la tasa de transferencia, independiente del procedimiento experimental utilizado, Levin *et al.* (Levin, *et al.*, 1979) describieron un método para estimar la llamada tasa de la transferencia conjugativa (γ). Este trabajo demostró que, en unas condiciones ideales, la dinámica de conjugación se puede ajustar a un modelo de acción de masas. En su realización más simple, un quimioestado bacteriano, la tasa de conjugación γ puede ser definida si se hacen algunas asunciones: las conjugaciones son eventos aleatorios entre células en suspensión; no hay pérdida del plásmido por segregación; los transconjugantes recién formados actúan como donadores inmediatamente; y todas las células tienen la misma velocidad de crecimiento. Posteriormente, Simonsen *et al* (Simonsen, *et al.*, 1990) adaptaron este modelo (sin solución analítica) para poder obtener datos que describiesen la transferencia plasmídica a partir de datos experimentales en cultivo discontinuo, desarrollando el llamado “*End-point method*” (o método de punto final) para el cálculo de la tasa de conjugación.

Este método ha sido ampliamente utilizado debido a que permite una estimación robusta de la tasa de conjugación, que es insensible a factores como la densidad celular inicial, la proporción inicial D/R y el tiempo al que se obtienen las muestras de conjugación, al menos en poblaciones bien mezcladas como las conjugaciones en líquido (Simonsen, *et al.*, 1990); (Zhong, *et al.*, 2012). Según este modelo la estimación de punto final de la tasa de conjugación (γ_{ep}) viene dada por la siguiente ecuación:

$$\gamma_{ep} = \psi_{max} (N - N_0)^{-1} \ln \left(1 + \frac{T \cdot N}{D \cdot R} \right)$$

donde γ_{ep} es la tasa de transferencia ($\text{ml cel}^{-1} \text{ h}^{-1}$), ψ_{max} es la tasa de crecimiento bacteriano (h^{-1}), y D, R, T y N son las densidades en un tiempo concreto (cel ml^{-1}) de donadores, receptores, transconjugantes y el total de las células de cultivo respectivamente.

Aunque la estimación de punto final originalmente fue desarrollada para cultivos líquidos, debido a su independencia de los cambios en algunas de las condiciones experimentales y a su simple implementación, el método ha sido usado para medir tasas de transferencia incluso en condiciones experimentales de conjugación asociada a superficies (Licht, *et al.*, 1999) (Lilley & Bailey, 2002) (Normander, *et al.*, 1998).

Recientemente, Zhong *et al.* (Zhong, *et al.*, 2012) analizaron la posibilidad teórica de aplicar este método a la conjugación en superficie, usando datos simulados de un modelo basado en un sistema interactivo de partículas. Concluyeron que las tasas de transferencia (γ) eran medidas más robustas que las frecuencias de transferencia (T/D o $T/(R+T)$), tanto en conjugación en líquido como en conjugación asociada a superficies, pero solo si las poblaciones de donadores y receptores constituían una capa confluyente bien formada. Se demostró que, a diferencia de los ratios T/D , T/R o T/N la estimación de punto final de γ es insensible a la proporción D/R y, hasta cierto punto, al tiempo de muestreo. (Zhong, *et al.*, 2012).



OBJETIVOS

OBJETIVOS

R388 es el plásmido conjugativo de menor tamaño de los estudiados hasta el momento. Pertenece a la familia de plásmidos IncW, es un plásmido de amplio rango de hospedador, y su mecanismo de transferencia ha sido objeto de estudio por parte de nuestro grupo de investigación durante los últimos veinte años.

En un trabajo previo se ha llevado a cabo el estudio de la organización general del genoma y la filogenia de R388, así como una primera aproximación al estudio de la regulación transcripcional del plásmido. Esta tesis tiene como objetivo continuar con el trabajo iniciado por Fernandez-López y profundizar en estudio de la red de regulación transcripcional del plásmido R388.

En este contexto, los objetivos de esta tesis son los siguientes:

1. Determinar cuantitativamente el efecto de los reguladores transcripcionales del plásmido R388 e identificar sus promotores diana.
2. Profundizar en la caracterización de uno de sus reguladores, ResP.
3. Caracterizar la organización global de la red de regulación transcripcional del plásmido.
4. Estudiar las diferencias en la familia IncW respecto a la regulación.

A partir del estudio de la regulación del plásmido nos planteamos además otros objetivos:

5. Aproximación a la caracterización del fenotipo de los IncW: replicación, rango de hospedador y conjugación.
6. Puesta a punto de un sistema de citometría de flujo para medir conjugación de manera más precisa.



MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

A. MATERIALES

1. CEPAS

En la tabla MM1 se resumen las cepas utilizadas en este trabajo. La herramienta principal de trabajo empleada han sido cepas de *Escherichia coli* todas derivadas de *E. coli* K-12.

Tabla MM1. Cepas empleadas en este trabajo.

Escherichia coli

Cepa	Características/Genotipo	Referencia
DH5α	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK-mK+), λ-	(Grant, <i>et al.</i> , 1990)
BW27783	lacI ^q rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514 DE(araBAD) 567 DE(rhaBAD) 568 DE(araFGH) Φ(ΔaraEp P _{CP8} -araE)	(Khlebnikov, <i>et al.</i> , 2001)
BW-Rif	Mutante espontáneo de BW27783	(del Campo, <i>et al.</i> , 2012)
BW-Nx	Mutante espontáneo de BW27783	(del Campo <i>et al.</i> , 2012)
DY380	Sm ^R λ CI857 (cro-bioA) tet (DH10B)	(Lee, <i>et al.</i> , 2001)

Otras bacterias

Cepa	Características/Genotipo	Referencia
Gammaproteobacteria Enterobacteriales		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> K6	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> . Aislado clínico del Medical College of Virginia, 1994. Ap ^R Km ^R , Cm ^R	ATCC 700603
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> str. LT2	ATCC 700720
Gammaproteobacteria Pseudomonadales		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Sm ^R Ap ^R	ATCC 19606
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Ap ^R Cm ^R . <i>P. putida</i> mt-2 sin pWWO	(Bagdasarian <i>et al.</i> 1981)
Gammaproteobacteria Vibrionales		

<i>Vibrio cholerae</i> CIP106855	N16961 Rif ^R . Biovar Eltor, serovar O:1	CIP106855
<i>Vibrio cholerae</i> CIP106851	N16961 Sm ^R . Biovar Eltor, serovar O:1	CIP106851
Alfaproteobacteria		
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GMI9023	Derivada de C58 curada de sus plásmidos naturales (pTi-, pAT-)	(Rosenberg and Huguet, 1984)

2. MEDIOS DE CULTIVO, SELECCIÓN Y CONSERVACIÓN

Para el cultivo rutinario de bacterias se utilizó medio LB Lennox comercial para el cultivo en líquido (triptona 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 5 g por litro, Pronadisa) y el mismo medio suplementado con agar 1,5% (p/v) para el cultivo en medio sólido. Los medios de cultivo se esterilizaron autoclavándolos a 121 °C durante 20 min.

Para los ensayos de fluorescencia el medio rico LB fue sustituido por medio mínimo M9 preparado utilizando sales M9 comerciales de Sigma (6,8 g/L Na₂HPO₄; 3 g/L KH₂PO₄; 1 g/L NH₄Cl; 0,5 g/L NaCl), esterilizadas mediante autoclave 121 °C durante 20 min, a las que posteriormente se añadió 2 mM MgSO₄ estéril. El medio se suplementó con casaminoácidos (0,2% p/v) y glicerol (0,5% p/v).

Para la conservación de cepas, los cultivos en fase estacionaria se centrifugaron y se resuspendieron en una mezcla 50% peptona 1,5% (p/V) y 50% glicerol. Las cepas se almacenaron a -20 °C y -75 °C.

Según necesidad, se añadieron antibióticos a los medios de cultivo para hacerlos selectivos. A continuación se incluye la tabla MM2 con los distintos antibióticos y concentraciones utilizados:

Tabla MM2: Antibióticos utilizados

<i>Antibiótico</i>	<i>Concentración</i>	<i>Producto comercial</i>	<i>Preparación</i>
A. Nalidíxico (Nx ²⁰)	20 µg/ml	Ácido nalidíxico (Apollo)	En agua (añadir NaOH)
Ampicilina (Ap ¹⁰⁰)	100 µg/ml	Ampicilina sódica (Apollo)	En agua
Cloranfenicol (Cm ²⁵)	25 µg/ml	Cloranfenicol (Apollo)	En etanol
Kanamicina (Km ⁵⁰)	50 µg/ml	Sulfato de kanamicina (Apollo)	En agua
Trimetoprim (Tp ²⁰)	20 µg/ml	Trimetoprim 98.8% (Apollo)	En DMSO

Tetraciclina (Tc ¹⁰)	10 µg/ml	Clorhidrato de tetraciclina (Apollo)	En etanol 50%
Estreptomicina (Sm ³⁰⁰)	300 µg/ml	Sulfato de estreptomicina (Apollo)	En agua
Rifampicina (Rif ⁵⁰)	50 µg/ml	Rifampicina 99% (Apollo)	En DMSO
Espectinomicina (Sp ¹⁰⁰)	20 µg/ml	Dihidrocloruro de espectinomicina pentahidratada (Apollo)	En agua

3. OLIGONUCLEÓTIDOS

Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por Sigma-Aldrich y purificados por HPSF (alta pureza sin sal) y están recogidos en la tabla MM3.

Tabla MM3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

<i>Nombre</i>	<i>Secuencia (5'→3')</i>	<i>Descripción/Uso</i>
resPdir	GCTATCTCGAGGACCCACATCATGCTAT	Construcción pGP1
resPrev	GGCTGGGATCCGCCTCATTCTAGCGCAG	Construcción pGP1
KfrAdir	AGCTCTCGAGGGCAAGTAGTTACAGCAAGT	Construcción pGP2
KfrArev	CGTAGGATCCGTTTAGTGATTGCCATTCTT	Construcción pGP2
nucdir	AGGTCACCTCGAGGCCACGAACTGACACC	Construcción pGP3
nucrev	GTTATAGGATCCATCGTGTCAAGCTCGCT	Construcción pGP3
ardCdir	TCGGCGCTCGAGGGAAATGCAAGGGTTAAG	Construcción pGP4
ardCrev	CATCAGGGATCCGCGAGAGTTCCAAAC	Construcción pGP4
orf7dir	AGCTCTCGAGGCTGCGTGCTTTGAAGGACG	Construcción pGP5
orf7rev	CGTAGGATCCACGATGACTCGGACTTGCAT	Construcción pGP5
orf8dir	AGCTCTCGAGCTCATCGAGAATGCGGCCGA	Construcción pGP6
orf8rev	CGTAGGATCCGGCACTTCGTACTCGTTGCCTTTC	Construcción pGP6
orf9dir	AGCTCTCGAGGAAACCGTCGAGCCAGATCACC	Construcción pGP7
orf9rev	CGTAGGATCCGGCTTGTTGCTTCTGTTCGT	Construcción pGP7
ssbdir	GTCGTCCTCGAGGAAACAGGTTGCGGCCACACT	Construcción pGP8
ssbrev	GTCGTCGGATCCTCGGCTTCAAACGATTGCT	Construcción pGP8
ardkdir	GTCGTCCTCGAGGTCATCGACCCCATCACTTA	Construcción pGP9
ardkrev	GTCGTCGGATCCTTTTGTTCGTCCATCGGT	Construcción pGP9
orf12dir	GTCGTCCTCGAGAAATGCGACGAAACAAGCA	Construcción pGP10
orf12rev	GTCGTCGGATCCTTTGCGCTTCATAGCTTTGA	Construcción pGP10

orf14dir	GTCGTCCTCGAGACAAACCATCTACCAAGAAG	Construcción pGP11
orf14ev	GTCGTCGGATCCTCATGTGTGACTCCTGCTTT	Construcción pGP11
trwAdir	GTCGTCCTCGAGCGTCCGTTTCATTCACTTGT	Construcción pGP12
trwArev	GTCGTCGGATCCTACTTGGATGGGGTCGCCTA	Construcción pGP12
stbAdir	GTCGTCCTCGAGTACTTGGATGGGGTCGCCTA	Construcción pGP13
stbArev	GTCGTCGGATCCCGTCCGTTTCATTCACTTGT	Construcción pGP13
trwHdir	GTCGTCCTCGAGCAATATGGCGAAAACCGTTG	Construcción pGP14
trwHrev	GTCGTCGGATCACAATAGCCCCGTCATCAAA	Construcción pGP14
korAdir	CGTTGCGGATCCCCTTGATCGCATGTTTAATC	Construcción pGP15
korArev	TACCTAGGATCCTAATGCAAGCGACGCCTTTT	Construcción pGP15
korBdir	TCGCCTCGAGAAACGACGGTC	Construcción pGP16
KorBrev	TCGCGGATCCGGTCATTCACTT	Construcción pGP16
kikAdir	TCGCCTCGAGGGTCATTCACTT	Construcción pGP17
kikArev	TCGCGGATCCAAACGACGGTCA	Construcción pGP17
intdir	GCTATCTCGAGGTTGGCTTCATCGCTACTTTGACCC	Construcción pGP18
intrev	GGCTGGGATCCACTGTAATGCAAGTAGCGTATGCGC	Construcción pGP18
antdir	GCTATGGATCCGTTGGCTTCATCGCTACTTTGACCC	Construcción pGP19
antrev	GGCTGCTCGAGGAACCCAGTTGACATAAGCCTGTTC	Construcción pGP19
pGhosdir	CTAGCTCGAGTTTCGGGCCTGTCAGGCTTGCT	Construcción pGP20
pGhosrev	GATCGGATCCCAAGGGGCACTCGCTCGAAGAACT	Construcción pGP20
pRAFd_EcoRI	GCTATGAATTCAAAAGTGCCACCTGACGTCTGAAGG	Amplificación de las proteínas fluorescentes
pRAFr_Sall	GCTATGTCGACTTCATATGGACCATGGCTAATTCCC	Amplificación de las proteínas fluorescentes
TrwAKamiK1	GATTGAACCACTACAGTAACACTACGGGAGAGGACA TGGCACTAGGCGACGGTACCATCAAGAGACAGGATG AGGATCGT	Construcción de R388ΔtrwA
TrwAKamiK2	TGACCTTTCTTTGATCGTCTGGATGCATCTCAATCCT CCTTCCCCTCCGGGGTACCAACCCCAGAGTCCCGCT CAG	Construcción de R388ΔtrwA
TrwBKamiK1	TGAGGTTTGGACACCGGAGGGGAAGGAGGATTGAG ATGCATCCAGACGATGGTACCATCAAGAGACAGGAT GAGGATCGT	Construcción de R388ΔtrwB
TrwBKamiK2	CTGTCGGGTCAATACCATGTGACTGAGCATTAGATA GTCCCCTCAACAAAGGTACCAACCCCAGAGTCCCGC TCAG	Construcción de R388ΔtrwB
TrwCKamiK1	AACCGGCAACCGGCCTTTTGTGAGGGGACTATCTAA TGCTCAGTCACATGGGTACCATCAAGAGACAGGATG AGGATCGT	Construcción de R388ΔtrwC
TrwCKamiK2	AGCACGCGCTACGGGCTTTTTCTTGTCCCTGCTTAC CTTCCGGCCTCCATGGTACCAACCCCAGAGTCCCGC TCAG	Construcción de R388ΔtrwC
KfrAKamiK1	TCATACAACATACTACAGTACAGAGGCCCGCAAGAA TGGCAATCACTAAAGGTACCATCAAGAGACAGGATG AGGATCGT	Construcción de R388ΔkfrA-osa y R388ΔkfrA-orf14

KfrAKamiK2	CGCGACCGCGCGAAGGGCGGCAAGGGCGCTTTTCA TTGTTTGCCTCCTGT GGTACCAACCCCAGAGTCCCGCTCAG AACCGCCCGGCCAGATCAATGCAGGAGTCAAAGCTA	Construcción de R388Δ <i>kfrA-osa</i>
Orf12KamiK1	TGAAGCGCAAATTTGGTACCATCAAGAGACAGGATG AGGATCGT TGGTGCTTTCTGCTCACGGCGTCGGCTCCGGCTCAA	Construcción de R388Δ <i>orf12</i>
Orf12KamiK2	TACTCGTGGGGCAGGGTACCAACCCCAGAGTCCCG CTCAG GGAAAGGGCGGGTTCCCCCGCCCTCCCCTCGGTCA	Construcción de R388Δ <i>orf12</i>
Orf14KamiK2	AATGTGCGCGGCGGTGGTACCAACCCCAGAGTCCC GCTCAG CATCCGCAATTCTAGTGTAGAAGGAGAGTAGAAAAG	Construcción de R388Δ <i>orf14</i> y R388Δ <i>kfrA-orf14</i>
KorBKamiK1	TGAATGACCTCAAGGGTACCATCAAGAGACAGGATG AGGATCGT GTTCTCCTGGCCTTACGGCCCGATCTTCAATTCATG	Construcción de R388Δ <i>korB</i>
KorBKamiK2	ATACTTCCAGTTCGGTACCAACCCCAGAGTCCCGCT CAG	Construcción de R388Δ <i>korB</i>
ResPNdel	GGCTGCATATGCCAAAATACTATGCCTA	Oligo directo para clonar resP_R388 en pET29C
ResPXhol	GCTATCTCGAGGGCATGTTGTTCCCTCCCCG	Oligo reverso para clonar resP_R388 en pET29C
pZE05	CCAGCTGGCAATTCCGA	Secuenciación del MCS en pUA66
GFPseq	GGGACAACACCAAGTG	Secuenciación del MCS en pUA66
pBAD1	CTGTTTCTCCATACCCGTT	Secuenciación del MCS en pBAD33
pBAD2	CTCATCCGCCAAAACAG	Secuenciación del MCS en pBAD33
pRODseq1	CTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACG	Secuenciación clones pAC

4. PLÁSMIDOS

La tabla MM4 contiene la lista de plásmidos empleados o contruidos en esta tesis. En el apartado B2 de Materiales y Métodos puede encontrarse una explicación más detallada de la construcción de las principales librerías de clones desarrolladas para este trabajo.

Tabla MM4. Plásmidos utilizados en este trabajo

<i>Plásmido</i>	<i>Resistencia</i>	<i>Replicón</i>	<i>Nº Acceso o referencia</i>	<i>Descripción</i>
pUA66	Km	pSC101	(Zaslaver, <i>et al.</i> , 2006)	Plásmido reportero GFP, para clonar una secuencia controlando la transcripción de <i>gfpmut2</i>
pBAD33	Cm	p15A	(Guzman, <i>et al.</i> , 1995)	Expresión controlada por ParaBAD , inducible por arabinosa
pET29c	Km	pBR322	Novagen	Sobreexpresión de proteínas con cola de histidinas, controlada por el promotor de T7.

pROD17	Ap, Km	ColE1	(Shaner, <i>et al.</i> , 2004)	Plásmido que expresa mCherry controlada por <i>Plac</i>
R388	Tp, Su	IncW	BR000038 Datta 1972	Plásmido silvestre. Representante de los IncW.
pSU2007	Tp, Su, Km	IncW	Martinez & de la Cruz, 1988	Derivado Km ^R de R388
pSa	Cm, Gm, Km, Sm, Sp, Su	IncW	EU419764 Watanabe 1968	Plásmido silvestre. Familia IncW.
R7K	Ap, Sm, Sp	IncW	AM901564 Coetzee 1972	Plásmido silvestre. Familia IncW.
pIE321	Sm, Tc	IncW	EF633507 (Gotz, <i>et al.</i> , 1996)	Plásmido silvestre. Familia IncW.
pIE522	Gm, Km, Su, Tob	IncW	EU247928 (Gotz, <i>et al.</i> , 1996)	Plásmido silvestre. Familia IncW.
pAP711Δ OriT::tet	Tc	IncW	(Demarre, <i>et al.</i> , 2005)	Derivado no movilizable de R388 al que se le ha eliminado el <i>oriT</i> y sustituido por una resistencia a tetraciclina (<i>tetA</i>)
pAR109	Cm	IncFI	(Reisner, 2002)	pOX38Km marcado con un cassette <i>cat-pLac-yfp*</i> en el locus <i>aph</i>
pAR111	Cm	Incl1	(Reisner, 2002)	pLG221 marcado con un cassette <i>cat-pLac-yfp*</i> en el locus <i>aph</i>
pAR113	Cm	Incl1	(Reisner, 2002)	pLG272 marcado con un cassette <i>cat-pLac-yfp*</i> en el locus <i>aph</i>
pAR115	Cm	IncP	(Reisner, 2002)	RP4 marcado con un cassette <i>cat-pLac-yfp*</i> en el locus <i>aph</i>
pAR118	Cm	IncFII	(Reisner, 2002)	R1 marcado con un cassette <i>tetRA-pLac-yfp*</i> en el locus <i>cat</i>
pAR120	Tc	IncFII	(Reisner, 2002)	R1dtd19 marcado con un cassette <i>tetRA-pLac-yfp*</i> en el locus <i>cat</i>
pAR145	Tc	IncW	(Reisner, 2002)	pSU2007 marcado con un cassette <i>cat-pLac-yfp*</i> en el locus <i>aph</i>

Plásmido	Resistencia	Vector (sitios de clonaje)	Inserto	Descripción
pGP1	Km	pUA66 (<i>XhoI</i> - <i>Bam</i> HI)	234 pb (del 4214 al 4447 de R388)	Clon de la región promotora del operón <i>resP-repA</i> controlando la expresión de <i>gfpmut2</i>
pGP2	Km	pUA66 (<i>XhoI</i> - <i>Bam</i> HI)	302 pb (del 6502 al 6803 de R388)	Clon de la región promotora del operón <i>kfrA-osa</i> controlando la expresión de <i>gfpmut2</i>
pGP3	Km	pUA66 (<i>XhoI</i> - <i>Bam</i> HI)	203 pb (del 7957 al 8159 de R388)	Clon de la región intergénica entre <i>parB</i> y <i>nuc</i> controlando la expresión de <i>gfpmut2</i>
pGP4	Km	pUA66 (<i>XhoI</i> - <i>Bam</i> HI)	155 pb (del 9911 al 10065 de R388)	Clon de la región promotora del operón <i>ardC</i> controlando la expresión de <i>gfpmut2</i>
pGP5	Km	pUA66 (<i>XhoI</i> - <i>Bam</i> HI)	169 pb (del 10959 al 11127 de R388)	Clon de la región promotora del operón <i>orf7-orf9</i> controlando la expresión de <i>gfpmut2</i>
pGP6	Km	pUA66 (<i>XhoI</i> - <i>Bam</i> HI)	86 pb (del 11287 al 11367 de R388)	Clon de la región intergénica entre <i>orf7</i> y <i>orf8</i> controlando la expresión de <i>gfpmut2</i>

pGP7	Km	pUA66 (<i>XhoI</i> - <i>Bam</i> HI)	52 pb (del 11548 al 11599 de R388)	Clon de la región intergénica entre <i>orf8</i> y <i>orf9</i> controlando la expresión de <i>gfpmut2</i>
pGP8	Km	pUA66 (<i>XhoI</i> - <i>Bam</i> HI)	258 pb (del 12353 al 12610 de R388)	Clon de la región promotora del operón <i>ssb-ardK</i> controlando la expresión de <i>gfpmut2</i>
pGP9	Km	pUA66 (<i>XhoI</i> - <i>Bam</i> HI)	106 pb (del 12903 al 13008 de R388)	Clon de la región intergénica entre <i>ssb</i> y <i>ardK</i> controlando la expresión de <i>gfpmut2</i>
pGP10	Km	pUA66 (<i>XhoI</i> - <i>Bam</i> HI)	181 pb (del 13911 al 14092 de R388)	Clon de la región promotora del operón <i>orf12</i> y <i>KlcB</i> controlando la expresión de <i>gfpmut2</i>
pGP11	Km	pUA66 (<i>XhoI</i> - <i>Bam</i> HI)	200 pb (del 14973 al 15172 de R388)	Clon de la región promotora del operón <i>orf14</i> controlando la expresión de <i>gfpmut2</i>
pGP12	Km	pUA66 (<i>XhoI</i> - <i>Bam</i> HI)	496 pb (del 17076 al 17571 de R388)	Clon de la región promotora del operón <i>stbA-stbC</i> controlando la expresión de <i>gfpmut2</i>
pGP13	Km	pUA66 (<i>XhoI</i> - <i>Bam</i> HI)	496 pb (del 17571 al 17076 de R388)	Clon de la región promotora del operón <i>trwA-trwC</i> controlando la expresión de <i>gfpmut2</i>
pGP14	Km	pUA66 (<i>XhoI</i> - <i>Bam</i> HI)	240 pb (del 26252 al 26491 de R388)	Clon de la región promotora del operón <i>trwH-trwD</i> controlando la expresión de <i>gfpmut2</i>
pGP15	Km	pUA66 (<i>XhoI</i> - <i>Bam</i> HI)	190 pb (del 31741 al 31930 de R388)	Clon de la región promotora del operón <i>korA-trwI</i> controlando la expresión de <i>gfpmut2</i>
pGP16	Km	pUA66 (<i>XhoI</i> - <i>Bam</i> HI)	171 pb (del 33121 al 33291 de R388)	Clon de la región promotora del operón <i>kikA-trwN</i> controlando la expresión de <i>gfpmut2</i>
pGP17	Km	pUA66 (<i>XhoI</i> - <i>Bam</i> HI)	171 pn (del 33291 al 33121 de R388)	Clon de la región promotora del operón <i>korB</i> controlando la expresión de <i>gfpmut2</i>
pGP18	Km	pUA66 (<i>XhoI</i> - <i>Bam</i> HI)	389 pb (del 2013 al 3001 de R388)	Clon del promotor <i>Pint</i> del integrón controlando la expresión de <i>gfpmut2</i>
pGP19	Km	pUA66 (<i>XhoI</i> - <i>Bam</i> HI)	355 pb (del 2613 al 2967 de R388)	Clon del promotor <i>Pant</i> del integrón controlando la expresión de <i>gfpmut2</i>
pGP20	Km	pUA66 (<i>XhoI</i> - <i>Bam</i> HI)		
pAR1	Cm	pBAD33 (<i>XbaI</i> - <i>Hind</i> III)	<i>resP</i> _R388	Clon del ORF <i>resP</i> de R388 bajo el control del promotor <i>ParaBAD</i>
pAR2	Cm	pBAD33 (<i>XbaI</i> - <i>Hind</i> III)	<i>repA</i> _R388	Clon del ORF <i>repA</i> de R388 bajo el control del promotor <i>ParaBAD</i>
pAR3	Cm	pBAD33 (<i>XbaI</i> - <i>Hind</i> III)	<i>kfrA</i> _R388	Clon del ORF <i>kfrA</i> de R388 bajo el control del promotor <i>ParaBAD</i> .
pAR4	Cm	pBAD33 (<i>XbaI</i> - <i>Hind</i> III)	<i>ardK</i> _R388	Clon del ORF <i>ardK</i> de R388 bajo el control del promotor <i>ParaBAD</i>
pAR5	Cm	pBAD33 (<i>XbaI</i> - <i>Hind</i> III)	<i>orf7</i> _R388	Clon del ORF <i>orf7</i> de R388 bajo el control del promotor <i>ParaBAD</i>
pAR6	Cm	pBAD33 (<i>XbaI</i> - <i>Hind</i> III)	<i>orf8</i> _R388	Clon del ORF <i>orf8</i> de R388 bajo el control del promotor <i>ParaBAD</i> .
pAR7	Cm	pBAD33 (<i>XbaI</i> - <i>Hind</i> III)	<i>orf9</i> _R388	Clon del ORF <i>orf9</i> de R388 bajo el control del promotor <i>ParaBAD</i>
pAR8	Cm	pBAD33 (<i>XbaI</i> - <i>Hind</i> III)	<i>orf12</i> _R88	Clon del ORF <i>orf12</i> de R388 bajo el control del promotor <i>ParaBAD</i>
pAR9	Cm	pBAD33 (<i>XbaI</i> - <i>Hind</i> III)	<i>klcB</i> _R388	Clon del ORF <i>klcB</i> de R388 bajo el control del promotor <i>ParaBAD</i>
pAR10	Cm	pBAD33 (<i>XbaI</i> - <i>Hind</i> III)	<i>orf14</i> _R388	Clon del ORF <i>orf14</i> de R388 bajo el control del promotor <i>ParaBAD</i>

pAR11	Cm	pBAD33 (<i>Xba</i> I- <i>Hind</i> III)	<i>stbA</i> _R388	Clon del ORF <i>stbA</i> de R388 bajo el control del promotor <i>ParaBAD</i>
pAR12	Cm	pBAD33 (<i>Xba</i> I- <i>Hind</i> III)	<i>trwA</i> _R388	Clon del ORF <i>trwA</i> de R388 bajo el control del promotor <i>ParaBAD</i>
pAR13	Cm	pBAD33 (<i>Xba</i> I- <i>Hind</i> III)	<i>korA</i> _R388	Clon del ORF <i>korA</i> de R388 bajo el control del promotor <i>ParaBAD</i>
pAR14	Cm	pBAD33 (<i>Xba</i> I- <i>Hind</i> III)	<i>korB</i> _R388	Clon del ORF <i>korB</i> de R388 bajo el control del promotor <i>ParaBAD</i>
pAR15	Cm	pBAD33 (<i>Xba</i> I)	<i>gfpmut2</i> (pUA66)	Clon de <i>gfpmut2</i> bajo el control del promotor <i>ParaBAD</i>
pIC1	Tp	R388	<i>trwA</i> ⁻	R388Δ <i>trwA</i>
pIC2	Tp Km	R388	<i>trwA</i> ⁻ (Km insertion)	R388Δ <i>trwA</i> (Km insertada en el sitio de <i>trwA</i>)
pIC3	Tp	R388	<i>trwB</i> ⁻	R388Δ <i>trwB</i>
pIC4	Tp Km	R388	<i>trwB</i> ⁻ (Km insertion)	R388Δ <i>trwB</i> (Km insertada en el sitio de <i>trwB</i>)
pIC5	Tp	R388	<i>trwC</i> ⁻	R388Δ <i>trwC</i>
pIC6	Tp Km	R388	<i>trwC</i> ⁻ (Km insertion)	R388Δ <i>trwA</i> (Km insertada en el sitio de <i>trwC</i>)
pIC7	Tp	R388	<i>korB</i> ⁻	R388Δ <i>korB</i>
pIC8	Tp Km	R388	<i>korB</i> ⁻ (Km insertion)	R388Δ <i>korB</i> (Km insertada en el sitio de <i>korB</i>)
pIC9	Tp	R388	<i>kfrA-orf14</i> ⁻	R388Δ <i>kfrA-orf14</i>
pIC10	Tp Km	R388	<i>kfrA-orf14</i> ⁻ (Km insertion)	R388Δ <i>kfrA-orf14</i> (Km insertada)
pIC11	Tp	R388	<i>orf12</i> ⁻ LDRs ⁻	R388Δ <i>orf12</i> que también ha perdido la región entre las LDRs
pIC12	Tp Km	R388	<i>orf12</i> ⁻ LDRs ⁻ (Km insertion)	R388Δ <i>orf12</i> (Km insertada en el sitio de <i>orf12</i>)
pAC1	Ap	pROD17	-	Derivado Km ^S de pROD17. Contiene <i>mCherry</i> controlado por <i>Plac</i>
pAC2	Ap	pROD17	<i>dsred2</i>	Derivado Km ^S de pROD17. Contiene <i>dsred2</i> controlado por <i>Plac</i>
pAC3	Ap	pROD17	<i>gfpmut2</i>	Derivado Km ^S de pROD17. Contiene <i>gfpmut2</i> controlado por <i>Plac</i>
pAC4	Ap	pROD17	<i>mKate2</i>	Derivado Km ^S de pROD17. Contiene <i>mkate2</i> controlado por <i>Plac</i>
pAC5	Ap	pROD17	<i>cfp</i>	Derivado Km ^S de pROD17. Contiene <i>cfp</i> controlado por <i>Plac</i>
pAC6	Ap	pROD17	<i>citrus</i>	Derivado Km ^S de pROD17. Contiene <i>citrus</i> controlado por <i>Plac</i>

B. MÉTODOS

1. MÉTODOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

1.1. Extracción y purificación de DNA

Para las extracciones y purificaciones de DNA se emplearon kits comerciales.

La extracción de DNA plasmídico se realizó utilizando el kit GenElute Plasmid Miniprep Kit de Sigma. Para la purificación de DNA a partir de bandas extraídas de gel de agarosa, se utilizó GenElute Gel Extraction Kit de Sigma y, por último, para limpiar DNA o cambiarle el tampón se utilizó GenElute PCR Clean-Up Kit, también de Sigma.

En todos los casos el procedimiento se realizó siguiendo los protocolos proporcionados por el fabricante.

Para determinar la concentración de las muestras de DNA se utilizó un espectrofotómetro para la cuantificación de ácidos nucleicos *Nano-Drop Spectrophotometer ND-1000*.

1.2. Transformación

a) Transformaciones por TSB

La transformación de DNA por medio de TSB (LB pH 6,1, con 10% de PEG, 5% DMSO, 10 mM de $MgCl_2$ y 10 mM de $MgSO_4$) (Chung & Miller, 1988), es una técnica sencilla y barata que permite conseguir frecuencias de hasta 2×10^8 transformantes por μg de DNA. Además, las células que han adquirido competencia por este método pueden ser congeladas para ser transformadas en otro momento sin una pérdida significativa de eficiencia.

Para realizar la transformación, se crece en LB un cultivo bacteriano de la cepa que se quiere transformar hasta una DO_{600} de 0,3-0,6, y se recogen las células por centrifugación a 4,000 g. Las células se resuspenden en un volumen de TSB equivalente a 1/10 del volumen inicial (típicamente 1 ml de TSB a 4 °C) y se incuban en hielo durante 10 min. Manteniéndolo todo en frío, se preparan alícuotas de 0,1 ml a las que se añaden 10-100 pg del plásmido que se quiere transformar, y se mantienen en hielo durante 5-30 min. A continuación, se añaden 0,9 ml de TSB-glucosa (TSB con 20 mM de glucosa)

y se ponen a crecer las células a 37 °C con agitación durante 1h para permitir la expresión del marcador de selección. Posteriormente se siembran los cultivos en placas de LB-agar con el antibiótico adecuado para seleccionar los transformantes.

b) Transformaciones por electroporación

Otro método de transformación empleado en este trabajo ha sido la utilización de células electrocompetentes. Éste fue el método de elección cuando la frecuencia de transformación necesaria era muy alta, ya que con él se consiguen frecuencias de hasta 10^{10} transformantes por μg de DNA (Dower, *et al.*, 1988).

Para preparar células competentes para electroporar se crecen los cultivos en LB hasta una DO_{600} de 0,5-0,7 y se dejan en hielo durante 30 minutos. A continuación, se realizan varios lavados con agua milliQ estéril a 4 °C mediante centrifugación a 3000 g durante 10 min y resuspensión en agua. Se realiza un último pase resuspendiendo las células en glicerol 10% (p/v) a 4 °C y, por último, se vuelven a centrifugar y se resuspenden en un 2% del volumen inicial de glicerol 10% frío. Estas células se reparten en alícuotas de 60 μl y se conservan a -80 °C para su posterior utilización.

Para llevar a cabo las transformaciones por electroporación el DNA se dializa en filtros Millipore GS de 0,05 μm de tamaño de poro, colocados sobre una placa Petri con agua MilliQ durante 30 min. Se recoge el DNA del filtro y se añaden de 1 a 50 pg a una alícuota de las células competentes. La mezcla se deposita en el fondo de una cubeta de electroporación de 0,2 cm (Gene Pulser de BioRad) previamente enfriada en hielo, manteniendo siempre las células a 4 °C. Utilizando un electroporador MicropulserTM de BioRad se realiza la electroporación en las siguientes condiciones: 2,5 kV, 25 μF y 200 Ω . Inmediatamente después, se añade 1 ml de LB estéril a la cubeta para recuperar las células, que se incuban a 37 °C con agitación durante, al menos, 1h para permitir la expresión del marcador de selección (el tiempo puede ser mayor en función del antibiótico que se utilice para seleccionar). Posteriormente el cultivo se siembra en placas de LB-agar con el antibiótico de selección correspondiente.

1.3. Amplificación de DNA: PCR

La amplificación de fragmentos de DNA se llevó a cabo por la técnica de PCR. Siempre que se requirió una alta fidelidad en la polimerización, como en el caso de los procesos de clonación, se utilizó una polimerasa con actividad correctora de errores como la polimerasa Vent (BioLabs) o BioXact (Bioline). Para otras amplificaciones, como

en el caso de la comprobación de colonias, se utilizó la polimerasa Biotaq (Bioline). Generalmente las reacciones de PCR se hicieron en un volumen final de 50 μ l, y las concentraciones de cada reactivo se eligieron según la recomendación de cada fabricante.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador UNO II (Biometra). El programa utilizado rutinariamente consta de los siguiente pasos: un primer paso de desnaturalización de 5 min a 94 °C; 25 ciclos compuestos por 30 segundos a 94 °C para desnaturalizar la doble hebra del DNA, 30 segundos a la temperatura de hibridación adecuada, y 1 min por kb de DNA a 72 °C para la elongación del DNA; después de los 25 ciclos se añade un último paso de 10 min a 72 °C para favorecer que se complete la elongación de los fragmentos. Una vez terminada la reacción se mantienen las muestras en frío.

Para calcular la temperatura de hibridación a utilizar en las distintas amplificaciones, se calcula la T_m de los cebadores y a la más baja de las dos se le restan 5 °C.

1.4. Digestiones enzimáticas

Las digestiones enzimáticas se llevaron a cabo con enzimas de restricción de Fermentas (Ontario, Canadá), siguiendo las instrucciones dadas por la casa comercial. El volumen habitual utilizado en estas reacciones fue de 20 μ l, el tiempo de reacción una hora y la temperatura a la que se llevaron a cabo de 37 °C (siempre que no se indique lo contrario). Para inactivar las reacciones se siguieron las recomendaciones específicas para cada enzima (típicamente calentamiento a 65 °C durante 20 min, salvo excepciones).

1.5. Ligaciones

Los vectores de clonación y los fragmentos de PCR a ligar se digirieron con los enzimas de restricción seleccionados según el método que se ha indicado anteriormente. Para aumentar la eficiencia de la ligación y disminuir el número de falsos positivos, se introduce un paso de desfosforilación en el vector utilizando fosfatasa alcalina (Roche) que elimina los fosfatos terminales. Siguiendo las instrucciones del fabricante se utilizan 10 U por reacción y se mantiene 1 hora a 37 °C. La reacción se inactiva mediante incubación a 65°C 10 min.

Para las reacciones de ligación se utilizó la ligasa del fago T4 (Fermentas). Las reacciones se llevaron a cabo poniendo una relación vector/inserto 1:5 en 20 µl de volumen final, implicando típicamente 50 - 100 ng de DNA y 4 U de enzima. Las reacciones de ligación se llevaron a cabo a 22 °C durante toda la noche. Como control negativo de las ligaciones se utilizó la misma reacción sin inserto, añadiendo el volumen equivalente de agua en este caso hasta completar los 20 µl.

1.6. Secuenciación de DNA

Para comprobar la secuencia de los clones obtenidos, las muestras de DNA se enviaron al “Servicio de secuenciación de DNA HUMV-UNICAN” (Unidad de Genética Molecular, Hospital de Valdecilla, Santander), o al “Servicio de Secuenciación de DNA del CIB” (SECUGEN S.L. Madrid). Posteriormente se pasó a trabajar con el servicio de secuenciación MACROGEN Inc. DNA Sequencing Service (Seul, Korea).

1.7. Electroforesis de DNA

Para la separación de fragmentos de DNA se utilizó la electroforesis en geles de agarosa disuelta en TBE 0,5x, en porcentajes (p/v) del 1, 1,5 o 2% dependiendo del tamaño del DNA que se pretendiese resolver. Para la visualización del DNA se añadió a la agarosa bromuro de etidio a 0,25 mg/L que en las últimas etapas de este trabajo se sustituyó por Red Safe (Intron Biotechnology 20.000x fabricante) en una relación 1:100.000.

Para cargar las muestras en el gel se mezclan con 1/10 de su volumen de tampón de carga (azul de bromofenol 0,25% (p/v), glicerol 30% (v/v)). Como marcador de peso molecular se utilizó el patrón HyperLadder (Biolabs) o 100 bp para bajos pesos moleculares (Amersham), en función del tamaño del DNA que se estaba analizando.

La electroforesis se llevó a cabo en cubetas horizontales (BioRad) con tampón TBE 0.5x (Tris-HCl 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 0,5 mM pH 8,2) a voltajes entre 80-120 V, durante un tiempo variable según el voltaje y tamaño de los fragmentos empleados. Las imágenes de los geles se obtuvieron utilizando un transiluminador de luz ultravioleta GelDoc 2000 de BioRad y se analizaron con el programa Quantity One (BioRad).

1.8. Fijación de células

Para la fijación de células para citometría se utilizó un protocolo de fijación en paraformaldehído (PFA) al 4%.

Se prepara una disolución de PFA al 7,4% en agua (22,2 g PFA; 200 μ l NaOH 10N. Disolver en agua milliQ caliente a 60 °C, enrasar a 300 ml y filtrar con filtros de 0,22 μ m que se hacen alícuotas y se congela. Cuando vamos a trabajar con el fijador, las alícuotas se descongelan en un baño seco a unos 60-70 °C.

Para fijar los cultivos, se tomaron 400 μ l del cultivo o de la conjugación y se lavaron con 1 ml de PBS 1x. Posteriormente se centrifugó 3 min a 8000 r.p.m. para precipitar las células y el pellet se resuspendió en 200 μ l de PBS 2x. A esta suspensión se añadió 200 μ l del PFA 7,4% y se mezcló suavemente. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. en agitación para evitar que las células se agregasen en el fondo del tubo. Pasado el tiempo de fijación, la mezcla se centrifugó 3 min a 8000 rpm para eliminar el sobrenadante, se lavó con 1 ml de PBS 1x y finalmente las células se resuspendieron en 500 μ l de PBS 1x y se conservaron a 4 °C.

2. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS

A continuación se detalla la construcción de los principales plásmidos utilizados en este trabajo. La descripción de los plásmidos obtenidos aparece en la tabla MM4 y la secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la tabla MM3.

a) *Librería pGP*

Para analizar la capacidad de las regiones intergénicas del plásmido R388 de actuar como promotores se construyó una librería clonando estas regiones en el vector reportero pUA66. El vector pUA66 es un vector de bajo número de copias que contiene el ORF de la proteína GFPmut2, con su propio sitio de unión al ribosoma, precedida de dos dianas de restricción *Xho*I y *Bam*HI. Al clonar secuencias de DNA entre estas dianas puede ensayarse su actividad transcripcional valorando la capacidad de promover la transcripción de GFP.

Utilizando los oligonucleótidos indicados en la tabla MM3 se amplificaron las regiones intergénicas de R388. Estos fragmentos de DNA fueron purificados y

clonados en las dianas de restricción *XhoI* - *BamHI* del plásmido. Los clones obtenidos fueron analizados por secuenciación, utilizando para ello el oligonucleótido pZE05.

b) Librería pAR

Los ORFs de R388 que codificaban para posibles reguladores transcripcionales fueron clonados en el vector pBAD33. Este plásmido contiene el promotor AraBAD seguido de un MCS con los sitios de restricción *XbaI* y *HindIII*. Al clonar los ORFs precedidos de un sitio de unión al ribosoma entre estas dianas, su expresión queda controlada por el promotor arabad inducible por arabinosa.

Para realizar la librería, los ORFs de los posibles reguladores fueron obtenidos por digestión usando las enzimas *XbaI* – *HindIII* de una librería preexistente de clones de los ORFs de R388 en el vector pET3a. Los fragmentos obtenidos fueron purificados y clonados en las dianas del plásmido. Los clones obtenidos fueron analizados por secuenciación usando los oligonucleótidos pBAD1 y pBAD2. Así mismo se comprobó la correcta sobreexpresión de las proteínas tras la inducción con arabinosa mediante geles de tricina.

c) Plásmidos pIC

Se trata de una serie de deleciones de distintos ORFs del plásmido R388 realizadas mediante recombinación homóloga. Para ello se utilizó un protocolo derivado del método descrito por Wanner y Datsenko, que se describe en el apartado B3. Los genes se sustituyeron por un gen de resistencia Km amplificado del vector pUA66, que posteriormente fue eliminado mediante digestión con *KpnI*.

Los oligos y los plásmidos generados se encuentran recogidos en las tablas MM3 y MM4 respectivamente.

d) Plásmidos pAC

Son plásmidos que contienen los genes de distintas proteínas fluorescentes clonados bajo el control del promotor Plac. Estos plásmidos se construyeron a partir del pROD17.

Inicialmente se eliminó el gen de resistencia a Km mediante digestión *BglII* – *BamHI*, obteniéndose el derivado Ap^R Km^S pAC1.

Posteriormente pAC2, pAC3, pAC4 y pAC5 se obtuvieron por digestión EcoRI - SalI de pAC1, lo que elimina el gen correspondiente a la *mcherry*, que fue sustituido por un amplicón obtenido por PCR de los genes correspondientes a otras proteínas fluorescentes: *dsred2* (Bevis & Glick, 2002), *mkate2* (Shcherbo, *et al.*, 2009), *venus* (Nagai, *et al.*, 2002) y *cfp* (Rizzo, *et al.*, 2004). Los clones se comprobaron por secuenciación con el oligo pRODseq1.

3. MÉTODO DE WANNER Y DATSENKO

Una modificación de este método basado en el sistema recombinativo RED (Datsenko & Wanner, 2000) fue utilizado para realizar construcciones por delección de genes en R388, mediante la inducción de fenómenos de recombinación homóloga entre un plásmido determinado y un producto de PCR con secuencias homólogas a dicho plásmido. El proceso se encuentra esquematizado en la figura MM1.

Este sistema ha demostrado ser altamente eficiente para realizar construcciones por recombinación homóloga entre DNA cromosómico o plasmídico y un fragmento lineal de PCR, utilizando secuencias de homología cortas de 30 a 50 pares de bases.

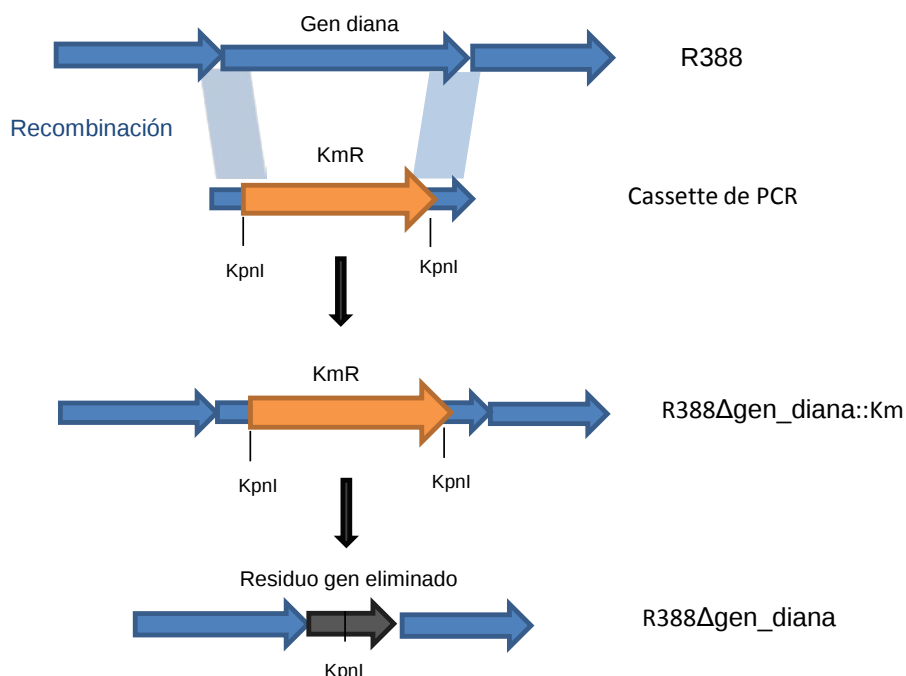


Figura MM1. Esquema de los pasos seguidos para la eliminación de ORFs en R388 siguiendo una modificación del método desarrollado por Wanner y Datsenko.

Para preparar las células electrocompetentes y generar recombinantes se procedió según el método descrito por Lee *et al.* (Lee, *et al.*, 2001). Se utilizó la cepa de *E. coli* DY380 que contiene los genes implicados en la recombinación RED clonados bajo el control de un represor sensible a temperatura, de manera que cuando la bacteria se expone a una temperatura de 42 °C, se induce la expresión de los genes recombinativos, junto con un inhibidor de las nucleasas RecBCD que impide el ataque al DNA lineal electroporado. Todo el trabajo rutinario con esta cepa se realizó a 30 °C para evitar la expresión innecesaria del sistema de recombinación.

Se diseñaron oligos (tabla MM3) para amplificar por PCR el gen de la resistencia a Km de pAU66, añadiendo a ambos lados regiones de 30-50 pb de homología con el gen que se quería eliminar. Una vez obtenida la banda correspondiente a la amplificación del gen de resistencia, ésta se purificó.

Por otro lado, se introdujo el plásmido R388 por conjugación en la cepa DY380 y se creció un cultivo del transconjugante a 30 °C con agitación hasta DO₆₀₀ 0,5-0,7. A continuación, se incubó el cultivo durante 15 minutos a 42 °C para inducir la expresión del sistema de recombinación y tras ese tiempo se procesaron las células para hacerlas electrocompetentes (apartado B1.2 de materiales y métodos).

Para llevar a cabo la transformación, se añadió 100 ng del producto de PCR purificado y se transformó de acuerdo a lo descrito previamente. Puesto que nuestro fragmento de PCR contenía extremos homólogos a las secuencias diana en R388, el sistema de recombinación podía reconocer y recombinar el DNA introducido con el del plásmido, resultando en la obtención de un R388 con la sustitución de los genes deseados por el del gen de resistencia a Km flanqueado por las secuencias de homología.

Tras una incubación de 2h a 30 °C, la transformación se sembró en placas de LB Agar con Km y se dejó crecer a 30 °C durante toda la noche. Se comprobaron las colonias obtenidas por PCR para verificar la sustitución de los genes deseados.

Una vez aislado y comprobado el mutante, se eliminó el gen de resistencia a Km mediante digestión del DNA con la enzima *KpnI*.

4. CONJUGACIONES

4.1. Conjugaciones en filtro

Las conjugaciones se realizaron tal y como se describe en Grandoso *et al.* (Grandoso, *et al.*, 2000).

Los cultivos de donadoras y receptoras se crecieron hasta fase estacionaria con los antibióticos adecuados. En un tubo eppendorf se mezclaron 100 µl de células donadoras con 100 µl de células receptoras y se lavaron centrifugando y resuspendiendo en el mismo volumen de LB estéril para eliminar los restos de antibióticos. Tras una nueva centrifugación el pellet se resuspendió en 20 µl de LB. Las conjugaciones se realizaron en placas de LB-Agar, ya que se ha descrito que tanto el plásmido R388 como sus derivados conjugan mejor en sólido que en líquido (Bradley, 1980). Para ello, se preincubó la placa de Petri LB-Agar a 37 °C con un filtro de nitrocelulosa de 0,22 µm de tamaño de poro y 25 mm de diámetro (GS Millipore). Los 20 µl de mezcla conjugativa se extendieron sobre dicho filtro, y se mantuvo la placa a 37 °C durante 60 min. En ese momento, se recogió el filtro con pinzas estériles y se introdujo en 1 ml de LB estéril, donde se resuspendió por medio de vórtex para desprender las células y parar la conjugación. Este tubo constituyó la dilución cero.

Se prepararon diluciones seriadas 1/10 y se sembraron en placas de LB-Agar con el antibiótico apropiado para seleccionar células donadoras, las células receptoras y los transconjugantes. Las frecuencias de conjugación se determinaron calculando el número de transconjugantes por donador o por receptor.

Teniendo en cuenta que las frecuencias de conjugación siguen una distribución de Poisson se calcularon los logaritmos en base 10 de las frecuencias para obtener las medias y desviaciones estándar utilizando los valores logarítmicos. El rango de las frecuencias se consiguió sumando y restando la desviación estándar a la media logarítmica y calculando a continuación el antilogaritmo de los valores resultantes.

4.2. Conjugaciones en placa

Los ensayos de conjugación en placa se pusieron a punto en placas de 24 pocillos, en las que se añade 1 ml de LB-agar por pocillo.

Los cultivos de donadores y receptores se crecieron a partir de colonia puntual en medio LB con antibiótico y 0,5 mM IPTG (cuando quisimos activar la expresión del promotor Plac), durante toda la noche a 37 °C con agitación. Al día siguiente los cultivos saturados se lavaron para eliminar los restos de antibiótico, centrifugando y resuspendiendo en LB fresco, se midió la OD₆₀₀ y se mezclaron donadores y recipientes en las proporciones adecuadas en función de la OD obtenida, para conseguir la relación donador:recipiente deseada en cada caso. La mezcla se centrifugó 5 min a 4000 g y se resuspendió en 1/10 del volumen inicial de LB con 0,5 mM IPTG.

Una vez preparada la mezcla, 15 µl (correspondiente a una OD₆₀₀= 0.6 (aproximadamente 6×10^8 células)) se extendieron sobre la superficie de cada pocillo relleno con agar y la placa se incubó a 37 °C. Transcurrido el tiempo deseado en cada caso, la mezcla de conjugación del pocillo se resuspendió en 1 ml de PBS y se prepararon diluciones seriadas para plaquear en medio de selectivo para donadores, recipientes y transconjugantes. Alternativamente, cuando se llevó a cabo análisis por citometría, se fijó una muestra con paraformaldehído al 4% (siguiendo el protocolo descrito en el apartado B1.8) y se guardó a 4 °C hasta que fue utilizada.

En el caso de tiempos de incubación muy largos (24h), el exterior de la placa multipocillo se rellenó con agua para evitar que el agar se secase demasiado durante la incubación.

Para plaquear las conjugaciones se preparó una batería de diluciones 1/10. En placas con los antibióticos correspondientes se sembró una gotita de 10 µl de cada dilución (desde la 0 a la -6) por triplicado. De esta manera se preparó una placa para donadores, una para recipientes y otra para transconjugantes que se crecieron a 37 °C toda la noche. Al día siguiente se contaron las colonias en la dilución contable que tenga mayor número de colonias y el resultado obtenido para las tres réplicas de la misma dilución se promedió. Con el resultado obtenido se calculó la frecuencia de conjugación por donador o por receptor.

5. ENSAYOS CON FLUORESCENCIA

5.1. Determinación de la actividad transcripcional

Para el análisis de la actividad transcripcional se realizaron perfiles de expresión de GFP, midiéndose la fluorescencia emitida por el cultivo a lo largo del tiempo. Para

ello se siguió el método descrito en (Zaslaver, *et al.*, 2006) con algunas modificaciones. Las medidas se llevaron a cabo usando un lector de placas Victor3 de Perkin Elmer con dispensador, equipado con filtros de excitación y emisión adecuados para leer fluorescencia de GFP (485 ± 15 ; 535 ± 25) y absorbancia a 600 nm.

Los cultivos con el plásmido reportero deseado se crecieron en medio M9 suplementado con glicerol y casaminoácidos, con el antibiótico de selección correspondiente, a 37 °C con agitación hasta que se obtuvo un cultivo saturado. Éste se diluyó 1:10.000 en el mismo medio y se prepararon placas de 96 pocillos, añadiendo 150 µl por pocillo. Las placas se pusieron a crecer en el lector de placas Victor 3 programado para incubar a 37 °C con agitación orbital durante 12 h, tomando medidas de fluorescencia y absorbancia de cada pocillo aproximadamente cada 5 minutos. Para compensar la evaporación durante la incubación, cada tres pasos de lectura se inyectó agua en los pocillos (la evaporación en nuestro lector de placas se calculó que era de 0,28 µl por minuto y por pocillo).

El procesamiento de los datos obtenidos se llevó a cabo como en (Zaslaver, *et al.*, 2006) con algunas modificaciones (Fernandez-Lopez, *et al.*, 2010). A los puntos de OD se les restó el fondo, calculado a partir de un pocillo que contenía únicamente medio de cultivo. El fondo para las lecturas de fluorescencia se obtuvo de las medidas de cultivos con el pUA66 sin ningún promotor clonado (vector vacío) y se restó a los valores obtenidos para la librería de clones pGP en la misma OD.

Para obtener los perfiles de expresión de cada promotor se representó el valor de fluorescencia obtenido partido por la OD, frente al crecimiento del cultivo calculado a partir de la OD medida transformada a valores equivalentes de OD₆₀₀ para cubetas de 1 cm de lado. La actividad promotora se determinó a partir de los valores de fluorescencia/OD cuando el sistema adquiría el estado de régimen o estado estacionario.

Este método se comprobó que era equivalente al método descrito por el laboratorio de U. Alon de medida de $(dGFP/dt/OD)$ y cálculo del máximo, con la ventaja de promediar varios datos alrededor del estado estacionario del promotor (Fernandez-Lopez, *et al.*, 2010).

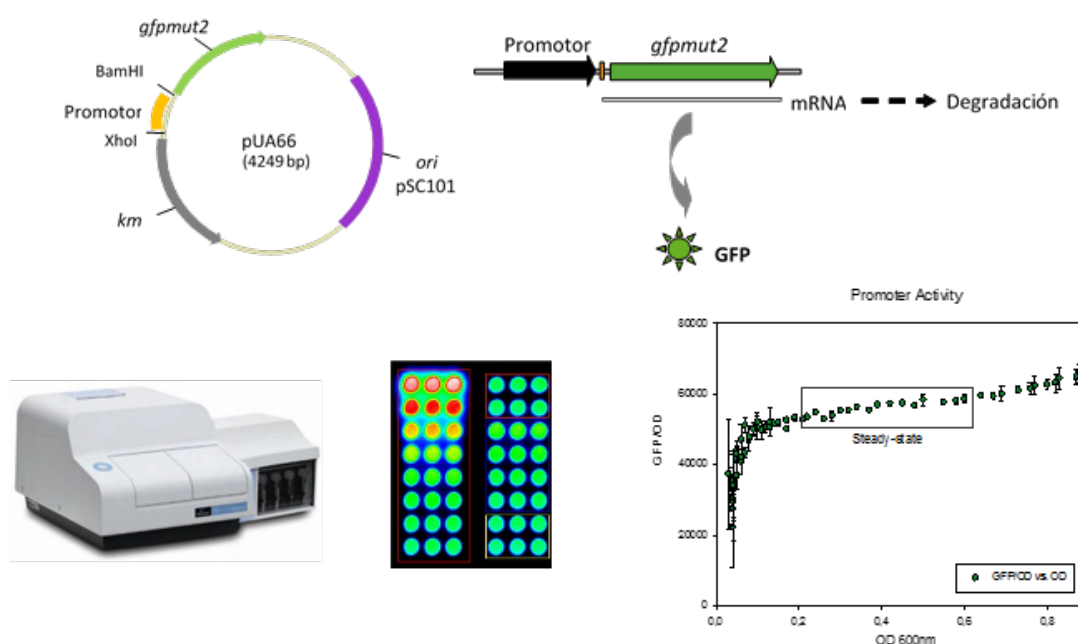


Figura MM2. Representación del sistema utilizado para determinar la actividad transcripcional de promotores.

Los fragmentos que contienen los posibles promotores se clonan en el vector pUA66, controlando la expresión de *gfpmut2*, de manera que si existe actividad promotora se transcribirá el gen produciendo proteína fluorescente GFP. Los cultivos de células conteniendo estas construcciones se miden utilizando un lector de placas Victor3, con filtros para medir OD y fluorescencia. Con los datos obtenidos se obtiene el perfil de expresión del promotor representando la fluorescencia por célula (GFP/OD) frente al crecimiento de los cultivos (OD_{600}), se identifica el estado estacionario y se calcula la actividad del promotor promediando los valores.

5.2. Citometría de flujo

Los ensayos de citometría de flujo se realizaron utilizando un citómetro FACScanto II (Beckton Dickinson) equipado con un láser de estado sólido de 488 nm, un láser HeNe de 633 nm y un láser de diodo de estado sólido de 405 nm.

La detección de la fluorescencia se llevó a cabo utilizando los siguientes filtros:

- 530/30 nm band pass (FL1) para fluorescencia de GFP e YFP
- 585/42 nm band pass (FL2) o 670 nm long pass (FL3) para la fluorescencia roja
- 450/50 nm band pass para la fluorescencia CFP

Todos los datos se recogieron en escala logarítmica, incluyendo FSC y SSC. En una representación FSC vs. SSC se estableció la población de bacterias que se seleccionó como P1. En todos los experimentos se recogieron al menos 20.000 eventos en P1 que se analizaron en los canales de fluorescencia adecuados según las proteínas fluorescentes utilizadas en cada experimento.

En los experimentos de conjugación, los datos recogidos en P1 se analizaron utilizando gráficos GFP vs. RFP o bien YFP vs. CFP, donde se establecen cuadrantes para delimitar las regiones correspondientes a los cuatro tipos de poblaciones (figura MM3)

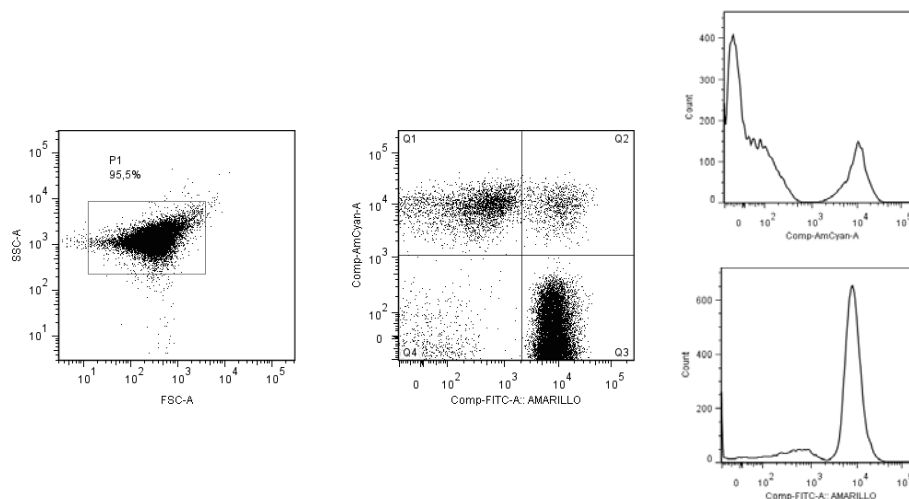


Figura MM3. Representación de los datos en los experimentos de citometría.

En la figura se muestran la acotación de poblaciones en los datos obtenidos por citometría de flujo. En un gráfico FSC vs. SSC (gráfico de la izquierda) se identifica, por tamaño y complejidad, la población correspondiente a *E. coli* que será la población de trabajo P1. Los datos contenidos en P1 se representan en un gráfico YFP vs. CFP (gráfico del medio) donde se lleva a cabo el estudio de las distintas poblaciones en relación a la expresión de los marcadores fluorescentes: Q1 corresponde a los eventos YFP-CFP+; Q2 los dobles positivas YFP+CFP+; Q3 son YFP+CFP-; Q4 los dobles negativos. Por último a la derecha se muestran histogramas de cada uno de los parámetros fluorescentes representados individualmente (arriba CFP y abajo YFP).

En cada experimento de citometría de flujo se utilizaron los controles adecuados en función de los datos a adquirir. En todos los casos se utilizó un control negativo (o blanco) y controles simples positivos para cada uno de los fluoróforos presentes en el ensayo. Cuando fue posible se utilizaron también controles dobles positivos para las fluorescencias utilizadas.

6. ENSAYOS DE ESTABILIDAD

Se realizaron adaptando el protocolo descrito por De Gelder (De Gelder, *et al.*, 2007). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado partiendo de tres colonias aisladas que se inocularon en 5 ml de LB con los antibióticos correspondientes y se crecieron hasta saturación a 30 °C o 37 °C con agitación. 1 ml de los cultivos saturados, se centrifugó y se resuspendió en LB fresco para eliminar cualquier resto de antibiótico

y 5 µl se transfirieron a un matraz con 5 ml de LB fresco. Una muestra de este cultivo recién inoculado se diluyó y se sembró en placas de LB-agar para obtener el valor a tiempo 0, el resto del cultivo se puso a crecer a 30 °C o 37 °C con agitación durante 12h. Una vez que el cultivo ha vuelto a saturarse se transfieren de nuevo 5 µl a un matraz con 5 ml de LB fresco, que se pone a crecer a 30 °C o 37 °C con agitación otras 12h.

