

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA  
FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**



**Redes de señalización implicadas en la regulación  
del metabolismo de las ectoínas en la bacteria  
halófila *Chromohalobacter salexigens* y su potencial  
terapéutico como agente neuroprotector**

Rosa María García Valero

Sevilla, 2019

Memoria que presenta la Lcda. en Biología  
Rosa María García Valero para optar al título  
de Doctor por la Universidad de Sevilla

## ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Sistemas reguladores de dos componentes (TCS).....	2
1.1.1.	Histidina quinasa (HK).....	4
1.1.1.1.	Histidinas quinastas híbridas.....	7
1.1.2.	Los reguladores de respuesta (RR).....	7
1.1.3.	Redes de regulación.....	8
1.1.4.	Distribución de los TCS.....	10
1.2.	Osmoadaptación en bacterias.....	11
1.2.1.	Solutos compatibles.....	13
1.2.2.	Las ectoínas y sus aplicaciones.....	13
1.3.	La bacteria halófila moderada <i>Chromohalobacter salexigens</i> .....	14
1.3.1.	Mecanismos de osmoadaptación en <i>C. salexigens</i> : síntesis, degradación y transporte de solutos compatibles.....	15
1.3.2.	Csal_0869: una histidina quinasa híbrida perteneciente a un posible sistema de dos componentes implicado en la osmoadaptación.....	22
II.	OBJETIVOS.....	24
III.	CAPÍTULO 1: Estudio de los circuitos reguladores implicados en el control de la osmoadaptación y metabolismo de ectoínas en la bacteria <i>Chromohalobacter salexigens</i> .....	27
1.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
1.1.	MATERIAL BIOLÓGICO.....	29
1.1.1.	Cepas bacterianas utilizadas.....	29
1.1.2.	Plásmidos utilizados.....	30
1.2.	MEDIOS DE CULTIVO.....	36
1.2.1.	Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i> .....	37
1.2.1.1.	Medios complejos.....	37
1.2.1.2.	Medios mínimos o sintéticos.....	38
1.2.2.	Medios de cultivo para <i>Chromohalobacter salexigens</i> .....	38
1.2.2.1.	Medios complejos.....	38
1.2.2.2.	Medios mínimos.....	39
1.3.	CONDICIONES DE CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS.....	39
1.3.1.	Condiciones de cultivo.....	39
1.3.2.	Conservación a 4 °C.....	40
1.3.3.	Conservación por congelación.....	40

## ÍNDICE

1.4.	COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS.....	40
1.5.	TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ADN.....	40
1.5.1.	Extracción de ADN plasmídico.....	40
1.5.2.	Método de “Boiling”.....	41
1.5.3.	Extracción del ADN genómico.....	41
1.5.4.	Electroforesis del ADN en geles de agarosa.....	42
1.5.5.	Cuantificación de ácidos nucleicos.....	42
1.5.6.	Manipulación enzimática del ADN.....	43
1.5.6.1.	Digestión del ADN con endonucleasas de restricción.....	43
1.5.6.2.	Desfosforilación de los extremos 5’.....	43
1.5.6.3.	Ligación de los fragmentos de restricción.....	43
1.5.7.	Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR.....	43
1.5.7.1.	PCR de extensión solapada (Overlapping PCR).....	44
1.5.7.2.	PCR de colonias.....	45
1.5.7.3.	Aislamiento y purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa.....	45
1.5.8.	Mutagénesis dirigida por PCR.....	46
1.5.9.	Secuenciación de ADN.....	47
1.6.	MÉTODOS DE TRANSFERENCIA DEL MATERIAL GENÉTICO.....	47
1.6.1.	Conjugación triparental.....	47
1.6.2.	Transformación.....	47
1.6.2.1.	Preparación de células competentes.....	48
1.6.3.	Obtención de mutantes por doble recombinación homóloga.....	50
1.7.	TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ARN.....	50
1.7.1.	Extracción de ARN total.....	50
1.7.2.	Retrotranscripción: ADN complementario.....	51
1.7.3.	Purificación del ARN mensajero.....	52
1.7.4.	Cuantificación del ARN.....	53
1.7.5.	Integridad del ARN.....	53
1.8.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	54
1.8.1.	Determinación de actividad $\beta$ -galactosidasa.....	54
1.8.1.1.	Fusiones transcripcionales de promotores.....	54
1.8.2.	RT-qPCR.....	55
1.8.3.	Análisis diferencial de la expresión génica mediante RNA-seq (Illumina).....	56
1.8.3.1.	Obtención de las muestras.....	57
1.8.3.2.	Secuenciación del ARNm (RNA-seq).....	57



## ÍNDICE

1.8.3.3. Análisis bioinformático de las secuencias: Mapeo de lecturas y cuantificación de los transcritos.....	58
1.8.3.4. Cuantificación de la expresión diferencial .....	58
1.8.3.5. Validación mediante genes diferencialmente expresados. ....	59
1.9. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS .....	59
1.9.1. Determinación de la concentración de proteínas .....	59
1.9.2. Electroforesis desnaturalizante de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	60
1.9.2.1. Preparación de las muestras.....	61
1.9.2.2. Preparación de los geles .....	61
1.9.2.3. Electroforesis .....	62
1.9.3. Visualización de los geles de proteínas: .....	62
1.9.3.1. Tinción con azul de Coomassie .....	62
1.9.3.2. Tinción con nitrato de plata .....	63
1.9.3.3. Tinción con SPYRO-Rubi.....	63
1.9.4. Inmunoblot (Western-Blot) .....	64
1.9.4.1. Anti-His Western Blot.....	64
1.9.4.2. Detección Step-Tactin-HRP conjugada .....	65
1.9.5. Expresión de proteínas heterólogas en <i>E. coli</i> .....	65
1.9.5.1. Construcción de los vectores de expresión (pET151).....	67
1.9.5.2. Expresión de las proteínas unidas a 6xHis.....	67
1.9.5.3. Purificación de proteínas de fusión unidas a 6xHis. ....	67
1.9.6. Experimentos de seguimiento de fosfato ( $p^{32}$ ).....	69
1.9.6.1. Ensayos de autofosforilación (HK).....	69
1.9.6.2. Ensayo de fosfotransferencia (HK-RR).....	70
1.10. ANÁLISIS DE INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA. ....	70
1.10.1. Ensayos de interacción <i>in vivo</i> mediante sistema de doble híbrido (BACTH)... ..	70
1.10.1.1. Construcciones génicas para la expresión de las proteínas fusión.....	72
1.10.1.2. Co-transformaciones.....	72
1.10.1.3. Análisis cualitativo de las interacciones.....	73
1.10.1.4. Análisis cuantitativo de las interacciones. Ensayo de complementación funcional. ....	75
1.10.2. Ensayos de interacción <i>in vivo</i> mediante Membrane-SPINE.....	77
1.10.2.1. Obtención de las construcciones génicas para la expresión de proteínas marcadas en <i>C. salexigens</i> .....	78

## ÍNDICE

1.10.2.2. Fijación de las interacciones con formaldehido.....	79
1.10.2.3. Formación de esferoplastos y purificación de las fracciones de membrana .. .....	79
1.10.2.4. Purificación de las proteínas unidas a Step-tactin.....	80
1.10.2.5. Análisis de las proteínas mediante SDS-PAGE/WESTERN y LC/MS .....	81
1.11. ANÁLISIS DE METABOLITOS INTRA Y EXTRACELULARES .....	82
1.11.1. Cuantificación de la concentración extracelular de glucosa .....	82
1.11.1.1. Método DNS .....	82
1.1.5. Extracción de solutos compatibles.....	83
1.11.2. Cuantificación de ectoínas intracelulares por HPLC-ESI-MS/MS .....	83
1.11.3. Cuantificación de ectoínas extracelulares por HPLC-UV .....	84
1.11.4. Cuantificación de ácidos orgánicos extracelulares.....	84
1.12. ANÁLISIS Y RECURSOS BIOINFORMÁTICOS. ....	85
1.12.1. Tratamiento y análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas.....	85
1.12.2. Diseño de cebadores.....	85
1.12.3. Análisis de promotores y terminadores transcripcionales.....	85
1.12.4. Búsqueda de secuencias homólogas en bases de datos.....	85
1.12.5. Secuencia del genoma de <i>C. salexigens</i> .....	85
1.12.6. Predicción y análisis de los sistemas de dos componentes.....	86
1.12.7. Análisis de proteínas.....	86
1.12.8. Otros análisis.....	87
2. RESULTADOS.....	88
2.1. El sistema de dos componentes EupK/EupR.....	89
2.1.1. Organización transcripcional de la región de EupK/EupR.....	89
2.1.2. Obtención de un mutante afectado en <i>eupK</i> .....	91
2.1.3. La región transmembrana de EupK no es un transportador de ectoína funcional.....	92
2.1.4. Implicación del sistema EupK/EupR en la osmoadaptación de <i>C. salexigens</i> ....	94
2.1.5. La falta de <i>eupR</i> conduce a un aumento de la producción de ectoína e hidroxiectoína a baja salinidad.....	95
2.1.6. La histidina quinasa EupK regula parcialmente el transporte de ectoínas (TeaABC).....	96
2.1.7. El sistema de dos componentes EupK/EupR está implicado en el control transcripcional del metabolismo de las ectoínas.....	98
2.1.8. Análisis del perfil metabólico extracelular en los mutantes <i>eupK</i> y <i>eupR</i> : influencia en la asimilación de glucosa y metabolismo “overflow” .....	101
2.1.9. Análisis de la interacción <i>in vivo</i> entre EupK y EupR.....	102

## ÍNDICE

2.1.10.	El sistema EupK/EupR es un sistema de dos componentes funcional .....	106
2.1.10.1.	Identificación de los motivos variables y residuos implicados en la transferencia de fosfato en EupK y EupR .....	107
2.1.10.2.	Autofosforilación de la histidina quinada EupK y transferencia del fosfato al regulador de respuesta EupR .....	109
2.2.	Caracterización de otros sistemas de dos componentes que interaccionan con el sistema EupK/EupR.....	111
2.2.1.	Sistemas de dos componentes de la bacteria <i>C. salexigens</i> .....	111
2.2.2.	Estudio de las histidinas quinasas híbridas.....	115
2.2.2.1.	Csal_1062 .....	116
2.2.2.2.	Csal_1635 .....	116
2.2.2.3.	Csal_2667 .....	117
2.2.3.	Análisis de la interacción <i>in vivo</i> entre el sistema EupK/EupR y las histidinas quinasas híbridas de <i>C. salexigens</i> .....	118
2.2.4.	Funcionalidad de las interacciones entre EupR y las histidina quinasas híbridas Csal1062, Csal1635, Csal2667 .....	125
2.2.5.	Ensayos de interacción <i>in vivo</i> proteína-proteína en <i>Chromohalobacter salexigens</i> .....	127
2.3.	Transcriptoma diferencial del mutante <i>eupR</i> en respuesta a salinidad.....	129
2.3.1.	Obtención de las muestras.....	129
2.3.2.	Obtención del ARNm libre de ARNr .....	130
2.3.3.	Secuenciación del ARNm por ILUMINA.....	131
2.3.4.	Normalización de las muestras.....	132
2.3.5.	Verificación de la reproducibilidad entre las muestras de cada condición.....	133
2.3.6.	Validación mediante qPCR.....	134
2.3.7.	Análisis del transcriptoma diferencial.....	135
2.3.8.	Análisis funcional.....	136
2.3.8.1.	Genes diferencialmente expresados relacionados con la respuesta metabólica general .....	136
2.3.8.2.	Genes relacionados con la regulación .....	137
2.3.8.3.	Genes relacionados con el transporte .....	138
3.	DISCUSIÓN .....	140
3.1.	El sistema de dos componentes EupK/EupR está implicado en el metabolismo y transporte de ectoínas.....	141
3.2.	La red de señalización que controla la producción de ectoínas está formada por al menos cuatro sistemas de dos componentes.....	143
3.3.	EupR es un regulador global implicado en la adaptación metabólica a salinidad de <i>C. salexigens</i> .....	148

## ÍNDICE

IV.	CAPÍTULO 2: EXPLORATION OF THE ECTOIN AS NEUROPROTECTOR .....	150
1.	INTRODUCTION.....	151
1.1.	Protein misfolding and aggregation .....	152
1.1.1.	Protein misfolding diseases .....	152
1.2.	Alzheimer's disease.....	153
1.2.1.	Pathogenesis and physiopathology.....	154
1.2.2.	Amyloid theory .....	155
1.2.2.1.	APP and $\beta$ amyloid .....	155
1.2.3.	Oxidative stress .....	157
1.2.4.	Neuroinflammation .....	158
1.2.5.	Microglia activation .....	159
1.3.	Compatible solutes: a type of natural compounds .....	160
1.3.1.	Ectoines.....	161
1.3.2.	Applications in medicine .....	161
1.3.3.	Ectoine in neuroprotection.....	161
2.	MATERIAL AND METHODS.....	163
2.1.	<i>In vitro</i> neuroprotective capacity assay when neuronal death is caused by induced oxidative damage .....	164
2.1.1.	Cell culture and treatment.....	164
2.1.2.	Cell viability.....	164
2.2.	<i>In vitro</i> neuroprotective capacity assay using an inflammatory neuronal cell model .....	165
2.2.1.	Cell culture.....	165
2.2.2.	A $\beta$ 42 oligomeric peptide preparation.....	165
2.2.3.	Treatment.....	166
2.2.4.	RNA and Protein Extraction .....	166
2.2.4.1.	RNA Extraction .....	167
2.2.4.2.	Total protein extraction.....	167
2.2.5.	Reverse transcription .....	168
2.2.6.	Real-time PCR.....	168
2.2.7.	Protein quantification (Lowry Method).....	168
2.2.8.	Western Blot.....	169
2.2.9.	Atomic Force Microscope (AFM).....	169
2.3.	<i>In vivo</i> assay to determine ectoine passage through the blood-brain barrier and quantitative brain time permanence .....	170
2.3.1.	Animals .....	170

## ÍNDICE

2.3.2.	Treatment.....	170
2.3.3.	Perfusion and sacrifice of the mice. ....	170
2.3.4.	Soluble proteins (S1) isolation: .....	170
2.3.5.	<i>Ectoine extraction and quantification by LC-MS:</i> .....	171
2.4.	<i>In vivo</i> neuroprotective capacity of ectoine in an Alzheimer's murine APP/PS1 model .....	172
2.4.1.	Transgenic APP/PS1 and litter sisters-brother mice generation:.....	172
2.4.2.	Treatment .....	172
2.4.3.	Performance of the cognitive test of the water maze of Morris (MWM).....	173
2.4.4.	Perfusion and sacrifice of the mice: .....	174
2.4.5.	Analysis of the brain, cortex and hippocampus regions: .....	174
2.4.5.1.	RNA and Protein Extraction .....	174
2.4.5.2.	Reverse transcription .....	175
2.4.5.3.	Real-time PCR.....	175
2.4.5.4.	Protein quantification (Lowry Method).....	175
2.4.5.5.	Western Blot.....	175
2.4.5.6.	Immunohistochemistry.....	176
3.	RESULTS .....	179
3.1.	Evaluation of the antioxidant and neuroprotective activity of ectoines. ....	180
3.1.1.	<i>In vitro</i> neuroprotective capacity of ectoine and hidroxiectoine from oxidative damage .....	180
3.1.2.	<i>In vitro</i> antioxidant capacity of ectoin and hydroxiectoin. ....	181
3.2.	Evaluation of anti-inflammatory and neuroprotective activity in mouse neuronal lines .....	181
3.2.1.	Capacity of ectoine to prevent inflammation in microglial mouse lines .....	182
3.2.2.	Mechanism action confirmation of ectoin in the prevention of inflammation by Western-Blot and AFM. ....	184
3.3.	Blood-brain barrier crossing and prevalence time in brain of ectoine.....	185
3.4.	<i>In vivo</i> analysis of neuroprotective capacity of ectoine in mice model APP/PS1187 .....	187
3.4.1.	Ectoine intraperitoneal administration is safe.....	187
3.4.2.	Ectoine treatment rescued improves spatial memory deficits.....	188
3.4.3.	Ectoine treatment reduces A $\beta$ accumulation and plaque size.....	190
3.5.	Intragastric adminstration.....	191
4.	DISCUSSION.....	193
V.	GENERAL CONCLUSIONS.....	196
VI.	BIBLIOGRAFÍA.....	198

## ÍNDICE

VII. ANEXOS .....	229
Tabla de cebadores .....	230
Sistemas de dos componentes de <i>C. salexigens</i> .....	233
Genes diferencialmente expresados a baja salinidad .....	235
Genes diferencialmente expresados a elevada salinidad .....	255
Datos recogidos de los animales tratados .....	276

## ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Esquema de un sistema de dos componentes típico.....	3
Figura 2 Esquema de un sistema de dos componentes y de un sistema de fosfotransferencia o “fosforelay” junto con la estructura por dominios de cada componente.....	4
Figura 3. Representación esquemática de los tres mecanismos de transmisión de señal.....	6
Figura 4. Clasificación de reguladores de respuesta más comunes en bacterias según sus dominios efectores. ....	8
Figura 5 Regulación cruzada frente a vías ramificadas. ....	10
Figura 6. Esquema de los mecanismos de osmoadaptación en procariontes. ....	12
Figura 7. Estructura molecular de varios solutos compatibles.....	13
Figura 8. Ruta biosintética de los solutos compatibles ectoína e hidroxiectoína en <i>C. salexigens</i> .....	17
Figura 9. Esquema del metabolismo central y síntesis de ectoínas en <i>C. salexigens</i> basado en el genoma anotado .....	20
Figura 10. Regulación de la síntesis de ectoínas en <i>Chromohalobacter salexigens</i> .....	21
Figura 11. Dominios conservados de la histidina quinasa híbrida EupK de <i>C. salexigens</i> . ...	23
Figura 12: Esquema del vector de clonación pET151/D-TOPO con detalle de la región de clonación.....	36
Figura 13. Esquema de la PCR de extensión solapada.....	44
Figura 14. Esquema de la mutagénesis dirigida por PCR.....	46
Figura 15. Fundamento del método usado en los kits para eliminar el ARNr de una muestra de ARN total. ....	52
Figura 16. Esquema de la tecnología Illumina, basada en la amplificación puente.....	57
Figura 17. Esquema de los ensayos de autofosforilación y transferencia de fosfato .....	70
Figura 18. Esquema del ensayo de doble híbrido (BACTH). ....	71
Figura 19. Análisis de las interacciones proteína-proteína utilizando el sistema BACTH...	73
Figura 20. Ensayo de $\beta$ -galactosidasa en placas de 96 pocillos. S.....	76
Figura 21. Diagrama de flujo del procedimiento de membrane-SPINE. ....	78
Figura 22. Organización genética de la región eupK de <i>C. salexigens</i> y construcción derivada de ella.....	89
Figura 23. Posiciones de promotores putativos y regiones cercanas a Csal_0869 n .....	90
Figura 24. Organización génica de la región de la histidina-quinasa Csal_0869 de <i>C. salexigens</i> .....	90
Figura 25. Estrategia utilizada para la construcción de un mutante <i>eupK</i> .....	92

Figura 26. Incorporación de ectoínas al citoplasma en las estirpes CHR62, CHR176 y CHR215.....	93
Figura 27. Crecimiento de la cepa silvestre y de los mutantes eupR y eupK.....	95
Figura 28. Contenido intracelular de ectoínas en cepas mutantes de <i>C. salexigens</i> l. ....	96
Figura 29. Estudio de los genes de transporte teaABC de <i>C. salexigens</i> .....	98
Figura 30. Organización génica de los genes de síntesis, degradación y transporte de ectoínas incluyendo los promotores. ....	99
Figura 31. Influencia del sistema de dos componentes EupK/EupR en la expresión de genes de síntesis, degradación y transporte de ectoínas ..... 101	101
Figura 32. Perfil de acumulación extracelular de ácidos orgánicos y consumo de glucosa de la cepa silvestre y los mutantes eupK- y eupR- de <i>C. salexigens</i> . ....	102
Figura 33. Mapas de las construcciones de los plásmidos diseñados para el ensayo BACTH. ....	103
Figura 34. Esquema de las combinaciones de plásmidos analizadas en el experimento de BACTH.....	104
Figura 35. Resultados de interacción entre EupK y EupR mediante el ensayo de doble híbridos.....	105
Figura 36. Placas de selección del ensayo BACTH M63-maltosa. ....	106
Figura 37. Localización de los cebadores utilizados para amplificar las regiones de las proteínas EupK y EupR para su sobreexpresión heteróloga en <i>E. coli</i> . ....	108
Figura 38. Gel de acrilamida con las diferentes fracciones de la superproducción y purificación de EupK y EupR.....	109
Figura 39. Estudio de autofosforilación de la histidina quinasa EupK y transmisión del fosfato al regulador de respuesta EupR. ....	110
Figura 40. Distribución de los diferentes dominios según el programa SMART de las histidinas quinasa híbridas. ....	116
Figura 41. Mapas de las construcciones de los plásmidos diseñados para el ensayo BACTH.. ....	118
Figura 42. Combinaciones de plásmidos testadas en el experimento de interacción proteína-proteína con las histidinas quinasa híbridas.. ....	119
Figura 43. Resultados de interacción entre Csal_1062, EupR y EupK mediante el ensayo de doble híbridos.. ....	120
Figura 44. Resultados de interacción entre Csal_1635, EupR y EupK mediante el ensayo de doble híbridos.. ....	121



Figura 45. Resultados de interacción entre Csal_2667, EupR y EupK mediante el ensayo de doble híbridos. ....	122
Figura 46. Resultados del ensayo de interacción proteína-proteína de Csal_1062 en las distintas condiciones del medio mínimo M63.....	123
Figura 47. Resultados del ensayo de interacción proteína-proteína de Csal_1635 en las distintas condiciones del medio mínimo M63.....	124
Figura 48. Resultados del ensayo de interacción proteína-proteína de Csal_2667 en las distintas condiciones del medio mínimo M63.....	125
Figura 49. Gel de acrilamida con las diferentes fracciones de la superproducción y purificación de las histidinas quinasas híbridas .....	126
Figura 50. Experimentos de autofosforilación de las histidinas quinasas híbridas y transmisión del fosfato al regulador de respuesta EupR. S.....	127
Figura 51. Estudio de interacción proteína-proteína en <i>C. salexigens</i> . (.....	128
Figura 52. Ensayos de interacción <i>in vivo</i> proteína-proteína en <i>Chromohalobacter salexigens</i> .....	128
Figura 53. Monitorización del estado metabólico de las muestras tomadas para el análisis transcriptómico.....	130
Figura 54. Análisis de la calidad del ARN total mediante electroforesis capilar. ....	131
Figura 55. Perfiles promedio en pichochip de BioAnalyzer .....	131
Figura 56. Normalización de las muestras.....	132
Figura 57. Clasificación de las muestras mediante el transcriptoma global.....	133
Figura 58. Ajuste del modelo teórico de dispersión génica.....	134
Figura 59. MAplot. ....	134
Figura 60. Validación mediante qPCR de diestintos genes expresados diferencialmente. ....	135
Figura 61. Distribución del porcentaje de genes diferencialmente expresados en el mutante eupR- con respecto a la cepa silvestre según la clasificación global de KEGG.....	136
Figura 62. Distribución del número de genes metabólicos diferencialmente expresados en eupR-.....	137
Figura 63. Distribución del número de genes de regulación diferencialmente expresados. ....	138
Figura 64. Distribución del número de genes implicados en el transporte diferencialmente expresados en el mutante eupR-. ....	139
Figura 65. Esquema de la posible red de regulación cruzada en la que se encontraría integrado el sistema de dos componentes EupK/EupR y las histidinas quinasa híbridas. ....	147

Figura 66. Schematic representation of the possible conformational states of proteins in the cell.....	152
Figura 67. Pathogenesis and physiopathology of Alzheimers disease. ....	155
Figura 68. Amyloidogenic and non Amyloidogenic pathway of $\beta$ amyloid.....	157
Figura 69. Causes of oxidative stress in Alzheimer's disease.....	157
Figura 70. Inflammation model in Alzheimer's disease.....	158
Figura 71. Protective effect against XXO oxidative damage by ectoine and hidroxyectoine in neuronal cells. ....	180
Figura 72. Cellular antioxidant capacity of ectoine and hidroxiectoine.. ....	181
Figura 73. Effect of ectoine in induction of inflammatory response mediated by ADDL in a N13 neuronal cell model. ....	183
Figura 74. Confirmation of the mechanism of action of ectoine in the prevention of inflammation by qPCR, Western blot and AFM.....	185
Figura 75. Checking the passage of the blood-brain barrier of ectoin by LC-MS.....	186
Figura 76. Determination of ectoine passage through the blood-brain barrier and quantitative time-permanence in brain after intraperitoneal administration.....	186
Figura 77. Evolution of mice weight during the three months of treatment. ....	187
Figura 78. Survival graph along the kinetics of administration of ectoine.....	188
Figura 79. Representation of the latency time to reach the platform during the learning stage in the MWM test. ....	189
Figura 80. Effects of ectoine on the spatial recognition memory.....	190
Figura 81. Effects of ectoine in Abeta concentration and plaque size. ....	191
Figura 82. Quantification and time-permanence of ectoine in brain after gastric administration.....	192

## ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en esta tesis doctoral.....	29
Tabla 2. Plásmidos utilizados en este estudio .....	30
Tabla 3. Antibióticos.....	40
Tabla 4. Etapas de la purificación de las distintas proteínas.....	69
Tabla 5. Análisis de los dominios arquitectónicos de las distintas histidinas quininas de <i>C. salexigens</i> .....	112
Tabla 6. Reguladores de respuesta de <i>C. salexigens</i> .....	112
Tabla 7. List of antibodies used for Western. The most relevant characteristics of each of them are detailed.....	176

# **I. INTRODUCCIÓN**

## INTRODUCCIÓN

Todos los organismos interactúan con el medio en el que habitan, caracterizado por el conjunto de componentes físicos, químicos y biológicos externos. Para sobrevivir en ese ambiente deben adaptarse a los cambios del mismo que son los que ejercen una presión selectiva. La capacidad para responder a estos cambios de una forma rápida y precisa es lo que aumenta las posibilidades de supervivencia.

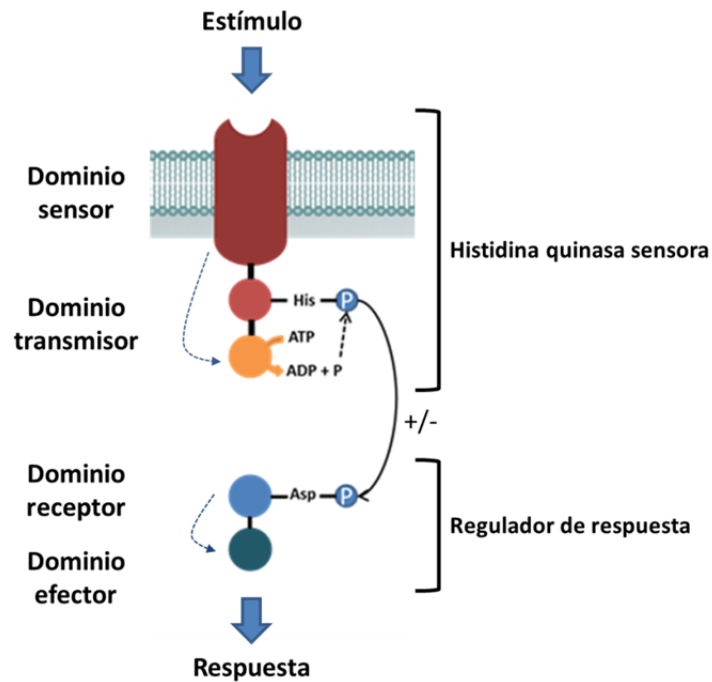
Esto es especialmente importante para los microorganismos ya que su medio ambiente se encuentra sometido a continuos cambios. Por ello, en el mundo bacteriano, la regulación de la expresión génica es una de las herramientas fundamentales para adaptarse a su hábitat cambiante (Krell *et al.*, 2010). Muchos de estos factores ambientales sirven de señales para regular la expresión génica y adaptarse al nuevo ambiente con éxito (Galperin and Gomelsky, 2005; Guan *et al.*, 2017). Detrás de estas respuestas adaptativas subyace una red compleja de sensores ambientales y reguladores de respuesta que conforman los sistemas o mecanismos de transducción de señales (Martín-Mora *et al.*, 2018).

### **1.1. Sistemas reguladores de dos componentes (TCS)**

Los mecanismos de transducción de señales bacterianos son muy diversos, variando en complejidad desde sistemas reguladores formados por una única proteína (Ulrich *et al.*, 2005), hasta cascadas de señalización integradas por múltiples proteínas (Gottesman, 1984; Bourret *et al.*, 1991; Wuichet and Zhulin, 2010). Sin embargo, las rutas más comunes en procariotas son los sistemas de dos componentes (TCS) (Hoch and Silhavy, 1995; Stock *et al.*, 2000; Krell *et al.*, 2010).

Este término apareció por primera vez en 1986 para distinguir estos sistemas, en los que la función sensora y la efectora reside en dos polipéptidos diferentes, de aquellos en los que ambas funciones residían en la misma proteína (Nixon *et al.*, 1986). Por tanto, en un sistema de dos componentes típico (Figura 1), la proteína sensora, una histidina quinasa (HK) que suele ser transmembrana, sería la encargada de detectar el estímulo y transmitir la señal al correspondiente regulador de la respuesta (RR) mediante fosfotransferencia, que sería la proteína efectora que modificaría su actividad (Hoch, 2000; Stock *et al.*, 2000; Kim and Forst, 2001; West and Stock, 2001; Gao and Stock, 2009; Krell *et al.*, 2010).

## INTRODUCCIÓN



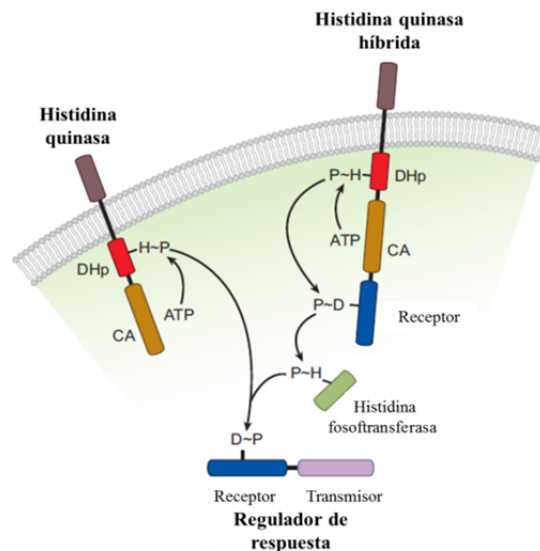
**Figura 1. Esquema de un sistema de dos componentes típico.** Se presentan los elementos de los sistemas de dos componentes de la señalización bacteriana. La información de la señal detectada fluye a través de dominios (flechas discontinuas) y mediante reacciones de fosforilación (flechas continuas) implicando los residuos de histidina (His) y aspártico (Asp). Los signos +/- indican las dos posibles vías de control del elemento regulador mediadas por la proteína sensora: actividad kinasa (+) o fosfatasa (-).

La regulación de la respuesta se rige por un proceso de cinco pasos: (1) el dominio del sensor la histidina quinasa detecta una señal ambiental, (2) la unión del ligando a la histidina quinasa hace que esta última sufra un cambio conformacional que afecta la autofosforilación en un residuo de histidina conservado (Stock *et al.*, 2000; Casino *et al.*, 2010a), (3) la quinasa fosforilada interactúa con un regulador de respuesta y transfiere el grupo fosfato a un residuo de aspártico conservado, (4) el regulador de respuesta fosforilado genera una señal de salida o respuesta, que generalmente implica la unión del ADN para mediar la respuesta celular apropiada, y por último (5) el regulador de respuesta se desfosforila.

La actividad del regulador de respuesta es controlada de dos formas, mediante su fosforilación por la vía que hemos explicado anteriormente y mediante la actividad fosfatasa, para devolver al sistema a su estado inicial (Stock *et al.*, 2000). Esta actividad fosfatasa puede venir del propio regulador de respuesta (autofosfatasa) o bien mediada por la propia histidina quinasa que lo ha fosforilado como ocurre en el caso del sistema de osmorregulación EnvZ / OmpR en *E. coli* (Inouye, 2003). En este caso, el estímulo inicial puede regular tanto la actividad kinasa como la fosfatasa (Laub and Goulian, 2007). Tanto las actividades de fosfotransferencia como de fosfatasa dependen de interacciones proteína-proteína específicas.

## INTRODUCCIÓN

Una variante al sistema de dos componentes es la fosfotransferencia o sistema de traducción de señales basada en la transferencia de grupos fosfato (“phosphorelay”). Esta vía (Figura 2, derecha) suele comenzar con una histidina quinasa híbrida que se autofosforila y que transfiere su grupo fosfato de forma intramolecular a un dominio análogo del receptor de un regulador de respuesta asociada a la misma. El grupo fosfato posteriormente se transfiere a una histidina fosfotransferasa (HTP) y, finalmente, al regulador de respuesta (Laub and Goulian, 2007).



**Figura 2 Esquema de un sistema de dos componentes y de un sistema de fosfotransferencia o “fosforelay” junto con la estructura por dominios de cada componente.** A la izquierda se muestra una ruta típica de un sistema de dos componentes con una histidina quinasa que se autofosforila y su regulador de respuesta asociado. A la derecha, un “fosforelay” que es una variante muy común del típico sistema de dos componentes. En este caso se incluye a una histidina fosfotransferasa que funciona como un enlace entre la histidina quinasa y el regulador de respuesta. (CA) dominio catalítico y ATPasa; (DHp) dominio de dimerización e histidina fosfotransferasa.

### 1.1.1. Histidina quinasa (HK)

Las histidinas quinasas son proteínas con una estructura modular o multidominio que muestran una amplia variación tanto en la organización como en la composición de dichos dominios, pero que se caracterizan por la presencia de: (i) el dominio sensor que detecta el cambio medioambiental y varía dependiendo de la histidina quinasa, (ii) el dominio catalítico y la ATPasa (CA) responsable de la unión del ATP y catalizadora de la autofosforilación de la histidina conservada localizada en el dominio DHp (Wolanin *et al.*, 2002), y (iii) el dominio de dimerización e histidina fosfotransferasa (DHp), que controla la homodimerización y que sirve como donador de fosfato al regulador de respuesta (Park *et al.*, 1998). Todas las histidinas quinasas clásicas caracterizadas hasta ahora forman homodímeros simétricos bilateralmente a través de sus núcleos de quinasa y la transmisión de señales desde el dominio de detección al núcleo generalmente conduce a la

## INTRODUCCIÓN

exposición de la histidina del sitio activo, colocándose más cerca del dominio de unión a ATP (Stewart, 2010).

Las proteínas HKs pueden clasificarse basándose en diferentes criterios como es la organización o la topología de sus dominios (Dutta *et al.*, 1999; Krell *et al.*, 2010) o según la secuencia de aminoácidos dentro de los dominios DHp (Grebe and Stock, 1999).

Atendiendo a la localización y funcionalidad de sus dominios se pueden establecer tres grupos principales (Thorsten Mascher *et al.*, 2006) (Figura 3):

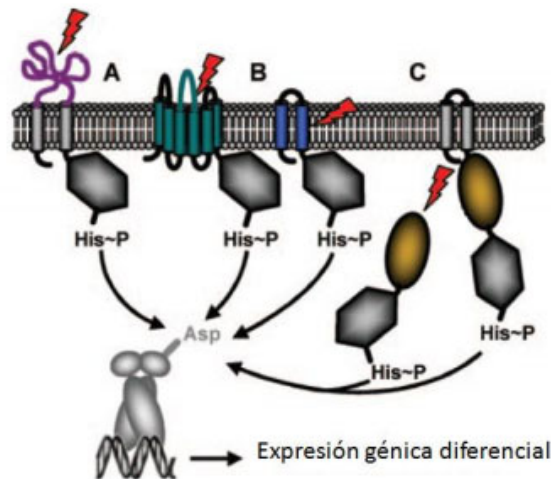
1) HKs periplásmicas o extracelulares: estas son el grupo más extenso e incluye proteínas con un dominio sensor extracelular unido a al menos dos hélices transmembrana (TM). Dado que el dominio quinasa está localizado en el citoplasma los dominios sensor y quinasa están localizados en dos compartimentos celulares diferentes separados por una membrana, requiriendo la transducción de la señal por los dominios TM. Este tipo de topología de membrana es típica para la detección de solutos y nutrientes.

2) HKs en las que la señal se detecta a través de hélices transmembrana. Este es un grupo muy heterogéneo cuyo aspecto en común es la presencia de 2 a 20 regiones transmembrana implicadas en la detección de la señal. Estas regiones TM están conectadas por uniones muy cortas intra- o extracelulares de modo que por ejemplo estos sensores no tienen un dominio extracelular que pueda detectar la señal muy evidente. Por tanto el estímulo detectado es o asociado con la membrana u ocurre directamente en la interfaz de la membrana. La detección de la señal suele estar relacionada con la integridad de la membrana celular, y están implicados gradientes de iones o electroquímicos, procesos de transporte y quorum sensing.

3) HKs citoplasmáticas que incluye tanto proteínas ancladas a la membrana como solubles con sus dominios de detección de la señal dentro del citoplasma. Esta clase de proteínas detectan la presencia de solutos citoplasmáticos o de proteínas señalizando el estado metabólico o de desarrollo de la célula. Otras responden a estímulos difusibles o internos, como O<sub>2</sub> o H<sub>2</sub> o estímulos transmitidos por sensores TM.



## INTRODUCCIÓN



**Figura 3. Representación esquemática de los tres mecanismos de transmisión de señal.** A) HKs periplásmicas. B) HKs con mecanismos sensores en la región transmembrana (la recepción de la señal puede ocurrir solamente en las hélices transmembrana o en combinación con la región transmembrana y lazos cortos extracelulares). C) HKs citoplásmicas (solubles o ancladas a la membrana). El estímulo se representa con un rayo de color rojo. Las partes de las proteínas involucradas en la recepción de la señal están coloreadas. Modificado de (Thorsten Mascher *et al.*, 2006).

Por otra parte, teniendo en cuenta la secuencia de aminoácidos dentro de los dominios DHp nos encontramos con al menos 5 subfamilias de histidinas quinazas en bacterias (Ulrich and Zhulin, 2009; Finn *et al.*, 2014) entre las que destacan tres:

- 1) La subfamilia HisKA, que es la más abundante, ya que comprende el 77% de los dominios DHp de más de 1500 genomas microbianos secuenciados (Grebe and Stock, 1999). Esta subfamilia puede a su vez dividirse en al menos 10 grupos, donde se incluyen algunas de las histidinas quinazas mejor estudiadas como NtrB, PhoQ y EnvZ de *E. coli* (Kramer and Weiss, 1999; Cai and Inouye, 2002; Castelli *et al.*, 2003).

- 2) La subfamilia HWE o HisKA\_2 implicada en señalización ambiental y quimiotaxis, en la que estaría incluida CheA (Bilwes *et al.*, 1999; Karniol and Vierstra, 2004)

- 3) la subfamilia HisKA\_3, que sería un paso evolutivo intermedio entre el grupo 1 y el 2 e incluiría a la mayoría de las denominadas histidinas quinazas híbridas. (Kristin Wuichet *et al.*, 2010; Adebali *et al.*, 2017).

Se ha observado un alto grado de conservación de la secuencia dentro de las distintas subfamilias, pero una variabilidad significativa entre las subfamilias. Se cree que esta variabilidad podría reflejar diferencias en el mecanismo o la función de estas proteínas. Además, se ha planteado la hipótesis de que estos residuos conservados son importantes para las actividades adecuadas de quinasa y/o fosfatasa (Huynh *et al.*, 2010; Huynh and Stewart, 2011; Willett and Kirby, 2012). De hecho se han examinado y definido

## INTRODUCCIÓN

una serie de residuos importantes de los sitios activos de los dominios principales los sistemas de dos componentes (DHp, HpT y REC) cuyas variaciones tienen efectos importantes en la cinética del fosfato (Thomas *et al.*, 2013; Immormino *et al.*, 2016; Page *et al.*, 2016).

### 1.1.1.1. Histidinas quinasas híbridas

Las histidinas quinasas híbridas representan menos del 20% de las histidinas quinasas en bacterias (Wuichet *et al.*, 2010). Son aquellas que, además de los dominios típicos de las histidinas quinasas poseen uno o más dominios REC similares al de los reguladores de respuesta fusionados a la región C terminal. Además, habitualmente también poseen un dominio fosfotrasferasa o HPT que actúan como un conector clave al retransmitir el grupo fosfato desde el residuo Asp del dominio REC de la quinasa del sensor híbrido al residuo Asp de un RR.

Este dominio HPT es típico en los denominados fosforelay y puede estar incluido en la misma proteína como ocurre en la histidina quinasa híbrida ArcB de *Escherichia coli* (Kwon *et al.*, 2000) o no como en el caso de la histidina quinasa híbrida LasS de *Pseudomonas aeruginosa* (Chambonnier *et al.*, 2016). De no estar presente en la proteína híbrida, podría estar en una proteína adicional, aunque en las bacterias, las proteínas HPT citosólicas son raras pero se puede dar el caso como por ejemplo, SpoB, la fosfotrasferasa de la bacteria *Bacillus subtilis*, que participa en la regulación de la inducción de la esporulación (Burbulys *et al.*, 1991).

Además, las histidinas quinasas híbridas pueden funcionar también en ausencia de proteínas fosfotrasferasa. En estos casos, se ha demostrado que los dominios REC fusionados modulan la transmisión de señal a un regulador de respuesta afín al funcionar inactivando a la quinasa asociada (Inclán *et al.*, 2008) y/o proporcionando sitios para la fosforilación de otra quinasa alternativa que presumiblemente conduce a la integración de la señal (Wegener-Feldbrügge and Sogaard-Andersen, 2009). Por lo tanto, las histidinas quinasas híbridas proporcionan un excelente ejemplo de cómo la naturaleza altamente modular de los fosforelays His-Asp puede explotarse para generar sistemas de señalización complejos (Schramm *et al.*, 2012).

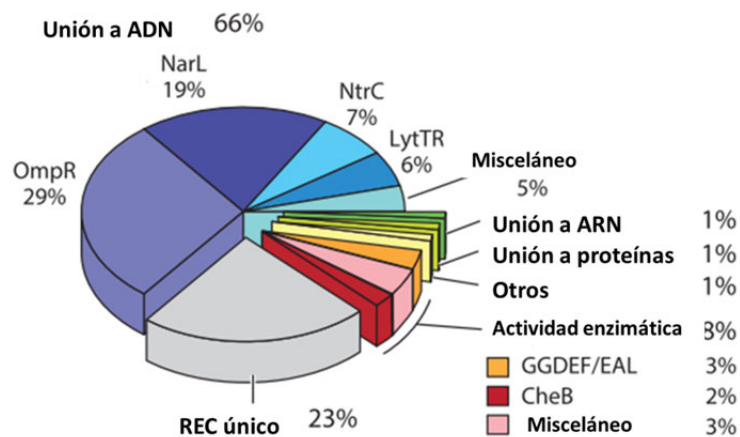
### 1.1.2. Los reguladores de respuesta (RR)

Los reguladores de la respuesta procariota son predominantemente factores de transcripción. El regulador de respuesta típico consta de dos dominios, un dominio receptor (REC), que contiene el residuo de aspartato receptor del fosfato de la histidina quinasa y varios aminoácidos conservados que catalizan la transferencia, y un dominio transmisor o efector, que es activado cuando se fosforila el residuo de aspartato del

## INTRODUCCIÓN

dominio receptor. Se han descrito numerosos tipos de dominios efectores o transmisores (Krell *et al.*, 2010), aunque en la mayoría de los casos (66%) son dominios de unión al ADN e inducen cambios en la expresión génica (Galperin, 2006; Gao *et al.*, 2019). Otros están involucrados en quimiotaxis y fosfororelays o poseen dominios efectores con actividades enzimáticas. Algunas regiones de salida también pueden mediar las interacciones proteína-proteína.

Los dominios de unión a DNA más abundantes son los del tipo HTH (hélice-girohélice, tipo NarL) o wHTH (HTH winged, tipo OmpR). Es también común encontrar el dominio Fis (factor of inversion stimulation) en estos reguladores, fusionado directamente al dominio REC o asociado a un dominio adicional AAA ATPasa (tipo NtrC). Además de éstas, existe una amplísima variedad de combinaciones con el dominio REC, incluyendo casos en los que el dominio HTH ocupa la posición N-terminal de la proteína (Figura 4).



**Figura 4. Clasificación de reguladores de respuesta más comunes en bacterias según sus dominios efectores.** La distribución porcentual se indica tanto para las clases funcionales como para las subfamilias de reguladores de respuesta. RR. Las subfamilias están definidas por las estructuras de plegamiento del dominio efector identificados en Pfam. Para nombrar las subfamilias tradicionalmente se emplean proteínas representativas de cada grupo como OmpR, NarL y NtrC con dominios efectores llamados Trans\_reg\_C, GerE y Sigma54\_activat en Pfam. Modificación de (Gao *et al.*, 2019)

A pesar de que los reguladores de respuesta habitualmente constan de dos dominios, aproximadamente un 23 % de ellos solo poseen el dominio receptor REC y generalmente actúan en las rutas de quimiotaxis, regulando la dirección de la rotación flagelar, o participan en sistemas de fosfotransferencia (Sarkar *et al.*, 2010). También se ha demostrado que algunos RR de dominio único actúan como sumideros de fosfato o como reguladores alostéricos.

### 1.1.3. Redes de regulación

Aunque se cree que la transmisión de grupos fosfato desde una histidina quinasa hasta su regulador de respuesta es muy específica, se ha demostrado la existencia de regulaciones cruzadas entre distintos sistemas de dos componentes como es el caso de

## INTRODUCCIÓN

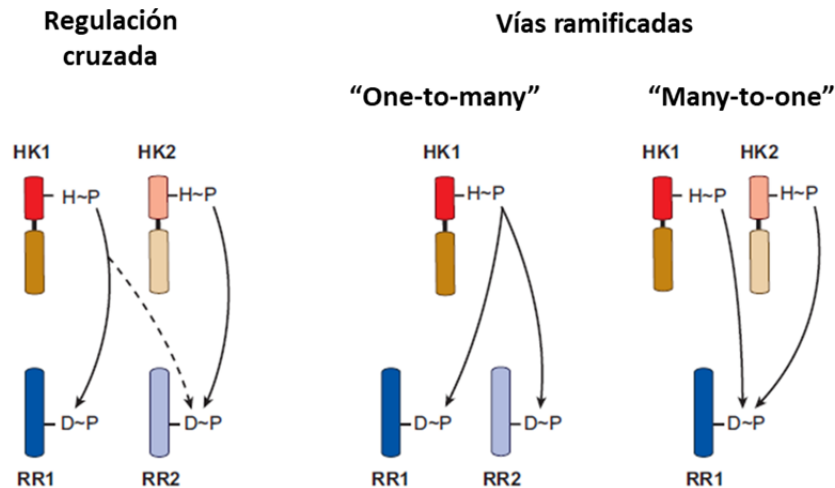
NarL (Laub and Goulian, 2007; Yoshida *et al.*, 2015). Además, la información recopilada en la bibliografía muestra de una forma cada vez más evidente, que los sistemas de señalización normalmente no son tan simples, sino que presentan componentes múltiples, interconexiones con otros circuitos reguladores, y circuitos de retroalimentación u otras propiedades de complejos de señalización (Parkinson and Kofoed, 1992; Bijlsma and Groisman, 2003; Heermann and Jung, 2010; Jung *et al.*, 2012; Schramm *et al.*, 2012; Agrawal *et al.*, 2015; Huynh, Chen, *et al.*, 2015; Santos-beneit, 2015; Chambonnier *et al.*, 2016; Willett and Crosson, 2017). Por tanto transmisión de fosfato típica descrita para los sistemas de dos componentes es una simplificación de lo que realmente sucede en una célula. Esto se debe principalmente al hecho de que las proteínas que conforman un sistema de dos componentes están compuestas por módulos que al tener estructuras similares propician la aparición de regulaciones redundantes tales como las llamadas "intercomunicaciones", la regulación cruzada o las rutas ramificadas (Siryaporn and Goulian, 2010).

En general, las vías de transducción más complejas son el resultado de la naturaleza modular de las proteínas, combinando motivos de fosfotransferencia, altamente conservados que aseguran la transducción de la señal, con una amplia variedad de dominios sensores y efectores que aseguran la respuesta a múltiples estímulos mediante diferentes procesos (Hellingwerf, 2005). Estos dos dominios implicados en la fosfotransferencia pueden combinarse con diversos dominios de entrada y salida que permiten el ensamblaje de diversas vías de señalización. El alto nivel de conservación de los dominios de fosfotransferencia demuestra cómo la evolución ha reciclado un mecanismo de señalización exitoso (Nixon *et al.*, 1986; Parkinson and Kofoed, 1992; Stock *et al.*, 2000; Gao and Stock, 2009).

Tanto el núcleo de la histidina quinasa como el dominio receptor han sido utilizados como elementos intercambiables a lo largo de la evolución para construir vías de señalización múltiples más complejas, proporcionando más puntos de control de fosforilación o mayor espacio para desarrollar mecanismos reguladores adicionales (Goulian, 2010). Además, las duplicaciones de genes, fusiones y otros eventos evolutivos también han moldeado las arquitecturas de algunos sistemas de dos componentes. Hay casos notables donde la histidina quinasa y el regulador de respuesta están fusionados (Sonnenburg *et al.*, 2006) o de proteínas con algunos dominios inusuales, como reguladores de respuesta híbridos (Kristin Wuichet *et al.*, 2010). También existen sistemas intrínsecamente ramificados, siguiendo un escenario de uno a muchos ("one to many") o muchos a uno ("many to one") (Laub and Goulian, 2007), donde una histidina quinasa fosforila varios reguladores de respuesta o donde la señalización de varias histidinas

## INTRODUCCIÓN

quinasas converge en un solo regulador de respuesta (Figura 5). Además, existen sistemas de señalización híbridos en los que un sistema de dos componentes se acopla directa o indirectamente con otra forma de transducción de señales, como las proteínas quinasas serina/treonina/tirosina (Stock *et al.*, 2000; Wolanin *et al.*, 2002).



**Figura 5 Regulación cruzada frente a vías ramificadas.** Los esquemas muestran diferentes conectividades posibles entre sistemas de dos componentes. La regulación cruzada se define la comunicación entre vías que, de eliminarse, dejarían intactas dos vías distintas. Hay que distinguirlas de aquellas vías que son inherentemente u obligatoriamente ramificadas. Existen numerosos ejemplos de casos en los que una quinasa tiene múltiples reguladores de respuesta (uno a muchos o "one to many") o donde múltiples quinasas fosforilan al mismo regulador de respuesta (muchos a uno o "many to one"). Modificación de Laub (Laub and Goulian, 2007).

### 1.1.4. Distribución de los TCS

El análisis de los genomas microbianos indica que los microorganismos sometidos a condiciones variables en su entorno, presentan sistemas de señalización mucho más diversos y complejos que aquellos cuyo entorno es estable. Igualmente, los microorganismos que poseen formas de vida adaptativas a diferentes ambientes tienen un número considerable de rutas sensoras, como ocurre en muchas bacterias patógenas facultativas. Sin embargo, aquellos que viven adaptados a un nicho estable, como les sucede a los microorganismos patógenos intracelulares obligados, con frecuencia contienen sistemas de señalización escasos y bastante primitivos (Konstantinidis and Tiedje, 2004; Galperin, 2006). Por todo ello, el recuento del número total de componentes de señalización en una especie bacteriana respecto al tamaño de su genoma, permite valorar el potencial adaptativo de este organismo al ambiente. Algunos ejemplo extremos son los parásitos intracelulares obligados como *Mycoplasma*, o endosimbiontes como *Amoebophilus*, con un genoma muy reducido, que no poseen sistemas de dos componentes. En el otro extremo se encuentran bacterias como *Myxococcus xanthus* con 136 histidinas quinasas y 127 reguladores de respuesta o *Nostoc punctiforme* con 160 histidinas quinasas

## INTRODUCCIÓN

y 98 reguladores de respuesta (Wuichet *et al.*, 2010; Capra and Laub, 2012; Salazar and Laub, 2015).

### 1.2. Osmoadaptación en bacterias

El término osmoadaptación describe la respuesta celular, es decir las manifestaciones fisiológicas y genéticas que ocurren en respuesta a un cambio osmótico (Krämer, 2010; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018; Bremer and Krämer, 2019).

Las bacterias responden al estrés osmótico, mediante dos niveles de regulación que actúan temporalmente de forma distinta: una regulación a nivel de actividad proteica, como repuesta inmediata al estrés, y otra, a nivel transcripcional, que actúa a más largo plazo (Krämer, 2010).

Además de la adaptación de sus membranas celulares, los microorganismos han desarrollado dos estrategias evolutivas fundamentales para controlar la concentración en el citoplasma de las moléculas osmóticamente activas (Figura6).

La primera estrategia se denomina en inglés “salt-in” y consiste en la acumulación en el citoplasma de concentraciones muy elevadas de iones inorgánicos, principalmente K<sup>+</sup> y Cl, hasta niveles que se asemejan a los de la concentración salina del medio externo, lo que implica la adaptación irreversible de proteínas y otras macromoléculas a esta elevada presencia de iones. Esta es típica de arqueas, pero también de bacterias fermentadoras, bacterias anaerobias acetogénicas (*Haloanaerobium*, *Halobacteroides*, *Sporohalobacter*, *Acetohalobium*) y algunos los reductores de sulfato (Brown, 1990; Pflüger and Müller, 2004).

La segunda estrategia se domina en inglés “salt-out”, en la que se mantiene el citoplasma libre de NaCl en una gran proporción, y se acumulan grandes cantidades de compuestos orgánicos de bajo peso molecular, muy solubles y generalmente de carga neutra, que no interfieren con el metabolismo celular y que actúan como osmolitos para equilibrar la presión osmótica externa, denominados “solutos compatibles” (Brown, 1976; Poolman and Glaasker, 1998). Estos compuestos se acumulan en grandes cantidades en el citoplasma tras su transporte al interior celular cuando se encuentran presentes en el medio externo, denominándose en este caso osmoprotectores, o bien, en ausencia de los mismos, se sintetizan de novo, mediante determinadas rutas biosintéticas. Ésta es la estrategia más utilizada por la mayoría de los procariontes debido a su mayor versatilidad de adaptación al medio externo, simplemente regulando la concentración interna de estos osmolitos para equilibrar la presión osmótica extracelular. Así, es la utilizada por las bacterias halófilas moderadas y marinas, las halotolerantes, algunas arqueas metanógenas halófilas moderadas, e incluso algas, levaduras, hongos, plantas y células humanas (Welsh, 2000; Wood *et al.*, 2001; Sleator and Hill, 2002; Roberts, 2005).

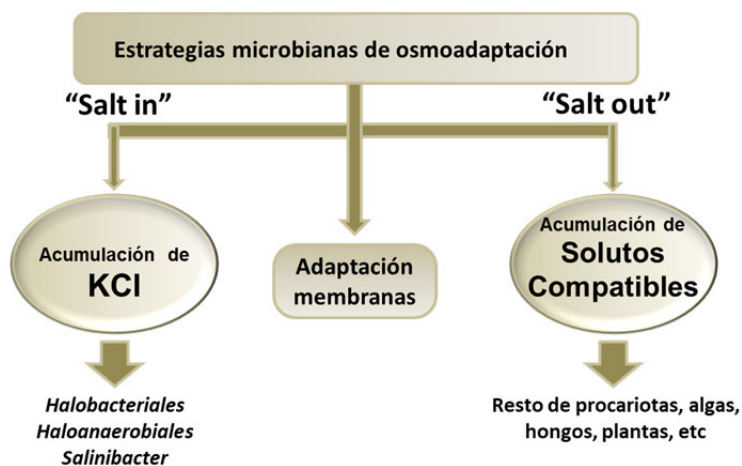


Figura 6. Esquema de los mecanismos de osmoadaptación en procariotas.

Además, existen casos extremos de organismos osmotolerantes, siendo el ejemplo más clásico el de las bacterias halófilas, que requieren de moderadas a elevadas concentraciones salinas para su crecimiento, siendo su hábitat natural los ambientes hipersalinos (Ventosa *et al.*, 1998).

Se denomina osmosensor u osmodetector a una proteína que detecta cambios en la actividad del agua, o cambios resultantes en la estructura o composición celular, y dirige las respuestas osmorreguladoras. Algunos de estos sistemas incluyen transportadores, canales mecanosensibles así como histidinas quinasa de sistemas de dos componentes (Wood, 2007; Krämer, 2010; Bremer and Krämer, 2019).

Los transportadores osmosensores prototípicos ProP, BetP y OpuA pueden detectar cambios de presión osmótica y responder mediando la absorción de osmoprotectores por simporte sin la ayuda de otras proteínas (Morbach and Krämer, 2002; Krämer and Morbach, 2004; Poolman *et al.*, 2004; Wood, 2006, 2007). Los canales mecanosensibles MscL, MscS y MscK se abren en respuesta a cambios en la tensión de membrana, liberando solutos y provocando así el flujo de agua (Martinac, 2001; Krämer, 2010).

Se conoce muy poco de los sistemas de dos componentes implicados en la osmodetección bacteriana. Las histidina quinasa transmembrana KdpD y EnvZ son de las mejor estudiadas y detectan cambios en la presión osmótica entre otras señales y responden activando los reguladores de respuesta afines que actuarían sobre la transcripción de ciertos genes. KdpD activaría a KdpE que estimula la transcripción de los genes que codifican para la ATPasa KdpFABC (Walderhaug *et al.*, 1992; Epstein, 2003; Alegado *et al.*, 2011). EnvZ por su parte activaría a OmpR implicado en la transcripción de muchos genes, entre ellos los que codifican las porinas de membrana externa OmpC y OmpF (Pratt *et al.*, 1996; Jung and Altendorf, 2002; Heermann and Jung, 2004). Otra histidina quinasa es MtrB de *Corynebacterium glutamicum* cuya activación se ha vinculado con cambios en el

## INTRODUCCIÓN

estado de hidratación en respuesta a la concentración de soluto citoplasmático (Möker, Krämer, *et al.*, 2007; Möker, Reihlen, *et al.*, 2007; Bott and Brocker, 2012; Parish, 2014). Por último, recientemente, se ha descubierto que el sistema PhoQ/PhoP, un sistema de dos componentes que desempeña un papel importante en la respuesta de las enterobacterias a varios estímulos de sus huéspedes mamíferos, también percibe subidas osmóticas (Yan *et al.*, 2017).

### 1.2.1. Solutos compatibles

Los solutos compatibles son moléculas multifuncionales que se acumulan en la mayoría de los organismos en respuesta al estrés abiótico (sobre todo la elevada salinidad y elevadas temperaturas) y que son capaces de estabilizar la estructura de las proteínas celulares, pero sin interferir con el metabolismo celular, actuando así como chaperonas químicas (Welch and Brown, 1996). Por ello se denominan solutos “compatibles” y también “bioestabilizadores”.

Los diferentes grupos bacterianos acumulan un número relativamente reducido de solutos compatibles, principalmente diversos azúcares, polioles y heterósidos, ciertos aminoácidos, aminoácidos N-acetilados, ectoínas y la betaína y sus derivados (da Costa *et al.*, 1998). Entre ellos, destacan especialmente por su multifuncionalidad, la trehalosa y las ectoínas (Santos and Da Costa, 2002; Yancey, 2005) (Figura 7). Generalmente, la mayoría de las bacterias acumulan más de un tipo de soluto compatible, como estrategia para poder afrontar las diferentes agresiones ambientales.

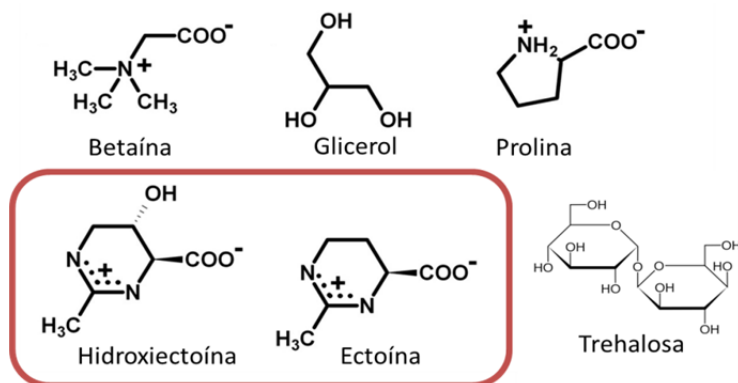


Figura 7. Estructura molecular de varios solutos compatibles.

### 1.2.2. Las ectoínas y sus aplicaciones.

La ectoína y su derivado hidroxilado, la hidroxiectoína, son los solutos compatibles mayoritarios acumulados por las bacterias halófilas y muchas halotolerantes cuando se cultivan en un medio mínimo, es decir, en ausencia de osmoprotectores. En el caso de algunas bacterias como *Sporosarcina pasteurii*, *Chromohalobacter salexigens* y *Halomonas boliviensis*, se ha descrito que la síntesis de las ectoínas está osmorregulada, produciéndose un aumento en la síntesis al aumentar la concentración salina del medio



## INTRODUCCIÓN

externo (Cánovas *et al.*, 1999; Kuhlmann and Bremer, 2002; Calderon, 2004). Las ectoínas son compuestos tetrahidropirimidínicos cíclicos y que por su naturaleza quiral, su síntesis química es prácticamente inabordable, siendo la producción biotecnológica la más factible.

Debido a su naturaleza bioestabilizadora, las ectoínas se comercializan como componentes de cosméticos y en soluciones bioestabilizadoras para la protección de enzimas y otras macromoléculas en ensayos de laboratorio. Todas estas aplicaciones comercializadas no son más que una muestra del enorme potencial biotecnológico de las ectoínas (Pastor *et al.*, 2010). Por otro lado, se ha demostrado que las ectoínas tienen también propiedades antioxidantes e inhibitoras de la respuesta inflamatoria *in vitro* (Buommino *et al.*, 2005), lo que les confiere un gran valor añadido como posibles biofármacos frente a enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson, en los que tanto el estrés oxidativo como la inflamación se han postulado como mecanismos asociados a su patología. Además, el efecto inhibitor de las ectoínas sobre los agregados de amiloide, característico de las enfermedades neurodegenerativas, o la actividad inhibitora de la agregación y la neurotoxicidad del péptido priónico 106-126 y de la apoptosis inducida por la proteína responsable de la enfermedad de Machado-Joseph, son ejemplos que manifiestan su potencial biomédico (Coronado *et al.*, 1995; Furusho *et al.*, 2005; Kanapathipillai *et al.*, 2005).

### **1.3. La bacteria halófila moderada *Chromohalobacter salexigens*.**

*Chromohalobacter salexigens*, anteriormente denominada *Halomonas elongata* DSM 3043 (Arahal *et al.*, 2001), es una gamma proteobacteria halófila de la familia *Halomonadaceae*, considerada como modelo biológico para estudiar los procesos de osmoadaptación en bacterias, ya que posee uno de los rangos salinos de crecimiento más amplios de los conocidos, siendo capaz de crecer en medio complejo de sales (SW, de Sea Water) desde 0,1 hasta 4,3 M de NaCl (Vreeland *et al.*, 1980), siendo la salinidad óptima para su crecimiento en medio mínimo de 1,5-2 M de NaCl (aproximadamente un 9-12 %) (Cánovas *et al.*, 1996; Vargas *et al.*, 2008). Entre las ventajas que posee *C. salexigens* podemos citar la facilidad para su cultivo usando medios convencionales, su gran versatilidad metabólica, la disponibilidad de herramientas genéticas para su manipulación (Argandoña *et al.*, 2012) y el hecho de que su genoma ha sido secuenciado y disponible en el servidor del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Copeland *et al.*, 2011). El hecho de que además acumule grandes cantidades de ectoínas justifica su posible uso como factoría celular para la producción de los mismos (Pastor *et al.*, 2010). Además en los últimos años la biología de sistemas ha ayudado mucho para avanzar en el

## INTRODUCCIÓN

estudio de los procesos adaptativos y han permitido sentar las bases para la mejora de cepas productoras de ectoínas (Piubeli *et al.*, 2018; Salvador *et al.*, 2018).

Además en los últimos años se han puesto a punto distintos métodos para la producción de ectoínas a mayor escala, aunque aún no se ha podido llevar la producción a nivel industrial. Alguno de estos métodos consisten en cultivos de alta densidad celular (Salar-García *et al.*, 2017) y cultivos continuos en dos biorreactores independientes (Fallet *et al.*, 2010). En uno de ellos la bacteria crece en condiciones de alta salinidad hasta alcanzar una biomasa máxima concreta y, posteriormente, en otro biorreactor las células se someten a un shock hiposmótico para que liberen las ectoínas al medio extracelular (milking). Finalmente el producto excretado se purifica y recupera por cromatografía de intercambio catiónico.

### **1.3.1. Mecanismos de osmoadaptación en *C. salexigens*: síntesis, degradación y transporte de solutos compatibles.**

A pesar de que, como estrategia general de los procariontes, existe una adaptación de la membrana citoplasmática que conlleva cambios en la hidrofobicidad-hidrofilidad de la superficie celular, el principal mecanismo de osmoadaptación de *C. salexigens* es la acumulación de solutos compatibles (ectoína, hidroxiectoína, betaína y trehalosa, principalmente), variando éstos en función de las condiciones ambientales, de ahí el interés en el estudio de sus rutas de biosíntesis, degradación y transporte.

En lo que respecta la adaptación de las membranas, Vargas y colaboradores (Vargas *et al.*, 2005) realizaron un estudio de los cambios adaptativos en la composición lipídica de la membrana citoplasmática de *C. salexigens* en respuesta a variaciones en la osmolalidad externa. En las membranas de la estirpe silvestre el fosfolípido mayoritario fue la fosfatidiletanolamina, constituyendo casi un 50 % del total de los fosfolípidos, seguido del fosfatidilglicerol y de la cardiolipina. Al aumentar la salinidad del medio de cultivo desde 0,75 M a 1,5 M de NaCl no se detectaron cambios significativos en la composición de los fosfolípidos, pero sí al aumentar la salinidad hasta 2,5 M de NaCl, observándose una ligera disminución en el contenido en fosfatidiletanolamina, no variando la proporción de fosfatidilglicerol y aumentando al doble la proporción de la cardiolipina. Adicionalmente, la composición de los ácidos grasos de dichos lípidos varió en función de la salinidad. Así, un aumento de la salinidad del medio de cultivo desde 1,5 M a 2,5 M de NaCl se tradujo en un incremento de las proporciones relativas de los ácidos ciclopropánicos a expensas de los ácidos palmitoleico y oleico respectivamente, no afectándose la proporción relativa del ácido palmítico. Sin embargo, este incremento no se detectó al aumentar la salinidad desde 0,75 M a 1,5 M de NaCl. Este estudio se realizó, además de con la estirpe silvestre, con tres mutantes sensibles a la sal afectados en alguno

## INTRODUCCIÓN

de los genes responsables de la ruta biosintética de ectoínas, con el fin de determinar el efecto del aporte exógeno de la ectoína sobre el fenotipo del crecimiento a distintas salinidades. De esta manera, el contenido en cardiolipina se vio afectado en los mutantes, restableciéndose al añadir ectoína de forma exógena. Este resultado sugiere que el aporte de ectoína podría atenuar la respuesta al estrés osmótico relativa a los cambios en la composición de los lípidos de membrana (Vargas *et al.*, 2005).

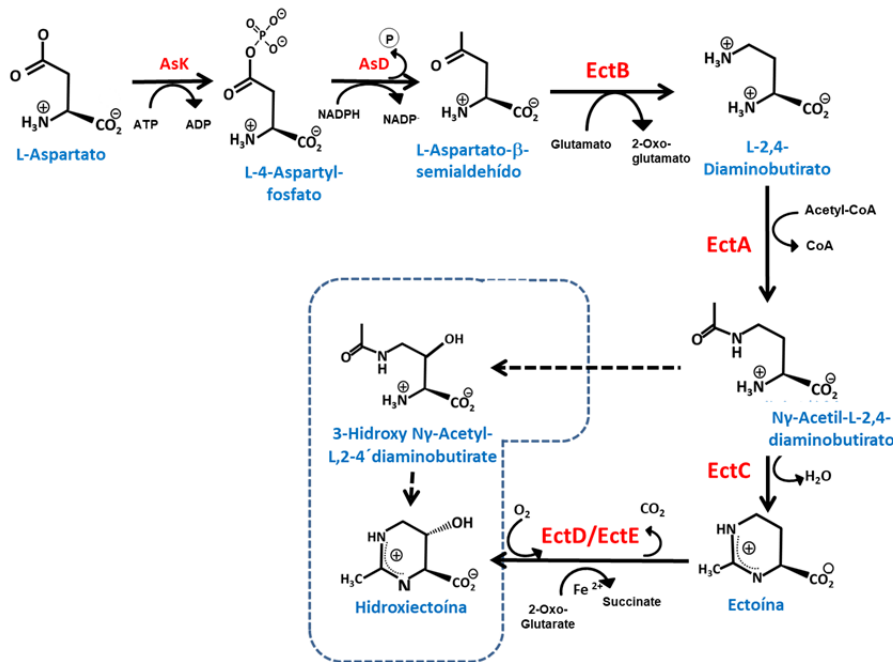
En referencia a la acumulación de solutos compatibles (ectoína, hidroxiectoína, betaína y trehalosa, principalmente), esta varía en función de las condiciones ambientales y se ha demostrado que ésta se realiza de forma jerarquizada, de manera que la presencia de betaína en el exterior celular inhibe la síntesis de ectoínas, y que las ectoínas endógenas inhiben la síntesis de trehalosa a la temperatura óptima de crecimiento (37°C), acumulándose ésta únicamente cuando la temperatura se eleva a 45°C o en mutantes incapaces de sintetizar ectoínas (Vargas *et al.*, 2008).

La síntesis de ectoína está codificada por los genes *ectABC* y comienza con la fosforilación de una molécula de L-aspartato por una aspartato kinasa (AsK), y seguidamente, una deshidrogenasa (AsD) transforma el producto fosforilado en L-aspartato- $\beta$ -semialdehído. A partir de este intermediario, la ruta continúa con tres pasos adicionales. En primer lugar, una enzima transaminasa, codificada por el gen *ectB*, intercambia el grupo funcional semialdehído por un grupo amino, generando diaminobutirato. Este compuesto, a través de una acetil transferasa codificada por *ectA*, se transforma en ácido N- $\gamma$ -acetildiaminobutírico (NADA). Finalmente el NADA, a través de un proceso de condensación en el que participa una ectoína sintasa (codificada por *ectC*), se transforma en ectoína (Cánovas *et al.*, 1998). La síntesis de hidroxiectoína desde la ectoína está catalizada por la enzima ectoína hidroxilasa, codificada por los genes *ectD* y *ectE*, y que posee actividad reversible (Vargas *et al.*, 2008; Reina-Bueno, 2010). Además, se ha propuesto una ruta alternativa para la síntesis de hidroxiectoína a partir del N- $\gamma$ -acetildiaminobutírico NADA (Cánovas *et al.*, 1999). La betaína se sintetiza a partir del precursor colina, a través de dos reacciones de oxidación catalizadas por los genes *betAB* (Cánovas *et al.*, 2000). Por último, la trehalosa se sintetiza a partir de la glucosa a través de la ruta codificada por los genes *otsAB* (Reina-Bueno *et al.*, 2012) (Figura 8).

Cuando están presentes en el medio, el transporte de solutos compatibles desde el medio externo y su posterior acumulación se prefiere a la síntesis *de novo*, ya que aquél es menos costoso desde el punto de vista energético. Así, *C. salexigens* posee sistemas para el transporte de betaína, colina, trehalosa y para el transporte de las ectoínas, éste último similar a los sistemas *teaABC* descritos en la bacteria filogenéticamente relacionada

## INTRODUCCIÓN

*Halomonas elongata* (Vargas *et al.*, 2008; Rodríguez de Moya Vera, 2010; Reina-Bueno *et al.*, 2012).



**Figura 8. Ruta biosintética de los solutos compatibles ectoína e hidroxiectoína en *C. salexigens*.** Modificación de Pastor y colaboradores (Pastor *et al.*, 2010). El espacio delimitado con línea discontinua señala la posible vía de síntesis alternativa de hidroxiectoína a partir del intermediario NADA.

Vargas y colaboradores (Vargas *et al.*, 2006) estudiaron en profundidad la utilización de las ectoínas como fuente de carbono en *C. salexigens*, poniendo de manifiesto que esta bacteria no es capaz de utilizar la ectoína y la hidroxiectoína como fuente de carbono y energía ni a baja (0,75 M de NaCl) ni a elevada (2,5 M de NaCl) salinidad, pero sí a la salinidad óptima de crecimiento (1,5 M de NaCl), lo que demuestra la existencia de una ruta catabólica para las ectoínas. Además, demostraron que la glucosa, fuente de carbono y energía preferida por *C. salexigens*, influye en el catabolismo de la ectoína cuando ésta se añade exógenamente, aunque no inhibe el transporte de ectoína ni reprime totalmente su utilización como fuente de carbono. La ruta de degradación de las ectoínas podría actuar a través de reacciones análogas a las propuestas en *H. elongata* (Schwibbert *et al.*, 2011) ya que el genoma de *C. salexigens* contiene ortólogos de dichos genes.

Como hemos dicho, las ectoínas son derivados del metabolismo primario. Los metabolitos primarios implicados en la síntesis de ectoínas son, principalmente, acetyl-coA y oxaloacetato, siendo este último el intermediario en la síntesis de L-aspartato, precursor en la síntesis de ectoínas (Figura 11). No es de extrañar, pues, que el metabolismo de *C. salexigens* esté adaptado para suplir los requerimientos de dichos intermediarios. El metabolismo central de *C. salexigens* ha sido analizado recientemente, comprobándose que la salinidad influye en el consumo de glucosa y en la producción de biomasa. De esta forma, el coeficiente estequiométrico de consumo de glucosa es mucho más alto a baja

## INTRODUCCIÓN

salinidad, mientras que la producción de biomasa es menor, sugiriendo la existencia de un metabolismo ineficiente en condiciones de baja salinidad. Dicha ineficiencia se ha comprobado que está provocada por un metabolismo exacerbado a dicha baja salinidad, que conlleva la excreción de subproductos tales como el piruvato y el acetato a lo largo de la fase exponencial del crecimiento, que no son consumidos hasta que los niveles de glucosa extracelular son mínimos.

Además, se detectó la presencia de gluconato extracelular, siendo consumido a lo largo de la fase exponencial de crecimiento, por lo que se propuso que parte de la glucosa es asimilada vía oxidación a gluconato, ya sea citoplasmáticamente o periplasmáticamente, tal como se ha descrito en *Pseudomonas putida* (Del Castillo y col., 2007) o *Gluconobacter oxidans* (Hanke et al., 2013). Esta producción y consumo de gluconato extracelular también se afectó a alta salinidad, postulándose que en estas condiciones tiene lugar una mayor oxidación citoplasmática, con implicación en la mayor producción de ectoínas en esta condición. La oxidación citoplasmática genera poder reductor, mientras que la oxidación periplasmática está asociada a la reducción de quinonas y así, una oxidación citoplasmática satisface los requerimientos de poder reductor para la mayor síntesis de ectoínas que se precisa a elevada salinidad (Pastor y col., 2013).

Adicionalmente, se analizó el patrón de marcaje de las ectoínas que se obtuvo tras cultivar a las células en presencia de glucosa  $-(1-^{13}C)$ ,  $-(2-^{13}C)$  y  $-(U-^{13}C_6)$ , combinándose con un análisis del genoma. De esta forma, se observó que *C. salexigens* utiliza la ruta de Entner-Doudoroff, pero no la glucólisis, para la producción de piruvato a partir del catabolismo de la glucosa, produciéndose a partir de dicho piruvato el acetyl-coA y el oxaloacetato necesario para la biosíntesis de ectoína. Este uso de los intermediarios del ciclo de ácidos tricarbóxicos es de especial relevancia, ya que se necesitan vías anapleróticas activas para reponer el ciclo, es decir, que el metabolismo de esta bacteria se haya adaptado para soportar la retirada de dichos intermediarios.

Recientemente (José M. Pastor *et al.*, 2013) describieron el metabolismo central de *C. salexigens* durante la osmoadaptación. Mostraron que la salinidad influye en el consumo de glucosa y la producción de biomasa. Por lo tanto, el coeficiente estequiométrico de consumo de glucosa fue mucho mayor a baja salinidad, mientras que la producción de biomasa fue menor, lo que sugiere la existencia de un metabolismo ineficiente a baja salinidad. Además, se observó un metabolismo de desbordamiento u “overflow” a baja salinidad, que podría ser responsable de la menor eficiencia del metabolismo del carbono en esta condición. Esta pérdida de carbono puede surgir un catabolismo limitado de glucosa a baja salinidad, lo que lleva a una mayor excreción de acetato, piruvato y lactato. Curiosamente, estos metabolitos excretados se produjeron durante el crecimiento

## INTRODUCCIÓN

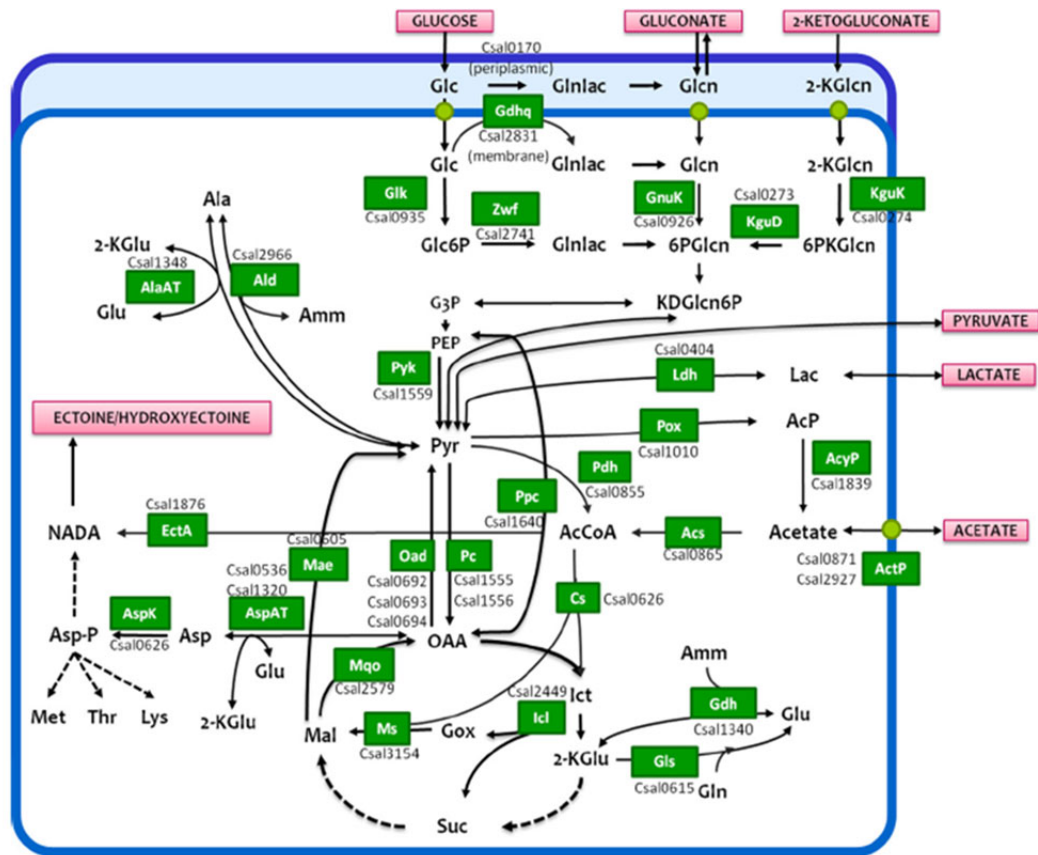
exponencial, pero posteriormente se eliminaron y se usaron como fuentes secundarias de carbono cuando se agotó la glucosa. Además, se detectó gluconato en el medio extracelular hasta la mitad de la fase logarítmica, y luego se consumió de manera dependiente de la salinidad. A diferencia de *E. coli*, *C. salexigens* utiliza la vía Entner-Doudoroff (DE) en lugar de la vía glucolítica estándar para el catabolismo de la glucosa. En esta vía, también descrita en otras proteobacterias como *Pseudomonas putida* (Del Castillo *et al.*, 2007) o *Gluconobacter oxydans* (Hanke *et al.*, 2013), la glucosa se oxida en gluconato en el periplasma y citoplasma a través de D-glucono-1, 5-lactona y las enzimas quinoproteína glucosa deshidrogenasa (Gdcq) y gluconolactonasa (Glcnl) (Figura 9). En la variante periplásmica, el gluconato producido es transportado al citoplasma a través de un transportador de gluconato similar a GntP, y fosforilado por GnuK, para obtener gluconato-6P. Por otro lado, la glucosa captada por *C. salexigens* podría entrar en la variante citoplásmica de DE a través de la acción concertada de una glucoquinasa (Glc), una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Zwf) y una 6-fosfogluconolactonasa (Pgl) (José M. Pastor *et al.*, 2013) (Figura 9).

En *C. salexigens*, la producción de ectoínas es una vía osmoregulada que implica las rutas metabólicas centrales mediante la extracción cuantitativa de intermedios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). La vía biosintética de la ectoína comienza con la fosforilación del L-aspartato y consume acetil-CoA, que se produce por la descarboxilación oxidativa del piruvato por la piruvato deshidrogenasa y el oxaloacetato (OAA) (Figura 8). Este uso de intermediarios del ciclo TCA es de especial relevancia, ya que se necesitan vías anapleróticas activas para reponer el ciclo. En consecuencia, el metabolismo de *C. salexigens* se ha adaptado para apoyar esta ruta biosintética. El particionamiento de piruvato y acetil-CoA en los nodos Pc/Pdh, EctA/Cs y Pc/Cs reveló que la relación de flujos de anaplerosis y catabolismo, con respecto a la síntesis de ectoínas, es similar a baja y alta salinidad. Esto es de alguna manera sorprendente ya que se esperaba una carga biosintética más baja a bajas concentraciones de sal, cuando la síntesis de ectoína es baja y podría estar relacionada con el metabolismo de desbordamiento (José M. Pastor *et al.*, 2013).

Por otro lado, la mayor producción de ectoínas a elevada salinidad se produjo a expensas de una menor producción de proteínas, para equilibrar el consumo total de amonio (Argandoña *et al.*, 2010). Este es un hallazgo notable, ya que la mayor producción de ectoínas a elevada salinidad debería conducir a una mayor demanda de la fuente de nitrógeno (ya que la ectoína se considera un aminoácido heterocíclico o como un derivado de pirimidina parcialmente hidrogenado). Sin embargo, la estequiometría del consumo de

## INTRODUCCIÓN

amoníaco no varió entre condiciones de baja y elevada salinidad (José M. Pastor *et al.*, 2013).



**Figura 9. Esquema del metabolismo central y síntesis de ectoínas en *C. salexigens* basado en el genoma anotado.** Se proponen vías que conducen de la glucosa al gluconato de 6-P (6PGln) en la comparación del análisis *in silico* de *C. salexigens* y *P. putida* (Jose María Pastor *et al.*, 2013). Las flechas punteadas se usan para conversiones que requieren más de un paso enzimático.

Con respecto a la regulación, la cantidad intracelular de ectoínas en *C. salexigens* debe ser finamente ajustada para responder adecuadamente a todas las variaciones del medio externo. Para ello *C. salexigens* es capaz de integrar distintas señales tanto internas como externas, y controlar, a través de una compleja red de señalización la síntesis, el transporte y el catabolismo de ectoínas. En cuanto a la síntesis, existe una región promotora, llamada PectA1-4, cadena arriba de los genes *ectABC*, cuya inducción depende principalmente de salinidad. La activación de este promotor se da a través de los factores transcripcionales de estrés  $\sigma_s/\sigma_{70}$  y del factor transcripcional dependiente de hierro Fur (Figura 10). Además, el promotor PectB es un promotor interno situado cadena arriba del gen *ectB* cuya activación se da a altas temperaturas, a través del factor transcripcional de estrés térmico  $\sigma_{32}$  (Calderon, 2004; Vargas *et al.*, 2008; Argandoña *et al.*, 2010; José M. Pastor *et al.*, 2013). Sin embargo, la expresión de los genes *ectABC* está parcialmente reprimida por la presencia de hierro y osmoprotectores como la betaína y la propia ectoína (Calderon, 2004; Pastor *et al.*, 2010). Además, se ha visto que el regulador global

## INTRODUCCIÓN

*rpoS* involucrado en la adaptación metabólica al estrés, contribuye también a la expresión de los genes *ectABC* en células ya adaptadas a alta o baja salinidad (Salvador *et al.*, 2015). Por otro lado, el gen *ectD*, esencial para la hidroxilación de la ectoína, está también osmo- y termorregulado por los factores  $\sigma^{32}$  y  $\sigma^{70}/\sigma^S$  y el activador transcripcional *ectZ* (Reina-Bueno, 2010) (Figura 9). Por otro lado, la captación y transporte de ectoínas presentes en el medio externo está regulada por el gen *eupR* (de Ectoine Uptake Regulator), que codifica un regulador de respuesta perteneciente a la familia NarL/FixJ. (Rodríguez-Moya *et al.*, 2010) (Figura 10).

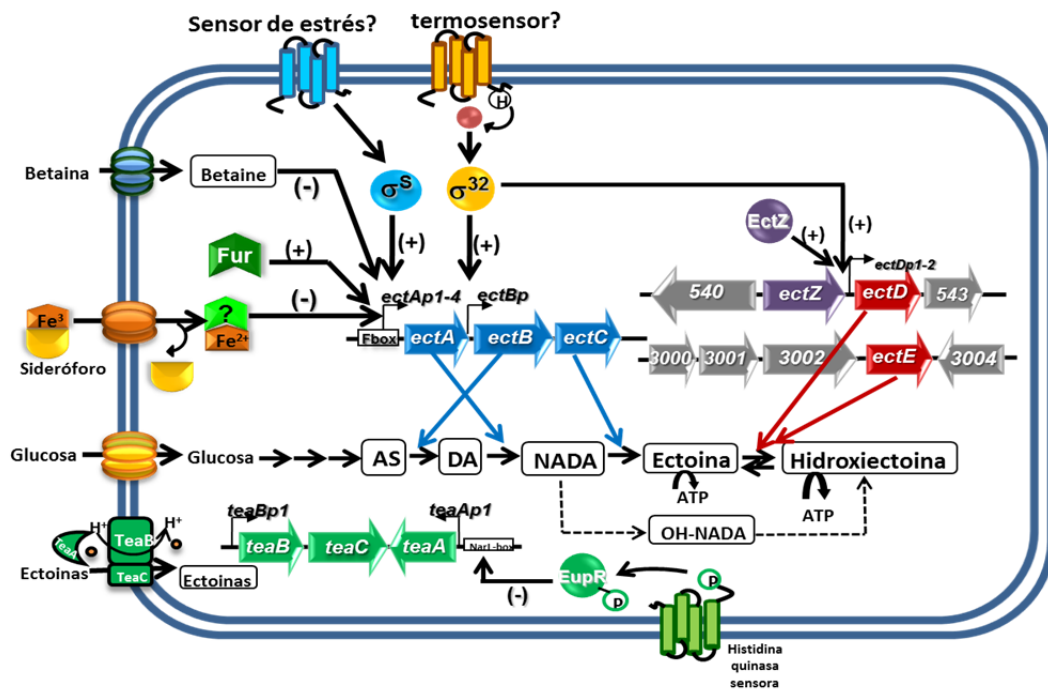


Figura 10. Regulación de la síntesis de ectoínas en *Chromohalobacter salexigens*

De hecho, *EupR* es el primer regulador de respuesta perteneciente a un sistema de dos componentes que se describe implicado en la osmorregulación bacteriana (Rodríguez-Moya *et al.*, 2010). En primer lugar, un mutante en dicho regulador fue capaz de utilizar ectoínas como fuente de carbono a baja salinidad, pero también presentó un crecimiento muy lento con glucosa como única fuente tanto a baja como a elevada salinidad (Rodríguez-Moya *et al.*, 2010). Por otro lado, se comprobó que los promotores de los genes *teaABC* de *C. salexigens* están controlados por *EupR* (Rodríguez de Moya Vera, 2010), lo que sugiere que *EupR* estaba implicado en el control del transporte de ectoínas en condiciones de baja salinidad (Rodríguez-Moya *et al.*, 2010). Finalmente, el gen *csal\_0869*, separado por dos genes de *eupR* en dirección 3', fue identificado mediante el programa STRING como el posible gen que codifica la histidina quinasa híbrida asociada a *EupR* (Rodríguez-Moya *et al.*, 2010).



## INTRODUCCIÓN

La partición del piruvato y el acetil-coA en determinados “nodos” claves, reveló que la proporción de flujos correspondientes a la anaplerosis y el catabolismo con respecto a la síntesis de ectoínas, son similares en condiciones de elevada y baja salinidad, hecho sorprendente, ya que se esperaba que disminuyera dicha proporción a baja salinidad, circunstancia en la que la síntesis de ectoínas está muy reducida. Así, se propuso que la ausencia de variaciones en dichas proporciones podría estar relacionada con la formación de subproductos, fruto del desbordamiento del metabolismo a baja salinidad.

### **1.3.2. Csal\_0869: una histidina quinasa híbrida perteneciente a un posible sistema de dos componentes implicado en la osmoadaptación.**

Como se ha mencionado anteriormente, el gen *Csal\_0869* se ha identificado recientemente como el que pudiera codificar la histidina quinasa híbrida asociada al regulador de respuesta EupR (Rodríguez-Moya *et al.*, 2010), formando así ambos un sistema de dos componentes implicado en la regulación del transporte de ectoínas en *C. salexigens* y, por tanto, en la osmoadaptación bacteriana. Sin embargo, esta hipótesis se encuentra aún por confirmar, siendo esta confirmación uno de los objetivos de la presente Tesis.

Aunque los dominios sensores de las histidina quinasa son extremadamente diversos, se ha demostrado que los dominios miembros de la misma familia normalmente reconocen señales iguales o muy similares (Galperin and Nikolskaya, 2007b). Los análisis informáticos mediante la herramienta SMART (Simple Modular Architecture Research Tool. <http://smart.embl-heidelberg.de>), han demostrado que se trata de una histidina quinasa híbrida con dos dominios sensores, uno transmembrana y otro citoplasmático (Figura 11). El primer dominio sensor presenta un elevado grado de homología con los dominios sensores transmembrana de tipo SSSF (*sodium/solute symporters family*). El estímulo captado por este tipo de dominios está normalmente asociado a la membrana o se localizan directamente en la interfaz de la misma. Este tipo de estímulos incluyen diferencias en la tensión de la membrana y el estrés de tipo mecánico, así como gradientes iónicos o electroquímicos y procesos de transporte (T. Mascher *et al.*, 2006a). El segundo dominio, citoplasmático, consta de dos subdominios PAS seguidos de un subdominio PAC C-terminal. Este tipo de dominios sensores citoplasmáticos detectan la presencia de solutos citoplasmáticos que difunden a través de la membrana, como el oxígeno y el nitrógeno, o también pueden captar estímulos transmitidos por los sensores transmembrana (Hefti *et al.*, 2004). Además de éstos, como se puede observar en la Figura 9, hay dos dominios más, uno transmisor, en el C-terminal que contiene la histidina aceptora y la región de unión a ATP, y otro dominio receptor C-terminal (REC)(Galperin, 2006).