Este mismo esquema se repitió cada 12h hasta obtener unas 100 generaciones. Se consideró que cada paso de dilución 1/1000 daba lugar a 10 generaciones antes de que el cultivo volviese a alcanzar la saturación (12h). Cada 20 generaciones los cultivos fueron diluidos y plaqueados en LB-agar. La determinación de la fracción de células libre de plásmido se hizo replicando 100 colonias de cada placa de LB-agar en placas de LB-agar con el antibiótico de selección del plásmido y de LB-agar sin antibiótico. Las células que han perdido el plásmido no crecen en la placa con el antibiótico de selección.

7. MEDIDA DEL NÚMERO RELATIVO DE COPIAS DE PLÁSMIDO

Los experimentos para obtener el número de copias de los plásmidos IncW se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito en Lee *et al.* (Lee, *et al.*, 2006) para la cuantificación relativa. Este método permite la cuantificación del número de copias mediante PCR tiempo real cuantitativa, comparando la amplificación obtenida para un gen diana (gen del plásmido) respecto a un gen de referencia presente en el cromosoma bacteriano.

Se crecieron cultivos de DH5α con pIE321, R388 y R7K, a 37 °C durante toda la noche. Estos cultivos se diluyeron y se crecieron hasta una OD₆₀₀ de 0,4 – 0,6 y se extrajo el DNA total de cada uno de ellos utilizando el kit QIAamp DNA Mini kit (Qiagen) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante para células bacterianas. La concentración de DNA extraído de *E. coli* se midió y se normalizó a 2 ng/l con agua desionizada y destilada (ddW). Este DNA molde preparado se utilizó para cuantificar el número de copias mediante experimentos de PCR tiempo real, llevados a cabo por triplicado.

El ensayo de PCR tiempo real se realizó utilizando cuatro parejas de oligos que amplifican regiones diana conservadas en los tres plásmidos y dos parejas de oligos para amplificar dos genes de referencia en el cromosoma bacteriano, *rho* y *dxs* (ver tabla MM5). La amplificación y análisis por qPCR se llevó a cabo usando un equipo iQ5 de Bio-Rad, determinándose el ciclo umbral (Ct) utilizando el software del equipo.

Previamente a los experimentos se comprobó que la eficiencia de todos los oligos era equivalente utilizando cuatro diluciones 1/10 de la muestra y aplicando la fórmula ($E=10^{(-1/\text{pendiente})-1}$).

Nombre	Secuencia (5'→3')	Producto
orf7left	GAAGGCCGCGAGAACTGAC	<i>orf7-8</i>
orf8right	ATGTCGGGCACTTCGTAATC	
klcbleft	ATAAAGCCCCGTTTGCATC	<i>klcB-orf14</i>
orf14right	GTTTCCGCCTTGTGCGAAATA	
trwCleft	CAACAGCCCGCGCATGATC	<i>trwC-D</i>
trwDright	TTCAAAGATCGGAAGCTGGT	
int14right	GCCTTCGTTAGGTGCTGAA	<i>oriV</i>
respleft	CGAGCAAACCGTATTTTTTG	
rhodir	AAATATGGGGCTGGAAAACC	<i>rho</i>
rhorev	GTAGGAGCTGTCTGCGGAAC	
dxsdir	CGAGAAACTGGCGATCCTTA	<i>dxs</i>
dxsrev	CTTCATCAAGCGGTTTCACA	

Tabla MM5. Oligonucleótidos utilizados en los experimentos PCR tiempo real.

En la tabla se recogen las parejas de oligos y las dianas amplificadas en los experimentos de cuantificación relativa de los plásmidos. Los cuatro primeros (*orf7-8*; *klcB-orf14*; *trwC-D*; *oriV*) corresponden a marcadores del plásmido, mientras que los dos últimos (*rho*; *dxs*) son genes del cromosoma utilizados como referencia.

La mezcla de QPCR se preparó en un volumen de 20 µl usando IQ SYBER Green Supermix y el protocolo de amplificación utilizado fue: 10 min a 95 °C de desnaturalización inicial, seguido de 40 ciclos de 10 s a 95 °C, 10 s a 62 °C y 10 s a 72 °C. La señal de fluorescencia se midió al final de cada paso de extensión a 72 °C. Tras la amplificación, se llevó a cabo el análisis de la curva de melting para confirmar que solo se hubiese producido amplificación de los productos específicos.

Para la obtención del número de copias relativo se calculó ΔC_t (C_t cromosoma - C_t plásmido) para cada uno de los plásmidos, obteniéndose el número de copias como $2^{\Delta C_t}$.

8. TEORÍA: ESTIMACIÓN DE LA TASA DE CONJUACIÓN A TIEMPO FINAL (v)

Con el fin de obtener un indicador robusto de la transferencia plasmídica, seguimos el modelo propuesto por Levin (Levin, *et al.*, 1979) según las adaptaciones de Simonsen (Simonsen, *et al.*, 1990) y Zhong *et al.* (Zhong, *et al.*, 2012) para estimar la tasa de conjugación γ .

Debido a las características de nuestro procedimiento experimental, que transfiere únicamente el *oriT* en lugar de un plásmido *tra*⁺ completo y la utilización de la citometría de flujo para obtener los datos, adaptamos la ecuación para el cálculo de γ_{ep} descrita en el modelo anterior según se expone a continuación.

Mantenemos las asunciones de las citadas referencias: i) la conjugación ocurre de manera aleatoria, ii) no hay pérdida significativa del plásmido por segregación, iii) todas las células bacterianas tienen la misma velocidad de crecimiento y, a diferencia del modelo original, la cuarta asunción es que: iv) los transconjugantes no son capaces de transferir el plásmido a nuevos receptores.

Con estas restricciones iniciales, el sistema de ecuaciones diferenciales para las densidades dependientes del tiempo de los tres tipos celulares (D, R y T) y la concentración de nutrientes (C) vendría dado por:

$$\begin{aligned}\dot{R} &= \psi(C).R - \gamma(C).R.D \\ \dot{D} &= \psi(C).D \\ \dot{T} &= \psi(C).T + \gamma(C).R.D \\ \dot{C} &= -\psi(C).(R + D + T).e\end{aligned}$$

donde ψ denota la tasa de crecimiento (h^{-1}), γ la tasa de conjugación ($ml\ cel^{-1} h^{-1}$) y e (μg) es la cantidad de recurso requerido para producir una nueva célula.

Según establece Simonsen *et al.* (Simonsen, *et al.*, 1990), el crecimiento y las tasas de transferencia son iguales para todos los tipos celulares (D, R y T) y funciones de Monod (Monod, 1949) de la concentración de nutrientes:

$$\begin{aligned}\psi(C) &= \psi_{max} C / (C + K) \\ \gamma(C) &= \gamma_{max} C / (C + K)\end{aligned}$$

donde γ_{max} es el valor estimado por el método de punto final (desde ahora γ_{ep}) y K es la constante de media saturación ($\mu g\ mL^{-1}$). De las asunciones sobre dependencia de nutrientes de las constantes de crecimiento y conjugación, se puede inferir que $\gamma(C)/\psi(C) = \gamma_{ep}/\psi_{max}$ es una constante. Esta apreciación es crucial en la derivación de

las ecuaciones para calcular γ , como se explica en Levin et al. (1979) y Simonsen et al. (1990). Simonsen demostró mediante simulaciones complejas que estas estimaciones son bastante robustas y que las diferencias en las tasas de crecimiento de D, R y T tienen poco efecto en el resultado (excepto cuando las células que llevan el plásmido tienen ventaja en el crecimiento).

Del desarrollo posterior de las ecuaciones puede ser deducido que la estimación de la tasa de conjugación de punto final cuando los transconjugantes no son capaces de volver a transferir el plásmido vendría dada por:

$$\gamma_{ep} = \psi_{max}(D - D_0)^{-1} \ln\left(\frac{T}{R} + 1\right)$$

donde D sería la densidad a tiempo final de los donadores y D_0 la densidad inicial (cel mL^{-1}). Dado que en nuestro modelo experimental la frecuencia de conjugación viene dada $Y = T/(R + T)$, entonces la ecuación (2) se puede convertir en:

$$\gamma_{ep} = \psi_{max}(D - D_0)^{-1} \ln\left(\frac{1}{1 - Y}\right)$$

De esta manera, la primera ecuación usaría los parámetros T y R obtenidos en los ensayos de citometría de flujo mientras que la segunda usa las frecuencias de conjugación obtenidas en los experimentos por el método tradicional de plaqueo.

9. OBTENCIÓN DE CURVAS DE CRECIMIENTO Y CÁLCULO DEL TIEMPO DE GENERACIÓN

La obtención de curvas de crecimiento bacteriano se llevó a cabo utilizando un lector de placas Victor3 (Perkin Elmer) equipado con un filtro de 600 nm y placas microtiter de 96 pocillos.

Los cultivos de interés se crecieron a partir de colonias puntuales toda la noche a 37 °C en medio LB con los correspondientes antibióticos. Una vez crecidos los cultivos se diluyeron 1:1000 en LB fresco y se pusieron a crecer en placas de 96 pocillos en el Victor3 programado para incubar a 37 °C con agitación orbital durante 8h, midiendo la absorbancia de los pocillos cada 5 min. Para contrarrestar la evaporación se introdujo un paso de inyección de agua en los pocillos.

Los valores de absorbancia contenidos en el equipo se transformaron en equivalentes de OD600 usando una curva calibrada con medidas realizadas en cubetas de 1cm de lado en un espectrofotómetro convencional. Cada experimento consta de 8 réplicas de cada cultivo, que se promediaron obteniéndose también la desviación estándar de las medidas, que se representa en las gráficas como barras de error de cada punto de la curva.

El tiempo de generación en fase exponencial se calculó de los datos de OD600. Se obtuvo el ln de los valores de OD600 entre 0,2 y 0,5, y se calculó la tasa de crecimiento (α) por regresión lineal. El tiempo de generación se calculó aplicando la fórmula $g = \ln(2)/\alpha$

10. PURIFICACIÓN DE ResP DE R388

Para su purificación, ResP se expresó como una proteína recombinante unida a una cola de histidinas y se purificó por cromatografía de afinidad utilizando una columna HisTrap HP (GE healthcare) y un segundo paso de cromatografía de gel filtración con Superdex S75 (GE healthcare).

El gen *resP* de R388 se amplificó utilizando los oligos resPNdel y resPXhoI (tabla MM3 de materiales y métodos) que añaden sitios de corte para las enzimas *NdeI* (en el extremo 3' del fragmento) y *XhoI* (en el 5') y se clonó en el vector de expresión pET29c (Novagen) utilizando los sitios de corte del vector. La construcción se introdujo por electroporación en la cepa *E. coli* C41 (Miroux and Walker 1996) para su sobreexpresión y purificación.

Se creció un preinóculo de C41 (pET29c-resP) a 37 °C en 25 ml de LB con Km. Con este cultivo se inoculó un matraz de 1 litro de medio LB y se creció hasta una OD₆₀₀ de 0.6 momento en el que se añadió 0.5 mM de IPTG y se incubaron las células a 37 °C durante 3h más para permitir la expresión. Transcurrido este tiempo, las células se recogieron por centrifugación y el pellet se congeló a -80 °C.

Para proceder a la purificación, el pellet de células se resuspendió en 45 ml de buffer A (50 mM Tris pH 7.5, 1M NaCl) con 0.002% PMSF. Las células se lisaron por sonicación usando un sonicador Vibra Cell (Sonic & Materials Inc.) y el lisado se centrifugó a 40,000 g durante 20 minutos at 4 °C.

El sobrenadante obtenido se cargó en una columna His trap HP (GE healthcare) previamente equilibrada con buffer A (50 mM Tris pH 7.5, 1M NaCl). Tras pasar la muestra, las proteínas unidas a la columna fueron eluidas en un gradiente lineal de imidazol (0–500 mM) utilizando buffer B (50 mM Tris pH 7.5, 1 M NaCl, 500 mM imidazol).

Las fracciones en las que eluyó ResP se cargaron en una columna de gel filtración Superdex 75 (GE healthcare) equilibrada con buffer C (Tris 50 mM pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) y eluida con el mismo buffer. Se identificaron las fracciones con ResP-His purificada y se guardaron a -80 °C añadiendo 20% glicerol.

Para comprobar el adecuado progreso de cada uno de los pasos de la purificación, se guardaron muestras que se corrieron en geles SDS-PAGE 10%. Las muestras se mezclaron 1/5 en tampón de carga (SAB 5x: Tris-HCl pH 6,8 250 mM, SDS 5 % (p/v), glicerol 50 % (p/v), azul de bromofenol 0,05 % (p/v), DTT 250 mM) y se calentaron durante 2 minutos a 95 °C. La electroforesis se llevó a cabo en tampón Tris 25mM, glicina 192mM, SDS 0,1% (p/v) a 100V. Tras la electroforesis, los geles se tiñeron con tinción de Coomassie.

11. ENSAYOS DE RETARDO EN GEL CON RESP (EMSA)

Utilizando una batería de oligos (tabla MM3) se generaron distintos fragmentos de dsDNA mediante PCR sobre el plásmido R388.

En un ensayo EMSA estándar, se mezclaron 0.2-0.5 pmol de los fragmentos de DNA con concentraciones crecientes de ResP-His purificada, en un volumen final de 20 µl de reacción (50mM Tris pH7.5, 50mM NaCl, 1mM DTT, 0.1 mM EDTA, 5% glicerol) y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente.

Tras la incubación, las mezclas de reacción se cargaron en un gel nativo de poliacrilamida al 5%. La electroforesis se desarrolló a 100V durante 45 min en tampón TBE. Para revelar el gel, éste se tiñó usando una solución 1x de SYBR Gold y se escanearon usando un sistema de análisis de imagen FLA-5100 (Fujifilm) con un láser de 473 nm.



RESULTADOS

RESULTADOS

1. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL PLÁSMIDO R388

Numerosos estudios a nivel bioquímico han hecho del plásmido R388 uno de los modelos fundamentales en el estudio de la transferencia conjugativa en enterobacterias. Sin embargo, a pesar del conocimiento detallado de la bioquímica de las proteínas implicadas en la conjugación, al comienzo de esta tesis existía un desconocimiento general sobre otros aspectos fundamentales de la biología del plásmido. Estudios de secuenciación revelaron la presencia de un gran número de secuencias repetidas en el genoma del plásmido (Fernandez-Lopez, *et al.*, 2006). Estos mismos estudios y otros datos obtenidos en nuestro laboratorio (Fernandez-Lopez, 2007) indicaban la presencia de al menos 5 reguladores transcripcionales y apuntaban la posible existencia de una red global de control transcripcional en el plásmido.

En base a estos resultados preliminares, uno de los objetivos fundamentales de esta tesis consistió en la caracterización cuantitativa de la red de regulación transcripcional del plásmido.

1.1. Determinación de la actividad transcripcional de los promotores de R388

La primera tarea en el estudio de la red transcripcional de R388 fue caracterizar la actividad transcripcional de sus promotores hipotéticos. Basándonos en la secuencia genética del plásmido R388 (nº acceso BR000038) clonamos las regiones intergénicas incorporando fragmentos de unos 200 pb en el vector reportero de bajo número de copias pUA66. Este procedimiento se llevó a cabo siguiendo lo descrito en materiales y métodos para la construcción de la librería pGP (apartado B2). Estas regiones fueron clonadas de forma que el fragmento controlaría la transcripción de un gen *gfpmut2* precedido de un RBS fuerte. GFPmut2 (Cormack, *et al.*, 1996) es una proteína fluorescente verde que madura en 5 minutos, es estable y no tóxica en *E. coli*, de manera que la producción y acumulación de fluorescencia en las células nos permitiría detectar la presencia de actividad transcripcional en los fragmentos clonados. (Zaslaver, *et al.*, 2006).

Los clones de los posibles promotores se introdujeron en la cepa de *E. coli* BW27783, que es la cepa utilizada preferentemente en prácticamente todos los experimentos de este trabajo. Se trata de un derivado de *E. coli* K12, con la mutación *lacI^q*, con el sistema de transporte de arabinosa modificado y capaz de crecer en medio mínimo, por lo que se ajusta muy bien a las necesidades de nuestros experimentos.

Se midió la producción de fluorescencia de la librería pGP utilizando un lector de placas Victor3, siguiendo el método descrito en la sección B5.1 de materiales y métodos para la determinación de la actividad transcripcional. De esta manera, los plásmidos reporteros construidos nos permiten inferir la actividad transcripcional de las regiones intergénicas clonadas en ellos.

Para llevar a cabo estas medidas, se decidió sustituir el medio LB utilizado de manera rutinaria para crecer los cultivos de *E. coli* por un medio mínimo M9 suplementado con casaminoácidos y glicerol. La elección de este medio de cultivo se debe a que presenta varias características que resultan ventajosas para nuestros experimentos. Por un lado, es un medio con poca autofluorescencia, de manera que permite reducir mucho la señal fondo y aumentar la sensibilidad de los ensayos. Por otro lado, es un medio definido (a diferencia del LB) lo que nos permite mantener unas condiciones de cultivo uniformes en los distintos ensayos. La utilización de un medio mínimo con glicerol como fuente carbono contribuyó a aumentar la sensibilidad de los ensayos ya que al aumentar los tiempos de generación nos permitió alargar la duración de la fase exponencial en las medidas en el lector de placas. Además, la utilización de glicerol como fuente de carbono nos proporciona un medio donde podemos utilizar arabinosa y glucosa para trabajar con el sistema de expresión *araBAD*.

La actividad transcripcional de la librería pGP se midió de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, y los resultados recogidos en la tabla R1 y figura R1, representan el promedio y la desviación estándar de al menos 10 experimentos independientes.

Tabla R1. Actividad transcripcional obtenida para los distintos clones pGP en unidades arbitrarias de fluorescencia.

<i>Plásmido</i>	<i>Actividad transcripcional (u.a.f) (x10²)</i>	<i>SD (x10²)</i>	<i>Promotor</i>
pGP1	432	43	<i>P_{resP}</i>
pGP2	230	16	<i>P_{kfrA}</i>
pGP3	< 1	2	-
pGP4	1136	425	<i>P_{ardC}</i>

pGP5	808	96	P_{ORF7}
pGP6	< 1	3	-
pGP7	< 1	3	-
pGP8	758	59	P_{ssb}
pGP9	< 1	3	-
pGP10	465	53	P_{ORF12}
pGP11	197	32	P_{ORF14}
pGP12	859	77	P_{stbA}
pGP13	161	29	P_{trwA}
pGP14	628	63	P_{trwH}
pGP15	578	54	P_{korA}
pGP16	672	80	P_{kikA}
pGP17	9	5	P_{korB}
pGP18	4	9	P_{int}
pGP19	945	94	P_{ant}
pGP20	< 1	2	-

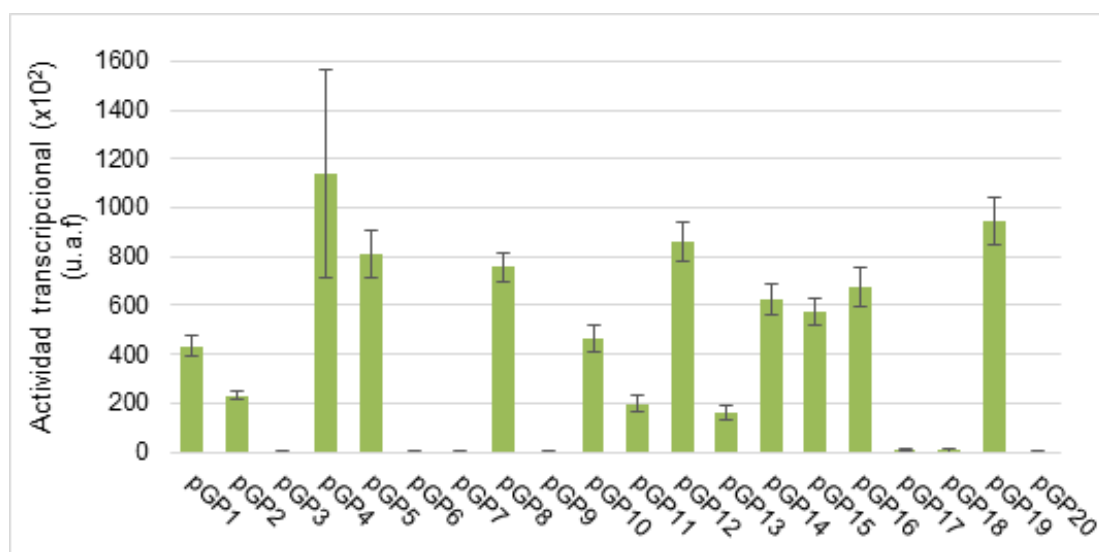


Figura R1. Actividad transcripcional calculada para cada uno de los posibles promotores de R388 contenidos en la librería pGP.

Las medidas se realizaron en un lector de placas Victor3 según el procedimiento indicado en materiales y métodos (B5.1), realizándose al menos 10 medidas independientes de cada dato. Las columnas del gráfico representan el promedio de la actividad obtenida para cada uno de los posibles promotores y las barras de error corresponden a la desviación estándar. La actividad transcripcional se expresa como cantidad de fluorescencia por célula (GFP/OD₆₀₀).

De todas las regiones clonadas en la librería pGP, se consideró que contenían un promotor aquellas que manifestaron una expresión de fluorescencia de, al menos, dos veces la medida para el vector pUA66 vacío. Así, de las 20 regiones seleccionadas inicialmente se determinó que 15 de ellas contendrían un promotor, mientras que las otras no parecían manifestar actividad transcripcional significativa.

Como las medidas de actividad transcripcional obtenidas en el lector de placas son medias poblacionales, los cultivos se pasaron por citometría de flujo para comprobar la uniformidad de la población, comprobándose en todos los casos que se obtenía un solo pico de fluorescencia con una distribución uniforme (datos no mostrados). Únicamente se encontró un comportamiento diferente en el caso de pGP4, que ya había mostrado un comportamiento bastante variable en las medidas en el lector de placas. Recién aislado este promotor presenta un pico de fluorescencia muy alta bien definido, pero con el tiempo la población se va disgregando apareciendo varios picos en el citómetro con una fluorescencia intermedia o baja. Cuando hemos aislado y secuenciado estas poblaciones todas ellas contienen el pGP4 pero se han producido algunas deleciones en la región de promotora. Por lo que hemos observado esto solo ocurre cuando el promotor está desregulado.

Dado que los perfiles de expresión producen unos valores de transcripción en unidades arbitrarias de fluorescencia, para tratar de establecer la fuerza de los promotores de R388 decidimos medir la actividad de dos promotores estándar, **ParaBAD** y **P_{lacZ}**. En el caso de **ParaBAD** se midió la actividad del promotor con concentraciones crecientes de arabinosa en el medio hasta alcanzar una actividad máxima de $1 \cdot 10^5$ unidades de GFP/OD (figura R4 en el apartado 1.3) valor se tomó como referencia de actividad promotora alta. Como referencia para un promotor reprimido o en estado de mínima actividad, se midieron los niveles de **P_{lacZ}** en una cepa *lacI^q*, donde el represor de **P_{lacZ}** (LacI) se expresa constitutivamente, en ausencia de inductor, obteniéndose valores de $1 \cdot 10^3$ GFP/OD.

Estos valores de referencia nos permiten analizar los resultados en UAF obtenidos para los promotores de R388. De las medidas obtenidas para los promotores de R388 aislados, 13 de los 15 mostraron niveles equivalentes o superiores al valor máximo mostrado por **ParaBAD** por lo que consideramos que los promotores de R388 en ausencia de regulación presentan una actividad promotora fuerte. Únicamente **P_{korB}** y **P_{int}** presentan actividades muy bajas, que se encuentran prácticamente en el nivel del ruido de fondo de nuestros experimentos.

1.2. Actividad de los promotores en presencia de R388

Una vez determinada la actividad transcripcional de los distintos promotores de forma aislada, se quiso establecer el estado en el que se encuentran cuando están integrados en la red del plásmido, para lo que se midieron todos los clones de la librería pGP en presencia del plásmido R388 completo. Se pasó R388 por conjugación a las células BW27783 que contenían la librería pGP, seleccionándose los transconjugantes como células Km^RTp^R. Igual que en el caso anterior, los cultivos se midieron en medio mínimo M9 utilizando el lector de placas Victor3 y siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos (apartado B5.1).

Los resultados obtenidos se muestran en la figura R2. Como se puede observar, en presencia de R388 13 de los 15 promotores identificados mostraron un descenso muy significativo en los niveles de fluorescencia, mientras que los dos restantes mantuvieron prácticamente el mismo nivel de expresión que cuando estaban aislados. Los índices de represión obtenidos van desde 5 para **PresP** hasta más de 500 en el caso de **Porf7**.

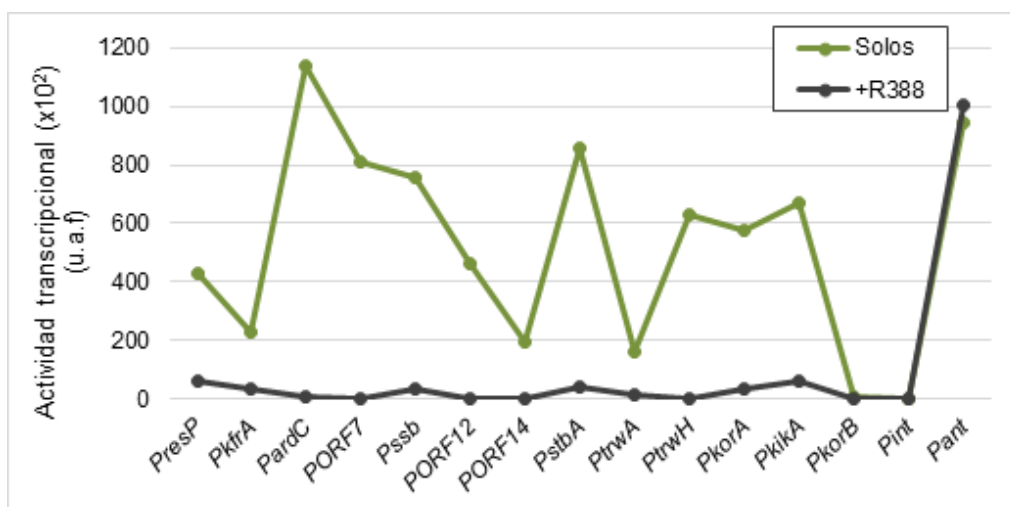


Figura R2. Actividad transcripcional de los promotores de R388 solos y con el plásmido completo.

Las medidas se realizaron en un lector de placas Victor3 según el procedimiento indicado en materiales y métodos, realizándose al menos 10 medidas independientes de cada dato. En verde se representa la actividad de los promotores aislados y en negro la actividad medida en presencia del plásmido R388. La actividad transcripcional se expresa como cantidad de fluorescencia por célula (GFP/OD₆₀₀).

Nos encontramos con que seis de los promotores de R388 (**PardC**, **Porf7**, **Porf14**, **Porf12**, **PkorB**, **PtrwH**) bajaron sus niveles de expresión hasta el nivel del ruido de fondo,

mostrando valores por debajo de los obtenidos en las medidas de **P_{lacZ}** reprimido ($1 \cdot 10^3$ GFP/OD) que habíamos tomado como referencia de un promotor apagado. Otros siete promotores (**P_{resP}**, **P_{kfrA}**, **P_{ssB}**, **P_{stbA}**, **P_{trwA}**, **P_{korA}**, **P_{kikA}**) mostraron valores alrededor del mismo orden de magnitud de **P_{lacZ}** reprimido (entre 1 y $7 \cdot 10^3$ GFP/OD).

Los dos promotores restantes, **P_{int}** y **P_{ant}**, no mostraron cambios significativos en su nivel de expresión al ensayarse en presencia de R388, manteniendo los niveles de expresión correspondientes al promotor desregulado (figura R3). Se da la circunstancia de que estos dos promotores no forman parte del esqueleto plasmídico propiamente dicho sino que se encuentran dentro de un integrón In-1 que se encuentra insertado en R388 y que parece que evolutivamente ha sido la adquisición más reciente del plásmido (Revilla, *et al.*, 2008).

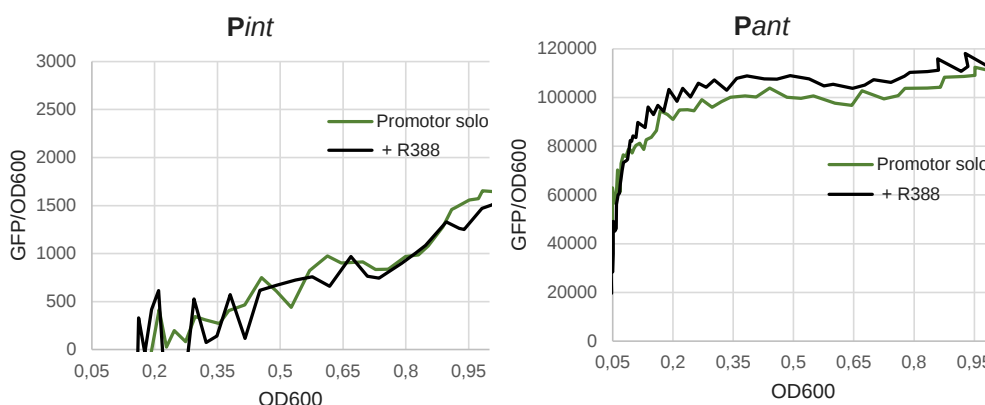


Figura R3. Perfiles de expresión transcripcional del **P_{int} y el **P_{ant}** de R388.**

Las medidas se realizaron en un lector de placas Victor3 según el procedimiento indicado en el apartado B5.1 de materiales y métodos. En verde se representa el perfil de actividad transcripcional de los promotores aislados y en negro la actividad medida en presencia del plásmido R388. La actividad transcripcional se representa como cantidad de fluorescencia por célula (GFP/OD₆₀₀) frente al crecimiento del cultivo (OD₆₀₀).

También se ensayaron en presencia de R388 los clones de la librería pGP para los que no se había detectado actividad transcripcional al medirlos aislados, con el fin de descartar que estuviésemos obviando algún promotor que pudiese necesitar de un activador presente en el plásmido. En ninguno de los cinco casos se observó ningún cambio en presencia de R388.

En conjunto estos resultados indican:

- i) Que los promotores de R388 muestran una gran actividad intrínseca: en ausencia de regulación producen altos niveles de transcripción.

- ii) Que la presencia de la red de regulación del plásmido mantiene estos promotores altamente reprimidos, de lo que se deduce que la regulación en el plásmido R388 esta mediada fundamentalmente por represores transcripcionales.
- iii) Que las diferencias entre el estado activado y el estado reprimido de los promotores del plásmido son, de forma general, muy altas. Decimos por tanto que los promotores de R388 tienen una alta ganancia.

1.3. Obtención de un sistema de expresión controlada para los reguladores

Para poder estudiar el efecto de los posibles reguladores sobre los promotores, era necesaria la utilización de un sistema que permitiese inducir la expresión del regulador de manera controlada y medible.

Para ello se optó por el sistema de expresión dependiente de arabinosa *araBAD*, utilizándose el vector desarrollado por Guzman *et al.* (Guzman, *et al.*, 1995) pBAD33, que permite clonar los ORFs bajo el control de dicho promotor.

La elección del sistema *araBAD* se basó fundamentalmente en la capacidad de inducir de manera muy controlada la expresión a partir del promotor. En la mayor parte de los promotores inducibles existe un circuito de feedback positivo que genera una biestabilidad en el efecto del inductor. En el caso de *araBAD* esta biestabilidad está causada porque AraE, un transportador activo de arabinosa, se encuentra bajo el control del propio sistema. Como consecuencia la inducción por arabinosa cierra un feedback positivo que resulta en una inducción biestable (Santillan, *et al.*, 2007).

Para superar este problema, Keasling *et al.*, construyeron la cepa *E.coli* Bw27784, que contiene el gen *araE* bajo un promotor de expresión constitutiva (Khlebnikov, *et al.*, 2001). De este modo se consigue una inducción de la expresión progresiva y controlable de *ParaBAD* al añadir al medio de cultivo cantidades crecientes de arabinosa. Para poner a prueba este funcionamiento utilizamos una construcción *ParaBAD::gfpmut2* en la cepa *E.coli* BW27783. Indujimos su expresión mediante cantidades crecientes de arabinosa y medimos la actividad transcripcional mediante citometría de flujo (Figura R4). Como se muestra en la figura, nuestros resultados no mostraron rastro de biestabilidad, sino que toda la población se desplaza homogéneamente a lo largo del eje X a medida que aumenta la concentración de arabinosa. Tras comprobar el

comportamiento homogéneo de la población, se midió también la respuesta poblacional al incremento de las concentraciones de arabinosa mediante la realización de perfiles de expresión del promotor a concentraciones crecientes de arabinosa, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado B5.1 de materiales y métodos.

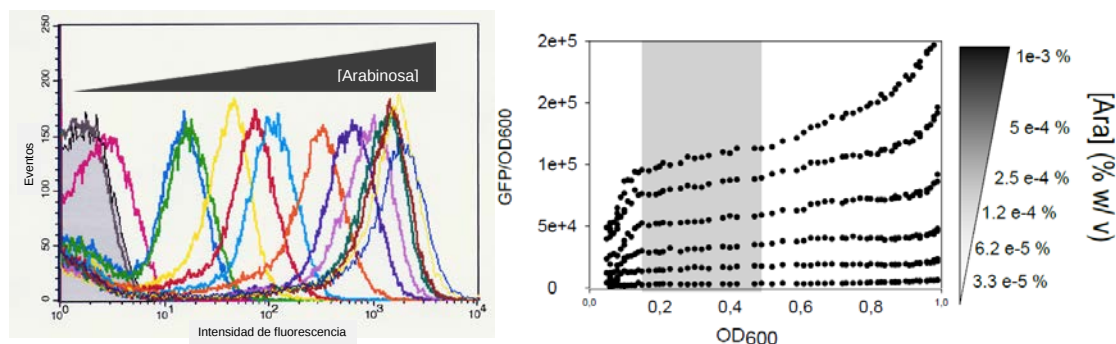


Figura R4. Respuesta de pBAD::gfpmut2 en la cepa BW27783 a la inducción por arabinosa.

La figura de la izquierda muestra los histogramas de distribución de fluorescencia en la población obtenidos por citometría para cultivos inducidos con concentraciones crecientes de arabinosa (cada color corresponde a un cultivo). La figura de la derecha muestra los perfiles de expresión obtenidos en el lector de placas de los cultivos BW27783 con pBAD33::gfpmut2. Cada curva corresponde a una concentración de arabinosa del rango indicado en la derecha de la imagen. El gráfico enfrenta los niveles de fluorescencia por células (GFP/OD₆₀₀) frente al crecimiento del cultivo (OD₆₀₀), en gris se destaca la zona en la que se alcanza el estado estacionario.

Los datos obtenidos en las medidas de expresión de GFP se ajustaron a una función Michaelis-Menten ($R^2=0.99$), obteniéndose una expresión matemática que permitiría inferir el nivel de expresión de **ParaBAD** como una función de la concentración de arabinosa añadida al medio (figura R5). De esta manera, el sistema nos permitiría inferir el cambio relativo en las concentraciones de regulador producido en estado estacionario para los clones pAR en BW27783, de acuerdo a la curva standard obtenida para **ParaBAD::gfpmut2**.

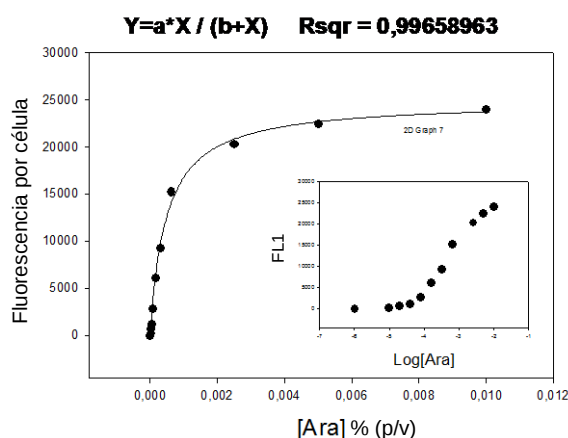


Figura R5. Ajuste de la curva de respuesta a la inducción por arabinosa de pBAD33::gfpmut2 en BW27783.

En el gráfico de la izquierda se representan los valores medios de fluorescencia obtenidos para los cultivos de BW27783 (pBAD33::gfpmut2) inducidos, frente al rango de concentraciones de arabinosa utilizado. En la parte superior del gráfico se muestran los parámetros del ajuste (en el cuadro interior se muestra lo mismo utilizando los valores de arabinosa en escala logarítmica).

1.4. Búsqueda combinatoria de reguladores transcripcionales en R388

Para tratar de identificar todos los posibles reguladores transcripcionales presentes en R388 así como individualizar su efecto regulatorio sobre la actividad transcripcional de cada promotor, se llevó a cabo una estrategia combinatoria. Se construyó una librería de clones de los ORFs del plásmido identificados como posibles reguladores, o aquellos sin función asignada, clonados en un vector pBAD33 (librería pAR) y se ensayó cada uno de los reguladores con toda la librería pGP (figura R6).

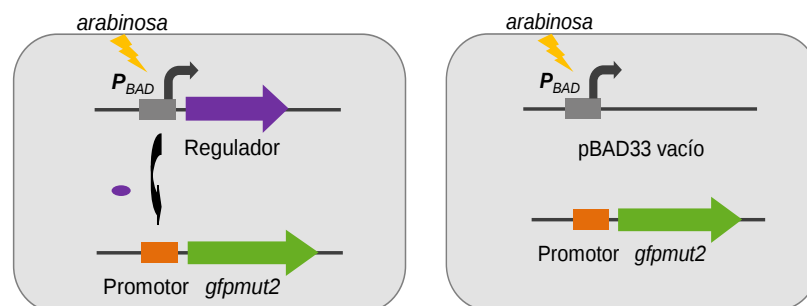


Figura R6. Esquema del diseño experimental utilizado para identificar los posibles reguladores.

Por un lado se mide la actividad transcripcional de los distintos clones de la librería pGP en BW27783 con pBAD33 vacío para obtener la actividad del promotor sin regulador (a la derecha de la figura). Por otro, se mide la actividad de los mismos clones en BW27783 con cada uno de los plásmidos de la librería pAR que contienen los posibles reguladores de R388 (a la izquierda de la figura). Los perfiles de expresión se obtuvieron según el procedimiento descrito en el apartado B5.1 de MM, añadiendo al medio de cultivo arabinosa para inducir la expresión de los reguladores clonados en pBAD33.

Se determinó la actividad transcripcional de cada uno de los promotores mediante la obtención del perfil de expresión de fluorescencia en presencia del vector pBAD33 vacío y se comparó este resultado con el obtenido al medirlos en presencia de cada uno de los posibles reguladores de R388. Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en la tabla R2.

	Actividad del promotor ($\times 10^2$) (GFP/OD)							
	+ pBAD33	+ pAR1	+ pAR3	+ pAR4	+ pAR11	+ pAR12	+ pAR13	+ pAR14
<i>P_{resP}</i>	350 $\pm$ 8	< 1	406 $\pm$ 6	355 $\pm$ 6	368 $\pm$ 11	369 $\pm$ 12	344 $\pm$ 7	323 $\pm$ 7
<i>P_{kfrA}</i>	188 $\pm$ 17	206 $\pm$ 2	4 $\pm$ 3	201 $\pm$ 7	187 $\pm$ 4	165 $\pm$ 6	206 $\pm$ 9	204 $\pm$ 5
<i>P_{ardC}</i>	1662 $\pm$ 352	*	*	10 $\pm$ 1	43 $\pm$ 4	*	*	*
<i>P_{ORF7}</i>	690 $\pm$ 79	614 $\pm$ 13	637 $\pm$ 16	3 $\pm$ 0,7	6 $\pm$ 2	607 $\pm$ 17	619 $\pm$ 14	700 $\pm$ 9
<i>P_{ssb}</i>	857 $\pm$ 127	938 $\pm$ 12	821 $\pm$ 97	< 1	801 $\pm$ 67	777 $\pm$ 12	718 $\pm$ 15	942 $\pm$ 18
<i>P_{ORF12}</i>	403 $\pm$ 47	398 $\pm$ 12	390 $\pm$ 13	30 $\pm$ 3	9 $\pm$ 1	395 $\pm$ 14	396 $\pm$ 17	406 $\pm$ 4
<i>P_{ORF14}</i>	170 $\pm$ 12	158 $\pm$ 6	155 $\pm$ 6	6 $\pm$ 0,3	9 $\pm$ 2	165 $\pm$ 5	155 $\pm$ 4	154 $\pm$ 6
<i>P_{stbA}</i>	915 $\pm$ 52	990 $\pm$ 17	959 $\pm$ 72	945 $\pm$ 24	17 $\pm$ 4	872 $\pm$ 88	1044 $\pm$ 21	1120 $\pm$ 310
<i>P_{trwA}</i>	144 $\pm$ 9	179 $\pm$ 48	129 $\pm$ 5	133 $\pm$ 10	146 $\pm$ 3	< 1	170 $\pm$ 8	184 $\pm$ 4
<i>P_{trwH}</i>	662 $\pm$ 69	634 $\pm$ 15	530 $\pm$ 14	590 $\pm$ 15	264 $\pm$ 8	567 $\pm$ 9	2 $\pm$ 1	558 $\pm$ 34
<i>P_{korA}</i>	526 $\pm$ 57	481 $\pm$ 18	490 $\pm$ 6	492 $\pm$ 13	56 $\pm$ 3	479 $\pm$ 7	17 $\pm$ 1	577 $\pm$ 32
<i>P_{kikA}</i>	707 $\pm$ 73	666 $\pm$ 15	ND	767 $\pm$ 14	204 $\pm$ 8	ND	11 $\pm$ 2	739 $\pm$ 31
<i>P_{korB}</i>	8 $\pm$ 2	7 $\pm$ 2	ND	8 $\pm$ 1	5 $\pm$ 2	10 $\pm$ 2	< 1	12 $\pm$ 1

Tabla R2. Resultados obtenidos en la búsqueda combinatoria de reguladores transcripcionales en R388.

En la tabla se recogen los valores medios de actividad transcripcional medidos para los promotores de R388 en el estado estacionario, acompañados de la desviación estándar. Cada fila corresponde a un promotor clonado en la librería pGP y cada columna a un clon pAR, excepto la primera que contiene los valores de los promotores con el vector pBAD33 vacío. Los colores utilizados tratan de indicar la región/función en la que se encuentran implicados los distintos genes (azul: replicación, gris y verde: zona de mantenimiento estable; morado y rosa: genes implicados en conjugación). Los valores que aparecen señalados en amarillo corresponden a la interacción de un regulador con promotores de otro módulo funcional distinto. Los valores representados son los obtenidos para la máxima inducción de regulador sin afectar al crecimiento de los cultivos (normalmente arabinosa 10⁻³%).

Además de los mostrados en la tabla, se ensayaron también otros ORFs de R388 que consideramos que podrían actuar como reguladores transcripcionales: *repA*, *klcB*, *orf7*, *orf8*, *orf9*, *orf12*, *orf14*. En ninguno de estos casos se encontró evidencia de actividad reguladora sobre los promotores de sus correspondientes operones (o los de regiones próximas o relacionadas).

Cuando se determinó la actividad del promotor *PresP* (plásmido pGP1) en presencia del plásmido pAR1 que codifica para la resolvasa *resP*, observamos un descenso de la actividad transcripcional de dos logaritmos respecto al valor obtenido en

presencia del vector pBAD33 vacío mientras que ningún otro regulador transcripcional mostró un efecto significativo en **PresP**.

El promotor **PkfrA** fue reprimido por la proteína KfrA, como mostró la comparación entre los perfiles de expresión de fluorescencia en presencia (+pAR3) y en ausencia (+pBAD33) de KfrA. Al igual que para **PresP**, ningún otro regulador transcripcional alteró la expresión de **PkfrA**, ni KfrA afectó a ningún otro promotor de R388.

Como era de esperar, se confirmó el rol regulador de TrwA sobre el operón *trwABC* (Moncalian, *et al.*, 1997), observándose una disminución de 150 veces en la expresión del promotor **PtrwA** (pGP12) cuando se indujo la expresión de *trwA* con el plásmido pAR12. No se detectó ningún efecto por parte de ningún otro regulador sobre este promotor.

De esta manera, encontramos que las proteínas ResP, KfrA y TrwA regulan sus propios operones y no muestran efecto sobre otros promotores, estableciéndose en cada caso un circuito de *feedback loop* negativo simple. En la figura R7 se muestran los perfiles de expresión de estos promotores en presencia y ausencia de regulación.

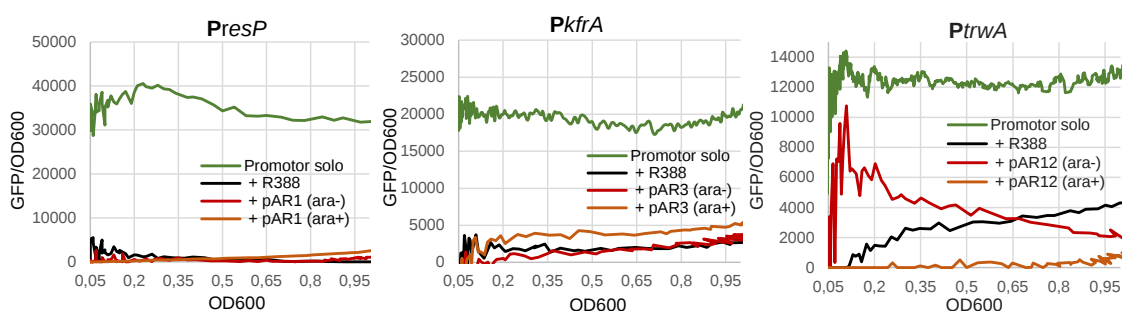


Figura R7. Perfiles de expresión transcripcional de los promotores *PresP*, *PkfrA* y *PtrwA* de R388.

En la figura se recogen los perfiles de expresión obtenidos según se describe en el apartado B5.1 de materiales y métodos. En verde se representa el perfil de actividad transcripcional de los promotores aislados y en negro la actividad medida en presencia del plásmido R388. En rojo y naranja se representan los perfiles obtenidos en presencia de sus reguladores, a máxima y mínima inducción con arabinosa, respectivamente. La actividad transcripcional se representa como cantidad de fluorescencia por célula (GFP/OD₆₀₀) frente al crecimiento del cultivo (OD₆₀₀).

Como ya se había establecido en trabajos previos, los promotores **PardC**, **Porf7**, **Pssb**, **Porf12** y **Porf14** contienen repeticiones de la familia denominada SDR-A (Fernandez-Lopez, *et al.*, 2006) y estos promotores parecen responder a la actividad reguladora de ArdK (Fernandez-Lopez, 2007). Para analizar este posible efecto,

determinamos que una cantidad de arabinosa de $10^{-3}\%$ (p/v) añadida al medio de cultivo producía la inducción máxima de *ardK* sin llegar a alterar la velocidad de crecimiento de las células. Al inducir *ArdK* con esta concentración de arabinosa encontramos que las tasas de transcripción de **PardC**, **Porf7**, **Pssb** y **Porf14** caen hasta los niveles de fondo ($1 \cdot 10^2$ unidades de GFP/OD). En el caso de **Porf12**, que también es reprimido por *ArdK*, el índice de represión es menor, disminuyendo la actividad unas 2 veces cuando la expresión de *ardK* no está inducida y unas 10 cuando está inducido con $10^{-3} \%$ de arabinosa (tabla R2). No se detectaron efectos de *ArdK* en los promotores que no contenían los sitios de unión SDR-A.

De manera similar, existían indicios de que las repeticiones denominadas IT-B, identificadas en (Fernandez-Lopez, et al., 2006) y que están presentes en los promotores **PardC**, **Porf7**, **Porf12**, **Porf14** y **PstbA** son sitios de unión del regulador *StbA* (Fernandez-Lopez, 2007). Los perfiles de expresión de los plásmidos reporteros que contienen estos promotores (pGP4, pGP5, pGP10, pGP11 y pGP13, respectivamente) muestran un decremento entre 20 y 100 veces cuando la proteína *StbA* es expresada desde el plásmido pAR11 respecto a los valores medidos con pBAD33 vacío.

En la figura R8 se representan los perfiles de expresión obtenidos para los promotores de la región de mantenimiento.

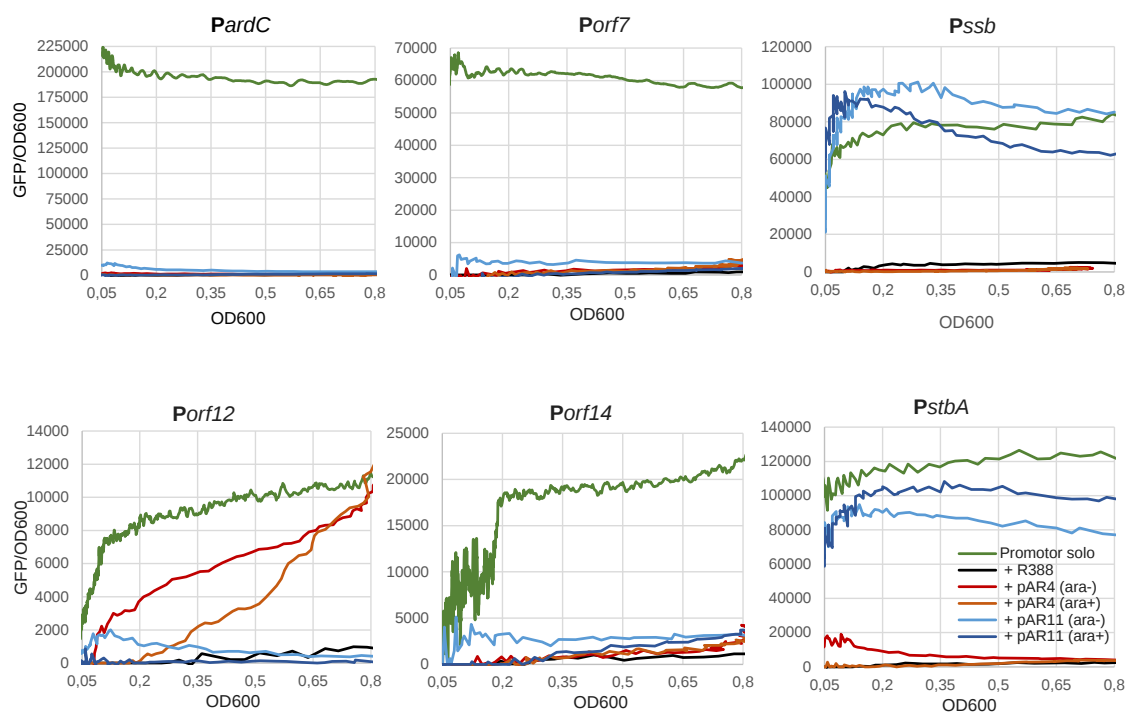


Figura R8. Perfiles de expresión transcripcional de los promotores regulados por *ArdK* y *StbA*.

En la figura se recogen los perfiles de expresión de los promotores *PardC*, *Porf7*, *Pssb*, *Porf12*, *Porf14* y *PstbA* obtenidos según se describe en el apartado B5.1 de materiales y métodos. En verde se representa el perfil de actividad transcripcional de los promotores aislados y en negro la actividad medida en presencia del plásmido R388. En tonos rojos los perfiles obtenidos en presencia del regulador *ArdK* a mínima y máxima inducción, y en azules los obtenidos en presencia de *StbA* a mínima y máxima inducción. La actividad transcripcional se representa como cantidad de fluorescencia por célula (GFP/DO₆₀₀) frente al crecimiento del cultivo (OD₆₀₀).

Sin embargo, tres promotores pertenecientes al módulo de transferencia del plásmido (***PtrwH***, ***PkorA*** y ***PkikA***) para los que no estaba descrita la presencia de sitios de unión IT-B, mostraron también una disminución en sus tasas de transcripción cuando *stbA* era expresado a máxima inducción (Figura R9, tabla R2 señalado en amarillo). En presencia de pAR11 inducido con 10⁻³ % (p/v) de arabinosa, las tasas de transcripción de los promotores ***PtrwH***, ***PkorA*** y ***PkikA*** cayeron 2, 9 y 3 veces respectivamente. En principio estos promotores no contienen iterones IT-B sino que contienen repeticiones SDR-B. Al mirar en detalle la secuencia consenso de estas otras repeticiones encontramos que contienen el pentanucleótido TTGCA que forma parte de las repeticiones IT-B, lo que podría estar produciendo la respuesta observada. De esta manera, aunque ***PtrwH***, ***PkorA*** y ***PkikA*** no contienen los iterones consenso implicados en la represión por *StbA*, parece que la proteína también es capaz de interferir en su actividad transcripcional cuando se expresa a niveles altos.

Por último, en la región del plásmido que codifica para la formación del pilus conjugativo existen 4 promotores: ***PtrwH***, ***PkorA***, ***PkikA*** y ***PkorB*** (pGP14, pGP15, pGP16 y pGP17, respectivamente). Está descrito que estos promotores contienen repeticiones de la familia SDR-B, identificadas como sitios de unión del regulador *KorA* (Fernandez-Lopez, 2007). Así, la actividad transcripcional de estos promotores medida en presencia de pAR13, que codifica para *KorA*, muestra un descenso significativo respecto a la actividad obtenida en ausencia del regulador (con pBAD33 vacío), con índices de represión que van desde 30 en el caso de ***PkikA*** a 90 en el caso de ***PtrwH***. (Figura R9, tabla R2).

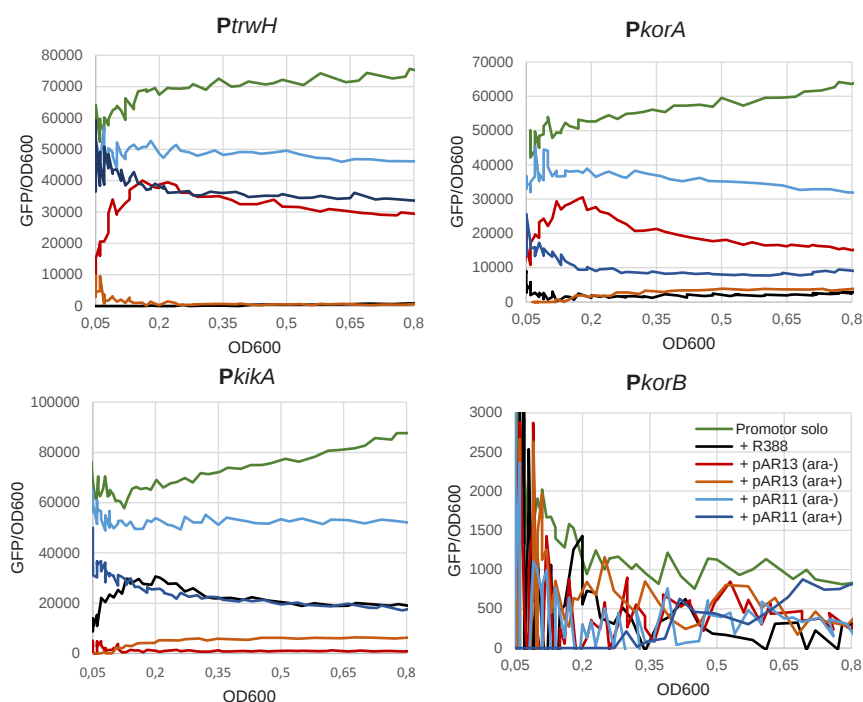


Figura R9. Perfiles de expresión transcripcional de los promotores del *Mpf*.

En la figura se recogen los perfiles de expresión obtenidos según se describe en el apartado B5.1 de materiales y métodos. En verde se representa el perfil de actividad transcripcional de los promotores con pBAD33 vacío y en negro la actividad medida en presencia del plásmido R388. En tonos rojos los perfiles obtenidos en presencia del regulador *korA* a mínima y máxima inducción, y en azules los obtenidos en presencia de *stbA* a mínima y máxima inducción. La actividad transcripcional se representa como cantidad de fluorescencia por célula (GFP/DO₆₀₀) frente al crecimiento del cultivo (OD₆₀₀).

1.5. Deleciones de R388

Para tratar de ampliar el conocimiento sobre el funcionamiento de la red de regulación transcripcional del plásmido se quiso seguir una estrategia complementaria a la aplicada en la búsqueda de reguladores aplicada en el apartado 1.4. Para ello se inició la construcción de una librería de “*knock-out*” de distintos genes en el plásmido R388 mediante el método de recombinación homóloga, siguiendo el procedimiento derivado del método Wanner y Datsenko (Datsenko & Wanner, 2000) que aparece descrito en el apartado B3 de materiales y métodos. Los derivados de R388 resultantes (librería pIC) obtenidos hasta el momento se ensayaron en la cepa de *E. coli* BW27783 en presencia de la librería de plásmidos reporteros (pGP) para comprobar si se producían efectos inesperados en la red que pudiesen revelar la presencia de reguladores ocultos en el genoma de R388.

Sin embargo, este planteamiento experimental resultó ser más complicado de lo esperado inicialmente. En muchos casos no fue posible aislar derivados del plásmido que fuesen *knock-out* puros, lo que sugiere que la delección de ciertas partes del genoma del plásmido resulta en plásmidos tóxicos o inestables. Por ejemplo, las delecciones de *stbA* resultaron en un plásmido altamente inestable, que fuimos incapaces de aislar adecuadamente. Una forma de evitar estos efectos deletéreos fue realizar delecciones de grandes regiones u operones completos, obteniendo de esta manera, por ejemplo, la delección de *kfrA* con todo el operón ($R388\Delta kfrA$ -*osa*).

Los mutantes de R388 obtenidos hasta el momento se ensayaron en presencia de la librería de promotores de R388 siguiendo el protocolo descrito en el apartado B5.1 de materiales y métodos para la medida de la actividad transcripcional y los resultados obtenidos se recogen en la tabla R3.

	Desregulado	Con la red completa	pIC7 ($\Delta KorB$)	pIC1 ($\Delta TrwA$)	pIC3 ($\Delta TrwB$)	pIC5 ($\Delta TrwC$)	pIC9 ($\Delta ArdK$)	pIC11 ($\Delta ArdK + \Delta KfrA$)	pIC13 ($\Delta KfrA$)
<i>P_{resP}</i>	432 ± 43	64 ± 7	60 ± 6	61 ± 5	56 ± 6	43 ± 5	60 ± 7	51 ± 4	46 ± 5
<i>P_{kfrA}</i>	230 ± 16	32 ± 4	31 ± 4	25 ± 2	27 ± 3	23 ± 3	29 ± 2	215 ± 13	261 ± 35
<i>P_{ardC}</i>	1136 ± 425	5 ± 2	5 ± 2	3 ± 2	3 ± 2	2 ± 2	190 ± 247	393 ± 370	4 ± 2
<i>P_{ORF7}</i>	808 ± 96	<1	<1	<1	<1	<1	93 ± 4	78 ± 5	<1
<i>P_{ssb}</i>	758 ± 59	36 ± 4	36 ± 7	33 ± 2	31 ± 1	23 ± 2	995 ± 29	1120 ± 74	27 ± 3
<i>P_{ORF12}</i>	465 ± 53	1 ± 2	3 ± 2	<1	<1	<1	49 ± 4	33 ± 3	<1
<i>P_{ORF14}</i>	197 ± 32	2 ± 2	3 ± 2	2 ± 2	<1	<1	35 ± 2	84 ± 9	<1
<i>P_{stbA}</i>	859 ± 77	39 ± 12	31 ± 3	43 ± 5	27 ± 3	31 ± 3	83 ± 7	85 ± 19	36 ± 13
<i>P_{trwA}</i>	161 ± 28	12 ± 4	12 ± 6	213 ± 20	9 ± 6	152 ± 3	13 ± 9	23 ± 6	7 ± 3
<i>P_{trwH}</i>	628 ± 63	<1	41 ± 3	2 ± 2	<1	<1	<1	<1	<1
<i>P_{korA}</i>	578 ± 54	33 ± 5	12 ± 3	31 ± 3	30 ± 3	25 ± 2	25 ± 2	23 ± 1	25 ± 1
<i>P_{kikA}</i>	672 ± 80	59 ± 9	36 ± 3	55 ± 3	51 ± 3	43 ± 4	44 ± 2	40 ± 2	44 ± 3
<i>P_{korB}</i>	9 ± 5	2 ± 2	2 ± 1	2 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	<1	<1	3 ± 2
<i>P_{int}</i>	4 ± 5	2 ± 2	4 ± 2	3 ± 1	1 ± 2	<1	<1	<1	2 ± 2
<i>P_{ant}</i>	945 ± 94	1006 ± 74	1005 ± 57	1061 ± 52	986 ± 47	958 ± 27	929 ± 25	836 ± 20	940 ± 66

Tabla R3. Actividad transcripcional de los promotores de R388 en presencia de los mutantes knock-out.

En la tabla se recogen los valores medios de actividad transcripcional medidos para los promotores de R388 en el estado estacionario, acompañados de la desviación estándar. Cada fila corresponde a un promotor clonado en la librería pGP y cada columna a un mutante por delección del plásmido R388, excepto la primera que contiene los valores de los promotores desregulados y la segunda que se corresponde a la presencia de R388 silvestre. Los colores utilizados tratan de indicar la región/función en la que se encuentran implicados los distintos genes (azul: replicación, gris y verde: zona de mantenimiento estable; morado y rosa: genes implicados en conjugación).

Las delecciones de la región de conjugación, pIC1, pIC3 y pIC5, (columnas 4, 5 y 6 de la tabla R3) confirman el efecto represor de *trwA* únicamente sobre su propio promotor, observándose una desregulación del promotor del operón *trwABC* en

presencia del *knock-out* de *trwA*, (pIC1). La delección de *trwB*, no mostró ningún efecto sobre la actividad transcripcional de los promotores, obteniéndose el mismo resultado que con R388 silvestre. Sin embargo, el mutante sin *trwC* sorprendentemente, produjo una desregulación de *P_{trwA}*, lo que sugeriría un papel regulador de *trwC* hasta ahora desconocido.

En el caso de los plásmidos pIC11, pIC9 y pIC13, los resultados obtenidos se correlacionan bien con los obtenidos en los ensayos con los reguladores (apartado 1.4). En el plásmido pIC13 se ha eliminado el operón *kfrA-osa* por lo que el regulador *kfrA* se encuentra ausente. Al igual que ocurría en la delección de *trwA*, únicamente se ve afectado su propio promotor, *P_{kfrA}*, (columna 9 de la tabla R3) que presenta un nivel de expresión equivalente al medido para el promotor desregulado (valores de la columna 1). pIC11 corresponde a una delección del gen *orf12* de R388 pero en el que se ha perdido, además, toda la zona contenida entre las LDRs, donde se encuentra el regulador *ardK*. Así, se ven afectados todos los promotores regulados por este represor, aunque sin estar totalmente desregulados ya que *stbA* continua presente en el plásmido, y no se observa ningún cambio inesperado que podamos atribuir a la ausencia del resto de genes eliminados (valores de la columna 7 en la tabla R3). En pIC9 se ha eliminado toda la región de R388 comprendida entre *oriV* y el operón *stbABC* de manera que, de los reguladores previamente identificados, no están presentes *ardK* ni *kfrA*. En este caso, nos encontramos con unos valores de expresión muy similares a los producidos por pIC11, sumando la desregulación del promotor del operón *kfrA* (columna 8 de la tabla R3). En los dos mutantes carentes de *ardK* (pIC11 y pIC9), se observa un cambio en el promotor de *stbA* que, sin encontrarse desregulado, da valores de más del doble que los obtenidos en presencia de R388 silvestre. Por lo que sabemos hasta el momento, este promotor se encuentra regulado únicamente por *StbA*, proteína que debería estar presente en la célula en ambos casos.