## INTRODUCCIÓN



**Figura 11. Dominios conservados de la histidina quinasa híbrida EupK de *C. salexigens*.** Se utilizó la herramienta SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) para el análisis de dominios. Se ha indicado la histidina conservada del dominio transmisor. El péptido señal se representa con un cuadro rojo.

En resumen, la posible histidina quinasa asociada a EupR sería una histidina quinasa híbrida con dos dominios sensores, transmembrana y citoplasmático, lo que sugiere que podría detectar estímulos tanto en condiciones externas como internas e integrarlas posteriormente.

## **II. OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

Las ectoínas son un tipo de soluto compatibles acumulados por algunas bacterias halófilas que presentan un gran potencial aplicado, tanto a nivel industrial como biomédico. En los últimos años, nuestro Grupo de Investigación se ha especializado en el estudio de la bacteria halófila *Chromohalobacter salexigens*, un microorganismo sólido y fiable para su uso como factoría celular en la producción industrial de ectoínas. Para el diseño y generación de cepas recombinantes mejoradas de esta bacteria para la producción industrial de ectoínas se requiere un conocimiento integral sobre la regulación del metabolismo central relacionado con la síntesis, degradación y transporte de ectoína. Mediante las herramientas de Biología de Sistemas se ha construido un modelo metabólico como etapa inicial para el estudio del metabolismo central de *C. salexigens* sin embargo, para conectar dicho modelo con un modelo de regulación y generar un modelo híbrido más complejo, es esencial determinar los principales circuitos de regulación transcripcional.

En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de EupK/EupR, un sistema regulador de dos componentes implicado en procesos de osmodetección, siendo EupK una histidina quinasa híbrida y EupR un regulador de respuesta de tipo NarL. Así, se pretende dilucidar su implicación tanto en las rutas de transporte como en el metabolismo de las ectoínas estudiando también su regulación mediante técnicas de RNAseq. Estudios previos de nuestro Grupo han demostrado que, en *C. salexigens*, la síntesis de ectoínas está fuertemente regulada a nivel transcripcional, con la intervención de reguladores globales y específicos sin que por el momento se hayan descrito los regulones de estos reguladores.

Por otro lado, como se ha mencionado anteriormente las ectoínas son compuestos bioestabilizadores que poseen aplicaciones en Biomedicina, y en particular la ectoína se ha propuesto como candidato para la prevención y el tratamiento de enfermedades que cursan con la formación de agregados proteicos, como la enfermedad de Alzheimer. Dicha enfermedad tiene un origen multifactorial, incluyendo el daño oxidativo, una respuesta inflamatoria, y la formación de agregados proteicos tipo  $\beta$ -amiloide, procesos que están interconectados entre sí. Todo ello sugiere la conveniencia de utilizar fármacos o conjuntos de fármacos con actividad frente a más de una diana.

## OBJETIVOS

Por ello, los objetivos de esta Tesis Doctoral se pueden dividir en los siguientes objetivos específicos:

### **1. Estudio de los circuitos reguladores implicados en el control de la osmoadaptación y metabolismo de ectoínas en la bacteria *Chromohalobacter salexigens*.**

- 1.1. Caracterización molecular del sistema de dos componentes EupK/EupR.
- 1.2. Determinación de la implicación del sistema EupK/EupR en el control de la síntesis degradación y transporte de ectoínas.
- 1.3. Determinación de la implicación del sistema EupK/EupR en el control de la adaptación metabólica a salinidad.
- 1.4. Determinación de la existencia de una posible regulación cruzada de este sistema con otros sistemas de dos componentes y caracterización de los mismos.

### **2. Estudio del potencial uso de las ectoínas como agentes neuroprotectores en la enfermedad de Alzheimer.**

- 2.1. Estudios *in vitro* del efecto protector de las ectoínas frente a daño oxidativo e inflamación en líneas celulares neuronales y microgliales
- 2.2. Determinación de la capacidad de las ectoínas de atravesar la barrera hematoencefálica en un modelo murino.
- 2.3. Análisis de la capacidad neuroprotectora de las ectoínas en un modelo A $\beta$  murino de la enfermedad de Alzheimer.

### **III. CAPÍTULO 1:**

**Estudio de los circuitos reguladores implicados en el control de la osmoadaptación y metabolismo de ectoínas en la bacteria *Chromohalobacter salexigens*.**

# **1. MATERIAL Y MÉTODOS**

## 1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

### 1.1.1. Cepas bacterianas utilizadas.

Las distintas cepas empleadas en la presente tesis doctoral tanto de la bacteria halófila moderada *Chromohalobacter salexigens* como de *Escherichia coli* junto a su procedencia y características más relevantes se encuentran listadas en la tabla 1.

**Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en esta tesis doctoral.**

Cepa bacteriana	Características relevantes	Fuente o referencia
<i>Chromohalobacter salexigens</i>		
CHR61	Cepa silvestre, mutante espontáneo a la rifampicina de la estirpe de <i>C. salexigens</i> DSM 3043, RfR	Cánovas et al., 1997
CHR62	Cepa CHR61 <i>DectABC::Tn1732</i> Mutante defectivo en la síntesis de ectoína e hidroxiectoína, sensible a la salinidad, RfR, KmR	Cánovas et al., 1997
CHR103	Cepa CHR61 conteniendo el vector pMP220 sin promotor	Cánovas et al., 1997
CHR176	CHR62 <i>teaC::Ω</i> (Sm).Mutante defectivo en la síntesis y el transporte de ectoína e hidroxiectoína, sensible a la salinidad, RfR, SmR	Rodríguez- Moya, 2011,
CHR183	CHR61 <i>eupR::Ωaac</i> (Gn) Mutante capaz de utilizar las ectoínas como fuente de carbono a baja salinidad, sensible a la salinidad, RfR, GnR	Rodríguez-Moya, 2011,
CHR188	Cepa CHR61 que contiene el plásmido pPTeaALacZ.	Rodríguez-Moya, 2011,
CHR189	Cepa CHR61 que contiene el plásmido pPTeaBCLacZ.	Rodríguez-Moya, 2011,
CHR194	Cepa CHR183 que contiene el plásmido pPTeaALacZ.	Rodríguez-Moya, 2011,
CHR195	Cepa CHR183 que contiene el plásmido pPTeaBCLacZ.	Rodríguez-Moya, 2011,
CHR 196	Cepa CHR61 que tiene deletado el gen <i>rpoS</i> por la inserción del casete $\Omega$ RfR, SmR	Salvador et al., 2015
CHR212	Cepa CHR61 <i>eupK::KmR</i> Mutante en la quinasa <i>csal0869</i> ( <i>eupK</i> ) de <i>C. salexigens</i> , RfR, KmR	Este estudio
CHR213	Cepa CHR212 que contiene el plásmido pPTeaALacZ	Este estudio
CHR214	Cepa CHR212 que contiene el plásmido pPTeaBCLacZ.	Este estudio
CHR215	Cepa CHR 176 <i>eupK::KmR</i> Mutante defectivo en la síntesis y el transporte de ectoína e hidroxiectoína, sensible a la salinidad, y sin la quinasa <i>Csal_0869</i> RfR, SmR, KmR	Este estudio
CHR229	CHR61 <i>Csal_1635::SmR</i> Doble evento de recombinación tras conjugación con el plásmido pHS570 RfR, SmR	Este estudio
CHR230	CHR61 con el plásmido derivado de pMP92 con el gen <i>Csal_0869</i> insertado en fase con el promotor <i>PectA</i> en BamHI, EcoRI con una cola de <i>sterptavidina</i> en C-terminal. RifR TcR	Este estudio
CHR231	CHR61 con el plásmido derivado de pMP92 con la región C-terminal del gen <i>Csal_0869</i> insertado en fase con el promotor <i>PectA</i> en BamHI, EcoRI con una cola de <i>sterptavidina</i> en C-terminal. RifR TcR	Este estudio
CHR232	CHR61 con el plásmido derivado de pMP92 con la región N-terminal del gen <i>Csal_0869</i> insertado en fase con el promotor <i>PectA</i> en BamHI, EcoRI con una cola de <i>sterptavidina</i> en N-terminal. Rif R TcR	Este estudio
CHR233	CHR61 con el plásmido derivado de pMP92 con el gen <i>Csal_0866</i> insertado en fase con el promotor <i>PectA</i> en Sall EcoRI con una cola de <i>sterptavidina</i> en N-terminal. RifR TcR	Este estudio
CHR234	CHR61 con el plásmido derivado de pMP92 con el gen <i>Csal_0866</i> insertado en fase con el promotor <i>PectA</i> en Sall EcoRI con una cola de <i>sterptavidina</i> en N-terminal. RifR TcR	Este estudio
CHR235	CHR61 con el plásmido derivado de pMP92 con el gen <i>Csal_0866</i> insertado en fase con el promotor <i>PectA</i> en Sall EcoRI con una cola de <i>histidina</i> en N-terminal. RifR TcR	Este estudio



## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	F-f80dlacZDM15 D( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk-, mk) <i>phoAsupE44</i> l-thi-1 <i>gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
BL21(DE3)	F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm (DE3)	Invitrogen
BL21(DE3)pLysS	F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm (DE3) pLysS (KmR)	Invitrogen
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZdelta-M15 Tn10</i> (Tetr)].	Masher group
DHM1	F-, <i>cya-854, recA1, endA1, gyrA96</i> (NalR), <i>thi1, hsdR17, spoT1, rfbD1, glnV44</i> (AS).	Euromedex
BTH101	F-, <i>cya-99, araD139, galE15, galK16, rpsL1</i> (SmR), <i>hsdR2, mcrA1, mcrB1</i> .	Euromedex

### 1.1.2. Plásmidos utilizados.

En la Tabla 2 se muestra la relación de plásmidos utilizados en la presente Tesis Doctoral junto con su procedencia y las características más relevantes.

**Tabla 2. Plásmidos utilizados en este estudio**

Plásmido	Cepa hospedadora de <i>E. coli</i>	Características relevantes	Fuente o referencia
pBluescript SK(+)	DH5α	Vector de clonación de 3 kb derivado de pUC19. oriColE1, Amp <sup>R</sup>	Stratagene
pJQ200-SK	DH5α	Vector suicida, <i>mob+</i> , <i>sacB</i> . Gm <sup>R</sup>	Quandt y Hynes, 1993
pUC4K	DH5α	Derivado de pUC4 y Tn903 con un casete de resistencia a la kanamicina. Amp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup>	Pharmacia (GE Healthcare)
pRK600	DH5α	Plásmido "helper o cooperador", oriColE1, Tra <sup>+</sup> . Cm <sup>R</sup>	Kessler et al., 1992
pMP220	HB101	Vector para el análisis de promotores. IncP, gen <i>lacZ</i> sin promotor, Tc <sup>R</sup>	Spaink et al., 1987
pHS15	DH5α	Vector de expresión para bacterias halófilas moderadas. Amp <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup>	Vargas et al., 1995
pMP92	DH5α	Vector de clonación de amplio rango de hospedador, IncP, Tc <sup>R</sup>	Spaink et al., 1987
<b>Mutante Csal_0869 (eupK)</b>			
pKina1-SK	DH5α	Derivado de pKS con un fragmento de 2,3Kb que contiene parte del gen <i>csal0869</i> , el gen <i>csal0870</i> y parte de <i>csal0871</i> . Amplificado por <i>Pfu</i> TurboPCR, Amp <sup>R</sup>	Este estudio
pKina2-SK	DH5α	Derivado de pKina1-SK en el que se ha introducido un punto de corte <i>HpaI</i> en el gen <i>eupK</i> por mutagénesis <i>in vitro</i> . Amp <sup>R</sup>	Este estudio
pKina3-SK	DH5α	Derivado de pKina2-SK obtenido por la inserción en <i>HpaI</i> , de un casete de resistencia a Km, digerido con <i>EcoRV-XbaI</i> , interrumpiendo el gen <i>eupK</i> . Amp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Este estudio

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

pKina4-pJQ	DH5 $\alpha$	Derivado de pJQ200-SK con un fragmento <i>SmaI-XbaI</i> de 3,2 kb que contiene el gen <i>eupK</i> interrumpido por un casete de resistencia a Km, introducido en el vector. Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup>	Este estudio
<b>Análisis de la región transmembrana de EupK</b>			
pPTeaALacZ	DH5 $\alpha$	Derivado de pMP220 con un fragmento de 500 pb <i>EcoRI-PstI</i> que contiene la región promotora del gen <i>teaA</i> de <i>C. salexigens</i> . Tc <sup>R</sup>	Rodríguez de Moya, 2011.
pPTeaBCLacZ	DH5 $\alpha$	Derivado de pMP220 con un fragmento de 470 pb <i>EcoRI-PstI</i> que contiene la región promotora del gen <i>teaBC</i> de <i>C. salexigens</i> . Tc <sup>R</sup>	Rodríguez de Moya, 2011.
<b>Análisis de la interacción in vivo entre EupK y EupR</b>			
pUT18	DH5 $\alpha$	Vector del sistema BACTH que contiene el fragmento T18 y un MCS en su extremo 5' para crear fusiones en fase en el extremo N-terminal del polipéptido T18. Amp <sup>R</sup>	Euromedex
pUT18C	DH5 $\alpha$	Vector del sistema BACTH que contiene el fragmento T18 y un MCS en su extremo 3' para crear fusiones en fase en el extremo C-terminal del polipéptido T18. Amp <sup>R</sup>	Euromedex
pKT25	DH5 $\alpha$	Vector del sistema BACTH que contiene el fragmento T25 y un MCS en su extremo 3' para crear fusiones en fase en el extremo C-terminal del polipéptido T25. Km <sup>R</sup>	Euromedex
pKNT25	DH5 $\alpha$	Vector del sistema BACTH que contiene el fragmento T25 y un MCS en su extremo 5' para crear fusiones en fase en el extremo N-terminal del polipéptido T25. Km <sup>R</sup>	Euromedex
pUT18C-Zip	DH5 $\alpha$	Derivado de pUT18C con la cremallera de leucina de GCN4 insertada en fase en el sitio KpnI. Amp <sup>R</sup>	Euromedex
pKT25-Zip	DH5 $\alpha$	Derivado de pKT25 con la cremallera de leucina de GCN4 insertada en fase en el sitio KpnI. Km <sup>R</sup>	Euromedex
pUT18-Csal_0866	DH5 $\alpha$	Derivado de pUT18 con Csal_0866 insertada en fase en el sitio XbaI/BamHI. Amp <sup>R</sup>	Este estudio
pUT18C-Csal_0866	DH5 $\alpha$	Derivado de pUT18C con Csal_0866 insertada en fase en el sitio XbaI/BamHI. Amp <sup>R</sup>	Este estudio
pKT25-Csal_0866	DH5 $\alpha$	Derivado de pKT25 con Csal_0866 insertada en fase en el sitio XbaI/BamHI. Km <sup>R</sup>	Este estudio
pKNT25-Csal_0866	DH5 $\alpha$	Derivado de pKNT25 con Csal_0866 insertada en fase en el sitio XbaI/BamHI. Km <sup>R</sup>	Este estudio
pUT18C-Csal_0869	DH5 $\alpha$	Derivado de pUT18C con Csal_0869 insertada en fase en el sitio XbaI/BamHI. Amp <sup>R</sup>	Este estudio
pKT25-Csal_0869	DH5 $\alpha$	Derivado de pKT25 con Csal_0869 insertada en fase en el sitio XbaI/BamHI. Km <sup>R</sup>	Este estudio
pUT18C-Csal_1062	DH5 $\alpha$	Derivado de pUT18C con Csal_1062 insertada en fase en el sitio XbaI/BamHI. Amp <sup>R</sup>	Este estudio
pKT25-Csal_1062	DH5 $\alpha$	Derivado de pKT25 con Csal_1062 insertada en fase en el sitio XbaI/BamHI. Km <sup>R</sup>	Este estudio

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

pUT18C-Csal_1635	DH5 $\alpha$	Derivado de pUT18C con Csal_1635 insertada en fase en el sitio XbaI/BamHI. AmpR	TFG Álvaro
pKT25-Csal_1635	DH5 $\alpha$	Derivado de pKT25 con Csal_1635 insertada en fase en el sitio XbaI/BamHI. KmR	TFG Álvaro
pUT18C-Csal_2667	DH5 $\alpha$	Derivado de pUT18C con Csal_2667 insertada en fase en el sitio XbaI/BamHI. AmpR	TGF Dani
pKT25-Csal_2667	DH5 $\alpha$	Derivado de pKT25 con Csal_2667 insertada en fase en el sitio XbaI/BamHI. KmR	TFG Dani
<b>Expresión heteróloga de proteínas para su posterior purificación</b>			
pET151/D-TOPO®	DH5 $\alpha$	pET151/D-TOPO permite la expresión de proteínas recombinantes con una etiqueta N-terminal que contiene el epítipo V5 y una etiqueta 6xHis.	Invitrogen
pET151D TOPO-Csal_0866	DH5 $\alpha$	Derivado de pET151 / D-TOPO con Csal_ 0866 (1:130) insertado en fase. Amp <sup>R</sup>	Este estudio
pET151D TOPO-Csal_0866	BL21-plyS	Derivado de pET151 / D-TOPO con Csal_ 0866 (1:130) insertado en fase. AmpR	Este estudio
pET151D TOPO-Csal_0869	DH5 $\alpha$	Derivado de pET151 / D-TOPO con Csal_ 0869 (898:fin) insertado en fase. AmpR	Este estudio
pET151D TOPO-Csal_0869	BL21-plyS	Derivado de pET151 / D-TOPO con Csal_ 0869 (898:fin) insertado en fase. AmpR	Este estudio
pET151D TOPO-K880	DH5 $\alpha$	Derivado de pET151 / D-TOPO con Csal_ 0869 (880:fin) insertado en fase. AmpR	Este estudio
pET151D TOPO-K880	BL21	Derivado de pET151 / D-TOPO con Csal_ 0869 (880:fin) insertado en fase. AmpR	Este estudio
pET151D TOPO-K880	BL21-plyS	Derivado de pET151 / D-TOPO con Csal_ 0869 (880:fin) insertado en fase. AmpR	Este estudio
pET151D TOPO-K940	DH5 $\alpha$	Derivado de pET151 / D-TOPO con Csal_ 0869 (940:fin) insertado en fase. AmpR	Este estudio
pET151D TOPO-K940	BL21	Derivado de pET151 / D-TOPO con Csal_ 0869 (940:fin) insertado en fase. AmpR	Este estudio
pET151D TOPO-K940	BL21-plyS	Derivado de pET151 / D-TOPO con Csal_ 0869 (940:fin) insertado en fase. AmpR	Este estudio
pET151D TOPO-Csal_1062	DH5 $\alpha$	Derivado de pET151 / D-TOPO con Csal_ 1062 (163:fin) insertado en fase. AmpR	Este estudio
pET151D TOPO-Csal_1062	BL21-plyS	Derivado de pET151 / D-TOPO con Csal_ 1062 (163:fin) insertado en fase. AmpR	Este estudio
pET151D TOPO-Csal_1635	DH5 $\alpha$	Derivado de pET151 / D-TOPO con Csal_ 1635 (250:fin) insertado en fase. AmpR	Este estudio
pET151D TOPO-Csal_1635	BL21	Derivado de pET151 / D-TOPO con Csal_ 1635 (250:fin) insertado en fase. AmpR	Este estudio
pET151D TOPO-Csal_2667	DH5 $\alpha$	Derivado de pET151 / D-TOPO con Csal_ 2667 (215:fin) insertado en fase. AmpR	Este estudio
pET151D TOPO-	BL21	Derivado de pET151 / D-TOPO con Csal_ 2667 (215:fin)	Este estudio

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

Csal_2667		insertado en fase. AmpR	
<b>Ensayos de interacción in vivo proteína-proteína en <i>Chromohalobacter salexigens</i></b>			
pMP92-EupK+Ctag	DH5 $\alpha$	Derivado de pMP92 con el gen Csal_0869 insertado en fase con el promotor PectA en BamHI, EcoRI con una cola de sterptavidina en C-terminal. Tc <sup>R</sup>	Este estudio
pMP92-Cterm EupK+Ctag	DH5 $\alpha$	Derivado de pMP92 con la región C-terminal del gen Csal_0869 insertado en fase con el promotor PectA en BamHI, EcoRI con una cola de sterptavidina en C-terminal. Tc <sup>R</sup>	Este estudio
pMP92-Nterm EupK+Ntag	DH5 $\alpha$	Derivado de pMP92 con la región N-terminal del gen Csal_0869 insertado en fase con el promotor PectA en BamHI, EcoRI con una cola de sterptavidina en N-terminal. Tc <sup>R</sup>	Este estudio
pMP92-EupR+Ntag	DH5 $\alpha$	Derivado de pMP92 con el gen Csal_0866 insertado en fase con el promotor PectA en Sall EcoRI con una cola de sterptavidina en N-terminal. Tc <sup>R</sup>	Este estudio
pMP92-EupR+Ctag	DH5 $\alpha$	Derivado de pMP92 con el gen Csal_0866 insertado en fase con el promotor PectA en Sall EcoRI con una cola de sterptavidina en C-terminal. Tc <sup>R</sup>	Este estudio
pMP92-EupR+Histag	DH5 $\alpha$	Derivado de pMP92 con el gen Csal_0866 insertado en fase con el promotor PectA en Sall EcoRI con una cola de histidina en N-terminal. Tc <sup>R</sup>	Este estudio

A continuación se detallan algunos de los rasgos más relevantes de ciertos vectores anteriormente citados.

**pBluescript SK(+)** (**pSK**): Es un vector de clonación diseñado para simplificar los procedimientos de clonación y secuenciación. Lo comercializa Stratagene. Deriva del plásmido pUC19 y es de aproximadamente 3 kb. Posee el gen *lacZ* que codifica la enzima  $\beta$ -galactosidasa junto con su promotor (*Plac*), por lo que en presencia de X-gal e IPTG produce colonias azules. En el gen *lacZ* se incluye un MCS (sitio múltiple de clonación) con 21 sitios únicos de reconocimiento para enzimas de restricción que permite la fácil clonación de insertos. Así, la clonación de un inserto interrumpe el gen *lacZ* y se obtienen colonias blancas en presencia de X-gal e IPTG, ya que las cepas hospedadoras de *E. coli* poseen un fenotipo Lac<sup>-</sup>. Este vector también posee el gen *bla*, que le confiere resistencia al antibiótico ampicilina (Stratagene, San Diego, California).

**pRK600**: Es un plásmido auxiliar también denominado plásmido ayudante o “helper”, utilizado en algunos sistemas de conjugación para movilizar plásmidos mob<sup>+</sup> defectivos en la función tra ya que posee los genes *mob* y *tra*, del plásmido RK2. Presenta, además, el origen de replicación ColE1 de pBR322 para *E. coli* (Kessler *et al.*, 1992).

**pJQ200-SK**: Es un vector suicida muy versátil que permite el reemplazamiento de genes por doble recombinación homóloga en muchas bacterias Gram negativas. Es un plásmido

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

de alto número de copias, con un tamaño de 5,4 kb, que posee el origen de replicación P15A, el cual no es reconocido por gran parte de las bacterias Gram-negativas, restringido a enterobacterias, así como el origen de transferencia (*oriT*) y los genes *mob*, del plásmido RP4, que permiten su movilización a bacterias Gram negativas. Presenta como marcadores de selección el gen *aacC* que le confiere resistencia a gentamicina, y el sistema *lacZ $\alpha$*  que permite la selección blanco/azul. Además, este plásmido es movilizable e incorpora el gen *sacB* de *Bacillus subtilis*, que es inducible por sacarosa y cuya expresión resulta letal en bacterias Gram-negativas. (Quandt and Hynes, 1993).

**pMP92:** Es un vector de clonación de amplio rango de hospedador IncP, Tc<sup>R</sup>. Tiene un tamaño de unas 7 Kb y deriva del plásmido pTJS75 al que se le ha añadido el multilinker de pC20H para facilitar la clonación de insertos (Spaink *et al.*, 1987).

**pMP220:** Es un vector de clonación de amplio rango de hospedador IncP Tc<sup>R</sup> construido para crear fusiones transcripcionales con el gen *lacZ* y, de este modo, determinar, mediante medidas de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, la actividad de promotores. La actividad  $\beta$ -galactosidasa basal del vector es menor de 0,1 unidades Miller, pero cada fragmento clonado de 100 pb aumenta la actividad en, al menos, 1 unidad en *E. coli* (Spaink *et al.*, 1987).

**pHS15:** Es un vector de clonación de bacterias halófilas moderadas con múltiples sitios de restricción únicos útiles para la clonación de insertos. Contiene el plásmido pHE1, autóctono de *H. elongata*, el gen de resistencia a la estreptomicina y la espectinomicina, el plásmido pBluescript KS (incluyendo el gen de resistencia a la ampicilina y el origen de replicación de *E. coli*) y una región de 3,1 kb de la región *oriT* (Vargas *et al.*, 1995).

### **Vectores de expresión para los experimentos de doble híbrido (BACTH):**

El método BACTH requiere la co-expresión de dos proteínas híbridas dentro de la misma bacteria cya receptora. El sistema BACTH proporciona dos conjuntos diferentes de vectores compatibles que permiten fusiones genéticas de proteínas en el extremo N o C del fragmento T18 (pUT18 y pUT18C) o del fragmento T25 (pKT25 y pKNT25)(Karimova *et al.*, 1998; Battesti and Bouveret, 2012).

**pKT25:** plásmido que codifica el fragmento T25 (correspondiente a los primeros 224 aminoácidos de CyaA) que se expresa bajo el control transcripcional de un promotor *lac*. El vector pKT25 es un derivado del plásmido pSU40 de bajo número de copias, que expresa un marcador seleccionable de resistencia a kanamicina. Se inserta MCS en el extremo 3' de T25 para permitir la construcción de fusiones en fase el extremo C-terminal del polipéptido T25.

**pKNT25:** plásmido que codifica el fragmento T25 que se fusiona aguas abajo al MCS. Esto permite crear fusiones en fase en el extremo N-terminal de T25. El vector es un derivado

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

del plásmido pSU40 de bajo número de copias, que expresa un marcador seleccionable de resistencia a kanamicina.

**pUT18:** es un plásmido derivado del vector de alto número de copia pUC19, que expresa un marcador seleccionable de resistencia a ampicilina, y codifica el fragmento T18 (aminoácidos 225 a 399 de CyaA) que se expresa bajo el control transcripcional de un promotor lac. El marco de lectura abierto T18 se encuentra aguas abajo de un MCS con 9 sitios de restricción únicos. Este plásmido está diseñado para expresar proteínas quiméricas en las que se fusiona un polipéptido heterólogo al extremo N-terminal de T18.

**pUT18C:** plásmido que se diferencia de pUT18 en que el MCS está ubicado en el extremo 3' del marco de lectura abierto T18. Este plásmido está diseñado para crear proteínas quiméricas en las que se fusiona un polipéptido heterólogo al extremo C-terminal de T18.

**pKT25-zip:** es un plásmido derivado de pKT25 en el que la cremallera de leucina de GCN4 se fusiona genéticamente en marco al fragmento T25 (insertado dentro del sitio KpnI de pKT25).

**pUT18C-zip:** es un plásmido derivado de pUT18C en el que la cremallera de leucina de GCN4 se fusiona genéticamente en marco al fragmento T18 (insertado entre el sitio KpnI y EcoRI de pUT18C).

Los plásmidos pKT25-zip y pUT18C-zip sirven como controles positivos para la complementación. Expresan las proteínas de fusión T25-zip y T18-zip que pueden asociarse como resultado de la dimerización de los motivos de cremallera de leucina unidos a los fragmentos T25 y T18. Cuando pKT25-zip y pUT18C-zip se co-transforman en DHM1 o BTH101, restauran un fenotipo Cya + característico.

**pET151/D-TOPO®:** Es un plásmido de Invitrogen, que se emplea como vector de clonación y de expresión de proteínas. Está basado en los vectores de expresión desarrollados originalmente por Studier y colaboradores, y aprovecha la alta actividad y especificidad de la ARN polimerasa del bacteriófago T7 para permitir la expresión regulada de genes heterólogos en *E. coli* gracias al promotor T7 (Studier and Moffatt, 1986; Rosenberg *et al.*, 1987; Studier *et al.*, 1990). El vector presenta una región promotora T7, una región de que contiene el epítipo V5, una etiqueta de poli histidinas (6xHis) y un sitio de reconocimiento de TEV para permitir la eliminación de la etiqueta después de la purificación de proteínas utilizando proteasa TEV (Figura 12). Además, posee un gen que confiere resistencia a la ampicilina (Amp<sup>R</sup>). Para lograr el reconocimiento del promotor por parte de la polimerasa, es necesario transformarlo dentro cepas de *E. coli* como BL21 (DE3). Esta cepa es lisogénica para el bacteriófago DE3. Dicho bacteriófago es un derivado de lambda que porta la región de inmunidad del fago 21, un fragmento de DNA con el gen *lacl*, el promotor *lacUV5* y el gen de la ARN polimerasa

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

T7. Es decir, que en este tipo de bacterias, el único promotor capaz de producir la transcripción de la ARN polimerasa T7 en el lacUV5, que además es inducible por IPTG. Al añadir IPTG al medio, se inducirá la plomerasa T7 con lo cual se inducirá también la expresión de los genes introducidos en vectores bajo promotores T7, como pET151.

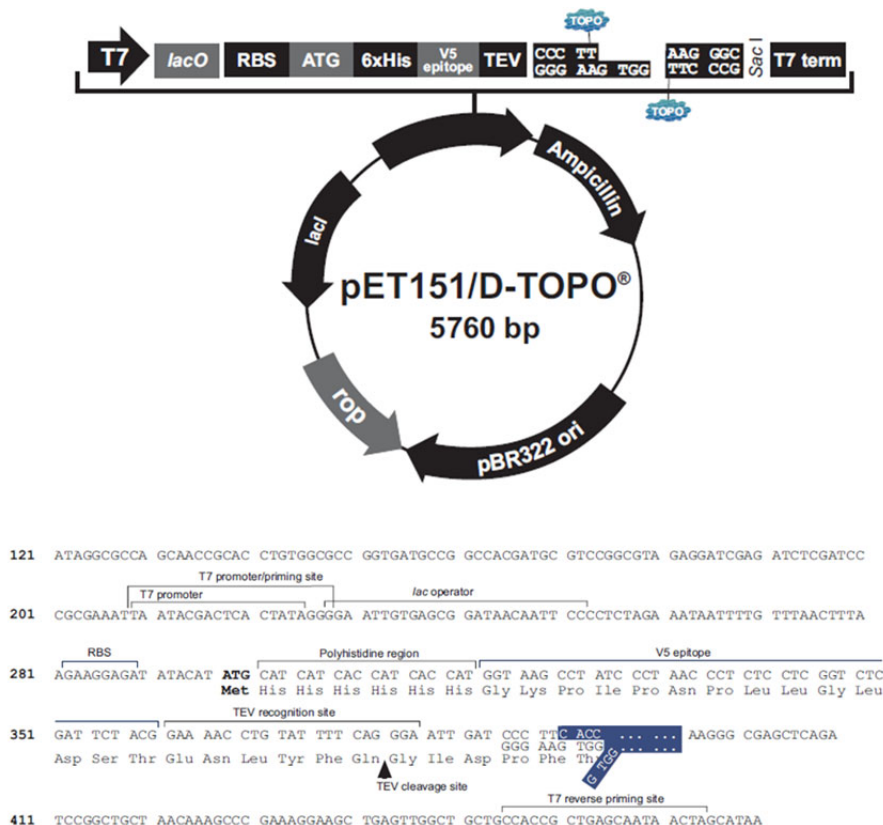


Figura 12: Esquema del vector de clonación pET151/D-TOPO con detalle de la región de clonación. (Invitrogen)

### 1.2. MEDIOS DE CULTIVO.

A continuación, se detalla la composición de los diferentes medios de cultivo utilizados de rutina a lo largo de este trabajo. Tras su preparación, todos se han esterilizaron en autoclave durante 20 min, a una temperatura de 121 °C y a una presión de 1 atmósfera.

Para la preparación de los medios de cultivo sólidos se ha utilizado Agar Bacteriológico Europeo (iNtRON, Pronadisa, OXOID) a una concentración entre 1.5- 2 % (p/v) según el experimento. Las fuentes de carbono que se han empleado han sido glucosa (Panreac), maltosa (Difco), o ectoína (bitop AG) según el experimento, a una concentración de 1, 10 o 20 mM. La concentración de NaCl en el medio varió desde 0 M, 0,6M (3.5% sales) o 2.5 M (14.5% de sales) en función del experimento.

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

Cuando fue necesario, se agregaron los siguientes compuestos al medio: X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido) (Sigma), IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido) (Sigma), sacarosa (Sigma).

### 1.2.1. Medios de cultivo para *Escherichia coli*

#### 1.2.1.1. Medios complejos.

Se definen como medios complejos aquellos cuya composición exacta no se conoce, al tener entre sus componentes algunos ingredientes cuya composición química se desconoce como por ejemplo los extractos de levadura o de peptonas.

**Medio LB:** Como medio de crecimiento habitual para las cepas de *Escherichia coli* se utilizó el medio LB (Luria-Bertani) cuya composición se muestra a continuación (Jeffrey H Miller, 1972):

Composición del medio Luria-Bertani (LB):	
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> Odest. c.s.p	1000 ml

**Medio LB modificado:** para los experimentos de BACTH se utilizó una variante del medio Luria-Bertani cuya composición es la siguiente (Karimova *et al.*, 1998):

Composición del medio LB modificado	
Triptona	10 g
Extracto de levadura	10 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> Odest. c.s.p	1000 ml

El pH se ajustó a 7,0 con una solución de NaOH

**Medio MacConkey:** para los experimentos de BACTH se emplea el medio agar MacConkey (Difco Laboratories) ya preparado a una concentración de 40 g de en 1 litro de agua destilada 4% (p/v) que se esterilizar en autoclave (Battesti and Bouveret, 2012). Tras la esterilización se añadió maltosa como única fuente de carbono a una concentración de 25 mM (1% p/v) (Difco). Su composición se muestra a continuación:

Composición del medio Agar MacConkey:	
Peptona	17,0 g
Peptona de proteosa	3,0 g
Sales biliares N.o3	1,5 g
NaCl	5,0 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,001 g
Agar	13,5 g
Agua destilada	c.s.p. 1000 ml



**1.2.1.2. Medios mínimos o sintéticos.**

A diferencia de los anteriores, los medios mínimos o sintéticos son aquellos donde se conoce exactamente la composición química. Además, se debe proveer una fuente de energía para que el microorganismo pueda crecer (como fuente de carbono o nitrógeno) así como factores de crecimientos orgánicos que el microorganismo no pueda sintetizar.

**Medio M63 modificado:** para los experimentos de BACTH se ha empleado una variante del medio M63 (Jeffrey H Miller, 1972; Karimova *et al.*, 1998; Battesti and Bouveret, 2012) cuya composición se muestra a continuación:

Composición del medio M63 modificado	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13,6 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g
MgSO <sub>4</sub>	0.4g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5mg
H <sub>2</sub> Odest. c.s.p	1000 ml

Ajustar el pH a 7,0 con KOH y autoclavar. Tras la esterilización, se añade una solución de vitamina B1 esterilizada por filtración a una concentración final de 0,5µg/ml, junto con la fuente de carbono y los antibióticos necesarios.

Para la preparación de medio M63 sólido fue necesario autoclavar por separado la cantidad de agar correspondiente para evitar la precipitación de las sales, que se añadió posteriormente al medio.

**1.2.2. Medios de cultivo para *Chromohalobacter salexigens***

**1.2.2.1. Medios complejos.**

**Medio SW:** Las distintas cepas de *C. salexigens* se cultivaron en un medio salino compuesto a partir de una solución stock concentrada de sales (al 30 %), denominada SW30 donde SW deriva de las iniciales en inglés de “Sea Water” (Subow, 1931), que se adicionó en la proporción adecuada con agua destilada para obtener los medios con diferentes concentraciones salinas (p/v), y un 0,5 % de extracto de levadura (iNtRON, Pronadisa). Dicha solución de sales mantiene las proporciones relativas del agua del mar, con una ligera disminución en las concentraciones de CaCl<sub>2</sub> y NaHCO<sub>3</sub> para evitar la precipitación de las mismas. Cuando fue necesario, el medio se preparó a diferentes concentraciones salinas finales entre el 2 y el 10 % (p/v) y los medios resultantes se denominaron SW2 y SW10, respectivamente(Nieto *et al.*, 1989).

La composición de la solución de stock SW-30 se detalla a continuación:

Composición del medio SW30	
NaCl	234 g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	39 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	61 g
KCl	6 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1 g
NaBr	0,7 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,2 g
H <sub>2</sub> O dest. c.s.p	1000 ml

El pH se ajustó a 7,2 con una solución de KOH 1 N.

#### 1.2.2.2. Medios mínimos.

**Medio M63:** Como medio mínimo se ha utilizado el medio M63 (Csonka, 1982). Su composición base, a la que se le añadirán tanto la fuente de carbono como la concentración de NaCl deseada para cada experimento es la siguiente:

Composición del medio M63	
KOH	4,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	16,3 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g
MgSO <sub>4</sub>	0,195 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,005 g
H <sub>2</sub> Odest. c.s.p	1000 ml

El pH se ajustó a 7,2 tras la adición de la cantidad de NaCl correspondiente con una solución de KOH 1 N.

Para la preparación de medio M63 sólido fue necesario autoclavar por separado la cantidad de agar correspondiente, que se añadió posteriormente al medio.

### 1.3. CONDICIONES DE CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS.

#### 1.3.1. Condiciones de cultivo

La temperatura habitual de crecimiento para las todas las cepas tanto de *C. salexigens* como de *E. coli* fue de 37 °C. Los cultivos líquidos se incubaron en agitadores orbitales (New Brunswick Sci. Co) a una velocidad de 200-220 r.p.m. Para la realización de las curvas de crecimiento de los cultivos líquidos, se determinó la D.O. a 600 nm de los mismos en un espectrofotómetro LanOptics serie 1100 (LABOLAN).

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1.3.2. Conservación a 4 °C

Las cepas utilizadas fueron inoculadas en placas con el medio y los antibióticos correspondientes. Después de la siembra de las placas y posterior incubación a 37 °C durante 24-48 horas, los cultivos se mantuvieron a 4 °C. De este modo se conservan las cepas durante al menos un mes, procediendo periódicamente a su resiembra.

### 1.3.3. Conservación por congelación

Las bajas temperaturas permiten una conservación a más largo plazo, utilizando el glicerol como agente crioprotector. Para ello, cada una de las cepas se cultivó en el medio líquido junto con los antibióticos correspondientes hasta alcanzar la fase exponencial. A una alícuota de dicho cultivo se le una solución de glicerol estéril en agua destilada hasta alcanzar una concentración entre el 40-50% (v/v). La mezcla se repartió en criotubos estériles, manteniéndolos congelados a -80 °C.

## 1.4. COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS.

Cuando fue necesario, a los medios de cultivo se les adicionaron diferentes compuestos antimicrobianos, proporcionados por Sigma o PAA. Las soluciones de los antimicrobianos se esterilizaron por filtración a través de filtros de membrana de 0,22 µm de diámetro (Millipore). Todas las soluciones stock se conservaron a -20 °C.

Tabla 3. Antibióticos

Antibiótico	Disolvente	Stock (mg/ml)	Conc. Final <i>E. coli</i> en LB (µg/ml)	Conc. Final <i>E. coli</i> en LB modificado (µg/ml)	Conc. Final <i>C. salexigens</i> en SW2 (µg/ml)
Ac. Nalidixico	225µl NaOH 5M	50	20	30	-
Ampicilina	Agua biestilada estéril (175µl de NaOH 5N)	100	150	100	-
Cloranfenicol	Etanol 96% (p/v)	50	30	-	-
Estreptomicina	Agua bidestilada	100	20	100	50
Gentamicina	Agua bidestilada	20	20	-	25
Kanamicina	Agua bidestilada	100	50	50	75
Rifampicina	Metanol ó DMSO	25	25	-	25
Tetraciclina	50% Agua bidestilada 50% Etanol	10	15	-	100

## 1.5. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ADN

### 1.5.1. Extracción de ADN plasmídico

Para la purificación de plásmidos a gran escala (cultivos de más de 50 ml) se utilizó el sistema Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System de Promega siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para la preparación de plásmidos a utilizar en procesos de ligación o secuenciación, que requieren una gran pureza de las muestras, se utilizaron los kits

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

comerciales Wizard Plus SV Miniprep (promega), GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific), HiYield Plasmid Mini DNA Kit (SLG) o QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) según la disponibilidad.

Para el análisis rutinario de plásmidos se utilizó el método de “Boiling Lysis”, según el manual de Sambrook y Russel (Sambrook and Russell, 2001) que se describe a continuación:

### 1.5.2. Método de “Boiling”

La extracción de plásmidos por calor (método de “boiling”) se utiliza para extraer ADN plasmídico de un gran número de muestras empleando pequeños volúmenes (minipreps). El ADN suele ser de calidad inferior al obtenido con otros métodos como los kits comerciales, pero sirve de screenig preliminar. Las bacterias se lisan tras tratamiento con lisozima, tritón y calor. El ADN cromosómico queda en la pared celular y se elimina por centrifugación. El ADN plasmídico queda en el sobrenadante y se precipita con isopropanol.

#### PROTOCOLO

- 
- Coger 1,5 ml de cultivo bien crecido y centrifugar 3' a 12000 rpm. Tirar el sobrenadante.
  - Resuspender en 200 µl de STET Buffer.
  - Añadir 10 µl de lisozima (10 mg/ml)
  - Incubar 5' a T<sup>a</sup> ambiente mezclando de vez en cuando
  - Incubar 1' a 100 °C
  - Centrifugar 15' a velocidad máxima
  - Retirar con un palillo estéril los restos de células
  - Añadir 100 µl de dH<sub>2</sub>O y 300 µl de Isopropanol
  - Incubar 5' a T<sup>a</sup> ambiente
  - Centrifugar 5' a velocidad máxima. Tirar el sobrenadante
  - Dejar secar al aire a 37°C
  - Resuspender en 30 µl de dH<sub>2</sub>O
- 

**STET Buffer: Sacarosa 8 %, Tritón X-100 0,5 %, EDTA 50 mM, Tris ClH pH8 50 mM.**

### 1.5.3. Extracción del ADN genómico.

Para la extracción y purificación del ADN genómico se utilizaron los distintos kits comerciales: “Genomic DNA Mini Kit” (Bioline), “PureLink® Genomic DNA Kits” (Life Technologies) o “RecoverEase DNA Isolation Kit” (Stratagene), según la disponibilidad, y se siguieron las recomendaciones de los fabricantes.

### 1.5.4. Electroforesis del ADN en geles de agarosa

El ADN es una molécula que posee carga negativa y, por tanto, cuando se carga en un gel de agarosa y es sometido a un campo eléctrico (electroforesis) migra hacia el ánodo (polo positivo). Esta migración es inversamente proporcional al logaritmo del peso molecular, consiguiéndose de esta forma separar fragmentos de ADN de distintos tamaños. Los fragmentos pequeños de ADN migran más rápidos, estando más cercanos al ánodo, y los fragmentos grandes se desplazan más lentamente, por lo que están más cercanos al cátodo.

Esta técnica se utilizó para visualizar tanto el ADN genómico como plasmídico, así como para separar según su tamaño los fragmentos de ADN obtenidos por digestión con enzimas de restricción o visualizar los productos de PCR. Se realizó en geles horizontales de agarosa (D1 Low EEO, iNtRON) cuya concentración osciló entre 1 y 2 % (p/v), preparados en TAE 1x y sumergidos en el mismo tampón. La concentración de agarosa del gel varió según el tamaño de los fragmentos que se querían separar y visualizar. Rutinariamente se prepararon los geles con una concentración de agarosa del 1 %, mientras que para visualizar fragmentos muy pequeños de ADN se utilizaron geles con una elevada concentración de agarosa, como 1,5 o 2 %. El voltaje usual de trabajo ha sido de 90 V. Para la visualización del ADN, durante la preparación del gel se añadió un 7 % de bromuro de etidio (Promega) o RedSafe (iNtRON) que se intercalan en la doble cadena de ADN, permitiendo su visualización al exponer el gel a la luz ultravioleta de una longitud de onda de 360 nm, usando un transiluminador (TFP-M/WL). Como patrón de pesos moleculares se utilizó el "1 kb DNA ladder" (gTPbio e Invitrogen). Para fotografiar los geles se usó una cámara digital Kodak CD290 asociada al programa Kodak 1D 3.5. Las fotografías se imprimieron en una impresora térmica Sony Digital UP-D895.

#### Soluciones empleadas

---

**Tampón TAE 50x:** ácido acético glacial: 57,1 ml; EDTA 0,050 M pH 8,0: 100 ml; Tris base: 242 g; H<sub>2</sub>Odest. c.s.p. 1000 ml

---

### 1.5.5. Cuantificación de ácidos nucleicos

El ADN purificado se cuantificó en un espectrofotómetro (NanoDrop; Thermo Scientific), aprovechando la capacidad de las bases nitrogenadas de absorber a una longitud de onda de 260nm. Históricamente, la relación de absorbancia a esta longitud de onda se ha utilizado como una medida de pureza en las extracciones de ácidos nucleicos. Una razón de absorbancia a 260nm/280nm cercana de ~ 1.8 generalmente se acepta como "pura" para el ADN. De manera similar, se acepta la absorbancia a 230 nm como

resultado de otra contaminación; por lo tanto, la relación de A260 / A230 también se calcula con frecuencia. Los valores en este caso están comúnmente en el rango de 2.0-2.2.

### 1.5.6. Manipulación enzimática del ADN

#### 1.5.6.1. Digestión del ADN con endonucleasas de restricción.

La digestión del ADN se realizó en las condiciones óptimas para cada enzima de restricción, según las indicaciones de temperatura y tampón recomendadas por el proveedor (Fermentas, NEB). Las digestiones con más de una enzima de restricción se realizaron de forma simultánea en el tampón universal KGB (McClelland *et al.*, 1988).

#### Soluciones empleadas

---

---

Tampón KGB 2x: glutamato K: 200 mM; tris-acetato (pH=7,6): 50 mM; acetato Mg: 20 mM; albúmina sérica bovina 100 µg/ml; 2-mercaptoetanol: 1 mM.

---

---

#### 1.5.6.2. Desfosforilación de los extremos 5'

La desfosforilación de los extremos 5' del ADN del vector tiene como objetivo impedir la religación del mismo y favorecer su unión con el inserto. Para este proceso se utilizó la enzima fosfatasa alcalina de gamba (rSAP de NEB). Al vector, ya digerido, se le añadió fosfatasa alcalina a una concentración de 1 U/µl y el tampón de desfosforilación a una concentración final de 1x. La mezcla se incubó al menos 30 minutos a 37 °C y, posteriormente, se inactivó la enzima mediante un tratamiento de 5 minutos a 65 °C.

#### 1.5.6.3. Ligación de los fragmentos de restricción.

Tras la cuantificación (apartado 2.5.5.), se probaron distintas relaciones molares vector: inserto, dependiendo de los fragmentos que se iban a ligar y según la fórmula:

$$\text{masa Inserto (g)} = \frac{\text{masa Vector(g)} \times \text{tamaño Inserto (Kb)}}{\text{tamaño Vector (Kb)}} \times \text{relación molar} \frac{\text{Inserto}}{\text{Vector}}$$

Para la reacción se empleó la enzima T4 ADN ligasa (Promega o Invitrogen) según las indicaciones del fabricante. Esta mezcla se utilizó directamente para la transformación (apartado 2.8.2.).

### 1.5.7. Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que nos permite de manera fácil y rápida amplificar fragmentos de ADN (Saiki *et al.*, 1985, 1988; Mullis and Faloona, 1987). Partiendo de las moléculas de un ADN molde, se amplifica de manera exponencial una región contenida en ellas mediante el empleo de cebadores o "primers". Estos cebadores son dos oligonucleótidos de origen sintético diseñados siempre en la

dirección 5'→3', tanto en la cadena molde como en la reversa complementaria. La distancia que separa ambos cebadores determina la longitud del fragmento que se va a amplificar. Esta técnica se usó tanto para la obtención de fragmentos de ADN para su posterior clonación, para la comprobación de clones y para técnicas de mutagénesis *in vitro*. Las reacciones de PCR se realizaron siguiendo las indicaciones del manual de Sambrook y Russell (Sambrook and Russell, 2001), utilizándose un volumen total de 20 o 50 µl según el experimento. La enzima empleada en la mayoría de las reacciones fue la MyTaq ADN polymerase (Bioline), que se suele emplear de forma rutinaria. Para los experimentos que precisaban una alta fiabilidad en la amplificación se usó la enzima Pfu Turbo (Stratagene), Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) o Platinum™ SuperFi™ (Invitrogen) ya que éstas minimizan los posibles errores en la amplificación.

La reacción de PCR se realizó según disponibilidad en un RoboCycler (Stratagene), PCRSystem 9700 (AppliedBiosystems), un Mastercycler (Eppendorf) o T100™ Thermal Cycler (BioRad). El número de ciclos, la temperatura de hibridación de los cebadores y el tiempo de extensión variaron según el tipo de experimento realizado (Ver tabla de cebadores en Anexo). Al concluir la reacción, se comprobaron el tamaño y la calidad de los productos mediante electroforesis en geles de agarosa.

### 1.5.7.1. PCR de extensión solapada (Overlapping PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa de extensión solapada (u Overlapping-PCR) es una variante de la PCR. Se utiliza para insertar mutaciones específicas en puntos concretos de una secuencia o para unir fragmentos de ADN más pequeños en un polinucleótido más grande (Higuchi *et al.*, 1988).

El método consiste en dos reacciones de PCR primarias que generan fragmentos de ADN con extremos superpuestos y una reacción secundaria que une los dos fragmentos en un solo fragmento (Figura 13) (Sambrook and Russell, 2001)

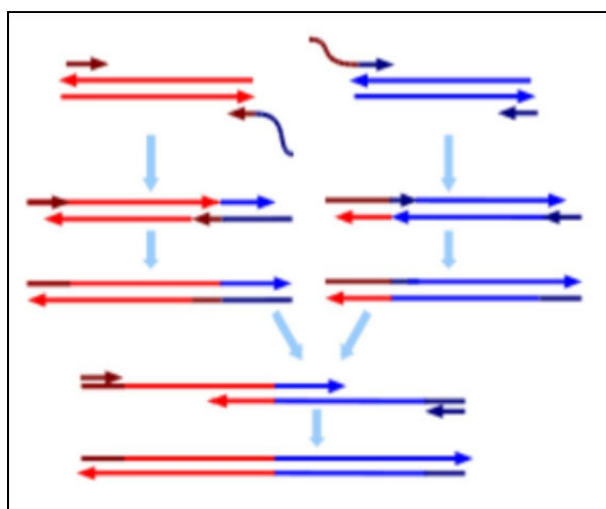


Figura 13. Esquema de la PCR de extensión solapada

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

El diseño de cebadores es uno de los pasos críticos de esta técnica. En concreto, es recomendable que los cebadores solapantes tengan de 20 a 30 nucleótidos de cada región nativa y que su contenido G+C sea cercano a 50%. Además, a los cebadores de los extremos se les puede incluir puntos de restricción que faciliten su posterior clonación. En estos casos, es recomendable añadir unos 4-6 nucleótidos antes del punto de restricción para que las endonucleasas puedan actuar de forma correcta. Los cebadores solapantes pueden ser complementarios entre sí, aunque esto es necesario sólo cuando se van a mutar algunas bases, y en este caso éstas deberían estar en el centro de cada cebador. (Tabla cebadores en anexo).

### 1.5.7.2. PCR de colonias

La PCR de colonias es un método rápido y sencillo para detectar colonias de bacterias tras un paso de transformación, ya sea para verificar que la construcción génica deseada está presente o bien para amplificar parte de la misma sin tener que purificar los plásmidos. Para ello normalmente se emplean oligos específicos del vector o plásmido en el que se ha clonado el fragmento (Bergkessel and Guthrie, 2013) (Tabla cebadores en anexo).

---

#### PROTOCOLO

---

- Coger mediante una punta de pipeta estéril la colonia de la placa.
  - Transferir la colonia a un eppendorf que contenga 50 µl de agua estéril. Mezclar bien para resuspender las células.
  - Incubar 5 minutos en agua hirviendo o en un termobloque a 99°C para lisar las células y desnaturalizar las DNAsas.
  - Centrifugar 1 minuto a 12000 g para eliminar los restos celulares.
  - Transferir 10 µl del sobrenadante a un nuevo tubo de PCR.
  - Mantener en hielo hasta su uso
  - Realizar una PCR convencional
- 

### 1.5.7.3. Aislamiento y purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Una vez separados los fragmentos de ADN mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (apartado 2.5.4), las bandas elegidas se extrajeron con el accesorio para extracción de bandas de geles de electroforesis X-tracta (LabGadget) o mediante una cuchilla estéril. El ADN se recuperó utilizando los kits Isolate PCR and Gel Kit (Bioline) o Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) según la disponibilidad y siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.



### 1.5.8. Mutagénesis dirigida por PCR

El método de mutagénesis dirigida por PCR se empleó para la generación de mutaciones puntuales. Para ello, se utilizó el kit Quickchange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene), ya que es el método más rápido y sencillo para realizar una mutagénesis dirigida. Para obtener la mutación se utiliza un par de cebadores complementarios que poseen la mutación deseada, ya sea la delección de un fragmento o una mutación puntual. Así, los cebadores se unen al ADN del vector que contiene el inserto donde queremos generar la mutación y se extienden mediante una polimerasa de alta fidelidad, generándose un nuevo plásmido que contiene las mutaciones deseadas. Los cebadores deben diseñarse con unas características específicas: ambos deben contener la mutación deseada y unirse a la misma secuencia de las cadenas complementarias del plásmido, deben tener una longitud de entre 25-45 bases, la mutación deseada debe estar en la zona central del cebador y deben tener un contenido en G+C como mínimo de un 40 % (Papworth *et al.*, 1996).

A continuación, la mezcla se trata con la endonucleasa de restricción DpnI (10 U/ $\mu$ l, NEB) y se incuba 1 hora a 37 °C. Esta enzima corta el ADN en la secuencia 5'-Gm6ATC-3', específica para ADN metilado y hemimetilado y que se utiliza para digerir el ADN molde y seleccionar el generado por PCR, que contiene la mutación deseada. Este ADN recién sintetizado se utiliza para transformar células competentes de distintas cepas de *E. coli* (apartado 2.8.2.) (Figura 14). (Tabla cebadores en anexo)

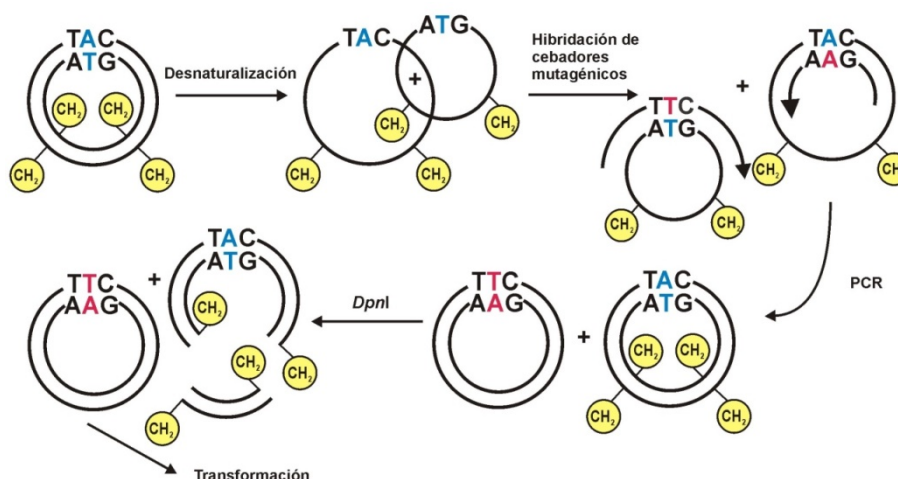


Figura 14. Esquema de la mutagénesis dirigida por PCR

### 1.5.9. Secuenciación de ADN.

Todos los fragmentos de ADN analizados en este estudio han sido secuenciados por las empresas Newbiotechnic S.A. (Sevilla), GATC (Eurofins genomics) o Genewitz según disponibilidad.

## 1.6. MÉTODOS DE TRANSFERENCIA DEL MATERIAL GENÉTICO

### 1.6.1. Conjugación triparental

La transferencia de plásmidos movilizables, aunque no auto transmisibles, desde estirpes de *E. coli* a cepas de *C. salexigens*, se realizó según el modelo de conjugación triparental, utilizando el plásmido pRK600 como plásmido ayudador o “helper” en *trans* (Kessler *et al.*, 1992). Para ello se siguió el siguiente protocolo:

#### PROTOCOLO

- Coger 100 µl del donador (plásmido en DH5 $\alpha$ ), 100 µl del Helper (PRK600) y 400 µl del receptor y mezclarlo en un eppendorf.
- Centrifugar 3' a 12000 rpm y tirar el sobrenadante
- Lavar las células con 1 ml de SW2 %
- Centrifugar 3' a 12000 rpm y tirar el sobrenadante
- Resuspender en 100 µl de SW2 % y colocar la mezcla en un filtro milipore de 0,2 µm autoclavado en una placa de SW2 %
- Incubar o/n a 37 °C
- Resuspender el filtro en 1 ml de glicerol al 20 % con vórtex y pipeta.
- Hacer diluciones seriadas (con glicerol 20 %)
- Sembrar 100 µl de cada dilución en placas de SW2 % con los antibióticos necesarios.
- Incubar 2 días a 37 °C hasta que aparezcan los transformantes.

### 1.6.2. Transformación.

La transformación es un proceso por el cual las células captan ADN libre presente en el medio. Es un fenómeno que ocurre de forma natural en muchas bacterias pero la eficiencia del proceso varía enormemente de unas especies a otras. Para que la transformación tenga lugar, la bacteria tiene que encontrarse en el llamado “estado de competencia”, que ocurre en determinadas condiciones fisiológicas; en este estado, la bacteria presenta alteraciones en su pared y membrana celular, que permiten la entrada de ácidos nucleicos en la célula.

En el laboratorio se pueden realizar tratamientos químicos y/o físicos que producen microporos en la célula, y permiten la introducción del DNA exógeno (transformación) de modo bastante eficiente. El método rutinario de transformación utilizado fue el de transformación de células competentes por choque térmico, descrito

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

por Hanahan (Hanahan, 1983). Como células competentes se utilizaron las cepas comerciales DH5 $\alpha$ , XL1 blue, BL21, BL21-pLY de *E. coli*, (Invitrogen o NEB), o bien preparadas en el laboratorio. En el caso de células competentes comerciales, se siguieron los protocolos recomendados de los fabricantes que suele ser el siguiente:

### PROTOCOLO

---

- Añadir 8  $\mu$ l de la ligación a 50  $\mu$ l de células competentes comerciales
  - Mantener 30' en hielo mezclando cada 2'
  - Choque térmico: 20'' a 42 °C
  - Mantener 2' en hielo
  - En tubos estériles de 10 ml, añadir a la transformación 450  $\mu$ l de LB
  - Incubar 1 hora a 37 °C
  - Sembrar en placas de LB con los antibióticos necesarios (50 y 100  $\mu$ l).
  - Dejar crecer o/n a 37 °C
- 

En el caso de los experimentos de BACTH donde se realizan co-transformaciones de varios plásmidos, el protocolo varía un poco (ver apartado 1.10.1.2).

#### 1.6.2.1. Preparación de células competentes

Cuando no ha sido posible emplear células competentes comerciales, se han preparado en el laboratorio. El método clásico para hacer que las bacterias sean competentes a la transformación es mediante el uso de cloruro de calcio. (Sambrook and Russell, 2001). Existen otros protocolos para hacer que las bacterias sean competentes por medio de productos químicos, y muchas más variantes de los mismos que a menudo tienen una mayor competencia, como dar una mayor cantidad de bacterias transformadas (Mülhardt, 2009). En todos los protocolos, las bacterias competentes se pueden almacenar dividiéndolas en alícuotas (generalmente son alícuotas de 50-200  $\mu$ l), congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 ° C. Sin embargo, la competencia suele disminuir.

##### 1.6.2.1.1. Método CaCl<sub>2</sub>

Las células químicamente competentes se tratan con cloruro de calcio para facilitar la unión del ADN plasmídico a la membrana celular competente. La célula se calienta alternativamente en un baño de agua, lo que abre los poros de la membrana celular permitiendo la entrada del plásmido (Sambrook and Russell, 2001).

### PROTOCOLO

---

- Poner inóculo desde una placa fresca (5ml de LB con los antibióticos adecuados) y dejar crecer o/n a 37°C y 220rpm
- Inocular un matraz con 50 ml de LB, esta vez ya sin antibióticos y dejar en agitación a 37°C hasta que alcance una densidad óptica de 0,4- 0,7 a 600nm.
- Incubar 20minutos en hielo para para el crecimiento
  - Centrifugar de 5 a 10 minutos a 6000 rpm y 4°C
- Retirar el sobrenadante y resuspender en 10 ml de solución 1
- Mantener en hielo 20 minutos
- Centrifugar 6 minutos a 6000 rpm y 4°C

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

- Retirar el sobrenadante y resuspender en 2 ml de solución 2
- Hacer alícuotas de 100µl y congelar a -80°C

---

**Solución 1: 10mM NaAc pH 5,6; 50mM MnCl<sub>2</sub>; 5mM NaCl**

**Solución 2: 10mM NaAc pH 5,6; 5% glicerol; 70 mM Cl<sub>2</sub>Ca; 5 mM MnCl<sub>2</sub>**

---

### 1.6.2.1.2. Método RbCl

Este método es una variante del método del cloruro de calcio, que proporciona un nivel de competencia ligeramente superior (Mülhardt, 2009).

---

#### PROTOCOLO

---

- Inocular e incubar 500 ml de medio LB como para el método de cloruro de calcio.
- Dejar en agitación a 37°C hasta que alcance una densidad óptica de ente 0,4- 0,7 a 600nm.
- Mantener en hielo 10 minutos
- Centrifugar 5 minutos a 6000 rpm y 4°C
- Retirar el sobrenadante y resuspender en 150 ml de TFB I
- Mantener en hielo 15 minutos
- Centrifugar 5 minutos a 6000 rpm y 4°C
- Retirar el sobrenadante y resuspender en 2 ml de TFB II
- Hacer alícuotas de 100µl y congelar con nitrógeno líquido y se almacenan a -80°C

---

**TFB I: CaCl<sub>2</sub> 10 mM; 15% (v/v) glicerol; CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K 30 mM pH 5.8; RbCl<sub>2</sub> 100 mM; MnCl<sub>2</sub> 250 mM.**

**TFB II: MOPS 10 mM pH 7,0; RbCl<sub>2</sub> 10 mM; CaCl<sub>2</sub> 75 mM; glicerol al 15%.**

La transformación continúa como con las células CaCl<sub>2</sub>.

### 1.6.2.1.3. Método TSS

Este es un método para generar células competentes en un solo paso (Chung *et al*, 1989).

---

#### PROTOCOLO

---

- Poner inóculo desde una placa fresca (5ml de Lb con los antibióticos adecuados) y dejar crecer o/n a 37°C y 220rpm
- Inocular 15 ml de LB con 150µl del inóculo (1/100), esta vez ya sin antibióticos y dejar en agitación a 37°C hasta que alcance una densidad óptica de 0,4 a 600nm.
- Centrifugar de 5 a 10 minutos a 6000 rpm y 4°C
- Retirar el sobrenadante y resuspender muy suavemente en 500 µl de TSS
- Hacer alícuotas de 100µl y congelar con nitrógeno líquido y se almacenan a -80°C

---

**TSS: 1X LB; 10 % PEG6000; 5 % DMSO; 50 mM MgSO<sub>4</sub>**

---

Para la transformación, se mezclaron 100 µl de bacterias competentes con el ADN (0,1-10 ng), incubó la mezcla durante 5-60 min a 4 °C, luego se agregaron 900 µl de medio LB con glucosa 20 mM y se incubó durante 30 -60 min a 37 ° C. Luego se sembraron en las placas adecuadas y se incubó 0/n a 37°C.

### **1.6.3. Obtención de mutantes por doble recombinación homóloga.**

Para la obtención de mutantes de *C. salexigens* por doble recombinación homóloga se utilizó el plásmido suicida pJQ200-SK, en el que se clonó una copia del gen diana interrumpido por un casete de resistencia a un antibiótico. Su punto de inserción estaba flanqueado a cada lado por, al menos, 1 kb de ADN de *C. salexigens*, a fin de posibilitar la doble recombinación. A continuación, el plásmido se transfirió desde *E. coli* DH5 $\alpha$  a la cepa receptora de *C. salexigens* mediante conjugación triparental, utilizando el plásmido pRK600 como plásmido movilizador en *trans*, según la metodología empleada para la conjugación. La selección de los transconjugantes se realizó en medio SW2, adicionado de los antibióticos correspondientes y de un 10-15 % (p/v) de sacarosa, condiciones que permitieron la selección de los dobles recombinantes. Así, se seleccionaron aquellos transconjugantes que habían adquirido la resistencia que confiere el casete de resistencia al antibiótico utilizado en cada caso (como prueba de que habían incorporado el gen interrumpido), y resistentes a la sacarosa, pero que eran sensibles a la gentamicina, lo que indicaba que el vector había sido eliminado del cromosoma de la cepa receptora por un proceso de doble recombinación homóloga. Los mutantes se confirmaron posteriormente mediante PCR con los cebadores apropiados y posterior secuenciación (Tabla cebadores en anexo).

## **1.7. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ARN**

### **1.7.1. Extracción de ARN total.**

Para obtener una extracción de ARN lo más adecuada posible, se ha de conseguir minimizar la actividad ribonucleasa en los estadíos iniciales de la extracción. Para ello, es importante que tanto reactivos como material de trabajo estén libres de ARNsas, por lo que rutinariamente se trató el agua con DEPC a una concentración del 0,1% (p/v) (Fedorcsák and Ehrenberg, 1966), que se autoclavó posteriormente para eliminar el DEPC, ya que éste puede inactivar el ARN por carboximetilación. Con este agua se prepararon el resto de reactivos no suministrados en el kit comercial. Todos los reactivos y material fungible de origen comercial utilizados durante este proceso se adquirieron libres de ARNsas. Las superficies de trabajo se trataron con SDS al 10% preparado en agua DEPC. Para la extracción y purificación del ARN se utilizaron los kits comerciales “High Pure RNA Isolation Kit” (Roche) siguiendo las recomendaciones del fabricante para el aislamiento de ARN de bacterias. Brevemente:

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

### PROTOCOLO

- Partimos de una alícuota de cultivo bacteriano de entre 1 y 3 ml según el experimento.
- Centrifugar las células 5' a 2000 g y retirar el sobrenadante por completo.
- Resuspendender en 200 µl de tampón Tris.
- Añadir 4 µl de lisozima-DEPC e incubar 10 minutos a 37°C.
- Añadir 400 µl de Lysis/Binding Buffer (kit) y mezclar bien.
- Poner la muestra en la columna con su tubo colector.
- Centrifugar 30" a 8000 g. Retirar el eluido y recuperar el tubo colector.
- Mezclar en un tubo estéril 90 µl de DNasa Incubation buffer (kit) con 10 µl de DNasa I. Añadir la mezcla a la columna e incubar 60' a temperatura ambiente.
- Añadir 500 µl de Wash Buffer I (kit) y centrifugar 30" a 9000 g. Retirar el eluido.
- Añadir 500 µl de Wash Buffer II (kit) y centrifugar 30" a 9000 g. Retirar el eluido.
- Añadir 200 µl de Wash Buffer II (kit) y centrifugar 2'30" a velocidad máxima. Retirar el eluido.
- Tirar el tubo colector y colocar la columna en un eppendorf etéril apto para ARN.
- Añadir 50 µl de agua DEPC y centrifugar 1' a 8000 g.
- Conservar el ARN a -80°C hasta su uso.

**Agua-DEPC:** agua destilada con 1/1000 de DEPC. Dejar agitando o/n y autoclavar.

**Lisozima:** lisozoma 50mg/ml en agua DEPC

**NaOH-DEPC:** NaOH 1M en agua DEPC. Dejar agitando o/n y autoclavar.

**Tampón Tris:** Tris Cl 10 mM, pH 8 (ajustado con NaOH-DEPC) en agua DEPC. Autoclavar.

**SDS-DEPC:** SDS 10% p/v en agua DEPC. Dejar agitando o/n y autoclavar (para limpieza de superficies).

Para eliminar los posibles restos de ADN se trataron las muestras con una DNasa (TURBO DNase-free de Ambion) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La ausencia de ADN se comprobó por PCR. La concentración y pureza del ARN se comprobó mediante su análisis en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (ThermoScientific) (apartado 2.6.4) y la calidad del ARN se comprobó mediante la plataforma "Bioanalyzer 2100" (Agilent) (apartado 1.7.5).

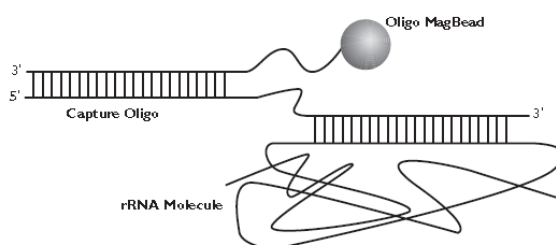
### **1.7.2. Retrotranscripción: ADN complementario**

La retrotranscripción es el proceso por el cual a partir de ARN podemos obtener ADNc (ADN complementario al ARN). El ADNc es mucho más estable que el primero y por lo tanto permite un manejo más cómodo y seguro de la muestra. El ADNc se sintetizó a partir de 2 µg de ARN total utilizando el kit comercial "Transcriptor firststrand cDNA synthesis" (Roche) siguiendo las indicaciones de fabricante. Una vez sintetizado, el ADNc se guardó a -20°C hasta su utilización. Con el fin de comprobar si reacción de retrotranscripción ha ocurrido de manera correcta, hacemos una PCR utilizando cebadores específicos de un gen cuya expresión es constante e independiente a las condiciones de cultivo (housekeeper), como puede ser el gen 16S, que posteriormente se visualiza en un gel de agarosa.

### 1.7.3. Purificación del ARN mensajero

Para la obtención del ARN mensajero (ARNm) a partir de las muestras de ARN total, se utilizaron de forma secuencial dos kits diferentes para eliminar el ARN ribosómico (ARNr) en un 99 %. En ambos kits se utilizan oligonucleótidos específicos para realizar una hibridación que captura específicamente el ARNr 16S y 23S de bacterias Gram negativas. De esta forma, se obtuvo una cantidad y concentración suficiente de ARNm para su posterior secuenciación.

El método en el que se basan los dos kits, denominado “MICROBExpress kit” (Ambion) y “Ribo-Zero Magnetic Kits Gram-negative bacteria” (Epicentre) es una nueva modificación a los protocolos convencionales de hibridación desarrollados para la captura y detección de ácidos nucleicos específicos (Hunsaker *et al.*, 1989; Morrissey and Collins, 1989; Morrissey *et al.*, 1989). El proceso implica una primera hibridación con oligonucleótidos específicos del ARNr 16S y 23S (“capture oligos”). En el segundo proceso de hibridación, se añaden oligonucleótidos derivatizados con perlas magnéticas (“oligos MacBead”) que hibridan con el extremo libre de los oligonucleótidos que han “capturado” previamente el ARNr. De esta forma, utilizando un imán diseñado a tal efecto (Single Place Magnetic Stand, Ambion), se forma un precipitado que contiene las perlas magnéticas unidas al ARNr 16S y al ARN 23S, quedando únicamente en el sobrenadante el resto de ARNm (Figura 15).



**Figura 15. Fundamento del método usado en los kits para eliminar el ARNr de una muestra de ARN total.**

Para realizar la primera fase de eliminación del ARNr se partió de 10 µg del ARN total en un volumen máximo de 15 µL y se utilizó el kit “MICROBExpress kit” (Ambion), según las instrucciones del fabricante. Tras el paso de enriquecimiento del ARNm, este debe precipitarse mediante etanol, para después resuspenderlo ya en el tampón apropiado para los siguientes experimentos. Si bien la eliminación del ARNr mediante la utilización de este kit no es completa (aproximadamente un 50%), sí permite obtener una cantidad suficiente de ARN parcialmente desribosomizado para pasar a la segunda fase de eliminación del ARNr, y obtener una cantidad suficiente de ARNm libre de ARNr al final de todo el proceso.

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

Para esta segunda fase de eliminación del ARNr se utilizó el kit “Ribo-Zero Magnetic Kits Gram-negative bacteria” y partimos de un volumen máximo de 26  $\mu\text{l}$  y de una concentración de entre 2.5-5 $\mu\text{g}$  de ARN. Con este paso conseguimos un porcentaje de depleción mínima del 90%

### 1.7.4. Cuantificación del ARN

De manera similar al ADN, el ARN purificado se cuantifica en un espectrofotómetro (NanoDrop; Thermo Scientific), aprovechando la capacidad de las bases nitrogenadas de absorber a una longitud de onda de 260nm. Una vez se ha purificado, cuantificado y comprobado su integridad (ver apartado siguiente) y el ARN es almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior utilización.

Cuando partimos de una concentración muy baja de ARN, como es en el caso de las muestras desribosomizadas, el Nanodrop no es lo suficientemente sensible, por lo que se utilizó un método de fluorimetría (Qubit®) mediante el kit Quant-iT RiboGreen (Invitrogen). El reactivo de ARN Quant-iT™ RiboGreen® es uno colorante de detección muy sensibles para la cuantificación de ARN en solución, con una detección de fluorescencia lineal en el intervalo de 1 a 200 ng de ARN. (REF)

### 1.7.5. Integridad del ARN

Para comprobar la integridad del ARN purificado se empleó el sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) como instrumento de detección y análisis. Este sistema permite llevar a cabo una electroforesis capilar de microfluidos en gel mediante el uso de un chip, sobre el cual se carga la matriz del gel, el fluoróforo que permitirá llevar a cabo la visualización del ARN y la muestra correspondiente. Tras la electroforesis, el sistema de análisis recoge la fluorescencia emitida por la muestra, previamente estimulada con láser, creando un electroferograma (fluorescencia/tiempo). El electroferograma permite conocer la calidad del ARN proporcionando el RIN (Número de Integridad del ARN; del inglés, RNA Integrity Number), mediante el uso de un software específico. El RIN establece una clasificación numérica de la calidad del ARN que comprende valores del 1 al 10, siendo 1 el RIN de un ARN totalmente degradado y 10 el RIN de un ARN perfectamente conservado (Schroeder *et al.*, 2006).

Las muestras se diluyeron hasta alcanzar un rango de concentración entre 25-500 ng/ $\mu\text{l}$ , se trataron con el kit “Agilent RNA 6000 Nano kit” (Agilent Technologies) y se cargaron en un soporte nanochip siguiendo las instrucciones del fabricante. Como estándares de un ARN de calidad se establecieron los siguientes valores para cada uno de los parámetros: A260/A280 ratio > 2,0, 23S/16S ARNratio $\approx$ 1,6, y un valor de RIN > 7,0.



## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

Del mismo modo que con la cuantificación, cuando las muestras estaban por debajo de los rangos anteriormente mencionados, se comprobó la calidad evaluando los perfiles en un pichip ("Agilent RNA 6000 pichip kit") mediante el equipo de electroforesis capilar Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). En este caso, al haber eliminado el ARNr en un 99%, no se pudieron determinar los parámetros de la relación ARNr 23S/16S, ni el RIN, por lo que para estimar la calidad del ARN únicamente se realizó un análisis visual de los perfiles de ARNm. Las muestras de ARN que se ajustaron a dichos estándares de calidad se almacenaron a -80 °C hasta su posterior utilización.

### **1.8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA**

#### **1.8.1. Determinación de actividad $\beta$ -galactosidasa**

La  $\beta$ -galactosidasa es una enzima codificada por el gen *lacZ* del operón *lac* en *E. coli*. Su función es catalizar la hidrólisis de  $\beta$ -galactósidos en monosacáridos a través de la ruptura de un enlace glicosídico. El compuesto sintético ONPG (Orto Nitro Fenil Galactopiranosido) puede ser reconocido como sustrato de esta enzima produciendo galactosa y o-nitrofenol que tiene un color amarillo. Cuando ONPG está en exceso, la producción de o-nitrofenol por unidad de tiempo es proporcional a la concentración de  $\beta$ -galactosidasa; por lo tanto, la producción de color amarillo se puede utilizar para determinar la concentración de enzima (Jeffrey H. Miller, 1972).

##### **1.8.1.1. Fusiones transcripcionales de promotores**

Los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa para aquellos plásmidos que contenían fusiones transcripcionales de secuencias promotoras al gen *lacZ* (pP<sub>Tea</sub>ALacZ y pP<sub>Tea</sub>BCLacZ), se realizaron según el método de Miller et al. (Jeffrey H Miller, 1972). Se partió de un preinóculo de 5mL de medio SW2 en fase exponencial. Se inocularon los distintos matraces de medio mínimo y diferentes salinidades y fuentes de carbono a una concentración final 1/100 con dicho preinóculo. Se cultivaron a 37°C en agitación monitorizando el crecimiento hasta alcanzar la fase exponencial media de crecimiento. A continuación, se tomaron 3 alícuotas de 800  $\mu$ L de cultivo. Se centrifugaron 3 minutos a 13.000 rpm y se retiró el sobrenadante por competo. El sedimento de células se lavó con 800  $\mu$ L de tampón Z sin beta-mercaptoetanol al menos una vez (dos si la concentración de sal era elevada) para eliminar posibles interferencias en la actividad enzimática por culpa de la sal. Se mezcló con 800  $\mu$ L de tampón Z con  $\beta$ -mercaptoetanol recién añadido 50  $\mu$ L de cloroformo y 100  $\mu$ L de SDS 0.1% (p/v), para aumentar la permeabilidad de las células. La mezcla se homogenizó en el vórtex y se mantuvo 5 minutos a temperatura ambiente antes de añadirle 150  $\mu$ L de reactivo ONPG. Se volvió a homogenizar en el vórtex y se incubó a

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

temperatura ambiente hasta que la mezcla adquirió una tonalidad amarilla, momento en el que se paró la reacción añadiendo 400 µL de solución de stop y poniéndola en hielo. Se anotó el tiempo en el que la reacción viró de color, es decir, el tiempo transcurrido entre la adición de ONPG y el stop, se centrifugó la mezcla 5-6 min a 13000 rpm y se cuantificó el color amarillo del sobrenadante en un espectrofotómetro a 420 nm.

La actividad β-galactosidasa se determinó según la fórmula descrita por Miller y col. (Jeffrey H Miller, 1972):

$$\text{actividad } \beta\text{-galactosidasa (Unidades Miller)} = \frac{A_{420} \times 1000}{t(\text{min}) \times V(\text{ml}) \times A_{600}}$$

Donde el término A420 corresponde a la absorbancia de la reacción a 420 nm de longitud de onda, V al Volumen de cultivo utilizado en la reacción expresado en mL, A600 es la absorbancia del cultivo a 600 nm de longitud de onda y t el tiempo de reacción expresado en minutos.

Como control negativo se utilizó la estirpe silvestre de *C. salexigens* con el vector pMP220 sin inserto (CHR103). Para calcular la actividad total, a la actividad correspondiente a la fusión se le sustrajo la actividad obtenida con el control negativo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y en cada caso se calculó la desviación estándar.

### Soluciones empleadas

---

**Tampón Z:** Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 60 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O 40 mM, KCl 10 mM, MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 1 mM,

**Tampón Z con β mercaptoetanol:** Tampón Z; β- mercaptoetanol 0,27% (v/v)

**SDS 0,1%:** solución de lauril sulfato sódico al 0.1% (p/v) en agua

**Reactivo de ONPG:** 13 mM de o-nitrofenil galactopiranosido, preparado en agua

**Solución de stop:** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M en agua

**Solución blanco:** 800µl tampón Z; 50 µl DSD 0,1%; 150 µl reactivo ONPG; 400 µl solución stop (añadidas al final)

---

### 1.8.2. RT-qPCR

Esta técnica se utilizó para cuantificar la expresión de genes en distintas condiciones de cultivo y diversas estirpes. A diferencia de otras técnicas convencionales de PCR, en estas PCR cuantitativas (qPCR) a tiempo real, el análisis de las muestras amplificadas se produce durante la misma reacción, monitorizando la señal fluorescente del agente intercalante SYBR Green (ROCHE) asociada al producto de PCR. En este sentido, la RT-qPCR es una técnica útil para la cuantificación de cantidades muy pequeñas de ARN. Para ello, se utilizan termocicladores que son capaces de amplificar y detectar la fluorescencia simultáneamente, como el termociclador de tiempo-real LightCycler 480-

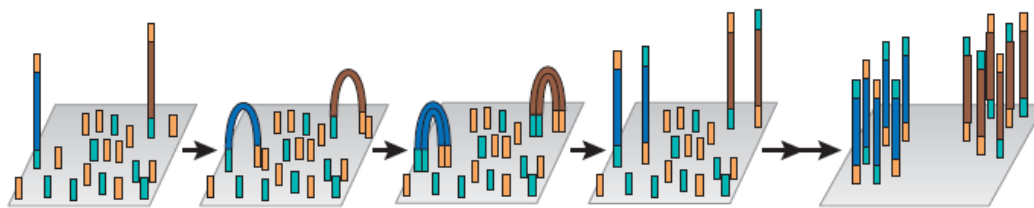
## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

Time PCR System (Roche), utilizado en la presente tesis. Este sistema combina un termociclador, un detector de fluorescencia y un software específico de amplificación.

Tanto el diseño de cebadores como las condiciones de la PCR en tiempo real se realizaron siguiendo los criterios de Argandoña y colaboradores (Argandoña *et al.*, 2010) en placas de 96 pocillos utilizando el sistema de PCR en tiempo real LightCycler®480 (Roche) y FastStart SYBRGreen Master (Rox) (Roche). Los datos de amplificación se analizaron con el Software LightCycler®480 Gene Scanning v1.5 (Roche). Los niveles de transcripción se calcularon mediante el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak and Schmittgen, 2001) utilizando los niveles de ARNm del gen 16S rRNA como control endógeno para normalizar los datos obtenidos con cada muestra.

### **1.8.3. Análisis diferencial de la expresión génica mediante RNA-seq (Illumina)**

La información obtenida de la genética se puede entender con mayor precisión si se profundiza al nivel de la transcripción, cuantificando así el nivel de expresión de dichos genes bajo diferentes condiciones. El transcriptoma es el conjunto de todas las moléculas de ARN mensajeros en una célula y refleja los genes que son activamente expresados en el momento de su extracción. El transcriptoma de un organismo dado varía en función de varios factores, como las condiciones ambientales o el nivel de desarrollo del organismo en el momento de la extracción de las moléculas. Implicadas tanto en la transcripción como en la traducción, las moléculas de ARN sirven de enlace entre los genes y las proteínas. Así, aunque la expresión génica se puede regular en diferentes etapas, la regulación transcripcional a menudo desempeña el papel más importante (Romanel *et al.*, 2012). Para facilitar la interpretación de la función del genoma y los patrones de regulación del mismo se desarrollaron los “microarrays” de ARN, métodos analíticos de alto rendimiento y bajo coste, pero con limitaciones, como es la necesidad de conocer la secuencia del genoma y la existencia de posibles errores causados por fenómenos de hibridación cruzada (Wang *et al.*, 2009). Estas limitaciones iniciales se superaron cuando se pudo secuenciar directamente los transcritos de ARN, empleando las herramientas de secuenciación masiva, de alto rendimiento o Secuenciación de Nueva Generación (NGS) (Shendure and Ji, 2008; Metzker, 2010). De éstas últimas cabe destacar la plataforma Illumina que tiene sus orígenes en los trabajos de Turcatti y colaboradores (Turcatti *et al.*, 2008) y que es actualmente una de las más empleadas. Se basa en el principio de amplificación puente (“bridge amplification”) y en el uso de nucleótidos terminadores marcados con moléculas fluorescentes (Metzker, 2010) (Figura 16).



**Figura 16.** Esquema de la tecnología Illumina, basada en la amplificación puente. Modificado de (Shendure and Ji, 2008).

El paso principal de éste método es la generación de la librería. Generalmente comienza con la preparación de la muestra de ARN total seguida de un paso de eliminación del ARN ribosomal. La muestra de ARN total se convierte luego en ADN antes de la preparación estándar de la librería.

### 1.8.3.1. Obtención de las muestras

Para ello se hizo crecer a la cepa silvestre (CHR61) así como la cepa mutante *eupR* (CHR183) en 5 mL de medio rico SW2 con los respectivos antibióticos o/n a 37°C y 220 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 1,5-1,7. Posteriormente se inoculó al 1% de volumen final en medio mínimo M63 con 20mM de glucosa como única fuente de carbono (100mL de medio en matraz de 500mL) bajo las condiciones anteriormente mencionadas, y se monitorizó su crecimiento.

Una vez que los cultivos alcanzaron la densidad óptica deseada (final de la fase exponencial, o agotamiento de la fuente de carbono), se recogieron alícuotas de 3 ml de cada uno de ellos y se centrifugaron a 13000 g durante 4 minutos. Seguidamente se desechó el sobrenadante y el sedimento con las células se conservaron a -80 °C hasta su posterior utilización.

### 1.8.3.2. Secuenciación del ARNm (RNA-seq)

Se extrajo el ARN total de las distintas muestras (apartado 1.7.1) y se eliminó el ARN ribosómico (apartado 1.7.3). Tras el control de calidad de las muestras (apartados 1.7.4 y 1.7.5) se prepararon las librerías y se generaron los diferentes grupos o paquetes de datos. Las librerías pueden ser construidas por cualquier método que dé lugar a una mezcla de fragmentos flanqueados por el adaptador de hasta varios cientos de pares de bases de longitud. La secuenciación del ARNm de todas las muestras obtenidas se realizó en la empresa Sistemas Genómicos (Valencia) mediante la plataforma Illumina HiSeq 2000. Para llevar a cabo la secuenciación se utilizó la estrategia de “*paired-ends*” a partir de la cual se leen ambos extremos del mismo fragmento obteniéndose así secuencias

emparejadas que mejoran en gran medida el proceso de análisis de mapeo de zonas conflictivas del genoma como podrían ser las zonas repetitivas.

### **1.8.3.3. Análisis bioinformático de las secuencias: Mapeo de lecturas y cuantificación de los transcritos**

El control de calidad de los datos obtenidos tras la secuenciación se llevó a cabo utilizando programas desarrollados por el servicio de secuenciación de Sistemas Genómicos. El control de calidad de las secuencias generales fue realizado mediante el programa fastqc. Seguidamente se realizó un mapeo y cuantificación de transcritos. Las lecturas generadas se mapearon frente a la última versión del genoma de "Chromohalobacter Salaxigens, versión DSM 3043" proporcionado por la base de datos NCBI. Posteriormente se eliminaron las lecturas de baja calidad en el mapeo mediante Picard Tools [<http://picard.sourceforge.net>]. Una vez seleccionadas las lecturas con un valor de calidad elevado se llevó a cabo el ensamblaje, identificación y cuantificación de los transcritos mediante inferencia bayesiana utilizando cufflinks v2.11 (Trapnell *et al.*, 2010). En el estudio de la concordancia entre las muestras de una misma condición, estudio necesario para la aceptación de las diferentes muestras como réplicas biológicas, se realizó un estudio de correlación y distancia euclídea entre muestras considerando todo el transcriptoma normalizado. Este proceso se realizó mediante el programa estadístico R (Ihaka and Gentleman, 1996).

### **1.8.3.4. Cuantificación de la expresión diferencial**

Previo a la cuantificación de la expresión diferencial, se realizaron diferentes controles de calidad de las muestras como son el contenido G+C (que puede condicionar el proceso de secuenciación y mapeo), pero también el estudio de duplicados (indicador de posibles degradaciones del material de partida), la distribución de cobertura génica o la saturación del sistema. Una vez verificado que no se detectó ninguna anomalía o desviación en ninguno de los controles de calidad por muestra, pasó a cuantificación diferencial.

Existen numerosos estudios (Risso *et al.*, 2011; Hansen *et al.*, 2012) que indican la necesidad de normalizar los datos de cuantificación para la eliminación de diferentes desviaciones estadísticas que pueden distorsionar todo el análisis posterior. Debido a la naturaleza de la secuenciación mediante RNA-SEQ, las desviaciones de mayor peso son la longitud del gen y el tamaño de librería por muestra, contenido en GC entre otros. En estos pasos de normalización que permiten eliminar o minimizar estos efectos. Se utilizó como valor para representar la expresión de un gen el número de lecturas normalizado por el

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

tamaño de la librería. Este valor junto a los diferentes procesos estadísticos que describen en (Trapnell *et al.*, 2013) permite eliminar las bias estadísticas anteriormente mencionadas.

Para llevar a cabo el estudio de expresión diferencial entre grupos de muestras se utilizó diferentes paquetes estadísticos diseñados en Python (Sanner F., 1999) y R (Ihaka and Gentleman, 1996) Para el estudio de expresión diferencial, tanto en genes como en isoformas, se utilizó el algoritmo propuesto por cufflinks (Trapnell *et al.*, 2010) utilizando como modelo de dispersión de expresión el modelo agrupado y la media geométrica como método de normalización. Se consideró gen o isoforma diferencialmente expresado aquel que presenta un valor de FolChange inferior a -1.5 o superior a 1.5 y con un valor de pValue ajustado mediante FDR (Benjamini and Hochberg, 1995) de 0.1. Por último, para el estudio de enriquecimiento funcional se utilizó el test híper-geométrico presente en el paquete base de R (Ihaka and Gentleman, 1996) para obtener el pValue asociado. Se utilizó un valor de 0.05 de pValue sin ajustar para determinar una categoría funcional como estadísticamente sobre-representada.