Un resultado interesante es el obtenido al ensayar el plásmido pIC7, en el que se ha eliminado el gen correspondiente a *korB*. Mientras que en los ensayos en busca de reguladores del apartado 1.4, la expresión de *korB*, no parecía afectar a ningún promotor diana, el mutante por delección de *korB* (pIC7) muestra una cambios en la expresión de los promotores regulados por *KorA*. Esto indica que *KorB* podría actuar como un co-regulador de estos promotores, necesitando la presencia de *KorA* para ejercer su acción.

1.6. Aproximación a la caracterización de *resP*

Estudios genómicos previos (Fernandez-Lopez, *et al.*, 2006) habían demostrado la presencia de secuencias repetidas en las regiones intergénicas del plásmido R388. Como hemos visto, estas repeticiones constituyen, con gran probabilidad, los sitios de unión de los reguladores transcripcionales del plásmido ArdK, StbA y KorA. Tres reguladores, sin embargo, mostraron acción represora exclusivamente sobre sus propios promotores (TrwA, ResP, KfrA), lo que hace que no podamos asociar la acción represora a la presencia de ninguna secuencia repetida. En el caso de TrwA, estudios bioquímicos previos habían desvelado sus operadores (Moncalian, *et al.*, 1997). Sin embargo, existían dos reguladores, ResP y KfrA, para los que no teníamos forma de asignar sitios de unión hipotéticos. Por ello, en este trabajo se optó por hacer una primera aproximación al estudio de la proteína ResP mediante la purificación y la realización de ensayos de retardo en gel.

ResP es una proteína de 218 aminoácidos, que presenta homología con las serín-recombinasas sitio específicas de tipo 2. Su homólogo más cercano caracterizado es la resolvasa del Tn21 con un 24% de identidad (Fernandez-Lopez, *et al.*, 2006). El gen *resP* está acoplado transcripcionalmente a *repA* formando el operón replicación de R388 y parece ser responsable de la regulación transcripcional de este operón (figura 10).

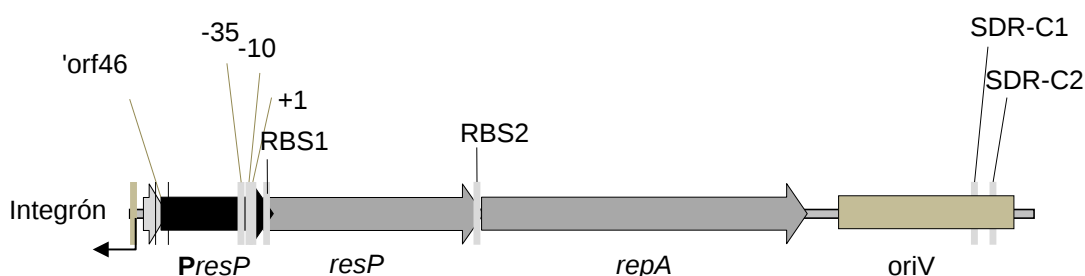


Figura R10. Replicón de R388. En la figura se representan los componentes del operón de replicación (*resP-repA*) junto con el *oriV* de R388.

La realización del *primer extension* de la región promotora **PresP** por Carlos Revilla, ha permitido el establecimiento del inicio de la transcripción y se han identificado las posibles regiones -10 y -35 del promotor.

a) Purificación de ResP

Para su purificación, ResP se expresó como una proteína recombinante unida a una cola de histidinas y se purificó por cromatografía de afinidad utilizando una columna

HisTrap HP (GE healthcare) y un segundo paso de cromatografía de gel filtración con Superdex S75 (GE healthcare). El protocolo de purificación se encuentra recogido en materiales y métodos en el apartado B9.

Para comprobar el adecuado progreso de cada uno de los pasos de la purificación, se guardaron muestras que se corrieron en geles SDS-PAGE. Tras la purificación se cuantificó la concentración y las alícuotas de la proteína se guardaron a -80 °C en glicerol 20%.

b) Búsqueda del sitio de unión de resP en el promotor *PresP* mediante EMSA

Mediante ensayos de retardo en gel se ha tratado de acotar la zona de unión de ResP en la región promotora *PresP*. Para ello, utilizando una batería de oligos (tabla MM3) se generaron distintos fragmentos de dsDNA mediante PCR sobre el plásmido R388. Los fragmentos obtenidos se encuentran descritos en la tabla R4 y representados en la figura R11

Nombre	Oligonucleótidos	Descripción	Tamaño (pb)
S2	resPdir_2 + resPrev_2	P_{RESP}	333
S3	IRdir + IRrev	extremo 3' del integrón	149
S4	orf7dir + orf7rev	DNA inespecífico (P_{ORF7})	169
S5	resPdir_2 + resPrev_3	fragmento 5' P_{RESP}	164
S6	resPdir_3 + resPrev	fragmento 3' P_{RESP}	154

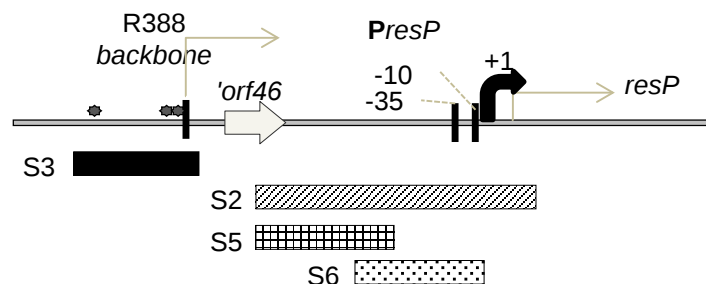


Tabla R4 y figura R11. Sustratos de dsDNA para los ensayos EMSA.

En la figura se representan los sustratos utilizados en los ensayos de retardo en gel con ResP. La información de los distintos sustratos se encuentra recogida en la tabla en la que para cada sustrato aparecen los oligos empleados en su obtención, el tamaño y una breve descripción.

Los ensayos se llevaron a cabo como se describe en el apartado B10 de materiales y métodos. Concentraciones crecientes de ResP-His se incubaron con los

distintos sustratos y los geles se tiñeron con SYBR Gold, escaneándose con un láser de 473 nm.

Los resultados obtenidos en los ensayos se encuentran recogidos en las imágenes de la figura R12.

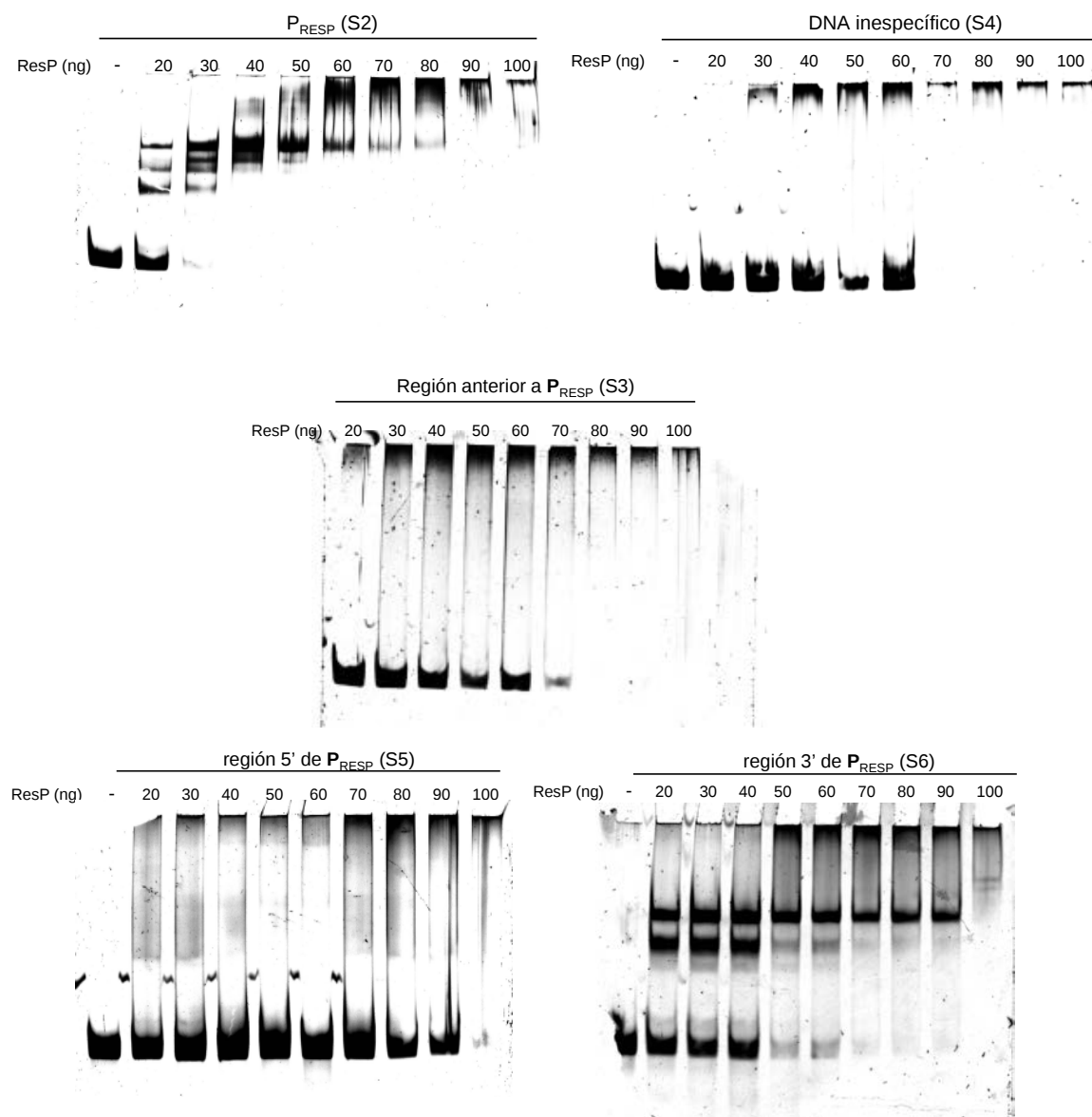


Figura R12. Resultados EMSA de ResP.

Fotos de los geles de acrilamida de los ensayos de retardo en gel por ResP de los distintos sustratos recogidos en la figura R11: S2, S5 y S6 corresponden a la región promotora del operón *resP-repA*, mientras que S3 contiene la región inmediatamente anterior a *PresP*, incluyendo el extremo 3' del integrón; por último, S4 es un sustrato de DNA inespecífico. Se llevó a cabo un ensayo EMSA estandar, donde 0.2-0.5 pmol de los fragmentos de DNA se incubaron con concentraciones crecientes de ResP-His6 en un volumen final de 20 μ l de reacción. Tras la electroforesis el gel se tiñó con SYBR Gold 1x y se escaneó usando un láser de 473 nm en un equipo FLA-5100 de Fujifilm.

Encontramos que ResP retarda de forma específica al fragmento S2 correspondiente a la región promotora del operón *resP-repA*, no así la región inmediatamente anterior correspondiente al sustrato S3 que se comporta igual que el sustrato inespecífico S4. El sustrato S3 corresponde a la zona inmediatamente anterior a *PresP* incluyendo el extremo 3' del integrón In1. Este sustrato se generó para descartar que ResP pudiese tener un sitio de unión solapando con el extremo del integrón, como está descrito para la resolvasa *upv1* del plásmido R46 (Tosini, *et al.*, 1998).

El fragmento S2 retardado por ResP de forma específica se dividió dos fragmentos, los sustratos S5 y S6, correspondientes a la región 5' y la región 3' de *PresP* respectivamente. Al ensayar estos fragmentos encontramos que ResP se une de manera específica el sustrato S6 que contiene la región 3' del promotor mientras que el fragmento S5 se comporta como un sustrato inespecífico. Por tanto, el sitio de unión de ResP se encuentra contenido en los 150 pb correspondientes a la zona del promotor situada inmediatamente antes del comienzo de *resP* (figura R13), aunque no hemos identificado las secuencias de reconocimiento. Para establecer con precisión la secuencia de unión de ResP será necesario la realización de ensayos de *footprinting*.

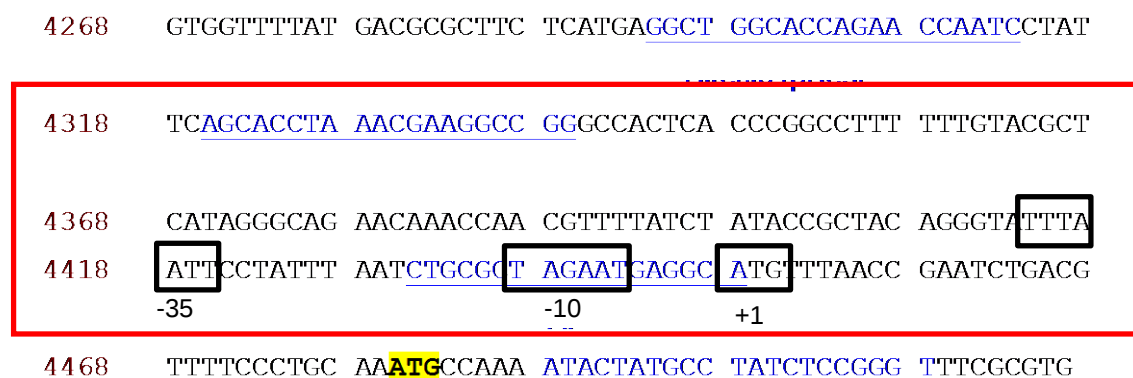


Figura R13. Secuencia de la región *PresP*.

En la figura se recoge la secuencia de la región promotora *PresP* contenida en el fragmento S2. El cuadro rojo enmarca la zona, incluida en el fragmento S6, donde tiene que estar contenido el sitio de unión para la proteína según indican los resultados de los EMSA. Los recuadros señalan las regiones +1, -10 y -35 identificadas para el promotor.

c) Actividad resolvasa de ResP

En base a los datos de homología de secuencia, es presumible que ResP sea una resolvasa y por tanto desempeñe un papel en la estabilidad plasmídica evitando la formación de dímeros de plásmido (Fernandez-Lopez, *et al.*, 2006). Para investigar la habilidad de ResP para resolver cointegrados se construyeron dos plásmidos con el replicón de R388 (figura R14 A y B). Uno de ellos (A) contiene el replicón W sin *resP* mientras que el otro contiene el replicón completo (B). Además, estos plásmidos llevan un *cassette* de resistencia cloranfenicol flanqueado por repeticiones directas (DR) que contenían la región promotora de *resP*.

Al plaquear en Km para aislar las construcciones, el plásmido A se recuperó fácilmente. Sin embargo, no fuimos capaces de obtener el plásmido B, excepto seleccionando para el Cm contenido entre las DR. Esto parecía indicar que el sitio de resolución de ResP estaba contenido en ellas y se estaba perdiendo el *cassette*.

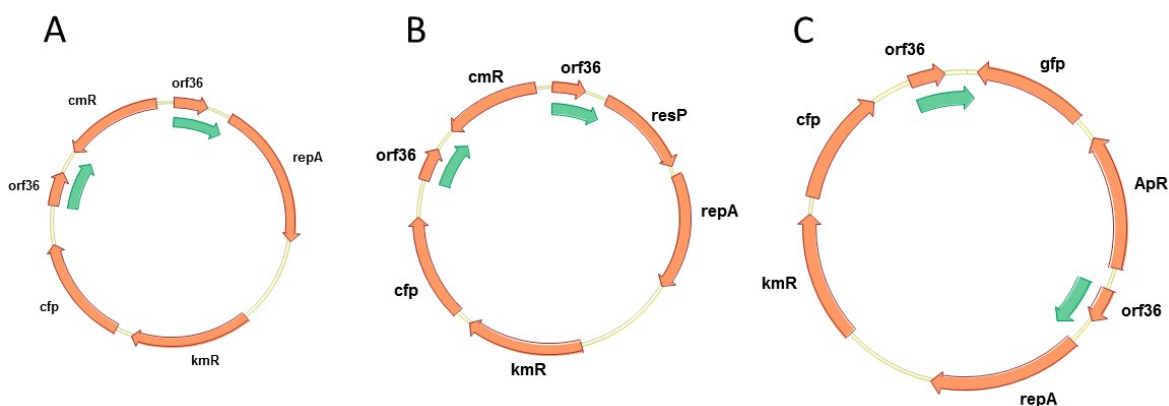


Figura R14: Plásmidos contruidos para probar la actividad resolvasa de ResP.

Los plásmidos A y B tienen un *cassette* con una resistencia a Cm situado entre dos repeticiones que contienen el hipotético sitio de resolución para ResP y el replicón de R388, sin *resP* en el plásmido A y el silvestre en el plásmido B.

El plásmido C contiene el replicón de R388 sin *resP* (como el del plásmido A) pero en este caso el *cassette* situado entre las DR contiene dos marcadores: un gen de resistencia a Ap y un gen *gfpmut2*.

Decidimos entonces construir un tercer sustrato (Figura R14, plásmido C) para poder estudiar la actividad de resolución. En este caso, al igual que en el plásmido A utilizamos un replicón W sin *resP* pero esta vez se incluyeron dos marcadores entre las DR, un gen de resistencia a Ap y un gen *gfp*. De esta manera, añadiendo ResP en *trans* se podría medir la actividad de resolución tanto por plaqueo como por citometría de flujo.

El plásmido C se introdujo en una cepa *recA*⁻ de *E. coli* (DH5α), tanto en presencia como en ausencia de ResP. Para producir ResP en *trans* se utilizó un plásmido

pBAD::*resP* (pAR1). Se crecieron cultivos de DH5 α (plásmido C), DH5 α (plásmido C + pBAD33 vacío) y DH5 α (plásmido C + pAR1) en LB con Km en el primer caso o LB con Km/Cm/glucosa para los que contenía un pBAD. Los cultivos crecidos se diluyeron en LB, sin antibiótico para la que solo llevan el plásmido C, y con Cm y arabinosa para las que llevan el pAR1 (o el pBAD33). A continuación, se crecieron a 37 °C durante unas 5 generaciones.

Muestras iniciales (0 generaciones) y finales (5 generaciones) de los distintos cultivos se analizaron por citometría de flujo y por plaqueo. En el citómetro se recogieron 20.000 eventos que se representaron en gráficas enfrentando CFP vs. GFP. Las células con el plásmido C original se recogen como evento CFP⁺GFP⁺ mientras que aquellas en las que ResP ha eliminado en *cassette* se transforman en eventos CFP⁺GFP⁻, al eliminarse el marcador de fluorescencia verde. En los ensayos de plaqueo, se replicaron 100 colonias de cada muestra en placas Ap, Km y Cm. Aquellas células en la que el plásmido C está intacto crecerán tanto en Km como en Ap, pero aquellas en las que se ha eliminado el *cassette* entre las DR crecerán en Km pero no en Ap.

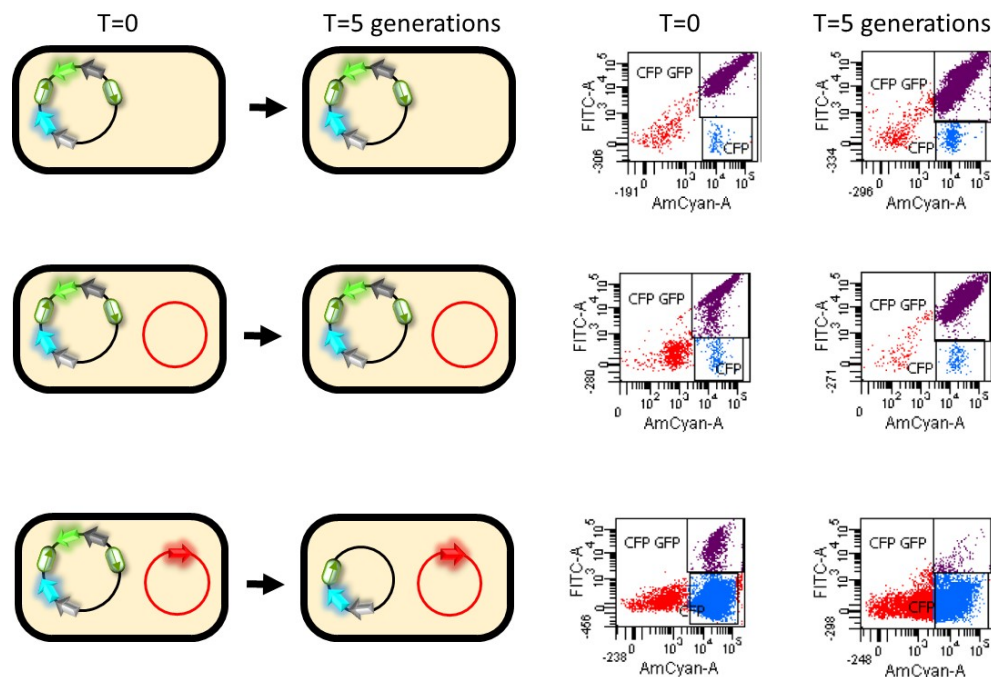


Figura R15: Experimentos de citometría para el análisis de la actividad resolvasa de ResP.

Izquierda: representación de las células con el sustrato de resolución C: solo (arriba), con el pBAD vacío (en medio) y con el pAR1 (abajo). En el sustrato de resolución las resistencias a antibióticos están representadas con flechas grises; los marcadores fluorescencia con flechas verdes *gfp* o azules para *cfp*; las DRs se representan como óvalos verdes. Se muestra el estado del sustrato de resolución al inicio (t=0) y al final (t=5).

Derecha: gráficas de citometría de flujo correspondientes al resultado obtenido para los cultivos se representa en los dibujos. En rojo se representan las dobles negativas; en azul las CFP+GFP-, que corresponde a aquellas células en las que se ha eliminado el *cassette*; en morado los eventos dobles positivos, que corresponden a las células con el plásmido C intacto.

Los resultados obtenidos por citometría de flujo y confirmados por el plaqueo, indican que ResP es eficiente resolviendo cointegrados. Esto se ve claramente en las citometrías mostradas en la figura R15, donde la población representada en morado (células CFP+GFP+) corresponde a las células con el sustrato sin resolver, mientras que la población en azul (CFP+GFP-) corresponde con las que tienen el sustrato sin el *cassette*. En presencia de *resP* en *trans* (células con el pAR1), incluso al inicio del experimento ($t=0$) cuando la expresión de *resP* no estaba inducida, solo el 5% de las células presentan el sustrato en la configuración sin resolver y tras 5 generaciones son <1%. Sin embargo en el caso de las células que no tienen *resP* (las que solo tienen el sustrato o las que tienen el sustrato más el pBAD vacío) el porcentaje de células con el sustrato sin resolver al inicio se conserva a las 5 generaciones.

En conjunto, nuestros datos indican que ResP constituye una “*moonlight protein*” (Jeffery, 1999) capaz de ejecutar dos acciones diferentes. Por un lado ResP actúa como regulador transcripcional de los genes implicados en la replicación del plásmido. Por otra parte, ResP mantiene su actividad resolvasa, siendo capaz de resolver cointegrados.

1.7. Efecto de perturbaciones ambientales en la red

El hecho de que los promotores del plásmido sean intrínsecamente fuertes, pero se encuentren completamente silenciados por la acción de represores transcripcionales, sugería que podrían existir situaciones en las cuales esta represión fuese levantada. Por esta razón, decidimos analizar si el plásmido era capaz de responder a perturbaciones ambientales. Para ello, se ensayó tanto la librería de promotores pGP solos como en presencia de R388 (pGP+R388) en distintas condiciones, midiendo los perfiles de expresión transcripcional en el lector de placas según el protocolo descrito en materiales y métodos (apartado B5.1).

Se probaron varias condiciones: temperatura, inducción de respuesta SOS, concentraciones subinhibitorias de antibióticos y presencia de potenciales receptores conjugativos.

a) Temperatura

Se probó el crecimiento de los cultivos a 3 temperaturas de cultivo diferentes: 30, 37 y 42 °C. Para ello, se procedió según el protocolo descrito para los ensayos de actividad transcripcional, programando la incubación en el Victor 3 a las temperaturas deseadas, habiendo calculado previamente los ajustes adecuados para la inyección de agua durante las medidas de manera que no se viese afectado el volumen de los pocillos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura R16.

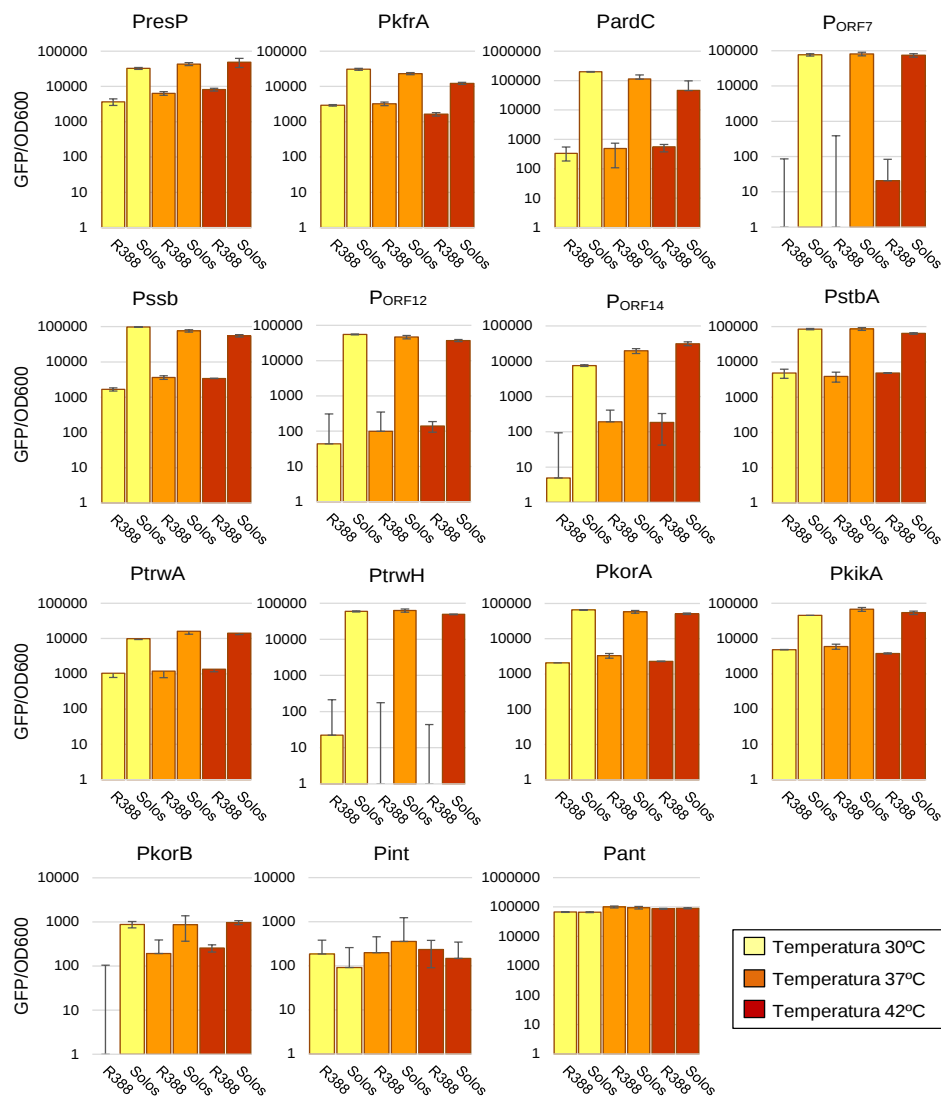


Figura R16. Efecto de la temperatura sobre los promotores de R388.

En la figura se muestran los resultados de las medidas de la actividad transcripcional de los promotores tanto solos como en presencia de R388 a tres temperaturas de cultivo distintas (30, 37 y 42 °C). Los datos son el promedio de 3 medidas independientes y las

barras de error muestran la desviación estándar de las medidas. El eje Y se muestra en escala logarítmica para facilitar la representación de los datos.

En ningún caso parecen encontrarse diferencias significativas más allá de los efectos derivados de los cambios en la velocidad de crecimiento a las distintas temperaturas. Debe tenerse en cuenta que el eje Y se muestra en escala logarítmica para facilitar la visualización de todos los datos pero esto puede magnificar en algunos casos diferencias en los valores pequeños (por debajo de 100 u.a.f.). Estos valores se encuentran muy influenciados por el ruido de fondo y en ellos no podemos discriminar si se producirían variaciones pequeñas, únicamente detectaríamos si se producen activaciones importantes.

b) Respuesta SOS

Otra condición que se decidió probar fue si alguno de los promotores presentaba respuesta SOS. La respuesta SOS se produce en condiciones de estrés celular, por ejemplo cuando tiene lugar daño en el DNA. Su activación da lugar al desencadenamiento de cambios en la expresión de genes mediado por LexA produciendo la activación de mecanismos de reparación del DNA. Se sabe que la entrada de cadena sencilla en la célula puede desencadenar la respuesta SOS (Baharoglu, *et al.*, 2010), por lo que parece interesante comprobar si en un plásmido conjugativo alguno de sus promotores puede verse afectado por esta respuesta de estrés.

Para desencadenar la respuesta SOS en las células se probaron tres protocolos diferentes. Tras la dilución de los cultivos en la placa microtiter, se expusieron las células a luz UV (254 nm, 15W) durante 5 o 10 segundos, y a continuación se midió el perfil de expresión de los promotores en el lector de placas siguiendo el protocolo de medida de la actividad transcripcional (MM B5.1). Además de la exposición a luz UV, también se probó como inductor de la respuesta SOS un tratamiento con Mitomicina C a una concentración de 5 µg/ml. Los resultados obtenidos en los tres casos se muestran en la figura R17.

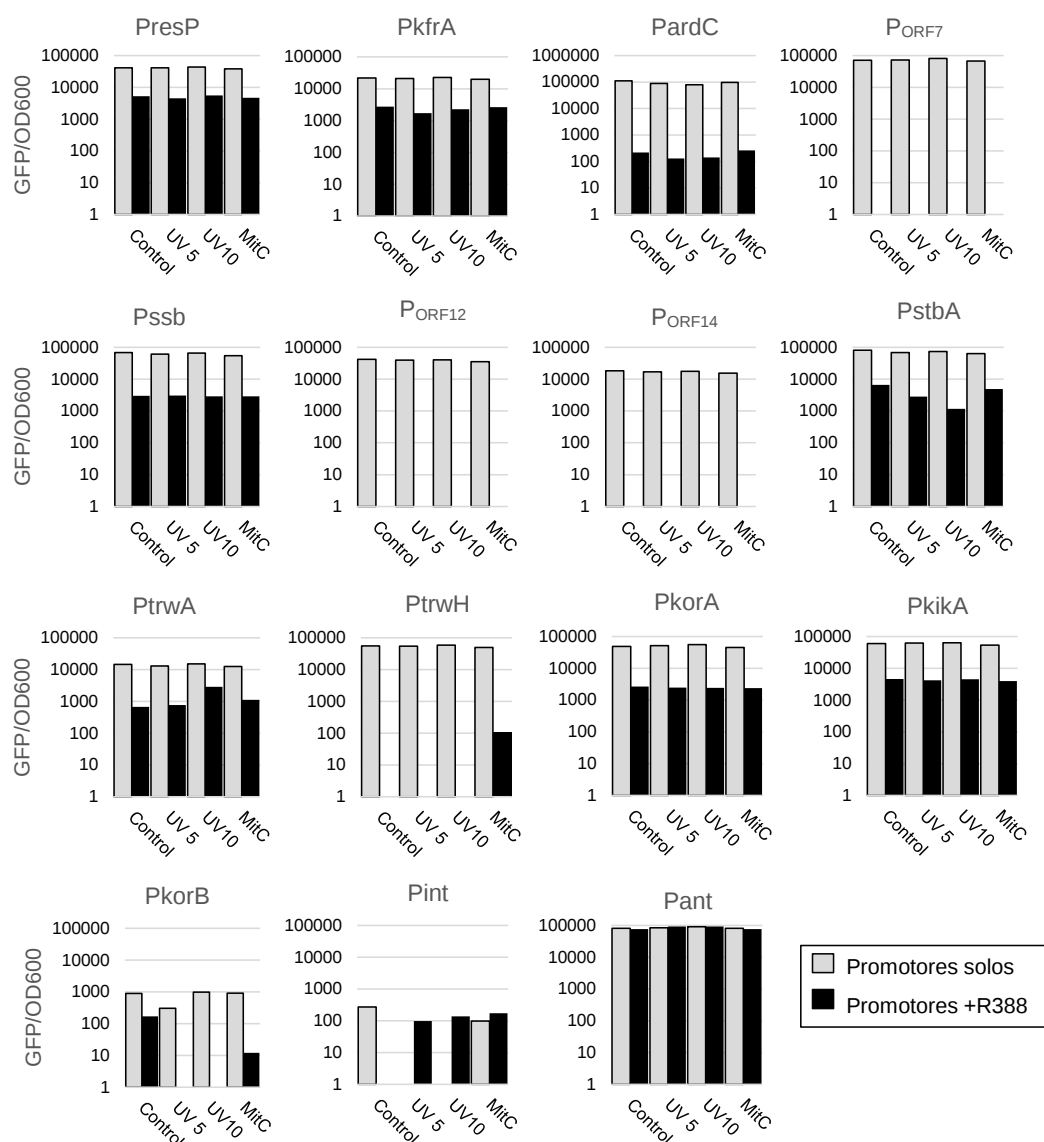


Figura R17. Medida del efecto de la respuesta SOS en los promotores de R388

En la figura se muestran los valores de actividad transcripcional en estado estacionario para los promotores de R388 tanto solos (en gris) como en presencia de R388 (en negro), tras inducir la respuesta SOS en las células. Las medidas se realizaron según el protocolo B5.1 de materiales y métodos. Para desencadenar la respuesta SOS, tras 2h de crecimiento de los culivos, las células se expusieron a luz UV 5 seg., UV 10 seg. o bien se añadió 5 µg/ml de mitomicina C al medio y se pusieron a medir en el lector de placas. El eje Y se muestra en escala logarítmica.

No se encontraron cambios importantes en ningún promotor a la respuesta SOS, únicamente **PtrwA** podría mostrar un discreto incremento de la actividad (3 veces) (casi 3000 u.a.f. frente a unas 1000 u.a.f. en el control) en la exposición a UV durante 10 seg. pero solo en la medida del promotor en presencia de R388. Este efecto podría ser un

artefacto experimental y para confirmarlo haría falta hacer más medidas. En el caso de *Pint* podría observarse una respuesta SOS tanto por mitomicina C como por radiación UV, pero al tratarse de valores de muy bajos están demasiado influenciados por el ruido de fondo como para poder considerarlos significativos. Para obtener unos datos más robustos sería necesario repetir los experimentos para tener más réplicas y poder analizar los datos en profundidad.

c) Concentraciones subinhibitorias de antibióticos:

Se ha observado que concentraciones subinhibitorias de antibióticos que afectan a los procesos de transcripción/traducción pueden producir fuertes respuestas transcripcionales (Davies, *et al.*, 2006). Dado el papel que los plásmidos conjugativos tienen en la dispersión de las resistencias a los antibióticos, decidimos analizar el posible efecto de concentraciones subinhibitorias de rifampicina y cloranfenicol en la red de regulación del plásmido. Para ello, se utilizaron concentraciones de 3 µg/ml de rifampicina y de 0,2 – 0,4 µg/ml de cloranfenicol, midiéndose la actividad transcripcional de los promotores según el procedimiento habitual. Las concentraciones de antibiótico se eligieron mediante la realización de curvas de crecimiento en diluciones seriadas de antibiótico, eligiéndose aquellas concentraciones a partir de las cuales el crecimiento de los cultivos empezaba a verse afectado. Los resultados obtenidos se recogen en la figura R18.

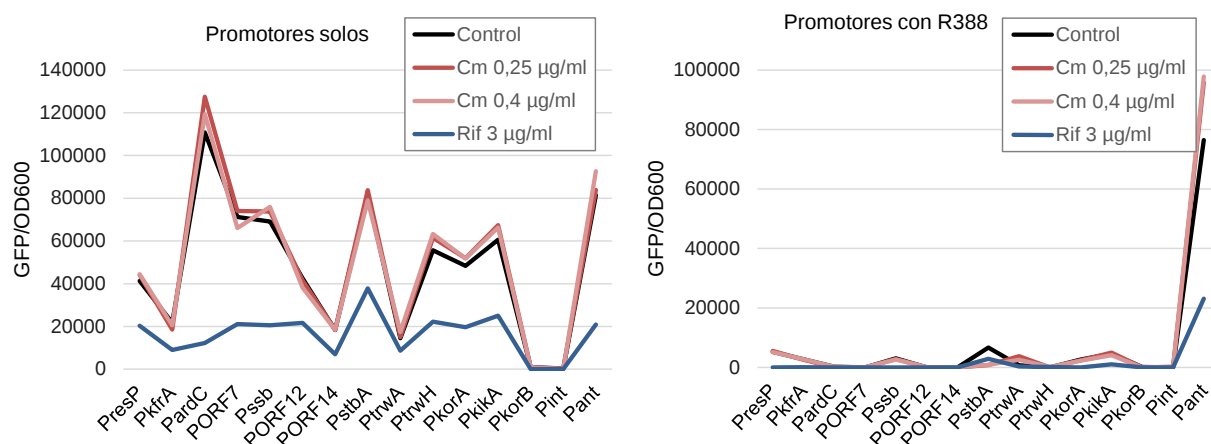


Figura R18. Efecto de concentraciones subinhibitorias de antibiótico sobre los promotores de R388.

En la figura se muestra la actividad transcripcional media en estado estacionario para los promotores de R388, tanto solos (izquierda) como en presencia del plásmido completo (derecha), creciendo en medio de cultivo con concentraciones subinhibitorias de Cm (0,2 y 0,4 µg/ml) y Rif (3 µg/ml).

Ninguna de las concentraciones de antibiótico parece desencadenar una respuesta específica en ninguno de los promotores. En el caso del cloranfenicol no se observa ningún efecto sobre el perfil de expresión de los promotores de R388, ni solos ni en presencia de R388. En el caso de la rifampicina, su presencia en el medio produce una reducción general de los niveles GFP/OD de los promotores, que se observa tanto en ausencia como en presencia de R388, pero no parece desencadenarse ningún efecto específico llamativo sobre alguno de los promotores en concreto.

d) Presencia de posibles receptores:

Otro factor que pensamos que podría ser importante para el plásmido es la presencia en el medio de posibles receptores para la transferencia por conjugación. Por ello, se obtuvieron los perfiles de expresión de los promotores de R388 en presencia de potenciales receptores conjugativos, mezclando el cultivo de las células con la librería pGP con células BW27783 vacías. Para ello se crecieron cultivos de BW27783 con los promotores solos y con los promotores + R388, y se mezclaron en un ratio 1:1 con un cultivo de células BW27783 justo antes de comenzar las medidas de los perfiles de expresión. Para mantener la misma cantidad de células productoras de GFP en los cultivos control y en los mezclados con receptores, se optó por doblar el volumen a medir en cada pocillo (en vez de 150 μ l se pusieron 300 μ l) en el caso de los cultivos con receptores. Los perfiles de expresión obtenidos para cada uno de los promotores se muestran en la figura R19.

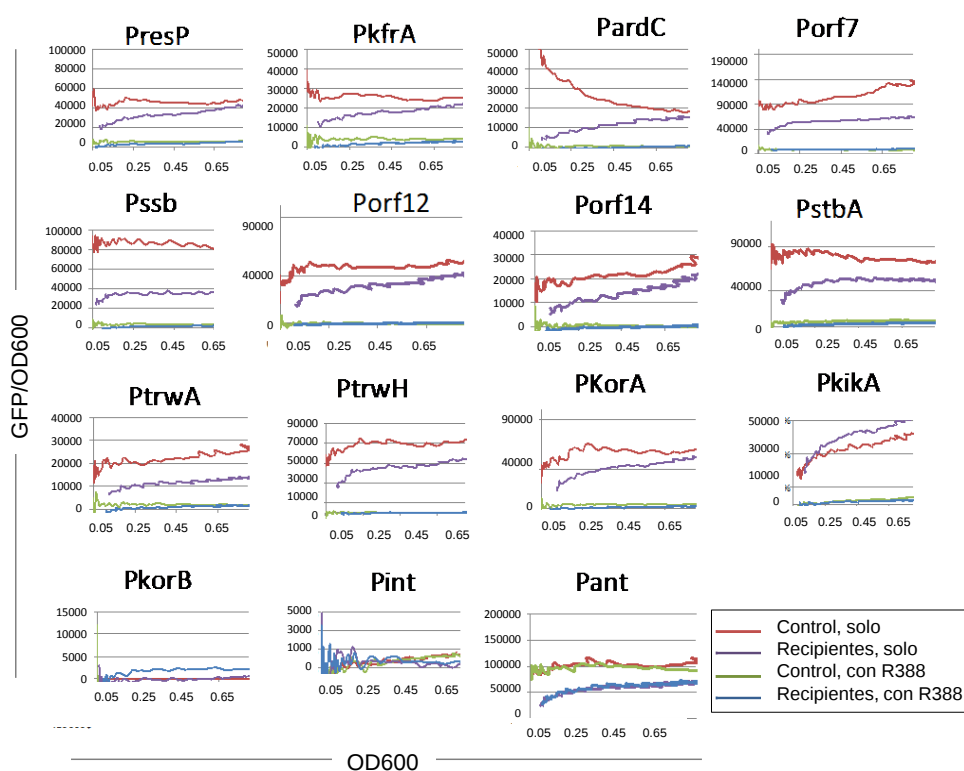


Figura R19. Perfiles de expresión de los promotores de R388 en presencia de posibles receptores.

Se muestran los perfiles de expresión de los promotores R388 obtenidos según el protocolo de medida de la actividad transcripcional descrito en materiales y métodos (apartado B5.1). El cultivo con la librería de promotores se mezcló 1:1 con un cultivo de BW27783 vacío (recipientes potenciales). Para cada promotor se muestra la curva en ausencia y en presencia de R388, para un experimento control y para el experimento en presencia de posibles receptores conjugativos.

En ninguno de los promotores se detectó un efecto significativo, únicamente se observa una reducción general de la señal de fluorescencia medida, que probablemente sea un efecto inespecífico debido al apantallamiento de la señal producido por las células no fluorescentes del cultivo.

1.8. Actividad de los promotores en presencia de otros plásmidos genéticamente parecidos a R388

R388 es el prototipo del grupo de incompatibilidad IncW, un grupo de plásmidos conjugativos próximamente relacionados que comparten un esqueleto genético común con 97% de identidad de secuencia (Revilla, *et al.*, 2008). Para probar el efecto en la red de R388 de un *background* (fondo) genético similar pero con mutaciones puntuales y distintas inserciones de elementos genéticos móviles, analizamos la actividad transcripcional de los promotores de nuestra librería, en presencia tanto del plásmido R7K como el plásmido pIE321, dos miembros del grupo de incompatibilidad IncW.

Los plásmidos R7K y pIE321 fueron transferidos por conjugación a cultivos de *E. coli* BW27783 que contenían la librería pGP y se obtuvieron los perfiles de expresión de los promotores como se describe en el apartado B5.1 de materiales y métodos. Los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos en presencia de R388 y se encuentran recogidos en la tabla R5 y representados en la figura R20.

	Actividad promotor ($\times 10^2$)		
	R388	R7K	pIE321
P_{resP}	64 $\pm$ 9	58 $\pm$ 7	38 $\pm$ 5
P_{kfrA}	32 $\pm$ 4	26 $\pm$ 6	24 $\pm$ 2
P_{ardC}	5 $\pm$ 1	13 $\pm$ 4	3 $\pm$ 2
P_{ORF7}	1 $\pm$ 1	< 1	7 $\pm$ 2
P_{ssb}	35 $\pm$ 2	39 $\pm$ 3	5 $\pm$ 2
P_{ORF12}	2 $\pm$ 2	4 $\pm$ 3	19 $\pm$ 4
P_{ORF14}	4 $\pm$ 3	1 $\pm$ 2	17 $\pm$ 2
P_{stbA}	48 $\pm$ 9	117 $\pm$ 19	86 $\pm$ 9
P_{trwA}	16 $\pm$ 3	185 $\pm$ 16	37 $\pm$ 10
P_{trwH}	< 1	< 1	6 $\pm$ 2
P_{korA}	36 $\pm$ 3	44 $\pm$ 2	87 $\pm$ 6
P_{kikA}	59 $\pm$ 7	61 $\pm$ 3	77 $\pm$ 4
P_{korB}	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 2
P_{int}	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 2	1 $\pm$ 3
P_{ant}	1045 $\pm$ 66	917 $\pm$ 37	819 $\pm$ 67

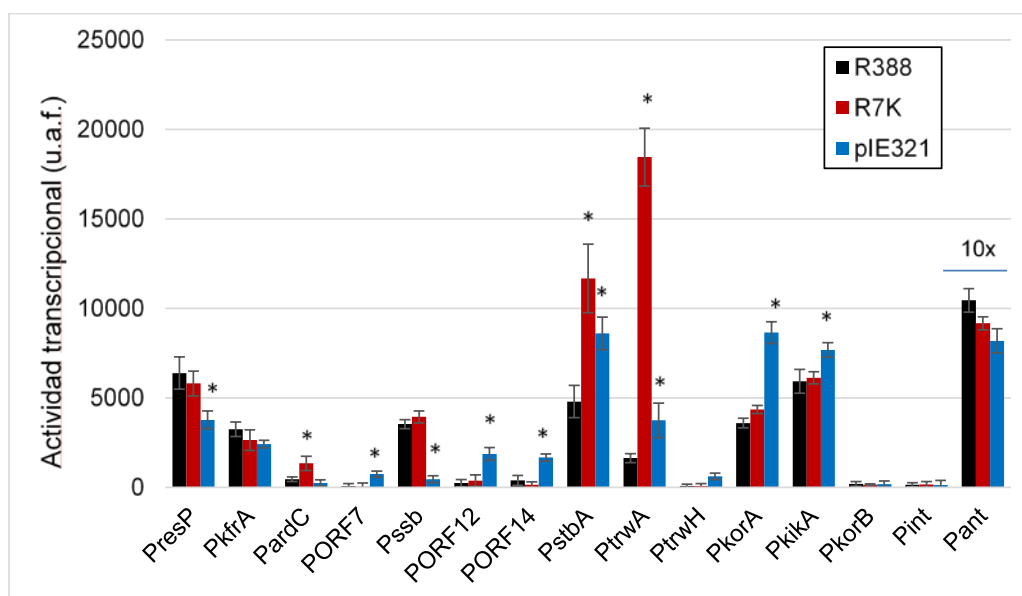


Figura R20. Actividad transcripcional de los promotores de R388 en presencia de plásmidos IncW.

Las medidas se realizaron en un lector de placas Victor3 según el procedimiento descrito en el apartado B5.1 de materiales y métodos, realizándose al menos 10 medidas independientes de cada dato. Las columnas corresponden al promedio de los distintos experimentos y las barras de error representan la desviación estándar de las medidas. En negro se representa la actividad de los promotores en presencia de R388, en rojo en presencia de R7K y en azul la actividad medida en presencia de pIE321. La actividad transcripcional se expresa como cantidad de fluorescencia por célula (GFP/DO₆₀₀).

A pesar de que el esqueleto del plásmido es un 97.5% idéntico entre R388 y R7K, y 97% entre R388 y pIE321, encontramos bastantes variaciones en la actividad de los promotores de R388 en presencia de la red de transcripcional de estos plásmidos. Cuando la librería de promotores se probó en células que contenían R7K, los promotores **P_{trwA}**, **P_{stbA}** y **P_{ardC}** mostraron un aumento de actividad transcripcional respecto a la medida en presencia de R388 mientras que el resto de promotores no mostraron cambios significativos. El promotor que mostró una mayor variación fue **P_{trwA}** con un incremento de unas 10 veces, obteniéndose un nivel de actividad similar al medido para el promotor solo (ver tabla R1, apartado 1.1). Esto indicaría que, aunque R7K tiene un gen *trwA*, su producto no es capaz de reprimir **P_{trwA}** de R388. En el caso de **P_{stbA}** y **P_{ardC}**, los niveles obtenidos no fueron tan altos como en el plásmido reportero solo, por lo que parece que los reguladores del plásmido R7K aún son capaces de reprimir estos promotores aunque solo parcialmente.

Los resultados obtenidos con el plásmido pIE321 indican que 9 de los 13 promotores del esqueleto plasmídico muestran variaciones significativas respecto a los resultados obtenidos en presencia de R388. Los promotores **P_{resP}** y **P_{ssb}** muestran actividades transcripcionales menores, lo que sugiere que los reguladores transcripcionales del pIE321 ejercen una mayor represión sobre ellos que R388. Por otro lado, los promotores **P_{orf12}**, **P_{orf14}** y los 4 promotores implicados en la transferencia conjugativa (**P_{trwA}**, **P_{trwH}**, **P_{korA}** and **P_{kikA}**) mostraron mayores actividades transcripcionales. Aunque la presencia del pIE321 altera los niveles transcripcionales de más promotores que en presencia de R7K, la intensidad de la perturbación ejercida es menor. Los mayores cambios se observaron en los promotores **P_{ssb}** (baja 7 veces) y **P_{orf7}** (sube 7 veces), mientras que el resto solo mostró variaciones entre 2 y 4 veces.

2. APROXIMACIÓN AL ESTUDIO DEL FENOTIPO DE LOS IncW

Los estudios genómicos sobre la familia de los plásmidos IncW revelaron la existencia de un grupo de plásmidos caracterizados por una alta identidad genética (97%) y que estaban presentes en distintos hospedadores bacterianos (Revilla 2008). Al analizar el efecto de estos genomas sobre los promotores de R388, observamos, sin embargo, importantes diferencias pese a la alta conservación de la secuencia. Esto nos llevó a preguntarnos si esta similitud a nivel de secuencia se traduciría en un fenotipo similar, o si por el contrario, existirían diferencias fenotípicas importantes, como el impacto sobre la red de regulación parecía sugerir.

Por estas razones decidimos analizar el fenotipo de varios miembros de la familia IncW, atendiendo a las tres características básicas del fenotipo de un plásmido: su capacidad de replicar, de conjugar a nuevos hospedadores y de mantenerse estable en ellos.

2.1. Funcionamiento de la replicación: medida del número de copias por cromosoma.

Para determinar si las diferencias genéticas entre los plásmidos IncW tenían un impacto sobre la capacidad replicativa del plásmido, se determinó el número de copias de los plásmidos R388, R7K y pIE321. Para ello empleamos PCR cuantitativa, normalizando los valores obtenidos frente al cromosoma para obtener así el número de equivalentes plasmídicos por copia cromosómica. El protocolo utilizado se describe en el apartado B7 de materiales y métodos. Se utilizaron cuatro parejas de oligos que hibridan en secuencias 100% conservadas en los tres plásmidos, utilizándose como referencia cromosómica los genes *rho* y *dxs* del cromosoma bacteriano. El número de copias relativo se determinó comparando el ciclo umbral obtenido para el plásmido y el cromosoma ($n^{\circ} \text{ copias} = 2^{\Delta Ct}$; $\Delta Ct = Ct \text{ cromosoma} - Ct \text{ plásmido}$). En la tabla R6 se recogen los valores de Ct medidos y en la figura R21 se han representado los resultados obtenidos al calcular el número de copias de plásmido por cromosoma de cada una de las réplicas.

	Dianas plásmido				Cromosoma	
	<i>orf7left-orf8right</i>	<i>klcbleft-orf14right</i>	<i>trwCleft-trwDrigh</i>	<i>int14right-resPleft</i>	<i>rho</i>	<i>dxs</i>
R388	13,36	13,4	13,1	13,53	15,52	15,33
R388 (dil. 1/2)	14,07	14,55	14,32	14,02	15,99	16,21
R388 (dil. 1/4)	15,12	14,69	14,32	14,39	16,76	16,5
R7K	14,25	13,81	13,27	13,46	15,72	15,51
R7k (dil. 1/2)	15,47	15,58	14,85	14,61	16,92	17,16
R7K (dil 1/4)	16,94	16,55	15,89	16,21	18,1	18,08
pIE321	18,48	18,68	17,36	17,74	17,41	17,48
pIE321 (dil 1/2)	21,16	20,73	20,64	20,04	19,42	19,56
pIE321 (dil 1/4)	21,59	21,99	20,93	21,16	20,18	20,38

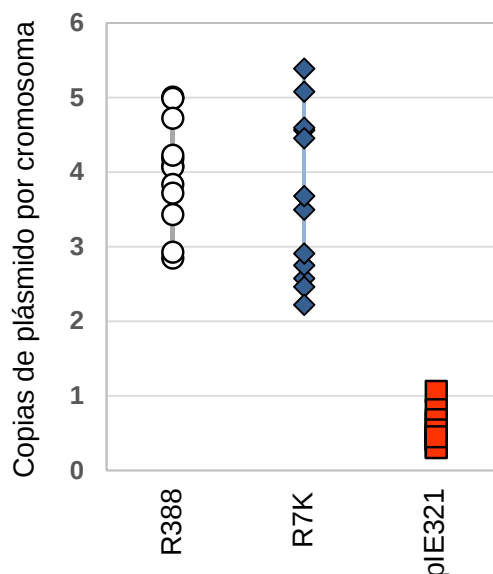


Tabla R6 y figura R21. Cálculo del número de copias de plásmido por cromosoma.

En la tabla se recogen los valores Ct obtenidos en los experimentos de PCR tiempo real para las cuatro dianas plasmídicas y las dos cromosómicas, en las muestras de DNA total extraído para R388, R7K y pIE321. En la figura se representa el número de copias por cromosoma obtenido para las distintas réplicas de cada uno de los plásmidos (R388 en blanco, R7K en azul y pIE321 en rojo).

El resultado obtenido muestra que existe una diferencia en el número de copias, encontrándonos con que mientras R388 y R7K tienen alrededor de 4 copias por cromosoma, el número de copias de pIE321 es más bajo obteniéndose un valor medio de entre 0,5 y 1 copia por cromosoma.

Debido a estas diferencias, analizamos en detalle la región de replicación de estos plásmidos. El análisis de la secuencia puso de manifiesto la presencia en pIE321 de una repetición adicional del iterón de unión de RepA en el *oriV* (Tait, et al., 1983). En la figura R22 se muestra el resultado del alineamiento de la secuencia IT-A de R388, R7K y pIE321, destacándose de forma esquematizada la inserción presente en pIE321.

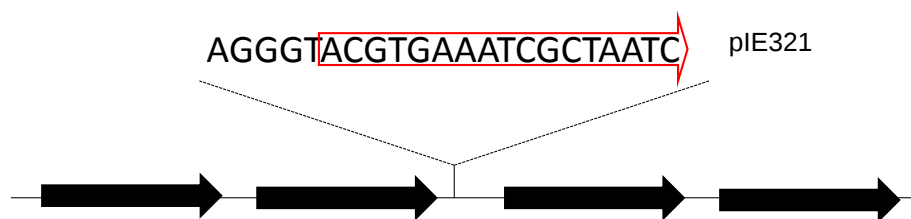


Figura R22. Secuencias IT-A en *oriV* de los plásmidos IncW. En la figura se muestra un alineamiento de la secuencia *oriV* de R388, R7K y pIE321, donde se observa como pIE321 presenta una repetición más en el iterón de unión de repA (IT-A) que sus compañeros. En la parte de arriba de la figura se destaca la secuencia extra encontrada en pIE321 de manera más clara.

2.2. Ensayos de estabilidad del plásmido R388, plásmidos IncW y derivados R388

Como se recoge en la introducción, la transferencia genética horizontal por conjugación de plásmidos de amplio rango de hospedador (BHR) ha demostrado ser un factor muy importante en la propagación de resistencias a antibióticos entre bacterias, dado que estos plásmidos pueden transferirse y replicarse en un amplio rango de especies diferentes. Para ser capaces de establecer el rango real de hospedador de un plásmido, además de la capacidad de conjugación y replicación, una tercera característica que debería ser considerada es la capacidad de los plásmidos para mantenerse en el hospedador en ausencia de selección.

En el artículo de Fernandez-Lopez (Fernandez-Lopez, *et al.*, 2006) se presenta una tabla con todas aquellas especies bacterianas en las que se ha descrito la presencia de R388 o alguno de sus homólogos IncW, estableciéndose un rango de hospedador que abarca una amplia variedad de proteobacterias. Sin embargo, al igual que en ocurre en la mayoría de los plásmidos considerados BHR, esta tabla se basa fundamentalmente en información sobre conjugación o replicación y se dispone de muy poca información sobre la estabilidad a largo plazo de los distintos IncW en estos hospedadores.

Para abordar el estudio de la estabilidad de los plásmidos IncW, inicialmente decidimos comprobar su estabilidad en *E. coli*. Para ello, introdujimos R388, pSa, R7K, pIE321 y pIE522 en *E. coli* BW-Rif^R y seguimos la estabilidad durante 100 generaciones,

siguiendo el protocolo descrito en el apartado B6 de MM adaptado de (De Gelder, *et al.*, 2007). Se añadió también en los experimentos el pSU5000 que es una construcción que contiene únicamente el replicón de R388 con una resistencia a Cm (Fernandez-Lopez, 2007).

Los resultados obtenidos en este experimento se encuentran recogidos en la tabla R7 y representados en la figura R23.

	Número de generaciones					
	0	20	40	60	80	100
R388	100	100	100	100	99	100
R7K	94	83	76	75	68	57
pIE522	98	97	96	96	96	96
pSa	100	99	99	98	95	96
pIE321	100	100	100	100	100	100
Replicón R388	91	78	65	54	44	29

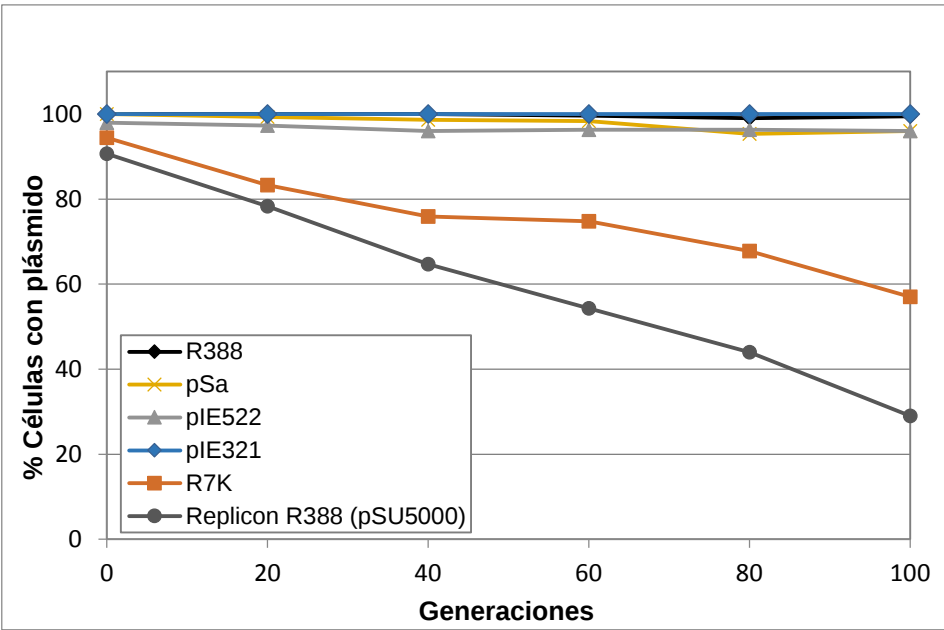


Figura R23. Estabilidad de los plásmidos IncW en *E. coli* BW-Rif^R.

En la figura se muestra el % de células que mantienen el plásmido tras 100 generaciones creciendo sin selección, para cada uno de los plásmidos IncW (y para el replicón de R388 aislado). El procedimiento experimental seguido se encuentra recogido en MM. Cada dato es el promedio de, al menos, 3 experimentos independientes con 3 réplicas cada uno. Los antibióticos de selección utilizados en cada caso son los siguientes: R388 (Tp), pSa (Km), pIE522 (Km), pIE321 (Sm), R7K (Ap o Sp), (pSU5000 (Cm)).

Como se puede observar, con excepción de R7K todos los plásmidos IncW ensayados se mantienen completamente estables en *E. coli* durante las 100 generaciones, obteniéndose valores del 100% de la población en el caso de R388 y pIE321 o de alrededor del 95% en pSa y pIE522. Sin embargo, en el caso de R7K el plásmido parece que no es capaz de mantenerse estable y se va perdiendo, aunque más lentamente que el pSU5000 que contiene solo el replicón y que se pierde de forma constante.

El hecho de que no todos los plásmidos IncW exhibiesen el mismo nivel de estabilidad en *E. coli* nos llevó a preguntarnos si el plásmido modelo de este grupo, R388, estable en *E. coli*, podría tener un fenotipo de estabilidad diferente en otros hospedadores. Para comprobarlo se ensayó R388 en varias gammaproteobacterias y una alfaproteobacteria a las que pudimos tener acceso:

Gammaproteobacteria Enterobacteriales

Klebsiella pneumoniae K6 ATCC700603

Salmonella typhimurium LT2

Gammaproteobacteria Pseudomonadales

Acinetobacter baumannii ATCC19606

Pseudomonas putida KT2440

Gammaproteobacteria Vibrionales

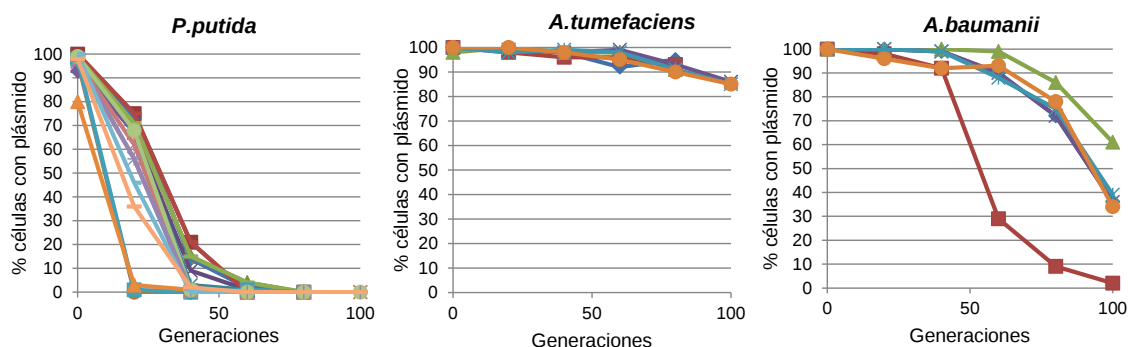
Vibrio cholerae CIP106855

Vibrio cholerae CIP106851

Alfaproteobacteria

Agrobacterium tumefaciens GMI9023

Según los marcadores de resistencia de cada especie, en los ensayos se utilizó R388 o pSU2007 (derivado de R388 con un marcador de resistencia a Km), que se introdujeron mediante conjugación desde *E. coli* BW27783. La figura R24 muestra los resultados obtenidos para los ensayos de estabilidad llevados a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado B6 de materiales y métodos.



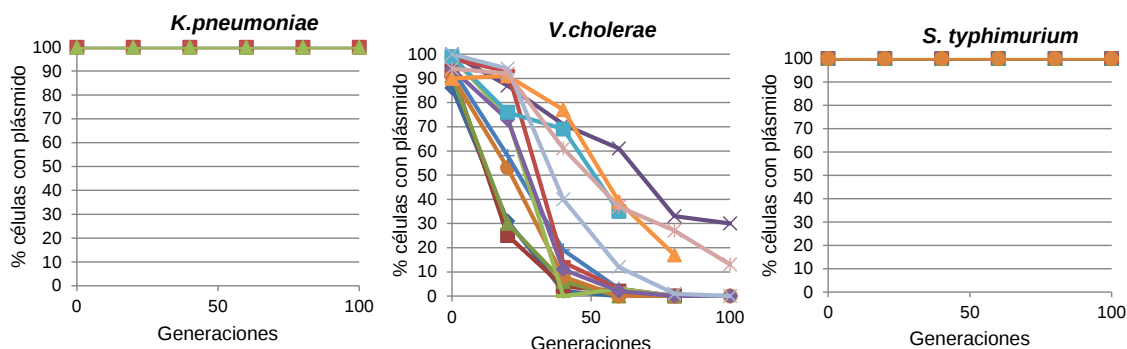


Figura R24. Estabilidad de R388 en distintos hospedadores.