### **1.8.3.5. Validación mediante genes diferencialmente expresados.**

Una forma de validar los datos obtenidos mediante secuenciación masiva es calcular la correlación de los mismos mediante qPCR. Para ello se ha realizaron distintas qPCR (apartado 1.8.2) siguiendo las indicaciones de Argandoña y colaboradores (Argandoña *et al.*, 2010) utilizando genes diferencialmente expresados en la transcriptómica (Ver tabla de cebadores en Anexo). La PCR en tiempo real se realizó en placas de 96 pocillos utilizando un sistema de PCR en tiempo real LightCycler R 480 (Roche) y FastStart SYBR Green Master (Rox) (Roche). Los datos de amplificación se analizaron con el LightCycler R 480 Gene Scanning Software v1.5 (Roche). Los niveles de transcripción se calcularon mediante el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  utilizando los niveles de ARNm del gen 16S rRNA como control endógeno para normalizar los datos resultantes de cada muestra.

## **1.9. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS**

### **1.9.1. Determinación de la concentración de proteínas**

El contenido proteico se determinó según el método de Smith o ensayo del ácido bicinconínico (BCA) (Smith *et al.*, 1985), modificado según Kraegeloh y Kunte (Kraegeloh and Kunte, 2002), mediante el empleo del kit "Pierce BCA Protein Assay Kit" (Thermo Scientific). La concentración de proteína total se detectó mediante un cambio de color de

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

la solución que pasó de verde a púrpura en proporción a la concentración de proteína, que se midió utilizando técnicas colorimétricas.

### PROTOCOLO

- 
- Partiendo de 1 ml de cultivo, centrifugar 4 minutos a 13000 rpm
  - Dejar que se sequen las muestras o/n a 100°C en un termobloque
  - Resuspender en 1 ml de agua miliQ estéril
  - A 100 ml de muestra se le añade 2 ml de reactivo
  - Incubar 30 minutos a 60°C
  - Dejar atemperar las muestras y medir la absorbancia a 562nm, comparándolo con una recta patrón de BSA en un rango entre 0 y 250 µg/ml
- 

**Reactivo: 50 partes de BCA Reactivo A (que contiene carbonato sódico, bicarbonato sódico, ácido bicinoninico y tartrato sódico en hidróxido sódico 0.1M) con 1 parte de BCA Reactivo B que contienen 4% de sulfato cúprico).**

### 1.9.2. Electroforesis desnaturante de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las proteínas fueron separadas y analizadas mediante electroforesis en geles desnaturantes de poliacrilamida con SDS 0,1% (p/v), según el método descrito por (Laemmli, 1970). En este paso, las proteínas se separan en los geles de poliacrilamida dependiendo de su peso molecular. Esto se debe a que los geles contienen dodecil sulfato sódico (SDS), que es un detergente aniónico que desnaturiza las proteínas al romper los enlaces de los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas, eliminando tanto las estructuras secundarias como terciarias. De este modo, cuando las proteínas se tratan con SDS y Ditiotritiol (DTT, un agente reductor) se pueden separar por su peso molecular, existiendo una relación lineal entre el logaritmo del peso molecular y la distancia relativa de migración en el gel. La poliacrilamida se forma a partir de la co-polimerización entre los reactivos acrilamida y bis-acrilamida (N,N'-metilén-bis-acrilamida), en presencia de PSA (persulfato de amonio) que actúa como catalizador de la polimerización, y TEMED (Tetrametiletilendiamina), que inicia la reacción. En estos geles, podemos variar el diámetro de poro fácilmente cambiando las concentraciones de acrilamida y bis-acrilamida, lo que nos permite resolver proteínas de diferentes tamaños. En este trabajo, los geles preparados han sido de 12% de acrilamida. Cuando se precisaron de geles en gradiente de agarosa, se utilizaron los geles comerciales 4–20% Mini-PROTEAN TGX™ Precast Protein Gels (Biorad).

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1.9.2.1. Preparación de las muestras

Las muestras se mezclaron con el tampón de carga hasta alcanzar una concentración 1x del mismo y se calentaron a 95 ° C durante unos minutos. Con este paso se desnaturalizan por completo las proteínas permitiendo que se separen mejor en el gel, aunque este paso no es estrictamente necesario.

<b>Tampón de carga 6X</b>	
<b>Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8</b>	3 ml
<b>Glicerol</b>	3 ml
<b>SDS</b>	1 g
<b>DTT (Ditiotreitol)</b>	0.93 g
<b>Azul de bromofenol</b>	1.2 mg
<b>Agua destilada c.s.p.</b>	10 ml

### 1.9.2.2. Preparación de los geles

Los geles se prepararon con el sistema Mini-PROTEAN (BioRad). En primer lugar, se preparó el gel de separación, sobre el que se depositó el gel de empaquetamiento. En ambos casos, se añadió en último lugar persulfato amónico recién preparado y TEMED. Una vez gelificados, fueron utilizados en el momento.

<b>Gel de separación al 12.5 % (para 2 geles)</b>	
<b>Acrilamida 30%</b>	4,2 ml
<b>Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8</b>	2,5 ml
<b>SDS al 10%</b>	100 µl
<b>Persulfato amónico al 10%</b>	75 µl
<b>TEMED</b>	10 µl
<b>Agua destilada</b>	3,2 ml

Cubrir el gel con agua o butanol y permitir que polimerice al menos 20 minutos. Eliminar el agua o butanol y continuar con el gel de empaquetamiento.

<b>Gel de empaquetamiento al 4 % (para 2 geles)</b>	
<b>Acrilamida 30%</b>	0,67 ml
<b>Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8</b>	0,4 ml
<b>SDS al 10%</b>	50 µl
<b>Persulfato amónico al 10%</b>	50 µl
<b>TEMED</b>	8 µl
<b>Agua destilada</b>	3,85 ml

Poner el peine para formar los carriles y permitir que polimerice.



### 1.9.2.3. Electroforesis

Se depositaron 15 µl de muestra en cada pocillo del gel. La electroforesis se realizó en tampón de electroforesis a una intensidad de corriente de 20 mA (220V constante) por cada gel, durante aproximadamente 1 hora o hasta que el frente alcanzó el final del gel. Como patrón de peso molecular se emplearon las preparaciones comerciales Precision Plus Protein™ Standards (Bio-Rad) o PageRuler™ Plus Prestained 10-250kDa (Thermo Scientific™) según la disponibilidad.

#### Soluciones empleadas

---

---

**Tampón de electroforesis: Tris 0.025M; Glicina 0.192M; SDS 0.1%.**

---

---

### 1.9.3. Visualización de los geles de proteínas:

La tinción de proteínas es un paso importante después de las técnicas de electroforesis de proteínas como SDS-PAGE. El colorante interactúa con los aminoácidos y las proteínas se hacen visibles dentro de la matriz del gel, proporcionando información tanto sobre propiedades físicas, como el peso molecular, así como la cantidad de proteínas o la eficiencia de separación dentro del sistema electroforético. Por lo tanto, una tinción de proteína tiene que cumplir ciertos requisitos específicos. Entre otras, debe ser fácil de usar, ser sensible, teñir las proteínas de manera lineal en cuanto a su cantidad y no debe influir en los análisis posteriores que se quieran realizar (Winkler *et al.*, 2007).

#### 1.9.3.1. Tinción con azul de Coomassie

De rutina se visualizan las proteínas empleando una tinción con azul de Coomassie (Merril, 1990). Después de la electroforesis, los geles se sumergieron en la solución colorante durante 30 min en agitación o hasta que se visualizaron las bandas de interés. Transcurrido el tiempo de tinción se eliminó el exceso del colorante, lavando los geles en solución decolorante hasta que el fondo del gel esté casi claro. La tinción de Coomassie es capaz de detectar bandas que contienen aproximadamente entre 50-100 ng de proteínas.

#### Soluciones empleadas

---

---

**Solución colorante: 0,5% de azul de Coomassie R250 en ácido acético al 7%, metanol al 40% y H<sub>2</sub>O.**

**Solución decolorante: ácido acético al 7%, metanol al 40% y H<sub>2</sub>O.**

---

---

Una alternativa similar al Coomassie es el empleo del compuesto comercial BlueSafe (nzytech). Éste compuesto representa una alternativa más segura a la tinción tradicional con azul de Coomassie ya que no contiene metanol ni ácido acético en su composición. Además, no requiere el uso de una solución decolorante. Simplemente, tras el SDS-PAGE, se agrega la tinción en una proporción de 25 ml por gel y se espere a que aparezcan las bandas en unos minutos. La sensibilidad es de bandas de unos 60 ng al cabo de 10-15 minutos y bajará a 10 ng tras 30-60 minutos.

### 1.9.3.2. Tinción con nitrato de plata

Cuando las concentraciones de proteínas son muy bajas, las tinciones con azul de Coomassie o BlueSafe no son lo suficientemente sensibles. Es por ello que se realizaron tinciones con nitrato de plata ya que es aproximadamente 100 veces más sensible que la tinción con Coomassie (Winkler *et al.*, 2007). Esta técnica se basan en la reacción de nitrato de plata con los sitios de proteínas en condiciones ácidas, seguido de la reducción selectiva de iones de plata a plata metálica mediante el formaldehído en condiciones alcalinas (Merril, 1990). Se ha empleado una modificación de los protocolos de Blum (Blum *et al.*, 1987) y Oakley (Oakley *et al.*, 1980). Una vez terminada la electroforesis, el gel se lavó durante 5 minutos en agua Mili-Q. Seguidamente se fijó durante 1 hora a temperatura ambiente en solución de fijación. Tras la fijación se realizaron tres lavados de 20 minutos en etanol al 50% seguido de 2 lavados de 2 minutos con una solución oxidante. Tras la oxidación se realizaron 3 lavados de 30 segundos cada uno con agua Mili-Q. Se incubó el gel con el reactivo de plata durante 15 minutos y seguidamente se hicieron 3 lavados de 30 segundos con agua Mili-Q. El gel se reveló en la solución de revelado hasta que las bandas fueron visibles. Una vez aparecidas las bandas hicieron dos lavados rápidos de 1 minuto con agua Mili-Q. LA reacción se paró colocando en gel en la solución de stop durante 15 minutos y lavando durante 20 minutos con metanol al 50%. Cuando se quiso conservar los geles a largo plazo se dejó el gel en una solución de metanol 40% y glicerol 5% al menos 2 horas antes de realizar las imágenes o el secado entre hojas de celofán.

#### Soluciones empleadas

---

Solución de fijación: Etanol 50% (v/v); ácido acético glacial 12% (v/v); 1/2000 formaldehído 37%

Solución oxidante: 0,8 mM tiosulfato de sodio en agua

Reactivo de plata: 100 mg de nitrato de plata; 38µl de formaldehído 37%; en 50 ml de agua (mantener en oscuridad)

Solución de revelado: 6% p/v carbonato sódico; 1/50 volumen solución oxidante; 1/1000 volumen formaldehído 37%

Solución stop: metanol 50%; ácido acético glacial 12%

---

Todas las soluciones se deben utilizar recién preparadas y usarlas en pocas horas.

Todas las soluciones que contengan formaldehído, éste debe ser añadido justo antes de añadir las soluciones al gel, no prepararlas con antelación.

Aunque la tinción con nitrato de plata es el método no radioactivo más sensible, sigue siendo necesaria una carga mínima de proteínas para que estas sean visibles.

### 1.9.3.3. Tinción con SPYRO-Rubi

En este método se utiliza un reactivo fluorescente (Sypro®Ruby) que, aunque no es tan sensible como la tinción con nitrato de plata, permite realizar más fácilmente el análisis posterior de las proteínas escindidas del gel mediante espectrometría de masas. Tras la electroforesis, teñir el gel con agitación suave continua durante al menos 3 horas

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

para una sensibilidad máxima con una cantidad de producto unas 10 veces mayor que el volumen del gel. La tinción específica se puede ver en 30-90 min, pero por conveniencia, los geles pueden dejarse en la solución de tinción durante la noche (16-18 h) sin sobreteñirse. Una vez teñido el gel, éste se lava con una solución de metanol al 10% (o etanol) y ácido acético al 7% durante 30-60 min. Este paso disminuye la fluorescencia de fondo. Finalmente, antes de tomar la imagen, se lava el gel en agua. Para la visualización del gel, se utilizó el sistema de cámara Bio-Rad ChemiDoc™ (basado en CCD), equipado con un transiluminador UV específico para obtener imágenes de la tinción de gel de proteína con SYPRO Ruby.

### 1.9.4. Inmunoblot (Western-Blot)

Este método, descrito por primera vez por Towbin y colaboradores (Towbin *et al.*, 1979), permite la detección de una sola proteína dentro de una muestra biológica. La especificidad de Western Blot se logra mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo único de la proteína de interés. Una vez realizada la electroforesis en un gel de poliacrilamida (apartado 2.7.2), las proteínas se transfirieron a una membrana de polivinilo de difluoruro (PVDF), utilizando el aparato de transferencia húmeda Mini Trans-Blot electrophoretic transfer cell (Bio-Rad). Las membranas de PVDF se activaron previamente mediante inmersión durante unos segundos en metanol. La transferencia se realizó en tampón de transferencia a 200mA (150V para dos membranas) durante 60 minutos a 4°C.

#### Soluciones empleadas

---

---

**Towbin Buffer 10X: 25 mM Tris-HCl pH 8,3; 192 mM Glicina y H<sub>2</sub>O.**

**Tampón de transferencia: Towbin buffer 0.5x; 15% metanol; 0.1% SDS**

---

---

#### 1.9.4.1. Anti-His Western Blot

Una vez terminada la transferencia, la membrana se lavó 3 veces con TTBS 1x durante 5 minutos y se incubó o/n a 4°C en solución de bloqueo. A continuación se añadió el anticuerpo primario diluido en solución bloqueo (1:2000) y se dejó incubar 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se retiró el anticuerpo primario y se lavó la membrana 2 veces con tampón TTBS 1x durante 10 minutos y 2 veces más con tampón TBS durante 10 minutos cada vez, para retirar el anticuerpo en exceso. Luego se incubó la membrana durante 1 horas con el anticuerpo secundario (1:2000) Finalmente, se repitieron los lavados con TTBS 1x (4 lavados de 10 minutos). Para la detección se utilizaron los kits AceGlow (PepqLab) o Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

Sientific) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las membranas se revelaron en un Amersham™ Imager 600 (GE Healthcare).

### **Soluciones y anticuerpos empleados**

---

**TBS 10X:** 500 mM Tris-HCl pH 7,6; 1,5 NaCl y H<sub>2</sub>O

**TTBS:** TBS 1X con 0,1% (v/v) de Tween-20

**Solución de bloqueo:** TBS 1X con 3 % (v/v) BSA

**Solución para anticuerpo primario:** TBS 1X con 5% BSA

**Anticuerpo primario:** Anti-Penta-His (Qiagen, Penta-His, N<sup>o</sup>.34660, mouse)

**Solución para anticuerpo secundario:** TBS 1X con 10% leche denatada

**Anticuerpo secundario:** Anti-mouse-HRP (Promega, W402B1)

---

### **1.9.4.2. Detección Step-Tactin-HRP conjugada**

Para la detección de proteínas marcadas con una cola de esteptavidina se empleó el kit comercial Strep-tag® detection in Western blots (IBA) siguiendo las indicaciones del fabricante. El conjugado Strep-Tactin® HRP (Strep-Tactin® marcado con peroxidasa de rábano) se utiliza para la detección rápida y directa de las proteínas de fusión Strep-tag®II sin necesidad de un anticuerpo secundario. Tras la transferencia de las proteínas a la membrana, esta se bloqueó en el tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente u o/n a 4°C. Tras el bloqueo se realizaron 3 lavados de 5 minutos a temperatura ambiente y en agitación suave con tampón PBS-Tween. Se diluyó previamente el conjugado en tampón de dilución de la encima a una concentración 1:100. Se añadieron 10µl de dicha dilución a 10 ml de tampón PBS-Tween y se incubó 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave. Finalmente se realizaron 2 lavados de 1 minuto cada uno con tampón PBS-Tween y dos lavados más de 1 minuto con tampón PBS. Para la detección se utilizaron los kits AceGlow (Peqlab) o Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Sientific) según la disponibilidad siguiendo las indicaciones del fabricante. Las membranas se revelaron en un Amersham™ Imager 600 (GE Healthcare).

### **Soluciones empleadas**

---

**PBS:** 4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 16mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 115 mM NaCl; pH 7,4

**Tampón de bloqueo:** PBS con 3% BSA y 0.5% v/v Tween 20

**Tampón de dilución de la encima:** PBS con 0,2% BSA y 0,1% v/v Tween 20

**Tampón PBS-Tween:** PBS con 0,1% Tween 20

**Anticuerpo conjugado:** Strep-Tactin® HRP (Strep-Tactin® marcado con peroxidasa de rábano) (IBA)

---

### **1.9.5. Expresión de proteínas heterólogas en *E. coli***

La expresión heteróloga de proteínas se refiere a la expresión de una proteína o parte de una proteína en un organismo huésped que, naturalmente, no expresa dicha proteína. Para ello, el gen que codifica para la proteína en cuestión debe introducirse en el huésped mediante técnicas de transferencia de ADN (apartado 1.6). El principal objetivo

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

es la obtención de elevadas cantidades de proteína exógena en el organismo hospedador en el mínimo tiempo posible. La sobreexpresión de proteínas en *E. coli* es una herramienta de gran utilidad para la purificación, localización y análisis funcional de las proteínas. La técnica de expresión se basa en la inserción de un promotor fuerte y una secuencia de unión al ribosoma muy eficaz delante del ORF del gen a estudiar. Estas proteínas pueden expresarse en modo nativo o como proteínas de fusión (Hartley, 2006; Gopal and Kumar, 2013). Las proteínas integrales de membrana o proteínas transmembrana, constituyen una fracción significativa del proteoma de todas las células vivas. Sin embargo, debido a sus propiedades físicas únicas y al requisito de asociación con las membranas celulares, su expresión en sistemas heterólogos a menudo muy compleja. Es por eso que, salvo que sea estrictamente necesario, se suelen expresar fracciones truncadas de las regiones citosólicas, evitando las regiones transmembranas.

En cuanto a la cepa hospedadora, las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) y BL21 (DE3) pLysS son dos cepas comúnmente utilizadas para la producción de proteínas. Como miembros del linaje B, carecen de proteasas Lon y OmpT, protegiendo las proteínas producidas de la degradación. El profago DE3 encontrado en BL21 (DE3) proporciona la ARN polimerasa T7 (dirigida por el promotor LacUV5), lo que permite utilizar vectores con el promotor T7 (Lorence, 2004; Gopal and Kumar, 2013; Hilbi and Buchrieser, 2013). Una vez elegido el método de expresión, el siguiente paso importante en la purificación de proteínas es la expresión de las mismas en el sistema heterólogo. Para determinar las condiciones óptimas se suelen hacer pequeños ensayos para definir las condiciones finales que se emplearán (González and Fillat, 2018). Algunas de estas consideraciones a tener en cuenta son tanto el medio de cultivo empleado, habitualmente LB, como la temperatura de incubación, o el tiempo y cantidad de inducción (Hayat et al., 2018). Respecto a estos últimos, habitualmente se comienzan los cultivos a hasta alcanzar la fase logarítmica a 37°C y, tras la inducción se disminuye la temperatura 25-30°C, favoreciendo de este modo un correcto plegamiento y estabilidad de la proteína recombinante (Hartley, 2006; González and Fillat, 2018).

Para facilitar la purificación, la presencia de etiquetas como la de polihistidina (6xHis) permite la purificación de la proteína recombinante mediante el uso de resinas quelantes de metales. Las resinas Ni-NTA (níquel- ácido nitrilotriacético) en concreto, son resinas de agarosa cargadas de níquel que pueden usarse para la purificación por afinidad de proteínas de fusión que contienen la etiqueta 6xHis. Las proteínas unidas a la resina pueden eluirse con tampón de pH bajo o competir con imidazol o histidina (Hochuli, 1990).

### **1.9.5.1. Construcción de los vectores de expresión (pET151)**

Se utilizó el plásmido pET151/D-TOPO® (Invitrogen). El diseño de cebadores es aquí también uno de los pasos importantes. El cebador forward debe contener la secuencia “CACC” en el extremo 5' para permitir la clonación direccional. Estos 4 nucleótidos se aparean con la secuencia GTGG de la región solapante del vector. Además, el cebador complementario (reverse) no debe ser complementario a la secuencia dicha secuencia en el extremo 5' y debe estar diseñado para permitirle clonar el producto de PCR en fase con cualquier etiqueta C-terminal si así se desea. Hay que asegurarse de incluir un codón de parada en el cebador complementario o diseñar el cebador para que hibride aguas abajo del codón de parada nativo del vector (Tabla cebadores en anexo).

### **1.9.5.2. Expresión de las proteínas unidas a 6xHis.**

La expresión de proteínas unidas a la una cola de histidina (6xHis) se realizó mediante el método descrito por Sambrook y Russell (Sambrook and Russell, 2001). Una colonia de *E. coli* BL21 o BL21-pLysS, con el plásmido de expresión que porta los genes que codifican para la proteína de fusión, se preinoculó en 20 mL del medio LB/Amp 100 (LB con ampicilina 100 µg/ml) y se incubó a 37 °C en agitación durante toda la noche. Una vez crecido, se inocularon los 20 mL en 1000 mL del mismo medio y se incubó a 37 °C en agitación hasta que la densidad óptica a 600 nm alcanzó un valor aproximado de 0.4-0.8. Posteriormente, se le añadió isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 0.5-1 mM para inducir la expresión de los genes que codifican para la proteína de fusión. El cultivo se incubó a toda la noche, a temperatura ambiente o a 16°C según la proteína a expresar. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron las células durante 20 minutos a 4 °C y 4000 rpm. A continuación, se descartó el sobrenadante, el sedimento se congeló y se almacenó a -20°C hasta su uso.

### **1.9.5.3. Purificación de proteínas de fusión unidas a 6xHis.**

Para la purificación de las proteínas se siguió el protocolo descrito por Fassler y West (Fassler and West, 2010) con ciertas modificaciones. El sedimento congelado se resuspendió en 50 ml de tampón de lisis. Se incubó en hielo al menos durante 10 minutos y se homogenizó mediante un homogeneizador de alta presión (Avestin). Tras la homogenización de la muestra se mantuvo en hielo para evitar la degradación de las proteínas de la muestra y se ultracentrifugó durante 45 minutos a 30,000 y 4°C en una ultracentrífuga Beckmann L-80 con un rotor Ti60. A continuación, se añadió el sobrenadante obtenido anteriormente a una columna de resina de agarosa Ni-NTA (Quiagen), previamente preparada y equilibrada. Para el equilibrado de la columna se añadió a 3 ml de resina (volumen de la columna, CV) 4 CV de H<sub>2</sub>O para lavar la resina y un segundo lavado con 4 CV de tampón de lisis. El sobrenadante se hizo pasar dos veces por

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

la columna y se lavó con 20 CV de tampón de lavado (para eliminar las proteínas no ancladas a la resina). Por último, se eluyó la proteína con 20 ml de tampón de elución (tomar una muestra de 20  $\mu$ L). En todos los casos, al no necesitar la cola de histidina para los experimentos posteriores se añadió un paso de eliminación de la cola de histidinas mediante digestión con proteasa TEV (proteasa del virus del tabaco) en una relación molar 1:1000 durante su diálisis en tampón TMG con 4 mL DTT 1M y 2mL EDTA 500mM, a temperatura ambiente durante 20 h empleando las membranas de diálisis según el tamaño de la proteína (6-8 o 12-14 kDa, Spectrumlabs). Tras la digestión, las proteínas se cargaron en un purificador ÄKTA (que monitoriza los volúmenes y flujos incorporados en la columna así como la detección mediante espectrometría de los cambios de absorbancia) acoplado a una columna HiPrep 26/60 Sephacryl S-200 HR de alta resolución (GE Healthcare). Se realizó la cromatografía líquida de exclusión molecular utilizando TMG como tampón de separación a un flujo de 1ml/minuto y una presión máxima de columna de 15 MPa. Se recogieron las distintas fracciones que contenían proteínas y se comprobaron mediante SDS-PAGE. Finalmente, la proteína purificada se concentró mediante filtros Amicon Ultra Centrifugal Filters de 3 o 10K según el tamaño de la misma (Millipore), se alícuotó y almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

Todos los pasos de purificación se comprobaron mediante SDS-PAGE (apartado 1.9.2).

### Soluciones empleadas

---

**Tampón de lisis I: Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, glicerol al 5%, DTT 1 mM**

**Tampón de lisis II: Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, glicerol al 5%, DTT 1 mM**

**Tampón de lavado I: Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, glicerol al 5%, DTT 1 mM, imidazol 20 mM**

**Tampón de lavado II: Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, glicerol al 5%, DTT 1 mM, imidazol 20 mM**

**Tampón de elución I: Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, glicerol al 5%, DTT 1 mM, imidazol 300 mM**

**Tampón de elución II: Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, glicerol al 5%, DTT 1 mM, imidazol 300 mM**

**Tampón de diálisis para la muestra: 20 ml de TMG, 200  $\mu$ L DTT 1M, 40  $\mu$ L EDTA 500mM y 3  $\mu$ L TEV.**

**Tampón de diálisis: 2 L TGM+4ml DTT 1M+ 2mL EDTA 0.5M.**

**TMG: 25mM Tris pH 7.5; 5mM MgCl<sub>2</sub>; 10% Glycerol**

---

A continuación, se muestra una tabla resumen con los pasos específicos que se han empleado para la purificación de las distintas proteínas en esta tesis doctoral, incluyendo características físicas de las mismas.

Tabla 4. Etapas de la purificación de las distintas proteínas.

Proteína	Secuencia	Tª inducción (°C)	[IPTG] (mM)	Tampón lisis	Tampón lavado	Tampón elución	Dialisis (kDa)	Filtros	Ext. Coef (M-1cm-1)	Peso molecular (KDa)
Csal_0866	1-130	Tª ambiente	1	I	I	I	6-8 kDa	3K	6990	14.0782
Csal_0869	940-fin	16	0.5	II	II	II	12-14 kDa	10K	26720	41.5380
Csal_1062	167-fin	16	0.5	II	II	II	12-14 kDa	10K	13575	58.0950
Csal_1635	250-fin	Tª ambiente	1	I	I	I	12-14 kDa	10K	46450	74.6050
Csal_2667	215-fin	Tª ambiente	1	I	I	I	12-14 kDa	10K	28210	56.5380

### 1.9.6. Experimentos de seguimiento de fosfato (p<sup>32</sup>)

Una vez purificadas las proteínas, se comprobó su funcionalidad mediante experimentos de transferencia de fosfato. Para dichos experimentos se empleó el protocolo descrito por Fassler y West (Fassler and West, 2010) con ciertas modificaciones. Las concentraciones de las proteínas se midieron empleando un espectrofotómetro (NanoDrop; Thermo Scientific). Las proteínas, a diferencia de los ácidos nucleicos, pueden presentar una diversidad considerable. Las proteínas purificadas que contienen residuos de triptófano, de tirosina o enlaces disulfuro cisteína-cisteína tienen absorbancia a 280 nm que, junto con el coeficiente de extinción, permite calcular la concentración de la muestra. Con éste método se obtienen proteínas fosforiladas, pero también se pueden realizar ensayos de fosfotransferencia *in vitro*, en los cuales la distribución de grupos fosfato radiomarcados se puede monitorizar a lo largo del tiempo, en un intervalo entre 5 a 60 min (Figura 17).

#### 1.9.6.1. Ensayos de autofosforilación (HK)

Se incubaron 150 µL de la histidina quinasa purificada en tampón de incubación. Se retiraron alícuotas de 10 µL a distintos tiempos y mezclaron con 5 µL de tampón de parada 4X para parar la reacción. Los resultados se analizaron mediante SDS-PAGE (apartado 1.9.2.), cargando 10 µL de cada muestra. Una vez corrido el gel, éste se incubó o/n con una pantalla o placa de imágenes (BAS-MS 2025, Fujifilm) y revelar en un escáner de láser Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare).

---

#### Soluciones empleadas

---

TMG: 25mM Tris pH 7.5; 5mM MgCl<sub>2</sub>; 10% Glycerol

Tampón de incubación: Tampón TMG con KCl 100 mM y MgCl<sub>2</sub> 10 mM al que se añadió 3 µL de [γ-<sup>32</sup>P]-ATP (30 Ci/mmol)

Tampón de parada 4x: Tris-HCl 0,25 M, pH 6,8, SDS al 8%, EDTA 60 mM, glicerol al 40% y azul de bromofenol al 0,0008%

---



### 1.9.6.2. Ensayo de fosfotransferencia (HK-RR)

Se incubaron 100  $\mu\text{L}$  de la histidina quinasa purificada en tampón de incubación. Tras 15 minutos de reacción, se tomó una alícuota de 50  $\mu\text{L}$  de la mezcla y se incubó con 50  $\mu\text{L}$  del regulador de respuesta purificado en tampón de mezcla (sin  $^{32}\text{P}$ ), asegurándonos que las concentraciones sean similares. Se retiraron alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  a distintos tiempos y se mezclaron con 5  $\mu\text{L}$  de tampón de parada 4X para parar la reacción. Los resultados se analizaron mediante SDS-PAGE (apartado 2.7.2), cargando 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra. Una vez corrido el gel, éste se incubó o/n con una pantalla o placa de imágenes (BAS-MS 2025, Fujifilm) y revelar en un escáner de láser Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare).

#### Soluciones empleadas

TMG: 25mM Tris pH 7.5; 5mM  $\text{MgCl}_2$ ; 10% Glycerol

Tampón de incubación: Tampón TMG con KCl 100 mM y  $\text{MgCl}_2$  10 mM al que se añadió 2  $\mu\text{L}$  de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  (30 Ci/mmol)

Tampón de mezcla: TMG con KCl 100 mM y  $\text{MgCl}_2$  10 mM

Tampón de parada 4x: Tris-HCl 0,25 M, pH 6,8, SDS al 8%, EDTA 60 mM, glicerol al 40% y azul de bromofenol al 0,0008%

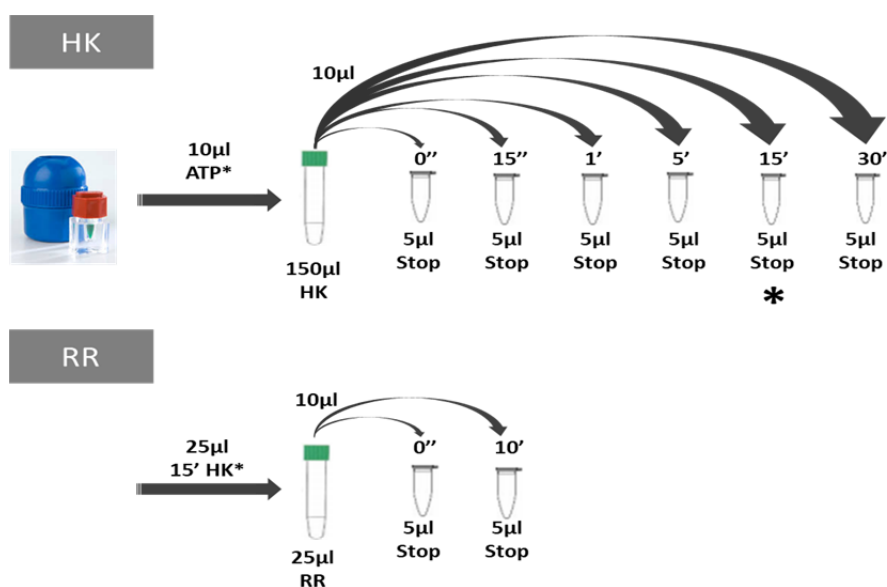


Figura 17. Esquema de los ensayos de autofosforilación y transferencia de fosfato

## 1.10. ANÁLISIS DE INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA.

### 1.10.1. Ensayos de interacción *in vivo* mediante sistema de doble híbrido (BACTH)

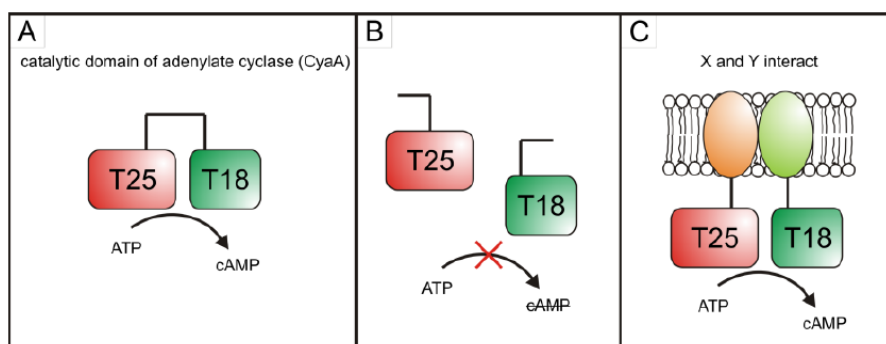
El sistema BACTH ("Bacterial Adenylate Cyclase-based Two Hybrid") es un sistema simple que permite ver y caracterizar interacciones proteína-proteína *in vivo* (Karimova *et al.*,

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

1998, 2005). Se basa en reconstrucción de la actividad de la adenilato ciclasa mediada por interacción en *Escherichia coli*. Se aprovecha el hecho de que el dominio catalítico de la adenilato ciclasa (CyaA) de *Bordetella pertussis* consta de dos fragmentos complementarios, T18 y T25, que sólo son activos si *están* físicamente cercano, dando como resultado niveles elevados de AMP cíclico (APMc) (Karimova *et al.*, 1998).

El AMPc es una molécula de señalización clave en *E. coli* que activa la proteína activadora de catabolitos (CAP). El complejo AMPc/CAP es un regulador pleiotrópico de la transcripción de operones metabólicos como los de la lactosa y la maltosa (Deutscher *et al.*, 2006). Cuando estos dos fragmentos se fusionan a polipéptidos que interactúan entre sí (que en nuestro caso serían las proteínas problema), la heterodimerización de estas proteína híbridas resulta en la complementación funcional entre los fragmentos T18 y T25 y, por tanto, en la síntesis de AMPc (Figura 18). En consecuencia, dos proteínas, fusionadas con los fragmentos de adenilato ciclasa, que interactúen entre sí producirían una fermentación de lactosa o maltosa que es una señal que se puede detectar fácilmente en cualquier medio indicador (como pueden ser placas de MacConkey-Maltosa o de LB-X-Gal) o en medios de selección (medios mínimos complementados con lactosa o maltosa como única fuente de carbono) (Karimova *et al.*, 2005). No hay que olvidar que el ensayo BACTH también permite la cuantificación de la interacción proteína-proteína al medir la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa ya que la expresión de *lacZ* en *E. coli* está regulada positivamente por cAMP / CAP (Robichon *et al.*, 2011).

Además, otro beneficio del sistema BACTH es que, debido a que el cAMP es una molécula difusible, las interacciones de las proteínas de fusión híbridas con T25 y T18 no tienen que ocurrir cerca de la maquinaria transcripcional. Esto permite una mejor caracterización de las interacciones de proteínas de membrana. (Karimova *et al.*, 1998; Battesti and Bouveret, 2012)



**Figura 18. Esquema del ensayo de doble híbrido de la adenilato ciclasa bacteriana (BACTH).** Modificado de Karimova *et al.*, 2005. (A) La adenilato ciclasa (CyaA) de *Bordetella pertussis* sintetiza AMPc en *E. coli*. El AMPc activa la proteína activadora de catabolitos que resulta en la expresión del gen diana. (B) La coexpresión de dos fragmentos CyaA (T25, T18) no da como resultado la complementación del fragmento de proteína (PCA). (C) La fusión de T25 y T18 a proteínas de membrana interactivas da como resultado la producción de PCA y AMPc (Karimova *et al.*, 1998, 2005).

### 1.10.1.1. Construcciones génicas para la expresión de las proteínas fusión.

Una proteína de fusión o proteína quimérica consiste en la unión de una corta secuencia de aminoácidos, polipéptido o proteína a la proteína que se quiere expresar por vía recombinante a través de un sitio de reconocimiento a proteasas específicas que posteriormente facilitan la separación de nuestra proteína. Usualmente esta fusión se construye a nivel de ADN y la quimera se transcribe y expresa como una sola entidad dentro de la célula. Para obtener las construcciones génicas que generen las distintas proteínas de fusión se emplearon los plásmidos proporcionados en el kit de Euromedex y que se detallan en el apartado 0. Todos los métodos de ADN recombinante se realizaron utilizando protocolos estándar de clonación (Karimova *et al.*, 1998).

Brevemente, los distintos genes que codifican las proteínas a testar (Reguladores de Respuesta o Histidinas quinasas) se amplificaron a partir del ADN genómico de *C. salexigens* DSM 3043T y se introdujeron en los diferentes vectores mediante PCR solapante (apartado 2.5.7.1), utilizando los oligonucleótidos que se encuentran listados en la Tabla de cebadores (Anexo).

### 1.10.1.2. Co-transformaciones

Una vez obtenidas las construcciones híbridas por separado, los plásmidos resultantes se deben co-transformar en una cepa bacteriana adecuada para su posterior análisis ya sea mediante su siembra en medios indicadores (LB/X-gal o MacConkey/maltosa) o en medios de selección para detectar las interacciones entre proteínas. Para ello se pueden usar cualquier combinación de vectores siempre que contengan un híbrido T25 y un híbrido T18 en ensayos de complementación.

Las células empleadas para la co-transformación fueron las BTH101 químicamente competentes mediante el método de CaCl<sub>2</sub> (Ver sección 1.6.2.1.1). Estas células son cya<sup>-</sup>. El protocolo empleado ha sido una variación del protocolo de Karimova y colaboradores (Karimova *et al.*, 1998) siguiendo las indicaciones de Rodríguez-Beltrán y colaboradores (Rodríguez-Beltrán *et al.*, 2012) y es el siguiente:

---

#### PROTOCOLO

---

- Añadir 100 ng de cada plásmido a 100 µl de células competentes BTH101
  - Mantener 20-30' en hielo
  - Choque térmico: 90" a 42 °C
  - Mantener 2' en hielo
  - Añadir 600 µl de LB fresco
  - Incubar al menos 1 hora a 37 °C y mínimo 200 rpm
  - Sembrar gotas en los medios seleccionados con los antibióticos apropiados.
  - Dejar crecer a 30 °C de 2 a 7 días
-

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

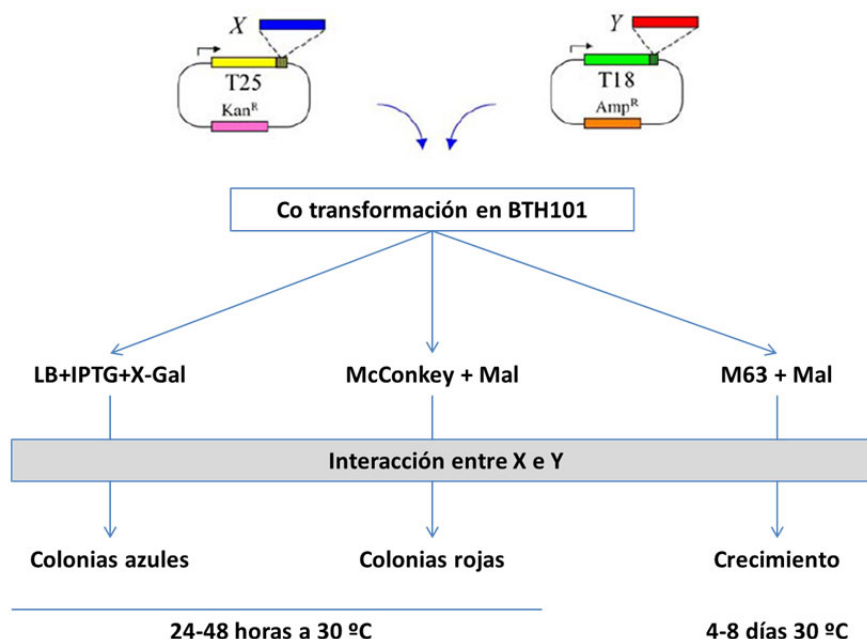
Los controles empleados han sido los siguientes:

Controles negativos: Las células de *E. coli* competentes se forman con plásmidos que contienen fragmentos T25 y T18 no fusionados (plásmidos vacíos).

Controles positivos: Los productos de recombinación para los fragmentos T25 y T18 se fusionan con proteínas de interacción conocida. Por ejemplo, pKT25-*zip* y pUT18C-*zip* codifican la cremallera de leucina GCN4. Las proteínas híbridas expresadas T25-*zip* y T18-*zip* se heterodimerizarán a través de su motivo de cremallera de leucina.

### 1.10.1.3. Análisis cualitativo de las interacciones.

Las bacterias *E. coli cya-* (que no poseen adenilato ciclasa endógena) no pueden activar los operones *lac* o *mal*, por lo que no pueden fermentar lactosa o maltosa (Ullmann and Danchin, 1983) por lo que forman colonias blancas en los medios indicadores, mientras que las bacterias *cya+* forman colonias coloreadas en dichos medios, lo que las hace distinguibles (Karimova *et al.*, 2000, 2005). Además las bacterias *cya+* crecerá, en medios mínimos suplementado con lactosa o maltosa como únicas fuentes de carbono (Miller, 1992) (Figura 19).



**Figura 19. Análisis de las interacciones proteína-proteína utilizando el sistema BACTH.** Se representan la estrategia de clonación y los distintos procedimientos de selección. Modificado de Karimova y colaboradores (Karimova *et al.*, 2000).

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

### **1.10.1.3.1. Método de Screening**

Uno de los métodos más sencillos de determinar si dos proteínas particulares (X e Y) interactúan, es empleando placas indicadoras. En estos medios ricos, las células crecen más rápido y se pueden obtener resultados después de 1-2 días de incubación a 30 °C.

De cada co-trasformación a testar se han sembrado gotas de 20 µl junto con los controles positivos y negativos en placas cuadradas de los distintos medios indicadores, LB+IPTG+X-Gal o MacConkey con maltosa.

#### **LB+IPTG+X-Gal**

Éste medio es un clásico medio indicador. En él, las proteínas que no interaccionan entre sí, no producen adenilato ciclasa, no activan el operón lac y no puede por tanto degradar el sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-indolil-β-D-galactósido (X-gal) dando lugar a colonias de color blanco/azul pálido. Por lo contrario, las proteínas que interactúan entre sí, al reconstituir al adenilato ciclasa, dan como resultado en presencia del y un inductor del gen de la lactosa como el isopropiltio-β-D-galactósido (IPTG) colonias azules.

#### **MacConkey -maltosa**

El agar MacConkey es probablemente el medio diferencial sólido más popular del mundo. Se utiliza principalmente en la identificación de la fermentación de azúcares como lactosa o maltosa. Debido a que la expresión del regulón de maltosa depende más estrictamente del AMPc, no se produce fermentación de maltosa en bacterias que no sintetizan AMPc, es decir, bacterias que expresan proteínas quiméricas que no interactúan. Por lo tanto, se verá una diferencia clara e inequívoca entre las bacterias complementarias y no complementarias en MacConkey-maltosa (Ullmann and Danchin, 1983; Karimova *et al.*, 2000). Además es importante utilizar una maltosa libre de glucosa como la de Difco Laboratories. La concentración final fue de 1%. Para inducir la expresión completa de las proteínas híbridas, se puede añadir al medio IPTG (0,5 mM).

Las proteínas no interactivas dan como resultado colonias de color incoloro/blanco pálido en medios MacConkey-maltosa mientras que las que sí que interactúan dan colonias rojas. Esto es debido a que la fermentación de los azúcares agregados da como resultado la acidificación del medio que se revela por un cambio de color del indicador rojo fenol.

### **1.10.1.3.2. Método de Selección. Identificación de estímulos**

Como se ha dicho anteriormente, las colonias Mal+ (que serán aquellas cuyas proteínas híbridas interaccionen), crecerán en un medio mínimo suplementado con

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

maltosa. El crecimiento en este tipo de medio es más lento (de 4 a 8 días de incubación a 30 °C). El sustrato X-gal se puede agregar al medio para facilitar la visualización temprana de colonias en crecimiento.

Además, utilizamos este medio para intentar dilucidar los posibles estímulos implicados en la interacción de las proteínas problema. Para ello, además de la maltosa como fuente única de carbono se añadió ectoína a distintas concentraciones (1mM, usada como osmoprotector o 10 mM, usada como fuente de carbono) y/o aumentando la salinidad (0.5% Y 1% de NaCl). Como control de crecimiento se realizaron placas con glucosa 10mM como única fuente de carbono. Para eliminar todas las trazas del medio rico utilizado en el procedimiento de transformación, previo a la siembra en placas de medio mínimo las células se lavaron al menos tres veces con medio M63 estéril.

### **1.10.1.4. Análisis cuantitativo de las interacciones. Ensayo de complementación funcional.**

La cuantificación de la complementación funcional entre proteínas quiméricas se cuantifica midiendo la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa (lacZ del operón lac) en cultivos líquidos (Karimova *et al.*, 2000). Los ensayos se realizaron mediante un protocolo modificado del descrito anteriormente (Battesti and Bouveret, 2012), que se describe a continuación. Las mediciones de la  $\beta$ -galactosidasa se debe realizar en células permeabilizadas, bien de cultivos en fase exponencial o en fase estacionaria) usando ONPG como sustrato (apartado 1.8.1.).

Para ello se sembraron placas de LB-IPTG-X-Gal con los respectivos antibióticos con 100 $\mu$ l de las transformaciones y se crecieron durante dos días a 30°C. De cada transformación se seleccionaron tres colonias positivas (azules) que se inocularon en tubos con 5 ml de LB con IPTG 0.5mM y los respectivos antibióticos y se crecieron a 30 °C hasta alcanzar la fase estacionaria (14-18 horas). Al día siguiente 200 $\mu$ l de cada cultivo se mezclaron, en tubos de vidrio, con 800  $\mu$ l de tampón Z a los que se les añadió una gota de SDS 0.01% y dos gotas de cloroformo para permeabilizar las células. Tras mezclar bien en un vórtex se transfirieron 50  $\mu$ l a una placa de 96 pocillos que contenía 150  $\mu$ l de tampón Z con  $\beta$ - mercaptoetanol. Por último se añadieron 40  $\mu$ l de reactivo ONPG y se dejó llevar a cabo la reacción enzimática a 28 ° C durante 15-20 min con medición de OD420nm cada 2 min en un lector de microplacas Synergy™ HT (BioTek® Instruments).

De forma paralela se transfirieron 50  $\mu$ l del cultivo original a una nueva placa de 96 pocillos y fondo plano ya llena con 150  $\mu$ l de LB (dilución final 1:4), para medir la OD600nm en un lector de microplacas UVM 340 (ASYS).

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

La actividad relativa de la  $\beta$ -galactosidasa se expresó en Unidades Miller que para cada muestra se corresponde con la siguiente fórmula:

$$U. \text{ Miller} = 1000 \times \frac{(OD_{420nm} \text{ t2} - OD_{420nm} \text{ t1}) / t2 - t1 \text{ (min)}}{OD_{600nm}}$$

Donde  $OD_{420nm}$  es la densidad óptica a 420 nm, los puntos de tiempo  $t1$  y  $t2$  se eligieron para ubicarse en la parte lineal de la reacción cinética y  $OD_{600nm}$  la densidad óptica del cultivo a 600nm.

Para considerar el experimento como válido, se deben establecer los controles positivos como el 100% de actividad y los controles negativos (o fondo) no deben superar el 3% de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de las muestras de control positivo. Una lectura superior a cinco veces el nivel del control negativo se considerará una interacción positiva para el ensayo (Battesti and Bouveret, 2012; Ouellette *et al.*, 2014). Los valores presentados son la media de 3 ensayos de actividad independientes.

### Soluciones empleadas

---

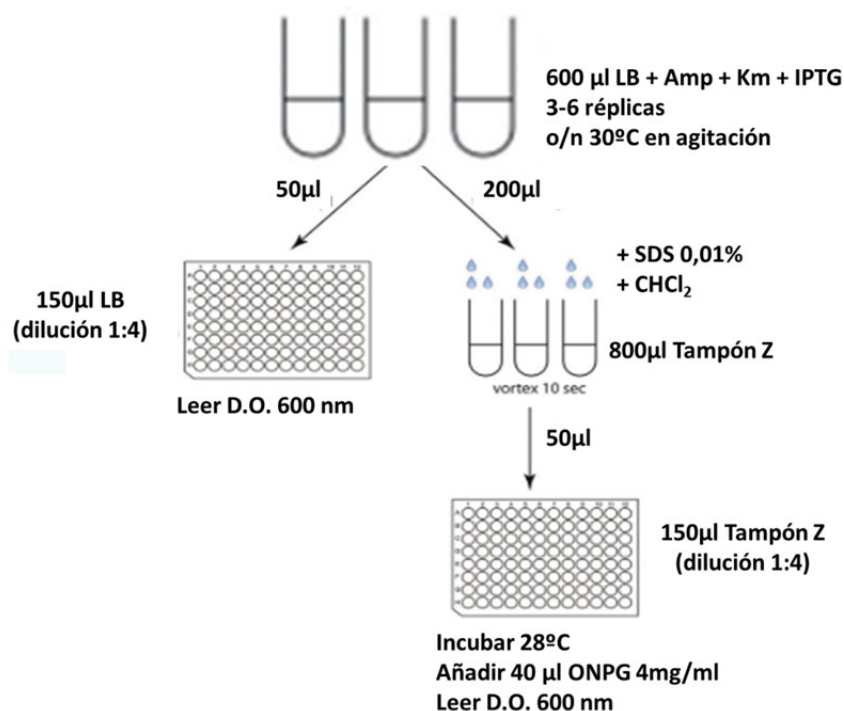
**Tampón Z:** Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 45 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 45 mM, KCl 10 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 mM,

**Tampón Z con  $\beta$  mercaptoetanol:** Tampón Z;  $\beta$ - mercaptoetanol 0,27% (v/v)

**SDS 0,01%:** solución de lauril sulfato sódico al 0,01% (p/v) en agua

**Reactivo de ONPG:** 0,4% de o-nitrofenil galactopiranosido, preparado en agua

---



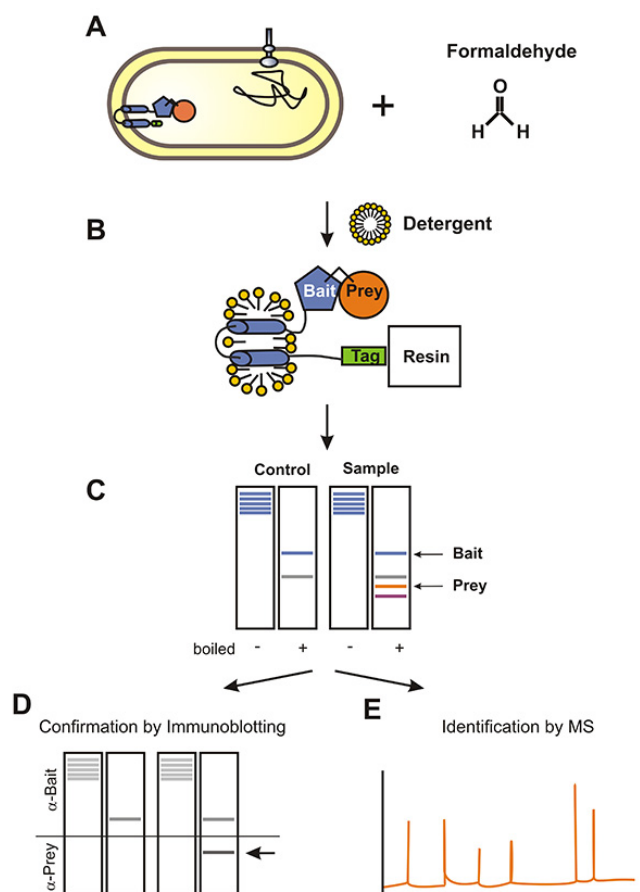
**Figura 20. Ensayo de  $\beta$ -galactosidasa en placas de 96 pocillos.** Se describen los diferentes pasos del protocolo que usados en esta tesis. Modificado de Battesti y colaboradores (Battesti and Bouveret, 2012).

### 1.10.2. Ensayos de interacción *in vivo* mediante Membrane-SPINE

Es un método de detección y análisis rápido de interacción proteína-proteína *in vivo* basado en el método desarrollado por el grupo de Stülke y colaboradores (Herzberg *et al.*, 2007) pero adaptado a proteínas de membrana (Müller *et al.*, 2011). El método SPINE se basa en la combinación de dos métodos, que son la purificación altamente específica de proteínas que llevan una etiqueta Strep (Terpe, 2003) con el entrecruzamiento reversible producido por el formaldehído (Vasilescu *et al.*, 2004). La variante desarrollada por el grupo de Hunke y colaboradores, denominada Membrane-SPINE, incluye el aislamiento y la conservación de complejos de proteínas de membrana (Hunke and Müller, 2009, 2012; Müller *et al.*, 2011, 2013).

El formaldehído, al ser una molécula de pequeño tamaño y soluble, atraviesa fácilmente la membrana plasmática y fija las proteínas que estén en contacto cercano entre sí (aproximadamente 2 Å). Además, los enlaces cruzados son reversibles, lo que permite el análisis posterior de los componentes dentro de un complejo (Vasilescu *et al.*, 2004). Además, no solo se pueden observar las interacciones permanentes proteína-proteína, sino también las interacciones transitorias que ocurren durante la transducción de señales, que suelen ser interacciones muy rápidas. Gracias al formaldehído, por tanto, se consigue crear una instantánea efectiva del interactoma de una célula viva (Müller *et al.*, 2011). La etiqueta Strep, por su parte, es un péptido de aminoácidos que se desarrolló como una herramienta de afinidad para la purificación de las proteínas de fusión en columnas de estreptavidina. Una variante de la estreptavidina, denominada Strep-Tactin (WSHPQFEK), tiene una mayor afinidad por el octapéptido Strep-tag II que la forma nativa ya que posee varias mutaciones específicas en las posiciones 44, 45 y 47. Al explotar la interacción altamente específica, las proteínas marcadas con Strep se pueden aislar en un solo paso de los lisados de células crudas, facilitando los pasos posteriores (Schmidt and Skerra, 2007). La proteína cebo debe expresarse con una etiqueta Strep en las condiciones en las que las posibles parejas de interacción probablemente estén presentes en las células. La adición de formaldehído une la proteína cebo a sus posibles socios de interacción. La proteína cebo junto con sus posibles parejas de interacción pueden aislarse luego utilizando una columna de afinidad. Los enlaces entre la proteína del cebo y la pareja potencial de interacción se pueden eliminar calentando las muestras. Finalmente, el compañero de interacción co-purificado puede separarse mediante SDS PAGE e identificarse mediante espectrometría de masas (Herzberg *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 2011, 2013) (Figura 21).





**Figura 21. Diagrama de flujo del procedimiento de membrana-SPINE.** A) Las bacterias que expresan la proteína unida a la etiqueta Strep-Tag son tratadas con formaldehído. El formaldehído atraviesa las membranas y forma enlaces cruzados. B) Se prepara la fracción de membrana y se solubilizan las proteínas de membrana mediante un tratamiento con detergente. Posteriormente, las proteínas marcadas son copurificadas con la proteína cebo. C) los enlaces cruzados de formaldehído se revierten por ebullición y las proteínas se separan por SDS-PAGE. Finalmente, las proteínas presa se seguirán mediante inmunotransferencia (D) o identificados por análisis MSs (E). (Müller *et al.*, 2011)

### 1.10.2.1. Obtención de las construcciones génicas para la expresión de proteínas marcadas en *C. salexigens*

A diferencia de la expresión heteróloga (apartado 1.9.5.) la expresión homóloga se refiere a la sobreexpresión de un gen en el sistema de donde se origina. Por ello es importante emplear un vector de expresión apto para la bacteria en la que se desea realizar el experimento. Como se ha mencionado anteriormente (apartado 1.1.2.) el plásmido pMP92 (Spaink *et al.*, 1987) es un plásmido de amplio rango de hospedador al que se le ha añadido todos los elementos necesarios para expresar proteínas a las que se les ha añadido además una etiqueta Strep para facilitar la posterior purificación. Las distintas construcciones se han introducido mediante conjugación triparental (apartado 1.6.1) en una cepa silvestre de *Chromohalobacter salexigens* (CHR61). En concreto, se ha incluido el promotor del gen *ectA* (PectA), que es un promotor semiconstitutivo e

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

inducible por salinidad y las etiquetas Strep-tactin en la región C terminal de las distintas proteínas problema, mediante PCR.

Se realizaron distintos ensayos con las diferentes proteínas o fragmentos de proteínas “cebo” (marcadas con una etiqueta Strep-Tactin) que se quisieron estudiar. En cuanto a la histidina quinasa EupK, la etiqueta se añadió en la región C terminal. Además, al tratarse de una expresión homóloga, no fue necesario eliminar las regiones transmembrana de la proteína. En cuanto al regulador de respuesta EupR, que al ser una proteína citosólica se realizaron diferentes construcciones con la etiqueta tanto en la región N terminal como C terminal. Por último, las condiciones testadas fueron para ambas proteínas tanto de baja salinidad (0,6 M de NaCl) como de elevada salinidad (2,5 M NaCl) en medio mínimo M63 con 20 mM de glucosa como fuente de carbono. El crecimiento hasta alcanzar la fase exponencial se realizó a 37°C y 220 rpm según las características de cada cepa.

### **1.10.2.2. Fijación de las interacciones con formaldehido**

Las cepas recombinantes se crecieron hasta alcanzar la fase exponencial. Para poder alcanzar una cantidad suficiente de proteínas, se escaló el experimento partiendo de un litro de medio M63 por cada condición y proteína a testar, (baja y elevada salinidad; EupK o EupR). Alcanzada la fase exponencial, el cultivo se separó en dos matraces con medio litro cada uno y se añadió formaldehido en disolución al 37% para alcanzar una concentración final de 0.6% a uno de ellos. El otro matraz se mantuvo sin formaldehido como control del proceso de purificación. Tras ello se volvió a incubar en las mismas condiciones anteriores durante 20 minutos. Por último, los cultivos se centrifugaron a 3.000 x g durante 30 min y se retiró el sobrenadante.

### **1.10.2.3. Formación de esferoplastos y purificación de las fracciones de membrana.**

Un esferoplasto es una célula bacteriana desprovista de la mayor parte de su envoltura celular. En este caso la pérdida de la envoltura se realiza mediante la acción de lisozima. Así, en primer lugar, se prepararon esferoplastos a partir de las células cultivadas, para obtener un mayor rendimiento de proteínas de membrana.

El sedimento de células obtenido en el apartado anterior se resuspendió en 10 ml de tampón P3 y se transfirió a un tubo cónico de 15 ml. Se añadió 1 ml de tampón P2 y se incubó en hielo durante 30 minutos. Los esferoplastos se recogieron mediante una centrifugación de 30 minutos a 3000 g. El sobrenadante se retiró de forma cuidadosa y se incubó o/n a -20°C.

### Soluciones empleadas

---

**Tampón Tris (P1):** 20 mM Tris-HCl pH 8 (ajustar con NaOH)

**Inhibidor de proteasa (PMSF):** fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 M, preparado en isopropanol

**Tampón P2:** 2 mg/ml de lisozima en 0.1 M EDTA, pH 7.5

**Tampón P3:** 20mM Tris-HCl, pH 8 con 10 mM PMSF (usar tras la preparación)

---

#### 1.10.2.4. Purificación de las proteínas unidas a Step-tactin

La purificación de las proteínas unidas a Strep-tactin se realizó utilizando columnas de afinidad. Para la purificación se empleó en kit comercial “Strep-tag® affinity purification” (IBA) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El sedimento de esferoplasto se mantuvo en hielo para que la descongelación fuera gradual. Se resuspendió el sedimento en 6 ml de tampón P3 al que se le añadió DNasaI, recién preparado. La muestra se sonicó en un procesador ultrasónico (LABSONIC) mediante 4 ráfagas de 1 minuto en continuo con pausas de 1 minuto entre cada ráfaga, manteniendo las muestras continuamente. La muestra se centrifugó durante 10 minutos a 10,000 g para recolectar los restos celulares. Y el sobrenadante se transfirió con una pipeta a un tubo de ultracentrífuga. Se ultracentrifugó la fracción de membrana durante 30 minutos a 100.000g en una ultracentrífuga Beckmann L-80 con un rotor Ti70. El sedimento se lavó cuidadosamente con tampón Tris sin llegar a disolverlo y se secó el tubo con un pañuelo de papel evitando perturbar el sedimento en cualquier momento. Por último, el sedimento (las membranas) se resuspendió en 1 ml de tampón Tris. Se tomó una alícuota de 20 µl para determinar la concentración de proteína (apartado 2.7.1) y el resto se congeló en nitrógeno líquido y almacenó a -80 °C hasta su uso.

### Soluciones empleadas

---

**Tampón Tris:** 20 mM Tris-HCl pH 8 (ajustar con NaOH)

**Tampón P3 con DNasaI:** 20mM Tris-HCl, pH 8 con 10 mM PMSF; 0,1mg/ml DNasaI (usar tras la preparación)

---

La concentración de proteínas de la fracción de membrana se normalizó a 5 mg/ml con tampón Tris. En un tubo de ultracentrífuga se trataron 2.5 ml de la fracción de membrana con 0.25 ml de Triton X-100 al 20% (concentración final de 2%) para solubilizar las proteínas de la membrana. Se añadió una micro-varilla magnética y se dejó agitando en hielo durante 1 hora. Durante ese tiempo se prepararon las columnas de separación por gravedad ajustando el volumen del extracto de proteína de acuerdo con la capacidad de unión de la columna y empleando el extracto lo más concentrado posible en el rango de volumen recomendado por el fabricante. Se añadió a una columna de polipropileno de un mililitro de capacidad (Qiagen) con 1 ml (CV) de suspensión Strep-Tactin® Sepharose® 50% (IBA) y se dejó que se empaquetase la columna por gravedad.

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

La columna se equilibró por gravedad con 8 ml de tampón W sin dejar secar la resina. Se retiró la varilla magnética de la muestra de solubilización y se ultracentrifugó durante 30 minutos a 100,000 g para sedimentar la fracción de membrana insoluble. Se recogió el sobrenadante con una pipeta y se cargó en la columna de purificación. La columna se dejó correr únicamente por gravedad. Se lavó 5 veces la con 5 ml de tampón W cada vez. Por último, las proteínas se eluyeron con 1 ml de tampón E. Este último paso de elución se repitió 4 veces para obtener la máxima cantidad de proteínas. Las fracciones de elución se concentraron por centrifugación utilizando filtros de concentración (Amicon) hasta un volumen de 300  $\mu$ l. 200  $\mu$ l de cada muestra se mezclaron con 50  $\mu$ l de tampón de carga SDS-PAGE 5x. Se dividió cada preparación en dos alícuotas de 125  $\mu$ l. Una de las alícuotas de cada muestra se hirvió durante 20 minutos a 95 °C, para revertir los enlaces cruzados formados por el formaldehído. Por último, las muestras se dejaron atemperar a temperatura ambiente al menos durante 10 minutos. Para visualizar las proteínas se cargaron 30  $\mu$ l de cada muestra en un gel de poliacrilamida adecuado para inmunotransferencia y se separaron mediante SDS-PAGE (aparatado 1.9.2).

### Soluciones empleadas

---

**Tampón Tris:** 20 mM Tris-HCl pH 8 (ajustar con NaOH)

**Tampón P3 con DNasaI:** 20mM Tris-HCl, pH 8 con 10 mM PMSF; 0,1mg/ml DNasaI (usar tras la preparación)

**Detergente:** Tritón X-100 al 20%

**Tampón W:** 100 mM Tris.HCl, pH 8; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,06% Tritón X-100

**Tampón E:** 100 mM Tris.HCl, pH 8; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2.5 mM Dethiobiotina; 0,06% Tritón X-100

**Tampón de carga-SDS 5X:** 0.3125 M Tris HCl, pH 6.8, 10% SDS; 0.5 M DTT; 50% glicerol; 0.05% azul de bromofenol.

---

### 1.10.2.5. Análisis de las proteínas mediante SDS-PAGE/WESTERN y LC/MS

Tras la separación de las proteínas, éstas se transfirieron a una membrana de PVDF y se realizó un Western-Blot específico de Strep-Tactin (aparatado 1.9.4.2) para confirmar los patrones de interacción.

Al no tener anticuerpos específicos de las posibles proteínas de las interacciones, la identificación de las mismas se realizó mediante LC/MS. Tras la separación de las proteínas por SDS\_PAGE, las proteínas se visualizaron mediante tinción de plata (apartado 1.9.3.2) o con SPYRO-Rubi (apartado 1.9.3.3). Las mezclas hervidas se mandaron analizar a la unidad de proteómica de IBiS (Sevilla), donde las muestras se limpiaron y prepararon para el marcaje (alquilación, reducción y digestión) y se desalaron mediante C18. El análisis se realizó mediante un nano-LC-MS/MS (Easy-nanoLC 1000+QExactive Plus Orbitrap) y el análisis primario de resultados se realizó mediante programa protein discover 1.4 (Thermo).

## 1.11. ANÁLISIS DE METABOLITOS INTRA Y EXTRACELULARES

### 1.11.1. Cuantificación de la concentración extracelular de glucosa

La cuantificación de la glucosa presente en el medio extracelular se determinó mediante la utilización del kit comercial “glucose (HK) assay kit” (Sigma Aldrich), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La absorbancia de las muestras se realizó a 340 nm en un lector de placas de 96 pocillos modelo Synergy HT (Bio-Tek). Los datos obtenidos se utilizaron para calcular el consumo de glucosa en cada una de las condiciones de cultivo ensayadas (Pastor *et al.*, 2013; Salar-García *et al.*, 2017).

#### 1.11.1.1. Método DNS

Este método se desarrolló para calcular la concentración de azúcares reductores (como la glucosa o la fructosa) en distintos materiales (Sumner, 1921). Está basado en una reacción redox que ocurre entre el reactivo 3,5-dinitrosalicilato (DNS) y los azúcares reductores presentes en la muestra. En presencia de azúcares reductores el 3,5-dinitrosalicilato es reducido a 3,5-diaminosalicilato, que presenta un máximo de absorbancia a 550 nm. Dicha medición es proporcional a la concentración de azúcares reductores presentes en el medio. Además el método tiene una sensibilidad y al ser un método espectrofotométrico, mayor productividad (Miller, 1959; Bello Gil *et al.*, 2006).

Se puede realizar la prueba tanto en microplacas de 96 pocillos o bien en tubos de vidrio individuales. Se realizó una curva patrón de glucosa a partir de la solución stock con las siguientes concentraciones: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 30 mM, teniendo en cuenta la salinidad de las muestras (baja o elevada salinidad).

Tanto a las muestras de la curva patrón o estándares como a las muestras problema se les hizo una dilución previa 1:2, para mantener el rango lineal. A esa dilución se le añadió el doble de volumen del reactivo DNS. Se incubó durante 5 minutos a 95°C. Para parar la reacción, se añadió el triple de volumen de agua. Las proporciones finales son: muestra/estándar: DNS: agua (1:2:9). A esta disolución final se dejó atemperar a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 550 nm, ajustando el blanco con el patrón 0 mM de glucosa.

#### Reactivos empleados

---

**Solución stock de glucosa a baja salinidad:**

**Solución stock de glucosa a elevada salinidad:**

**Reactivo DNS** 40 gr de NaOH, 0.5 gr de ácido 3,5-dinitro-salicílico, y 150 gr de trartrato sódico-potásico (sal de Seignette). Se disuelve primero el NaOH en 100 ml de agua destilada, y se añade el resto de reactivos antes de enrasar con agua a 500 mL

---

### 1.1.5. Extracción de solutos compatibles

Los solutos citoplasmáticos se extrajeron siguiendo el método descrito por Bligh y Dyer (Bligh and Dyer, 1959), tal y como se describe a continuación.

#### PROTOCOLO

---

- Partir de 100 ml de cultivo en final de la fase exponencial
  - Centrifugar 10 minutos a 4000-6000 rpm (a 4 °C)
  - Descartar el sobrenadante
  - Resuspender el pellet en 10 ml del medio sin glucosa (misma salinidad).
  - Centrifugar 10 minutos a 4000-6000 rpm (a 4 °C)
  - Descartar el sobrenadante
  - Resuspender el pellet en solución de extracción:
  - metanol/cloroformo/agua (V/V/V) (10/5/4)
  - Incubar 30 minutos en agitación a 37 °C
  - Añadir volumen cloroformo/agua (V/V) (1/1) 2ml
  - Separar las fases centrifugando 10 minutos a 6000 rpm (a 4 °C)
  - Recoger la fase acuosa
  - Dejar evaporar o/n a temperatura ambiente o bien a 37°C
  - Resuspender el precipitado con 1ml de agua destilada
- 

### 1.11.2. Cuantificación de ectoínas intracelulares por HPLC-ESI-MS/MS

La cuantificación de los solutos intracelulares se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a espectrometría de masas, siendo ésta es una técnica muy sensible que permite cuantificar los solutos compatibles con exactitud (Argandoña *et al.*, 2010).

Las diferentes estirpes de *C. salexigens* se sembraron en medio mínimo M63 y se incubaron en diferentes condiciones de salinidad y temperatura según los casos. Como fuente de carbono se utilizó la glucosa a una concentración final de 20 mM. Los solutos intracelulares se extrajeron por el método descrito en el apartado 1.11.1. Para la determinación de los solutos ectoína e hidroxiectoína se analizaron muestras de 20 µl correspondientes a la fase acuosa por HPLC (sistema PerkinElmer Series 200 HPLC (Wellesley, USA) acoplado a un sistema Applied Biosystems QTRAP LC/MS/MS (Foster City, USA), utilizando una columna Spherisorb S3 NH2 (dimensiones: 150 x 4,6 mm Waters), con un flujo de 0,4 ml/min. La separación de los compuestos se realizó mediante un gradiente binario de agua y metanol en diferentes proporciones (ambos con un 0,1 % v/v de ácido fórmico). Para el análisis HPLC-ESI-MS/MS (High Performance Liquid

## CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODOS

Chromatography - Electrospray Tandem Mass Spectrometry), el espectrómetro de masas se configuró según los siguientes parámetros: una cortina de gas 35 psi, un voltaje de spray iónico 5500 V, temperatura de la fuente a 350 °C y gas de la fuente 60 psi. Los tiempos de retención fueron de 4,30 minutos para la ectoína y de 4,70 minutos para la hidroxiectoína, respectivamente. Dado que la cuantificación de los solutos se expresa en  $\mu\text{mol}$  soluto/mg proteína, es necesario obtener una recta patrón para cada soluto con estándares de concentraciones conocidas. Para la determinación del tiempo de retención de las ectoínas se utilizaron compuestos puros de los mismos proporcionados por la casa comercial bitopAG (Witten, Alemania).

### **1.11.3. Cuantificación de ectoínas extracelulares por HPLC-UV**

Las muestras de sobrenadante se liofilizaron y resuspendieron en 150  $\mu\text{l}$  de agua Mili-Q. Los solutos se extrajeron por el método descrito en el apartado 2.9.2.1. Una muestra de 20  $\mu\text{l}$  de la fracción soluble se analizó por HPLC isocrático en una columna Spherisorb S3 NH2 (150 mm por 4,6 mm de diámetro interno; Waters). La fase móvil fue acetonitrilo 70% en agua Mili-Q a 0,5  $\text{ml min}^{-1}$  de flujo y temperatura ambiente tal y como se describe en Garcia-Esteba y colaboradores (García-Esteba *et al.*, 2006a). Los tiempos de retención de ectoína e hidroxiectoína se determinaron utilizando soluciones de ectoína e hidroxiectoína comerciales.

### **1.11.4. Cuantificación de ácidos orgánicos extracelulares.**

Las concentraciones extracelulares de acetato, gluconato, piruvato y lactato se determinaron a partir de muestras previamente filtradas de 20  $\mu\text{l}$  mediante un equipo de HPLC equipado con un detector de índice de refracción (IR) y un diodo (UV) (Shimadzu Scientific Instruments). Como patrones de utilizaron diferentes concentraciones de los ácidos orgánicos comerciales, Se utilizó una columna de intercambio de cationes HPX-87H (BioRad). La fase móvil fue  $\text{H}_2\text{SO}_4$  15 mM a 0,5  $\text{ml min}^{-1}$  de flujo y 45 °C. El espectrómetro de masas se hizo funcionar en el modo de ionización por electropulverización negativo, usando el modo SCAN en un rango de  $m/z$  50-300, mientras que el modo de monitoreo de iones seleccionado se usó para el  $m/z$  de cada compuesto. El voltaje de pulverización iónica se ajustó a 3500 V. Se usó nitrógeno con un flujo de 12 litros / min como gas de revestimiento (40 p.s.i.) y gas auxiliar. El capilar de transferencia de iones se calentó a 350 °C. El voltaje de fragmentación se ajustó a 70 V. La separación se realizó en un volumen de inyección de 10  $\mu\text{l}$  utilizando la misma columna y condiciones que el método anterior, sustituyendo  $\text{H}_2$  5 mM, tal y como se describe en (Jose María Pastor *et al.*, 2013; Salar-García *et al.*, 2017).

## **1.12. ANÁLISIS Y RECURSOS BIOINFORMÁTICOS.**

### **1.12.1. Tratamiento y análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas.**

El tratamiento y análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas (identificación de marcos abiertos de lectura, análisis de restricción, composición de aminoácidos, diseño de cebadores, alineamientos, clonación) se llevó a cabo utilizando el paquete de programas CLC Main Woekbench (Qiagen).

### **1.12.2. Diseño de cebadores.**

Para el diseño de cebadores se utilizó el programa “Primer3” (Whitehead Institute for Biomedical Research) (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) y para la comprobación de sus características, tales como la T<sub>m</sub>, formación de estructuras secundarias o formación de dímeros, se utilizó la herramienta “DNA calculator”, disponible en la página web del proveedor Sigma-Genosys (<http://www.sigma-genosys.com/calc/DNACalc.asp>), así como en la página OligoAnalyzer ([eu.idtdna.com](http://eu.idtdna.com))

### **1.12.3. Análisis de promotores y terminadores transcripcionales.**

Para la predicción de regiones promotoras, se utilizó el programa “BDGP Neural Network Promoter Prediction Input” ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)) (Waibel *et al.*, 1989). La predicción de los terminadores transcripcionales se realizó mediante el programa “SoftBerry-FindTerm” (<http://www.softberry.ru/berry.phtml>).

### **1.12.4. Búsqueda de secuencias homólogas en bases de datos.**

La búsqueda de secuencias homólogas en las bases de datos de ADN y proteínas (EMBL, Gen Bank, DDBJ, UniProt), así como el alineamiento preliminar de dos secuencias, se realizó mediante las diferentes herramientas del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)(Altschul *et al.*, 1997) en el servidor del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

### **1.12.5. Secuencia del genoma de *C. salexigens*.**

Dicho genoma fue secuenciado por el Joint Genome Institute, del Departamento de Energía de los Estados Unidos, en 2004, estando disponible a través de la página web <https://img.jgi.doe.gov/>. Recientemente se encuentra disponible la versión actualizada del genoma en la base de datos del NBCI (National Center for Biotechnology Information). Para la visualización del genoma se empleó el programa Artemis ([sanger.ac.uk/resources/software/artemis/](http://sanger.ac.uk/resources/software/artemis/)).



### 1.12.6. Predicción y análisis de los sistemas de dos componentes.

Para ello se utilizó la base de datos “Signal Census” para la detección de las histidinas quininas y los reguladores de respuesta presentes en el genoma de *C. salexigens* ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete\\_Genomes/SignalCensus.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/SignalCensus.html)webcite, (Galperin *et al.*, 2010)). Seguidamente se utilizó la herramienta STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins), (<http://string-db.org/>) (Szklarczyk *et al.*, 2011) para realizar una predicción sobre los posibles reguladores de respuesta asociados a las diferentes histidina quininas. La búsqueda de secuencias homólogas en las bases de datos de las proteínas (EMBL, Gen Bank, UniProt), así como el alineamiento preliminar de secuencias, se realizó mediante las diferentes herramientas del programa BLAST del servidor del NCIB (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Por otro lado, se realizó un análisis de dominios de las diferentes histidina quininas para su clasificación y posterior predicción de la posible función biológica, mediante la utilización de las herramientas “SMART” (Simple Modular Architecture Research Tool, <http://smart.embl-heidelberg.de/>).(Schultz *et al.*, 1998; Letunic and Bork, 2018)

### 1.12.7. Análisis de proteínas.

Para la predicción de péptidos señal y la topología de las proteínas se utilizó principalmente la aplicación online SMART 6 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) (Schultz *et al.*, 1998; Letunic and Bork, 2018). Los parámetros físicos y químicos teóricos de las proteínas recombinantes (masa molecular, punto isoeléctrico y coeficiente de extinción molar) se calcularon con la aplicación ProtParam del servidor de proteómica ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger *et al.*, 2003)

Otras aplicaciones usadas para el análisis funcional y la predicción de motivos conservados en proteínas fueron:

- STRING 8.2, para la determinación de redes interacción proteínas-proteínas (<http://string.embl.de>) (Kanehisa, 2004)
- Sinaling census (<http://hodgkin.mbu.iisc.ernet.in/-king>) (Galperin, 2005)
- PROSITE (<http://www.expasy.org/prosite>) (Hulo, 2006)
- Pfam, para la predicción de dominios funcionales (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam>) (Finn *et al.*, 2014)
- CDD, para la clasificación de dominios y proteínas conservados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) (Marchler-Bauer *et al.*, 2015)
- InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (Mitchell *et al.*, 2019)

- HMMTOP, para la predicción de regiones transmembrana. (<http://www.enzim.hu/hmmtop/index.php>) (Tusnady and Simon, 1998).

### **1.12.8. Otros análisis.**

Para el análisis filogenético se utilizó el programa Megalign del paquete de programas DNASTAR Lasergene, y el programa MEGA versión 6 (Tamura *et al.*, 2013).

Para el alineamiento de múltiples secuencias de ácidos nucleicos y proteínas se realizó con la herramienta ClustalW2 ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)) y ClustalOmega ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)).

Como explorador de sintenia se utilizó la base de datos SyntTax (<https://archaea.i2bc.paris-saclay.fr/synttax>) (Oberto, 2013)

De igual forma, como primer análisis funcional, se consultaron las distintas categorías funcionales descritas en las agrupaciones o "clústers" de grupos ortólogos ("Clusters of orthologous groups"; COG) (Tatusov *et al.*, 2003) asociadas a cada gen o proteína sobreexpresado/a. Para verificar la anotación, y por ende, la función de los genes y proteínas sobreexpresadas, se consultó la ontología génica otorgada por UniprotKB, las anotaciones provenientes del NCBI, PATRIC (Wattam *et al.*, 2017). Adicionalmente, se ordenaron dichos genes y proteínas atendiendo a la clasificación ortologica proporcionada por KEGG (Kanehisa, 2004), incorporándose a dicha clasificación aquellos genes y proteínas revisadas por las distintas anotaciones y ontologías mencionadas con anterioridad.

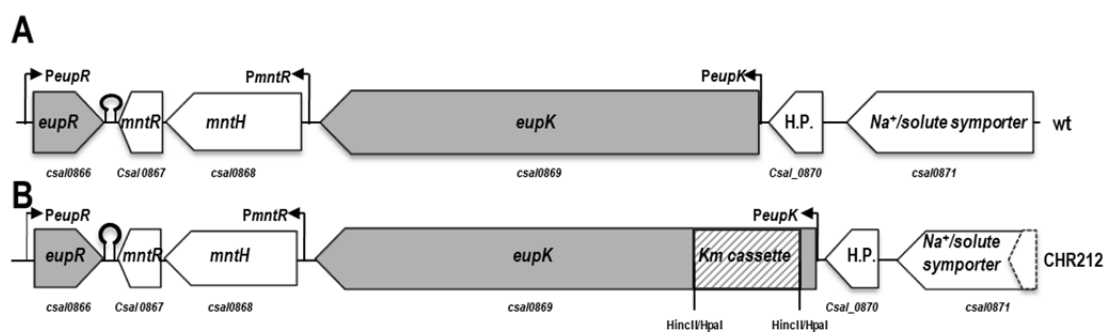
## **2. RESULTADOS**

## 2.1. El sistema de dos componentes EupK/EupR

A raíz de la caracterización de EupR como el primer regulador de respuesta perteneciente a un sistema de dos componentes que se describió implicado en la osmorregulación bacteriana (Rodríguez-Moya *et al.*, 2010), el siguiente paso era identificar al otro componente del sistema, la histidina quinasa. Al tratarse de un regulador de respuesta de los denominados huérfanos al no estar en ningún operón donde se encontrase la histidina quinasa asociada, se buscó al posible candidato mediante análisis *in silico*, lo que dio pie al descubrimiento de la histidina quinasa codificada por el gen *Csal\_0869*, a la que a partir de ahora denominaremos EupK, como la posible candidata para formar parte del sistema

### 2.1.1. Organización transcripcional de la región de EupK/EupR

En primer lugar se realizó un análisis de los genes que se localizan próximos a *eupR* y a su posible histidina quinasa asociada, *Csal\_0869* (*eupK*). Dicho análisis nos indicó que los genes cercanos presentaban una elevada similitud con genes implicados en procesos de transporte (como *Csal\_0868*, un posible transportador de manganeso *mntH*, y *Csal\_0871* un simporte de sodio/soluto), o de regulación (como *Csal\_0867*, un represor dependiente de manganeso, *mntR*) (Figura 22). Como se observa en la Figura 22 A, el gen *eupR* se encuentra dos genes en posición 3' respecto al gen que codifica su posible histidina quinasa (*eupK*) y en dirección opuesta. Este hecho, junto con la presencia de un terminador transcripcional localizado delante del gen *Csal\_0867*, indicaba que *eupR* y *eupK* no formaban parte del mismo operón.

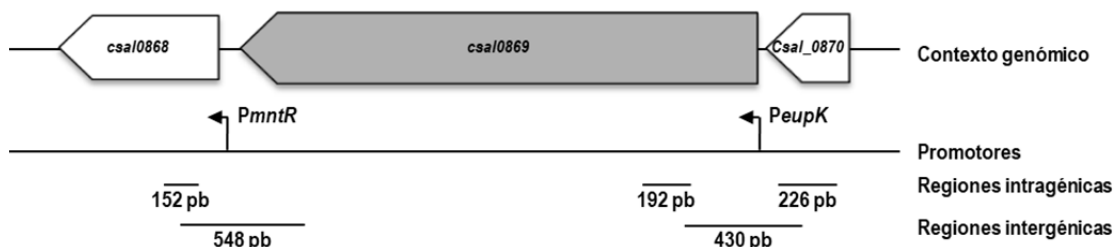


**Figura 22. Organización genética de la región *eupK* de *C. salexigens* y construcción derivada de ella.** (A) región genómica de *C. salexigens* que contiene *eupK* y *Csal\_0866*, que codifica su regulador de respuesta putativo, los genes *mntH*-*mntR* relacionados con el transporte de manganeso y el gen simulador de  $\text{Na}^+$  / soluto. Los promotores están indicados por flechas en ángulo. El terminador transcripcional corriente abajo de *eupR* se muestra como una paleta. (B) Generación de la cepa *eupK*-. El gen *eupK* fue inactivado por la inserción de un casete *Km*, que transporta genes de resistencia para kanamicina, en su sitio único *HpaI*.

La búsqueda *in silico* de promotores en la región utilizando algoritmos de promotores bacterianos (<http://www.softberry.com>) detectó la existencia de una región promotora delante del gen *eupK* y otra delante del gen *Csal\_0868*, lo que parecía indicar

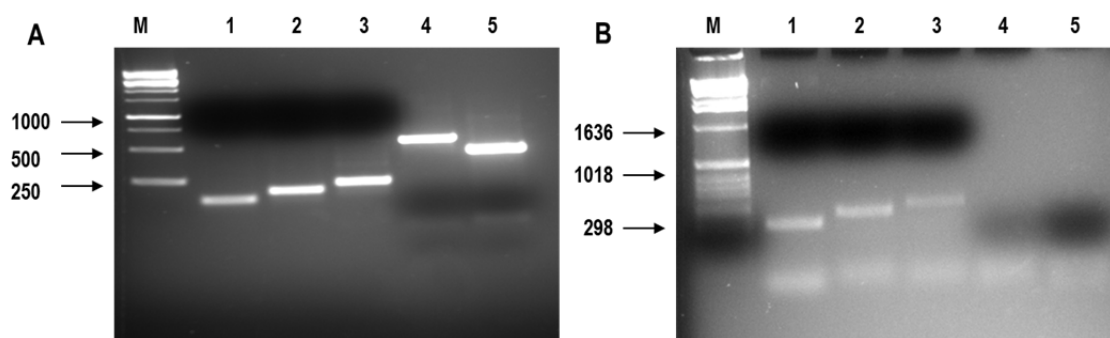
que el gen *eupK* formaba una única unidad transcripcional e independiente de los dos genes en posición 3', *csal0868* y *csal0867*. Estos, a su vez, parecían formar un único operón, ya que estaban separados únicamente por 14 pb y poseían una región promotora en posición 5' de *csal0868* y un terminador transcripcional detrás de *csal0867*. Por otro lado, la anotación de ambos genes parecía indicar que estaban funcionalmente relacionados (un transportador de manganeso y su regulador transcripcional).

Para comprobar si *Csal\_0869* formaba una única unidad transcripcional se realizaron experimentos de RT-PCR. Para ello se aisló el ARN total de la cepa silvestre y se obtuvo su ADNc correspondiente. Seguidamente, se amplificaron las regiones intragénicas (*Csal\_0868*-*Csal\_0869* y *Csal\_0869*-*Csal\_0870*) usando como molde 2µl de ADNc, amplificándose también las regiones intergénicas (*Csal\_0868*, *Csal\_0869* y *Csal\_0870*) como control de la expresión individual de cada gen. (Figura 23). Como control de la PCR se realizó la amplificación de los mismos amplicones usando ADN genómico.



**Figura 23. Posiciones de promotores putativos (flechas) y regiones intragénicas para ser amplificadas por cebadores específicos entre *Csal\_0868*-*Csal\_0869* y *Csal\_0869*-*Csal\_0870* y regiones intergénicas de los genes *Csal\_0868*, *Csal\_0869* y *Csal\_0870*.**

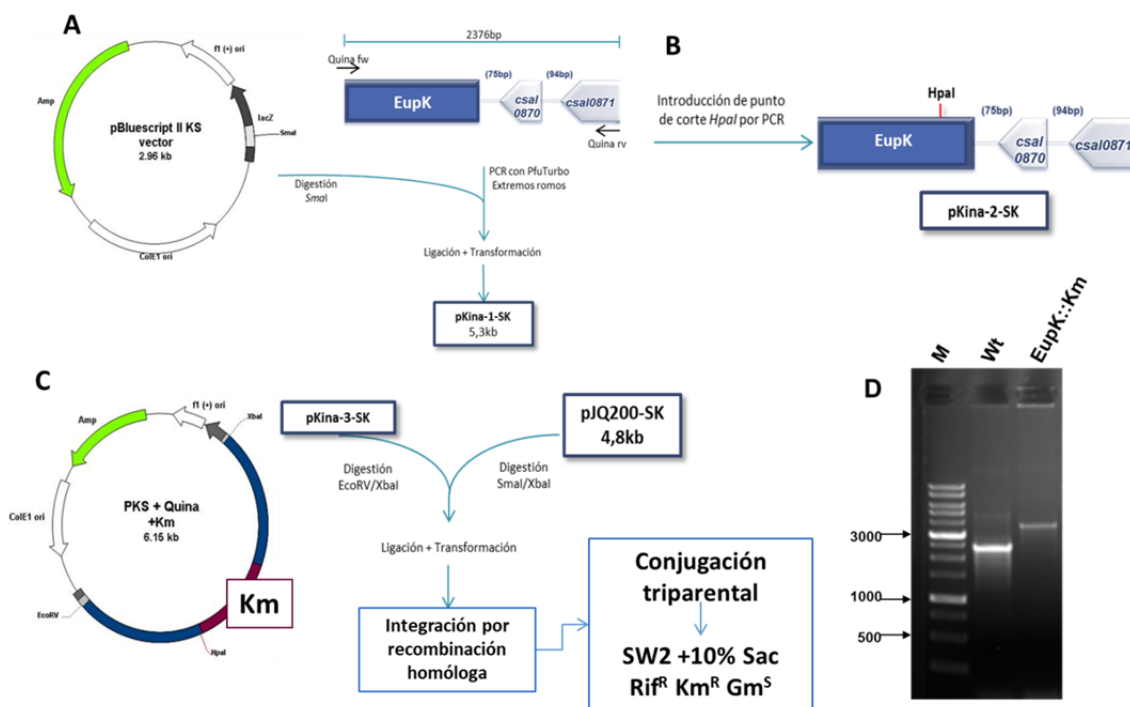
Como se observa en la Figura 24, los genes *Csal\_0868*, *Csal\_0869* (*eupK*) y *Csal\_0870* están expresados y se transcriben, pero no forman parte del mismo ARNm, ya que no se obtuvo ninguna amplificación de las regiones intragénicas *csal0868*-*0869* y *csal0869*-*0870* (filas 4 y 5 de Figura 24 B). Por tanto, la falta de evidencias de co-transcripción entre *eupK* y sus genes adyacentes sugiere que el gen *eupK* se transcribe de forma monocistrónica, formando una unidad transcripcional única (Figura 24 A y B).



**Figura 24. Organización génica de la región de la histidina-quinasa *Csal\_0869* de *C. salexigens*. Amplificación de *Csal\_0868* intragénico (línea 1), *Csal\_0869* (línea 2), *Csal\_0870* (línea 3) y regiones intergénicas entre *Csal\_0868* y *Csal\_0869* (línea 4) y *Csal\_0869* y *Csal\_0870* (línea 5) utilizando ADN genómico (A) o cDNA (B). M, marcador de peso molecular (1 kb ladder, gTPbio (A), Invitrogen (B)).**

### **2.1.2. Obtención de un mutante afectado en *eupK***

Una vez demostrado que el gen *Csal\_0869* formaba una única unidad transcripcional, y descartando por tanto que su mutación ejerciese un efecto polar sobre los genes localizados en 3', se procedió a la construcción de un mutante en dicho gen mediante la inserción de un casete de resistencia a la kanamicina (*eupK::Km*) (Figura 25). Así, mediante PCR utilizando la ADN polimerasa de alta afinidad Pfu turbo, se amplificó un fragmento de ADN de 2376 pb que contenía el gen *eupK*. Éste se clonó en el plásmido pKS Bluescript previamente digerido con la enzima de restricción *SmaI*, dando lugar al plásmido pKina1-SK. Posteriormente, se introdujo un sitio de restricción *HpaI* en el gen *eupK* mediante mutagénesis dirigida por PCR, dando lugar al plásmido pKina2-SK. Dicho plásmido se linearizó con la enzima de restricción *HpaI* y se religó con un fragmento de 1763 pb proveniente del vector pUCK, previamente digerido con la enzima *HincII*, que contenía un casete de resistencia a la kanamicina (*KmR*), denominándose como pKina3-SK al plásmido resultante. Por último, para recombinar el gen mutado en el cromosoma de *C. salexigens*, se clonó un fragmento del plásmido pKina3-SK de unas 5 kb, digerido con *EcoRV-XbaI*, en el vector suicida pJQSK200 (*GmR*) previamente digerido con *SmaI-XbaI*, dando lugar al plásmido pKina4-pJQ (Figura 25). Este se transfirió posteriormente a células de *C. salexigens* mediante conjugación triparental y las cepas mutantes resultantes que formaron un doble evento de recombinación homóloga se seleccionaron en placas de medio SW2 con un 10% de sacarosa y se identificaron como aquellas colonias que eran Rif<sup>r</sup>Km<sup>r</sup>Gm<sup>s</sup>. Posteriormente, el mutante se confirmó por PCR y posterior secuenciación. La cepa mutante obtenida se denominó CHR212 (*eupK::Km*).