En la figura se muestra el % de células que mantienen el plásmido (R388/pSU2007) tras 100 generaciones creciendo sin selección, obtenidos según el protocolo descrito en el apartado B6 de materiales y métodos. Cada gráfico muestra las distintas réplicas llevadas a cabo en cada hospedador. Según las resistencias a antibióticos de cada hospedador se utilizó R388 o un derivado Km^R, pSU2007. Los antibióticos de selección utilizados fueron Tp para R388 o Km en el caso pSU2007.

Como se ve en la figura R21, el plásmido R388 se mantiene completamente estable durante 100 generaciones en todas las enterobacterias ensayadas. En *Agrobacterium*, una alfa-proteobacteria, la inestabilidad plasmídica es baja, y no parece incrementarse con el tiempo; tras las primeras 20 generaciones el 99% de las células conservan el plásmido y tras 80 el 93% de las células de *Agrobacterium* continúan teniendo plásmido. Por el contrario, *Pseudomonas* y *Vibrio* muestran dramáticas pérdidas del plásmido. Las células de *Vibrio* con plásmido pasan a ser alrededor del 40 % de la población tras solo 20 generaciones, no detectándose prácticamente el plásmido tras 80 generaciones. En *Pseudomonas* solo el 73% de las células mantienen el plásmido tras 20 generaciones no habiendo células con plásmido a las 80 generaciones.

Las dos especies en las que R388 resultó más inestable, *V. cholerae* y *P. putida*, se seleccionaron para ensayar en ella la estabilidad del resto de plásmidos IncW. Añadimos también al experimento los dos mutantes de R388 con deleciones en la región de establecimiento y mantenimiento estable del plásmido, construcciones pIC10 y pIC12, para ver si el cambio en esta región producía algún efecto sobre en la estabilidad del plásmido. Se decidió meter en el ensayo estos dos mutantes por presentar modificaciones en la región de establecimiento y mantenimiento del plásmido y por ser esta zona es donde se concentran las principales diferencias entre los IncW. Los plásmidos se introdujeron en las cepas de *V. cholerae* y *P. putida* por conjugación desde *E. coli* BW27783 y se siguió la estabilidad durante 100 generaciones, de acuerdo al

protocolo descrito en el apartado B6 de MM. En el caso de *P. putida* se dejó fuera del experimento R7K debido a la falta de un marcador de selección eficaz para llevar a cabo el ensayo. En cada caso se realizaron 3 experimentos con 3 réplicas cada uno, los resultados obtenidos se encuentran representados en la figura R25.

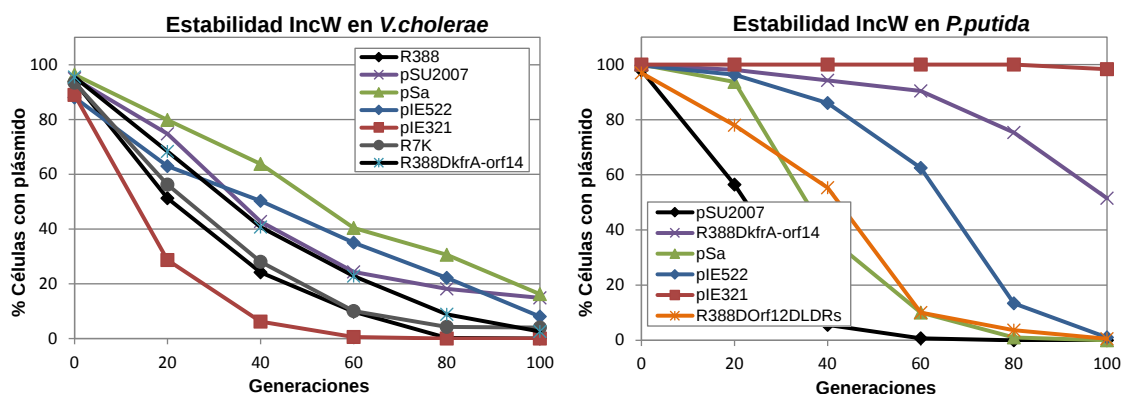


Figura R25. Estabilidad de los plásmidos IncW en *V. cholerae* y *P. putida*. En la figura se muestra el % de células que mantienen el plásmido tras 100 generaciones creciendo sin selección, para cada uno de los plásmidos IncW (y para el replicón de R388 aislado). El procedimiento experimental seguido se encuentra recogido en el apartado B6 de MM. Cada dato es el promedio de, al menos, 3 experimentos independientes con 3 réplicas cada uno. Los antibióticos de selección utilizados en cada caso son los siguientes: R388 (Tp), pSa (Km), plE522 (Km), plE321 (Sm), R7K (Ap o Sp), pIC9 (Km) y pIC10 (Km).

El resultado de los experimentos muestra que en *V. cholerae* todos los plásmidos parecen comportarse de manera muy similar, desapareciendo prácticamente de la población a las 100 generaciones. En *P. putida*, sin embargo, encontramos que el comportamiento es más heterogéneo, destacando el plásmido plE321 que parece mantenerse estable a lo largo de las 100 generaciones. También parece mostrar un comportamiento más estable en *P. putida* el derivado de R388 que carece de todos los genes de la región de mantenimiento, desde *kfrA* hasta el *orf14* (pIC10), pero no sucede lo mismo con aquel que carece de los genes ubicados entre las LDRs y el *orf12* (pIC12).

2.3. Ensayos de conjugación

El tercer aspecto básico de la fisiología plasmídica es la transferencia conjugativa. Para analizar el impacto de las diferencias genéticas sobre la capacidad conjugativa de los plásmidos IncW comparamos las frecuencias obtenidas utilizando distintas especies como donadoras y receptoras.

En primer lugar, llevamos a cabo experimentos de conjugación con R388 desde *E. coli* a las distintas especies de proteobacterias ensayadas en los experimentos de estabilidad (apartado 2.2) así como de éstas a *E. coli* como cepa receptora. Las conjugaciones se llevaron a cabo siguiendo el protocolo de conjugación descrito en el apartado B4.2 de MM, incubando a 30 °C (*P. putida* y *A. tumefaciens*) o 37 °C (el resto), con tiempos de conjugación de 1h excepto en *V. cholerae* y *A. baumannii* que fue de 4h. Cada dato es el promedio de al menos 9 experimentos (la columna N recoge el número de datos promediados en cada dato), calculado a partir de la media de los logaritmos. En la tabla R8 se recoge las frecuencias de conjugación obtenida para el plásmido R388 entre *E.coli* y otras especies bacterianas.

		F. conjugación por donador		F. conjugación por receptor		
Donador	Receptor	(media ± desvest)		(media ± desvest)		N
<i>S. typhimurium</i> (R388)	<i>BW-Nx</i>	2,6E-02	3,2E-01	7,6E-02	6,9E-01	9
<i>K. pneumoniae</i> (R388)	<i>BW-Nx</i>	2,2E-03	4,9E-02	2,4E-03	3,8E-02	18
<i>P. putida</i> (pSU2007)	<i>BW-Nx</i>	3,4E-01	3,7E+00	4,3E-02	1,5E+00	15
<i>A. baumanii</i> (pSU2007)	<i>BW-Nx</i>	2,8E-04	2,5E-03	1,8E-03	1,8E-02	9
<i>V. cholerae</i> (pSU2007)	<i>BW-Nx</i>	1,6E-05	1,2E-04	3,7E-05	9,0E-04	9
<i>A. tumefaciens</i> (pSU2007)	<i>BW-Nx</i>	1,4E-02	1,7E-01	6,5E-02	8,0E-01	9
<i>E.coli</i> (R388)	<i>BW-Nx</i>	5,0E-01	1,8E-01	6,2E-01	2,0E-01	20
<i>BW-Nx</i> (R388)	<i>S. typhimurium</i>	1,1E-03	2,6E-05	1,3E-04	8,0E-06	9
<i>BW-Nx</i> (R388)	<i>K. pneumoniae</i>	2,5E-01	4,1E-02	1,5E-01	2,6E-02	18
<i>BW-Nx</i> (pSU2007)	<i>P. putida</i>	4,1E-02	9,6E-04	3,8E-01	1,2E-02	18
<i>BW-Nx</i> (pSU2007)	<i>A. baumanii</i>	1,6E-05	4,9E-07	8,5E-06	4,4E-08	20
<i>BW-Nx</i> (pSU2007)	<i>V. cholerae</i>	9,9E-04	6,8E-05	1,8E-02	3,4E-04	15
<i>BW-Nx</i> (pSU2007)	<i>A. tumefaciens</i>	2,4E-01	3,2E-02	2,3E-02	1,8E-03	15

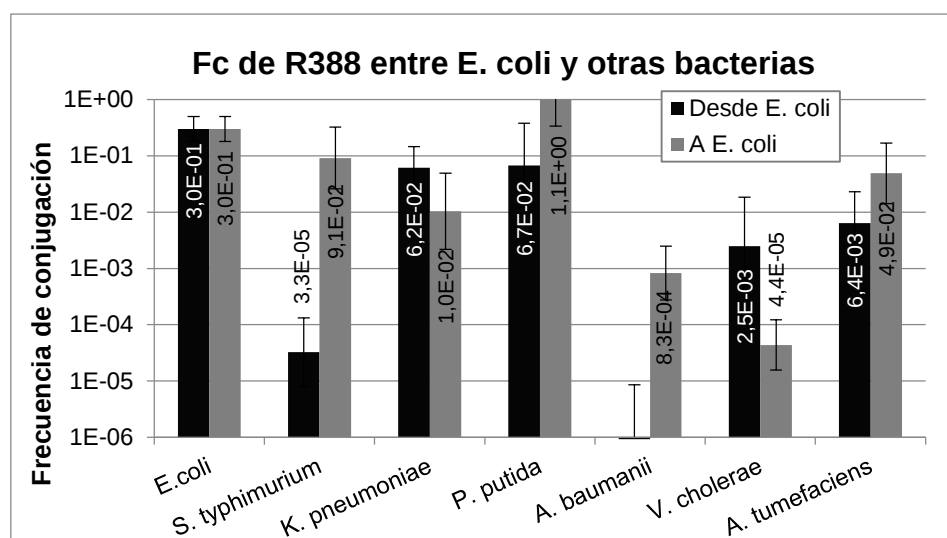


Tabla R8, Figura R26. Frecuencias de conjugación de R388.

En negro se representan las frecuencias de conjugación obtenidas para R388 desde *E. coli* hacia otras bacterias (ver eje) y en gris se representan las frecuencias obtenidas en la conjugación inversa (desde las bacterias hacia *E. coli*). Los cálculos para obtener las medias y desviaciones se han hecho utilizando los logaritmos de las frecuencias.

Encontramos que R388 es capaz de conjugar a todas las especies utilizadas aunque con frecuencias de conjugación bastante diferentes. *Pseudomonas putida* es la especie que muestra las mayores tasas de transferencia (como donador y como receptor) mientras que *Acinetobacter* y *Vibrio* son los que muestran peores frecuencias. En ambos se utilizaron tiempos de conjugación de 4h (frente a 1h en el resto) y en el caso de *A. baumannii* apenas fuimos capaces de recuperar transconugantes.

Repetimos los experimentos de conjugación utilizando el mutante por delección de R388 que carece de los genes de la zona de establecimiento desde *kfrA* al *orf14* (*pIC12*). Al probar la capacidad de conjugación de este plásmido entre las cepas de *E. coli* de laboratorio no encontramos diferencias en la frecuencia con respecto a la obtenida para el R388 silvestre por lo que quisimos comprobar si al utilizar como receptores otras bacterias distintas se observaría algún efecto en el comportamiento del plásmido al carecer de todos los genes de esta región. Las conjugaciones se llevaron a cabo siguiendo el mismo procedimiento que en el caso de R388, así como en el procesado de los datos. Los resultados obtenidos en las se encuentran recogidos en la tabla R9 y en la figura R27 aparecen comparadas las frecuencias de R388 y del mutante.

		F. conjugación por donador		F. conjugación por receptor		
Donador	Receptor	(media ± desvest)		(media ± desvest)		N
BW-Nx (pIC12)	E.coli	8,2E-01	5,8E-01	9,0E-01	4,3E-01	9
BW-Nx (pIC12)	S. typhimurium	1,6E-03	9,5E-04	1,2E-03	3,0E-04	9
BW-Nx (pIC12)	K. pneumoniae	7,4E-01	2,8E-01	4,5E-01	1,8E-01	9
BW-Nx (pIC12)	P. putida	3,2E-05	2,1E-06	2,4E-04	1,6E-05	18
BW-Nx (pIC12)	A. baumannii	1,8E-05	2,2E-06	2,5E-05	1,7E-06	18
BW-Nx (pIC12)	V. cholerae	6,8E-04	6,9E-05	2,7E-03	1,6E-04	12
D1210 (pIC12)	A. tumefaciens	1,2E-02	3,7E-04	2,8E-04	3,2E-05	18

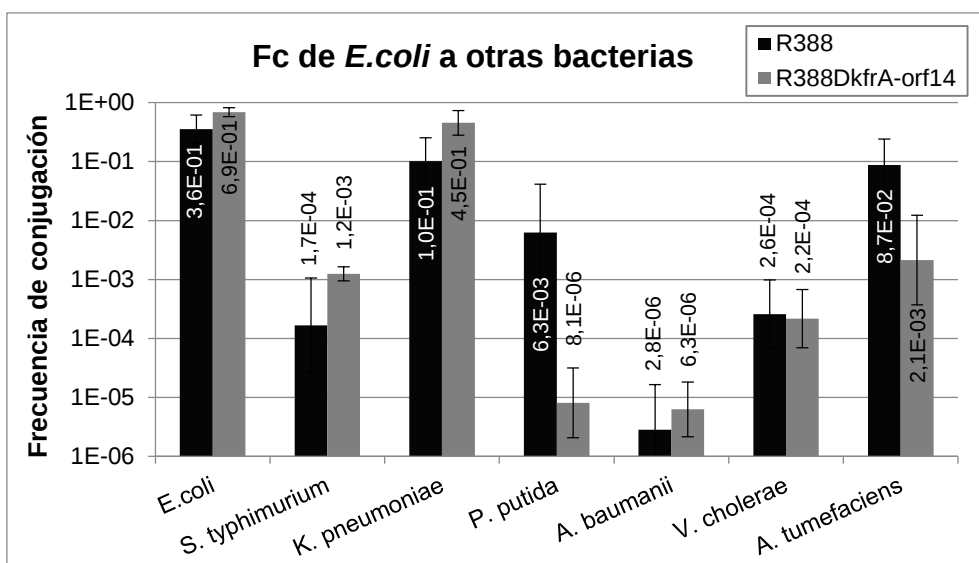


Tabla R9, Figura R27. Frecuencias de conjugación de R388 y pICG12 desde *E. coli* a otras bacterias. En negro se representan las frecuencias de conjugación obtenidas para R388 desde *E. coli* hacia otras bacterias (ver eje) y en gris las obtenidas para el mutante que carece de los genes de la zona de establecimiento (desde *kfrA* a *orf14*, ambos incluidos). Las columnas corresponden a la media de las frecuencias de conjugación obtenidas en los distintos experimentos y las barras de error a la desviación estándar de los datos. Los cálculos para obtener las medias y desviaciones se han hecho utilizando los logaritmos de las frecuencias y calculando después el antilogaritmo de la media.

Los valores obtenidos son similares en todos los casos excepto para *P. putida*, en que la frecuencia de conjugación de R388 es considerablemente mayor que la del mutante sin los genes de la zona de establecimiento. Curiosamente este mutante también mostró un comportamiento diferente al de R388 en los ensayos de estabilidad en *P. putida*.

Se obtuvieron las frecuencias de conjugación de los distintos plásmidos IncW usando como receptores *E. coli*, *V. cholerae* y *P. putida* (en este caso todos menos R7K que por los marcadores de resistencia no pudo ser seleccionado en *Pseudomonas*). Las conjugaciones se llevaron a cabo siguiendo el protocolo recogido en el apartado B4.2 de MM y los cálculos de las frecuencias medias se realizaron utilizando logaritmos. Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en la tabla R10 y representados en la gráfica R28. En las gráficas se ha añadido también el mutante de R388, pIC12 (R388Δ*kfrA-orf14*), que carece de toda la zona de establecimiento.

		F. conjugación por donador		F. conjugación por recipiente		
Donador	Receptor	(media ± desvest)		(media ± desvest)		N
BW-Nx (pSU2007)	BW-Rif	6,2E-01	2,0E-01	5,0E-01	1,8E-01	20
BW-Nx (pSa)	BW-Rif	1,5E-02	1,1E-04	6,3E-03	7,4E-05	15
BW-Nx (R7K)	BW-Rif	2,9E-02	1,1E-02	3,7E-02	9,0E-03	9
BW-Nx (pIE321)	BW-Rif	2,5E-01	4,5E-02	1,6E-01	3,4E-02	9
BW-Nx (pIE522)	BW-Rif	6,1E-05	3,3E-06	5,5E-05	2,9E-06	18
BW-Nx (pIC11)	BW-Rif	8,2E-01	5,8E-01	9,0E-01	4,3E-01	9
BW-Nx (pSU2007)	V. cholerae Rif	9,9E-04	6,8E-05	1,8E-02	3,4E-04	15
BW-Nx (pSa)	V. cholerae Rif	4,3E-04	1,8E-05	6,6E-03	3,0E-04	13
BW-Nx (R7K)	V. cholerae Rif	7,1E-04	3,0E-05	2,3E-03	2,8E-04	13
BW-Nx (pIE321)	V. cholerae Rif	4,1E-04	2,0E-04	3,3E-03	2,5E-04	13
BW-Nx (pIE522)	V. cholerae Rif	9,5E-05	6,2E-06	4,4E-04	3,1E-05	13
BW-Nx (pIC11)	V. cholerae Rif	4,1E-04	2,0E-04	2,7E-03	1,6E-04	12
BW-Nx (pSU2007)	P. putida	4,1E-02	9,6E-04	3,8E-01	1,2E-02	18
BW-Nx (pSa)	P. putida	9,9E-06	3,7E-07	1,0E-04	5,0E-06	9
BW-Nx (R7K)	P. putida	-	-	-	-	-
BW-Nx (pIE321)	P. putida	1,9E+00	8,3E-05	3,5E+00	1,4E-03	9
BW-Nx (pIE522)	P. putida	3,3E-06	6,1E-07	5,3E-05	2,5E-05	9
BW-Nx (pIC11)	P. putida	3,2E-05	2,1E-06	2,4E-04	1,6E-05	18

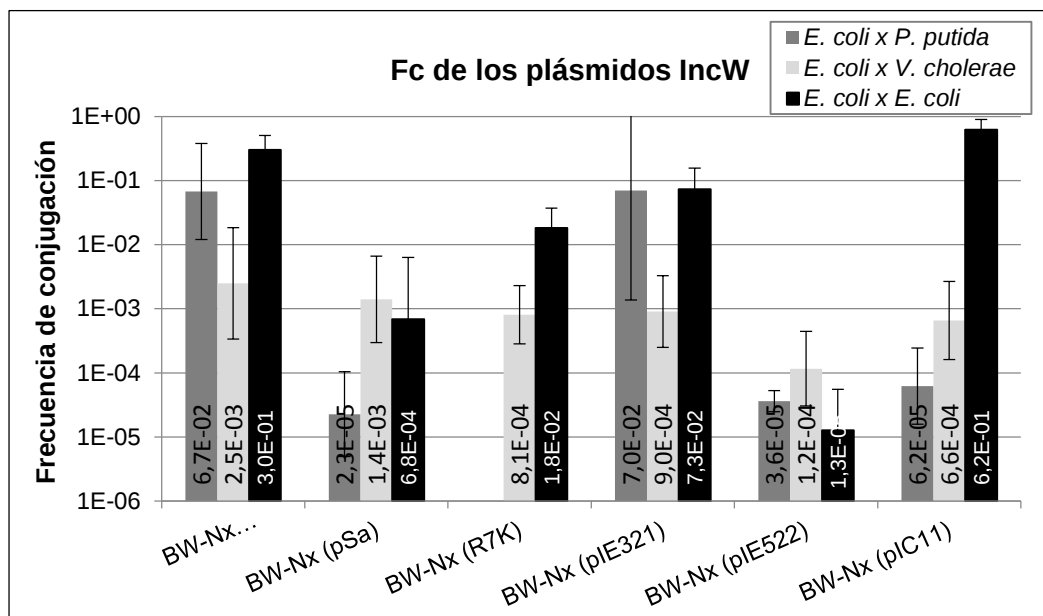


Tabla R10, Figura R28. Frecuencias de conjugación de los plásmidos IncW a *P. putida*, *E. coli* y *V. cholerae*. En negro se representan las frecuencias de conjugación a *E. coli*; en gris claro las frecuencias conjugando a *V. cholerae*; en gris las frecuencias a *P. putida*. Las columnas corresponden a la media de las frecuencias de conjugación obtenidas en los distintos experimentos y las barras de error a la desviación estandar de

los datos. Los cálculos para obtener las medias y desviaciones se han hecho utilizando los logaritmos de las frecuencias y calculando después el antilogaritmo de la media.

Como se ve en la figura, todos los plásmidos se comportan de manera muy similar en las conjugaciones a *V. cholerae*, con frecuencias de alrededor de 10^{-4} en 4h de conjugación. Sin embargo en los otros hospedadores (*E. coli* y *P. putida*) observamos diferencias en el funcionamiento de los distintos IncW. pIE321 muestra un comportamiento bastante similar a R388 en todos los hospedadores ensayados, mientras que pSa y pIE522 muestran frecuencias de conjugación considerablemente más bajas.

Los resultados globales de esta sección indican que, pese a su alto nivel de identidad genética, los plásmidos del grupo IncW muestran diferencias fenotípicas en las funciones de replicación, estabilidad y conjugación.

3. SISTEMATIZACIÓN DE LA MEDIDA DE LA CONJUGACIÓN

3.1. Puesta a punto de un ensayo de conjugación en el citómetro

Además de caracterizar la red de regulación y la diversidad fenotípica de los plásmidos IncW, un objetivo paralelo de esta tesis fue la sistematización de un ensayo de conjugación. El protocolo standard de conjugación requiere situar la mezcla de células donadoras y células receptoras sobre filtros de conjugación colocados en placas de agar, que son incubadas a la temperatura adecuada durante un tiempo determinado. Para *Escherichia coli* y los plásmidos IncW, la temperatura es de 37 °C y el tiempo es de 1 hora. Una vez incubada la mezcla, se realizan diluciones seriadas de la misma y se plaquea en medio selectivo para donadores, receptores y transconjugantes. Tras el plaqueo, se deja a las células desarrollar colonias mediante incubación o/n, se cuentan las colonias y se calcula la proporción de transconjugantes frente a los donadores o receptores.

Este método es el mismo que el utilizado hace 20 años, es un medio válido pero tedioso, lo que dificulta la realización de experimentos con muchas muestras o la obtención de datos estadísticamente robustos. Por otra parte, la conjugación es un proceso que transcurre de manera geométrica (los transconjugantes actúan como donadores), por lo que las medidas de conjugación están sometidas a una alta variabilidad. Por estas razones, decidimos poner a punto un ensayo sistemático que no requiriese del plaqueo para medir las frecuencias conjugativas, para lo que elegimos la citometría de flujo.

Como se describe en Maksimow *et al.* (Maksimow, *et al.*, 2002) la expresión de GFP y RFP puede ser detectada simultáneamente en bacterias individuales, mediante el uso de un citómetro de flujo convencional. Por ello, decidimos tratar de monitorizar la transferencia de un plásmido usando la proteína fluorescente GFPmut2 y tres proteínas fluorescentes rojas diferentes: DsRed2, mCherry y mKate2.

Diseñamos un sistema basado en *E.coli* en el que un plásmido que contiene la región *oriT* de R388 es movilizado por un derivado de R388 no trasmisible, desde una célula donadora a una receptora. Decidimos utilizar un sistema en el que el plásmido completo no es capaz de transferirse entre los receptores para intentar que fuera lo más simple posible de analizar. De esta manera, se evita que pueda haber conjugación desde los transconjugantes recién formados, que podrían conjugarse a una velocidad

diferente (probablemente mayor) a la de los donadores primarios (Jacob & Wollman, 1956).

Así, utilizamos como donadores células BW-Rif^R que contienen el derivado no movilizable de R388 pAP711ΔoriT::Tet; (Demarre, *et al.*, 2005) y, como elemento transmisible el clon pGP12 (pUA66::PstbA). pAP711ΔoriT es una construcción que carece de *oriT* funcional pero contiene el sistema conjugativo completo de R388, por lo que es capaz de movilizar construcciones que contienen la región *oriT* de R388. El plásmido pGP12 contiene el *oriT* del plásmido R388 clonado delante del gen reportero *gfpmut2* orientado de tal manera que la expresión de GFP es controlada por el promotor del operón *stbABC* que, como se ha visto antes, está reprimido en presencia de la proteína de StbA de R388.

De esta manera, R388ΔoriT es capaz de movilizar el plásmido pGP12 pero él mismo no se transfiere a los receptores. Además en los donadores, en presencia de la red de regulación de R388, la transcripción a partir del promotor **PstbA** de pGP12 está reprimida al estar presente StbA. Una vez que pGP12 es transferido a los receptores StbA ya no está presente en la célula por lo que el promotor se encuentra desreprimido dando lugar a la expresión y acumulación de GFPmut2 en los transconjugantes.

Las células receptoras utilizadas son BW-Nx^R que contienen un plásmido que codifica para una proteína fluorescente roja, cuya expresión es controlada por **P_{lac}**. Se probaron tres construcciones similares pAC1, pAC2 y pAC4, cada uno de ellos codificando una proteína roja distinta (tabla MM4), obteniéndose en los tres casos resultados similares (datos no mostrados). La expresión de fluorescencia roja se utilizó como marcador de células receptoras manteniéndose de forma permanente la expresión desde **P_{lac}** mediante la adición de 0,5 mM IPTG al medio de cultivo. Aunque el pico máximo de excitación para estas proteínas difiere bastante de la longitud máxima de emisión del láser (488 nm), comprobamos que son suficientemente excitadas dando resultados reproducibles mediante la detección en los canales FL2 para DsRed2 o en FL3 para mCherry y mKate2.

De esta manera se estableció un sistema en el que identificar fácilmente las tres poblaciones presentes en la conjugación en el citómetro, mediante un gráfico que enfrente los canales de fluorescencia verde y roja. Las células receptoras pueden ser identificadas en él como eventos RFP⁺, los transconjugantes mostrarán un fenotipo GFP⁺RFP⁺ mientras que los donadores se recogen como células dobles negativas (figura R29).

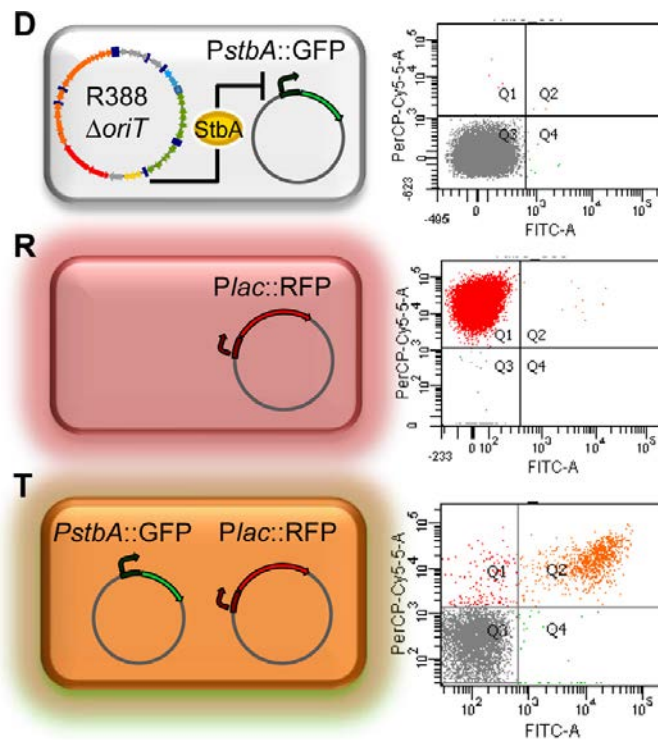


Figura R29. Esquema del diseño experimental para la medida de la conjugación en el citómetro de flujo.

En la figura se muestran esquemáticamente los distintos componentes del ensayo de conjugación por citometría. Representados en gris, los donadores contienen el plásmido pAP711 Δ oriT::Tet (que codifica para todos los genes de R388 pero carece de *oriT*) junto con el pAR12 (*PstbA-gfpmut2*) y se recogen como eventos Q3 en el citómetro (dobles negativos); los receptores, representados en rojo, contienen pAC1,2 o 4 (*Plac-rfp*) y se detectan como eventos Q1 (RFP+GFP-); por último los transconjugantes, representados en naranja, contendrán el plásmido pAC1,2 o 4 (*Plac-rfp*) junto con pAR12 (*PstbA-gfpmut2*) por lo que se detectan como eventos Q2 (dobles positivos RFP+GFP+).

Para realizar los experimentos, las conjugaciones se llevaron a cabo en medio sólido utilizando placas de 24 pocillos, en las que la mezcla de conjugación se extiende directamente en la superficie de 1 ml de agar depositado en un pocillo, tal y como se describe en el apartado B4.1 de materiales y métodos.

Para analizar las cinéticas de transferencia de *oriT*_R388, se midió la conjugación simultáneamente por citometría y por el método tradicional de plaqueo en medio selectivo, de forma que pudiésemos verificar los resultados obtenidos en la citometría con el protocolo estándar de medida de la conjugación.

Se preparó una mezcla de conjugación 1:1 (D/R) y se extendió en pocillos individuales de una placa de 24 pocillos que se incubaron a 37 °C (ver materiales y métodos). A distintos tiempos se fueron resuspendiendo las mezclas de conjugación en

LB y una muestra se fijó con PFA 4% para el análisis por citometría y otra se plaqueó en placas con los antibióticos de selección para donadores, receptores y transconjugantes.

En las medidas de citometría de flujo, se seleccionó la población bacteriana por tamaño y complejidad, denominándola P1. Se recogieron 20.000 eventos en P1 que se analizaron en gráficos FL1-GFP vs. FL2-RFP (o FL3) donde se establecen las distintas poblaciones: las células donadoras se identificaron como eventos no fluorescentes; los receptores son células RFP⁺GFP⁻ y son detectadas en Q1 (eventos RFP⁺GFP⁻); los transconjugantes son dobles positivos RFP⁺GFP⁺ que son detectados en Q2 (eventos RFP⁺ GFP⁺). En la figura R30 se muestra una serie temporal de medidas en el citómetro.

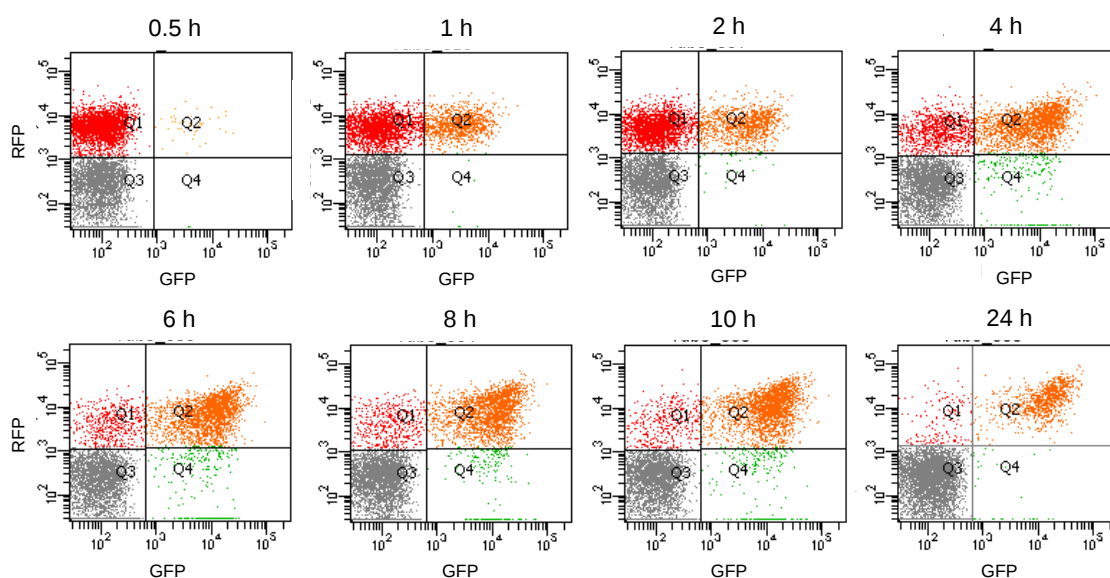


Figura R30. Serie temporal de un experimento de conjugación medido mediante citometría de flujo.

En la figura se muestran los gráficos FL1 (GFP) vs. FL3 (RFP) obtenidos a diferentes tiempos de conjugación con los cuadrantes delimitando las distintas poblaciones. La población Q1 corresponde a los eventos RFP⁺GFP⁻ que serían los receptores; Q3 serían los dobles negativos donde se recogerían los donadores; Q2 sería la población de dobles positivos correspondiente a los transconjugantes. Como se puede observar, la población Q2 (transconjugantes) aumenta con el tiempo de conjugación, mientras que simultáneamente la población Q1 (receptores) va disminuyendo.

Para verificar la validez los resultados obtenidos en los experimentos de citometría de flujo, las mismas muestras de conjugación fueron analizadas por plaqueo en medio selectivo. Mediante citometría de flujo calculamos la frecuencia de conjugación por receptor como $T/(T+R)$, que se corresponde con el cociente $Q2/(Q1+Q2)$. En los

experimentos de plaqueo obtenemos la proporción $T/(T+R)$ al dividir el número de colonias con fenotipo $(NxApKm)^R$ entre las colonias obtenidas con fenotipo $(NxAp)^R$

En la figura R31 se muestran las frecuencias de conjugación por célula receptora obtenidas por ambos métodos para los distintos tiempos de conjugación. Como se puede observar en el gráfico las frecuencias obtenidas por citometría de flujo se corresponden perfectamente con las obtenidas por el método tradicional de plaqueo. Además, las barras de error obtenidas en los datos de los experimentos de citometría son consistentemente menores que la obtenidas en los ensayos de plaqueo, lo que podría ser de esperar dado que los ensayos de citometría se analizan muestras con muchas más células (20.000) que en los de plaqueo (unos cientos).

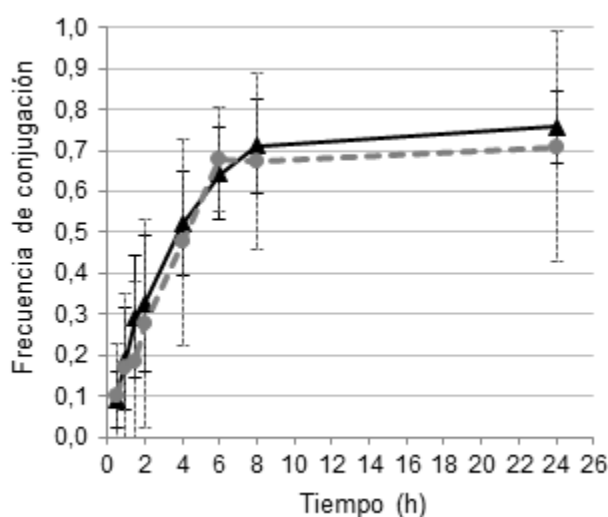


Figura R31. Comparación de las frecuencias de conjugación obtenidas por citometría y por plaqueo.

La curva gris (círculos) se corresponde a los datos obtenidos por plaqueo mientras que la negra (triángulos) corresponde a las frecuencias calculadas por citometría.

Las frecuencias de conjugación están calculadas como número de transconjugantes por receptor y cada punto corresponde a la media de al menos 9 experimentos independientes; las barras de error muestran la desviación estándar de los datos.

Basándonos en los resultados obtenidos, concluimos que las medidas de citometría son comparables a las obtenidas por el método tradicional de plaqueo en medio selectivo, presentando menor variabilidad.

También quisimos comprobar si la fijación con PFA4% puede tener algún efecto sobre los resultados obtenidos en el análisis por citometría respecto al uso de muestras frescas sin fijar. Para ello, obtuvimos las frecuencias de conjugación en el citómetro a distintos tiempos de conjugación de las mismas muestras frescas y fijadas con PFA 4%. La figura R32 confirma que la fijación de las células con PFA4% y conservación a 4 °C antes de la citometría no tiene efectos medibles en el ensayo. Dada la similitud de los resultados cuando se miden células frescas o fijadas, el uso de la fijación permite simplificar el ensayo, al poder conservar las muestras y procesarlas todas juntas en el citómetro.

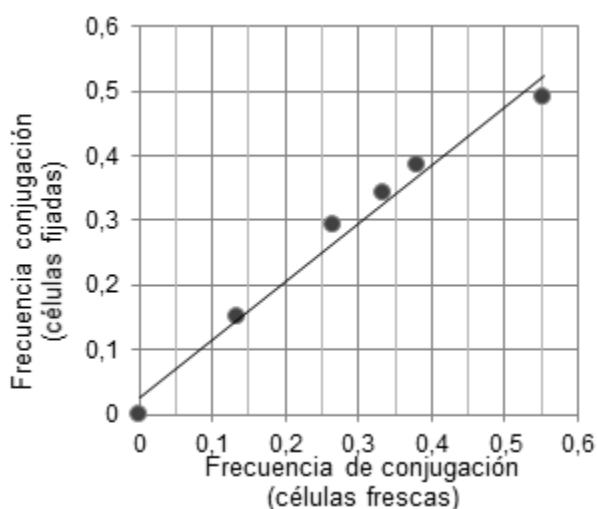


Figura R32. Efecto de la fijación de las muestras en los ensayos de citometría de flujo.

Comparación de las frecuencias de conjugación obtenidas por citometría de flujo para la misma muestra de células medidas directamente o tras la fijación con 4% PFA y mantenimiento a 4 °C durante 24h. Las muestras se tomaron a 0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 y 4,0 h de conjugación. Cada punto corresponde a la media de 4 experimentos individuales.

3.2. Estimación de la cinética de conjugación del *oriT* de R388

Para comprobar la capacidad de nuestro método experimental, decidimos utilizarlo para estimar la cinética de movilización de un plásmido que portaba el origen de transferencia (*oriT*) de R388. De acuerdo al ensayo teórico publicado por Zhong et al. (Zhong, et al., 2012), la tasa de movilización debería ser un parámetro robusto, resistente a los cambios en las condiciones experimentales iniciales, de la proporción D/R y, hasta cierto punto, del tiempo. Para comprobar estos postulados, obtuvimos la cinética de movilización del *oriT* de R388.

Para ello se prepararon distintas mezclas de conjugación, variando la proporción de donadores y receptores. Se utilizaron cantidades del 2,5%, 5%, 10% o 50% de donadores, pero manteniendo constante la concentración total de células. Las mezclas conjugativas se dispusieron en placas de 24 pocillos a 37 °C, según el protocolo B4.1 (materiales y métodos). Se obtuvieron muestras a distintos tiempos (0,5h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h y 24h) resuspendiendo los pocillos correspondientes y fijando las células con 4% PFA. Las células fijadas se almacenaron a una temperatura de 4 °C hasta que se analizaron por citometría de flujo, según se describe en el apartado 2.1.

El resultado del experimento aparece recogido en la figura R33 que muestra las frecuencias de conjugación por receptor ($T/(R+T)$) obtenidas a cada tiempo para cada mezcla de conjugación.

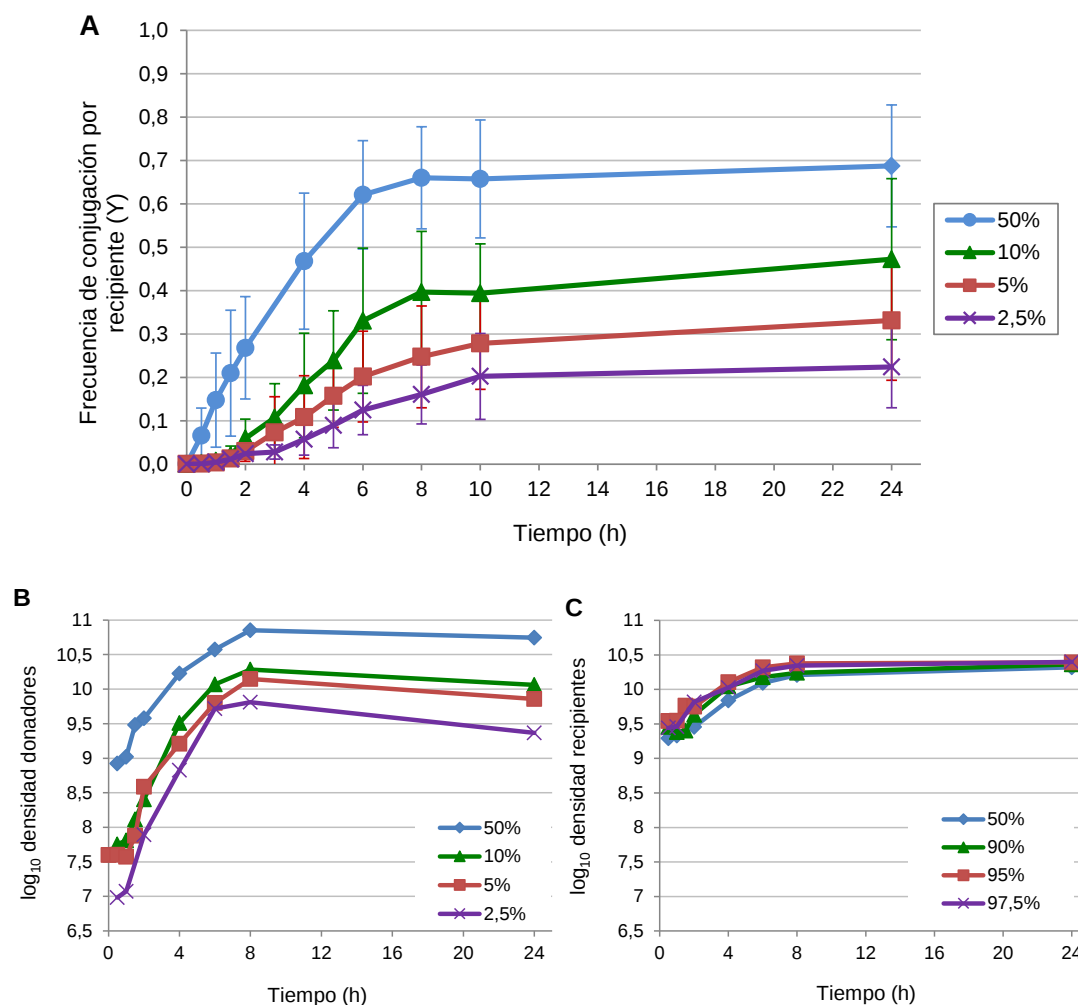


Figura R33. Determinación de las frecuencias de conjugación a distintos tiempos y diferentes ratios D/R.

Cada color representa una mezcla de conjugación distinta con diferente proporción D/R (ver leyenda). **(A)** Serie temporal de frecuencia de conjugación por receptor ($Y = T/(R + T)$) obtenida para las diferentes mezclas de conjugación mediante citometría de flujo. Las muestras se tomaron tras 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 y 24 h de conjugación. **(B)(C)** Crecimiento de los donadores y receptores, respectivamente, en la superficie del agar durante el experimento de conjugación estimados por plaque en medio selectivo.

Como se observa en la figura, la aparición de transconjugantes aumenta con el tiempo de conjugación hasta las 6-8h de conjugación, en que prácticamente se detiene. Como reflejan las gráficas (B) y (C) el momento en el que la frecuencia deja de aumentar coincide con la ausencia de crecimiento en las poblaciones de donadores y receptores (alrededor de las 8h), por lo que la conjugación en medio sólido parece progresar hasta que se detiene la multiplicación celular.

Con los datos obtenidos calculamos los valores de tasa de conjugación (γ) mediante el método “End point” descrito por Simonsen (Simonsen, *et al.*, 1990),

modificado como se describe en el apartado B7 de materiales y métodos para poder aplicarlo a conjugaciones llevadas a cabo en una superficie sólida. Al representar los valores γ en vez de las frecuencias de conjugación, obtenemos el gráfico representado en la figura R34 (A). En los cuatro ratios D/R ensayados la tasa de conjugación (γ) disminuye ligeramente con el tiempo. Este descenso se muestra más claramente en la figura R34 (B) en la que se ha representado una sola curva con la media de los valores de los distintos ratios D/R.

Sin embargo, si promediamos γ en los distintos tiempos para cada concentración de donadores (figura R34C), podemos ver que el valor medio para la tasa de conjugación se mantiene para los distintos ratios D/R ensayados.

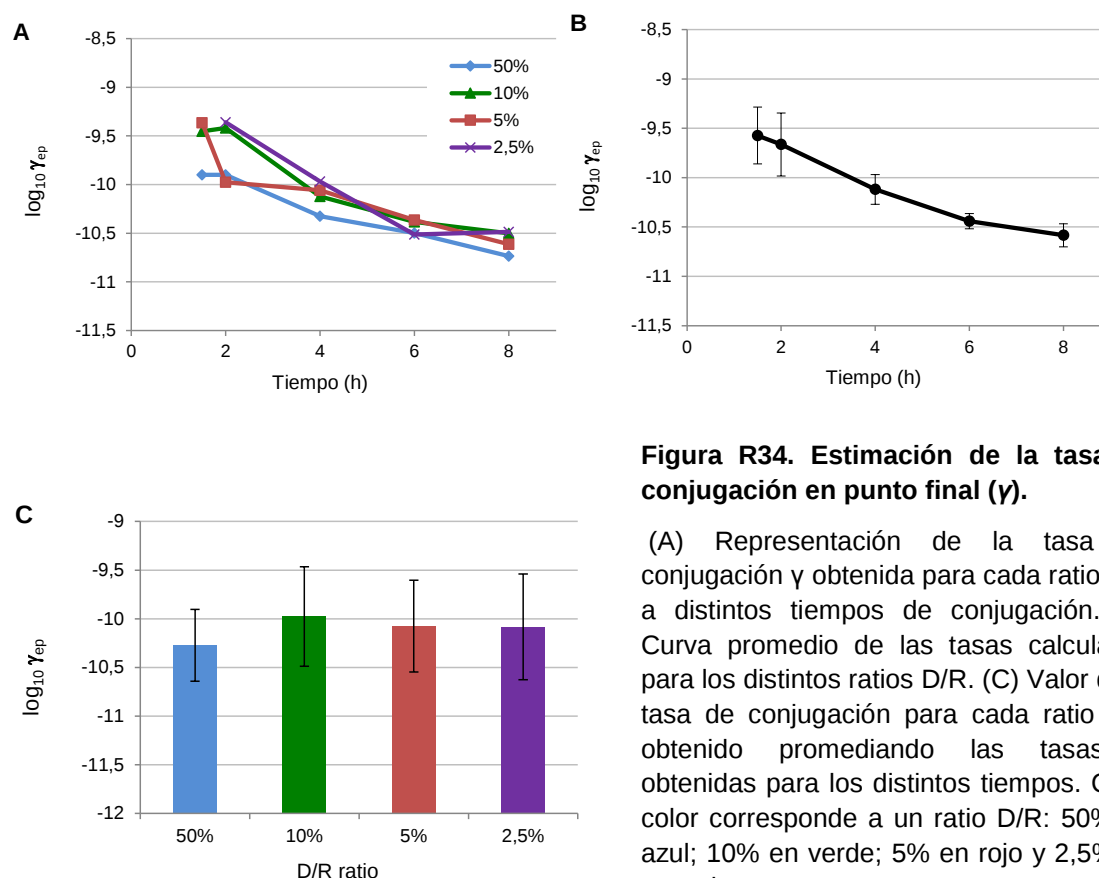


Figura R34. Estimación de la tasa de conjugación en punto final (γ).

(A) Representación de la tasa de conjugación γ obtenida para cada ratio D/R a distintos tiempos de conjugación. (B) Curva promedio de las tasas calculadas para los distintos ratios D/R. (C) Valor de la tasa de conjugación para cada ratio D/R obtenido promediando las tasas a obtenidas para los distintos tiempos. Cada color corresponde a un ratio D/R: 50% en azul; 10% en verde; 5% en rojo y 2,5% en morado.

En la tabla R11 se encuentran recogidos los datos representados en las figuras. Con ellos, obtenemos un valor medio de γ para *oriT_R388* de $8 \cdot 10^{-11}$ ($-10,10 \pm 0,45$ (tabla)) que no cambia prácticamente con el ratio D/R y que presenta poca variación con el tiempo de conjugación. La media varía en una desviación standard según el punto temporal en el que se tomen los datos. Este indicador es claramente más robusto que

las proporciones de la frecuencia de conjugación que se ven muy influenciadas por las condiciones experimentales.

Tabla R11. Valores de tasa de conjugación en punto final (γ) obtenidos para las distintas proporciones de donadores (izquierda) y para los distintos tiempos (derecha).

% D	$\log_{10}\gamma$	
	Media	SD
2,5%	-10,08	0,54
5%	-10,08	0,47
10%	-9,98	0,51
50%	-10,27	0,37
$\log_{10}\gamma$	-10,10	0,45
γ	7,91E-11	

Tiempo	$\log_{10}\gamma$	
	Media	SD
1,5	-9,57	0,29
2	-9,66	0,32
4	-10,12	0,15
6	-10,44	0,08
8	-10,58	0,12
$\log_{10}\gamma$	-10,08	0,67
γ	8,39E-11	

Para tratar de determinar si la disminución de la conjugación (Y , γ) observada en las muestras tomadas en tiempos largos de conjugación (más de 6h) puede ser debida a un efecto derivado de la estructuración de la población, llevamos a cabo experimentos resuspendiendo las mezclas de conjugación a las 6h en LB fresco y volviendo a poner a conjuguar la misma cantidad de células en una nueva superficie de agar hasta las 24h desde el inicio del experimento. Los resultados obtenidos se muestran en la figura R35 que muestra las frecuencias de conjugación por receptor (Y) para las distintas mezclas de conjugación a las 24h del comienzo del experimento, comparando los resultados obtenidos para la mezcla inicial frente a los obtenidos para la resuspendida y remezclada a las 6h.

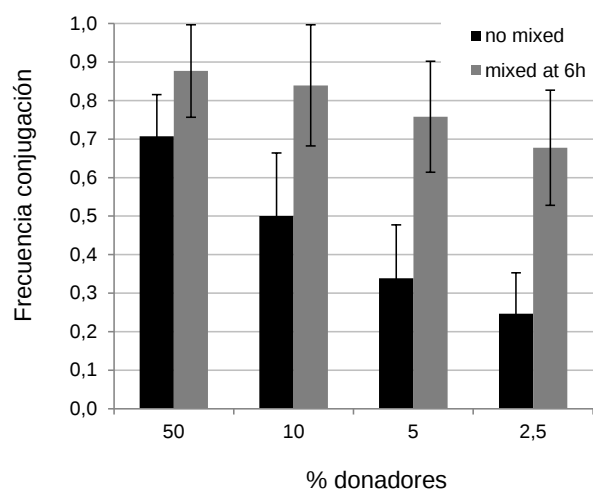


Figura R35. Efecto de la mezcla en la conjugación.

Se representan las frecuencias de conjugación ($Y = T/(R + T)$) a las 24h, de experimentos con diferentes ratios D/R. En negro se representan las frecuencias obtenidas a las 24h (no mezcladas) y en gris se representa Y medido a las 24h pero tras un paso intermedio de resuspensión y mezcla en LB fresco a las 6h de conjugación (mezcladas a las 6h).

Como se puede ver, las frecuencias de conjugación aumentan sustancialmente tras este proceso de refresco, alcanzándose en todos los casos valores máximos de Y , sin que se observen diferencias entre las distintas proporciones iniciales de donadores.

3.3. Medida de la conjugación de plásmidos modelo por citometría

Una vez puesto a punto el sistema de medida de la conjugación en el citómetro decidimos analizar un grupo de plásmidos conjugativos marcados con fluorescencia proporcionados por el laboratorio de Ellen Zechner (Reisner, 2002). Estos plásmidos están marcados con una proteína fluorescente amarilla (*yfp*), clonada bajo un promotor *P_{lac}*. Para poder determinar su frecuencia de conjugación utilizando el citómetro de flujo, adaptamos el protocolo anterior para poder aplicarlo a células que expresaran la proteína YFP.

Como donadores se utilizaron células BW-Rif^R que contienen el correspondiente plásmido conjugativo marcado con *yfp* (Reisner, 2002), cuya fluorescencia nos permite detectarlos en el canal FL1 del citómetro. Dado que este fluoróforo tiene un espectro de emisión muy amplio que interfiere con el de las proteínas fluorescentes rojas, decidimos marcar las células receptoras con un plásmido que expresase la proteína fluorescente CFP cuyo uso es habitual en combinación con YFP. Por tanto, en este caso como receptores se utilizaron células BW-Nx^R transformadas con el plásmido pAC5 que codifica para la proteína fluorescente cian, cuya expresión es controlada por un *P_{lac}*. La expresión de fluorescencia cian se utilizó como marcador de la población de receptores manteniéndose inducida permanentemente la expresión mediante la adición al medio de cultivo de 0,5 μ M IPTG. En este caso, las células transconjugantes se identifican en el citómetro como una población de células dobles positivas YFP⁺CFP⁺ (figura R36).

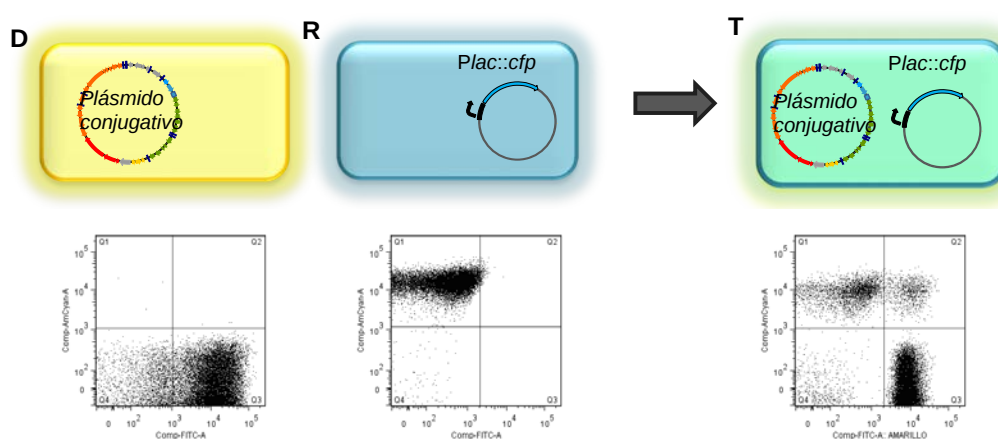


Figura R36. Esquema del diseño experimental para la medida de la conjugación en el citómetro de flujo.

En la figura se muestran esquemáticamente los distintos componentes del ensayo de conjugación por citometría. Los donadores, representados en amarillo, contienen el plásmido conjugativo marcado con *yfp* y se recogen como eventos Q4 en el citómetro

(CFP-YFP+); los receptores, representados en azul, contienen pAC5 (**P***lac-cfp*) y se detectan como eventos Q1 (CFP+YFP-); por último los transconjugantes, representados en verde, contendrán el plásmido pAC5 (**P***lac-cfp*) junto con el plásmido conjugativo marcado con *yfp* por lo que se detectan como eventos Q2 (dobles positivos CFP+YFP+).

Para realizar los experimentos, llevamos a cabo las conjugaciones en sólido utilizando placas microtiter de 24 pocillos, tal y como se describe en materiales y métodos B4.1. Se prepararon dos mezclas de conjugación con diferente proporción D:R, una con ratio 1:20 y otra 1:1, manteniendo en ambos casos la misma concentración inicial de células. Cada mezcla se repartió en pocillos individuales de una placa de 24 pocillos que se incubaron a 37 °C (ver materiales y métodos). A distintos tiempos las conjugaciones se resuspendieron en PBS, se fijaron y se almacenaron a 4 °C para el análisis posterior por citometría, midiéndose la proporción de células D, R y T a cada tiempo.

En todos los casos se analizaron 20.000 eventos en P1 mediante gráficos YFP vs. CFP donde establecemos las distintas poblaciones: las células donadoras se identificaron como eventos YFP+CFP- (Q3); las receptoras son células YFP-CFP+ y son detectadas en Q1; los transconjugantes son dobles positivos YFP+CFP+ que son detectados en Q2. En la figura R37 se muestra un ejemplo de un experimento con varios tiempos en el que se puede ver cómo a medida que aumenta el tiempo de conjugación la población de dobles positivos (P3), correspondiente a los transconjugantes, va aumentando al mismo tiempo que disminuye la población de receptores (P2).

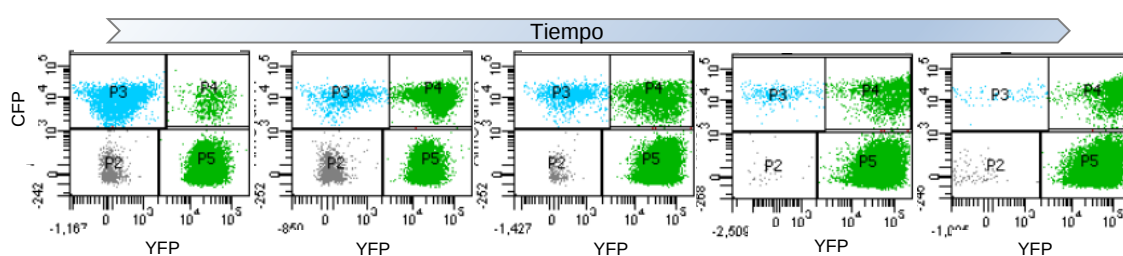


Figura R37. Serie temporal de un experimento de conjugación medido mediante citometría de flujo.

En la figura se muestran los gráficos YFP vs.CFP obtenidos a diferentes tiempos de conjugación con los cuadrantes delimitando las distintas poblaciones. La población P3 corresponde a los eventos CFP+YFP- que serían los receptores; P5 serían los CFP-YFP+ donde se recogerían los donadores; P4 sería la población de dobles positivos correspondiente a los transconjugantes.

En la figura R38 se representan las frecuencias de conjugación calculadas a partir de los datos de citometría para el plásmido R388 (pSU2007-*yfp*). Junto a la gráfica

correspondiente a R388 se ha colocado la obtenida en el apartado 2.1 para *oriT_R388* (derecha).

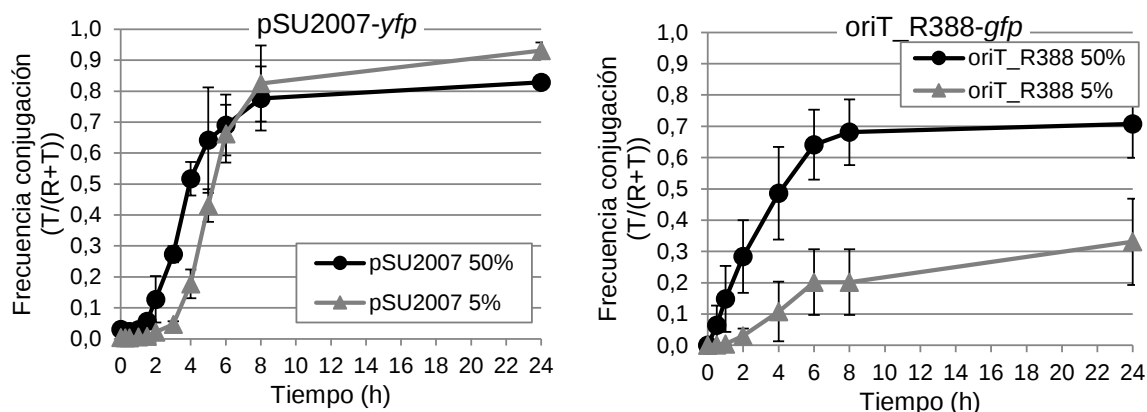


Figura R38. Determinación de las frecuencias de conjugación a distintos tiempos para pSU2007-yfp.

Serie temporal de frecuencia de conjugación por receptor ($Y = T/(R + T)$) obtenida para una mezcla de conjugación D/R 1:1 (en negro) y 1:20 (en gris) mediante citometría de flujo, para el plásmido R388 completo (gráfico de la izquierda) y para *oriT_R388* del apartado 2.2 (gráfico de la derecha). Las muestras se tomaron tras 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0 y 24 h de conjugación.

Como se puede observar las cinéticas de las curvas son ligeramente diferentes. El plásmido conjugativo (panel izquierdo) conjuga hasta frecuencias un poco más altas (0.8 frente a 0.7 $T/(R+T)$) y de forma más rápida: su cinética es de tipo sigmoideo, mientras que el plásmido movilizable muestra una cinética de tipo parabólico. Esta diferencia se aprecia de manera mucho más clara cuando reducimos la concentración inicial de donadores del 50% al 5%. En este caso, las frecuencias alcanzadas con el plásmido conjugativo son de 0,8-0,9 ($T/(R+T)$) frente a 0,3 ($T/(R+T)$) en el movilizable.

Usando la misma estrategia descrita para R388, aplicamos citometría de flujo para monitorizar la cinética de conjugación de representantes de los principales grupos de incompatibilidad, que incluían los plásmidos RP4 (IncP), pOX38 (IncFI), R1 (IncFI) y Collbp-9 (IncI). Además, para estos dos últimos plásmidos contábamos con dos mutantes des-reprimidos para la expresión de las funciones de transferencia: *R1drd19* (IncFII) y *Collbp-9dr* (IncI). Los distintos grupos de incompatibilidad plásmidicos muestran diferentes estructuras genómicas, preferencias de hospedador y prevalencia en poblaciones naturales, lo que plantea la pregunta de si su potencial conjugativo también será también diferente.

Las frecuencias de conjugación por receptor calculadas por citometría de flujo para estos plásmidos están representadas en la figura R39.

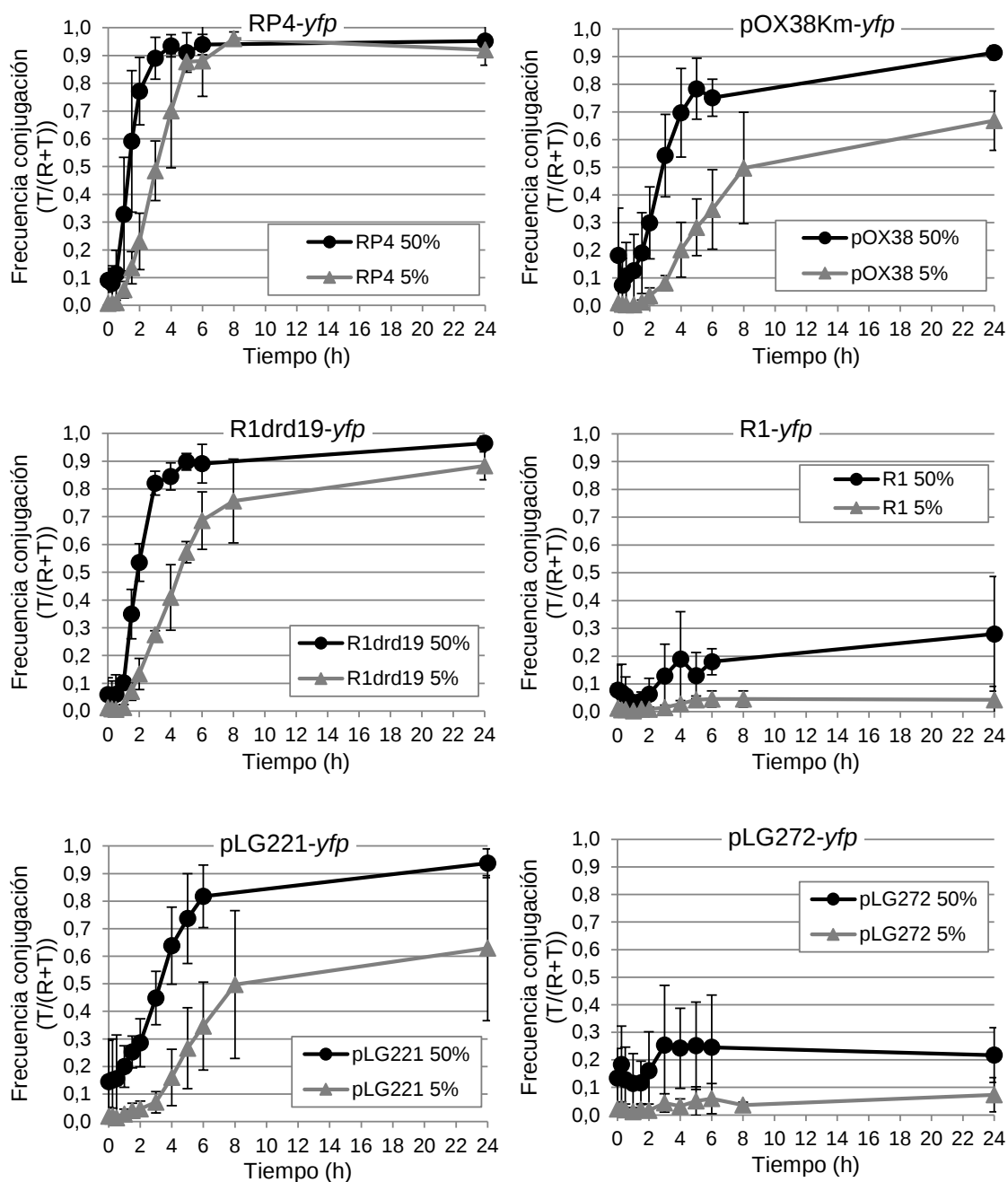


Figura R39. Frecuencias de conjugación de distintos plásmidos modelo a distintos tiempos y diferentes ratios D/R.