**Figura 25. Estrategia utilizada para la construcción de un mutante *eupK*.** (A) Se amplificó por PCR un fragmento de 2376 pb del genoma de *C. salexigens* que contenía el gen *CsaI\_0869* y se clonó el fragmento resultante en el plásmido en pKS bluescript previamente digerido con *SmaI* para dar el plásmido pKina1-SK de 5,3 Kb. (B) Se introdujo un sitio de reconocimiento de *HpaI* mediante mutagénesis dirigida generando el plásmido pKina-2 SK comprobado por secuenciación. (C) El plásmido se linealizó en *HpaI* y se ligó al fragmentos *HincII* del vector pUC4K que contenía un casete *Km* ( $Km^r$ ) interrumpiendo de este modo el gen y generándose el plásmido pKina3-SK. Para poder introducir la mutación en el cromosoma de *C. salexigens* por recombinación homóloga, se clonó un fragmento *EcoRV-XbaI* de 5 kb de pKina3-SK en el vector suicida pJQSK200 ( $Gm^r$ ) previamente digerido con *SmaI-XbaI* para dar el plásmido pKina4-pJQ, que, mediante conjugación triparental se introdujo en una cepa silvestres de *C. salexigens*. Las cepas mutantes resultantes de un evento de recombinación homóloga doble se identificaron como colonias  $Km^r Gm^s$  en placas SW-2 (medio complejo con 2% de sales totales y 0,5% de extracto de levadura) que contenían 10% de sacarosa. (D) La cepa resultante se confirmaron por PCR, donde se aprecia un salto correspondiente al cassette de Kanamicina y por secuenciación. La cepa mutante se denominó CHR212

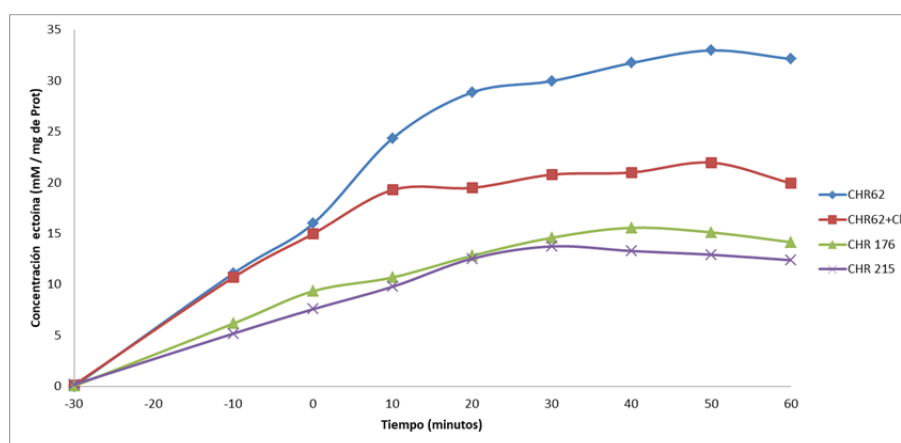
### 2.1.3. La región transmembrana de *EupK* no es un transportador de ectoína funcional.

Como se ha mencionado anteriormente, la región transmembrana de la proteína *EupK* presenta una elevado grado de homología con los dominios sensores transmembranas de tipo SSSF (sodium/solute symporters family). Esto clasifica a la quinasa *EupK* con proteínas similares a *CbrA* y *PutP* con más de 10 regiones transmembrana. Es decir, similar a quinazas sensoras con dominios de transportadores secundarios fusionados (T. Mascher *et al.*, 2006b). Si bien la topología de membrana y la bioquímica de los portadores se han estudiado con gran detalle (Jung, 2001), no hay datos disponibles sobre los sensores quinazas correspondientes. Es por ello que quisimos averiguar si dicho dominio era funcional y si el soluto que co-transportaba junto con el

## CAPÍTULO 1. RESULTADOS

sodio era la ectoína. En el caso de que la región transmembrana de eupK fuera un transportador de ectoína, un mutante que no lo exprese vería disminuida su entrada de ectoína al interior celular.

Para ello realizamos un experimento que permitía monitorizar el transporte de ectoína al medio intracelular desde el medio externo a lo largo del tiempo utilizando para ello mutantes incapaces de sintetizar ectoínas. Para ello, se cultivaron las estirpes CHR62 ( $\Delta\text{ectABC}::\text{Tn1732}$ ), CHR176 ( $\Delta\text{ectABC}::\text{Tn1732 teaC}::\Omega$ ) y CHR215 ( $\Delta\text{ectABC}::\text{Tn1732 teaC}::\Omega \text{ eupK}::\text{Km}$ ) en medio mínimo a una salinidad de 0,75 M de NaCl, con 20 mM de glucosa, y 30 minutos antes de la inducción de un shock hiperosmótico (tiempo 0) se añadió una concentración 1 mM de ectoína al medio de cultivo. Este shock hiperosmótico se indujo elevando la salinidad del medio hasta 1,5 M de NaCl durante la fase exponencial de crecimiento (densidad óptica 0,6-0,7). A partir del tiempo 0, la incorporación de ectoína o hidroxiectoína se midió cada 10 minutos, durante un tiempo total de 60 minutos, analizando la acumulación de ectoínas en las cepas CHR62, CHR176 y CHR215 por HPLC. El experimento se repitió tratando el cultivo de la cepa CHR62 con cloranfenicol (200  $\mu\text{g/ml}$ ) diez minutos antes de que las células se expusieran al shock hiperosmótico (Figura 26), con objeto de determinar si la inhibición de la síntesis de proteínas influía en la capacidad de *C. salexigens* de incorporar y acumular ectoínas. Como podemos observar en la Figura 26, en el mutante en eupK (CHR215) no disminuyeron su contenido de ectoína en el citoplasma a diferencia de un mutante únicamente en el transportador de ectoína, teaC, que sí fue capaz de incorporar en su citoplasma un máximo de 10 micromoles de ectoína/mg de proteína proveniente del medio externo, cuando este medio contenía glucosa como fuente de carbono y energía (Rodríguez de Moya Vera, 2010).



**Figura 26. Incorporación de ectoínas al citoplasma en las estirpes CHR62, CHR176 y CHR215, cultivadas en medio mínimo M63 con 20 mM de glucosa a 0,75 M de NaCl.** El experimento se repitió tres veces y el resultado mostrado es la media obtenida entre los valores observados en cada experimento independiente, siendo el error siempre inferior al 5 %.



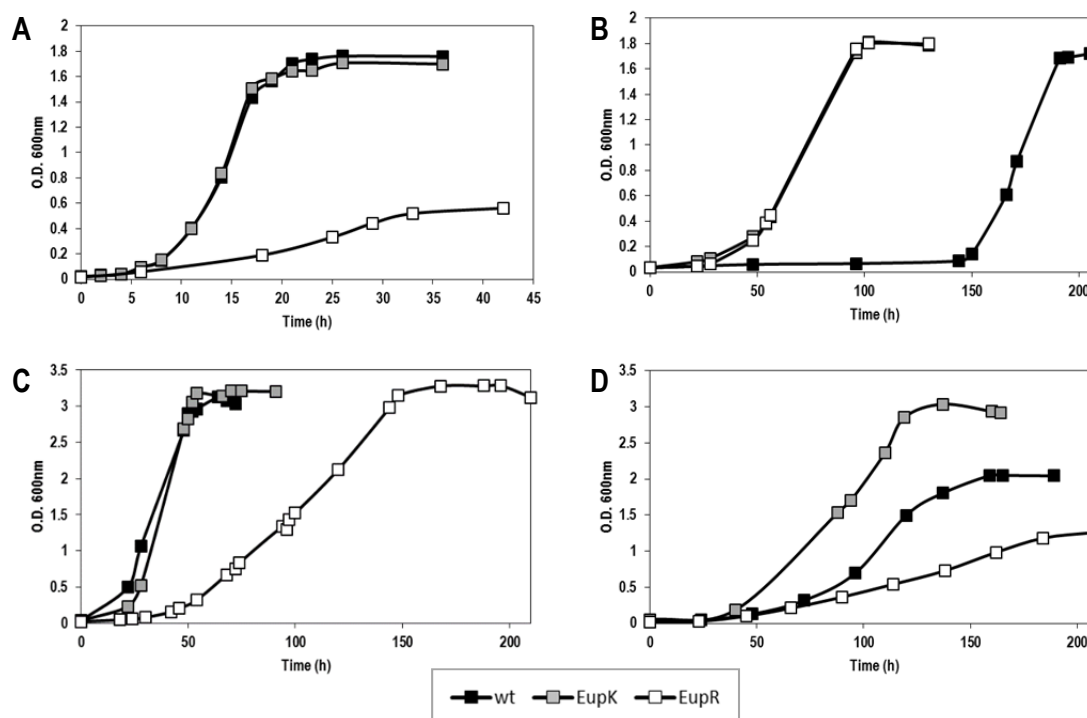
i bien estos datos parecen demostrar que la región transmembrana de la histidina quinasa EupK no es un transportador de ectoínas, habría que realizar estudios más específicos para asegurarse de que el canal sodio/soluto es o no funcional.

### **2.1.4. Implicación del sistema EupK/EupR en la osmoadaptación de *C. salexigens***

Para obtener una idea de la participación de la histidina quinasa en la respuesta adaptativa de *C. salexigens* al estrés por sal investigamos el crecimiento de la cepa mutante (CHR212) bajo estrés osmótico, que es una de las condiciones que desencadena la síntesis de ectoína (García-Esteva et al., 2006b).

Para ello comparamos el crecimiento del mutante en EupK con el de la cepa silvestre y el del mutante en el regulador de respuesta EupR (CHR183), baja salinidad (NaCl 0,6 M) (Figura 27 A y B) y elevada salinidad (NaCl 2,5 M) (Figura 27 C y D) en el medio mínimo M63 suplementado con glucosa o ectoína como las únicas fuentes de carbono a 37°C y 220 rpm. A baja salinidad el mutante EupK mostró un fenotipo similar al mutante en EupR (Figura 27 B), donde ambos podrían usar ectoína como única fuente de carbono y energía. Este hallazgo mostró que la eliminación del gen Csal\_0869 reproducía el fenotipo EupR, permitiendo a las células usar ectoínas como fuente de carbono a baja salinidad, posiblemente como consecuencia de la desregulación del transporte de ectoína a esta salinidad (Rodríguez-Moya *et al.*, 2010). A elevada salinidad, el mutante EupK mostró un crecimiento mejorado con ectoína como única fuente de carbono, en comparación tanto con la cepa silvestre como con la cepa EupR (Figura 25 D). Estos hallazgos confirman la relación entre EupR y EupK pero sugirieron la existencia de un circuito alternativo de regulación relacionado con el transporte de ectoína y/o el catabolismo. Sin embargo, cuando la fuente de carbono utilizada fue la glucosa, no se reprodujo el comportamiento del mutante eupR, sino que el crecimiento fue similar al de la cepa silvestre (Figura 27 A y C). Es decir, en presencia de glucosa el mutante eupR estaba afectado en el crecimiento, mientras que el mutante eupK no.

Estos resultados en conjunto sugieren que la histidina quinasa codificada por el gen eupK estaría asociada al gen eupR y que ambos formarían un sistema de dos componentes implicado en los mecanismos de detección de condiciones de estrés osmótico y en la osmorregulación. Sin embargo, cuando la fuente de carbono es la glucosa nuestros resultados sugieren la existencia de circuitos de regulación más complejos y posiblemente cruzados dependientes de NaCl relacionados con el transporte y/o catabolismo de ectoína pero probablemente, también con la asimilación de la glucosa.



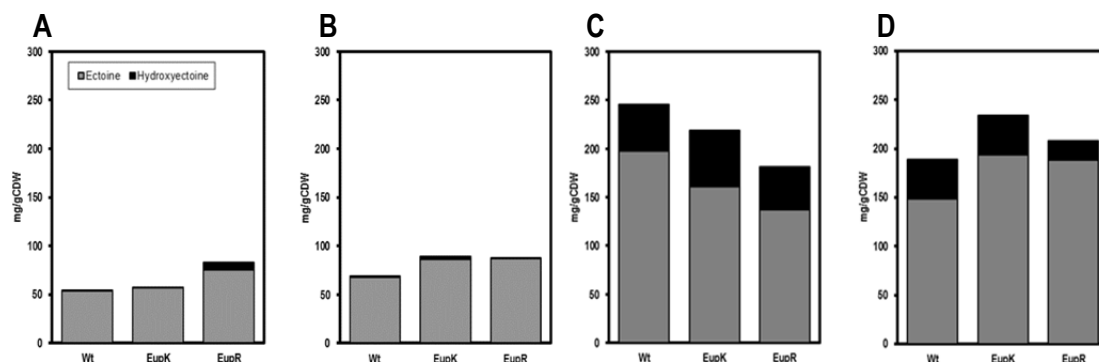
**Figura 27. Crecimiento de la cepa silvestre y de los mutantes *eupR* y *eupK* a 37°C y 220 rpm en medio mínimo M63 con 20 mM de glucosa (A y C) o ectoína (B y D) como única fuente de carbono o a 0,6 M (A y B) o 2,5 M de NaCl (B y D).**

### 2.1.5. La falta de *eupR* conduce a un aumento de la producción de ectoína e hidroxiectoína a baja salinidad.

Para verificar si el fenotipo osmoresistente mostrado por el mutante *eupK* se debió a una mayor acumulación de ectoína (s), cuantificamos mediante HPLC-MS la producción tanto de ectoína como de hidroxiectoína comprándola con la de la cepa silvestre y con una cepa mutante en el regulador *eupR*. Las condiciones ensayadas fueron las mismas que las que se testaron para las curvas de crecimiento, es decir diferentes salinidades (0,6 M y 2,5 M de NaCl), con glucosa o ectoína (20 mM) como única fuente de carbono.

Como ya se demostró anteriormente para la cepa silvestre (José M. Pastor *et al.*, 2013), todas cepas mostraron un aumento dependiente de la salinidad en las concentraciones de ectoína e hidroxiectoína (Figura 28 C y D). A baja salinidad, cuando la fuente de carbono fue la glucosa no se observaron diferencias significativas en la producción de ectoínas en el mutante *EupK* con respecto a la cepa silvestre, pero sin embargo, la pérdida del regulador *EupR* (Figura 28 A) produjo una mayor acumulación de ectoínas destacando la mayor producción de hidroxiectoína observándose un incremento de más de 40 veces la cantidad con respecto a la cepa silvestre. Por otra parte, cuando la fuente de carbono fue la ectoína, la eliminación del sistema *EupK/EupR* aumentó el contenido intracelular de ectoínas en casi un 30% en comparación con la cepa silvestre,

destacando el aumento de hidroxiectoína en el mutante EupK con un incremento de unas 30 veces la cantidad con respecto a la cepa silvestre (Figura 28 B). A elevada salinidad, la eliminación del sistema EupK/EupR sin embargo disminuyó el contenido intracelular de ectoínas con respecto a la cepa silvestre cuando la fuente de carbono fue la glucosa (Figura 28 C). Y por lo contrario, del mismo modo que ocurría a baja salinidad, cuando la fuente de carbono fue la ectoína, el contenido aumentó casi un 30% con respecto a la cepa silvestre en las mismas condiciones (Figura 28 D).



**Figura 28. Contenido intracelular de ectoínas en cepas mutantes de *C. salexigens*** cultivadas en medio mínimo M63 a diferentes concentraciones de NaCl, 0.6 M (A y B) y 2.5 M (C y D) y fuente de carbono glucosa 20 mM (A y C) o ectoína 20 mM (B y D). El contenido intracelular de la cepa silvestre de *C. salexigens* y mutantes eupK- y eupR- se midió por HPLC-MS y se representó la cantidad de ectoína en miligramos por peso seco. Las muestras fueron tomadas al final de la fase exponencial.

Todo ello no lleva a pensar que, del mismo modo que observábamos en los experimentos de osmoadaptación, la fuente de carbono es uno de los estímulos que influyen a la hora de establecer el sistema de dos componentes EupK/EupR, posiblemente debido a una desregularización del transporte de las mismas (Rodríguez-Moya *et al.*, 2010).

### 2.1.6. La histidina quinasa EupK regula parcialmente el transporte de ectoínas (TeaABC).

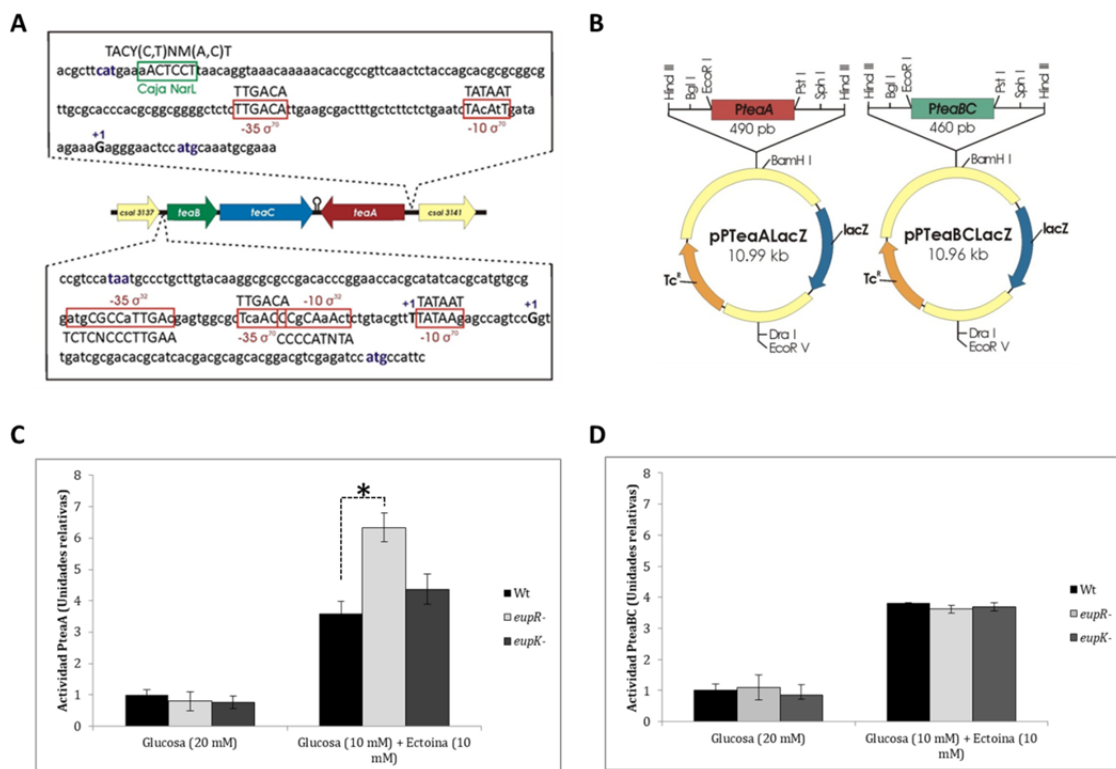
En *C. salexigens* se ha comprobado que el sistema TeaABC es un transportador de ectoínas formado por tres genes, teaA, teaB y teaC, muy similares a los descritos en la bacteria halófila *Halomonas elongata*, aunque se diferencian en su disposición en el genoma. Así, mientras que en *H. elongata* todos los genes se encuentran localizados en la cadena principal (Grammann *et al.*, 2002), los genes teaB y teaC de *C. salexigens* se encuentran en la cadena principal, y el gen teaA en la cadena complementaria. Además, están regulados por regiones promotoras diferentes (teaAp y teaBCp). En un estudio previo se ha comprobado que EupR es un regulador transcripcional del transporte de ectoínas, actuando como represor del sistema TeaABC en condiciones de baja salinidad

## CAPÍTULO 1. RESULTADOS

(Rodríguez de Moya Vera, 2010). Por otro lado, en nuestros resultados descritos anteriormente, se observó que a baja salinidad el mutante *eupK* mostró un fenotipo similar al del mutante en *eupR*, pudiendo ambos mutantes utilizar las ectoínas como única fuente de carbono y energía, además de aumentar su concentración interna en casi un 30% independientemente de la salinidad. Esto podría ser debido a una desregulación del transporte.

Para determinar si la expresión de los genes que codifican los transportadores de ectoínas estaba controlada por el sistema de dos componentes *eupK/eupR*, se realizaron ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa con las fusiones transcripcionales de los promotores que regulan los genes *teaA* (*PteaA*) y *teaBC* (*PteaBC*). Para ello, se transfirieron mediante conjugación triparental a las distintas cepas de *C. salexigens* (CHR61, estirpe silvestre; CHR183, mutante en *eupR* y CHR212, mutante en *eupK*) las construcciones correspondientes a las fusiones transcripcionales entre las regiones promotoras *PteaA* (*pPTeaALacZ*) y *PteaBC* (*pPTeaBCLacZ*) y el gen informador *lacZ*, en el vector *pMP220*, para así analizar posteriormente su expresión en los distintos fondos genéticos (Figura). De esta forma se obtuvieron las cepas CHR188 (Wt *pPTeaALacZ*), CHR189 (Wt *pPTeaBCLacZ*), CHR194 (*eupR pPTeaALacZ*), CHR195 (*eupR pPTeaBCLacZ*), CHR213 (*eupK pPTeaALacZ*) y CHR214 (*eupK pPTeaBCLacZ*), respectivamente. Una vez obtenidos los transconjugantes, se realizó un ensayo de actividad de  $\beta$ -galactosidasa, cultivando las distintas cepas en condiciones de baja salinidad, en medio mínimo M63 con 0,75M de NaCl y como fuente de carbono, glucosa (20 mM) o bien una mezcla de glucosa (10 mM) y ectoína (10 mM). Como cepa control se utilizó la cepa CHR103 (la cepa silvestre que contiene el vector *pMP220* sin promotor).

Como se puede observar en la Figura 29C, a baja salinidad y en presencia de glucosa, la actividad de los promotores *PteaA* y *PteaBC* tanto en un mutante *eupR* como *eupK* fue similar a la mostrada por la cepa silvestre. En presencia de ectoína, la actividad de los dos promotores (*teaAp* y *teaBCp*) se incrementó en 2-3 veces en el todos los casos, demostrando que la activación de dichos genes está regulada por la presencia de ectoína en el medio. Sin embargo, únicamente el promotor *teaAp* vio afectada su activación en un mutante en el regulador de respuesta o bien en la histidina quinasa. Aunque la actividad del promotor en *EupK* es mayor que en la cepa silvestre, ésta no es estadísticamente significativa como sí lo es en el mutante *EupR* ( $p$  value < 0.02 en un test t de Student).



**Figura 29. Estudio de los genes de transporte teaABC de *C. salexigens*.** (A) Análisis de las regiones promotoras de los genes *teaABC*. Se encuentran señalados los posibles inicios de la transcripción y las secuencias -10 y -35 correspondientes a tres posibles promotores dependientes de  $\sigma^{70}$  y de  $\sigma^{32}$ . En la parte superior de dichas secuencias se han indicado las secuencias consenso para los promotores dependientes de  $\sigma^{70}$  y  $\sigma^{32}$ . Así mismo se encuentra señalada una posible caja NarL. Para una mejor comprensión se muestra la secuencia reversa complementaria de la región promotora de *teaA*. (Rodríguez de Moya Vera, 2010). (B) Fusiones transcripcionales construidas con el vector pMP220 conteniendo el gen *lacZ* bajo el control de los promotores de los genes *teaA* y *teaBC* de *C. salexigens* (Rodríguez de Moya Vera, 2010). Patrones de expresión de las fusiones pPteaALacZ (C) y pPteaBClacZ (D) en la estirpe silvestre de *C. salexigens* CHR 61 (Wt) y los mutantes CHR183 (*eupR*) y CHR212 (*eupK*) cultivados en M63 con NaCl 0,75 M a 37°C y en distintas fuentes de carbono. De acuerdo con la prueba t de Student, el asterisco muestra una diferencia significativa (valor  $p < 0.02$ ) en comparación con el control.

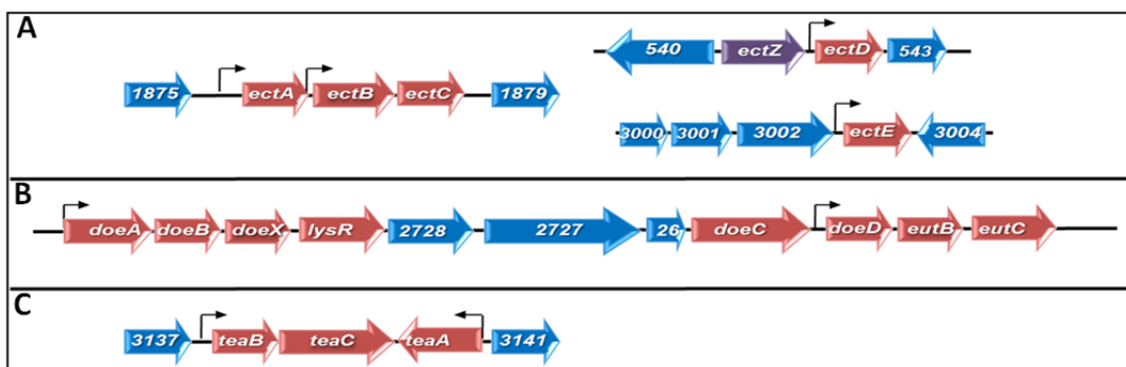
Estos datos corroboran la implicación del regulador de respuesta EupR con el transporte de ectoína, implicando en parte a la histidina quinasa EupK pero también a otros posibles elementos de una red de regulación más compleja.

### 2.1.7. El sistema de dos componentes EupK/EupR está implicado en el control transcripcional del metabolismo de las ectoínas.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, y viendo que la regulación tanto de los niveles de ectoína intracelulares como de la posibilidad de utilizarla como fuente de carbono se debía únicamente a los genes de transporte, quisimos estudiar la participación del sistema de dos componentes EupK/EupR en la regulación del metabolismo de las ectoínas de una forma más global (síntesis, degradación y transporte) en diferentes condiciones de salinidad y de fuente de carbono (glucosa o ectoína), y de este modo

intentar dilucidar las posibles rutas de transducción de señales involucradas en la respuesta al estrés osmótico en *C. salexigens*.

En primer lugar analizamos las distintas regiones transcripcionales de los genes de síntesis (Figura 30 A), degradación (Figura 30 B) y transporte (Figura 30 C), para elegir los genes más representativos de cada ruta. Teniendo en cuenta que en la transcripción de un operón, el óden de los genes puede influir en los niveles de expresión, siempre que fue posible se eligieron los genes más próximos a los promotores. Además que fueran genes relevantes de cada ruta. Se aisló ARN de las distintas cepas y condiciones de ensayo en una fase exponencial tardía. Los niveles de ARNm de los genes seleccionados tanto de síntesis (*ectA* y *ectD*), degradación (*doeA* y *doeD*) como del transporte (*teaA* y *teaC*) se cuantificaron mediante qPCR.



**Figura 30. Organización génica de los genes de síntesis (A), degradación (B) y transporte (C) de ectoínas incluyendo los promotores.**

En cuanto a los genes de transporte, los resultados corroboran los ensayos previos de actividad del promotor del gen *teaA* (Apartado 2.1.6) en los ensayos de baja salinidad con ectoína como única fuente de carbono. En cuanto a la expresión del gen *teaC*, hay que tener en cuenta que en este caso la fuente de carbono era únicamente ectoína 20 mM y no una combinación de glucosa 10mM + Ectoína 10mM, por lo que podríamos concluir que el regulador EupR, a baja salinidad y en presencia de ectoína es un represor de los genes de transporte de ectoínas ya que en un mutante defectivo en dicho regulador la expresión de estos genes es significativamente mayor con respecto a los niveles de la cepa silvestre. Además, dicha regulación parece no ser a través de la histidina quinasa EupK, ya que en el caso de un mutante defectivo en dicha histidina quinasa los niveles de expresión de los genes de transporte a baja salinidad no difieren con respecto a los niveles de la cepa silvestre (Figura 31 B).

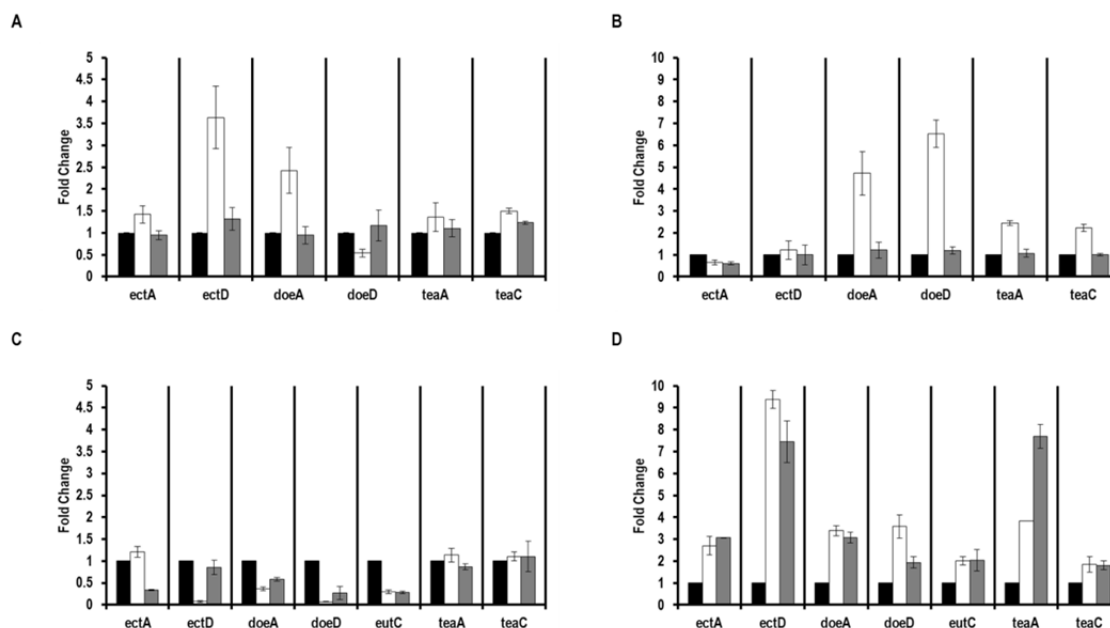
Sin embargo, esto no ocurre a elevada salinidad, donde únicamente cuando la fuente de carbono es la ectoína, estos genes están regulados por ambos elementos del

## CAPÍTULO 1. RESULTADOS

sistema, en especial el gen *teaA* cuya expresión aumenta unas 4 veces en ausencia del regulador EupR y unas 8 veces en ausencia de EupK (Figura 31 D).

Con respecto a los genes de degradación, analizamos el gen *doeA*, relacionado con el ciclo fútil, y el gen *doeD*, responsable de la degradación de las ectoínas y su conexión con el metabolismo central. En este caso, a baja salinidad el regulador EupR actuaría como un represor de del gen *doeA*, independientemente de la fuente de carbono y también de forma independiente de la histidina quinasa EupK (Figura 31 A y B). Además, también sería un represor del gen *doeD*, pero en este caso sólo en presencia de ectoína y de nuevo de forma independiente a EupK (Figura 31 B). A elevada salinidad sin embargo el sistema de dos componentes EupK/EupR actuaría como activador cuando la fuente de carbono es glucosa, pero como represor cuando es ectoína (Figura 31 C y D).

Finalmente, en cuanto a los genes de síntesis, analizamos *ectA*, uno de los genes implicado en la síntesis de ectoína, y el gen *ectD*, responsable de la síntesis de hidroxiectoína. A baja salinidad únicamente el regulador EupR actuaría como represor del gen de síntesis de ectoína cuando la fuente de carbono fue glucosa, corroborando los datos obtenidos de cuantificación del contenido intracelular de ectoínas (apartado 1.11.2) y justificándose de este modo la elevada acumulación de hidroxiectoína en un mutante deficiente en dicho regulador (Figura 31 A). A elevada salinidad sin embargo la regulación fue más compleja. El sistema actuaría como inhibidor de ambos genes en presencia de ectoína. Sin embargo, con glucosa como fuente de carbono, la regulación de cada gen sería de forma independiente y no implicaría al sistema de dos componentes. En este caso el gen *ectA* sería activado por la histidina quinasa mediante otro regulador distinto a EupR mientras que el gen *ectD* sería activado por el regulador EupR, de forma independiente a EupK (Figura 31 C y D).



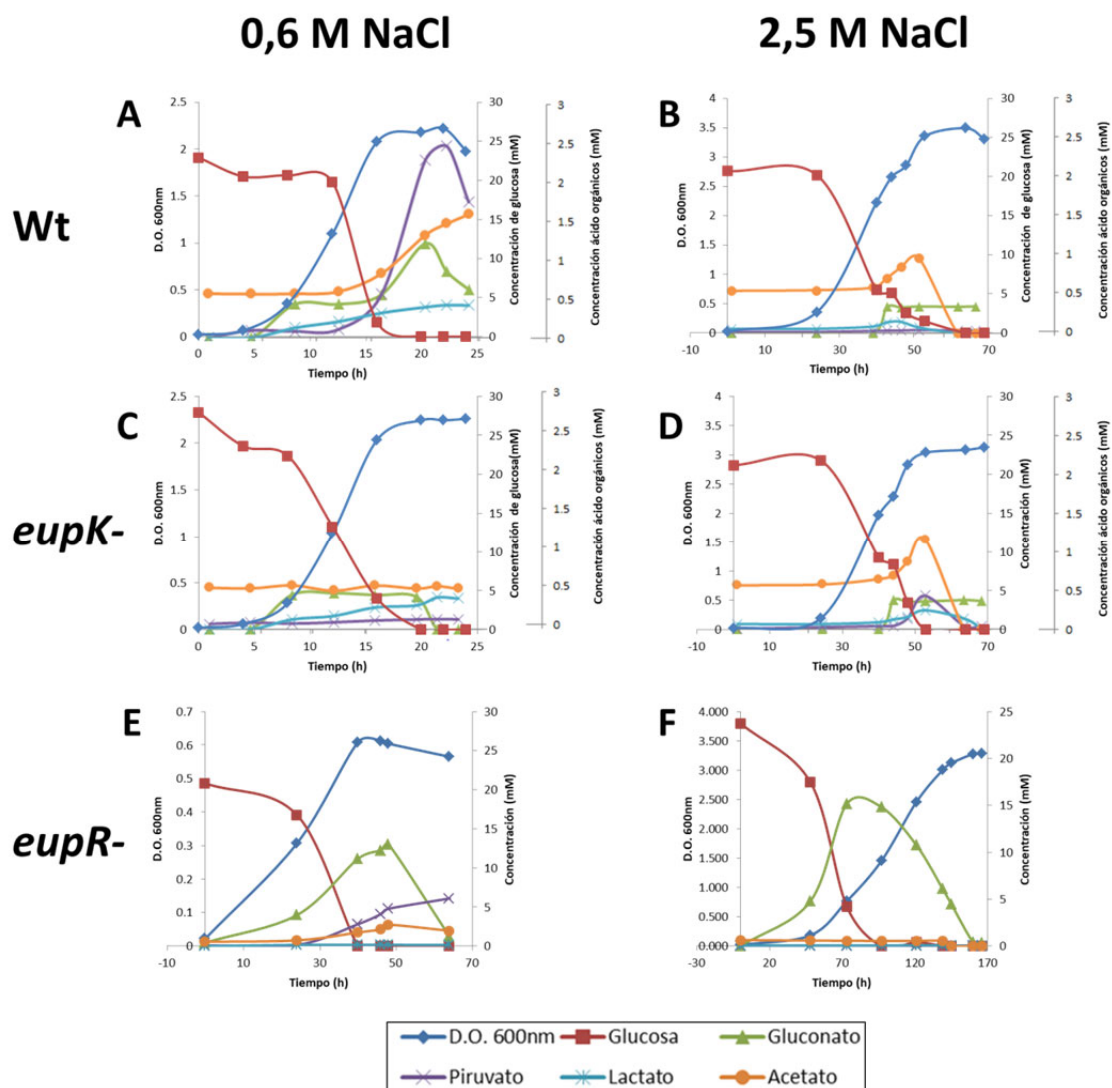
**Figura 31. Influencia del sistema de dos componentes EupK/EupR en la expresión de genes de síntesis (*ectA* y *ectD*), degradación (*doeA* y *doeD*) y transporte (*teaA* y *teaC*) de ectoines a 0.6M NaCl (A y C) y 2,5 M NaCl (B y D) con 20 mM de glucosa (A y C) o ectoína (B y D) como única fuente de carbono. El ARN total se extrajo de los cultivos al final de la fase exponencial, y la expresión se midió mediante q-PCR. Los datos se expresaron en unidades relativas y se calcularon mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , utilizando el gen del ARNr 16S como control interno para normalizar la expresión en cada muestra.**

### 2.1.8. Análisis del perfil metabólico extracelular en los mutantes *eupK* y *eupR*: influencia en la asimilación de glucosa y metabolismo “overflow”

Viendo que el sistema de dos componentes tenía una gran implicación en el metabolismo de la glucosa, decidimos analizar el perfil metabólico de las distintas cepas (Wt y mutantes *eupK*- y *eupR*-), monitorizando el consumo de glucosa y los niveles extracelulares de ácidos orgánicos (gluconato, piruvato, lactato y acetato).

En este caso, la pérdida del regulador EupR produjo una alteración tanto en el perfil de excreción de ácidos orgánicos como en el consumo de glucosa (Figura 32 E y F), no siendo así en el caso del mutante en la histidina quinasa, *eupK*- (Figura 32 C y D), cuyos perfiles fueron similares a los de la cepa silvestre tanto a baja como a elevada salinidad.





**Figura 32. Perfil de acumulación extracelular de ácidos orgánicos y consumo de glucosa de la cepa silvestre y los mutantes *eupK-* y *eupR-* de *C. salexigens* en distintas condiciones de salinidad.** La cepa silvestre de *C. salexigens* (A y B) y de los mutantes *eupK-* (C y D) y *eupR-* (E y F) se crecieron en medio mínimo M63 y adicionado con 20 mM de glucosa a 0,6 M (A, C y E) y 2,5 M (B, D y F) de NaCl. La concentración extracelular (mM) de glucosa se midió por el método DNS (dinitrosalicilato) mientras que la concentración de los ácidos orgánicos (gluconato, piruvato, lactato y acetato) se midió mediante HPLC-UV.

Estos datos, junto con los de producción de ectoína indican que EupR juega un papel importante en el metabolismo central de *C. salexigens*, estando involucrado en el control de la asimilación de glucosa y este control podría estar regulado por la vía del gluconato.

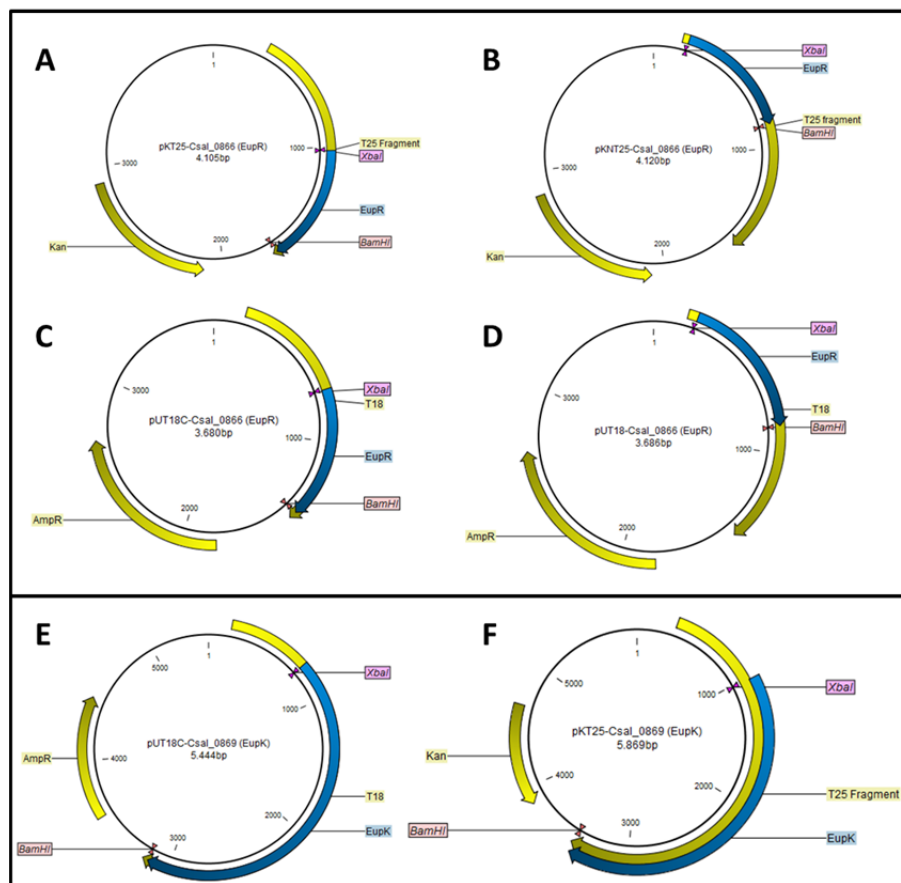
### 2.1.9. Análisis de la interacción *in vivo* entre EupK y EupR.

Los resultados anteriores muestran que EupK y EupR parecen actuar de forma conjunta sólo en algunas condiciones, por lo que es necesario demostrar que ambos forman parte del mismo sistema de dos componentes y que el sistema es funcional. Es por ello que, en primer lugar, y con el objetivo de determinar si ambas proteínas interaccionaban entre sí *in vivo* se realizó un ensayo utilizando el sistema de doble híbrido

## CAPÍTULO 1. RESULTADOS

bacteriano basado en la adenilato ciclasa (BACTH). Para ello, se construyeron fusiones génicas en las que el regulador de respuesta EupR se fusionó al fragmento T18 o T25 de la adenilato ciclasa tanto por su extremo por el extremo amino como por el extremo carbonilo, dando lugar a los plásmidos pUT18-Csal\_0866, pUT18C-Csal\_0866, pKT25-Csal\_0866 y pKNT25-Csal\_0866. Y de la misma manera para la histidina quinasa EupK, región C-terminal sin las regiones transmembrana, se fusionó en su extremo C terminal, dando lugar a los plásmidos pUT18C-Csal\_0869 y pKT25-Csal\_0869 (Figura 33).

Estos plásmidos, junto con los controles positivos pUT18C-Zip y pKT25-Zip, que contenían la cremallera de leucina de GCN4 fusionada a los extremos T25 y T18 respectivamente, y los controles negativos pUT18, pUT18C, pKT25 y pKNT25, que contenían los dominios T25 y T18 de la adenilato ciclasa no fusionados, se co-transformaron en la estirpe indicadora BTH101 (*E. coli cya-*), en distintas combinaciones tanto para detectar la posible interacción de la histidina quinasa EupK con el regulador de respuesta EupR así como la posible homodimerización de la histidina quinasa EupK (Figura 34).



**Figura 33. Mapas de las construcciones de los plásmidos diseñados para el ensayo BACTH.** Construcciones de EupR con los diferentes dominios y orientación (A) (B) (C) (D). Construcciones de EupK (E) (F).

## CAPÍTULO 1. RESULTADOS

Las distintas combinaciones se ensayaron cualitativamente mediante la siembra de gotas en los distintos medios indicadores LB+IPTG+X-Gal y MacConkey-maltosa para tener una idea preliminar y rápida de las posibles interacciones. Esto se debe a que en estos medios de cultivo las interacciones se pueden detectar pasados 1 - 4 días cuando las placas se incubaron a 30°C.