Serie temporal de frecuencia de conjugación por receptor ($Y = T/(R + T)$) obtenida para una mezcla de conjugación D/R 1:1 (en negro) y 1:20 (en gris) mediante citometría de flujo, para varios plásmidos modelo marcados con fluorescencia: RP4-yfp, pOX38-yfp, R1drd19-yfp, R1-yfp, Collbp9dr-yfp y Collbp-yfp. Las muestras se tomaron tras 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0 y 24 h de conjugación.

3.4. Comparación de la capacidad de propagación de los plásmidos modelo

La conjugación permite a los plásmidos invadir nuevos receptores, por lo que resulta un mecanismo fundamental en la propagación de estos elementos genéticos. Al objeto de comparar la capacidad de propagación de los distintos plásmidos modelo analizados, comparamos su cinética prestando atención a dos variables importantes: la proporción de células que llevaban el plásmido ($P^+ = (T + D) / (D+T+R)$) y la proporción de células donadoras ($D/(D+T+R)$). Con los datos obtenidos en el apartado anterior, representamos la cinética de estas variables para cada uno de los plásmidos analizados.

Comenzamos por las conjugaciones en las que la tasa inicial de donadores y receptores fue del 50%. Estos resultados se muestran en la figura R40.

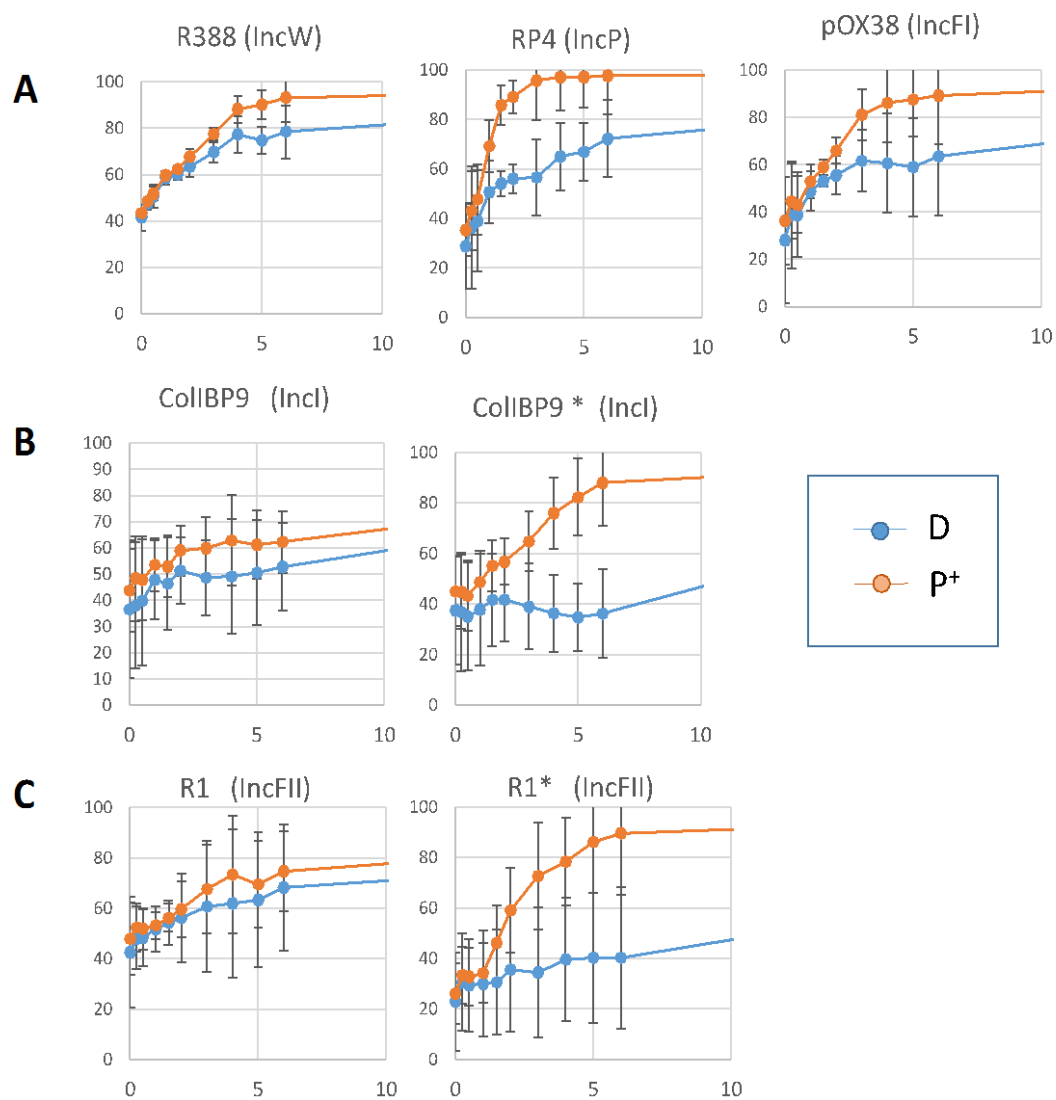


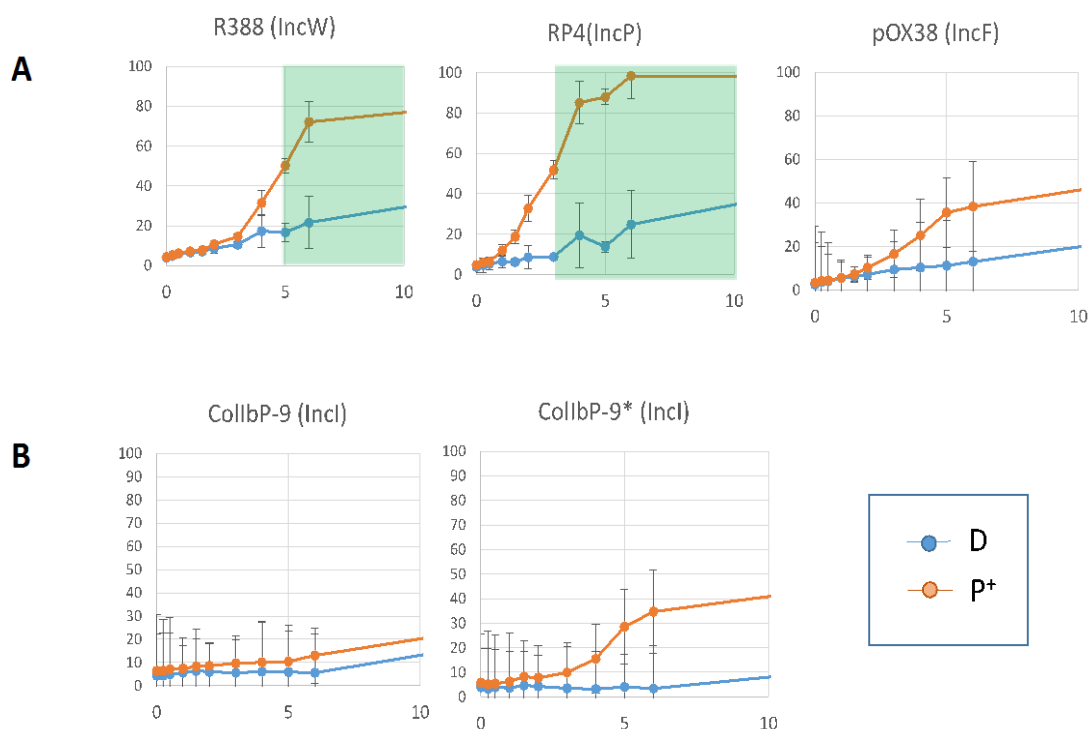
Figura R40. Proporción de células P+ y D en los ensayos de conjugación (1:1) para los distintos plásmidos conjugativos.

Utilizando los datos obtenidos en las cinéticas de conjugación analizadas por citometría de flujo, calculamos para cada instante de tiempo (t), la proporción de células que contenían el plásmido (en naranja) y la proporción de donadoras (en azul). Los valores de ambas proporciones, así como sus desviaciones estándar se muestran en la figura para

cada muestreo temporal. Cada gráfico representa los resultados obtenidos para uno de los plásmidos (RP4, R388, F, etc.) en conjugaciones en las que se utilizó un 50% de donadores (D) iniciales.

Los resultados obtenidos para los plásmidos R388 (IncW), RP4 (IncP) y F (IncFI) (figura R40, paneles A) indican que estos plásmidos lograron ocupaciones de la población bacteriana cercanas al 100%. Sin embargo, los plásmidos Collbp-9 y R1, representantes respectivamente de los grupos de incompatibilidad IncI e IncFII, incrementaron su prevalencia de manera más discreta (Figura R40, B y C, paneles izquierdos). La comparación entre P+ y D nos permite, además, cuantificar el efecto que el crecimiento de los donadores tiene sobre la prevalencia del plásmido en la población. Como se aprecia en la figura, en los casos de Collbp-9*dr* y R1 el incremento en la prevalencia se debe, fundamentalmente, al crecimiento de los donadores. En el caso de las variantes des-reprimidas de estos plásmidos (Figura R40 B y C, paneles derechos), la prevalencia del plásmido llegó a niveles cercanos al 100%, siendo la contribución de los donadores proporcionalmente mucho menor.

Para separar el efecto de donadores y transconjugantes en la expansión del plásmido en la población experimental, analizamos del mismo modo que en el caso anterior los resultados de las cinéticas obtenidos para conjugaciones en las que la proporción inicial de donadores se limitó a un 5% del total. Los resultados se muestran en las gráficas de la figura R41.



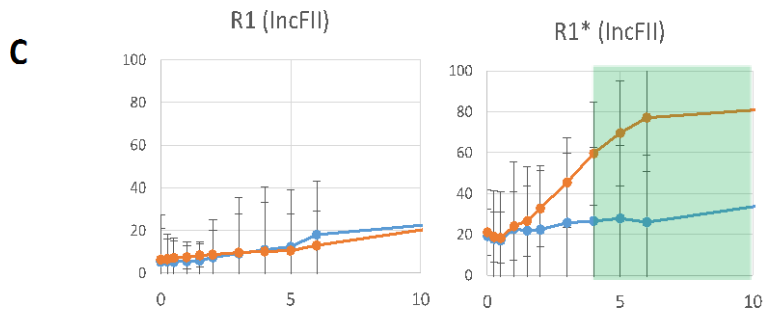


Figura R41. Proporción de células P+ y D en los ensayos de conjugación (1:20) para los distintos plásmidos conjugativos.

Utilizando los datos obtenidos en las cinéticas de conjugación analizadas por citometría de flujo, calculamos para cada instante de tiempo (t), la proporción de células que contenían el plásmido (en naranja) y la proporción de donadoras (en azul). Los valores de ambas proporciones, así como sus desviaciones estándar se muestran en la figura para cada muestreo temporal. Cada panel representa los resultados obtenidos para conjugaciones en las que se utilizó un 5% de D iniciales. Los recuadros verdes indican aquellos valores para los que $P+ > 50\%$.

Los resultados de la figura R41 permiten discriminar mejor la contribución de la conjugación a la propagación de cada uno de los plásmidos modelo estudiados. Así, encontramos que los plásmidos RP4, R388 y R1*drd19* alcanzaron los mayores niveles de prevalencia, con valores superiores al 70% al final de la cinética. Calculando el tiempo requerido por estos plásmidos para alcanzar valores de $P+ > 50\%$ pudimos determinar que RP4 (IncP) alcanzó estos niveles a las 3h desde el inicio de la conjugación, mientras que R1*drd19* y R388 lo hicieron a las 4 y a las 5 h respectivamente.

En conjunto, estos datos nos permitieron establecer que RP4 mostró las mayores tasas de conjugación, seguido de R1*drd19* y R388. Los plásmidos F y Collb-p9 mostraron valores intermedios, mientras que R1 y Collbp-9*dr* incrementaron su prevalencia debido, fundamentalmente al crecimiento de los donadores, sin que la conjugación mostrase contribución aparente alguna.

The background of the slide is a microscopic image showing numerous green, rod-shaped bacteria (likely Bacillus subtilis) scattered across a purple surface. The bacteria are in various orientations, some appearing as single cells and others in small clusters. The purple background has a slightly textured appearance.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. LA RED DE REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE R388

Los plásmidos conjugativos son vehículos esenciales para la transferencia genética horizontal en bacterias. Sin embargo, los plásmidos exceden su papel instrumental para las bacterias ya que ellos mismos son unidades genéticas con genomas estructurados capaces de mostrar una fisiología en sí mismos.

Tal y como habían establecido los experimentos llevados a cabo en nuestro grupo, el plásmido R388 presenta distintas familias de motivos de repetición de secuencia en las zonas intergénicas (Fernandez-Lopez, *et al.*, 2006). Estudios preliminares sugerían estos sitios podrían corresponder a operadores para los distintos reguladores transcripcionales plasmídicos (Fernandez-Lopez, 2007), mostrando que, en cuatro de estas repeticiones era posible asociar un regulador transcripcional dado que:

- Los promotores con repeticiones IT-B eran reprimidos por StbA.
- Los promotores con repeticiones SDR-A eran reprimidos por ArdK.
- Los promotores con repeticiones SDR-B eran reprimidos por KorA.

Nuestros resultados identificaron, además, dos reguladores adicionales que actúan exclusivamente sobre su propio promotor (ResP y KfrA) y confirmaron el papel de TrwA en la regulación de su propia síntesis (Moncalian, *et al.*, 1997). Por otra parte, los resultados con el mutante R388 Δ korB indicaron que KorB parece actuar como un co-represor de los promotores con repeticiones IT-B, si bien requiere la presencia de otro factor plasmídico, posiblemente KorA, para ejercer su acción. No encontramos, sin embargo, ningún regulador específico asociado a las repeticiones SDR-C. Por lo tanto, es posible que estas secuencias correspondan a sitios de unión de algún regulador celular o bien se trate de sitios de unión de proteínas con otro tipo de función.

El estudio del genoma de R388 puso de manifiesto que se encuentra dividido en distintos módulos funcionales basándonos en el papel atribuido a los genes localizados en cada región (Fernandez-Lopez, *et al.*, 2006). Tras el estudio de la red de regulación del plásmido, encontramos que la mayoría de los circuitos de regulación identificados en la red involucran reguladores y promotores pertenecientes al mismo módulo funcional

(figura D1), con la única excepción de StbA cuyo circuito englobaría genes de los módulos de mantenimiento y transferencia. Esta situación podría hacer pensar que cada módulo funcional constituiría un “bloque de construcción”, tratándose de una unidad funcional, regulatoria y filogenética. Sin embargo, la estructura filogenética del plásmido pone de manifiesto una situación donde reguladores y dianas presentan orígenes filogenéticos completamente distintos (Fernandez-Lopez, *et al.*, 2006). Por tanto, la red de regulación transcripcional del plásmido es capaz de integrar este mosaico genético, dando lugar al establecimiento de módulos funcionales con una regulación coordinada.

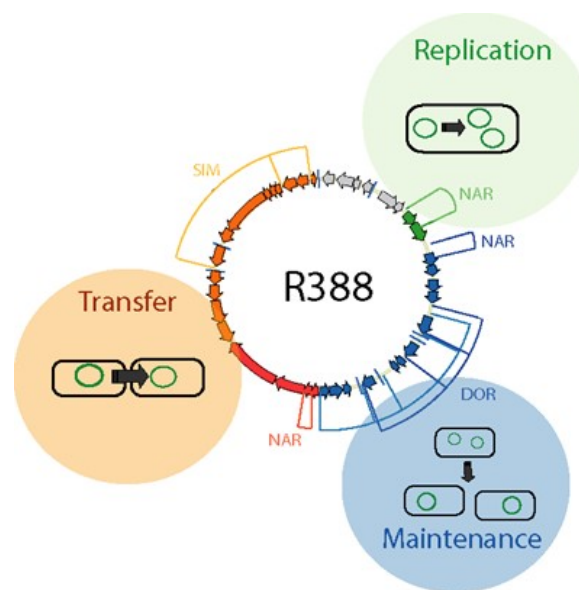


Figura D1. Módulos funcionales del plásmido R388 y su regulación.

La figura esquematiza en distintos colores los distintos módulos funcionales del plásmido, indicando de forma abreviada la regulación de cada módulo. No se muestra la interacción de StbA sobre el módulo de transferencia.

En general, la regulación transcripcional de R388 consiste exclusivamente en represores transcripcionales, está basada en circuitos de autorregulación negativa en los que cada regulador reprime su propia síntesis, y la mayoría de los promotores presentan altos índices de represión tratándose de promotores fuertes que encuentran muy reprimidos en presencia de R388. Esto contrasta con lo descrito en las redes de los cromosomas bacterianos como, por ejemplo, en la red de regulación de *E. coli* donde el número de activadores transcripcionales es aproximadamente igual al de los represores (Shen-Orr, *et al.*, 2002). Sin embargo esta tendencia a la regulación negativa aparece también en otros plásmidos BHR estudiados, como pKM101 (Paterson, *et al.*, 1999) o RP4 (Kostelidou & Thomas, 2002), lo que hace pensar que este diseño pueda

presentar algunas propiedades intrínsecas que favorecen la supervivencia y propagación para un plásmido BHR.

Arquitectura de la red transcripcional del plásmido R388

La red de regulación transcripcional del plásmido R388 aparece esquematizada en la figura D2. Inspeccionando su topología destacan varias características interesantes: todos los reguladores identificados parecen funcionar como represores transcripcionales autorregulados; la mayoría de los circuitos de regulación identificados involucran reguladores y promotores pertenecientes al mismo módulo funcional; todos los promotores del *backbone* son regulados por al menos un represor y cuando dos reguladores actúan sobre el mismo promotor, se aplica una lógica OR, por lo que no es necesaria la presencia simultánea de ambos sino que la presencia de uno u otro es capaz de reprimir al promotor.

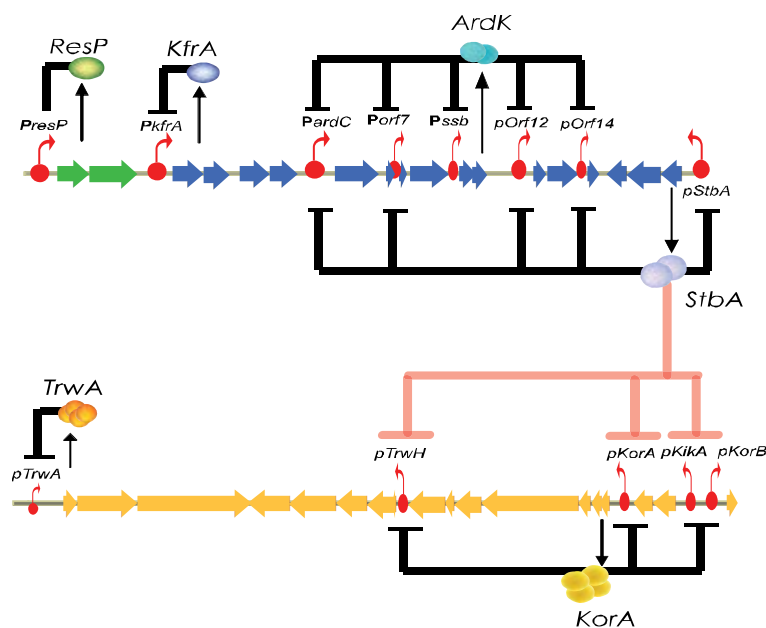


Figura D2. Arquitectura de la red de regulación transcripcional de R388.

La figura representa la estructura de la red de regulación transcripcional identificada en R388. Los genes plasmídicos se representan en distintos colores según el módulo funcional al que pertenecen: arriba aparece la región de mantenimiento general del plásmido con el módulo de replicación representado en verde y en azul los genes implicados en establecimiento y estabilidad; en la parte de abajo está la región que contiene los módulos implicados en la transferencia conjugativa representados en amarillo; las flechas rojas representan los promotores. Sobre el plásmido, en negro, se representan las interacciones de la red de regulación con sus correspondientes reguladores, excepto la regulación de StbA sobre el módulo de conjugación que se representa en rosa.

Esto se ve claramente en el caso de los promotores de la zona de establecimiento en el hospedador, que se encuentran regulados tanto por StbA como por ArdK constituyéndose un motivo de regulación de tipo DOR. Éste contiene dos reguladores que actúan sobre los mismos promotores pero no interfieren entre sí. Como se ha visto experimentalmente la presencia de uno de los dos reguladores produce una fuerte represión en los promotores, de manera que para que los promotores se activen es necesario que ambos reguladores se despeguen. La presencia de este motivo de red mantiene **PardC**, **Porf7**, **Porf12** and **Porf14** completamente reprimidos, como se observa en los perfiles de expresión en presencia del plásmido R388, y sugiere que el plásmido será capaz de mantener reprimidos estos genes frente a desuniones transitorias de uno de los dos represores. La medida de los perfiles de expresión en presencia de los R388 *knock-out* para *ardK* (pIC9 y pIC11) pone de manifiesto que los promotores permanecen reprimidos en ausencia de ArdK pero manifestándose un aumento en la actividad transcripcional cuando únicamente está regulados por StbA.

El circuito que regularía los promotores responsables de la síntesis y ensamblaje del *pilus* estaría integrado por los reguladores KorA y StbA y también presentaría una lógica OR, aunque su arquitectura se presenta más complicada. El principal regulador del circuito es KorA, que establece un motivo tipo SIM mediante su unión a las secuencias SDR-B que mantiene reprimidos *PkorA*, *PkikA*, *PtrwH* y *PkorB*. StbA parece ser capaz de reprimir los mismos promotores, pero no completamente incluso a máxima inducción del regulador. La conservación parcial en los sitios SDR-B de una secuencia análoga a un IT-B, el sitio de unión de StbA, podría ser la causa de este fenómeno. Así, StbA y KorA formarían un circuito complejo que topológicamente representa un motivo de tipo *Feedforward loop* de salida múltiple (MO-FFL). En R388, StbA reprime directamente los promotores de la región de conjugación pero también reprime la expresión de KorA que es el represor principal de estos promotores. Este FFL pertenecería al tipo incoherente de clase 2, un motivo de red escasamente representado en las redes de *E.coli* o *S.cerevisiae* y cuyas capacidades computacionales no han sido experimentalmente estudiadas.

El análisis de mutantes por delección de R388 nos ha permitido encontrar que la eliminación del gen *korB* produce un efecto sobre varios promotores de la red, a pesar de que KorB no había mostrado actividad como regulador transcripcional en la búsqueda combinatoria de reguladores. Cuando el mutante carente de *korB* es ensayado con la librería de promotores se observa un efecto en los promotores regulados por *korA*, que pone de manifiesto la existencia de otro nivel de regulación aún sin estudiar.

Previamente se habían hecho algunos experimentos coexpresando KorB y KorA desde distintos vectores (Fernandez-Lopez, 2007), tratando de observar un efecto de KorB sobre los promotores de R388 pero no se había conseguido ningún resultado que indicase una función reguladora de KorB, obteniéndose los valores esperados por la presencia de KorA. Este resultado señala a *korB* como un posible punto de interés para un trabajo posterior, al tiempo que pone de manifiesto el interés de conseguir nuevos *knockout* de R388, especialmente de ORFs sin función asignada o con homología con reguladores, para tratar de ampliar el conocimiento sobre la regulación de las funciones plasmídicas.

Además de estos circuitos más complejos, en el plásmido se han identificado tres motivos simples de autorregulación negativa. Así, tal y como previamente había sido caracterizado, TrwA actúa como represor transcripcional de sistema *Dtr*, mediante el reconocimiento de dos sitios de unión caracterizados en la región promotora del operón *trwABC*, situada dentro del *oriT* de R388 (Moncalian, *et al.*, 1997). La resolvasa ResP ha resultado ser el regulador transcripcional responsable del control del operón *resP-repA* que contiene los genes implicados en la replicación plasmídica, actuando como represor transcripcional de su propia síntesis. Por último, se ha encontrado un tercer circuito de autorregulación en el operón *kfrA-osa* que se encuentra reprimido por KfrA.

Dentro de la red de regulación identificada hasta el momento StbA parece destacarse como un regulador central del plásmido ya que conectaría la regulación de dos módulos funcionales, uniendo la regulación de los promotores de conjugación con los del módulo de mantenimiento, mientras que el resto de las interacciones regulatorias identificadas involucran promotores y represores pertenecientes al mismo módulo funcional. Además, los trabajos de Guynet *et al.* sobre el operón *stbABC* sugieren que estos genes pueden desempeñar un papel regulador en el balance entre la transmisión vertical y horizontal del plásmido (Guynet, *et al.*, 2011).

El trabajo con las delecciones de R388 nos deja un resultado a priori desconcertante, que es el obtenido al ensayar el mutante que carece de *trwC*. En este caso nos encontramos con que el promotor *P_{trwA}* aparece prácticamente desregulado cuando, en principio, la regulación de este promotor se lleva a cabo únicamente por TrwA y no se conoce que TrwC ejerza ningún papel regulatorio en el plásmido. Sin embargo TrwC se une a secuencias específicas en el *oriT* situadas adyacentes a los sitios de unión de TrwA (Llosa, *et al.*, 1991) por lo que existiría la posibilidad de que pueda tener alguna función regulatoria secundaria aún por explorar. Este resultado es

en cualquier caso preliminar y, aunque se ha comprobado que el gen *trwA* se encuentra en el plásmido, habría que descartar que se haya visto afectado de alguna manera.

Considerando el estado reprimido de la red, se sometió el plásmido a distintos estímulos ambientales que pudieran desencadenar alguna respuesta en el plásmido. Se cambiaron las condiciones de crecimiento: medio LB, medio M9, distintas temperaturas (30, 37 y 42 °C) y se probó la presencia de agentes estresantes como concentraciones subinhibitorias de antibióticos (Cm y Rif) o inductores de la respuesta SOS (UV, mitomicina). A juzgar por los resultados obtenidos en los perfiles de expresión de los promotores, ninguna de estas señales parece generar perturbaciones específicas en la red. Dado que una característica fundamental para la dispersión del plásmido en las poblaciones es la transferencia conjugativa y aún se desconoce si existe alguna señal responsable de desencadenar el proceso conjugativo se probó si la presencia de posibles receptores en el medio podía producir alguna respuesta en la regulación transcripcional del plásmido. Para ello, se co-cultivaron de las células con los promotores de R388 junto con células sin plásmido, igualmente sin obtenerse una respuesta en los promotores.

Propiedades de la red: minimización de la carga para el hospedador y producción de fuertes respuestas transcripcionales puntuales

Aunque no se conoce un estudio cuantitativo sistemático, la red de regulación del plásmido RP4 es posiblemente la más estudiada. A pesar de que la red de regulación global descrita en R388 y en RP4 tienen organizaciones distintas, ambas comparten dos características fundamentales: se basan únicamente en represores transcripcionales y contienen promotores con un alto índice de represión (Thomas, 2006). Tanto R388 como RP4 son plásmidos de amplio rango de hospedador pero pertenecen a grupos de incompatibilidad diferentes y no se encuentran relacionados filogenéticamente (Pansegrau, *et al.*, 1994) (Fernandez-Lopez, *et al.*, 2006) (Sen, *et al.*, 2013). Esto parece indicar que habrían evolucionado de manera independiente hacia redes de regulación basadas en los mismos principios lo que podría deberse a encontrarse ambos sometidos a presiones selectivas presumiblemente similares.

El estudio de las propiedades de los distintos motivos de red, ha puesto de manifiesto que los motivos de *feedback* negativo presentan la propiedad de acelerar los tiempos de respuesta (Alon, 2007) y de mantener un control robusto frente a activaciones espurias transitorias (Alon, 2007). Los altos índices de represión que presentan los promotores de R388 combinado con la abundancia de circuitos de

autorrepresión, favorecería la generación de respuestas transitorias rápidas y fuertes en situaciones específicas, permitiendo al mismo tiempo que el plásmido se mantenga fuertemente reprimido el resto del tiempo. De esta manera, la red transcripcional de R388 parece estar diseñada para permanecer apagada la mayoría del tiempo pero teniendo la capacidad de producir respuestas fuertes transitorias cuando es necesario. Estas características podrían resultar útiles para la dispersión del plásmido dado que la selección impone demandas opuestas a la fisiología plasmídica. Así, el plásmido requiere de un delicado equilibrio entre la expresión de los genes necesarios para su adecuado mantenimiento y propagación en la población y la carga metabólica causada al hospedador (Paulsson, 2002).

El mantenimiento de niveles de expresión basales muy bajos favorece que el plásmido ejerza una baja carga metabólica sobre el hospedador lo que supone un beneficio para el plásmido. Aquellos que ejercen alta presión sobre el hospedador reducen el *fitness* bacteriano y en ausencia de presión selectiva serán desplazados de la población por las células libres de plásmido o plásmidos con bajo coste para el hospedador (Paulsson, 2002).

Por otro lado, como muestran los modelos teóricos y las simulaciones, es esperable que tras un evento de conjugación los circuitos de *feedback* negativo experimenten *overshooting* transitorio, que será mayor cuanto más fuerte sea el promotor. El plásmido conjugativo al entrar en un nuevo hospedador se encuentra en una situación en donde está presente la maquinaria transcripcional pero la red de regulación se encuentra temporalmente ausente, lo que provocaría la expresión de los genes plasmídicos hasta que se alcancen las concentraciones de reguladores necesarias para volver a reprimirlos.

Un análisis mediante RT-qPCR llevado a cabo en el laboratorio por Fernandez-López muestra que se produce un incremento de transcripción en varios promotores de R388 sujetos a NFLs cuando el plásmido es transferido por conjugación a una nueva célula mientras que genes que no están bajo el control de ningún regulador (*dhfR*) no mostraron cambios similares (Fernandez-Lopez, *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos en estos experimentos corresponden a grandes rasgos lo predicho por las simulaciones teóricas. Además, han puesto de manifiesto que el pico de expresión producido tras la conjugación parece tener un impacto considerable sobre el crecimiento de las células presentando una reducción medible en la tasa de crecimiento bacteriano, posiblemente causado por la transcripción y traducción de los genes plasmídicos. Si, a pesar de que este efecto negativo temporal sobre el crecimiento del huésped, R388 y otros plásmidos

similares ha evolucionado redes basadas en *feedback loops* negativos, está claro que este diseño debe presentar alguna propiedad adaptativa interesante para el estilo de vida plasmídico.

Tras la conjugación, el plásmido que ha entrado en la célula está sometido a un proceso de selección intracelular en el que necesita conseguir establecerse en el hospedador, bloquear la entrada de otros plásmidos y alcanzar el número de copias de estado estacionario lo antes posible. Es posible que el *overshooting* transcripcional tras la conjugación permita al plásmido producir una respuesta transcripcional vigorosa en un momento en el que la selección intracelular es más fuerte que la intercelular. Sin embargo, la naturaleza transitoria de esta respuesta permitiría que a largo plazo, donde la selección intercelular se impone a la intracelular, los efectos que causa el plásmido en la célula sean mínimos. Así, al alcanzarse las concentraciones necesarias de reguladores, se mantendría la actividad de los promotores prácticamente apagados para ejercer la mínima carga posible sobre el huésped, favoreciendo su supervivencia frente a los fenómenos de selección intercelular.

2. EFECTO DE LA VARIACIÓN EN EL GENOMA DE LOS IncW EN LA REGULACIÓN Y EL FENOTIPO

Efectos del cambio en el genotipo sobre la red de regulación

La comparación de la actividad transcripcional de los promotores de R388 con dos plásmidos 97% idénticos a R388 revela que, a pesar de su simplicidad, la red muestra importantes e inesperadas respuestas a pequeñas variaciones genéticas. Más aún, muestra que la intensidad de estos cambios podría no ser predicha a priori a partir del nivel de identidad de secuencia, indicando una relación no lineal entre las velocidades de evolución del genoma y la de la red.

Las diferencias detectadas pueden deberse a dos razones principales: por un lado a que la concentración intracelular de los reguladores transcripcionales es distinta o que hay una variación en las secuencias de los represores o sus sitios de unión. Variaciones en la concentración intracelular suelen a su vez ser producidas por distintos mecanismos, incluyendo modificaciones en el número de copias del plásmido, variaciones en la fuerza del promotor, en la estabilidad de los RNA o proteínas, etc.

De todas las diferencias observadas en las actividades de los promotores, solo en el caso del pTrwA somos capaces de identificar su causa inmediata. Las variaciones de secuencias en la región *PtrwA-trwA* entre R7K y R388 es considerablemente más alta que en el resto del armazón (12.5% respecto a 2.5%). Un análisis más detallado revela que los residuos de TrwA implicados en el reconocimiento del sitio del DNA, así como los sitios de unión son diferentes (Tena, 2013) (Revilla, *et al.*, 2008), lo que explicaría lo observado en las actividades transcripcionales, donde TrwA_R7K resulta incapaz de reprimir *PtrwA_R388*. El resto de variaciones en las actividades promotoras podrían deberse a distintos mecanismos actualmente aún sin caracterizar. Es llamativo que pIE321 modifica los niveles de expresión de 9 de los 13 promotores del armazón mientras que R7K modifica la actividad de tres. pIE321 muestra solo un 0,5% más de variación respecto a R388 lo que sugiere que una relación no-lineal entre el grado de homología del genoma y su impacto en la red de regulación.

.Cambios en el fenotipo en los plásmidos IncW

La variación en la actividad transcripcional observada en los promotores de R388 en presencia de la red de regulación de otros IncW lleva a plantearse si podría haber también diferencias fenotípicas entre estos plásmidos. Tras estudiar las principales funciones plasmídicas encontramos que, a pesar de la alta identidad de secuencia, existen importantes diferencias fenotípicas entre ellos, desde el número de copias a la estabilidad en distintos hospedadores. Por ejemplo, la determinación del número de copias de plásmido respecto al cromosoma revela que pIE321 se encuentra en menor cantidad en la célula que R388 o R7K, con una media de 0,5 copias por cromosoma en el caso de pIE321 frente 4 en los otros dos. Los ensayos llevados a cabo para determinar el rango de hospedadores en que los plásmidos son capaces de mantenerse estables, también muestran diferencias. En *E. coli* encontramos que frente a una estabilidad del 100% para el resto de los IncW ensayados, R7K resulta inestable recuperándose el plásmido en un 60% de las células tras 100 generaciones; también encontramos que en un hospedador como *P. putida* donde R388 resulta altamente inestable (0% de células con plásmido tras 80 generaciones) pIE321 parece ser capaz de mantenerse estable (98% de células mantienen el plásmido en 80 generaciones). Estos resultados ponen de manifiesto que la presencia de pequeños cambios en el genoma no solo tiene un efecto considerable en el ajuste de la regulación sino que es capaz de producir importantes cambios en el fenotipo plasmídico.

Los plásmidos R388, R7K y pIE321 fueron aislados de diferentes especies bacterianas, representando el establecimiento exitoso del mismo *core* plasmídico en tres entornos genómicos diferentes (Revilla, 2008). La conservación de un *core* genómico común con distintas variantes, aisladas de distintas especies, es también una característica común de otros plásmidos BHR como es el caso de los plásmidos IncP (Schluter, *et al.*, 2007). Basándonos en los datos obtenidos para R388 y sus variantes, sugerimos que tras este aparentemente bajo grado de variación en la secuencia, los plásmidos esconden una sorprendente habilidad para ajustar sus redes regulatorias sin hacer grandes cambios en su estructura genómica. Esto contrasta con los estudios hechos recientemente en *E. coli* que muestran que cambios en la conectividad o en la expresión de los reguladores globales tienen poco efecto en el perfil transcripcional de la red de regulación (Isalan, *et al.*, 2008). Esta susceptibilidad al cambio genético conferiría a los plásmidos la habilidad de adaptarse rápido a nuevos ambientes genéticos facilitándoles la colonización de distintos tipos de células. Esta sería una característica favorable para los plásmidos BHR que necesitan sobrevivir en un amplio abanico de huéspedes.

3. MEDIDA DE LA CONJUGACIÓN EN EL CITÓMETRO

Establecer la importancia de la transmisión en la persistencia de los plásmidos conjugativos en las poblaciones es muy importante para entender y poder llegar a controlar la dispersión de resistencias a antibióticos (Levin, *et al.*, 1997). Esta tarea conlleva determinar los factores que promueven o limitan esta transmisión, lo que hace importante el desarrollo de protocolos experimentales que permitan medir eficientemente la conjugación posibilitando la obtención de mayor cantidad de datos de una forma relativamente sencilla.

La citometría de flujo es una herramienta potente que permite obtener mucha información de una manera relativamente rápida y sencilla. Presenta múltiples aplicaciones en microbiología (Alvarez-Barrientos, *et al.*, 2000); (Davey & Kell, 1996); (Porter, *et al.*, 1997) y el desarrollo de citómetros más baratos y la mejora de resolución hacen que sea una herramienta de trabajo cada vez más accesible en los laboratorios de investigación.

En este trabajo se ha validado un método que permite el análisis de la conjugación en el citómetro mediante el empleo de marcadores fluorescente que permiten

discriminar las distintas poblaciones presentes en la mezcla conjugativa. Gracias a la capacidad de procesamiento de esta técnica (Shapiro, 2005), el protocolo permite la obtención de manera rápida de gran cantidad de datos obteniéndose estimaciones de las frecuencias de conjugación equivalentes a las obtenidas mediante los protocolos de plaqueo tradicionales, pero menos ruidosas. La obtención de datos más robustos y el aumento de la velocidad de procesamiento de las muestras hacen de esta técnica una herramienta interesante para el estudio de la conjugación.

Utilizando el método citométrico puesto a punto se ha analizado la conjugación de *oriT* de R388 demostrando experimentalmente que el cálculo de la tasa de conjugación mediante el método “*End point*” (Simonsen, *et al.*, 1990) (Zhong, *et al.*, 2012) es insensible al ratio D/R y hasta cierto punto del tiempo de conjugación, a diferencia de la frecuencia de conjugación que resulta muy dependiente de las condiciones experimentales lo que hace difícil la comparación de valores. Aunque la conjugación en superficies sólidas se desvía de las condiciones ideales para este método en las que las células están continuamente mezclándose, los resultados obtenidos muestran que en condiciones de alta concentración inicial de células y tiempos de conjugación cortos, el método “*End point*” proporciona medidas robustas de la tasa de conjugación.

Las cinéticas realizadas con plásmidos conjugativos representativos de los principales grupos de incompatibilidad en enterobacterias nos permitieron asignar de manera semi-cuantitativa la transmisibilidad de estos plásmidos. Así, el plásmido RP4 demostró una mayor capacidad conjugativa, llegando a invadir completamente la población experimental en pocas horas incluso cuando la prevalencia inicial del plásmido fue tan solo de un 5%. Este resultado sugiere que la prevalencia de los plásmidos IncP en muestras ambientales, donde constituyen el grupo dominante, está asociada a una gran eficiencia conjugativa (Yano, *et al.*, 2013) (Suzuki, *et al.*, 2010). Por otra parte, resultó llamativa la baja capacidad de propagación de los plásmidos R1 y Collbp-9, en los que sólo se obtuvo evidencia de propagación conjugativa en el caso de sus mutantes des-reprimidos. Collbp-p9 y R1 son los prototipos de los grupos de incompatibilidad IncI e IncFI, grupos ampliamente diseminados en las enterobacterias de origen clínico, y frecuentemente asociados a la propagación de resistencias a los antibióticos (Lanza, *et al.*, 2014). Esto plantea la cuestión de si la propagación natural de estos plásmidos se debe a variantes des-reprimidas, o por el contrario la conjugación tiene un papel secundario en las causas de la gran prevalencia epidemiológica de estos grupos.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

A.- El plásmido R388 presenta una red global caracterizada por:

- i) Promotores fuertes, pero silenciados por la acción de reguladores específicos del plásmido.
- ii) Una arquitectura basada exclusivamente en represores transcripcionales.
- iii) Insensibilidad a las perturbaciones ambientales ensayadas.

B.- La red de regulación del plásmido R388 se basa en el motivo de autoregulación negativa con altos índices de represión. Su arquitectura aparece formada principalmente por motivos de tipo NAR, SIM y DOR. Específicamente:

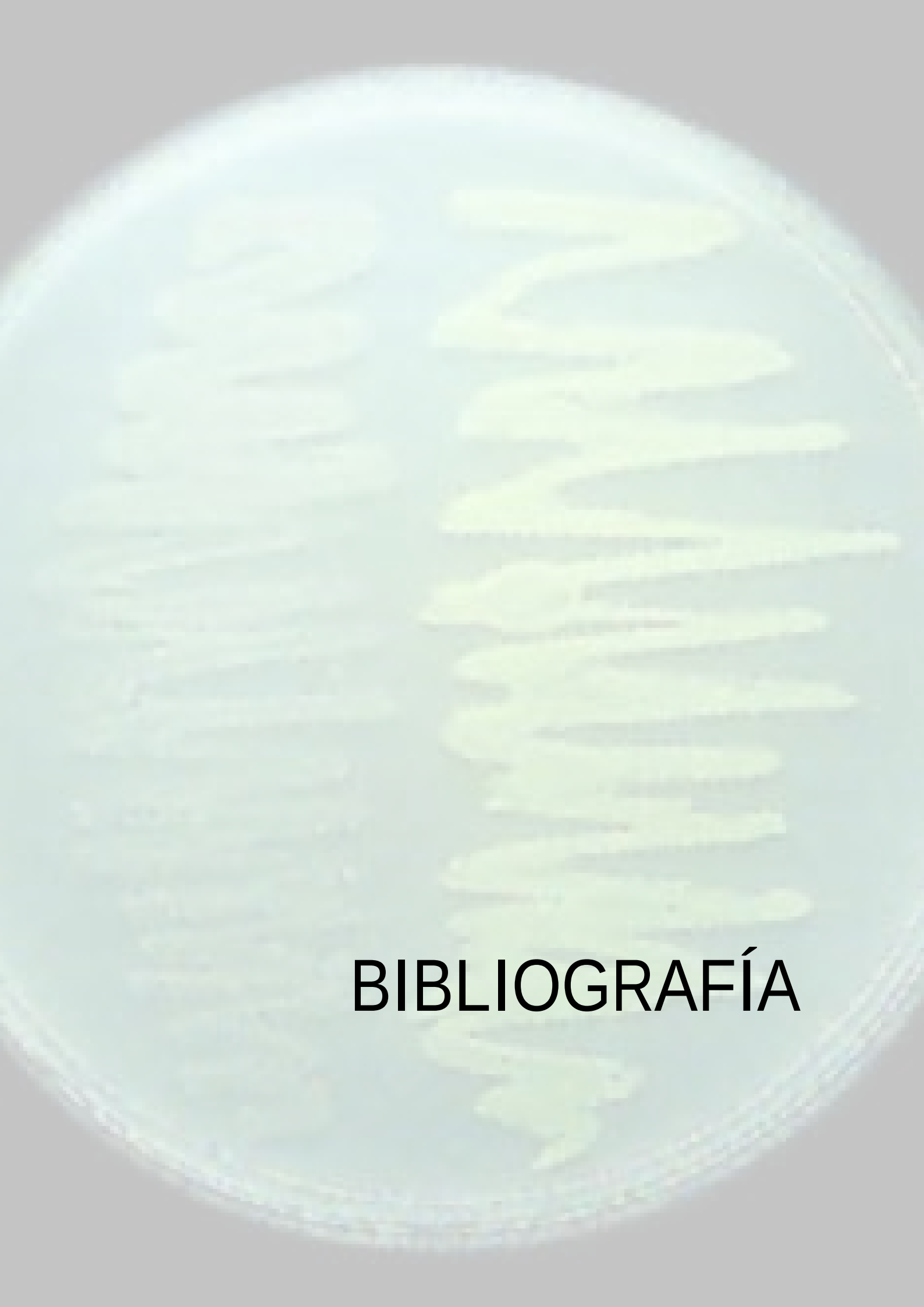
- i) Tres motivos de autorregulación negativa controlan la expresión de *PresP*, *PkfrA* y *PtrwA*.
- ii) Un DOR controlado por *ArdK* y *StbA* regula los operones de la zona de establecimiento en el receptor mientras que un SIM controlado por *KorA* regula los promotores del *Mpf*.
- iii) *StbA* establece un FFL sobre los promotores regulados por *KorA*, colocando a *StbA* como regulador central del plásmido.

C.- La eliminación de *korB* en el plásmido R388 tiene un efecto sobre los promotores del *Mpf*. *KorB* no actúa directamente sobre los promotores por lo que debe estar actuando a través de otro factor. Esto pone de manifiesto la existencia de otro nivel de regulación aún por caracterizar.

D.- Los experimentos con *ResP* indican que constituye una “*moonlight protein*” capaz de ejecutar dos acciones diferentes: actúa como regulador transcripcional de los genes implicados en la replicación del plásmido y mantiene su actividad resolvasa, siendo capaz de resolver cointegrados.

E.- A pesar de que los plásmidos IncW están caracterizados por una alta identidad a nivel de secuencia, los distintos plásmidos muestran efectos diferentes sobre la red de regulación y presentan importantes diferencias fenotípicas. Esto indica que pequeñas variaciones a nivel de secuencia pueden tener importantes consecuencias sobre la fisiología y rango de hospedador del plásmido.

F.- Hemos logrado poner a punto un protocolo rápido y preciso para la medida de la conjugación bacteriana utilizando citometría de flujo. Este método ha permitido cuantificar la tasa de conjugación de distintos plásmidos, permitiendo una comparación sistemática de su capacidad para propagarse horizontalmente.

A petri dish containing a bacterial culture. The culture is a yellowish, opaque substance. It has been streaked in a spiral pattern, starting from the center and moving outwards towards the edge of the dish. The streaks are closely spaced, creating a dense, spiral-like appearance. The background of the petri dish is a light, translucent color.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Albert R (2005) Scale-free networks in cell biology. *J Cell Sci* **118**: 4947-4957.
- Alon U (2006) *An introduction to systems biology design principles of biological circuits*. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, FLA.
- Alon U (2007) Network motifs: theory and experimental approaches. *Nat Rev Genet* **8**: 450-461.
- Alvarez-Barrientos A, Arroyo J, Canton R, Nombela C & Sanchez-Perez M (2000) Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* **13**: 167-195.
- Andersson JO, Sarchfield SW & Roger AJ (2005) Gene transfers from nanoarchaeota to an ancestor of diplomonads and parabasalids. *Mol Biol Evol* **22**: 85-90.
- Baharoglu Z, Bikard D & Mazel D (2010) Conjugative DNA transfer induces the bacterial SOS response and promotes antibiotic resistance development through integron activation. *PLoS Genet* **6**: e1001165.
- Balzer D, Ziegelin G, Pansegrau W, Kruft V & Lanka E (1992) KorB protein of promiscuous plasmid RP4 recognizes inverted sequence repetitions in regions essential for conjugative plasmid transfer. *Nucleic Acids Res* **20**: 1851-1858.
- Basu S, Mehreja R, Thiberge S, Chen MT & Weiss R (2004) Spatiotemporal control of gene expression with pulse-generating networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 6355-6360.
- Belogurov AA, Delver EP & Rodzevich OV (1992) IncN plasmid pKM101 and IncI1 plasmid Collb-P9 encode homologous antirestriction proteins in their leading regions. *J Bacteriol* **174**: 5079-5085.
- Belogurov AA, Delver EP, Agafonova OV, Belogurova NG, Lee LY & Kado CI (2000) Antirestriction protein Ard (Type C) encoded by IncW plasmid pSa has a high similarity to the "protein transport" domain of TraC1 primase of promiscuous plasmid RP4. *J Mol Biol* **296**: 969-977.
- Bevis BJ & Glick BS (2002) Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed). *Nat Biotechnol* **20**: 83-87.
- Bingle LE & Thomas CM (2001) Regulatory circuits for plasmid survival. *Curr Opin Microbiol* **4**: 194-200.
- Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, *et al.* (2009) Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **48**: 1-12.
- Boyer LA, Lee TI, Cole MF, *et al.* (2005) Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **122**: 947-956.

- Bradley DE (1980) Morphological and serological relationships of conjugative pili. *Plasmid* **4**: 155-169.
- Bradley DE & Cohen DR (1976) Basic characterization of W-pili. *J Gen Microbiol* **97**: 91-103.
- Camas FM, Blazquez J & Poyatos JF (2006) Autogenous and nonautogenous control of response in a genetic network. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 12718-12723.
- Cavalli LL, Lederberg J & Lederberg EM (1953) An infective factor controlling sex compatibility in *Bacterium coli*. *J Gen Microbiol* **8**: 89-103.
- Close SM & Kado CI (1991) The *osa* gene of pSa encodes a 21.1-kilodalton protein that suppresses *Agrobacterium tumefaciens* oncogenicity. *J Bacteriol* **173**: 5449-5456.
- Close SM & Kado CI (1992) A gene near the plasmid pSa origin of replication encodes a nuclease. *Mol Microbiol* **6**: 521-527.
- Coetzee JN, Datta N & Hedges RW (1972) R factors from *Proteus rettgeri*. *J Gen Microbiol* **72**: 543-552.
- Cormack BP, Valdivia RH & Falkow S (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**: 33-38.
- Couturier M, Bex F, Bergquist PL & Maas WK (1988) Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev* **52**: 375-395.
- Chen CY & Kado CI (1994) Inhibition of *Agrobacterium tumefaciens* oncogenicity by the *osa* gene of pSa. *J Bacteriol* **176**: 5697-5703.
- Chung CT & Miller RH (1988) A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Res* **16**: 3580.
- 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.
- Datta N & Hedges RW (1971) Compatibility groups among *fi* - R factors. *Nature* **234**: 222-223.
- Datta N & Hedges RW (1972) R factors identified in Paris, some conferring gentamicin resistance, constitute a new compatibility group. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **123**: 849-852.
- Datta N, Lawn AM & Meynell E (1966) The relationship of F type piliation and F phage sensitivity to drug resistance transfer in R⁺F⁻ *Escherichia coli* K 12. *J Gen Microbiol* **45**: 365-376.
- Davey HM & Kell DB (1996) Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiol Rev* **60**: 641-696.
- Davies J, Spiegelman GB & Yim G (2006) The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr Opin Microbiol* **9**: 445-453.
- De Gelder L, Ponciano JM, Joyce P & Top EM (2007) Stability of a promiscuous plasmid in different hosts: no guarantee for a long-term relationship. *Microbiology* **153**: 452-463.

de la Cruz F & Davies J (2000) Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol* **8**: 128-133.

del Campo I, Ruiz R, Cuevas A, Revilla C, Vielva L & de la Cruz F (2012) Determination of conjugation rates on solid surfaces. *Plasmid* **67**: 174-182.

del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevarria MJ, Espinosa M & Diaz-Orejas R (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 434-464.

Delver EP & Belogurov AA (1997) Organization of the leading region of IncN plasmid pKM101 (R46): a regulation controlled by CUP sequence elements. *J Mol Biol* **271**: 13-30.

Demarre G, Guerout AM, Matsumoto-Mashimo C, Rowe-Magnus DA, Marliere P & Mazel D (2005) A new family of mobilizable suicide plasmids based on broad host range R388 plasmid (IncW) and RP4 plasmid (IncPalph) conjugative machineries and their cognate Escherichia coli host strains. *Res Microbiol* **156**: 245-255.

Dorokhina OV & Korotiaev AI (1984) [Incompatibility properties of pKMR plasmids determining antibiotic resistance and the capacity to produce colonization antigen]. *Antibiotiki* **29**: 91-95.

Dostal L, Khare D, Bok J, Heinemann U, Lanka E & Welfle H (2003) RP4 repressor protein KorB binds to the major groove of the operator DNA: a Raman study. *Biochemistry* **42**: 14476-14482.

Dower WJ, Miller JF & Ragsdale CW (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**: 6127-6145.

Eichenberger P, Fujita M, Jensen ST, *et al.* (2004) The program of gene transcription for a single differentiating cell type during sporulation in *Bacillus subtilis*. *PLoS Biol* **2**: e328.

Fernandez-Lopez R (2007) Genómica, evolución y redes de regulación del plásmido R388. Tesis Doctoral de la Universidad de Cantabria. ed.^eds.), p.^pp.

Fernandez-Lopez R, Del Campo I, Revilla C, Cuevas A & de la Cruz F (2014) Negative feedback and transcriptional overshooting in a regulatory network for horizontal gene transfer. *PLoS Genet* **10**: e1004171.

Fernandez-Lopez R, Garcillan-Barcia MP, Revilla C, Lazaro M, Vielva L & de la Cruz F (2006) Dynamics of the IncW genetic backbone imply general trends in conjugative plasmid evolution. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 942-966.

Fernandez-Lopez R, Del Campo I, Ruiz R, Lanza V, Vielva L & de la Cruz F (2010) Numbers on the edges: a simplified and scalable method for quantifying the gene regulation function. *Bioessays* **32**: 346-355.

Garcillan-Barcia MP, Alvarado A & de la Cruz F (2011) Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 936-956.

Gogarten JP & Townsend JP (2005) Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nat Rev Microbiol* **3**: 679-687.

Goldenfeld N & Woese C (2007) Biology's next revolution. *Nature* **445**: 369.

- Gophna U, Charlebois RL & Doolittle WF (2004) Have archaeal genes contributed to bacterial virulence? *Trends Microbiol* **12**: 213-219.
- Gorai AP, Heffron F, Falkow S, Hedges RW & Datta N (1979) Electron microscope heteroduplex studies of sequence relationships among plasmids of the W incompatibility group. *Plasmid* **2**: 485-492.
- Gotz A, Pukall R, Smit E, *et al.* (1996) Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2621-2628.
- Grandoso G, Avila P, Cayon A, Hernando MA, Llosa M & de la Cruz F (2000) Two active-site tyrosyl residues of protein TrwC act sequentially at the origin of transfer during plasmid R388 conjugation. *J Mol Biol* **295**: 1163-1172.
- Grant SG, Jessee J, Bloom FR & Hanahan D (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4645-4649.
- Guglielmini J, Quintais L, Garcillan-Barcia MP, de la Cruz F & Rocha EP (2011) The repertoire of ICE in prokaryotes underscores the unity, diversity, and ubiquity of conjugation. *PLoS Genet* **7**: e1002222.
- Guljamow A, Jenke-Kodama H, Saumweber H, *et al.* (2007) Horizontal gene transfer of two cytoskeletal elements from a eukaryote to a cyanobacterium. *Curr Biol* **17**: R757-759.
- Guynet C, Cuevas A, Moncalian G & de la Cruz F (2011) The *stb* operon balances the requirements for vegetative stability and conjugative transfer of plasmid R388. *PLoS Genet* **7**: e1002073.
- 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.
- Halary S, Leigh JW, Cheaib B, Lopez P & Baptiste E (2010) Network analyses structure genetic diversity in independent genetic worlds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 127-132.
- Hayes W (1953) [Observations on a transmissible agent determining sexual differentiation in *Bacterium coli*]. *J Gen Microbiol* **8**: 72-88.
- Heinemann JA & Sprague GF, Jr. (1989) Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast. *Nature* **340**: 205-209.
- Isalan M, Lemerle C, Michalodimitrakis K, *et al.* (2008) Evolvability and hierarchy in rewired bacterial gene networks. *Nature* **452**: 840-845.
- Jacob F & Wollman EL (1956) [Processes of conjugation and recombination in *Escherichia coli*. I. Induction by conjugation or zygotic induction]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **91**: 486-510.
- Jain R, Rivera MC & Lake JA (1999) Horizontal gene transfer among genomes: the complexity hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 3801-3806.
- Jeffery CJ (1999) Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci* **24**: 8-11.

- Kalir S & Alon U (2004) Using a quantitative blueprint to reprogram the dynamics of the flagella gene network. *Cell* **117**: 713-720.
- Kalir S, Mangan S & Alon U (2005) A coherent feed-forward loop with a SUM input function prolongs flagella expression in Escherichia coli. *Mol Syst Biol* **1**: 2005 0006.
- Khlebnikov A, Datsenko KA, Skaug T, Wanner BL & Keasling JD (2001) Homogeneous expression of the P(BAD) promoter in Escherichia coli by constitutive expression of the low-affinity high-capacity AraE transporter. *Microbiology* **147**: 3241-3247.
- Konarska-Kozłowska M & Iyer VN (1983) Sequence homology between Inc N group plasmids. *Plasmid* **10**: 211-223.
- Kontomichalou P (1971) R-factors controlling resistance to the penicillins. Tesis de la Universidad de Atenas, Grecia. ed.^eds.), p.^pp.
- Kornacki JA, Burlage RS & Figurski DH (1990) The kil-kor regulon of broad-host-range plasmid RK2: nucleotide sequence, polypeptide product, and expression of regulatory gene korC. *J Bacteriol* **172**: 3040-3050.
- Kostelidou K & Thomas CM (2002) DNA recognition by the KorA proteins of IncP-1 plasmids RK2 and R751. *Biochim Biophys Acta* **1576**: 110-118.
- Lanza VF, de Toro M, Garcillan-Barcia MP, Mora A, Blanco J, Coque TM & de la Cruz F (2014) Plasmid flux in Escherichia coli ST131 sublineages, analyzed by plasmid constellation network (PLACNET), a new method for plasmid reconstruction from whole genome sequences. *PLoS Genet* **10**: e1004766.
- Lawrence JG & Ochman H (2002) Reconciling the many faces of lateral gene transfer. *Trends Microbiol* **10**: 1-4.
- Lederberg J & Tatum EL (1946) Gene recombination in Escherichia coli. *Nature* **158**: 558.
- Lee C, Kim J, Shin SG & Hwang S (2006) Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in Escherichia coli. *Journal of Biotechnology* **123**: 273-280.
- Lee EC, Yu D, Martinez de Velasco J, et al. (2001) A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* **73**: 56-65.
- Lee TI, Rinaldi NJ, Robert F, et al. (2002) Transcriptional regulatory networks in Saccharomyces cerevisiae. *Science* **298**: 799-804.
- Lessl M & Lanka E (1994) Common mechanisms in bacterial conjugation and Ti-mediated T-DNA transfer to plant cells. *Cell* **77**: 321-324.
- Levin BR, Stewart FM & Rice VA (1979) The kinetics of conjugative plasmid transmission: fit of a simple mass action model. *Plasmid* **2**: 247-260.
- Levin BR, Lipsitch M, Perrot V, et al. (1997) The population genetics of antibiotic resistance. *Clin Infect Dis* **24 Suppl 1**: S9-16.
- Levy SB (1998) The challenge of antibiotic resistance. *Sci Am* **278**: 46-53.

- Licht TR, Christensen BB, Krogfelt KA & Molin S (1999) Plasmid transfer in the animal intestine and other dynamic bacterial populations: the role of community structure and environment. *Microbiology* **145** (Pt 9): 2615-2622.
- Lilley AK & Bailey MJ (2002) The transfer dynamics of *Pseudomonas* sp. plasmid pQBR11 in biofilms. *FEMS Microbiol Ecol* **42**: 243-250.
- Loper JE & Kado CI (1979) Host range conferred by the virulence-specifying plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **139**: 591-596.
- Llosa M & de la Cruz F (2005) Bacterial conjugation: a potential tool for genomic engineering. *Res Microbiol* **156**: 1-6.
- Llosa M, Bolland S & de la Cruz F (1991) Structural and functional analysis of the origin of conjugal transfer of the broad-host-range IncW plasmid R388 and comparison with the related IncN plasmid R46. *Mol Gen Genet* **226**: 473-483.
- Llosa M, Gomis-Ruth FX, Coll M & de la Cruz Fd F (2002) Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol Microbiol* **45**: 1-8.
- Macartney DP, Williams DR, Stafford T & Thomas CM (1997) Divergence and conservation of the partitioning and global regulation functions in the central control region of the IncP plasmids RK2 and R751. *Microbiology* **143** (Pt 7): 2167-2177.
- Maksimow M, Hakkila K, Karp M & Virta M (2002) Simultaneous detection of bacteria expressing GFP and DsRed genes with a flow cytometer. *Cytometry* **47**: 243-247.
- Mangan S & Alon U (2003) Structure and function of the feed-forward loop network motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 11980-11985.
- Mangan S, Itzkovitz S, Zaslaver A & Alon U (2006) The incoherent feed-forward loop accelerates the response-time of the gal system of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **356**: 1073-1081.
- Mazel D & Davies J (1999) Antibiotic resistance in microbes. *Cell Mol Life Sci* **56**: 742-754.
- Milo R, Itzkovitz S, Kashtan N, *et al.* (2004) Superfamilies of evolved and designed networks. *Science* **303**: 1538-1542.
- Moncalian G, Grandoso G, Llosa M & de la Cruz F (1997) oriT-processing and regulatory roles of TrwA protein in plasmid R388 conjugation. *J Mol Biol* **270**: 188-200.
- Monod J (1949) The growth of bacterial cultures. *Ann. Rev. Microbiol.* **3**: 371-394.
- Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K & Miyawaki A (2002) A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* **20**: 87-90.
- Nedelcu AM, Miles IH, Fagir AM & Karol K (2008) Adaptive eukaryote-to-eukaryote lateral gene transfer: stress-related genes of algal origin in the closest unicellular relatives of animals. *J Evol Biol* **21**: 1852-1860.

- Norberg P, Bergstrom M & Hermansson M (2014) Complete nucleotide sequence and analysis of two conjugative broad host range plasmids from a marine microbial biofilm. *PLoS One* **9**: e92321.
- Normander B, Christensen BB, Molin S & Kroer N (1998) Effect of bacterial distribution and activity on conjugal gene transfer on the phylloplane of the bush bean (*Phaseolus vulgaris*). *Appl Environ Microbiol* **64**: 1902-1909.
- Okumura MS & Kado CI (1992) The region essential for efficient autonomous replication of pSa in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **235**: 55-63.
- Pansegrau W, Lanka E, Barth PT, *et al.* (1994) Complete nucleotide sequence of Birmingham IncP alpha plasmids. Compilation and comparative analysis. *J Mol Biol* **239**: 623-663.
- Paterson ES, More MI, Pillay G, *et al.* (1999) Genetic analysis of the mobilization and leading regions of the IncN plasmids pKM101 and pCU1. *J Bacteriol* **181**: 2572-2583.
- Pattishall KH, Acar J, Burchall JJ, Goldstein FW & Harvey RJ (1977) Two distinct types of trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase specified by R-plasmids of different compatibility groups. *J Biol Chem* **252**: 2319-2323.
- Paulsson J (2002) Multileveled selection on plasmid replication. *Genetics* **161**: 1373-1384.
- Porter J, Deere D, Hardman M, Edwards C & Pickup R (1997) Go with the flow – use of flow cytometry in environmental microbiology. *FEMS Microbiology Ecology* **24**: 93-101.
- Reisner A (2002) In situ studies of conjugative plasmid dissemination in *E. coli* surface communities. Tesis Doctoral. IMBM, Karl-Franzens-Universität Graz. ed.^eds.), p.^pp.
- Rest JS & Mindell DP (2003) Retroids in archaea: phylogeny and lateral origins. *Mol Biol Evol* **20**: 1134-1142.
- Revilla C, Garcillan-Barcia MP, Fernandez-Lopez R, *et al.* (2008) Different pathways to acquiring resistance genes illustrated by the recent evolution of IncW plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 1472-1480.
- Rizzo MA, Springer GH, Granada B & Piston DW (2004) An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat Biotechnol* **22**: 445-449.
- Ronen M, Rosenberg R, Shraiman BI & Alon U (2002) Assigning numbers to the arrows: parameterizing a gene regulation network by using accurate expression kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 10555-10560.
- Santillan M, Mackey MC & Zeron ES (2007) Origin of bistability in the lac Operon. *Biophys J* **92**: 3830-3842.
- Schluter A, Szczepanowski R, Puhler A & Top EM (2007) Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. *FEMS Microbiol Rev* **31**: 449-477.
- Sen D, Brown CJ, Top EM & Sullivan J (2013) Inferring the evolutionary history of IncP-1 plasmids despite incongruence among backbone gene trees. *Mol Biol Evol* **30**: 154-166.

Setty Y, Mayo AE, Surette MG & Alon U (2003) Detailed map of a cis-regulatory input function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 7702-7707.

Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE & Tsien RY (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **22**: 1567-1572.

Shapiro HM (2005) Learning Flow Cytometry. *Practical Flow Cytometry*, ed. ^eds.), p. ^pp. 61-72. John Wiley & Sons, Inc.

Shcherbo D, Souslova EA, Goedhart J, *et al.* (2009) Practical and reliable FRET/FLIM pair of fluorescent proteins. *BMC Biotechnol* **9**: 24.

Shen-Orr SS, Milo R, Mangan S & Alon U (2002) Network motifs in the transcriptional regulation network of *Escherichia coli*. *Nat Genet* **31**: 64-68.

Shinagawa M, Makino S, Hirato T, Ishiguro N & Sato G (1982) Comparison of DNA sequences required for the function of citrate utilization among different citrate utilization plasmids. *J Bacteriol* **151**: 1046-1050.

Shintani M, Sanchez ZK & Kimbara K (2015) Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Front Microbiol* **6**: 242.

Simonsen L, Gordon DM, Stewart FM & Levin BR (1990) Estimating the rate of plasmid transfer: an end-point method. *J Gen Microbiol* **136**: 2319-2325.

Smillie C, Garcillan-Barcia MP, Francia MV, Rocha EP & de la Cruz F (2010) Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**: 434-452.

Suzuki H, Yano H, Brown CJ & Top EM (2010) Predicting plasmid promiscuity based on genomic signature. *J Bacteriol* **192**: 6045-6055.

Tait RC, Kado CI & Rodriguez RL (1983) A comparison of the origin of replication of pSa with R6K. *Mol Gen Genet* **192**: 32-38.

Tena Y (2013) Las proteínas RHH confieren especificidad a la conjugación bacteriana. Tesis Doctoral de la Universidad de Cantabria.

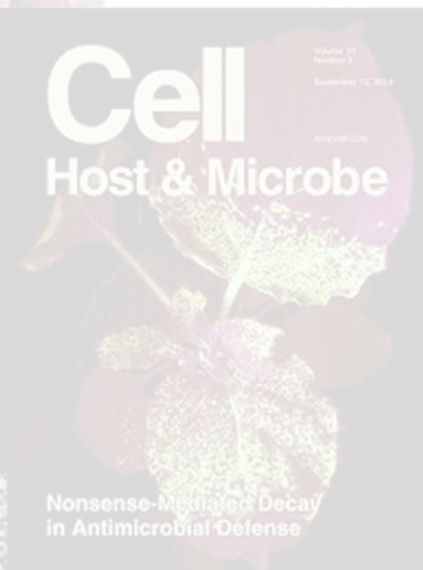
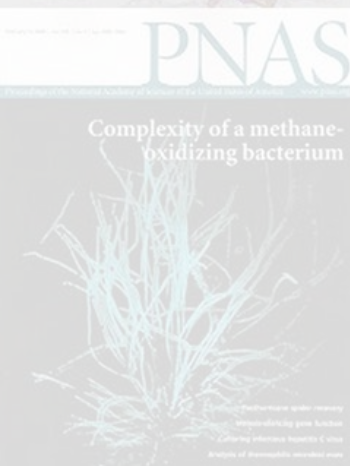
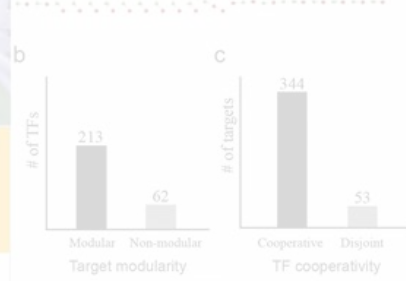
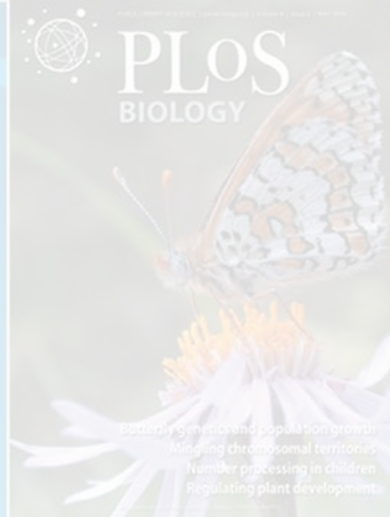
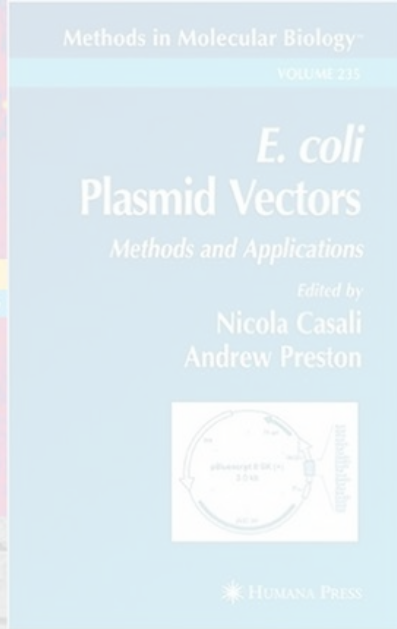
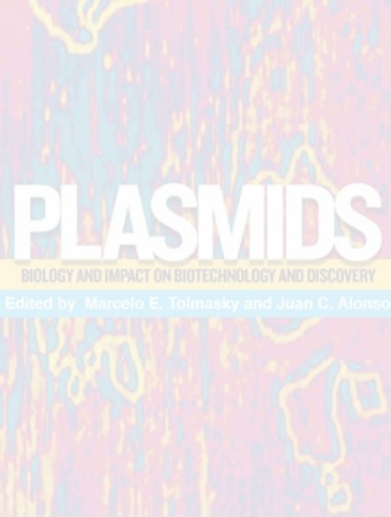
Tettelin H, Riley D, Cattuto C & Medini D (2008) Comparative genomics: the bacterial pan-genome. *Curr Opin Microbiol* **11**: 472-477.

Thomas CM (2006) Transcription regulatory circuits in bacterial plasmids. *Biochem Soc Trans* **34**: 1072-1074.

Tosini F, Venanzi S, Boschi A & Battaglia PA (1998) The *uvp1* gene on the R46 plasmid encodes a resolvase that catalyzes site-specific resolution involving the 5'-conserved segment of the adjacent integron *In1*. *Mol Gen Genet* **258**: 404-411.

Watanabe T (1963) Episome-Mediated Transfer of Drug Resistance in Enterobacteriaceae. Vi. High-Frequency Resistance Transfer System in *Escherichia Coli*. *J Bacteriol* **85**: 788-794.

- Watanabe T, Furuse C & Sakaizumi S (1968) Transduction of various R factors by phage P1 in *Escherichia coli* and by phage P22 in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **96**: 1791-1795.
- Watkins RF & Gray MW (2006) The frequency of eubacterium-to-eukaryote lateral gene transfers shows significant cross-taxa variation within amoebozoa. *J Mol Evol* **63**: 801-814.
- Wilson JW & Figurski DH (2002) Host-specific incompatibility by 9-bp direct repeats indicates a role in the maintenance of broad-host-range plasmid RK2. *Plasmid* **47**: 216-223.
- Yano H, Rogers LM, Knox MG, Heuer H, Smalla K, Brown CJ & Top EM (2013) Host range diversification within the IncP-1 plasmid group. *Microbiology* **159**: 2303-2315.
- Yuh CH, Bolouri H & Davidson EH (1998) Genomic cis-regulatory logic: experimental and computational analysis of a sea urchin gene. *Science* **279**: 1896-1902.
- Zaslaver A, Mayo AE, Rosenberg R, *et al.* (2004) Just-in-time transcription program in metabolic pathways. *Nat Genet* **36**: 486-491.
- Zaslaver A, Bren A, Ronen M, *et al.* (2006) A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*. *Nat Methods* **3**: 623-628.
- Zatyka M, Jagura-Burdzy G & Thomas CM (1994) Regulation of transfer genes of promiscuous IncP alpha plasmid RK2: repression of Tra1 region transcription both by relaxosome proteins and by the Tra2 regulator TrbA. *Microbiology* **140** (Pt 11): 2981-2990.
- Zhong X, Droesch J, Fox R, Top EM & Krone SM (2012) On the meaning and estimation of plasmid transfer rates for surface-associated and well-mixed bacterial populations. *J Theor Biol* **294**: 144-152.
- Ziebuhr W, Ohlsen K, Karch H, Korhonen T & Hacker J (1999) Evolution of bacterial pathogenesis. *Cell Mol Life Sci* **56**: 719-728.
- Zielenkiewicz U & Ceglowski P (2001) Mechanisms of plasmid stable maintenance with special focus on plasmid addiction systems. *Acta Biochim Pol* **48**: 1003-1023.
- Zoueva OP, Iyer VN, Matula TI & Kozlowski M (2003) Analysis of pCU1 replication origins: dependence of oriS on the plasmid-encoded replication initiation protein RepA. *Plasmid* **49**: 152-159.



PUBLICACIONES



Numbers on the edges: A simplified and scalable method for quantifying the Gene Regulation Function

Raul Fernandez-Lopez,^{1,2} Irene del Campo,¹ Raúl Ruiz,¹ Val Lanza,¹ Luis Vielva,³ and Fernando de la Cruz^{1*}

¹Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTec), Universidad de Cantabria-CSIC-IDICAN, Cardenal Herrera Oria s/n, 39011 Santander, Spain

²Department of Systems Biology, Harvard Medical School, 200 Longwood Ave, Boston, MA, USA

³Departamento de Ingeniería de Comunicaciones, Universidad de Cantabria, Avda. de Los Castros, 39005 Santander, Spain

The gene regulation function (GRF) provides an operational description of a promoter behavior as a function of the concentration of one of its transcriptional regulators. Behind this apparently trivial definition lies a central concept in biological control: the GRF provides the input/output relationship of each edge in a transcriptional network, independently from the molecular interactions involved. Here we discuss how existing methods allow direct measurement of the GRF, and how several trade-offs between scalability and accuracy have hindered its application to relatively large networks. We discuss the theoretical and technical requirements for obtaining the GRF. Based on these requirements, we introduce a simplified and easily scalable method that is able to capture the significant parameters of the GRF. The GRF is able to predict the behavior of a simple genetic circuit, illustrating how addressing the quantitative nature of gene regulation substantially increases our comprehension on the mechanisms of gene control.

Keywords: gene regulation function; network parameterization; plasmid regulatory network; transcriptional regulator

Abbreviations: α , growth rate; β , production rate for repressor-free promoter; β_0 , production rate for repressor-bound promoter; 3'-UTR, 3' untranslated region; AFU, arbitrary fluorescent units; ara, arabinose; aTc, anhydrotetracycline; CFP, cyan fluorescent protein; GFP, green fluorescent protein; GRF, gene regulation function; K, dissociation constant; OD, optical density; RBS, ribosome binding site; X, concentration of transcriptional repressor; X_{ss} , concentration of transcriptional repressor at the steady state; Y, product of the target promoter; YFP, yellow fluorescent protein.

Introduction

In their seminal work on adaptation, Jacob and Monod proposed that there are two kinds of genes.⁽¹⁾ The first kind

encodes proteins involved in catalytic or scaffolding activities; these were called structural genes. Genes of the second kind are involved in controlling in what amounts and under what circumstances structural proteins are produced; they were therefore called regulatory genes. Transcriptional regulation was recognized at that time as a core process of cell physiology,⁽²⁾ and has been a central topic of biological research ever since. Our perspective on how transcriptional activity is regulated has changed substantially over the past 60 years.⁽³⁾ Today there are two, apparently paradoxical, research trends on transcriptional control. On the one hand, analysis of transcriptional regulation has become “global”. Originally, transcriptional regulators were thought to control the production of a certain set of proteins in response to a specific stimulus.⁽⁴⁾ Now we know that regulators are interconnected in intricate transcriptional networks,^(5–9) and that the outcomes of these networks to changes in the environment are often complicated to assess. On the other hand, transcriptional control has become “individual.” The original description of the *lac*^{+/–} phenotype consisted of a graph showing how a bacterial population smoothly switched its *lac* phenotype in response to a diauxic shift.⁽¹⁰⁾ This behavior is still referred in textbooks as the canonical example of deterministic control: a culture of *E. coli* grown with glucose and lactose as carbon sources will always exhibit diauxie. However, at the single cell level, a culture of genetically identical cells grown in the same culture medium often exhibits a mixture of *lac*⁺ and *lac*[–] phenotypes, and the transition between them is purely stochastic.⁽¹¹⁾ Transcriptional regulation is therefore a probabilistic process, and this fact has many implications for cell adaptation and differentiation.^(12–14)

Although this situation might seem contradictory, actually it is not: regulatory networks are holistic, but cells within a population show strong individualism, based on the probabilistic nature of control processes. There is a common dimension in both aspects of transcriptional regulation. The final outcome of a regulatory network or stochastic switch within the cell depends not only on which factors are produced

*Correspondence to: Dr. F. de la Cruz, C. Herrera Oria s/n, Santander, Cantabria, 39011 Spain
E-mail: delacruz@unican.es

but also on the amounts of that factor. To understand how cells self-regulate, we need to describe quantitatively the nature of cell responses.⁽¹⁵⁾ While it remains technically challenging to assess how many mRNAs and proteins a cell produces as a response to a certain input,^(16,17) it is feasible to determine how much a promoter activity changes as a consequence of a change in the concentration of its regulators.

The gene regulation function (GRF) indicates the relationship between the intracellular concentration of a given regulator and the transcriptional activity of its target promoter.⁽¹⁸⁾ Ideally, it is a continuous bijective function that renders a certain promoter activity for any given regulator concentration. This function is characteristic for a regulator/promoter pair and each promoter has as many GRFs as the number of transcriptional regulators acting on it. The GRF is an input/output relationship that depends on a number of intermediate biochemical events (regulator oligomerization, binding site searching kinetics, DNA binding, interactions with RNAPol, *etc.*...). Therefore, it can be considered a metafunction: a mathematical abstraction that has no real process counterpart, but represents the convolution of many. This is in fact its main value, since it provides a complete description of the regulator/promoter response space regardless of the underlying mechanism. Disentangling how each intervening molecular process contributes to the final observable GRF is a quintessential problem of transcriptional regulation,⁽¹⁹⁾ and has attracted extensive research efforts. A detailed analysis of the molecular mechanisms of transcriptional regulation is beyond the scope of the present work. We do not discuss how to predict the GRF from our knowledge of each individual molecular step, but instead on how to measure it experimentally. Specifically, we describe how existing methods for accurate expression profiling and controlled protein expression allow a direct inference of the GRF.

The GRF is a powerful tool for systems and synthetic biology. The behavior of a given network depends not only on its topology but also on its parameterization. For relatively

large networks it is usually complicated to measure every relevant biochemical parameter, like dissociation constants or cooperativity indexes. Moreover, it is even more complicated to establish how parameters measured *in vitro* reflect the *in vivo* behavior.⁽²⁰⁾ A systematic method for measuring the GRF simplifies the task of assessing the relevant parameters of a given network, and also provides an *in vivo* framework to interpret *in vitro* results. One of the ultimate goals of synthetic biology is to generate a repertoire of standard biological parts that can be used in the design of higher order devices.⁽²¹⁾ One important set of such parts should be a series of well-characterized transcriptionally regulated promoters.⁽²²⁾ Without a precise description of the response dynamics of each component, the integration of complex devices becomes a trial-and-error instead of a design-based process.

Precise measurement of the GRF: The λ -cascade method

The gold standard for measuring the GRF is the method developed by Rosenfeld *et al.*⁽¹⁸⁾ In this work the authors measured the GRF for the P_R promoter of bacteriophage lambda in response to variations in the concentration of protein *ci*, its transcriptional repressor. Regulator concentration (input) was monitored by translational fusion of gene *ci* to the YFP (yellow fluorescent protein) gene. The transcriptional activity of P_R (output) was determined using a transcriptional fusion with the CFP (cyan fluorescent protein) gene (Fig. 1). The regulator concentration was modulated by making its expression dependent upon an upstream Tet promoter in a *tetR*⁺ background strain. Cells were grown in the presence of anhydrotetracycline to achieve full induction of repressor *ci*. Then the inducer was washed away, so that Tet promoter activity decreased over time to a final off state. Consequently, the levels of *ci*-YFP were shown to decrease analogically due to protein degradation and dilution in growing cells. The

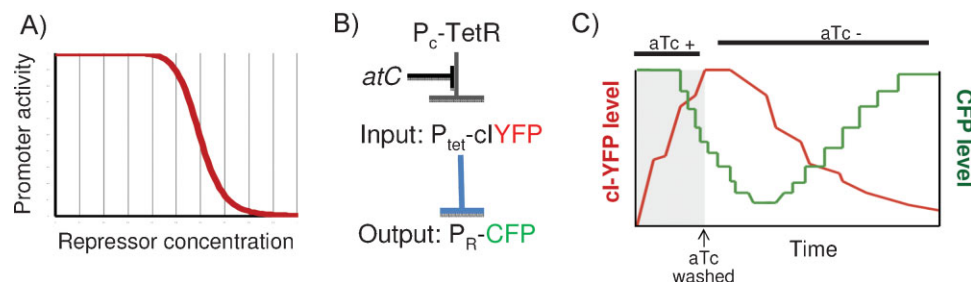


Figure 1. The λ -cascade method developed by Rosenfeld and Alon. **A:** Ideal representation of the GRF. Repressor concentration is decreased analogically (x-axis), and the GFP production rate (y-axis) is measured as an indicator of target promoter transcriptional activity. **B:** Scheme of the λ -cascade regulatory circuit. The transcriptional repressor *ci* is tagged by translational fusion with YFP and expressed from the P_{tet} promoter. TetR (constitutively produced) blocks P_{tet} expression. Repression can be lifted by the action of aTc. The target promoter (P_R) transcriptional activity is tracked by following the CFP fluorescence. **C:** Plot showing *ci*-YFP (red line, regulator) and CFP (green line, target promoter) dynamics in a single cell. The inducer aTc is kept at high concentration for 2 h (gray area) and then washed away (white area). Concentration of *ci* starts to decrease as judged by the decrease in YFP fluorescence. Simultaneously, CFP fluorescence increases. Figure modified from Rosenfeld *et al.*⁽¹⁸⁾

decrease in cl-YFP levels and the subsequent variation of P_R -driven CFP expression were tracked over time for each individual cell by real-time fluorescence microscopy, thus obtaining the GRF for the P_R /cl promoter/regulator pair. The biological meaning of the GRF and its predictive power were demonstrated later,⁽²³⁾ when the behavior of a simple circuit was predicted upon the measurement of the component's GRF. The main advantage of the λ -cascade method was its ability to make single-cell measurements in real time. This allowed an accurate evaluation of the contribution of stochasticity in the dynamics of the system and prevented underestimation of the cooperativity index, a problem that bulk population measurements might cause.⁽¹⁸⁾ As pointed out by the authors, the only caveat was that its applicability to other regulatory systems might be complicated by the refinement of the required measurements.⁽²³⁾ Nevertheless, it served as a powerful proof of concept that it is possible to obtain quantitative models of biological systems with predictive power.

A scalable method for obtaining the GRF: The two-plasmid method

The main obstacle for the applicability of the λ -cascade method is that it requires both extensive genetic manipulation and technically demanding measurements. Regulators need to be translationally fused with fluorescent reporters, which often results in non functional proteins. Quantifying each interaction, even in small networks with a discrete number of arrows, would be challenging. Nevertheless, the λ -cascade method demonstrated that the fundamental bases for resolving the GRF are apparently simple, *i.e.*, the ability to

precisely measure promoter activities over time and to control the induction levels of a given regulator. In this work we illustrate how existing methods can lead to a simplified procedure to measure the GRF. We will show that important trade-offs exist between the exactness of the measurement and the scalability of the procedure. In this respect, the method that we propose here must be considered optimized for scalability, as the λ -cascade is optimized for accuracy. In terms of scalability, the λ -cascade paradigm was complemented by efforts to determine quantitative kinetic parameters using bulk culture measurements in model regulatory networks.⁽²⁴⁾

We propose a variation of the Rosenfeld method, based on a two-plasmid system (one for expressing the regulator and one for measuring the target promoter response) (Fig. 2). The system consists of an arabinose inducible expression vector (the input plasmid) and a GFP reporter plasmid to precisely determine the response in the target promoter (the output plasmid). This method presents two main differences with respect to the original parameterization of the GRF in the λ -cascade system:

- (i) Single-cell measurements are replaced by bulk population averages: This allows the use of simple equipment such as fluorescence plate readers and flow cytometers as measuring instruments, instead of time-lapse microscopy facilities, which are of limited availability. On the other hand, it decreases the precision of the measurement, since the population GRF might show differences to single-cell GRF due to underestimation of cooperativity indexes (see *Trade-offs and limitations in experimental measurements of the GRF* below).
- (ii) Regulator concentrations are estimated, not directly measured: the major handicap for extending the λ -cascade

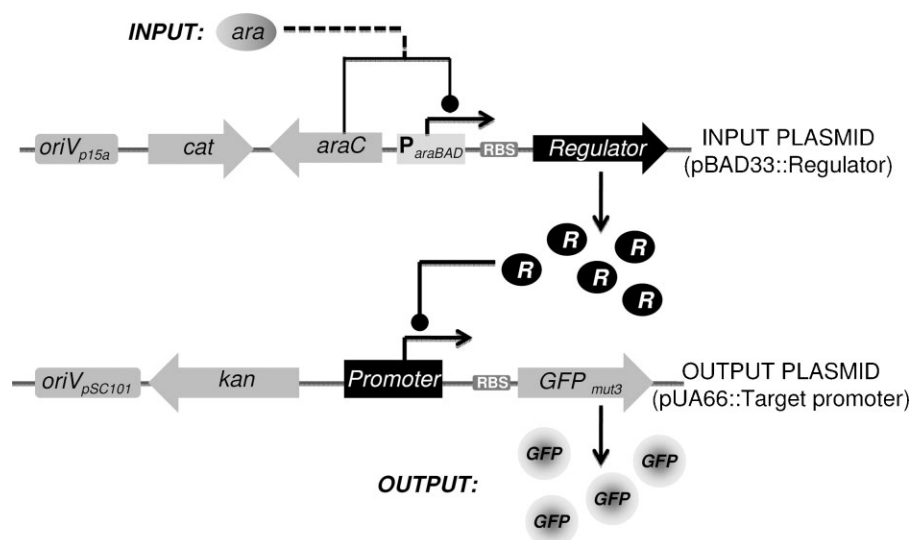


Figure 2. Scheme of the two-plasmid measuring system. The input plasmid consists of an expression vector (pBAD33) in which the desired regulator is cloned under the control of P_{araBAD} promoter (and thus is arabinose inducible). The output plasmid is a pSC101 derivative (pUA66) engineered for analyzing the activity of a given promoter. The target promoter is cloned so that it drives expression of the GFPmut2 gene.

method to the analysis of other regulatory systems is the need for a fluorescent protein/transcriptional regulator translational fusion. Translational fusions often result in non-functional proteins. To overcome this limitation we avoided the direct measurement of the regulator concentration. For this purpose, the regulator gene was cloned under the inducible promoter of the arabinose operon $P_{\text{ARA}}\text{BAD}$. Expression from this promoter is inducible, so increasing concentrations of arabinose in the culture medium produce increasing levels of $P_{\text{ARA}}\text{BAD}$ expression. Regulators were cloned so they always shared a strong consensus ribosomal binding site and a common 3'-UTR. This was intended to minimize differential translational efficiencies when different regulators were cloned. Since it is still possible that post-translational modifications and protein degradation rates have an important effect on regulator concentrations, measurements were made during steady state. Under steady-state conditions an invariant average concentration of regulator can be assumed. Steady-state levels depend on production and degradation rates. These rates are assumed to be independent from each other, at least under a range of non-extreme conditions (e.g., extremely high protein production could saturate the protein degradation machinery). Although degradation rates are unknown, they can be considered constant for a given regulator on a given genetic background. Variation in the steady-state concentration for two different *ara* induction levels therefore depend only on differences in production rates. Since it is possible to measure the response of $P_{\text{ARA}}\text{BAD}$ to increasing *ara* concentrations, changes in the regulator concentration can be inferred. Thus, the two-plasmid method measures relative changes: the regulator concentration is changed in a known proportion and the relative response of the target promoter is then measured.

Measuring the GRF I: Determining promoter activities

The first technical requisite for determining the GRF is to precisely measure promoter activities. An additional requirement for this simplified method is that these measurements must be done during steady state. Fluorescent expression profiling allows tracking promoter activity along time with error levels below 20%, accuracy unmatched by any other transcription estimation technique.^(25–27) Moreover, it measures promoter activities, not RNA concentrations. This makes the technique insensitive to differences in mRNA processing or degradation of the natural transcript, focusing on the rate that is effectively modulated by repressors or activators. Fluorescent expression profiling for bulk *E. coli* cultures follows the general

protocol described in Refs.^(24–26) Promoters are cloned in the pUA66 reporter vector, which contains the GFP-mut2 gene downstream of a strong ribosomal binding site. Fluorescence production and cell growth (OD_{600}) are simultaneously tracked so it is possible to determine the GFP/OD change rate. Since GFP-mut2 is a stable protein, the death rate can be assumed to be caused exclusively by dilution in the growing cells. Under these conditions, promoter activity becomes equivalent to the maximum of the time derivative of GFP levels per OD unit $[(d\text{GFP}/dt)/\text{OD}]$.^(24,25,27) To ensure that promoter activities were measured during steady-state conditions, several modifications were applied to the original procedure (Box 1). Cells were grown for longer times, starting from low OD levels ($\ll 0.01$). This ensures that the culture undergoes a number of replication events that dilute the GFP levels originating from previous growth. Under our conditions, GFP/OD levels reach a plateau in which $d(\text{GFP}/\text{OD})/dt = 0$, indicative of the steady-state regime (Fig. 3A). GFP levels at that point equal, by definition, the production rate divided by

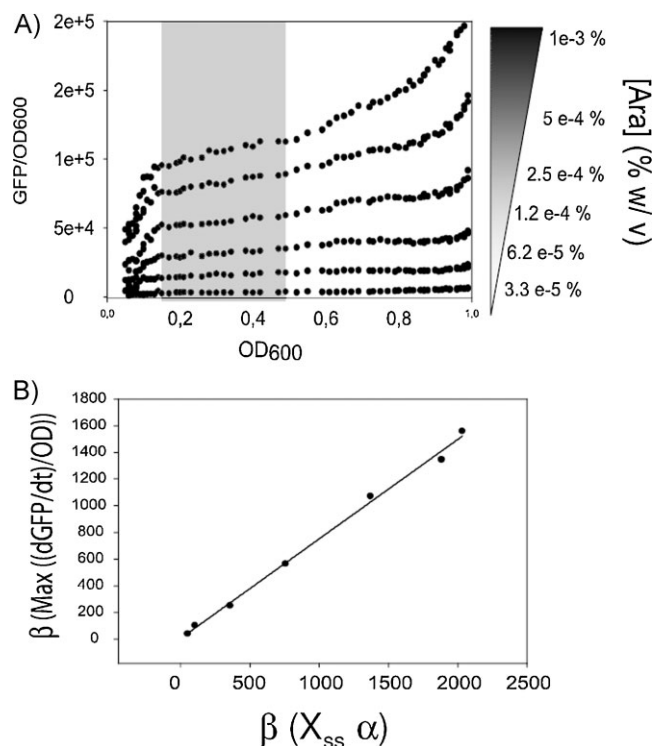


Figure 3. Expression profiling. **A:** Expression profiles of cultures containing pBAD33::GFPmut2 exposed to different arabinose concentrations. Fluorescence levels per OD unit ($\text{GFP}/\text{OD}_{600}$) are plotted against cell growth (OD_{600}). Each dot line represents one arabinose concentration, indicated by the scale at the right of the figure. After several rounds of replication, cells reach steady state (gray box). **B:** Comparison between promoter activities (β) estimated by taking the time derivative of the GFP signal per OD unit [y -axis, $\beta = \text{Max}(d\text{GFP}/dt)/\text{OD}$] plotted against the promoter activities calculated as the product of growth rate by steady-state concentration (x -axis, $\beta = X_{ss}\alpha$). Linear regression yielded an r square value of 0.99 and a slope of 0.79.

the degradation/dilution rate. Since the protein is stable and the dilution rate can be obtained from the OD₆₀₀ growth curves, promoter activities can thus be directly estimated:

$$\frac{d\left(\frac{\text{GFP}}{\text{OD}}\right)}{dt} = \beta - \alpha \left(\frac{\text{GFP}}{\text{OD}}\right) \quad (1.1)$$

$$\left\{ \frac{d\left(\frac{\text{GFP}}{\text{OD}}\right)}{dt} \right\}_{ss} = \beta - \alpha \left(\frac{\text{GFP}}{\text{OD}}\right)_{ss} = 0 \quad (1.2)$$

$$\beta = \alpha \left(\frac{\text{GFP}}{\text{OD}}\right)_{ss}$$

where GFP are the fluorescence levels, β the production rate per OD unit, and α the growth rate. This method yields promoter activities equivalent to those described in Refs. ^(24,25,27) (Fig. 3B). The advantage is that, since the steady-state phase can be monitored precisely, many data points can be averaged to estimate steady-state levels more precisely. The reproducibility of these measurements in different experiments was better than SD < 15%.

Box 1:

Experimental protocol for expression profiling

Step 1: Cell growth

Reporter strains were inoculated in M9 Medium plus kanamycin (25 mg/mL), casaminoacids (0.2%) and glycerol (0.5%). Cells were grown for 16 h, at 37°C with vigorous aeration.

Step 2: Measurement

Cultures were diluted 1:10 000 in the same medium in 96-well plates and incubated in a Victor3 fluorimeter at 37°C with orbital shaking for about 6 h. Fluorescence and absorbance were determined for each well every 5 min. To counterbalance evaporation, water was injected after each three steps of fluorescence and absorbance measurement. Water evaporated in the Victor3 multiplate reader at 37°C was 0.28 μ L/min/well.

Step 3: Data processing

Absorbance data points had background (data obtained from culture medium with no cells) subtracted. Absorbance values were transformed into OD₆₀₀ equivalents using a calibrated curve between Victor 3 readouts and a regular spectrophotometer (width 1 cm). Fluorescence background was obtained from cells containing the promoter-less plasmid pUA66. Fluorescence background was subtracted from the values obtained for the reporter strains at the same OD₆₀₀ (not necessarily at the same time points). Growth rate (α) was calculated from the OD₆₀₀ data. Fluorescence/OD₆₀₀ was plotted against OD₆₀₀ and the steady-state level was obtained by averaging values during the steady-state.

Measuring the GRF II: Inducing the regulator

The second technical challenge was to induce expression of the transcriptional regulator in a controlled and measurable way. This was achieved by cloning the regulator under the control of an inducible promoter. However, not every inducible promoter is suitable for this purpose. Population measurements of dose/response curves for inducible promoters yield an apparently continuous curve, indicative of an analogical increase in the output as the inducer concentration increases. However, in many cases these curves do not reflect the single-cell dynamics, and the apparent analogical behavior is the product of the averaging of different proportions of cells being either in on or in off state. ⁽²⁸⁾ This is a relevant issue for promoters that respond to a certain chemical modulator (an inducer or a corepressor). On many occasions the intracellular concentration of the modulator is dependent on active transport and the transporter is often activated by the transported metabolite. Transporter activation creates a positive feedback loop that drives system bi-stability. ⁽²⁹⁾ To overcome this issue, we took advantage of the engineered P_{ARA}BAD system developed by Keasling and coworkers, which uses an *E. coli* strain (BW27783) that constitutively expresses *araE*, the arabinose transporter. ⁽³⁰⁾ The P_{ARA}BAD promoter can be induced by adding different concentrations of arabinose to the growing medium. Since the transporter is no longer under the control of the transported metabolite, the positive feedback is broken. The quasi-analogical dynamics of this system was confirmed by measuring the expression levels of *E. coli* BW27783 bearing a P_{ARA}BAD::GFP transcriptional fusion by flow cytometry (Fig. 4A). As shown in Fig. 4, the whole population displaces along the X-axis as the *ara* concentration is increased. The population response to increasing *ara* concentrations was measured by expression profiling as indicated in the previous section. Results are shown in Fig. 3B. P_{ARA}BAD::GFP fluorescence values were plotted against the corresponding *ara* concentrations (Fig. 4B). Data were fitted to a Michaelis–Menten function ($R^2 = 0.99$), thus obtaining an expression that infers the P_{ARA}BAD expression level as a function of the arabinose concentration. When a transcriptional regulator is cloned in the pBAD33 vector under expression of P_{ARA}BAD, relative changes in steady-state concentrations can be inferred according to the standard curve obtained for the GFP.

Mathematical framework for determining the GRF

Since the GRF is a metafunction that does not represent a single process, different levels of abstraction can be applied to

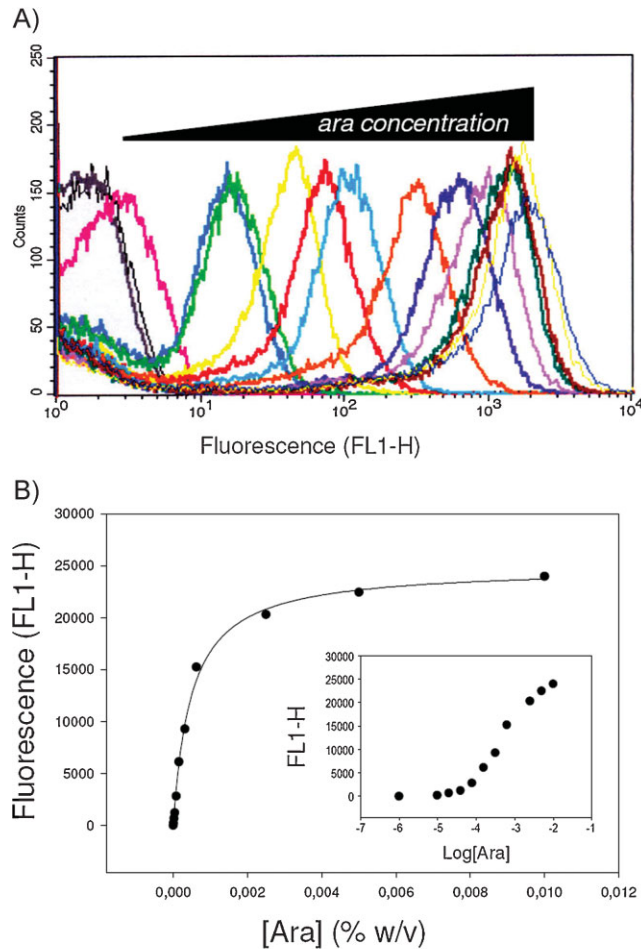


Figure 4. Response of the input plasmid to arabinose induction. **A:** Fluorescence distributions (x-axis indicates fluorescence, y-axis indicates cell number) obtained by flow cytometry analysis of a culture of *E. coli* BW27783 containing pBAD33::GFPmut2. Each color indicates a different arabinose concentration. **B:** Median fluorescence values obtained from the distributions shown above plotted against the Ara concentration used (in % w/v). Inner chart: arabinose concentrations indicated in log scale (% w/v).

obtain the significant parameters that conform it. The simplest model that, in our hands, successfully captured the GRF dynamics is illustrated in Fig. 5. Three assumptions were made to implement the model: constant growth rate (cells are in steady-state exponential growth), separation of timescales (protein binding to operators and promoters is much faster than transcription), and an invariant relationship between mRNA and protein production (since proteins are translated from the same RBS and 3'-UTR).

Under these assumptions, the dynamics of the product of the target promoter (*Y*) response to the concentration of

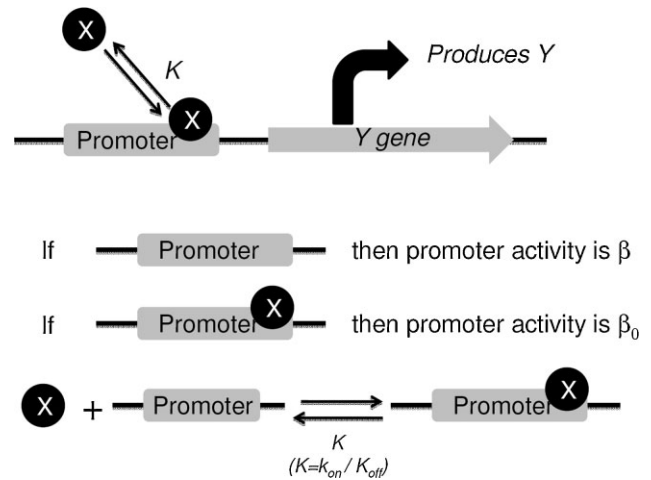


Figure 5. Model for repressor-promoter binding. Reporter gene *Y* production is assumed to be a one-step process with birth rate β or β_0 depending on the occupancy of the promoter. Binding of repressor *X* to its target promoter is considered to be in equilibrium, with dissociation constant K .

transcriptional repressor (*X*) follows:

$$\frac{dY}{dt} = \beta \underbrace{\frac{K}{K+X}}_{\substack{\text{X free} \\ \text{promoter} \\ \text{fraction}}} + \beta_0 \underbrace{\frac{X}{K+X}}_{\substack{\text{X bound} \\ \text{promoter} \\ \text{fraction}}} - \alpha Y \quad (2.1)$$

where β and β_0 correspond respectively to the activity rates for repressor-free and repressor-bound promoters, K stands for the dissociation constant and α indicates the growth rate of the culture. In steady state ($dY/dt = 0$):

$$Y_{ss} = \frac{\beta K + \beta_0 X_{ss}}{\alpha(K + X_{ss})} \quad (2.2)$$

If the concentration goes to zero, *Y* reaches a maximum

$$Y_{\max}(x) = Y_{(x \rightarrow 0)} = \frac{\beta K}{\alpha K} = \frac{\beta}{\alpha} \quad (2.3)$$

If the concentration of repressor is sufficiently high, *Y* reaches a minimum

$$Y_{\min}(x) = Y_{(x \rightarrow \infty)} = \frac{\beta_0 X_{ss}}{\alpha X_{ss}} = \frac{\beta_0}{\alpha} \quad (2.4)$$

$$\begin{cases} \beta K + \beta_0 X_{ss} \approx \beta_0 X_{ss}; & \beta_0 X_{ss} \gg \beta K \\ \alpha(K + X_{ss}) \approx \alpha X_{ss}; & X_{ss} \gg K \end{cases}$$

We define R as the regulatory rank of a given promoter Y for a given repressor X :

$$R_Y^X = \frac{Y_{\max}(X)}{Y_{\min}(X)} \quad (2.5)$$

This parameter is promoter/repressor dependent, and indicates the expression space that a certain repressor can produce when acting upon a target promoter. Therefore, a given promoter with two repressors will show different R values depending on the ability of each repressor to interfere with transcription initiation.

Introducing $Y_{\max} = \beta/\alpha$ and $Y_{\min} = \beta_0/\alpha$ into Eq. (2.2) we obtain

$$Y_{SS} = \frac{Y_{\max}K + Y_{\min}X_{SS}}{K + X_{SS}} \quad (2.6)$$

This expression indicates how the target promoter Y responds to changes in the repressor X and therefore can be considered directly proportional to the GRF. However, it is probably easier to interpret the relative change of Y from its $Y_{\max}$ levels for each X concentration; this expression also renders a dimensionless value. The transformation follows:

$$\frac{Y_{SS}}{Y_{\max}} = \frac{K + Y_{\min}/Y_{\max} X_{SS}}{K + X_{SS}} \quad (2.7)$$

$$\frac{Y_{\max}}{Y_{SS}} = \frac{K + X_{SS}}{K + (X_{SS}/R_Y^X)} \quad (2.8)$$

This expression is fairly intuitive: given an X concentration of repressor, the target promoter is $Y_{\max}/Y$ times repressed. Parameters $Y_{\max}$ and $Y_{\min}$ (and therefore R) can be experimentally measured. For measuring $Y_{\max}$ the promoter activity is determined in a regulator-defective genetic background. $Y_{\min}$ can in turn be measured by inducing the regulator expression to maximal levels [so $X/(X+K) \rightarrow 1$]. For this model to work, $Y_{\min}$ must be attained within the experimental rank of concentrations of X . Although the former expression was derived for the case of a transcriptional repressor, the derivation for a transcriptional activator is trivial taking into consideration that:

$$Y_{\min}(X) = Y_{(X=0)} = \frac{\beta K}{\alpha K} = \beta/\alpha$$

$$Y_{\max}(X) = Y_{(X=\infty)} = \beta_0/\alpha$$

The former expressions assume a unique binding event of the regulator to the promoter. For the more general case in which n regulator molecules bind the promoter, we can use the Hill approximation to say that the product of n different dissociation constants ($K_1 K_2 K_3 \dots K_n$) can be made equal to a

general constant K to the power of n (K^n). Therefore, the generalized expression follows:

$$\frac{Y_{\max}}{Y_{SS}} = \frac{K^n + X_{SS}^n}{K^n + (X_{SS}^n/R_Y^X)} \quad (2.9)$$

It should be noticed that a value of $n > 1$ in the GRF does not imply that the number of binding events is precisely n . It only indicates, as in the Hill function, the apparent cooperativity grade in the final observable dynamics.

A case study: Determining the GRF for the transcriptional repressor KorA

To demonstrate the validity of the two-plasmid method, we obtained the GRF for KorA, a transcriptional repressor from the broad host range plasmid R388.⁽³¹⁾ KorA is the major transcriptional modulator for the conjugative mating system, a multiprotein secretion system that mediates DNA transfer during plasmid conjugation.⁽³²⁾ KorA represses four promoters in the plasmid, binding to a conserved sequence called the KorA box. KorA controls its own expression, therefore establishing a negative feedback loop.⁽³²⁾ We analyzed the GRF of KorA on its own promoter (P_{KorA}) using the procedures described above. Briefly, *korA* gene was PCR-amplified and cloned in expression vector pBAD33, under the control of P_{ARABAD} promoter. To monitor P_{KorA} expression levels, the promoter was PCR-amplified and cloned in the reporter vector pUA66. Maximal P_{KorA} promoter activity ($Y_{\max}$) was measured by expression profiling of *E. coli* BW27783 containing pUA66:: P_{KorA} , thus measuring the promoter activity in absence of its cognate regulator. Minimal P_{KorA} promoter activity ($Y_{\min}$) was measured by introducing pBAD33::KorA and inducing KorA expression at saturating concentrations of arabinose. Saturating concentrations were attained at 3.5E-5% w/v. Higher *ara* concentrations impaired cell growth (data not shown). P_{KorA} expression levels (Y) were measured as indicated in Box 1 under different concentrations of arabinose. KorA levels were estimated by running in parallel a set of *E. coli* BW27783 cultures containing pBAD33::GFP-*mut2* subjected to the same *ara* concentrations. $Y_{\max}/Y$ levels were plotted against estimated concentrations of KorA (X) expressed in GFP fluorescence equivalents (Fig. 6A), and data were adjusted to Eq. (2.9) using the Levenberg–Marquardt algorithm for non-linear regression. Regression yielded $K = 22 \pm 10$ arbitrary fluorescent units (AFU). The regulatory rank was $R = 33$, indicating that KorA was able to repress P_{KorA} 33-fold from its native promoter activity. This value was in accordance to the experimental determination of R ($Y_{\max}/Y_{\min}$). The cooperativity index was $n = 1.3 \pm 0.4$, indicating a slight cooperative effect of KorA in P_{KorA}

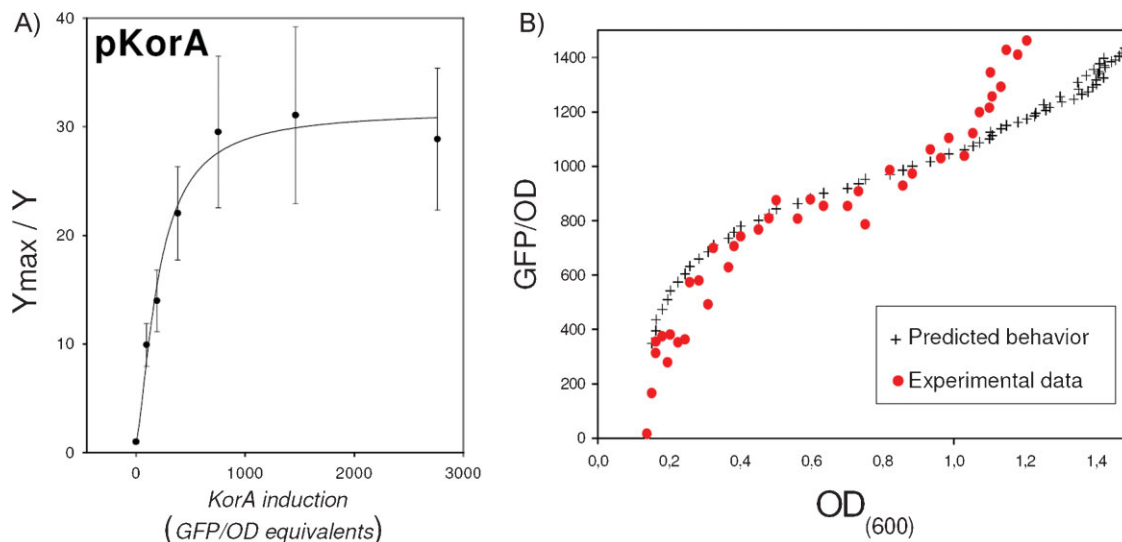


Figure 6. Measurement and performance of the GRF for KorA regulator acting on P_{korA} promoter. **A:** Repression ratio ($Y_{\max}/Y$) of P_{korA} promoter (y-axis) as a function of apparent KorA repressor concentration (x-axis). KorA concentrations is modified by inducing pBAD33::korA with different levels of arabinose, and apparent KorA concentrations are calculated from calibrating curves (pBAD33::GFP) obtained in parallel. Maximal steady-state fluorescence level achieved by P_{korA} promoter ($Y_{\max}$, $[\text{KorA}] = 0$) is divided by steady-state fluorescence levels achieved by P_{korA} (Y), and plotted in ordinates. Error bars indicate the standard deviation of eight independent experiments. Data were fitted to Eq. (2.9) with $R^2 = 0.98$. **B:** A comparison between the predicted behavior of P_{korA} -KorA feedback loop (black crosses) with an experimental measurement of P_{korA} -KorA dynamics (red dots). Experimental measurements were done in *E. coli* BW27783 cultures containing plasmid R388 (that contributes the P_{korA} -KorA feedback loop) and pUA66: P_{korA} -GFP (reporter plasmid that infers P_{korA} expression levels). Predicted dynamics were obtained from Eq. (2.1) using GFP/OD measured at $\text{OD}_{600} = 0.2$ as initial X value. All parameters in the simulation were determined experimentally [K and n obtained from data from (A), growth rate (α) obtained from growth curve and production rates β and β_0 obtained from expression profiles without KorA and at maximal KorA concentration, respectively].

transcriptional activity. The R^2 value of the adjusted curve was $R^2 = 0.980$.

To check the predictive power of the KorA/ P_{korA} GRF we simulated the time behavior of the negative feedback loop. We measured the behavior of this feedback loop experimentally by introducing plasmid R388 (that carries KorA under P_{korA} expression) into an *E. coli* BW27783 strain containing also pUA66:: P_{korA} and profiling the expression levels along time. We fed the computational simulation with the initial fluorescence value experimentally obtained at $\text{OD}_{600} = 0.2$. We then compared how the theoretical prediction and the experimental measurement behave as the culture grew (Fig. 6B). The OD_{600} start point was chosen because fluorescence values for $\text{OD}_{600} < 0.2$ were found to be extremely noisy. As shown in the figure, the computational prediction based on the measured GRF follows the dynamics of the experimental data until the cell culture enters stationary phase ($\text{OD}_{600} = 1$). At this point both curves separate sharply, indicating that the GRF performs well as a dynamical predictor for cells in constant growth but not in stationary cultures. This was to be expected since one of the assumptions of our model was that cells were in exponential growth.

Trade-offs and limitations in experimental measurements of the GRF

As we have shown, the two-plasmid method is able to extract sufficient information to determine the GRF using simple measurement techniques and a basic mathematical treatment. It is based on two previously reported experimental procedures^(25,30) and might be useful for systematic parameterization of relatively large networks. However, as stated above, several caveats should be taken into consideration when applying this method. The fundamental one refers to bulk averaging in contrast with single-cell measurements. Cell heterogeneity is a possible source of conflict: population measurements tend to underestimate cooperativity indexes due to convolution of the regulator concentration distribution and the promoter response.⁽³³⁾ The two-plasmid method alleviates this problem using an induction system that exhibits a unimodal distribution (Fig. 4A). However, since both regulator concentration and promoter activity distributions are averaged, the method will still underestimate the steepness of the curve. To overcome this problem, a simultaneous measurement at the single-cell level of both regulator concentration and promoter activity must be carried

out. Flow cytometry can determine both distributions if the transcriptional regulator and target promoter are tagged with fluorescent proteins with enough spectral separation and similar maturation timescales. However, due to the small size and bacillary shape of *E. coli*, this technique is unsuitable for assessing bacterial size. As a consequence flow cytometry retrieves a convoluted distribution of ill-defined cell sizes and fluorescence values. If a higher level of accuracy is desired, measurements can be made by fluorescence microscopy, which would render an equivalent procedure to the λ -cascade method. Scalability and precision in the measurement are therefore inversely related. According to the size of the network and the level of refinement needed, the researcher will have to decide which method to use. In that respect, further research is needed to assess the comparative performances of both methods.

Common to any GRF determination method is the need for a regulator-defective genetic background. In the λ -cascade, the authors used a phage protein so the host bacteria were naturally *cl*⁻.⁽¹⁸⁾ Similarly, we have used a plasmid-borne regulator, so the host strain is naturally KorA defective. If one wants to determine the GRF for a chromosomally encoded regulator, a knockout background is always needed, since the full possible range of regulator concentrations must be sampled. If the two-plasmid method described here were to be used, this mutation must be introduced into the *E. coli* BW27783 strain, since this genetic background is needed for appropriate induction of the P_{ara}BAD promoter.⁽³⁰⁾ For that purpose, extensive knockout libraries that allow P1 transduction, like the Keio collection,⁽³⁴⁾ can be used.

Conclusions and prospects

Despite its abstract nature, the GRF has proven predictive power.⁽²³⁾ Although we have focused on methods used for estimating the GRF in prokaryotes, similar approaches have been successfully employed in eukaryotes, where chromatin remodeling was found to be an essential player determining the GRF.⁽³⁵⁾ These results illustrate the possibility of calculating the output of a certain regulatory network if we know the transfer functions of its individual components.

Besides being a powerful tool for network analysis, the GRF opens the possibility to analyze a burning question in synthetic biology: How do promoters integrate the action of two or more regulators? It might happen that the signals deployed from two different transcription factors to the same target promoter act independently from each other, so the final function can be calculated as the sum of the individual contributions. This is usually referred to as orthogonality between two inputs. It is also possible that both regulators

display mutual interactions, so the function of regulators A and B is not equal to the sum of their independent GRFs. Since the GRF is a function, and function orthogonality is strictly defined, it can be used to test for this principle. It has been demonstrated that the multiple input functions for sugar metabolism in *E. coli* can sometimes be separated,⁽³⁶⁾ so it seems that, at least in some cases, biological control systems are orthogonal. The circumstances and the kinds of promoter architectures with which orthogonality in the GRF is allowed still need to be elucidated.

Parameterizing global regulatory networks is a formidable task, and massive parallel efforts are needed. In that sense, the development of a standard unit system for promoter activities is urgently needed so that results obtained by different methods and in different laboratories can be compared. Efforts are being made to obtain absolute scales based on the effective counting of mRNAs and proteins,⁽¹⁷⁾ and to establish a set of reference promoters.⁽³⁷⁾ Developing standard scales would be useful for Systems Biology and is probably essential for the development of standardized parts in synthetic biology. It is difficult to envisage how a new engineering discipline can be founded without an operational metric system.

Another crucial question is to determine what forces shape the GRF. Cost-benefit theory for the GRF identifies three distinguishable levels of selection: efficiency, economy, and noise adaptation.⁽³⁸⁾ Efficiency indicates the ability of the GRF to sense and respond in an appropriate timescale to changes in the input. Economy refers to the ability to produce responses only when the benefits for the bacterial fitness exceed the cost of producing the response. Noise adaptation indicates the capacity of the GRF to suppress or enhance cell-to-cell variation to achieve efficient and economic responses. Interestingly, there are severe trade-offs between these three levels.⁽³⁸⁾ As an example, a strict GRF with a high cooperativity index would be efficient (the cell would respond according to a certain threshold) and economic (no suboptimal responses under the threshold), but it would be extremely vulnerable to input noise, since noise transmission increases linearly with cooperativity indexes.⁽³⁸⁾ Network topology comes to play at this point, since network motifs such as negative feedback and feed-forward loops can decrease noise.^(38–40) In other cases, in which input fluctuations are fast or undetectable (so the cell has to rely on “blind” decisions), noise in gene expression can not be deleterious but beneficial.⁽⁴¹⁾ Selective landscapes will be the ultimate force shaping the GRF,⁽³⁸⁾ a function in which topological properties, noise in gene expression, and response time requirements concur. Therefore, the GRF exceeds any utilitarian view for design purposes: it is the keystone of gene regulation. It establishes how inputs and outputs are computed by the cell, and how these responses are modified and evolve by environmental constraints.

Acknowledgments: Work in the FdIC laboratory was supported by grants BFU2008-00995/BMC (Spanish Ministry of Education), RD06/0008/1012 (RETICS research network, Instituto de Salud Carlos III, Spanish Ministry of Health) and LSHM-CT-2005_019023 (European VI Framework Program).

References

- Jacob F, Monod J. 1959. Genes of structure and genes of regulation in the biosynthesis of proteins. *C R Hebd Seances Acad Sci* **249**: 1282–4.
- Umbarger HE. 1964. Intracellular regulatory mechanisms: regulation in multicellular forms may be an elaboration upon the pattern evolved in microorganisms. *Science* **145**: 674–9.
- Balleza E, Lopez-Bojorquez LN, Martinez-Antonio A, et al. 2009. Regulation by transcription factors in bacteria: beyond description. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 133–51.
- Stent GS. 1964. The Operon: on its third anniversary. Modulation of transfer RNA species can provide a workable model of an operator-less operon. *Science* **144**: 816–20.
- Shen-Orr SS, Milo R, Mangan S, et al. 2002. Network motifs in the transcriptional regulation network of *Escherichia coli*. *Nat Genet* **31**: 64–8.
- Ihmels J, Friedlander G, Bergmann S, et al. 2002. Revealing modular organization in the yeast transcriptional network. *Nat Genet* **31**: 370–7.
- Kashtan N, Itzkovitz S, Milo R, et al. 2004. Topological generalizations of network motifs. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **70**: 031909.
- Madan Babu M, Teichmann SA. 2003. Evolution of transcription factors and the gene regulatory network in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **31**: 1234–44.
- Gutierrez-Rios RM, Rosenblueth DA, Loza JA, et al. 2003. Regulatory network of *Escherichia coli*: consistency between literature knowledge and microarray profiles. *Genome Res* **13**: 2435–43.
- Jacob F, Monod J. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* **3**: 318–56.
- Choi PJ, Cai L, Frieda K, et al. 2008. A stochastic single-molecule event triggers phenotype switching of a bacterial cell. *Science* **322**: 442–6.
- Paulsson J. 2004. Summing up the noise in gene networks. *Nature* **427**: 415–8.
- Elowitz MB, Levine AJ, Siggia ED, et al. 2002. Stochastic gene expression in a single cell. *Science* **297**: 1183–6.
- Suel GM, Garcia-Ojalvo J, Liberman LM, et al. 2006. An excitable gene regulatory circuit induces transient cellular differentiation. *Nature* **440**: 545–50.
- Kim HD, Shay T, O'Shea EK, et al. 2009. Transcriptional regulatory circuits: predicting numbers from alphabets. *Science* **325**: 429–32.
- Raj A, van Oudenaarden A. 2009. Single-molecule approaches to stochastic gene expression. *Annu Rev Biophys* **38**: 255–70.
- Golding I, Paulsson J, Zawilski SM, et al. 2005. Real-time kinetics of gene activity in individual bacteria. *Cell* **123**: 1025–36.
- Rosenfeld N, Young JW, Alon U, et al. 2005. Gene regulation at the single-cell level. *Science* **307**: 1962–5.
- Segal E, Widom J. 2009. From DNA sequence to transcriptional behaviour: a quantitative approach. *Nat Rev Genet* **10**: 443–56.
- Cases I, de Lorenzo V. 2005. Promoters in the environment: transcriptional regulation in its natural context. *Nat Rev Microbiol* **3**: 105–18.
- Endy D. 2005. Foundations for engineering biology. *Nature* **438**: 449–53.
- Hasty J, McMillen D, Collins JJ. 2002. Engineered gene circuits. *Nature* **420**: 224–30.
- Rosenfeld N, Young JW, Alon U, et al. 2007. Accurate prediction of gene feedback circuit behavior from component properties. *Mol Syst Biol* **3**: 143.
- Ronen M, Rosenberg R, Shraiman BI, et al. 2002. Assigning numbers to the arrows: parameterizing a gene regulation network by using accurate expression kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 10555–60.
- Zaslaver A, Bren A, Ronen M, et al. 2006. A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*. *Nat Methods* **3**: 623–8.
- Kalir S, McClure J, Pabbaraju K, et al. 2001. Ordering genes in a flagella pathway by analysis of expression kinetics from living bacteria. *Science* **292**: 2080–3.
- Setty Y, Mayo AE, Surette MG, et al. 2003. Detailed map of a *cis*-regulatory input function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 7702–7.
- Ozbudak EM, Thattai M, Lim HN, et al. 2004. Multistability in the lactose utilization network of *Escherichia coli*. *Nature* **427**: 737–40.
- Santillan M, Mackey MC, Zeron ES. 2007. Origin of bistability in the lac Operon. *Biophys J* **92**: 3830–42.
- Khlebnikov A, Datsenko KA, Skaug T, et al. 2001. Homogeneous expression of the P(BAD) promoter in *Escherichia coli* by constitutive expression of the low-affinity high-capacity AraE transporter. *Microbiology* **147**: 3241–7.
- Fernandez-Lopez R, Garcillan-Barcia MP, Revilla C, et al. 2006. Dynamics of the IncW genetic backbone imply general trends in conjugative plasmid evolution. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 942–66.
- Seubert A, Hiestand R, de la Cruz F, et al. 2003. A bacterial conjugation machinery recruited for pathogenesis. *Mol Microbiol* **49**: 1253–66.
- Cluzel P, Surette M, Leibler S. 2000. An ultrasensitive bacterial motor revealed by monitoring signaling proteins in single cells. *Science* **287**: 1652–5.
- Baba T, Ara T, Hasegawa M, et al. 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* **2**: 2006 0008.
- Kim HD, O'Shea EK. 2008. A quantitative model of transcription factor-activated gene expression. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 1192–8.
- Kaplan S, Bren A, Zaslaver A, et al. 2008. Diverse two-dimensional input functions control bacterial sugar genes. *Mol Cell* **29**: 786–92.
- Kelly JR, Rubin AJ, Davis JH, et al. 2009. Measuring the activity of BioBrick promoters using an *in vivo* reference standard. *J Biol Eng* **3**: 4.
- Kalisky T, Dekel E, Alon U. 2007. Cost-benefit theory and optimal design of gene regulation functions. *Phys Biol* **4**: 229–45.
- Becskei A, Serrano L. 2000. Engineering stability in gene networks by autoregulation. *Nature* **405**: 590–3.
- Paulsson J, Ehrenberg M. 2001. Noise in a minimal regulatory network: plasmid copy number control. *Q Rev Biophys* **34**: 1–59.
- Wolf DM, Vazirani VV, Arkin AP. 2005. Diversity in times of adversity: probabilistic strategies in microbial survival games. *J Theor Biol* **234**: 227–53.



Determination of conjugation rates on solid surfaces

Irene del Campo^a, Raúl Ruiz^a, Ana Cuevas^a, Carlos Revilla^a, Luis Vielva^b, Fernando de la Cruz^{a,*}

^a Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTec), Universidad de Cantabria-CSIC-IDICAN, Cardenal Herrera Oria s/n, 39011 Santander, Spain

^b Departamento de Ingeniería de Comunicaciones, Universidad de Cantabria, Avda. de Los Castros, 39005 Santander, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 December 2011

Accepted 5 January 2012

Available online 24 January 2012

Communicated by Dr. Dhruba K. Chattoraj

Keywords:

Bacterial conjugation

Surface mating

Flow-cytometer

GFP

Conjugation rate

ABSTRACT

A cytometric method for the estimation of end-point conjugation rates is developed and adapted to surface conjugation. This method improves the through-put of conjugation assays based on replica-plating and results in less noisy experimental data. Although conjugation on solid surfaces deviates from ideal conditions in which cells are continuously mixed, results show that, within the limits of high initial population densities and short mating times, end-point estimates of the conjugation rates are robust measurements. They are independent of the donor/recipient ratios and, to some extent, of the sampling time. Remixing the mating population in the course of a conjugation experiment results in a boost in the frequency of transconjugants.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Conjugation is a mechanism of DNA transfer among bacteria (de la Cruz et al., 2010; Smillie et al., 2010). It is one of the main forces contributing to shape bacterial genomes (de la Cruz and Davies, 2000). Perhaps more importantly, it is responsible for the rapid spread of antibiotic resistance (AbR) among human bacterial pathogens. In fact, the mortality rate of patients afflicted with infectious diseases has shown a steady increase during the last years (Boucher et al., 2009). Analyses of the mobile platforms (plasmids, bacteriophages, transposons, etc.) that operate in bacterial populations, and the fluxes of AbR genes within them, requires precise quantitative determination of conjugation rates (Levin et al., 1997). These quantitative data will provide essential parameters for the development of mathematical models to explain AbR dissemination among bacterial populations and the effect of conjugation on the spread of AbR (Garcillan-Barcia et al., 2011). This knowledge, in turn, could suggest strategies to control the spread of AbR to human pathogens by using specifically designed drugs (Baquero et al., 2011).

Different approaches have been used to determine the efficiency of plasmid transfer. The most widely used indicator is the transfer frequency, that is, the ratio of the number of transconjugants (T) to either the number of donors (D) or of recipients (R). In an aim to establish a universal parameter of transfer rate, independent of the experimental procedure involved, Levin et al. (1979) described a method to estimate the rate constant of conjugative transfer. That work demonstrated that, in an ideal setting, conjugation dynamics fits a simple mass action model. In its simplest realization, a bacterial chemostat, a conjugation rate (γ) could be defined, if some assumptions were made: matings are random events between cells in suspension; there is no loss of plasmids by segregation; newly formed transconjugants act like donors immediately; and every cell has the same growth rate. Simonsen et al. (1990) adapted this model to describe plasmid transfer in batch culture. Importantly, the end-point method for estimating transfer rates is ideal because it is insensitive to initial cell density, initial D/R ratio and mating time (see Simonsen, 1990 for a more detailed analysis). The end-point estimate of the conjugation rate is given by the equation:

$$\gamma_{\text{ep}} = \psi_{\text{max}}(N - N_0)^{-1} \ln \left(1 + \frac{T \cdot N}{D \cdot R} \right) \quad (1)$$

* Corresponding author. Fax: +34 942 201945.

E-mail address: delacruz@unican.es (F. de la Cruz).

Table 1
Plasmids.

Plasmid	Replicon	Marker	Description	Reference
pAP711 Δ oriT::tet	R388	Gm, Tc	Non-mobilizable R388 derivative in which <i>oriT</i> was deleted and substituted by <i>tetA</i> (coding for TcR)	Demarre et al. (2005)
pGP12 ^a	pSC101	Km	Derivative of plasmid pUA66 that contains R388_oriT with its promoter <i>PstbA</i> controlling <i>gfp-mut2</i> expression	This work
pROD17	ColE1	Ap Km	Plasmid containing <i>mCherry</i> gene (Shaner et al., 2004) under <i>Plac</i> control	Gift of D. Sherratt
pAC1 ^b	ColE1	Ap	Km-sensitive pROD17 derivative. Contains <i>mCherry</i> gene under <i>Plac</i> control	This work
pAC2 ^b	ColE1	Ap	Km-sensitive pROD17 derivative. Contains <i>DsRed2</i> gene under <i>Plac</i> control	This work
pAC4 ^b	ColE1	Ap	Km-sensitive pROD17 derivative. Contains <i>mKate2</i> gene under <i>Plac</i> control	This work

^a Plasmid pGP12 was constructed as follows: plasmid pUA66 (Zaslaver et al., 2006) DNA was digested with endonucleases *XhoI* and *BamHI*. This fragment was ligated to a PCR amplicon of R388_oriT (Llosa et al., 1991) obtained using oligonucleotides *stbAdir* (5'-GTCGTCTCGAGTACTTGATGGGGTCGCCTA) and *stbArev* (5'-GTCGTCCGGATCCCGTCCGTTTCATTCACTTGT).

^b Plasmids containing the different RFP genes were constructed as pROD17 derivatives. pROD17 KmR gene was eliminated by digestion with endonucleases *BglII* and *BamHI* to obtain a ApR Km-sensitive derivative (called pAC1). pAC2 and pAC4 were obtained by *EcoRI* + *Sall* endonuclease digestion of pROD17 and ligation of a PCR amplicon of genes *dsred2* (Bevis and Glick, 2002) or *mkate2* (Shcherbo et al., 2009), respectively. Amplicons were obtained by PCR amplification using the same oligonucleotide primers *rfp_EcoRI* (5'-GCTATGAATTCAAAAGTCCACCTGACGTCTGAAGG) and *rfp_Sall* (5'-GCTATGTCGACTTCATATGGACCATGGCTAATCCC).

where γ_{ep} is the transfer rate ($\text{mL cell}^{-1} \text{h}^{-1}$), $\psi_{\max}$ is the bacterial growth rate (h^{-1}), and D , R , T and N are the densities (cells mL^{-1}) of donors, recipients, transconjugants and total culture cells, respectively, at any given time. Although the end point estimate was originally developed for liquid cultures, due to its independence from changes in some experimental conditions and to its simple implementation, the method has been used to measure transfer rates even in experimental set-ups involving surface-associated conjugation (Licht et al., 1999; Lilley and Bailey, 2002; Normander et al., 1998). More recently, Zhong et al. (2011) analyzed the theoretical feasibility of application of the method to surface conjugation, using simulated data from an interactive particle system model. They concluded that transfer rates (γ) were more robust measurements than transfer frequencies (T/D or $T/(R+T)$) both in liquid conjugation and in surface-associated conjugation but only if the donor and recipient populations are forming a well-mixed confluent layer. It was shown that, unlike the T/D , T/R or T/N ratios, the end-point estimate of γ is insensitive to the D/R ratio and, to some extent, to the sampling time.

In this work we develop a simplified method of measuring conjugation rates under laboratory conditions (on the surface of agar plates) by analyzing conjugation of simple *oriTs*. In this way, transconjugants are not converted to new donors and we measure the transfer rates of the donor population *sensu stricto*. By using a cytometric analysis of the mating populations, we can estimate γ directly from the cytometer readings. We provide experimental evidence that supports the statement of Zhong et al. (2011) that γ is a robust parameter, resistant to changes in the initial experimental conditions. We further demonstrate that conjugation frequencies can be boosted by remixing the mating populations.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and culture conditions

All experiments were carried out using the *Escherichia coli* K12 derivative BW27783 (*lacI^q rrnB3 Δ lacZ4787*

*hsdR514 DE(araBAD)567 DE(rhaBAD)568 DE(araFGH) ϕ (Δ araEp P_{CP8} -araE) (Khlebnikov et al., 2001). Two BW27783 spontaneous mutants, one resistant to nalidixic acid (BW-NxR) and another one resistant to rifampicin (BW-RfR) were obtained for this work by plating out BW27783 in LB-agar containing the relevant antibiotic. Spontaneous mutants arose at a frequency of roughly 10^{-8} . The mutants were not further characterized. Bacteria were grown in Luria–Bertani broth (LB) or LB-agar at 37 °C supplemented with the appropriate antibiotics. *Plac* expression was induced by adding 0.5 mM IPTG to culture media. Antibiotics were used at the following concentrations: tetracycline (Tc) = 10 mg/L; ampicillin (Ap) = 100 mg/L; kanamycin (Km) = 25 mg/L; nalidixic acid (Nx) = 20 mg/L and rifampicin (Rf) = 50 mg/L.*

2.2. Plasmid construction

Plasmids used and details of their construction are shown in Table 1. They were constructed by using standard recombinant DNA technology (Sambrook and Russell, 2001). DNA inserts were obtained by endonuclease digestion or PCR amplification with specific oligonucleotides and subsequent ligation to the appropriate plasmid vector. The integrity of all constructions was confirmed by DNA sequencing.

2.3. Conjugation assays

Plate-mating experiments were carried out in 24-well plates containing 1.0 mL LB-agar per well. Donor and recipient strains were grown o/n from single colonies in LB medium at 37 °C with the appropriate antibiotics. After washing, fresh suspensions from stationary phase cultures of donor and recipient strains were mixed in appropriate volumes according to their OD₆₀₀ to get the desired proportion of donor and recipient. The mixture was centrifuged for 5 min at 4000g and resuspended in 1/10 volume of LB medium. Fifteen microliters of this cell mixture (corresponding to a total OD₆₀₀ of 0.6 units (roughly 6×10^8 cells)) were placed directly onto an agar surface within a 24 well plate (previously filled with 1.0 mL

LB-agar) and incubated at 37 °C. At appropriate time points, the mating mixture of a well was resuspended in 1.0 mL of fresh LB medium. Serial dilutions were plated on selective media for counting cell concentrations of donor (Rf + Tc + Km), recipient (Nx + Ap) and transconjugant bacteria (Km + Ap + Nx). Alternatively, for cytometric assays, samples of the mating mixtures were fixed using 4% paraformaldehyde in 1% phosphate buffered saline for 15 min and stored at 4 °C until needed. Conjugation frequencies were expressed as the number of transconjugants per recipient cell ($T/(R + T)$), transconjugants per donor cell (T/D), or by calculating the transfer rate (γ), following Eq. (3).

2.4. Flow cytometric analysis

Flow cytometry measures were carried out using a FACScanto II flow cytometer (Becton Dickinson) equipped with a 488 nm solid state laser for excitation. Fluorescence was detected using a FL1 filter (530/30 nm band pass) for green fluorescence and either FL2 (585/42 nm band pass) or FL3 (670 nm long pass) filters for red fluorescence. In order to establish fluorescence compensations, negative, (GFP⁺ RFP⁻) and (GFP⁻ RFP⁺) controls were used (Maksimow et al., 2002). All data were collected using logarithmic plots. A FSC and SSC plot was used to gate the bacterial population (gate P1). Twenty-thousand P1 events were collected and additional regions were defined in a FL1 vs. FL2 (or FL3) plot in order to quantify recipient and transconjugant populations. Bacteria collected inside region Q1 correspond to RFP⁺ cells and were defined as recipients (R), region Q2 contains RFP⁺ GFP⁺ events, defined as transconjugants (T) and donor cells were included in Q3 region, which correspond to non-fluorescent events. Conjugation frequency was obtained as the number of Q2 (GFP⁺RFP⁺) events per total red events (Q1 + Q2). γ was calculated directly from the cytometer readings following Eq. (2).

3. Theory: end-point estimate of conjugation rate

In order to obtain a robust indicator of plasmid transfer, we followed the model of (Levin et al., 1979) as adapted by Simonsen et al. (1990) and Zhong et al. (2011) to estimate the conjugation rate. Because of our specific experimental procedure, which used the *oriT* instead of the whole Tra + plasmid and flow-cytometer counts to obtain data, we adapted the equation as explained below. We maintained the assumptions of the cited references, namely we assume that (1) mating occurs randomly, (2) plasmid loss by segregation is negligible and (3) all bacterial cells have the same growth rate (The growth rates of D , R and T were verified by growing the strains in LB at 37 °C in 96-well microtiter plates. Their exponential phase generation times ($\psi_{\max}$) were found to be 51.4 min for D and R and 52.9 for T , indicating that, within experimental error, the three strains grow at similar rates). In contrast to the original model, (4) transconjugants are not able to transfer the plasmid to new recipient cells. Following these assumptions, the differential equations for the time-dependent densities of the three types of cells and the nutrient concentration (C) would be given by:

$$\begin{aligned}\dot{R} &= \psi(C) \cdot R - \gamma(C) \cdot R \cdot D \\ \dot{D} &= \psi(C) \cdot D \\ \dot{T} &= \psi(C) \cdot T + \gamma(C) \cdot R \cdot D \\ C &= -\psi(C) \cdot (R + D + T) \cdot e\end{aligned}$$

where ($\dot{x}$) denotes differentiation with respect to time and e (μg) is the amount of resource required to produce a new cell.

As established by Simonsen et al. (1990) growth and plasmid transfer rates are Monod functions (Monod, 1949) of nutrient concentration:

$$\begin{cases} \psi(C) = \psi_{\max} C / (C + K) \\ \gamma(C) = \gamma_{\max} C / (C + K) \end{cases}$$

where $\gamma_{\max}$ is the value estimated by the end-point method (from now γ_{ep}) and K is the half saturation constant ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

From the assumptions about nutrient dependence of growth and conjugation constant it can be inferred that $\gamma(C)/\psi(C) = \gamma_{\text{ep}}/\psi_{\max}$ is a constant. This appreciation is crucial in the derivation of the equations to calculate γ , as previously explained by Levin et al. (1979) and Simonsen et al. (1990). Further developing the equations, it can be deduced that the end-point estimate of conjugation rate when transconjugants do not further transfer the plasmid is given by:

$$\gamma_{\text{ep}} = \psi_{\max} (D - D_0)^{-1} \ln \left(\frac{T}{R} + 1 \right) \quad (2)$$

where D is the end-point density (cells mL^{-1}) of donors and D_0 is the density at time zero.

Let the frequency of conjugation be $Y = T/(R + T)$. Hence, Eq. (2) converts to:

$$\gamma_{\text{ep}} = \psi_{\max} (D - D_0)^{-1} \ln \left(\frac{1}{1 - Y} \right) \quad (3)$$

Eq. (2) uses the parameters T and R that result from the cytometric analysis, while Eq. (3) uses the frequencies of conjugation that are obtained in the replica-plating method.

4. Results

4.1. A cytometer-based conjugation assay

An assay was designed to calculate conjugation rates (γ) on solid surfaces. Classically, conjugation rates are estimated by plating on filters placed on the surface of agar plates. Cells are allowed to develop colonies by o/n incubation and the proportion of transconjugants calculated by replica-plating of those colonies. This is a cumbersome protocol. In our updated plate-mating experiments, conjugation assays were carried out directly on the agar surface of 24 well plates. After the appropriate conjugation periods, the dynamics of the mating populations were calculated either by replica-plating (for comparative purposes), or directly by flow cytometry, as shown in Figs. 1 and 2.

In order to measure plasmid conjugation using flow cytometry, a dual fluorescent marker assay was set up. As previously described, GFP and RFP expression can be

Plasmid pGP12 (Table 1) contains the *oriT* of plasmid R388 cloned upstream of the *gfpmut2* reporter gene, so that GFP expression is controlled by the *stbABC* operon promoter. In the presence of R388, *PstbA* transcription is repressed by the presence of the StbA repressor protein coded by plasmid R388Δ*oriT*. Donors were BW-RfR cells containing the non-mobilizable R388 (pAP711Δ*oriT*::*tet*;

To analyze the kinetics of R388_oriT transfer to recipient cells, conjugation was measured using both flow

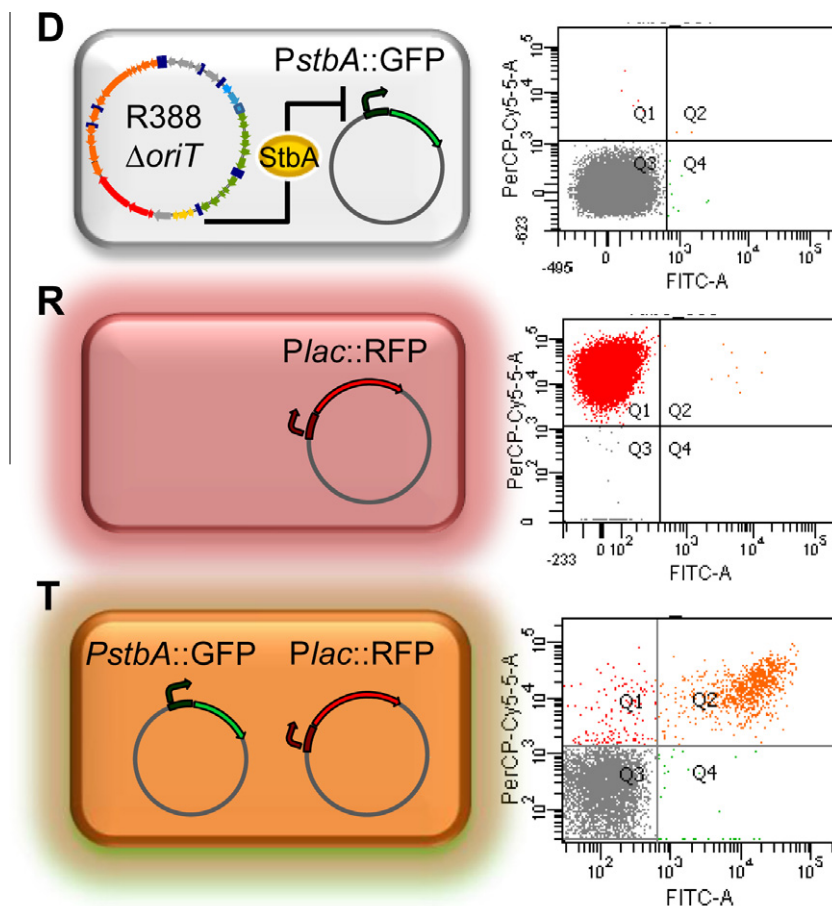


Fig. 1. Scheme of the cytometric conjugation assay. Donor cells (*D*) were derivatives of strain BW-RfR carrying the non-mobilizable plasmid R388Δ*oriT* and pGP12 (carrying an *oriT*:: construction); they appear in the cytometer as the grey population in Q3. They were mated with recipient BW-NxR cells (*R*) containing a *Plac*::RFP construction, appearing as the red population in Q1. In donor cells, GFP expression is repressed by the presence of R388Δ*oriT*. When pGP12 is transfer to the recipient cell, the *PstbA*::GFP promoter is induced, therefore producing GFP in the transconjugants (*T*), identified as the RFP⁺ GFP⁺ orange population in Q2.

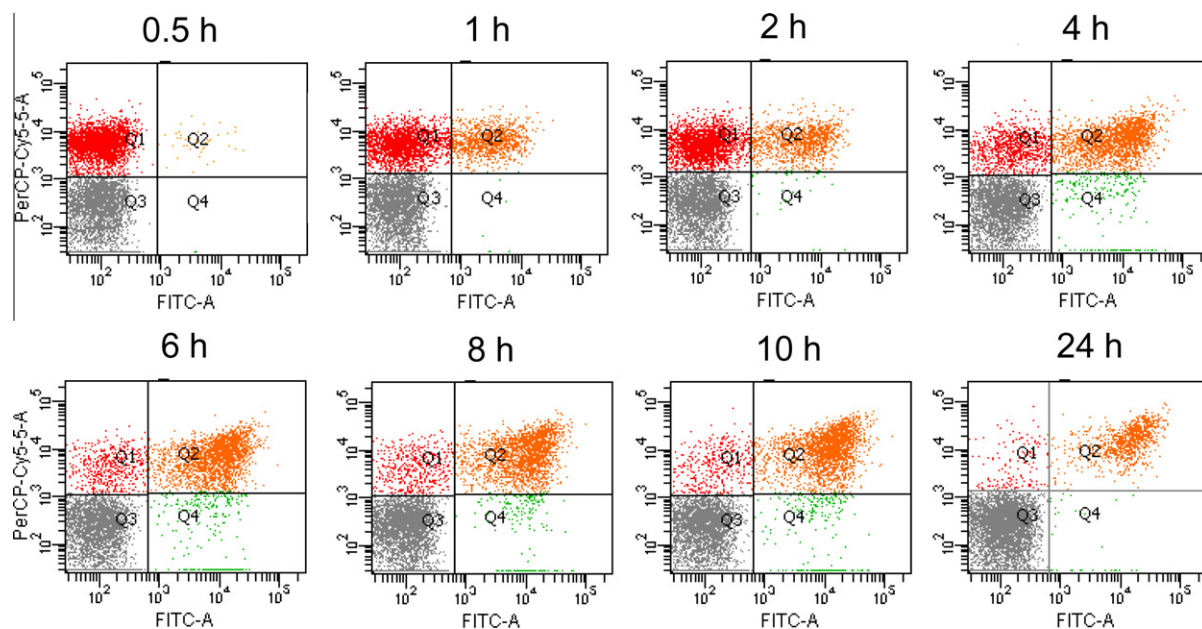


Fig. 2. Time series of a representative conjugation experiment as measured by flow cytometry. FL1 vs. FL3 plots showing gated populations. FL3+ population correspond to recipient cells (Q1). The FL3+FL1+ population (Q2), corresponding to transconjugants, increases with time. The Q3 population corresponds to non-fluorescent events and contains donor cells.

cytometry and the traditional replica-plating method. A 1:1 (*D/R*) conjugative mixture was prepared, spread on individual wells of 24 well plates and incubated at 37 °C (Section 2). At different time points, mating mixtures were resuspended in LB and a sample either fixed using paraformaldehyde for cytometry or plated on antibiotic-containing plates for selection for donors, recipients or transconjugants. In flow cytometric measurements, the bacterial population was gated in a SSC vs. FSC plot and set as P1. Twenty-thousand P1 events were collected and FL1 vs. FL2 (or FL3) plot was used to study the different populations. Donor cells were collected as non-fluorescent events while recipient cells expressing RFP protein were detected in gate Q1 corresponding to FL3+ events. As conjugation proceeds, transconjugants can be detected as (FL3+ FL1+) events, gated in region Q2.

4.2. Cytometric analysis vs. replica-plating

Fig. 2 shows flow cytometry FL1 vs. FL3 plots at different conjugation times with populations gated. As can be seen, the Q2 population (corresponding to transconjugants) increases as a function of conjugation time, while the Q1 population (containing recipient cells) decreases. In order to confirm flow cytometric assay results, the same conjugation samples were analyzed by the replica-plating assay, as shown in the plot of Fig. 3, in which the conjugation frequencies per recipient cell obtained at different time points are shown. Using flow cytometry, the conjugation frequency is obtained as $T/(R+T)$ (that is, $Q2/(Q1+Q2)$). In plating experiments, the conjugation frequency corresponds to $T/(R+T) = (N \times \text{Ap Km})/(N \times \text{Ap})$. As can be seen, the frequency plot obtained by flow cytometry nicely overlaps that obtained by replica-plating. Data

points were obtained by averaging at least nine independent experiments. Error bars represent the standard deviation for each data point. The same result was obtained at all four tested *D/R* ratios (data not shown). Interestingly, as shown in Fig. 3, the error bars of the cytometer experiments were consistently smaller than those of the replica-plating assays. This is to be expected, since we are sampling a much larger number of cells by cytometry (about 20,000) than by replica-plating (a few hundred). Based on these results, we conclude that flow cytometry measures

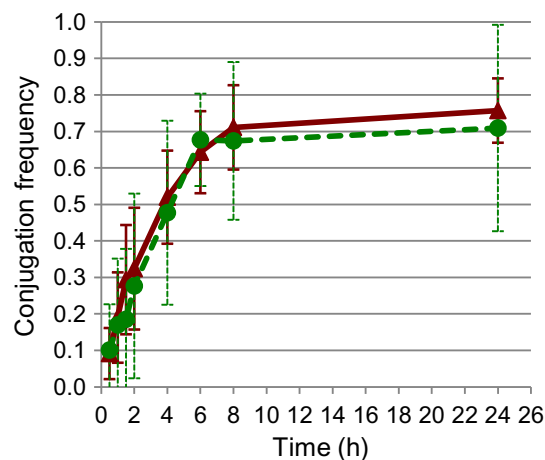


Fig. 3. Comparison of conjugation frequencies as estimated by flow cytometry and replica-plating. Transfer frequencies are expressed as the number of transconjugants per recipient cell ($T/(R+T)$). Data points were obtained by averaging at least 9 independent experiments. Green circles = replica-plating frequency data; red triangles = flow cytometry frequency data. Error bars show the standard deviation of the data. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

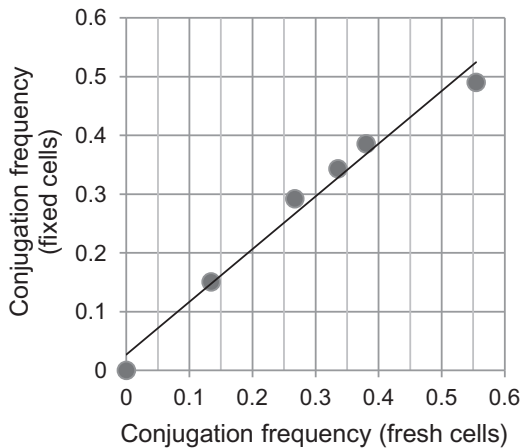


Fig. 4. Effect of cell fixation on the estimation of cytometric-assayed conjugation frequencies. Comparison of the conjugation frequencies obtained by flow cytometry (as described in Section 2) for the same samples measured either directly (fresh cells) or after 4% paraformaldehyde fixation and storage at 4 °C for 24 h (fixed cells). Samples were taken after 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 4.0 h of conjugation. Each point corresponds to the mean value of four individual experiments.

were comparable to those obtained with the traditional method of replica-plating on selective media, but with better statistics. Besides, results shown in Fig. 4 confirmed that cell fixation before cytometric analysis had no measurable effect on the assay. Given the similarity of results when fresh or fixed cells were measured, this finding implies that the assay can be simplified since the different time points in an experiment (or from several experiments) could be processed together in the cytometer.

4.3. Estimation of conjugation rates

According to the theoretical analysis of Zhong et al. (2011), γ should be independent of the D/R ratio and, to a certain extent, of the end-point time. Thus, we decided to analyze those two parameters in our assay, since a confirmation of their robustness will be of great use in the estimation of conjugation rates by different laboratories or in different experiments. The result of such an experiment is represented in Fig. 5A. It shows the transfer frequencies ($T/(R+T)$) observed at different D/R ratios, while keeping the total cell concentration constant. As can be observed, the frequency of appearance of transconjugants is a function of the concentration of donors, as expected. The proportion of transconjugants increases with time until 6–8 h of mating, when it stops. As can be seen in Fig. 5B, the same happens for the populations of donors. Therefore, conjugation on plates occurs for 6–8 h and then stops together with cell multiplication. If, instead of transfer frequencies, we represent the γ values for the same experiment, we obtain the graph of Fig. 6A. At all four D/R ratios, γ decreases slightly with time. This is averaged and shown more clearly in Fig. 6B. On the other hand, if we average γ over the time points, we can see that its value does not change significantly over the D/R ratios tested (Fig. 6C). The results are presented numerically in Table 2. Thus, the mean value of γ was -10.26 ± 0.45 . It does not

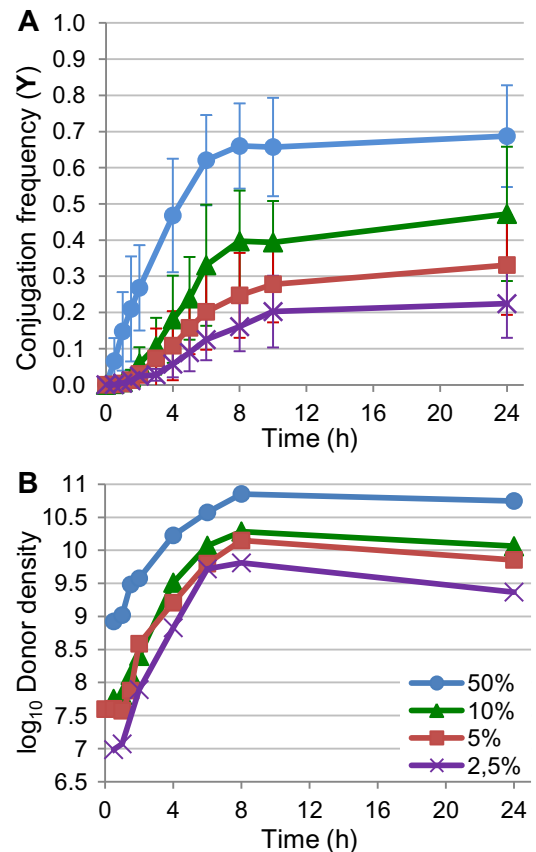


Fig. 5. Determination of conjugation frequencies at different times and D/R ratios. (A) Temporal series of transfer frequencies ($Y = T/(R+T)$) for different D/R ratios, as estimated by flow cytometry (see Section 2). Samples were taken after 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 and 24 h of conjugation. (B) Growth of donor cells on the surface of agar plates during the conjugation experiment, as calculated by replica-plating for different D/R ratios (specified in the inset).

change significantly with the D/R ratio and the mean varies within one standard deviation according to the time point at which data were collected. This is clearly more robust than conjugation frequency proportions (see Fig. 5A). To further confirm that the decrease in γ at longer time samplings (more than 6 h) was due to population structuring, we interrupted matings at 6 h, resuspended the cells in fresh medium and plated them out again. Fig. 7 shows how transfer frequencies increase substantially after mixing and plating again on fresh medium. This result indicates that conjugation on the plates stops after 6 h because of lack of bacterial multiplication. Alternatively, the number of transconjugants in a plate experiment might also plateau because of a structuring effect due to the constrained mobility of cells on the plate surface, which leads to an increasing proportion of donors being surrounded by sister donor cells and their transconjugants.

5. Discussion

An accurate determination of conjugation rates is important for several purposes. First, as explained in the

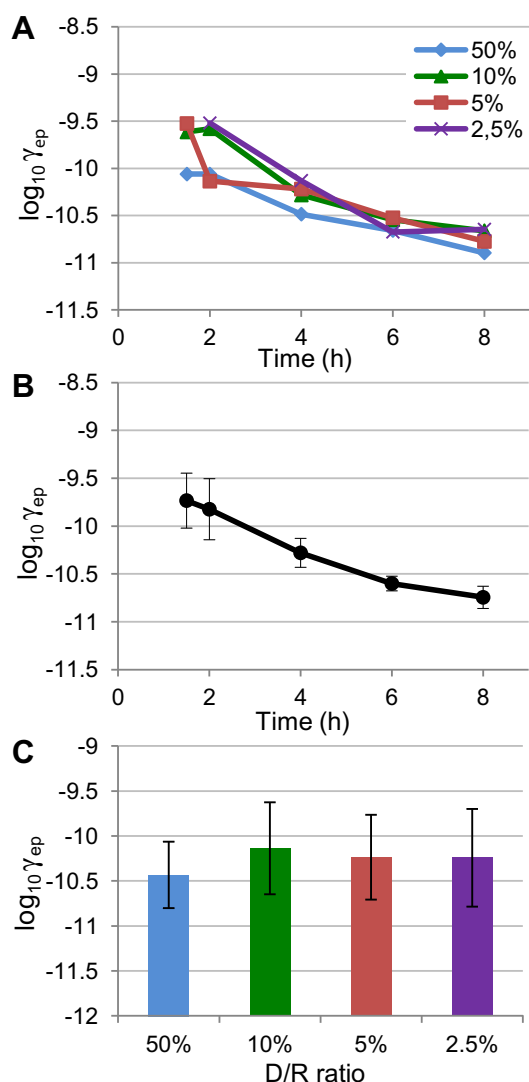


Fig. 6. End-point estimates of the conjugation efficiency rate (γ). (A) Effect of the end-point time. (B) Effect of variation of D/R ratio (using the averages of the data points in (A)). (C) Effect of variation of the end-point time (using the averages of the data points in (A)).

Table 2

End-point estimate of the conjugation efficiency rate at different time points.

Time (h)	Mean $\log_{10} \gamma$	SD
1.5	-9.73	0.29
2	-9.82	0.32
4	-10.27	0.15
6	-10.6	0.08
8	-10.74	0.12
Total average	-10.26	0.45

introduction, it can help in the design of models that account for the dissemination characteristics of AbR plasmids in hospital or environmental settings. This, in turn, will provide the theoretical ground for mathematical models to assess the outcomes of new intervention strategies

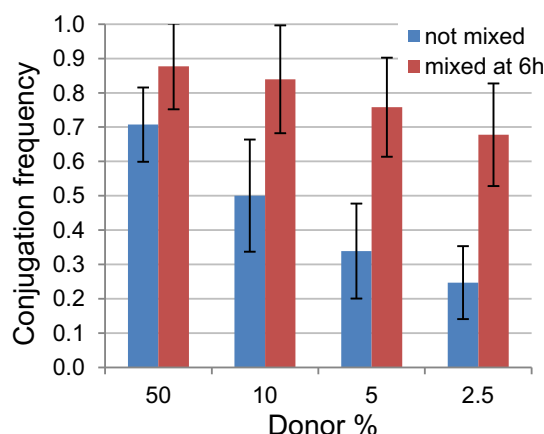


Fig. 7. Effect of population mixing. The figure represents frequencies ($Y = T/(R + T)$) of 24 h conjugation experiments at different D/R ratios. Blue bars represent Y measured after 24 h conjugation (defined as not mixed). Red bars represent Y measured after 24 h conjugation after a previous 6 h conjugation step, resuspension in fresh LB-medium and plated out again (mixed at 6 h). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

for the control of the dissemination of AbR (Andersson and Hughes, 2011; Baquero et al., 2011; Bonten et al., 2001). Second, plasmids are the workhorses of genetic engineering and, nowadays, systems and synthetic biology. In fact, plasmids are biological substrates that can be involved in biological processes to encode, store and manipulate information. The plasmid “components” may be combined together within a cell to form simple logical circuits. These components may be exchanged between individual bacteria via the process of conjugation. This is the basis for the EU project BACTOCOM (<http://www.bactocom.eu/index.html>). An accurate estimation of transfer rates is essential to model the behavior of such a system, to optimize D/R cell ratios, duration of the conjugation steps, etc. Third, conjugation rates should be more intrinsic and robust descriptors of the efficiencies of conjugative systems. We suggest they should be used in these types of analyses instead of conjugation frequencies.

Simonsen (Simonsen, 1990; Simonsen et al., 1990) proposed the existence of an expression called the end-point estimate of the conjugation rate (γ_{ep}). γ_{ep} provides a rate that is independent of the initial conditions of the reaction and thus it is a useful estimate of “intrinsic” conjugation rates. Later on, Zhong et al. (2011) analyzed how γ could be used to estimate transfer rates in surface associated conjugation. They showed that, while γ seemed to remain independent of some initial conditions (D/R ratio and conjugation time) it was not independent of others (spatial clustering and initial cell density). In our experimental set-up, we took care to use high initial cell densities, which result in short effective conjugation times (as shown in Fig. 5). As a result, in the time periods allowed for conjugation to occur in our experimental set-up there is relatively little bacterial growth and therefore, not substantial “structure effect” (bacteria develop microcolonies that, when sufficiently grown, touch adjacent colonies and elicit

conjugative transfer). Rather, the populations of donors and recipients are mixed well enough, so they effectively behave as if they were in solution. Interestingly, the fact that our transconjugants continue to act as recipients does not seem to affect the transfer rates either (it is included in the “structure effect”, which becomes significant only after long mating times). In fact, if any donor bacterium is going to engage in conjugation less than one time per experiment on average, the “structure effect” should not be relevant. This is what appears to happen in the experiments, as shown in Fig. 6. Cells multiply and conjugate for about 8 h. Little else occurs afterwards.

Each well in a 24-well plate has a surface of 177 mm² and was filled with about 1.0 mL of LB-agar. Therefore, a confluent *E. coli* monolayer (if each bacterium occupies 1 μm² – a cylinder 2.0 μm long and 0.5 μm base diameter) will consist of approximately 2×10^8 bacteria. According to our estimates, we place roughly $3\text{--}6 \times 10^8$ bacteria/plate well at the start of each conjugation experiment. This number was calculated, to get a maximal conjugation frequency (T/D) in a set of preliminary experiments that used 1:1 D/R ratio and 1 h mating periods (C. Revilla, data not shown). Therefore, the bacterial cells are already in close contact at the beginning of the mating experiment, forming at least a one-cell layer on the agar surface. Assuming a height of 0.1 mm for the water column above the agar surface, the resulting volume will be roughly 0.02 mL/well (that is, 5×10^{10} cells/mL). These high cell concentrations seem to be essential for the close contacts needed for conjugation to happen at optimal rates. According to the measurements in Fig. 5, the number of bacteria in the mating mixtures remains constant for about 1 h and then increases by a factor of 10 to 100-fold in the next 4–6 h (corresponding to 4–7 doublings), growing little afterwards. The lag phase is to be expected since experiments start from stationary phase cultures, grown the previous day. Besides, the mating plates have to adjust to the mating temperature. In summary, it seems that the surface of the plates can accumulate several layers of growing bacteria in close contact. This crowded environment seems to be optimal for surface conjugation.

The purpose of this work was not to analyze the theoretical aspects of conjugation kinetics on solid surfaces (as rigorously examined, for instance, by Zhong et al. (2011)). We rather wanted to provide a simple protocol to estimate conjugation rates (that can be used in models of conjugation kinetics) for the type of experiments that are usually performed in a bacterial genetics laboratory. We ended up with two equations, one that fits datasets obtained by cytometric analysis (Eq. (2)) and a second one that is adapted to replica-plating datasets (Eq. (3)). Due to its speed and simplicity, and the fact that the cytometric estimates are less noisy (see Fig. 3), we favor the use of the cytometric method.

Under these experimental conditions, our estimate for γ of *oriT*_R388 was 5.46×10^{-11} mL cell⁻¹ h⁻¹. It should be emphasized that this value considers a volume of 20 μL for the mating mixture, as discussed above. This value of γ can be compared to estimates in liquid mating experiments of *E. coli* plasmid F and of the derepressed plasmid R1-drd-19 (both giving $\gamma = 2 \times 10^{-9}$ mL cell⁻¹ h⁻¹), while

the repressed version of R1 gave a $\gamma = 2 \times 10^{-12}$ (Levin et al., 1979). These values are higher but consistent to those obtained in our surface mating experiments. The possibility that liquid-mating is more efficient than surface-conjugation as a general rule should be rigorously tested. The 3-log rate difference between R1 and its derepressed version underlines the potential “interfering” effect of zygotic induction on the calculation of γ , as discussed in this work. The values of γ obtained in other publications analyzing surface conjugation cannot be compared directly with ours since they use surface areas instead of volumes. When the γ of *oriT*_R388 is converted to these units, it gives 4.76×10^{-9} cm² cell⁻¹ h⁻¹. Then, it can be compared to that of plasmid pQBR11, which was 1×10^{-11} in surface conjugation experiments between two *Pseudomonas putida* strains, or 4×10^{-14} from *P. putida* to *Pseudomonas fluorescens* (Lilley and Bailey, 2002). Significantly higher transfer rates were observed by Normander et al. (1998) in surface conjugation of the TOL plasmid (ranging from 7×10^{-11} to 1×10^{-7}). It is difficult to conclude anything from this scanty data. Certainly, a more extensive analysis with different plasmids and conditions is needed before we can extract general conclusions about plasmid conjugation rates.

In summary, we propose that Eqs. (2) and (3) could be useful as a rule to estimate γ and thus compare the transfer dynamics of different plasmids (or mutants of conjugation genes). In this way significant differences can be discovered in the kinetic parameters that are related to different plasmid designs. As proof of principle, we analyzed the mobilization of a plasmid containing just the *oriT* region of plasmid R388, instead of the native plasmid itself. Since the *oriT* cannot transfer from primary transconjugants to new recipients, we were sure to deal with a single conjugation rate. Experiments such as those detailed in this work should be extended to different systems and conditions to adequately describe and quantify the conjugation kinetics of the most common transmissible plasmids.

6. Conclusions

We have developed a cytometric protocol for the estimation of end-point conjugation rates. Our method is faster and less noisy than the classical replica-plating method. Using the cytometric method for the analysis of conjugation of the *oriT* of plasmid R388 we demonstrate that the end-point method is insensitive of D/R ratios and, to a certain extent, of the time of data collection. Conjugation frequencies are significantly increased by re-mixing the mating populations, until most recipients are converted to transconjugants.

Acknowledgments

This work was supported by Grants BFU2008-00995/BMC from Ministerio de Ciencia e Innovación (MCINN, Spain), RD06/0008/1012 from Instituto de Salud Carlos III, and 248919/FP7-ICT-2009-4 from the European VII Framework Program. Ms. María Aramburu is also acknowledged by her expert assistance with the flow cytometer.

References

- Andersson, D.I., Hughes, D., 2011. Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 901–911.
- Baquero, F. et al., 2011. Ecology and evolution as targets: the need for novel eco-evo drugs and strategies to fight antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 3649–3660.
- Bevis, B.J., Glick, B.S., 2002. Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). *Nat. Biotechnol.* 20, 83–87.
- Bonten, M.J. et al., 2001. Understanding the spread of antibiotic resistant pathogens in hospitals: mathematical models as tools for control. *Clin. Infect. Dis.* 33, 1739–1746.
- Boucher, H.W. et al., 2009. Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 48, 1–12.
- Cormack, B.P. et al., 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33–38.
- de la Cruz, F., Davies, J., 2000. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol.* 8, 128–133.
- de la Cruz, F. et al., 2010. Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 18–40.
- Demarre, G. et al., 2005. A new family of mobilizable suicide plasmids based on broad host range R388 plasmid (IncW) and RP4 plasmid (IncPalph) conjugative machineries and their cognate *Escherichia coli* host strains. *Res. Microbiol.* 156, 245–255.
- Garcillan-Barcia, M.P. et al., 2011. Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 936–956.
- Jacob, F., Wollman, E.L., 1956. Processes of conjugation and recombination in *Escherichia coli*. I. Induction by conjugation or zygotic induction. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 91, 486–510.
- Khlebnikov, A. et al., 2001. Homogeneous expression of the P(BAD) promoter in *Escherichia coli* by constitutive expression of the low-affinity high-capacity AraE transporter. *Microbiology* 147, 3241–3247.
- Levin, B.R. et al., 1997. The population genetics of antibiotic resistance. *Clin. Infect. Dis.* 24 (Suppl. 1), S9–S16.
- Levin, B.R. et al., 1979. The kinetics of conjugative plasmid transmission: fit of a simple mass action model. *Plasmid* 2, 247–260.
- Licht, T.R. et al., 1999. Plasmid transfer in the animal intestine and other dynamic bacterial populations: the role of community structure and environment. *Microbiology* 145 (Pt 9), 2615–2622.
- Lilley, A.K., Bailey, M.J., 2002. The transfer dynamics of *Pseudomonas* sp. plasmid pQBR11 in biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 42, 243–250.
- Llosa, M. et al., 1991. Structural and functional analysis of the origin of conjugal transfer of the broad-host-range IncW plasmid R388 and comparison with the related IncN plasmid R46. *Mol. Gen. Genet.* 226, 473–483.
- Maksimow, M. et al., 2002. Simultaneous detection of bacteria expressing GFP and DsRed genes with a flow cytometer. *Cytometry* 47, 243–247.
- Monod, J., 1949. The growth of bacterial cultures. *Ann. Rev. Microbiol.* 3, 371–394.
- Normander, B. et al., 1998. Effect of bacterial distribution and activity on conjugal gene transfer on the phylloplane of the bush bean (*Phaseolus vulgaris*). *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1902–1909.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Shaner, N.C. et al., 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 22, 1567–1572.
- Shcherbo, D. et al., 2009. Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues. *Biochem. J.* 418, 567–574.
- Simonsen, L., 1990. Dynamics of plasmid transfer on surfaces. *J. Gen. Microbiol.* 136, 1001–1007.
- Simonsen, L. et al., 1990. Estimating the rate of plasmid transfer: an end-point method. *J. Gen. Microbiol.* 136, 2319–2325.
- Smillie, C. et al., 2010. Mobility of plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 434–452.
- Zaslaver, A. et al., 2006. A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*. *Nat. Methods* 3, 623–628.
- Zhong, X. et al., 2011. On the meaning and estimation of plasmid transfer rates for surface-associated and well-mixed bacterial populations. *J. Theor. Biol.*

Negative Feedback and Transcriptional Overshooting in a Regulatory Network for Horizontal Gene Transfer

Raul Fernandez-Lopez, Irene del Campo, Carlos Revilla, Ana Cuevas, Fernando de la Cruz*

Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTec), Santander, Spain

Abstract

Horizontal gene transfer (HGT) is a major force driving bacterial evolution. Because of their ability to cross inter-species barriers, bacterial plasmids are essential agents for HGT. This ability, however, poses specific requisites on plasmid physiology, in particular the need to overcome a multilevel selection process with opposing demands. We analyzed the transcriptional network of plasmid R388, one of the most promiscuous plasmids in *Proteobacteria*. Transcriptional analysis by fluorescence expression profiling and quantitative PCR revealed a regulatory network controlled by six transcriptional repressors. The regulatory network relied on strong promoters, which were tightly repressed in negative feedback loops. Computational simulations and theoretical analysis indicated that this architecture would show a transcriptional burst after plasmid conjugation, linking the magnitude of the feedback gain with the intensity of the transcriptional burst. Experimental analysis showed that transcriptional overshooting occurred when the plasmid invaded a new population of susceptible cells. We propose that transcriptional overshooting allows genome rebooting after horizontal gene transfer, and might have an adaptive role in overcoming the opposing demands of multilevel selection.

Citation: Fernandez-Lopez R, del Campo I, Revilla C, Cuevas A, de la Cruz F (2014) Negative Feedback and Transcriptional Overshooting in a Regulatory Network for Horizontal Gene Transfer. PLoS Genet 10(2): e1004171. doi:10.1371/journal.pgen.1004171

Editor: Ivan Matic, Université Paris Descartes, INSERM U1001, France

Received: May 13, 2013; **Accepted:** December 26, 2013; **Published:** February 27, 2014

Copyright: © 2014 Fernandez-Lopez 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: Work was financed by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (BFU2011–26608) and the European Seventh Framework Program (289326/FP7-KBBE-2011-5 and 282004/FP7–HEALTH-2011-2.3.1–2) to FdC. 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: delacruz@unican.es

Introduction

Horizontal gene transfer (HGT) is ubiquitous in bacteria. Because its important role in bacterial adaptation, HGT has been traditionally compared to sexual reproduction in higher eukaryotes. In bacteria, however, HGT is not mediated by specific intracellular mechanisms, but it is the byproduct of the pervasive movement of a myriad of mobile genetic elements. These include transposons, phages, ICEs and, most notably, plasmids [1]. Among them, broad host range (BHR) plasmids of *Proteobacteria* stand out because of their ability to colonize a wide range of bacterial species. This ability makes BHR plasmids efficient shuttles for HGT, clearly illustrated in the last decades by their leading role in the spread of antibiotic resistance genes among microbial populations [2].

Bacterial plasmids are agents for HGT, but they themselves are genetic replicons with their own, idiosyncratic, evolutionary history [3,4]. Plasmid fitness depends on two basic physiological functions: maintenance within the bacterial host and transfer into new hosts; functions that are encoded in the plasmid genome. However, since plasmids can only exist inside a bacterial cell, their fitness is also host dependent. Plasmids impose a burden on host fitness [5,6,7,8], which is dependent on the collective effect of the plasmid population within a given cell. The overall fitness of a plasmid replicon therefore depends not only on its own phenotype, but also on the phenotype of other co-residing plasmid copies. This dependency on the group phenotype puts plasmids under multilevel selection [9]. Multilevel selection forces plasmids to confront a paradoxical situation. Competition between plasmid

copies within a given cell favors plasmids with higher copy number, superior partition systems and higher transfer rates [9]. However, these processes come to a cost, since plasmid consumption of resources imposes a metabolic burden that hampers host fitness. Competition between plasmid-containing cells, on the contrary, selects for plasmids that minimize the burden imposed onto the host. Both selection levels are thus intrinsically in conflict, and an adequate regulation of gene expression becomes essential to ensure plasmid survival [10].

Transcriptional regulation is common in plasmids, and virtually all functions in plasmid physiology have been found to be under transcriptional control [11]. In some cases, this control is exerted in sophisticated and apparently redundant layers. For example, plasmid R1 replication is controlled simultaneously by an antisense RNA and a transcriptional repressor [12] [13]. In other cases, like in the broad host range plasmid RP4, transcriptional regulation is organized under a global network that coordinates all functions in the plasmid's physiology [14]. Unfortunately, despite our knowledge of the molecular biology of transcriptional regulation, our understanding of the signals that plasmid regulatory circuits respond to is scarce. Plasmids from *Gram+* bacteria regulate conjugation according to external cues about the abundance of possible receptors. These cues are communicated in the form of specific pheromones [15]. Such systems are generally not found in plasmids from *Proteobacteria*, with the remarkable exception of Ti-like plasmids from *Alpha-Proteobacteria*, which monitor external conditions via a quorum sensing mechanism [16] [17]. Apart from these and a few other cases, the input information that plasmid regulatory circuits monitor remains elusive.

Author Summary

In the environment, bacteria often evolve by the acquisition of new genes from different species. Plasmids are small DNA molecules that mediate horizontal gene transfer in bacteria, thus they are fundamental agents for the spread of antibiotic resistances. Plasmids replicate inside the bacterial cytoplasm, and propagate infectiously by contact. Plasmids control these two ways of multiplication, but like many other symbionts they suffer from a tradeoff. If plasmids become very infective, they can spread fast and successfully, but this damages the bacterial hosts they depend upon. If, on the contrary, plasmids become very mild, the host is able to grow better but the ability of plasmids to infect new hosts is hampered. We have studied the regulatory mechanisms plasmids use to overcome this paradox. We discovered that negative feedback, a regulatory motif ubiquitous in the plasmid network, allows transient activation of plasmid functions immediately after plasmids invade a new host. This might be an adaptive strategy for plasmids to be highly infective without damaging their hosts, and it illustrates a natural mechanism for DNA translocation that could be implemented in synthetic genomic transplants.

Trying to understand the fundamental principles of plasmid transcriptional control, we analyzed the regulatory network of plasmid R388. Plasmid R388 is the smallest BHR conjugative plasmid found in *Proteobacteria* [3]. It shows an extensive host range, which overlaps with that of plasmid RP4, another model BHR plasmid [18]. Remarkably, plasmid RP4 is phylogenetically unrelated to plasmid R388 [3]. This situation allowed us to compare two plasmid networks that evolved independently, but under similar selective constraints. Using fluorescence expression profiling and quantitative PCR, we found a global regulatory network that controlled plasmid R388 transcription. Unlike the archetypical plasmids from *Gram+* bacteria or Ti-like plasmids, the network seemed to be unresponsive to environmental changes, or quorum signals. The network was based on a basic regulatory motif: a strong promoter controlled by a tight negative feedback loop (NFL). We show, computationally and experimentally, that this architecture induces transcriptional overshooting after horizontal transfer of the plasmid.

Results

Intergenic regions in plasmid R388 DNA were PCR-amplified and cloned in the low copy number reporter vector pUA66 [19] to drive transcription of *gfpmut2* after a strong ribosomal binding site. Out of the 19 intergenic regions cloned, 15 showed transcriptional activities at least two-fold higher than the promoter-less vector, and were considered to contain a promoter (Figure 1). To compare the transcriptional strength of these promoters against a known standard, the activity of *ParaBAD* was measured at different arabinose concentrations. *ParaBAD* promoter reached 10^5 GFP/OD units at maximal induction, and 13 out of 15 R388 promoters showed levels similar to this value (Figure 1, Supporting Table S1). Therefore R388 promoters, when assayed in the absence of the plasmid network, have strong transcriptional activities.

Transcriptional activity decreased sharply when the promoters were assayed in cells that also contained plasmid R388 (Figure 1, Supporting Table S1). The repression fold exerted by the plasmid ranged from 5 (*PresP*) to more than 500 fold (*Porf7*). Six promoters (*PardC*, *Porf14*, *Porf12*, *PkorB*, *PtrwH*, *Porf7*) dropped to levels close

to background, and another six (*PresP*, *PkfrA*, *PssB*, *PstbA*, *PkorA*, *PkikA*) showed values similar to those of repressed *P_{lacZ}* (1×10^3 GFP/OD). The only promoters that showed no changes in the presence of plasmid R388 were *P_{int}* and *P_{ant}*. Interestingly, these promoters do not belong to the plasmid backbone: they are part of the In-3 integron platform, which incorporated recently, in evolutionary terms, into the plasmid genetic structure [20]. Therefore, when the full regulatory network was present, all promoters from the plasmid backbone were repressed, and kept at levels lower or similar to LacI-repressed *P_{lacZ}*.

To determine the transcriptional units of the plasmid, mRNA levels during exponential growth were analysed by RT-qPCR. Relative mRNA abundance was measured using a set of 66 primer pairs, designed to cover the entire plasmid genome. From these 66 primer pairs, 60 showed efficiencies in the interval $0.9 < E < 1.2$ (Figure 2A, left upper panel) and were considered suitable for quantification. mRNA was extracted from cells growing in rich media at mid-exponential phase, and retrotranscribed into cDNA as described in Materials and Methods. Using 300 ng total RNA, we obtained an average threshold cycle (Ct) of 19.9 with $cv = 0.12$. Results for each primer pair were normalized measuring the Ct corresponding to 5 ng of purified plasmid DNA. Results (Figure 2A, left lower panel), showed a tight distribution with an average Ct of 14.2 and $cv = 0.034$. Relative abundances of mRNAs were expressed as $\Delta Ct = Ct_{cDNA} - Ct_{DNA}$ [21] and a representation of the average ΔCt obtained for each primer pair in three independent experiments is shown in figure 2B. Known untranscribed regions, like the plasmid origin of transfer (between *PstbA* and *PtrwA*), yielded $\Delta Ct = -8$, while the most actively transcribed region corresponded to the integron cassettes, with $\Delta Ct = 2$. Overall, the transcriptional profile clearly delimited the boundaries between transcriptional units (Figure 2B). A comparison between promoter strengths, determined by fluorescence profiling, and mRNA abundances, measured by RT-qPCR (figure 2A, left lower panel), showed that both measurements were not linearly correlated ($r^2 = 0.49$), indicating that mRNA processing and degradation also played significant roles in determining plasmid levels of expression.

To determine the topology of the plasmid regulatory network, we tried to ascribe each plasmid promoter to its cognate regulators. ORFs from the plasmid genome that were either orphan, or showed homology to known transcriptional regulators, were considered potential candidates to encode a plasmid regulator. These ORFs were cloned in expression vector pBAD33, and the transcriptional activity of plasmid promoters was measured in the presence of all putative regulators. Expression profiles are shown in supporting figures S1 and S2, and steady-state levels are indicated in Supporting Table S1. Results allowed the identification of six plasmid proteins (ResP, KfrA, ArdK, StbA, TrwA and KorA) able to repress at least one of the plasmid promoters. (Supporting Table S1 and Supporting figure S1). Among the regulators identified, we did not find any transcriptional activator. All regulators were repressors involved in negative feedback loops (Figure 3A). Three of them controlled only their own promoter, thus constituting simple negative feedback loops (ResP, KfrA and TrwA). Another three (ArdK, StbA and KorA) controlled more complicated circuits. Protein ArdK repressed expression from *PardC*, *Porf7*, *Porf12*, *Porf14* and *Pssb*, its own promoter (Supporting fig. S1). All these promoters direct the transcription of genes involved in the stable maintenance of the plasmid [3]. Therefore, ArdK seems to regulate the vegetative maintenance of plasmid R388. Similarly, protein KorA was found to regulate *P_{trwH}*, *P_{korA}*, *P_{kikA}*, *P_{korB}* and its own promoter, *P_{korA}* (Supporting Fig. S2). All these promoters are responsible for

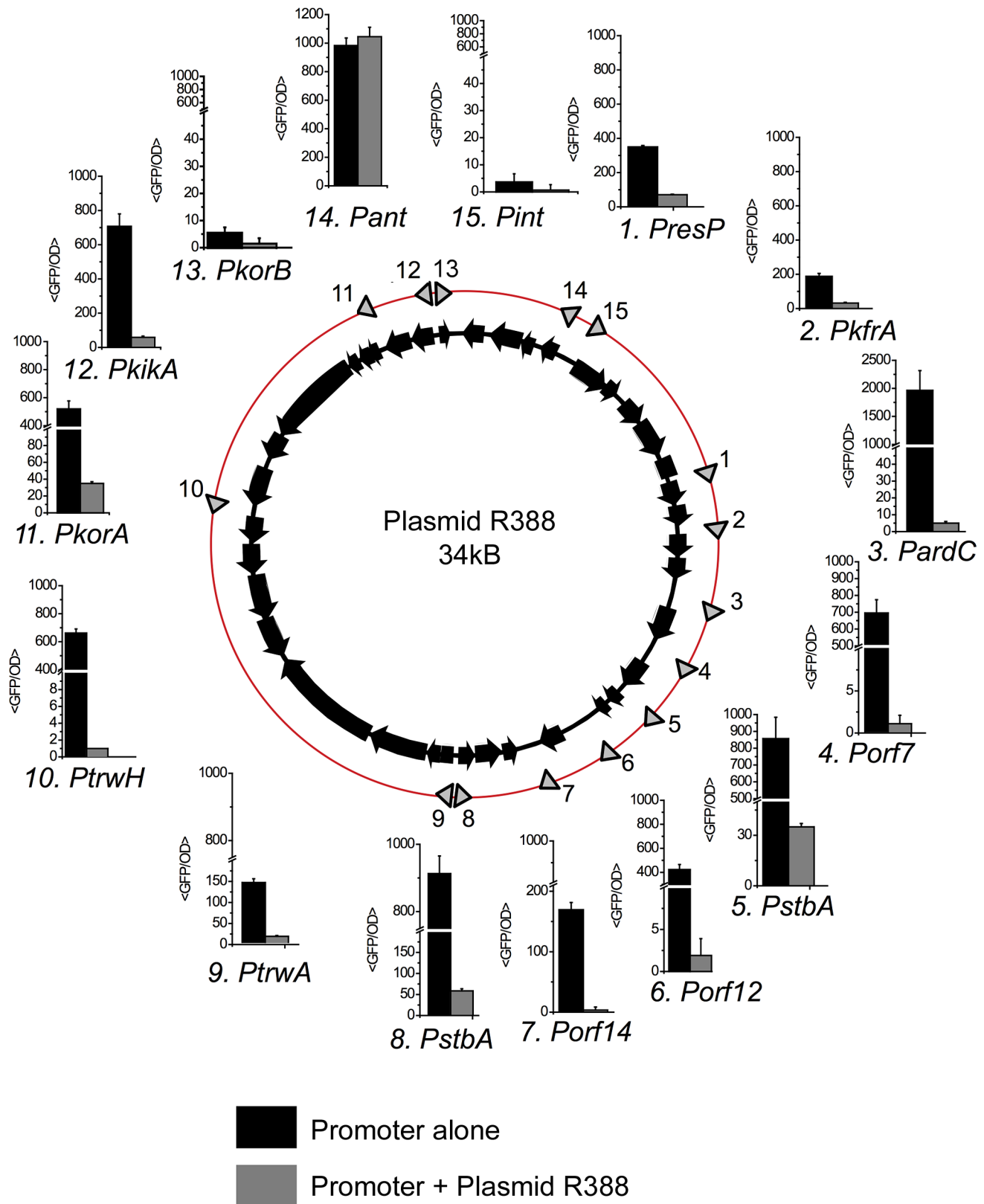


Figure 1. Promoters in plasmid R388. The figure shows the location and transcriptional activity of promoters detected in plasmid R388 genome. The location of each promoter is indicated by an arrow on the red circle. Each promoter receives the name of the first gene encoded in the transcriptional unit. Bar charts indicate the expression levels when the promoter activity was measured alone (black columns) or in cells that also contained plasmid R388 (grey columns). The expression levels (<GFP/OD>) represent the average GFP/OD ($\times 10^2$) level achieved by cells growing in exponential phase. Each column represents the average and standard deviation of at least five independent experiments.
doi:10.1371/journal.pgen.1004171.g001

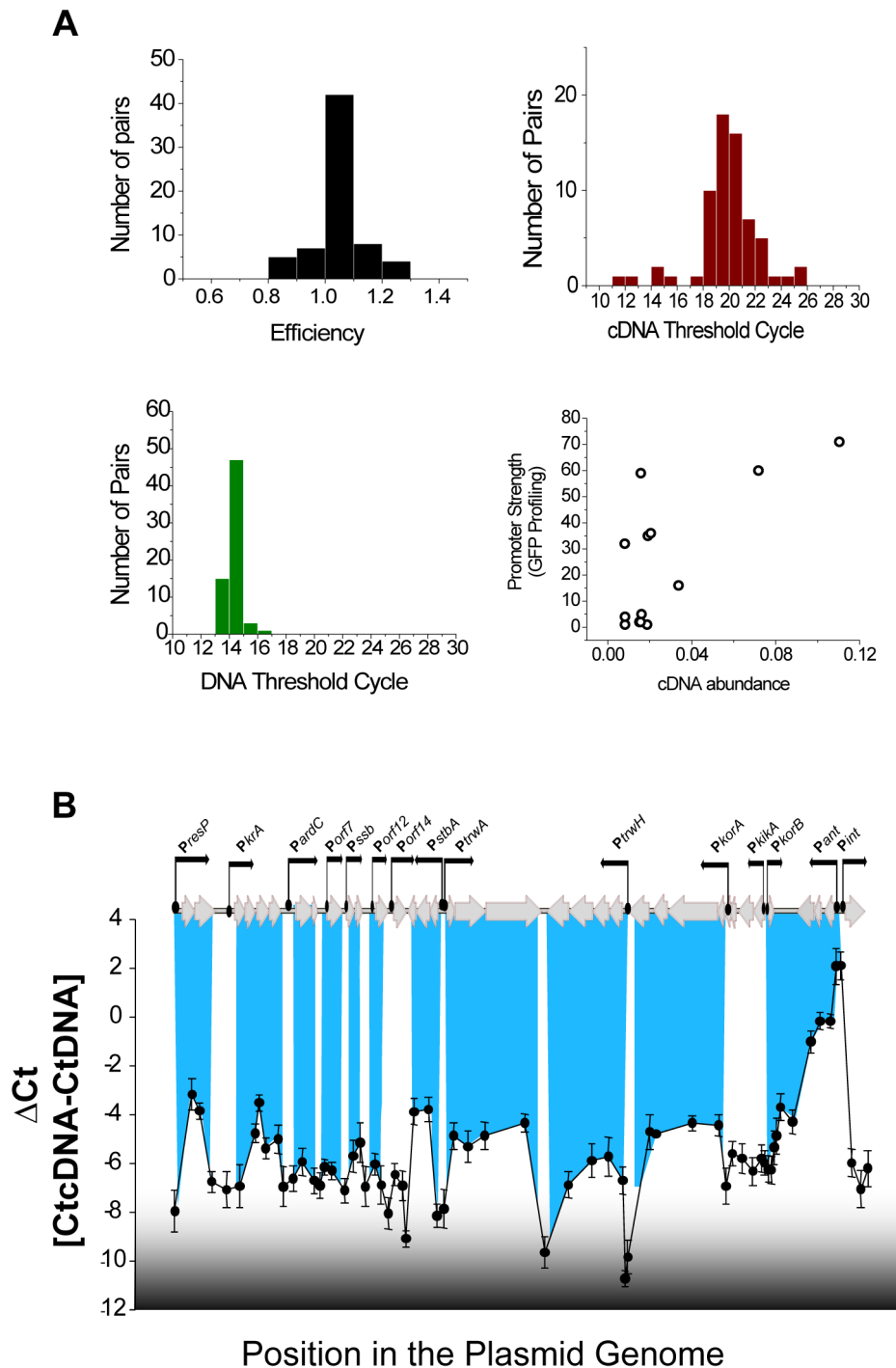


Figure 2. Transcriptional units in plasmid R388. (A) Statistics of the 66 primer pairs used to measure transcriptional levels in plasmid R388 (Upper left) Histogram showing the efficiency (calculated as indicated in materials and methods) of the primer pairs. (Upper right) Histogram showing the Ct obtained in qPCR amplifications from plasmid cDNA. (Lower left) Histogram showing the Ct obtained in qPCR amplifications from purified plasmid DNA. (Lower right) Scatter plot showing the relationship between the promoter activity (obtained from figure 1, in GFP/OD unit on the y axis) and the mRNA levels measured by RT-qPCR (ΔCt , x axis). (B) Transcriptional landscape of plasmid R388. The graph shows the relative abundance of mRNA, indicated as $\Delta Ct = Ct_{cDNA} - Ct_{DNA}$ along the plasmid genome. Each unit in the y axis corresponds to a 2 fold increase in mRNA. Peaks correspond to highly transcribed regions and valleys correspond to non-transcribed regions. The highlighted blue lines indicate the overlapping of the transcriptional units and the plasmid promoters identified in figure 1. doi:10.1371/journal.pgen.1004171.g002

expression of the Type IV secretion system, involved in plasmid conjugation. Therefore, *KorA* acted as the main transcriptional regulator for expression of the conjugative pilus. The third protein

involved in a complex regulatory circuit was *StbA*. Gene *stbA* is part of an operon responsible for plasmid segregation [22] and was found to decrease *P_{stbA}* transcription 50-fold (Figure 3A, Supporting

Table S1). StbA also repressed transcription from promoters **P***ardC*, **P***orf7*, **P***orf12* and **P***orf14*; indicating that its target repertoire overlaps with that of ArdK (Supporting Fig. S1). Similarly, StbA repressed the promoters targeted by KorA, although the level of repression exerted was significantly lower (2 to 10-fold decrease compared to the 90-fold decrease produced by KorA on **P***truH*) (Supporting Fig. S2). Interestingly, previous work on StbABC showed that this operon balances plasmid partition and conjugation [23]. Results presented here indicate that StbA acts as a common regulator for genes involved in the vegetative and conjugative functions of the plasmid.

These results allowed us to determine the topology of plasmid R388 transcriptional network, which is depicted in Figure 3B. The network is completely dominated by negative repression, and promoter activation will depend on signals leveraging the action of plasmid repressors. In order to identify the signals that the network responded to, we challenged the plasmid with a plethora of

environmental changes. We modified growth medium (LB, minimal M9), temperature (30, 37 and 42°C) and tested the presence of stressing agents, like sub-inhibitory concentrations of antibiotics and common triggers of the SOS response (Materials and Methods). As judged from fluorescent expression profiling, none of these signals was found to specifically activate any promoter in the network (Supporting figures S3, S4 and S5). The possible effect of *Escherichia coli* recipient cells was also tested by co-culture in liquid media with plasmid free cells (Supporting figure S6). Since plasmid R388 can only conjugate on solid surfaces [24], these conditions prevented horizontal transfer of the plasmid, while allowing the donors to sense any potential signal from the recipient cells. Again, the regulatory network was unresponsive (Supporting figure S6), indicating that, in the conditions tested, the network did not respond to any diffusible signal from the recipient cells. Altogether these results indicated that plasmid R388 does neither respond to pheromones (unlike many plasmids from *Gram*

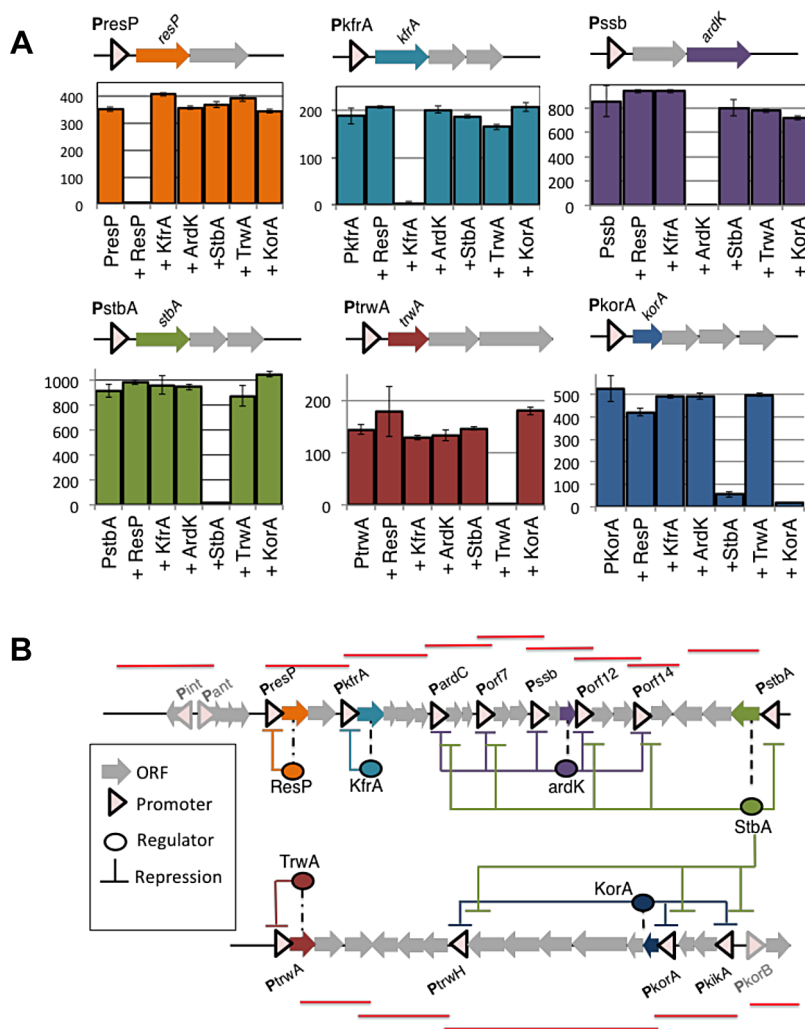


Figure 3. Negative feedbacks and topology of plasmid R388 transcriptional network. (A). Each panel shows the transcriptional activity (GFP/OD) ($\times 10^2$) of a given promoter, either alone or in the presence of each of the six transcriptional repressors (ResP, KfrA, ArdK, StbA, TrwA and KorA). Repressors were produced from a co-residing expression vector pBAD33, and the negative control indicates the GFP/OD ($\times 10^2$) values obtained in the presence of the empty vector. The upper diagrams show the location of each regulator with respect to its cognate promoter in plasmid R388 (B) A graphical representation of expression profiling data (shown in Supporting figures S3 and S4) unveils the topology of the regulatory circuitry. Coloured arrows indicate the position of transcriptional regulators within plasmid R388 genome (ResP in orange, KfrA in blue, ArdK in purple, StbA in green, TrwA in red and KorA in navy blue). The regulatory links are coloured according to the same code. Red lines shown over the ORF map correspond to the transcriptional units identified in Figure 2.

+ bacteria [15]), nor quorum sensing signals (unlike Ti plasmids from *Agrobacterium* [16,17]) nor SOS inducing agents (like many phages and ICEs [25])

The absence of responses against environmental challenges, DNA damage or quorum signals suggested that plasmid regulation is disconnected from the main sensory circuitry of the host cell. However, sensing is not the only function that transcriptional regulation can undertake; generating temporal programs, or guarding the cell homeostasis are also adaptive functions that arise purely from the internal dynamics of regulatory systems. In order to study the internal dynamics of the plasmid network, we used a simple quantitative model. Since all transcriptional regulators in the plasmid were self-repressors (Figure 3), we used a simple ordinary differential equations (ODE) model of a negative feedback loop. Let X denote the mRNA and Y the protein concentrations for a given feedback loop, the system of differential equations that describe the system follows:

$$\begin{aligned} \underbrace{\frac{dx}{dt}}_{\text{mRNA turnover}} &= \underbrace{\lambda_1 \frac{k^n}{k^n + y^n}}_{\text{production}} - \underbrace{\beta_1 x}_{\text{degradation}} \\ \underbrace{\frac{dy}{dt}}_{\text{protein turnover}} &= \underbrace{\lambda_2 x}_{\text{production}} - \underbrace{\beta_2 y}_{\text{degradation}} \end{aligned} \quad (1)$$

This equation is based on the assumption that, in the absence of repressor binding, mRNA is transcribed at rate λ_1 , and translated at rate λ_2 . Repressor binding is modelled following simple mass-action kinetics. This binding is characterized by a half maximal binding constant k , which is the ratio between the dissociation and binding constants ($k = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$). The model allows cooperative binding, with cooperativity index n ($n=1$ for non cooperative binding). Parameters β_1 and β_2 correspond to the degradation rates of mRNA and the regulator, respectively. This simple ODE model has been extensively used in the literature, and was shown to confer different properties, such as decrease the response time and increase the stability of transcriptional sensory systems [26,27]. These properties are characteristic of negative feedback loops whose components (mRNAs and proteins) are in steady state. However, apart from these and other steady-state properties, NFLs are known to exhibit transient behaviours while adjusting to the steady-state. In electrical engineering it is well known that NFLs can overshoot before reaching steady-state when they start from initial zero conditions ($x=0$, $y=0$ at $t=0$). In biological contexts, this property has received little attention, the reason being that daughter cells inherit not only the chromosome but also a proportional part of its regulatory elements. Thus, in the normal life of bacteria, transcriptional NFLs do not usually experience situations with zero concentration of its constituents. However, conjugative plasmids have a specific mechanism of invasion, entering a cell in the form of ssDNA, without accompanying mRNAs or transcriptional regulators. Simulations of Eq 1. mimicking these conditions produced an overshoot, showing that both the mRNA and the protein experienced a transitory burst and then relaxed to their steady state values (Figure 4A). While mathematical analysis indicated that a temporal lag between the mRNA and the protein was enough to produce overshooting (Supporting Text S1), computational analysis indicated that the magnitude of this overshoot is heavily dependent on the parameters of the system. Defining the magnitude of the overshoot as the ratio between the maximal levels reached by X (X_{max}) and

the value of X at steady state (X_{ss}), simulations showed that increasing the promoter strength (λ) or decreasing K (increasing the strength of the repression, i.e. the affinity of the regulator for its cognate site) increased correspondingly the size of the transcriptional overshoot (Figure 4A). This dependency strongly suggested that there should be a correlation between the overshoot and the relative strength of the repression exerted by the NFL. The relative strength of the feedback can be expressed in terms of feedback gain (G) (Figure 4B). We define G as the ratio between the steady states shown by the open loop (without the repressor) and the closed loop (with the repressor)

$$G = \left(\frac{\lambda_1 \lambda_2}{\beta_1 \beta_2 k} \right)^{\frac{n}{n+1}} \quad (2)$$

This expression indicates that the feedback gain is directly dependent on the transcriptional/translational strength ($\lambda_1 \lambda_2$) and inversely correlated to the feedback constant k . Similarly, the overshoot (O) can be expressed as the ratio between the maximum value on X divided by its steady state. Then, by linearizing X before the onset of the repression loop we can approximate O as:

$$O_x \cong (1 - e^{-\beta_1 t_{x=\text{max}}}) G \quad (3)$$

This approximation indicates that the stronger the gain (G) the higher the overshoot will be. This approximation holds for highly non-linear systems, with high values of n (Figure 4C, left panel). However, if we introduce a dimerization step where two monomers of repressor Y need to interact to form an active dimer, the approximation holds for all n (Figure 4C, right panel). The fact that nearly all transcription factors from Prokaryotes act as multimers indicates that this is a conservative assumption [28]. Equation 3 indicates that O is proportional to the gain G , and to the time to reach the maximal value of X (in the limit $t \rightarrow \infty$, $e^{-\beta_1 t} \approx 0$ and $O \approx G$). This means that O increases with higher delays, and the higher the feedback gain, the more prominent the transcriptional overshoot will be. Previous computational analysis of other feedback loops showed similar dependencies between the intensity of the overshoot and the strength of the feedback gain [29]. Therefore, simulations and theory predicted that a network architecture based on strong promoters, tightly repressed in negative feedback loops, would exhibit significant transient overshooting after HGT. For more complex circuits of the plasmid network that are under the control of two transcriptional regulators, transient overshooting is also expected (Supporting figure S7). Due to the OR logic that rules these circuits, the overshooting was dependent on the transcriptional regulator that first achieved its effective values. This, in turn, will depend of its affinity for the target promoter (k) and its own transcriptional/translational strength, as in simple NFLs.

To test whether this transcriptional overshoot could be detected experimentally, we determined mRNA expression levels during conjugative transfer of the plasmid. Conjugative mixes with 1:1 donor/recipient cell ratio were allowed to mate for 0, 30, 60, 90 and 120 min. Total RNA was extracted from time samples, and expression levels from the main plasmid operons were measured by RT-qPCR. Expression levels were normalized by the results obtained from a constitutive chromosomal gene (*dxs*). In order to check for possible mRNA increases due to conjugative replication of the plasmid, we measured the relative increase in non-transcribed regions (*oriT*), and also in promoters that were not negatively regulated (*dhfR* gene, controlled by **Pantf**). Experimental

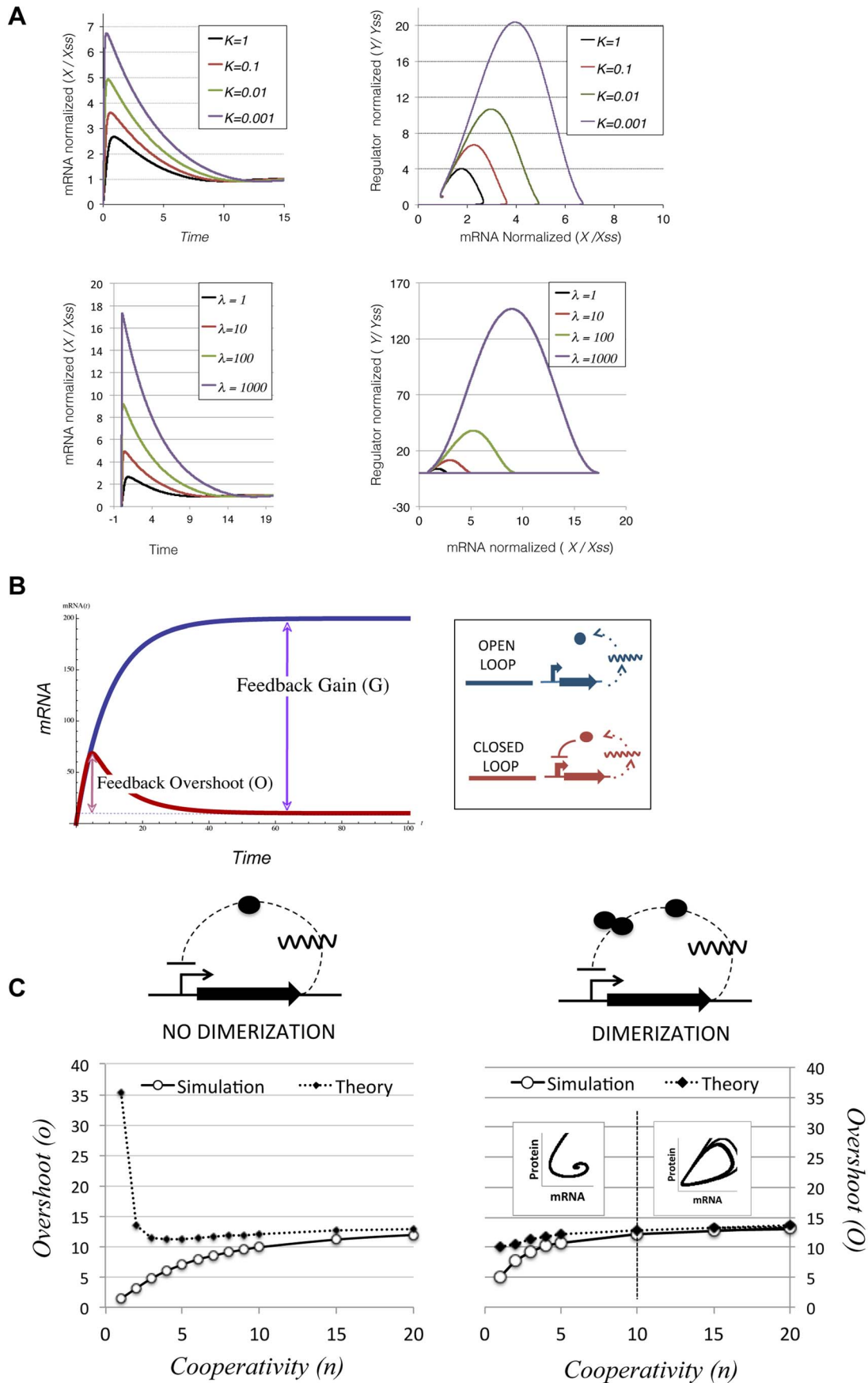


Figure 4. Transcriptional overshooting and its relationship with feedback gain. (A) Numerical simulations showing the effect of increasing feedback gain on the magnitude of the transcriptional overshoot. Left panels show the relative abundance of mRNA (X) normalized by its steady-state value (X_{ss}) along time. Right panels show the phase-plane portrait of the system, where the x axis corresponds to the normalized mRNA values (variable X in Ec.1) and the y axis corresponds to the normalized regulator levels (variable Y in Ec.1). Values were normalized by their respective steady-state levels. Upper panels show the effect of increasing the feedback gain by decreasing the feedback constant K. Simulations were performed with $\lambda_1 = 10$, $\beta_2 = 0.2$, $\lambda_2 = 10$, $\beta_1 = 1$ and $n = 1$. Lower panels show the effect of increasing the feedback gain by increasing the intrinsic transcription rate λ_1 . Simulations were performed with $\lambda_1 = 0.01$, $\beta_2 = 0.2$, $\lambda_2 = 10$, $\beta_1 = 1$ and $n = 1$. The figure shows that the maximal values of X and Y grow as the feedback gain is increased, either by decreasing K or increasing λ_1 (B) Scheme showing the theoretical time evolution of an open loop (blue) and a closed negative feedback loop (red). The feedback gain (G) corresponds to the ratio between the steady states of both systems, being all parameters equal (blue dashed line). The overshoot (O) corresponds to the transient production above the steady-state levels experienced by the closed loop when starting from initial conditions $t = 0$, $x = 0$, $y = 0$ (red dashed line) (C) Performance of the theoretical approximation described in Ec. 4, compared to numerical simulations. Both panels show results obtained by numerical integration of Ec.1 (white dots) and predicted overshoots obtained from Ec. 4 (black dots). All simulations and calculations were done in a system with parameters $k = 0.01$, $\lambda_1 = 10$, $\beta_2 = 0.2$, $\lambda_2 = 10$, $\beta_1 = 1$ and changing the cooperativity of the repression (n , x axis). The left panel corresponds to a system where regulator Y is allowed to repress its own synthesis immediately after translation, while the right panel corresponds to the same system but including the requirement of Y dimerization before binding to DNA. Dimer formation is simulated by a simple ODE with $K_d = 0.1$ and $K_d = 0.01$. The inner graphs on the right chart show the phase-portrait of the system, with mRNA on the x axis and regulator concentration on the y axis. As shown in the figure, when the number of binding sites is higher than $n = 10$ the system becomes cyclostationary, opening the possibility of periodical bursts of transcription.

procedures are detailed in materials and methods. Results, shown in figure 5, indicated that the expression levels of *oriT* and *dhfR* showed limited changes, while genes controlled by negative regulation (*resP*, *ardC*, *ssb*, *klcB*, *trwA* and *trwF*) increased their relative abundance immediately after conjugation. Experimental results showed that those genes that showed the highest induction

(*trwF*, *ardC*, *ssb* and *klcB*) corresponded to promoters with the higher gains (**P**trwH, **P**ardC, **P**ssb and **P**orf12). On the other hand, those promoters with lower gains (**P**trwA and **P**resP) also yielded lower overshoots (*trwA*, *repA* in fig. 5), as predicted by theory. Since conjugation is inherently asynchronous (newly formed transconjugants become donors and infect new receptors),

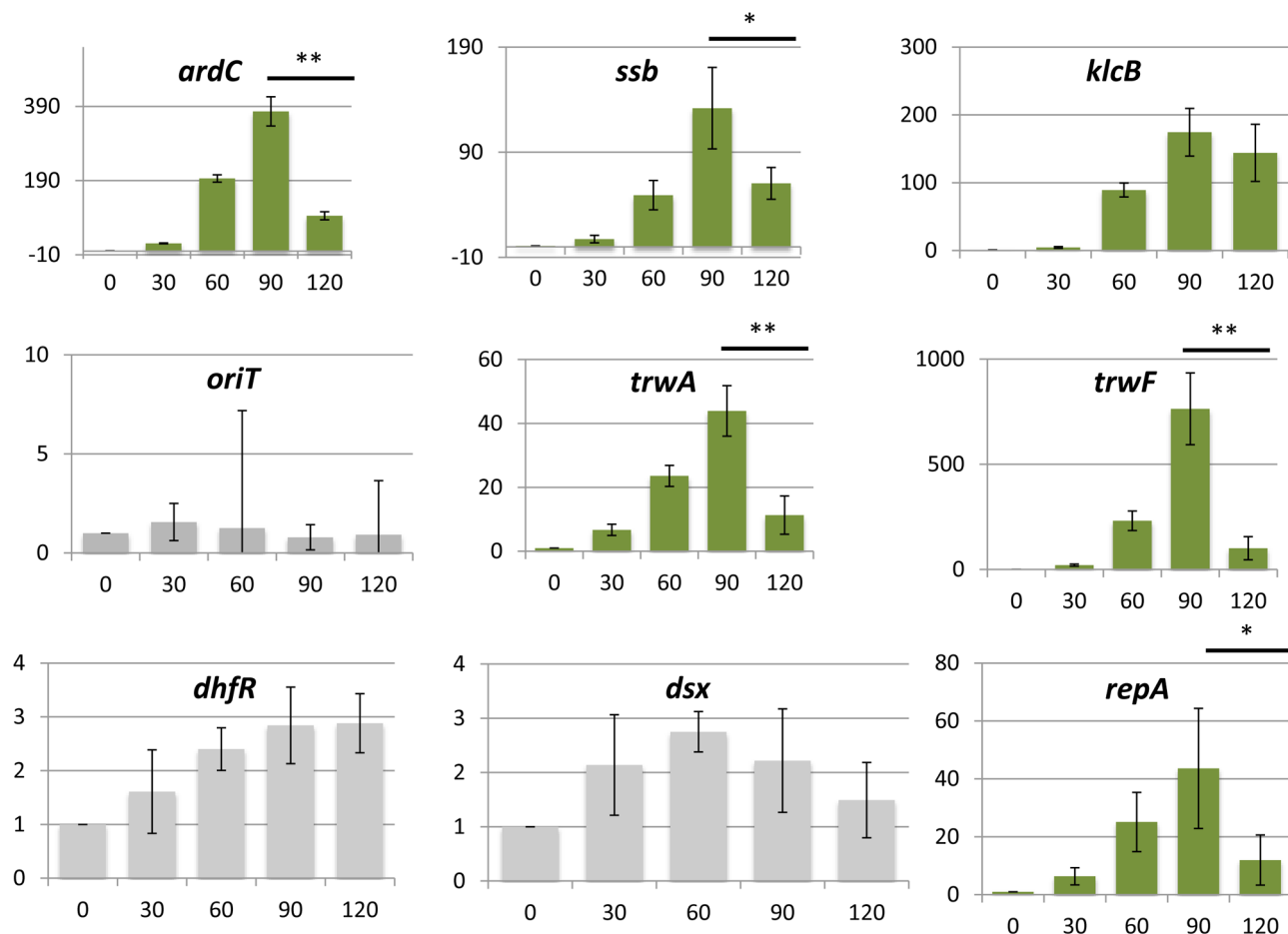


Figure 5. Promoter induction after horizontal transfer of the plasmid. RT-qPCR was used to measure mRNA levels. Bars indicate the relative ratio of mRNA at each time point compared to the values obtained in the absence of conjugation (time 0). Asterisks indicate the statistical significance of the differences observed * = $p < 0.1$, ** = $p < 0.05$. Experimental procedures and calculations are detailed in Materials and Methods and expanded results are shown in Supporting Figure S4. Measurements represent the average of three independent mRNA extractions.

our population measurements resolved poorly the actual kinetics of the overshoot. Also, the kinetics of the overshoot for individual NFLs will depend critically on the mRNA half-life (Eq.3), which is also likely to be variable from gene to gene. As a consequence, the decrease in the overshoot is only observable in some of the genes tested (*ardC*, *ssb*, *trwH* *trwA*). However, steady-state measurements (equivalent to time 0 in figure 5) indicated that all promoters would eventually return to basal levels. For the *klcB* gene, controlled by **Porf12** promoter, which yielded no observable overshoot, it is not possible to state at this point whether the overshoot was obscured by population effects, or the parameters of this promoter did not yield any significant overshoot.

This transient induction could have phenotypic effects on the host cell. Plasmids impose a burden on the host, meaning that, in the absence of positive selection for plasmid-encoded traits like antibiotic resistances, plasmids must survive as parasitic entities [30,31,32]. It is conceivable that a transient increase in plasmid gene expression will translate into a higher burden to the host cell. To test whether any effect on host fitness could be observed, we measured the growth rates of donor, recipient and transconjugant cells, immediately after conjugation. We used two spontaneous Rif^r and Nx^r mutants of *E.coli* strain Bw27783, which showed no observable differences in growth rate (figure 6A). Cells from both strains that had carried the plasmid for at least 10 generations exhibited a 17% increase in the generation time when compared to plasmid free cells (Figure 6A). This indicated that the plasmid exerted a measurable burden on the host. Plasmid conjugation assays were performed on LB agar surfaces in a 1:1 donor/recipient ratio, and cells were allowed to mate for 30 min. Conjugation was stopped by resuspending cells from the solid surface, cells were diluted to OD₆₀₀ ≈ 0.01 in fresh LB, placed in agitation at 37 °C and allowed to grow for 5 h (Figure 6B). Growth rates were measured by plating on selective antibiotics (materials and methods). Plasmid R388 does not conjugate in liquid media, thus any variation in the proportion of donors, recipients and transconjugants must be due to relative differences in growth rates. Results, shown in figure 6C, indicated that transconjugant cells suffered a remarkable decrease in growth rate immediately after conjugation, showing a first generation time of about 2.5 × times that of donor cells. However, after this long first generation, transconjugant cells recovered, achieving the same number of divisions as donor cells for the total duration of the experiment (7 generations). Similar results were obtained when donor and recipient strains were reversed (Supporting Figure S8). The observed growth deficit in the transconjugants could be a by-product of the conjugation mechanism, which requires the piercing of the recipient cell by the transfer apparatus. To test whether this was the case, we carried out a similar experiment with a mobilizable plasmid. In this case, a small cloning vector carrying just the origin of transfer (*oriT*) of plasmid R388 was mobilized into recipient cells by means of an *oriT*[−] mutant of plasmid R388. Under these conditions, plasmid R388 does not move itself, but is still able to produce a conjugative pilus and thus mobilize the small vector into the recipient cells. Results show that vector mobilization did not produce a significant decrease in the growth rate of transconjugant cells (Supporting Figure S8). This indicated that the transitory deficit in growth rate was not due to cell injuries produced by the mechanism of conjugation, but was a consequence of the entry of the conjugative plasmid inside the recipient cell.

Discussion

The intensity of HGT in the microbial world, and the prevalence of plasmids in nature indicate that plasmids are successful in colonizing microbial populations. Yet multilevel

selection imposes opposing demands on plasmid physiology that require a delicate equilibrium between the expression of plasmid functions and the burden imposed on the host cell [9]. Understanding the regulatory mechanisms of plasmid transcriptional control might shed light on the way plasmids conciliate these requirements.

In this work we describe the topology and dynamics of the transcriptional network of plasmid R388, the smallest BHR plasmid from *Proteobacteria*. The network consisted exclusively of transcriptional repressors. This preference for transcriptional repression is in contrast with the situation described for the regulatory networks of bacterial chromosomes. For example, in *E.coli* the number of transcriptional activators roughly equals the number of repressors [33]. However, other transcriptional networks from BHR plasmids, like plasmid RP4, were also found to depend solely on transcriptional repressors [11]. In plasmid R388, transcriptional repression was exerted mainly in the form of negative feedback loops. These feedback loops showed high gains (defined as the ratio between the expression levels of the open and the closed feedback loops). Although we are not aware of any systematic, quantitative study of a plasmid regulatory network, several independent studies have reported that the regulatory network of plasmid RP4 contains strong promoters that are kept tightly repressed by the plasmid regulators [14,34,35,36,37,38]. Remarkably, plasmids R388 and RP4 show similar broad host ranges, but they are not phylogenetically related [3,4,39]. This indicates that both plasmids, which presumably suffer from analogous selective constraints, have independently evolved transcriptional networks with analogous topologies.

Simulations and theory indicate that whenever a negative feedback loop has a gain higher than 1 and a certain time delay between the mRNA and the regulatory protein, the system would show transient overshooting (Eq 3 and figure 4A). The actual production of the overshoot requires the system to begin with zero initial concentration of transcriptional repressors ($t=0$, $x=0$, $y=0$, in Eq 1), allowing the separation of timescales to produce a period of repressor-free transcription. For conjugative plasmids, this situation is met every time the plasmid enters into a new cell by conjugation. In fact, any negative feedback loop that undergoes conjugation is likely to experience transient overshooting. It has been known for a long time that a lysogenic phage transferred by *Hfr* conjugation (an artificial system that allows the horizontal transfer of the entire chromosome), can become lytic when entering into a new host [40]. A similar behavior was also observed when an RFP-TetR autogenously regulated cassette was inserted in the *E.coli* chromosome and transferred by *Hfr* conjugation into a new cell [41]. Transient overshooting is therefore an epiphenomenon associated to negative feedback loops that experience some sort of “genome rebooting”, a condition where the transcriptional/translational machinery is present, but the regulatory network is transitory absent.

Simulations and theory also indicated that the overshoot is expected to be higher whenever the feedback loop has a high gain. Plasmid promoters were shown to contain feedback loops with characteristic high gains. RT-qPCR analysis showed a transcriptional burst in 5 out of 6 plasmid promoters subjected to NFLs, when the plasmid transferred horizontally into a new population (Figure 5). Untranscribed regions (*oriT*), or plasmid genes that were not under the control of a negative regulator (*dhfR*), did not show similar increases (Figure 5). This indicates that the observed effect is not due to conjugation increasing the abundance of plasmid molecules within the population. Moreover, given that the conjugative mix contained a 50% ratio of donor/recipient cells, the maximal increase that conjugation could cause is 2-fold. The

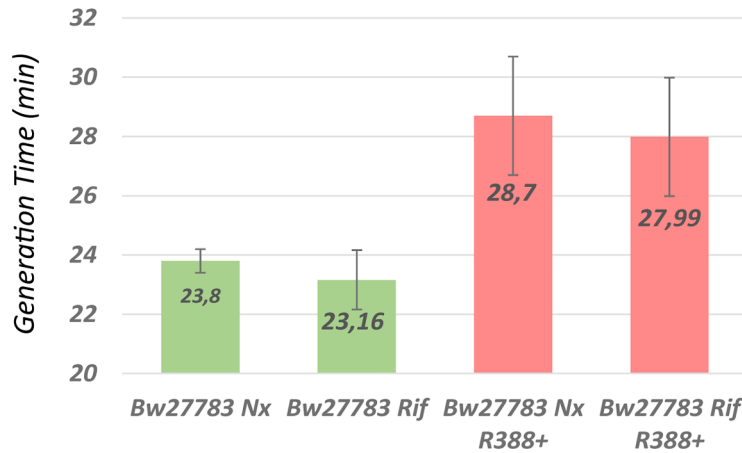
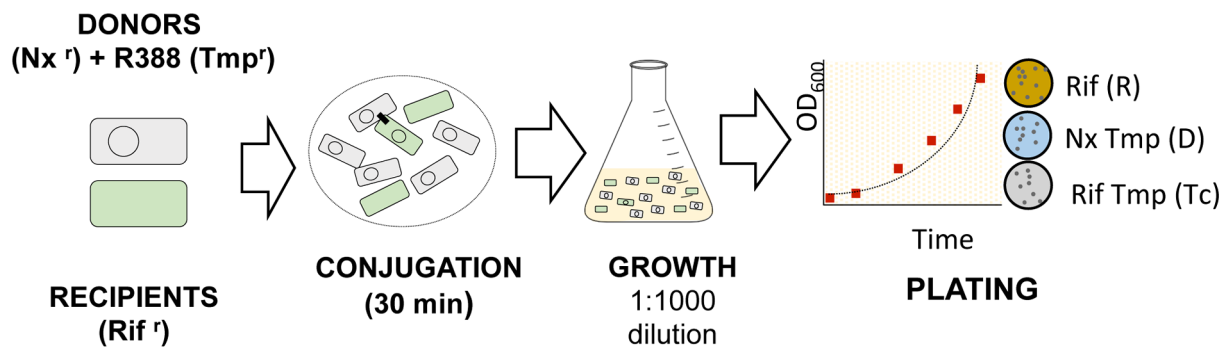
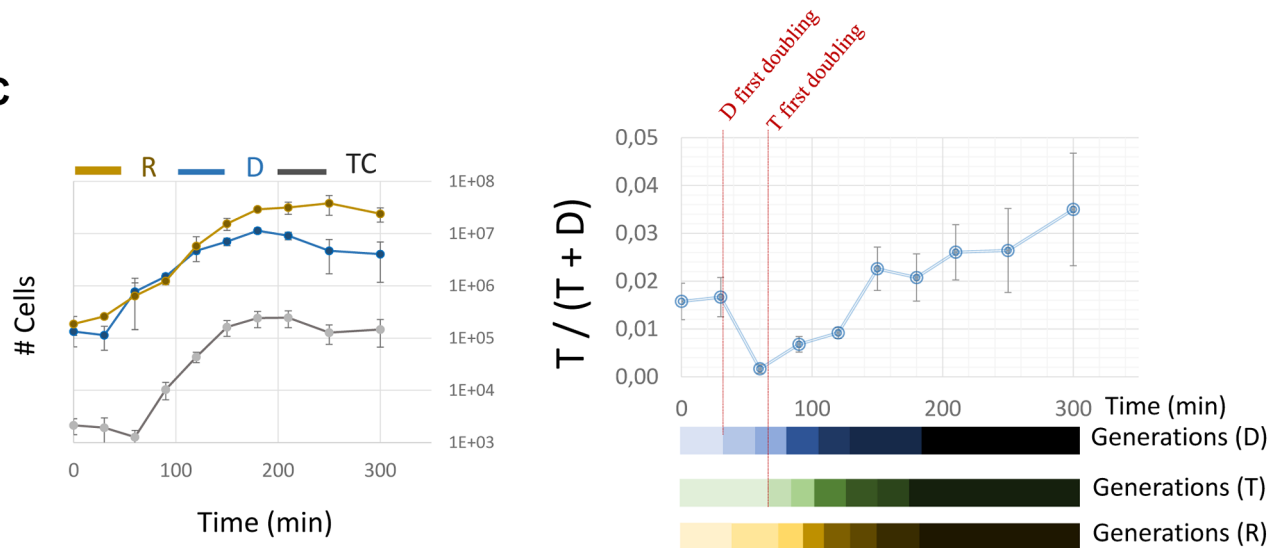
A**B****C**

Figure 6. Transconjugants experience a growth deficit immediately after conjugation. (A) Generation times (in minutes) of *E. coli* Bw27783 with or without plasmid R388. Results represent the average and standard deviation of 12 experiments. (B) Scheme showing the experimental design to test the effect of plasmid conjugation in early transconjugants. Donor and recipient cells were grown in LB broth in the presence of selective antibiotics and mixed in 1:1 conjugations on LB-Agar. Conjugation was allowed to take place for 30 minutes and cells were resuspended in fresh LB. Plate counting was used to determine the number of donors (D) recipients (R) and transconjugants (Tc). (C) Results of the competition experiments between D, R and Tc cells. (Left panel) Absolute numbers (cells/ml) of each species along the time course of the experiment. Each data point was measured by triplicate. (Right panel) Proportion of plasmid containing cells that are transconjugants along the time course of the experiment. Since plasmid R388 does not conjugate in liquid media, all variations in the relative proportions of Tc cells to D and R cells must be due to differences in growth. Results show a decrease in the relative abundance of Tc cells compared to D cells, that recovers after $t = 90$ minutes. The lower bars indicate the apparent generation times for each cell type calculated from data shown on the left panel.

increase of mRNA abundance was not due to cell growth either, since results were normalized by the increase experienced by a constitutively expressed chromosomal gene (*dxs*). Gene *dxs* showed a maximal increase of 2-fold, indicating that cell growth is a minor contributor to the observed bursts in mRNA levels. These results cannot be considered absolute quantifications of the transcriptional overshooting, because our measurements involved entire populations (which contained donor and recipient cells), and bacterial conjugation is an asynchronous process. However, although our quantitative results might be blurred by population effects, the general trend predicted by theory and simulations was sound: those promoted that showed higher gains also showed the higher overshoots.

Plasmids are known to produce fitness deficits on their hosts. This effect has been usually ascribed to the metabolic burden imposed by expression of plasmid genes. Therefore, any increase in expression levels caused by transient overshooting might have its counterpart in the growth rate of the host cell. We measured the growth rates of newly formed transconjugants and found that the plasmid induced a deficit that was transiently high (250% increase in generation time), relaxing later to a 17% increase compared to plasmid free cells. This was not caused by any physical damage produced by the mechanism of conjugation, and correlates in time with the induction of plasmid genes after transfer. Altogether, these results strongly suggest that overshooting after HGT has a measurable impact on the host growth rate. Although this kind of effect has been traditionally ascribed to metabolic burden, it is also possible that the toxic effects of specific plasmid proteins could contribute. Since the growth deficit roughly corresponds to the time of overshoot decay (figure 5 and figure 6C) the most plausible explanation is that growth deficit be caused by the transcription/translation of the plasmid genes. This would also explain why, when the recipient cells recover, they grow as fast as recipient cells for a few generations.

One intriguing question then is why has the plasmid evolved a network based exclusively on NFLs, when this motif is likely to overshoot after conjugative transfer, temporarily hampering the host growth rate? Other broad host range plasmids show convergent architectures, suggesting that despite this temporary fitness deficit, negative feedback might have some adaptive property for the plasmid lifestyle. Indeed, negative feedback has been shown to exhibit a number of adaptive properties, speeding up the response time of sensory regulatory networks [27], reducing transcriptional noise [42,43], driving noise to higher frequencies and allowing easier filtering [44]. Speeding up the response is a property associated to sensory systems, and so far the plasmid network has not shown responses to any specific signals. Noise control might be more interesting for plasmids, given that plasmid replication is extremely sensitive to fluctuations [45,46]. However this problem is restricted mainly to replication, and does not explain why the same regulatory strategy is widespread in the entire plasmid backbone.

It is also possible that transient overshooting provides an adaptive benefit for the particular lifestyle of conjugative plasmids. Plasmids spread horizontally, by invading new cells, and vertically, as the host cell reproduces. Like many other parasites that share this double reproductive strategy, plasmids suffer from opposing selective forces, summarized in the observation that increased infectivity usually results in increased virulence. This inverse relationship is well known in plasmids and phages [30,31,32], and if a given plasmid increases the expression levels of its own plasmid products (especially those that are *cis*-acting), it would also increase its intracellular fitness, at the cost of penalizing the host [9]. Penalizing the host, in turn, decreases the ability of the host cell to

compete with its neighbours [9], and thus the plasmid experiences lower vertical transmission rates. Although both selection processes are intrinsically in conflict, the timescales involved in each of them are different. The decrease on host fitness imposed by the plasmid metabolic burden is usually low (% in the case of plasmid R388), meaning that intercellular selection acts by the accumulation of small fitness deficits over long periods of time [5,6,8]. On the other hand, intracellular selection is more pronounced in the initial stages of infection, since a cell that has received the plasmid is still susceptible to superinfection until the surface exclusion systems have been deployed [9] [47]. Therefore, it is in the interest of the first plasmid that enters into a cell to block the entrance of other plasmid copies, and to reach the steady-state copy number as soon as possible. Transcriptional overshooting after HGT would allow the plasmid to produce a vigorous transcriptional response when intracellular selection is more acute. The transient nature of this response would guarantee that the long-term effects on intercellular selection are minimized. Indeed competition experiments showed that, despite the severe initial effect on the host growth rate, transconjugants recovered quickly and were able to achieve the same number of cell divisions as the original donors. Note also that since transconjugants are able to act as donors, conjugation results in an infectious process that proceeds geometrically in the population. If overexpression of conjugative functions results in increased transfer efficiency, a transient overshoot would provide the invading plasmids with higher infectivity. This property will be maintained as long as new cells are infected. If the availability of possible receptors decreases, the overshoot transient nature guarantees that the plasmid population relaxes to a “silent” state, minimizing the burden on the host and improving vertical transmission. Such a mechanism would provide the plasmid population with a mechanism to switch from horizontal to vertical reproduction modes depending on the availability of susceptible receptors. Other lines of evidence also point to this possibility. The *stbABC* operon of plasmid R388 has been shown to balance the requirements for vegetative stability and conjugative transfer [23]

The fact that transient overshooting is linked to genome rebooting is also interesting from a synthetic biology perspective. Plasmids are nature counterparts of genomic transplantations. In fact, they can be considered as genetic devices for the unidirectional injection of genomes into suitable recipient cells. So far, efforts to transplant whole chromosomes have been restricted to species that share a high degree of genomic identity [48]. A close phylogenetic relationship implies that the regulatory networks of both species might show some cross-reactivity, which could be necessary to control the transplanted chromosome until it has built up its own regulatory system. Distantly related species, however, might show no cross-reactivity between their regulatory networks. Broad host conjugative plasmids are able to invade a wide variety of distantly related species. If we want to expand the range of possible transplants, we need to deal with problems identical to those faced by conjugative plasmids. In particular, how can a genome start up from just DNA and the transcriptional/translational machinery? Negative regulation, with high feedback gains and transient overshooting might be the solution evolved by natural plasmids.

Materials and Methods

Promoter library construction

Strains used were *Escherichia coli* C41 (*ompT hsdS_B (r_B[−] m_B[−]) gal dcm* (DE3)), *E. coli* Bw27783 (*lacI^{rrmB3} ΔlacZ4787 hsdR514 Δ(araBAD)567 Δ(rhaBAD)568 Δ(araFGH) Φ(ΔaraEp P_{CP8}-araE)* [49] and *E. coli* JM109 (*recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44,*

relA1, $\Delta(lac-proAB)/F'$ [*traD36*, *proAB*⁺, *lacI*^q, *lacZ*AM15]) Primer oligonucleotides (Supporting table S2) were designed to flank each R388 intergenic region longer than 30 bp, according to R388 genomic sequence (Genbank accession number BR000038) and purchased from Sigma. R388 plasmid DNA was extracted using Sigma GenElute Miniprep kit and used as template for PCR amplification. PCR amplification was carried out with Vent DNA polymerase (Biolabs) and consisted of 95°C for 10 min, then 28 cycles of 95°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 30 s and a final step of 72°C for 5 min. PCR products were digested with *XhoI* and *BamHI* at 37°C for 2 h and the products purified using QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Digested and purified fragments were ligated into pUA66 plasmid DNA using T4 ligase (Roche) with overnight incubation at 16°C. Transformation was accomplished by electroporation into Bw27783 strain. Transformants were selected in LB-agar plates containing 25 µg/ml kanamycin. Positive colonies were detected by PCR using pZE0.5 and pZE0.6 primers. DNA from positive colonies was extracted and insertions sequenced using the same primers as above. The set of reporter plasmids obtained is indicated in Supporting table S2.

Plasmid R388 was transferred to the reporter strains by conjugation. Donor bacteria were *E. coli* JM109 containing plasmid R388 and recipient bacteria were *E. coli* Bw27783 containing the corresponding reporter plasmid. Conjugations were carried out as previously described [50].

Fluorescent expression profiling

Transcriptional activity was determined by GFP expression profiling as described in [51]. Reporter strains were inoculated into enriched M9 Medium (M9 + casaminoacids 0.2%+ glycerol 0.5%) to which kanamycin (25 µg/ml) was added. To test the effect of subinhibitory concentrations of antibiotics, we used rifampicin and chloramphenicol following the protocol described in [52]. Results represent the average of at least 4 independent measurements. The S.O.S. response was induced exposing the cells to 5 or 10 seconds of UV light (254 nm, 15W). Mitomycin C was used at a final concentration of 5 µg/ml.

Effects of regulatory proteins

Selected R388 ORFs containing potential transcriptional regulators were PCR amplified with primers indicated in table S1. The resulting DNA segments were cloned in plasmid pET3a (Addgene). The genetic manipulation techniques were the same as those described above, except that *NdeI* and *BamHI* restriction endonucleases were used for cloning PCR products in pET3a expression vector. After transforming to *Escherichia coli* C41 strain, protein expression was induced by adding 0.1 mM IPTG to exponentially growing cultures and visualized by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (data not shown). Then each gene was subcloned in plasmid pBAD33 using *XbaI-Hind III* endonucleases. Plasmids obtained (table S2) were transformed to *E. coli* Bw27783 containing the corresponding reporter plasmids for further analysis. To determine the effect of potential regulatory proteins, pAR expression plasmids (Supporting table S2) were transformed into *E. coli* Bw27783 containing the corresponding reporter plasmid. Protein expression was induced by adding appropriate concentrations of arabinose [51] to M9-broth and fluorescence per OD unit (GFP/OD) was determined and compared to that produced by the same reporter strain when containing the empty expression vector pBAD33.

Quantification of mRNA levels

Total RNA was extracted from *E. coli* Bw27783 containing plasmid R388 and grown in LB media at 37°C. Cells were

harvested at OD₆₀₀=0.5 and RNA was extracted using RNeasy kit (Qiagen). Total RNA concentration was quantified using Experion RNA StdSens Analysis kit (Biorad). cDNA was obtained by reverse transcriptase (Omniscript, Qiagen) and the relative concentration of the target genes was determined by qPCR (ICycler, Biorad) using the IQ SYBR Green Supermix kit (Biorad). To determine the cDNA abundance, the threshold cycle (Ct) was determined using the ICycler software. A total of 66 primer pairs were manually designed to cover the entire genome of the plasmid, and the efficiency of each primer pair was determined measuring the Ct obtained from 3 different DNA concentrations (2.5, 5 and 10 ng). The sequence and efficiencies of each primer is shown in Supporting table S2. cDNA reactions were performed from 300 ng total RNA concentration and results were normalized by the Ct obtained from 5 ng of plasmid DNA purified by alkaline lysis.

RT-qPCR measurements of gene expression during conjugation

To determine the relative expression of plasmid genes during conjugation, 1 ml samples of donor (*E. coli* Bw27783 +R388 plasmid) and recipient (*E. coli* Bw27783) cultures were mixed in a 1:1 ratio, pelleted and resuspended in 100 l of fresh LB. Cells were then spread on LB-Agar and incubated at 37°C for 30, 60 or 90 min. After each conjugation period, cells were resuspended in 2 ml of fresh LB and total RNA was extracted as described in the previous paragraph. Primer pairs used are shown in supporting table S2. For each independent experiment measurements were performed in duplicate, and a total of 4 independent experiments were performed for each time point. In order to avoid artefacts introduced by cell manipulation, the RNA concentration at time 0 was determined following the same manipulation procedure, but cells were immediately resuspended after being plated in LB-Agar. The relative concentration of target RNAs (*r*) was determined by $r = E^{(\Delta Ct)}$ where *E* is the efficiency of the primer pair, calculated as in [21], and $\Delta Ct = Ct_{T=t} - Ct_{T=0}$. Results were normalized to the increase experienced by a chromosomal gene (*dxs*) using the ΔCt method, where $\Delta Ct = (Ct_{T=t} - Ct_{T=0})_{probe} - [Ct_{T=t} - Ct_{T=0}]_{dxs}$ [21]. Relative error was propagated using the standard propagated error formula. For the relative amount of a test mRNA (Ct) with respect to a given standard (Ct_{dxs}) the aforementioned formula yields $\sigma_x / \langle x \rangle = \ln(2) (\text{var}(Ct) + \text{var}(Ct_{dxs}) - 2\text{cov}(Ct, Ct_{dxs}))^{-1/2}$, where *var* stands for the variance and *cov* for the covariance. The statistical significance was ascertained using a one handed *t* test.

Competition after conjugation experiments

Two spontaneous mutants resistant to rifampicin and nalidixic acid from *E. coli* Bw27783 were obtained by plating in selective antibiotics. The stability of the mutation was tested and the strains were used as donor/recipients in conjugation experiments. Growth rates were determined from cells growing in LB broth at 37°C with agitation, and results showed that both strains had indistinguishable division times in such conditions (*n*=12). In order to measure the growth rate of donor, recipient transconjugant cells, we performed conjugations for *t*=30 minutes. Saturated cultures, grown overnight in LB at 37°C, were and diluted 1/1000 in fresh LB until cells reached an OD₆₀₀ of 0.1. Donor and recipient cells were mixed in a 1:1 ratio and concentrated 1000 times. A total of 15 microliters were deposited onto a LB agar plate and let at 37°C for 30 minutes to allow plasmid transfer. Cells were then resuspended in 3 ml of LB broth and allowed to grow at 37°C with agitation. Time samples were obtained every 30 min, and cells were diluted in 1×PBS to count the number of donor, recipients and transconjugants by plating in selective antibiotics.

Plating of early time points was performed 30 minutes after PBS resuspension, to allow the antibiotic markers to express to adequate levels. We checked that this treatment did not artificially increase the number of cells due to growth in the PBS dilution. We plated dilutions from 10^{-1} to 10^{-6} . The error introduced by the dilution was measured obtaining values typically around $cv = 0.1-0.2$. This error was propagated to the actual number of cells and accounts for most of the variability observed in the results.

Computational analysis

Numerical integration of the ODE system was performed in Matlab (Mathworks) using the ODE23 algorithm. ODE23 is a Runge-Kutta algorithm with automatic step size. The absolute and relative tolerances were set at 10^{-10} , $tspan = 1000$.

Supporting Information

Figure S1 Expression profiles of the replication and maintenance promoters in the presence or absence of their transcriptional regulators. Each panel shows the expression profile of the reporter plasmid indicated above the panel (cloned promoter indicated in brackets). Expression profiles correspond to promoter alone (black lines), in the presence of plasmid R388 (red lines), or when different regulators are expressed from a co-residing pBAD33 expression vector (blue and green lines). The effect of the transcriptional regulators was tested without arabinose (darker lines, ara⁻) and with maximum arabinose induction (lighter lines, ara⁺). Some transcriptional regulators were found to decrease the growth rate when induced above a certain threshold. To discard effects produced by impaired growth rate we measured, for each regulator, the rank of arabinose concentration that did not impair bacterial growth (data not shown). Therefore maximum arabinose induction stands for the maximum concentration that did not produce a measurable effect on growth rate, and it is variable for each regulator (ranging from 10^{-3} to $10^{-4}\%$ (w/v)). **A**) Expression profiles from *PresP* and *PkfrA* promoters and response to ResP and KfrA respectively. **B**) Expression profiles from *PardC*, *Porf7*, *Pssb*, *Porf12*, *Porf14* and *PstbA* promoters and response to ArdK and StbA. Data shown represents the average of at least four independent experiments.

(DOCX)

Figure S2 Expression profiles of conjugation region and response to their transcriptional regulators. Panels show the expression profiles (obtained as in Materials and Methods) from cultures containing the reporter plasmids indicated above each panel (corresponding promoter indicated in brackets). Profiles obtained with the reporter plasmid alone are indicated by black lines and by red lines when plasmid R388 was also present. Green and blue lines indicate profiles obtained in the presence of a given regulator expressed from a co-residing pBAD33 expression vector. The effect of the regulators was determined both with arabinose induction (lighter lines, ara⁺) and without (darker lines, ara⁻). **A**) Expression profiles of *PtrwA* containing reporter vector and response to R388 (red line) and TrwA (blue lines). **B**) Expression profiles from reporter plasmids containing *PtrwH*, *PkorA*, *PkikA* and *PkorB* and response to KorA and StbA transcriptional regulators. Black lines represent expression profiles obtained from cultures containing the corresponding reporter vectors (indicated above each panel) and red lines indicate the profiles of the same reporter vector in the presence of a co-residing R388. Green lines show the profile obtained when expression vector pAR12 (pBAD33::stbA) was present with (light green, ara⁺) and without arabinose induction (dark green, ara⁻). Blue lines indicate the

expression profiles obtained with a co-residing pAR13 vector (pBAD33::korA). Although *PkorB* fluorescence levels decreased in response to KorA the profile is not shown since the difference was not statistically significant. **C**) Expression profiles of cultures containing *Pint* and *Pant* reporter vectors alone (black lines) and in the presence of R388 (red lines). Data shown represents the average of at least four independent experiments.

(DOCX)

Figure S3 Effects of sub-inhibitory concentrations of rifampicin on plasmid promoters. **A**) Expression profiles of plasmid R388 promoters, measured as described in Materials and Methods, in the presence of rifampicin 3 μ g/ml. Rifampicin produced a general decrease in GFP/OD levels, either in the presence or the absence of plasmid R388. **B**) Effect of rifampicin 3 μ g/ml on bacterial growth rate. Growth curves were determined measuring OD600 at different time points. The upper panel shows the complete growth curve in a linear scale. The lower panel shows the exponential growth phase in a semi-logarithmic scale. As shown by the figure, rifampicin 3 μ g/ml produced no detectable effect on the growth rate, while the presence of plasmid R388 decreased it significantly.

(DOCX)

Figure S4 Effects of SOS response on plasmid promoters. Charts show the GFP/OD values achieved in steady-state by the promoters indicated in the figure. Expression profiling was performed as described in Materials and Methods. Cells were treated with uv irradiation (254 nm, 15W) for 5 or 10 seconds. Mitomycin C was used at a concentration of 5 μ g/ml. Those promoters that were induced by SOS response were marked with an asterisk (*). *Pint* showed a clear response to S.O.S induction either by Mitomycin C or by UV irradiation. *PtrwA* showed a discrete 5 fold increase when the promoter was assayed alone, but that response could not be reproduced with co-residing plasmid R388.

(DOCX)

Figure S5 Temperature effects on plasmid promoters. Charts show the GFP/OD values achieved in steady-state by the promoters indicated in the figure. Expression profiling was performed as described in Materials and Methods. Cells were grown at 37 C overnight, then diluted 1:10000 in fresh media, and then grown at the indicated temperatures.

(DOCX)

Figure S6 Presence of potential receptors. Expression profiles of plasmid R388 promoters, obtained as described in Materials and Methods. The effect of potential recipients for horizontal transfer was tested by co-culture with empty E.coli Bw27783. Cells were mixed at 1:1 ratio before the measurement started. To obtain the same amount of GFP-producing cells, the volume of recipient-containing cultures was doubled. The only effect observed was a general decrease in fluorescence signal in those cultures that contained recipients. Cell quenching probably caused this unspecific effect.

(DOCX)

Figure S7 Transient overshooting in StbA/KorA Incoherent Feed Forward Loop (IFFL). In order to test whether the transient overshooting would also happen in more complex architectures apart from simple NFLs, we simulated the behavior of the KorA-StbA IFFL loop present in the conjugation region (Upper panel). The parameters were introduced according to the results depicted in Table S1, which indicate the order of promoter strengths (*PstbA*>*PtrwH*>*PkorA*) and indicated also the relative strengths of repression exerted by the two regulators ($K_{StbA_PkorA} \gg$

$K_{KorA_P_{KorA}}$ and $K_{StbA_P_{TwH}} \gg K_{KorA_P_{TwH}}$). Results shown in the lower panel indicate that this IFFL architecture will also exhibit a transient overshoot. (DOCX)

Figure S8 Growth rate deficit after horizontal gene transfer A. Growth rate after conjugation. (**Left panel**) Growth rate of Recipients (R), Donors (D) and Transconjugants (T). Cells were mixed at a 1:1 ratio and allowed to conjugate for 30 min. at 37 C, on LB agar plates. Donors were *E.coli* Bw27783 Rif^r containing plasmid R388, and recipients were *E.coli* Bw27783 Nx^r. Cells were then resuspended in liquid LB and allowed to grow. Cell numbers were obtained by plating on appropriate antibiotic combinations, as indicated in materials and methods. (**Right panel**) Proportion of plasmid-containing cells that are transconjugants along time. The x axis indicates the timespan since cells were taken out from conjugation mixtures. The y axis indicates the proportion of transconjugants over plasmid-containing cells (donors + transconjugants). Plasmid R388 does not conjugate in liquid, thus any change in this proportion was due to growth differences. Lower bars indicate the apparent generation times for each species, calculated from the data shown in the left panel. **B.** Growth rate after mobilization. Growth rate of Recipients (R), Donors (D) and Transconjugants (T). Cells were mixed at a 1:1

ratio and allowed to conjugate for 30 min at 37 C, on LB agar plates. Donors were *E.coli* Bw27783 Rif^r containing plasmid R388Δ*nic*, and the mobilizable vector pSU4910 (Cm^r). R388Δ*nic* encodes for the entire transfer system, but lacks the *nic* site needed in *cis* for a DNA to be transferred by conjugation. Thus this strain is able to mobilize pSU4910 without transferring plasmid R388. Recipients were *E.coli* Bw27783 Nx^r. Experiments were performed as in conjugation assays. (DOCX)

Table S1 Promoter activities in the presence of plasmid R388 and plasmid transcriptional regulators. (DOCX)

Table S2 Oligonucleotides and plasmids used in this study. (XLSX)

Text S1 Calculations on the Gain-Overshoot relationship. (PDF)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RFL IdC CR AC FdIC. Performed the experiments: RFL IdC CR AC. Analyzed the data: RFL IdC CR FdIC. Contributed reagents/materials/analysis tools: RFL IdC CR FdIC. Wrote the paper: RFL FdIC.

References

- Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* 3: 722–732.
- de la Cruz F, Davies J (2000) Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol* 8: 128–133.
- Fernandez-Lopez R, Garcillan-Barcia MP, Revilla C, Lazaro M, Vielva L, et al. (2006) Dynamics of the IncW genetic backbone imply general trends in conjugative plasmid evolution. *FEMS Microbiol Rev* 30: 942–966.
- Sen D, Brown CJ, Top EM, Sullivan J (2013) Inferring the Evolutionary History of IncP-1 Plasmids Despite Incongruence among Backbone Gene Trees. *Molecular biology and evolution* 30: 154–166.
- Bouma JE, Lenski RE (1988) Evolution of a bacteria/plasmid association. *Nature* 335: 351–352.
- Dionisio F, Conceicao IC, Marques AC, Fernandes L, Gordo I (2005) The evolution of a conjugative plasmid and its ability to increase bacterial fitness. *Biol Lett* 1: 250–252.
- De Gelder L, Ponciano JM, Joyce P, Top EM (2007) Stability of a promiscuous plasmid in different hosts: no guarantee for a long-term relationship. *Microbiology* 153: 452–463.
- Haft RJ, Mittler JE, Traxler B (2009) Competition favours reduced cost of plasmids to host bacteria. *ISME J* 3(7):761–9.
- Paulsson J (2002) Multileveled selection on plasmid replication. *Genetics* 161: 1373–1384.
- Thomas CM, Nielsen KM (2005) Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol* 3: 711–721.
- Bingle LE, Thomas CM (2001) Regulatory circuits for plasmid survival. *Curr Opin Microbiol* 4: 194–200.
- Polzleitner E, Zechner EL, Renner W, Fratte R, Jauk B, et al. (1997) TraM of plasmid R1 controls transfer gene expression as an integrated control element in a complex regulatory network. *Mol Microbiol* 25: 495–507.
- Koraimann G, Teferle K, Markolin G, Woger W, Hogenauer G (1996) The FinOP repressor system of plasmid R1: analysis of the antisense RNA control of *traJ* expression and conjugative DNA transfer. *Mol Microbiol* 21: 811–821.
- Thomas CM (2006) Transcription regulatory circuits in bacterial plasmids. *Biochem Soc Trans* 34: 1072–1074.
- Dunny GM, Johnson CM (2006) Regulatory circuits controlling enterococcal conjugation: lessons for functional genomics. *Curr Opin Microbiol* 14: 174–180.
- Oger P, Kim KS, Sackett RL, Piper KR, Farrand SK (1998) Octopine-type Ti plasmids code for a mannopine-inducible dominant-negative allele of *traR*, the quorum-sensing activator that regulates Ti plasmid conjugal transfer. *Mol Microbiol* 27: 277–288.
- McAnulla C, Edwards A, Sanchez-Contreras M, Sawers RG, Downie JA (2007) Quorum-sensing-regulated transcriptional initiation of plasmid transfer and replication genes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Microbiology* 153: 2074–2082.
- Suzuki H, Yano H, Brown CJ, Top EM (2010) Predicting plasmid promiscuity based on genomic signature. *J Bacteriol* 192: 6045–6055.
- Zaslaver A, Bren A, Ronen M, Itzkovitz S, Kikoin I, et al. (2006) A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*. *Nat Methods* 3: 623–628.
- Revilla C, Garcillan-Barcia MP, Fernandez-Lopez R, Thomson NR, Sanders M, et al. (2008) Different pathways to acquiring resistance genes illustrated by the recent evolution of IncW plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 1472–1480.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.
- Guynet C, de la Cruz F (2011) Plasmid segregation without partition. *Mobile genetic elements* 1: 236–241.
- Guynet C, Cuevas A, Moncalian G, de la Cruz F (2011) The *stb* operon balances the requirements for vegetative stability and conjugative transfer of plasmid R388. *PLoS genetics* 7: e1002073.
- del Campo I, Ruiz R, Cuevas A, Revilla C, Vielva L, et al. (2012) Determination of conjugation rates on solid surfaces. *Plasmid* 67: 174–182.
- Waldor MK, Friedman DI (2005) Phage regulatory circuits and virulence gene expression. *Current opinion in microbiology* 8: 459–465.
- Camas FM, Blazquez J, Poyatos JF (2006) Autogenous and nonautogenous control of response in a genetic network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 12718–12723.
- Rosenfeld N, Elowitz MB, Alon U (2002) Negative autoregulation speeds the response times of transcription networks. *J Mol Biol* 323: 785–793.
- Schleif R (1988) DNA binding by proteins. *Science* 241: 1182–1187.
- Sarkar RR, Maithreye R, Sinha S (2011) Design of regulation and dynamics in simple biochemical pathways. *Journal of mathematical biology* 63: 283–307.
- Levin BR, Stewart FM (1980) The population biology of bacterial plasmids: a priori conditions for the existence of mobilizable nonconjugative factors. *Genetics* 94: 425–443.
- Lundquist PD, Levin BR (1986) Transitory derepression and the maintenance of conjugative plasmids. *Genetics* 113: 483–497.
- Stewart FM, Levin BR (1977) The Population Biology of Bacterial Plasmids: A PRIORI Conditions for the Existence of Conjugationally Transmitted Factors. *Genetics* 87: 209–228.
- Shen-Orr SS, Milo R, Mangan S, Alon U (2002) Network motifs in the transcriptional regulation network of *Escherichia coli*. *Nat Genet* 31: 64–68.
- Jagura-Burdzy G, Thomas CM (1992) *kfrA* gene of broad host range plasmid RK2 encodes a novel DNA-binding protein. *J Mol Biol* 225: 651–660.
- Jagura-Burdzy G, Thomas CM (1995) Purification of *KorA* protein from broad host range plasmid RK2: definition of a hierarchy of *KorA* operators. *J Mol Biol* 253: 39–50.
- Kostelidou K, Jones AC, Thomas CM (1999) Conserved C-terminal region of global repressor *KorA* of broad-host-range plasmid RK2 is required for co-operativity between *KorA* and a second RK2 global regulator, *KorB*. *J Mol Biol* 289: 211–221.
- Adamczyk M, Dolowy P, Jonczyk M, Thomas CM, Jagura-Burdzy G (2006) The *kfrA* gene is the first in a tricistronic operon required for survival of IncP-1 plasmid R751. *Microbiology* 152: 1621–1637.
- Bingle LE, Rajasekar KV, Muntaha S, Nadella V, Hyde EI, et al. (2008) A single aromatic residue in transcriptional repressor protein *KorA* is critical for cooperativity with its co-regulator *KorB*. *Mol Microbiol* 70: 1502–1514.
- Pansegau W, Lanka E, Barth PT, Figurski DH, Guiney DG, et al. (1994) Complete nucleotide sequence of Birmingham IncP alpha plasmids. Compilation and comparative analysis. *J Mol Biol* 239: 623–663.

40. Jacob F, Wollman EL (1956) [Processes of conjugation and recombination in *Escherichia coli*. I. Induction by conjugation or zygotic induction]. *Annales de l'Institut Pasteur* 91: 486–510.
41. Babic A, Lindner AB, Vulic M, Stewart EJ, Radman M (2008) Direct visualization of horizontal gene transfer. *Science* 319: 1533–1536.
42. Becskei A, Serrano L (2000) Engineering stability in gene networks by autoregulation. *Nature* 405: 590–593.
43. Savageau MA (1974) Comparison of classical and autogenous systems of regulation in inducible operons. *Nature* 252: 546–549.
44. Austin DW, Allen MS, McCollum JM, Dar RD, Wilgus JR, et al. (2006) Gene network shaping of inherent noise spectra. *Nature* 439: 608–611.
45. Das N, Valjavec-Gratian M, Basuray AN, Fekete RA, Papp PP, et al. (2005) Multiple homeostatic mechanisms in the control of P1 plasmid replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 2856–2861.
46. Park K, Han E, Paulsson J, Chatteraj DK (2001) Origin pairing ('handcuffing') as a mode of negative control of P1 plasmid copy number. *EMBO J* 20: 7323–7332.
47. Garcillan-Barcia MP, de la Cruz F (2008) Why is entry exclusion an essential feature of conjugative plasmids? *Plasmid* 60: 1–18.
48. Lartigue C, Glass JI, Alperovich N, Pieper R, Parmar PP, et al. (2007) Genome transplantation in bacteria: changing one species to another. *Science* 317: 632–638.
49. Khlebnikov A, Datsenko KA, Skaug T, Wanner BL, Keasling JD (2001) Homogeneous expression of the P(BAD) promoter in *Escherichia coli* by constitutive expression of the low-affinity high-capacity AraE transporter. *Microbiology* 147: 3241–3247.
50. Bolland S, Llosa M, Avila P, de la Cruz F (1990) General organization of the conjugal transfer genes of the IncW plasmid R388 and interactions between R388 and IncN and IncP plasmids. *J Bacteriol* 172: 5795–5802.
51. Fernandez-Lopez R, Del Campo I, Ruiz R, Lanza V, Vielva L, et al. Numbers on the edges: a simplified and scalable method for quantifying the gene regulation function. *Bioessays* 32: 346–355.
52. Goh EB, Yim G, Tsui W, McClure J, Surette MG, et al. (2002) Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 17025–17030.