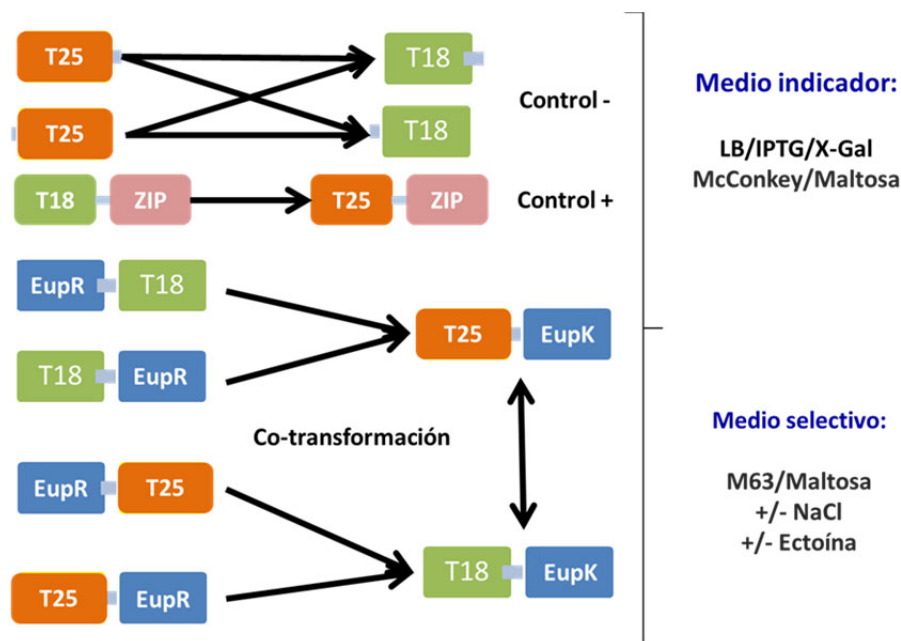
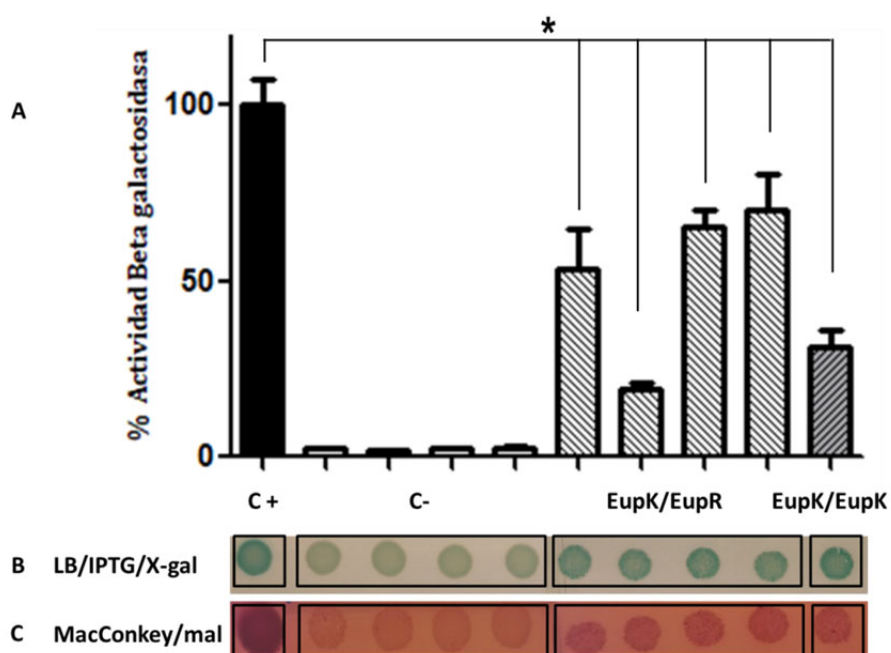


Figura 34. Esquema de las combinaciones de plásmidos analizadas en el experimento de BACTH.

Los resultados que se muestran a continuación son una selección de los resultados más representativos obtenidos en tres réplicas para cada uno de los ensayos.

Tal y como se observa en la Figura 35 B, cuando se creció en medio LB/IPTG/X-Gal, el fenotipo de interacción fue positivo tanto para el control positivo del sistema (C+) como para todas las interacciones entre EupK y EupR y también para la interacción de EupK consigo misma confirmando que la histidina quinasa dimeriza. Los controles negativos de interacción, correspondientes a las combinaciones con los dominios T25 y T18 sin fusionar, no mostraron fenotipo positivo (C-). En el medio MacConkey-maltosa (Figura 35 C), el control positivo fue muy claro, pero no así el resto de interacciones que fueron más leves. Para comprobar los resultados obtenidos, se realizaron ensayos cuantitativos de actividad  $\beta$ -galactosidasa (Figura 35 A). El ensayo confirmó lo anteriormente comprobado en las placas de medio indicador, siendo en este ensayo más evidente y observándose altos niveles de expresión, muy similares a los observados para el control positivo del sistema. El conjunto de nuestros resultados apoya fuertemente la hipótesis de que EupK y EupR forman un sistema de dos componentes como se predice de forma *in silico* y parecen también indicar los resultados anteriores.



**Figura 35. Resultados de interacción entre EupK y EupR mediante el ensayo de doble híbridos.** Las eficiencias de la complementación funcional entre proteínas híbridas se cuantificaron midiendo las actividades de β-galactosidasa en suspensiones de *E. coli* BTH101 tratadas con tolueno que albergan los plásmidos correspondientes. Los resultados se expresan en % de actividad β-galactosidasa y son la media ± desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. La significación estadística se determinó mediante la prueba t de Student ( $p < 0.01$ ).

Además, se utilizó el medio M63 como medio selectivo, para confirmar las interacciones y además intentar dilucidar los posibles estímulos implicados en la interacción de las proteínas problema. Aunque el experimento de interacción proteína-proteína en un principio no busca los estímulos que inducen la interacción, aprovechamos el hecho de que el medio M63 es un medio mínimo para analizar algunos posibles estímulos. Uno de los estímulos que se analizó fue la concentración de NaCl debido a la implicación del sistema que estamos investigando con la osmoadaptación. Para ello, se realizó un ensayo preliminar utilizando sólo los controles (positivo y negativo) con distintas concentraciones de salinidad, variando entre 0 y 5% de NaCl y con glucosa (10 mM) y maltosa (5 mM) como fuente de carbono, para elegir aquella concentración mínima que no inhibiera el crecimiento de *E. coli* y permitiera la interacción. Aunque las cepas crecieron hasta una salinidad de 1.5%, el crecimiento fue muy lento por lo que se seleccionó para los ensayos posteriores una concentración de 0,5% (datos no mostrados). Otro de los estímulos que se quiso analizar fue el efecto de la ectoína a distintas concentraciones, actuando tanto como osmoprotector (1 mM) como como fuente de carbono (10 mM). Debido a las características específicas de la cepa BTH101, en las placas en las que la ectoína se utilizaba como fuente de carbono (10 mM), se añadió también maltosa (5 mM) para permitir el crecimiento de la cepa.

## CAPÍTULO 1. RESULTADOS

Todas las placas se sembraron también mediante gotas (20  $\mu$ l) y se incubaron a 30°C durante un periodo variable de 5 a 15 días. Como podemos observar en la Figura 36, la histidina quinasa homo- dimeriza en todos los medios probados, incluso en el medio con NaCl, a pesar que en este medio el crecimiento se ve muy afectado. En cuanto a la interacción con el regulador de respuesta, en ausencia de NaCl se produce interacción en todas las condiciones, pero con 0.5% de NaCl la interacción sólo se dio cuando la ectoína estaba presente únicamente como osmoprotector (1mM).

Medios		Interacciones			
		Control +	Control -	Eupk-EupK	Eupk-EupR
M63 + 0% NaCl	Glucosa 10mM				
	Maltosa 0.2%				
	Mal 0.2% + 1mM Ect				
	Mal 0.2% + 10mM Ect				
M63 + 0.5% NaCl	Glucosa 10mM				
	Maltosa 0.2%				
	Mal 0.2% + 1mM Ect				
	Mal 0.2% + 10mM Ect				

Figura 36. Placas de selección del ensayo BACTH M63-maltosa.

### 2.1.10. El sistema EupK/EupR es un sistema de dos componentes funcional

Una vez confirmada la interacción de las dos proteínas del sistema EupK/EupR, quisimos averiguar si esta interacción era funcional, es decir que la histidina quinasa EupK era capaz de fosforilar *in vitro* al regulador de respuesta EupR. Uno de los métodos empleados para comprobar la funcionalidad de un sistema de dos componentes es realizaron experimentos de seguimiento de fosfato.

### 2.1.10.1. Identificación de los motivos variables y residuos implicados en la transferencia de fosfato en EupK y EupR.

Previamente al ensayo de transferencia de fosfato, se realizó el análisis de la secuencia proteica tanto de EupK como de EupR para comprobar la existencia de los motivos variables y residuos implicados en la transferencia de fosfato. Para ello, se siguieron las directrices establecidas por el grupo del profesor Bourret (UNC, North Carolina), en las que se definen una serie de residuos importantes de los sitios activos de los dominios principales los sistemas de dos componentes (DHP, HPT y REC) cuyas variaciones tienen efectos importantes en la cinética del fosfato (Thomas *et al.*, 2013; Immormino *et al.*, 2016; Page *et al.*, 2016). En nuestro caso, para simplificar la comprensión se utilizó la siguiente nomenclatura para identificar estos residuos variables: Se utilizó el código de aminoácidos de una letra para identificar los residuos conservados. Se empleó H para los sitios de fosforilación en los dominios DHP y HPT. En los dominios receptores (REC), se utilizó DD para los residuos ácidos que se unen al ion metálico (generalmente DD o ED), D para el sitio de fosforilación, T para el residuo conservado de Thr/Ser y K para la Lys conservada. Por último, +n hace referencia al número de residuos presentes en el lado C-terminal con respecto al residuo conservado y -n equivale al número de residuos en el lado N-terminal

Con respecto al regulador de respuesta EupR, el dominio receptor (REC) posee las huellas estructurales características, es decir una serie de cuatro residuos hidrofóbicos correspondientes a las cadenas beta 1, 3 y 4 inmediatamente C-terminal a DD, D y T. AP en D + 4 y una G en D + 8 reflejan el giro cerrado en el ciclo beta 3-alfa 3. Además, tiene la F comúnmente encontrada en K-3 y presumiblemente involucrada en interacciones con el dominio de salida. Por último, aunque las posiciones D + 2 T + 2 (H y S respectivamente) no es una combinación muy común en los dominios receptores en general, es típica en los reguladores de respuesta de la familia NarL / FixJ, a la que pertenece EupR.

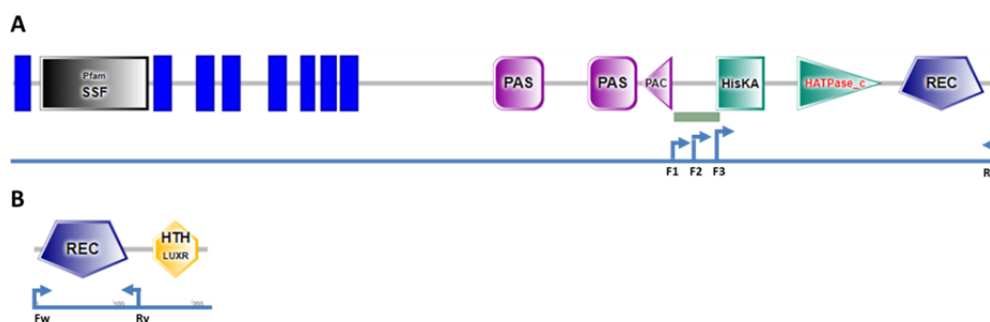
En cuanto la histidina quinasa EupK, el dominio DHP tiene una Q en H + 4 que es la que probablemente proporciona actividad de fosfatasa hacia un dominio receptor asociado. En cuanto al dominio receptor, este es más atípico ya que, a pesar de poseer una serie de cuatro residuos hidrofóbicos que corresponden a las cadenas beta 1, 3 y 4 inmediatamente C-terminal a DD, D y T, no presenta los residuos característicos de un giro cerrado en el bucle beta 3-alfa 3 y además carece del residuo Y/F encontrado en K-3 en ~ 84% de los dominios del receptor. Por otra parte, el par de residuos ácidos, a menudo seguidos por un tercer residuo ácido, se cambia en esta proteína a DNE. La D reemplazada por N en EupK generalmente forma un enlace iónico directo con el catión metálico. Por lo tanto, la unión entre el ión metálico y EupK debe ser diferente a la observada

habitualmente en los dominios receptores. El ion metálico aún podría unirse, pero este cambio podía tener efectos sobre la reactividad. En cualquier caso tanto los residuos encargados de la hidrólisis del ATP como los encargados de la fosforilación están presentes, indicando que se trataría de una histidina quinasa funcional (Kato *et al.*, 1997; Gao and Stock, 2009; Trajtenberg *et al.*, 2010).

### 2.1.10.2. Clonación, expresión y purificación de los componentes del sistema

Teniendo en cuenta los análisis anteriores, en primer lugar se procedió a la purificación de las proteínas correspondientes a cada elemento del sistema EupK/EupR. Para ello, las proteínas se expresaron de forma heteróloga en *E. coli* ya que es un método rápido y bastante eficaz de sobreproducción de proteínas. Para ello se empleó el vector de clonación pET151. Al tratarse de una producción heteróloga con todos los posibles problemas que eso conlleva, decidimos no solo eliminar las regiones transmembrana de la histidina quinasa sino también todos los dominios implicados en la detección de señales o en regulación y de ese modo eliminar posibles interferencias con la cepa hospedadora. Es por eso que, además de las regiones transmembrana, se eliminaron los dominios PAS y PAC de la histidina quinasa, pero también la región de unión a ADN (HTH) del regulador de respuesta. De este modo, las proteínas producidas sólo conservaron los dominios implicados en la transmisión del fosfato.

Una de las dificultades que nos encontramos a la hora de diseñar los oligos específicos para la histidina quinasa fue el hecho de encontrarnos con una región estructurada como una hélice súper enrollada, o coiled coil entre los dominios a eliminar, y no sabíamos si podía ser necesaria para el correcto plegamiento y por tanto funcionamiento de los dominios colindantes. Es por ello que decidimos realizar tres construcciones diferentes para la histidina quinasa (Figura 37) incluyendo o no dicha región.

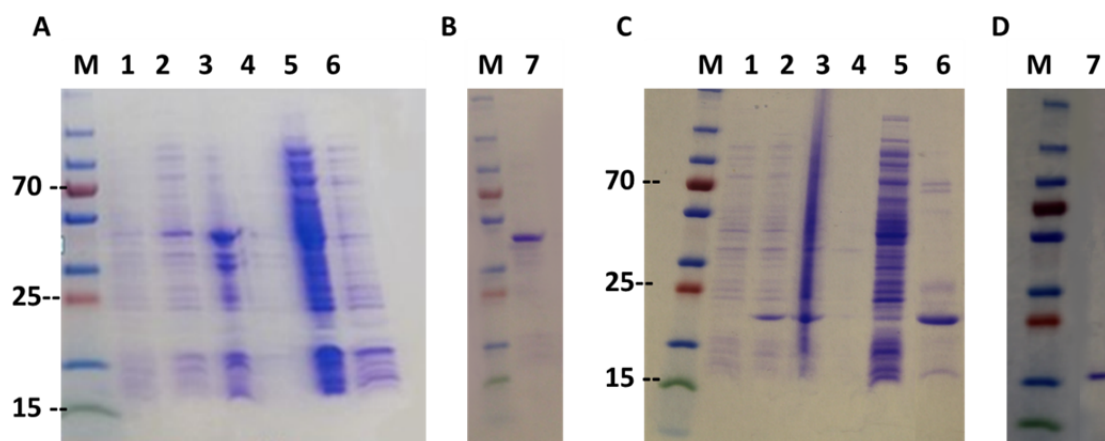


**Figura 37. Localización de los cebadores utilizados para amplificar las regiones de las proteínas EupK y EupR para su sobreexpresión heteróloga en *E. coli*.** (A) Esquema de la proteína EupK mediante el programa SMART en el que se aprecia una región súper enrollada entre los dominios PAC y HisKA representado con un recuadro verde. Se diseñaron tres oligos directos F1, F2 y F3 (representados por flechas) antes (aa 880), en medio (aa 898) y después (aa 940) de dicha región respectivamente. El cebador reverso incluía el codón de parada de la propia proteína. (B) Esquema de la proteína EupR mediante el programa SMART. El cebador directo incluía el codón de inicio del gen. En cuanto al oligo reverso, se localizó en la región entre los dos dominios (aa 130) y se incluyó un codón de de parada.



Los diferentes fragmentos amplificados de EupK (EupK-880, EupK-898 y EupK 940) así como el de EupR, se introdujeron en el vector pET 151 en pauta de lectura y permitiendo la generación de cola de 6 histidinas en posición N-terminal. Esto serviría para la purificación posterior de la proteína resultante.

Después de comprobar por secuenciación la correcta clonación de todas las construcciones génicas (pET151D TOPO-CsaI\_0869, pET151D TOPO-K880, pET151D TOPO-K940 y pET151D TOPO-CsaI\_0866 respectivamente) se introdujeron en la cepa *E. coli* BL21, y se procedió a su expresión mediante un protocolo estándar (apartado 1.9.5). La purificación de las proteínas se realizó en dos pasos cromatográficos: una columna de afinidad (Figura 38A y C) seguida de una columna de exclusión molecular (Figura 38B y D) (ver materiales y métodos). De todas las construcciones de EupK, sólo aquella en la que no estaba incluida la región coiled-coil (EupK 940) fue la que demostró una mejor purificación y es la que se muestra en la Figura 38A y B. Estos pasos de purificación fueron suficientes para obtener ambas proteínas con más de un 95% de pureza tal y como se observa en los geles de SDS PAGE teñidos con Azul de Coomassie (Figura 36B y D).



**Figura 38. Gel de acrilamida con las diferentes fracciones de la superproducción y purificación de EupK (Ay B) y EupR (C y D).** M, marcador de peso molecular en kilodaltons (kDa); 1, cultivo antes de inducir la producción; 2, cultivo tras la superproducción; 3, sedimento; 4, sobrenadante; 5, fracción no retenida en la columna; 6, fracción de elución; 7, Preparación final tras unir y concentrar todas las fracciones.

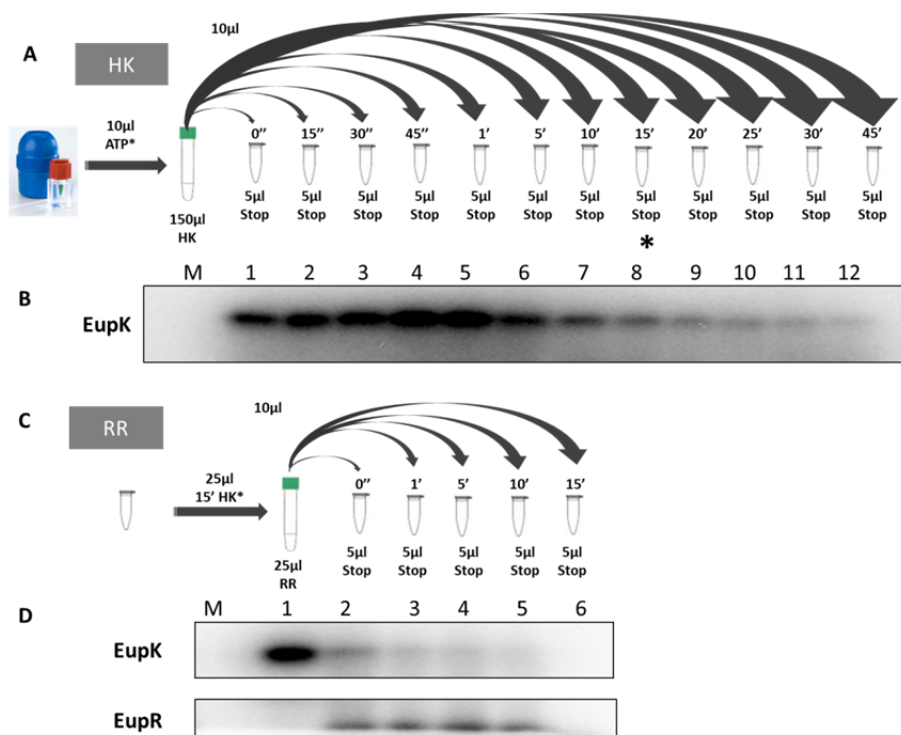
### 2.1.10.3. Autofosforilación de la histidina quinada EupK y transferencia del fosfato al regulador de respuesta EupR

Una vez purificadas las proteínas EupK y EupR, se realizaron ensayos de fosforilación *in vitro* para determinar primero, si EupK era funcional y se autofosforilaba y segundo, si EupR era fosforilada por EupK. La evaluación de la actividad autoquinasa de EupK se realizó usando la construcción EupK-940. Para el ensayo de autofosforilación (Figura 39 A), 150  $\mu$ L de la proteína purificada EupK (0.62 mg/mL) fue incubada con  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP en las condiciones de fosforilación *in vitro* que se indican en el apartado de Materiales y Métodos. Se tomaron muestras a los 0, 15", 30", 45" segundos 1', 5', 10', 15',



## CAPÍTULO 1. RESULTADOS

20', 25', 30', 45' minutos. Tras para la reacción, una alícuota de 10  $\mu$ l se cargó en un gel y los resultados se analizaron mediante SDS-PAGE y se revelaron en un Typhoon FLA 7000 (Figura 39 B). Para comprobar *in vitro* la existencia de la interacción entre EupK y el regulador EupR se realizaron ensayos de fosfotransferencia (Figura 39 C). Para ello, 100  $\mu$ L de la proteína EupK (0.62 mg / mL) fue incubada con  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP en las condiciones de fosforilación *in vitro* que se indican en el apartado de Materiales y Métodos. Tras 15 minutos de reacción, se tomaron 50  $\mu$ L de la mezcla que se incubaron con 50  $\mu$ L de la proteína purificada EupR (0.56 mg / mL). Se tomaron muestras a los 0, 1', 5', 10' y 15' minutos. Se analizaron los resultados mediante SDS-PAGE y se revelaron en un Typhoon FLA 7000. Como podemos apreciar en la Figura 39 B, la histidina quinasa EupK es una proteína funcional ya que tenemos un buen curso temporal de autofosforilación. El máximo de fosforilación se produce en el minuto 1, lo sugiere una fosforilación muy rápida, algo inusual en histidina quinasa híbridas. En cualquier caso, a los 15 minutos, que es el tiempo que hemos tomado como referencia para los ensayos de transferencia de fosfato, el nivel de fosforilación sigue siendo elevado. En cuanto a determinar si el sistema de dos componentes es funcional o no, el ensayo *in vitro* corroboró tanto dos datos *in silico* previos cómo los ensayos de doble híbrido ya que la desfosforilación de la histidina quinasa EupK se correlacionó con la aparición del regulador de respuesta EupR fosforilado, indicando una fosfotransferencia entre ambos (Figura 39 D).



**Figura 39. Estudio de autofosforilación de la histidina quinasa EupK y transmisión del fosfato al regulador de respuesta EupR.** (A) Esquema del ensayo de autofosforilación de la histidina quinasa EupK. (B)

Ensayo de autofosforilación de EupK. La HK se incubó con [ $\gamma$ 32] ATP durante 10, 15", 30", 45" segundos 1', 5', 10', 15', 20', 25', 30', 45' minutos a temperatura ambiente. Las proteínas fosforiladas se visualizaron por autorradiografía. (C) Esquema del ensayo de fosfotransferencia entre EupK (HK) y EupR (RR). (D) Capacidad de fosfotransferencia de EupK hacia EupR. La HK fosforilada (15 minutos) se incubó con el RR durante los tiempos indicados. Las bandas correspondientes están remarcadas.

## 2.2. Caracterización de otros sistemas de dos componentes que interactúan con el sistema EupK/EupR.

Tal y como parecían establecer los experimentos hasta ahora realizados, el sistema de dos componentes EupK/EupR debía formar parte de una red de regulación más compleja, interactuando de forma individual con otros sistemas de dos componentes. Es por ello que nos centramos en buscar a los otros posibles integrantes de dicha red. Decidimos hacer un análisis preliminar *in silico* de genoma de *C. salexigens* para buscar e intentar identificar a los posibles sistemas de dos componentes existentes, al ser los que con mayor probabilidad podían estar relacionados con nuestro sistema.

### 2.2.1. Sistemas de dos componentes de la bacteria *C. salexigens*

En el genoma de *C. salexigens* se identificaron 21 histidinas quinazas y 29 reguladores de respuesta (Programa p2cp) (Galperin, 2010). A fin de realizar una caracterización preliminar de las histidinas quinazas, se analizaron los distintos dominios arquitectónicos mediante el empleo de la herramienta informática SMART. Así, se asignaron a distintos grupos en base a la arquitectura de sus dominios, como puede ser su topología, su número de hélices transmembranas y la ordenación secuencial de sus dominios sensores lo que nos permitió clasificar a todas las histidinas quinazas en tres grandes grupos, independientemente de las histidinas quinazas híbridas, que se analizaron por separado (Tabla 5). Esta clasificación en la que las histidinas quinazas se agruparon de acuerdo a sus dominios sensores reflejó mejor el posible papel biológico que juegan en la comunicación entre el medioambiente y la célula (T. Mascher *et al.*, 2006a).

El primer grupo estaba constituido por las histidinas quinazas sensoras periplásmicas o extracelulares, que contienen al menos dos hélices transmembranas que normalmente están implicadas en la detección de solutos y nutrientes. El segundo grupo estaba formado por las histidinas quinazas asociadas a membrana o que contienen el mecanismo sensor asociado a la membrana o a sus hélices. Todas ellas se caracterizan por tener de 2 a 20 hélices transmembranas implicadas directamente en la percepción de estímulos como propiedades mecánicas de la envoltura celular, variaciones en gradientes iónicos o electroquímicos, procesos de transporte o presencia de compuestos que afecten a la integridad de la membrana. Por último, estarían las histidinas quinazas

CAPÍTULO 1. RESULTADOS

citoplasmáticas, que tienen el dominio sensor en el citoplasma, estén o no ancladas a la membrana. Estas detectarían solutos intracelulares o señales metabólicas (T. Mascher *et al.*, 2006a).

**Tabla 5. Análisis de los dominios arquitectónicos de las distintas histidinas quinastas de *C. salexigens*.**

Tipo de región sensora	Dominio tipo	Histidina quinasa	Esquema de los dominios arquitectónicos
Periplásmica	NarX/Q	Csal_0103 Csal_0670 Csal_1450 Csal_2086	
	NarX/Q	<u>Csal_1635</u>	
	CitA-/DucS	Csal_0700	
	VanS	Csal_0715 Csal_0728 Csal_2406 Csal_2595	
Asociada a membrana	LiaS	Csal_0631 Csal_0969 Csal_1782 Csal_2417	
	RegB-/ComD	Csal_1827	
	PutP	<u>EupK</u>	
Citoplasmática	ArcB	<u>Csal_2667</u> <u>Csal_1062</u>	
	CheA	Csal_2024	
	Cit-/Ntr-	Csal_0245 Csal_3254	

Las histidinas quinastas híbridas aparecen subrayadas.

Del mismo modo analizamos los 29 reguladores de respuesta, que se clasificaron según su dominio regulador.

**Tabla 6. Reguladores de respuesta de *C. salexigens***

Tipo	Referencia	Anotación
<b>REC only</b>		
Csal_2018	WP_011507315.1	chemotaxis protein CheY
<b>OmpR family (REC-wHTH)</b>		
Csal_0102	WP_011505412.1	response regulator
Csal_0630	WP_011505938.1	response regulator transcription factor
Csal_0669	WP_011505976.1	response regulator
Csal_0727	WP_011506034.1	response regulator
Csal_0968	WP_011506271.1	response regulator
Csal_1060	WP_011506363.1	response regulator transcription factor
Csal_1451	WP_011506750.1	response regulator transcription factor

## CAPÍTULO 1. RESULTADOS

Csal_1783	WP_011507081.1	response regulator transcription factor
Csal_2418	WP_011507711.1	response regulator
Csal_2596	WP_011507889.1	response regulator transcription factor
Csal_3253	WP_011508543.1	phosphate regulon transcriptional regulatory protein PhoB
<b>NarL family (REC-HTH)</b>		
Csal_0866	WP_011506169.1	response regulator transcription factor
Csal_2132	WP_011507429.1	UvrY/SirA/GacA family response regulator transcription factor
Csal_3030	WP_011508320.1	response regulator transcription factor
<b>NtrC family (REC-AAA-Fis)</b>		
Csal_0246	WP_011505556.1	nitrogen regulation protein NR(I)
Csal_0717	WP_011506024.1	two-component system response regulator GlrR
Csal_1063	WP_011506366.1	sigma-54-dependent Fis family transcriptional regulator
Csal_2085	WP_011507382.1	sigma-54-dependent Fis family transcriptional regulator
Csal_2407	WP_011507700.1	sigma-54-dependent Fis family transcriptional regulator
Csal_3062	WP_011508352.1	sigma-54-dependent Fis family transcriptional regulator
<b>ActR family (REC-Fis)</b>		
Csal_1826	WP_011507124.1	response regulator transcription factor
<b>AmiR family (REC-ANTAR)</b>		
Csal_0209	WP_011505519.1	ANTAR domain-containing protein
Csal_1132	WP_011506434.1	ANTAR domain-containing protein
<b>CheB family (REC-CheB)</b>		
Csal_2020	WP_011507317.1	chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase
<b>Otros</b>		
Csal_0699	WP_011506006.1	response regulator
Csal_2574	WP_011507867.1	response regulator (no more anotated)
Csal_2859	WP_011508151.1	diguanylate cyclase
Csal_3031	WP_011508321.1	response regulator transcription factor

Por otro lado la aplicación STRING 8.2 (Szklarczyk *et al.*, 2011), un programa y base de datos dedicados a la predicción de interacciones entre proteínas, incluyendo tanto interacciones físicas como funcionales, nos permitió realizar predicciones sobre asociaciones de proteínas funcionalmente relacionadas como las histidinas quinasas y sus reguladores, empleando algoritmos basados en datos sobre la cercanía de los genes que codifican las proteínas, datos bibliográficos y de fusión de genes y existencia de la asociación de proteínas ortólogas en otros genomas, entre otros.

Como paso preliminar para la descripción de los posibles sistemas de dos componentes existentes en *C. salexigens*, se realizó un análisis *in silico* para localizar a cada uno de los posibles reguladores de respuesta asociados a las histidinas quinasas. Las secuencias de las proteínas de todas las histidinas quinasas descritas en la base de datos Signal Census ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete\\_Genomes/SignalCensus.html](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/SignalCensus.html)) (Galperin, 2010) se utilizaron como entrada (“input”) en la herramienta bioinformática “STRING” para poder asociarlas con sus posibles reguladores de respuesta, en función de los distintos grados de confianza (“score”). Posteriormente, se realizó el mismo análisis, pero esta vez utilizando cada regulador de respuesta como “input”. Así, en muchos casos la

## CAPÍTULO 1. RESULTADOS

histidina quinasa se asociaba con un único regulador de respuesta, pero en otros, una misma histidina quinasa se asociaba con más de un posible regulador (Tabla 6). Por ello, en esos casos se analizó el entorno genómico de ambos genes y, si ambos estaban formando un mismo operón, ya que en cualquier caso, la presencia de un gen que codifica un regulador de respuesta en las proximidades de uno que codifica un regulador de respuesta puede reforzar la hipótesis de que se trata de su regulador de respuesta funcional (Galperin and Nikolskaya, 2007a). Además se tuvo en cuenta si el valor de la predicción era elevado (“score >0.7”). De esta forma se lograron asociar los reguladores de respuesta a sus posibles histidinas quinasa. Una vez asignadas las posibles parejas, éstas se confirmaron mediante búsqueda bibliográfica y comparación del grado de semejanza con proteínas ya caracterizadas mediante la herramienta BLAST para así poder asignar una posible función por ortología de las secuencias (Ver tabla Anexos). Todo ello nos permitió incluir a todos los sistemas de dos componentes encontrados en cinco grupos funcionales, correspondientes a procesos de osmoadaptación, metabolismo, condiciones de anaerobiosis, procesos de “quorum sensing”/quimiotaxis, y a otros procesos. Los resultados se muestran en el anexo.

Un análisis más detallado de cada grupo individual nos permitió encontrar 7 sistemas de dos componentes relacionados con procesos de osmoadaptación de los cuales cinco (Csal\_0728/Csal\_0727, Csal\_1450/Csal\_1451, Csal\_1782/Csal\_1783, Csal\_2417/Csal\_2718 y Csal\_2595/Csal\_2596) presentaron alta homología con los miembros del sistema EnvZ/OmpR, que incluye proteínas relacionadas con la detección de cambios osmóticos, y con la regulación de porinas de membrana externas del tipo OmpC y OmpF (Itou and Tanaka, 2001). De los restantes, Csal\_0631/Csal\_0630 fue homólogo al sistema FeuQ/FeuP de *Sinorhizobium meliloti* implicado en la estimulación a baja salinidad de la excreción de un glucano cíclico (Carlyon *et al.*, 2010)). El último sistema de dos componentes incluido en este grupo fue EupK/EupR, objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral.

También se encontraron sistemas de dos componentes relacionados con el metabolismo, como Csal\_0245/Csal\_0246, que presentaba alta homología con el sistema NtrBC implicado en la detección de los niveles de nitrógeno extracelulares y en la regulación de los genes implicados en el metabolismo nitrogenado (Leigh and Dodsworth, 2007), Csal\_0700/Csal\_0699, relacionado con el sistema CitAB, implicado en la utilización del citrato en condiciones de anaerobiosis (Yamamoto *et al.*, 2008), y Csal\_3254/Csal\_3253, que presentaba alta homología con el sistema PhoR/PhoB, implicado en la respuesta a la limitación de fosfato (Anba *et al.*, 1990). Otros se relacionaron con la anaerobiosis, como Csal\_1062/Csal\_2018, homólogo al sistema ArcAB

(Yaku *et al.*, 1997), y con mecanismos de “quorum sensing”/quimiotaxis, como es el caso de Csal\_0670/Csal\_0699, homólogo a BmsS/BmsR, un sistema de dos componentes relacionado con la formación de biofilms (Tomaras *et al.*, 2008), Csal\_1635/Csal\_2132, homólogo a GacS/GacA, implicado en la modulación del “quorum sensing” y con la excreción de metabolitos extracelulares (Kay *et al.*, 2006), y finalmente Csal\_2024/Csal\_2020, homólogo a CheA/CheY e implicado en quimiotaxis (Kato *et al.*, 2008). Del mismo modo, se encontraron sistemas involucrados en la resistencia al cobre como Csal\_00103/Csal\_0102 similar al sistema CopS/CopR (Munson *et al.*, 2000) o relacionados con respuesta redox, como Csal\_1827/Csal\_1826, similar al sistema RoxS/RoxR descrito en *Pseudomonas putida* (Fernández-Piñar *et al.*, 2008).

### 2.2.2. Estudio de las histidinas quinastas híbridas

Como ya se ha mencionado anteriormente las histidinas quinastas híbridas se caracterizan por poseer, además de los dominios típicos de las histidinas quinastas (dominio sensor, dominio catalítico ATPasa y el dominio de dimerización e histidina fosfotransferasa HisKA), un dominio receptor similar al presente en los reguladores de respuesta y un dominio de fosfotransferencia (HPt) que contiene un residuo de histidina conservado y que puede encontrarse formando parte del mismo péptido o como una proteína independiente (Appleby *et al.*, 1996; Laub and Goulian, 2007).

La proteína EupK es una histidina quinasta híbrida atípica al poseer un dominio REC, pero no un dominio fosfotransferasa (HPt) por lo que no podría transferir directamente el fosfato desde su dominio REC al regulador de respuesta, necesitaría de una proteína libre que hiciera el papel de fosfotransferencia. Se decidió por tanto buscar las posibles fosfotransferasas citosólicas de *C. salexigens* y para ello se analizó el genoma completo mediante homología de secuencia con la herramienta BLAST. El análisis mostró que no había ninguna proteína libre con un dominio fosfotransferasa, pero se encontraron 4 histidinas quinastas híbridas que poseían un dominio HPt además de EupK. Éstas eran las tres histidinas quinastas híbridas Csal\_1635, Csal\_2667 y Csal\_1062 y la histidina quinasta Csal\_2024 implicada en quimiotaxis y que no posee dominio REC (Figura 40). Las tres histidinas quinastas híbridos presentan un dominio REC además del dominio HPt lo que les permite ser bifuncionales, catalizando tanto la fosforilación como la desfosforilación de su regulador de respuesta asociado o bien formando parte de los sistemas de fosfotransferencia. Es por ello que nos centramos en el estudio más a fondo de estas proteínas.

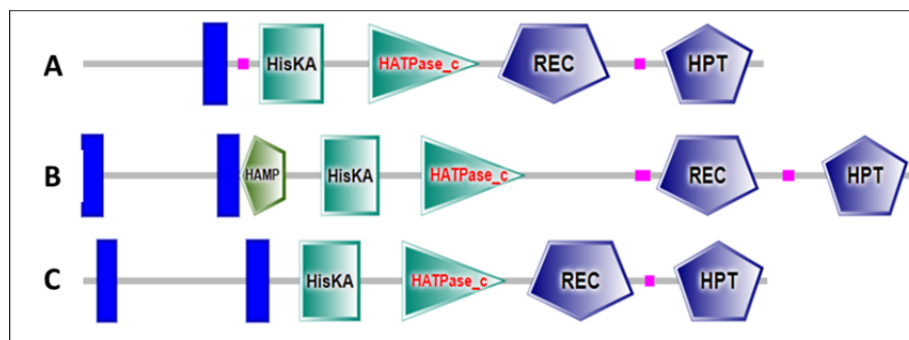


Figura 40. Distribución de los diferentes dominios según el programa SMART de las histidinas quinasa híbridas Csal\_1062 (A), Csal\_1635 (B) y Csal\_2667 (C).

### 2.2.2.1. Csal\_1062

Como se ha mencionado anteriormente, Csal\_1062 estaría relacionado con la detección de anaerobiosis y del estado redox de la bacteria, siendo homólogo a la histidina quinasa del sistema ArcA/ArcB (Yaku *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 2013).

Se llevó a cabo un análisis *in silico* de los dominios de la proteína a partir de la secuencia de aminoácidos, con la ayuda de la herramienta SMART. Los resultados indican que se trata de una histidina quinasa híbrida, los dominios HisKA y HATPase-c y un dominio REC. Además es bifuncional, pues posee un dominio Hpt en su extremo C-terminal capaz de catalizar reacciones de fosforilación y desfosforilación y posee una región transmembrana (Figura 40 A).

Un análisis más detallado de su secuencia nos reveló que se trata de una histidina quinasa híbrida típica, con una serina/treonina conservada, 4 nucleótidos aguas arriba de la histidina del dominio DHP que probablemente proporciona la actividad fosfatasa hacia un dominio receptor asociado. En cuanto al dominio receptor, tiene las firmas estructurales que se esperarían: una serie de cuatro residuos hidrofóbicos correspondientes a las cadenas beta 1, 3 y 4 inmediatamente C-terminal a DD, D y T. AP en D + 4 y una G en D + 8 reflejan el giro cerrado en el ciclo beta 3-alpha 3. Además, carece del Y/F que se suele encontrar en K-3 en ~ 84% de los dominios receptores. La posición D + 2 T + 2 se corresponde a QN, muy común en los dominios receptores de las quinasa híbridas y es probable que admitan una auto-desfosforilación razonablemente rápida. Todos los residuos más comunes de los dominios Hpt en las quinasa híbridas están presentes (Kato *et al.*, 1997; Gao and Stock, 2009; Trajtenberg *et al.*, 2010) (ver anexos).

### 2.2.2.2. Csal\_1635

Csal\_1635, a diferencia de las histidina quinasa anterior, es una histidina quinasa híbrida periplásmica de tipo NarX/Q, perteneciente a un sistema de dos componentes con alta homología al sistema GacS/GacA relacionado con la excreción de metabolitos celulares y el quorum sensing así como con la excreción de metabolitos extracelulares (Kay *et al.*, 2006). Existen muchos datos bibliográficos que apoyan que histidinas quinasa,

de tipo NarX/Q, fosforilan de forma cruzada a reguladores de respuesta de tipo NarL como sería el regulador de respuesta EupR (Huynh, Lin, *et al.*, 2015; Willett and Crosson, 2017). Del mismo modo que en el caso anterior, lo primero que se realizó fue un análisis *in silico* de los dominios de las proteínas Csal1635 a partir de la secuencia de aminoácidos, con la ayuda de la herramienta SMART (Figura 40 B). Los resultados muestran a Csal1635 como una histidina quinasa híbrida, ya que posee los dominios HisKA y HATPasa-c y un dominio REC. Además, al igual que Csal\_1062 es bifuncional, al presentar el dominio Hpt en su extremo C-terminal. Adicionalmente posee un dominio HAMP justo tras el dominio transmembrana, relacionado con la transmisión de estímulos generados en la propia membrana (Casino *et al.*, 2010b).

El análisis más detallado de su secuencia indica que al igual que en el caso anterior se trataría de una histidina quinasa híbrida típica, con una T en posición H + 4 en el dominio DHp que probablemente le proporcionaría la actividad de fosfatasa. El dominio receptor poseería la firma estructurales esperada (una serie de cuatro residuos hidrofóbicos correspondientes a las cadenas beta 1, 3 y 4 inmediatamente C-terminal a DD, D y T. AP en D + 4 y una G en D + 8 reflejan el giro cerrado en el ciclo beta 3-alpha 3). En cuanto al dominio HPT todos los residuos comunes estarían presentes excepto en H + 3 donde aparece una N en lugar de un residuo cargado positivamente (Kato *et al.*, 1997; Gao and Stock, 2009; Trajtenberg *et al.*, 2010) (ver anexos).

### 2.2.2.3. Csal\_2667

La histidina quinasa Csal\_2667 es muy similar a la histidina quinasa codificada por el gen Csal\_1062, por lo que también sería homólogo a la histidina quinasa ArcB implicada en la detección de anaerobiosis y del estado redox de la bacteria (Yaku *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 2013).

El análisis de este estudio se sus dominios mediante la herramienta informática SMART mostró que es una histidina quinasa híbrida típica, con dos dominios transmembrana, un dominio HiskA, un dominio HATPase\_c, un dominio REC y un dominio HPT (Wuichet *et al.*, 2007) (Figura 40 C).

Un análisis más detallado de su secuencia no encontró diferencias significativas con la anteriormente analizada Csal\_1062, presentando los mismos tipos de residuos, como son la T en posición H+4 del dominio DHp que proporcionaría la actividad de fosfatasa, y del mismo modo el dominio receptor que posee la firma estructural típica. (Kato *et al.*, 1997; Gao and Stock, 2009; Trajtenberg *et al.*, 2010) (Ver anexos).



### 2.2.3. Análisis de la interacción *in vivo* entre el sistema EupK/EupR y las histidinas quinisas híbridas de *C. salexigens*.

Para confirmar la posible interacción entre el sistema EupK/EupR y las histidinas quinisas híbridas se realizaron experimentos de doble híbrido o BACTH para determinar las posibles interacciones en el sistema heterólogo (*E. coli*) así como identificar algunos de los posibles estímulos implicados en dichas interacciones, como salinidad y concentración de ectoína. Previo al experimento de interacción, se construyeron fusiones génicas en las que las distintas histidinas quinisas se fusionaron al fragmento T25 o T18, siempre en las regiones C-terminal al haber eliminado todas las regiones transmembrana para evitar posibles interferencias o malos plegamientos al tratarse de una expresión heteróloga. Los plásmidos resultantes se muestran en la Figura 41. Estos plásmidos, junto con las construcciones previas de EupR y de EupK (Figura 31), los controles positivos pUT18C-Zip y pKT25-Zip y los controles negativos pUT18, pUT18C, pKT25 y pKNT25 se co-transformaron en la estirpe indicadora BTH101 (*E. coli* cya-), en distintas combinaciones tanto para detectar la posible interacción de las histidinas quinisas con el regulador de respuesta EupR así como la posible homo o hetero dimerización de las histidinas quinisas entre sí o con EupK (Figura 42).

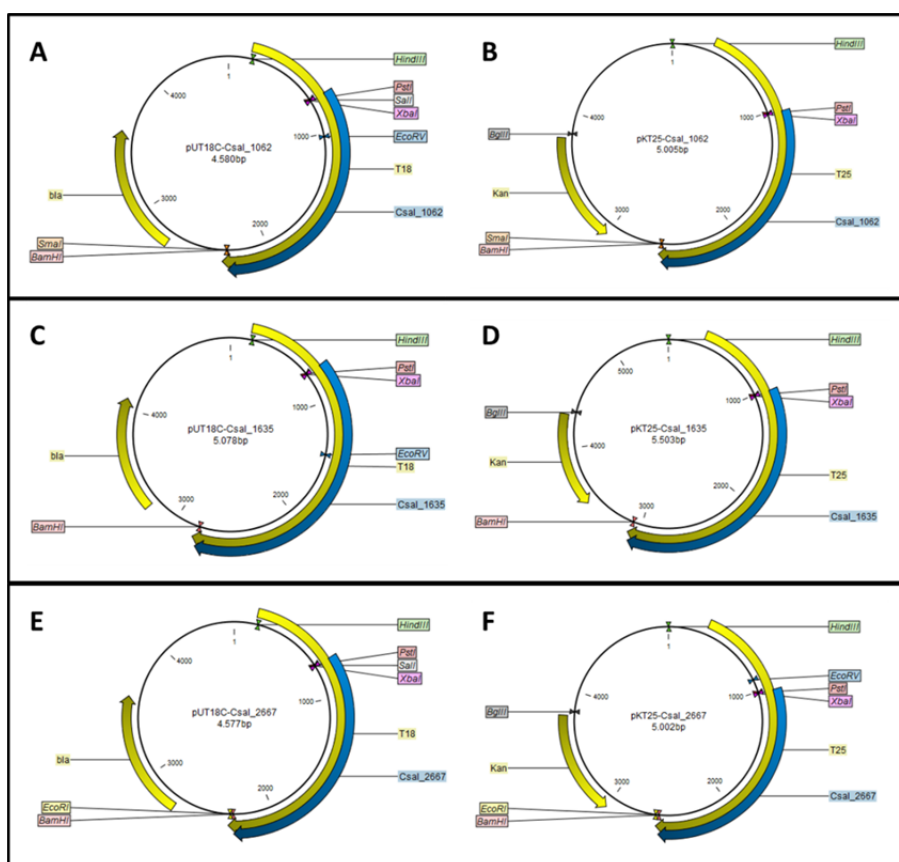


Figura 41. Mapas de las construcciones de los plásmidos diseñados para el ensayo BACTH. Construcciones de CsaI\_1062 (A) (B), CsaI\_1635 (C) (D) y CsaI\_2667 (E) (F).

CAPÍTULO 1. RESULTADOS

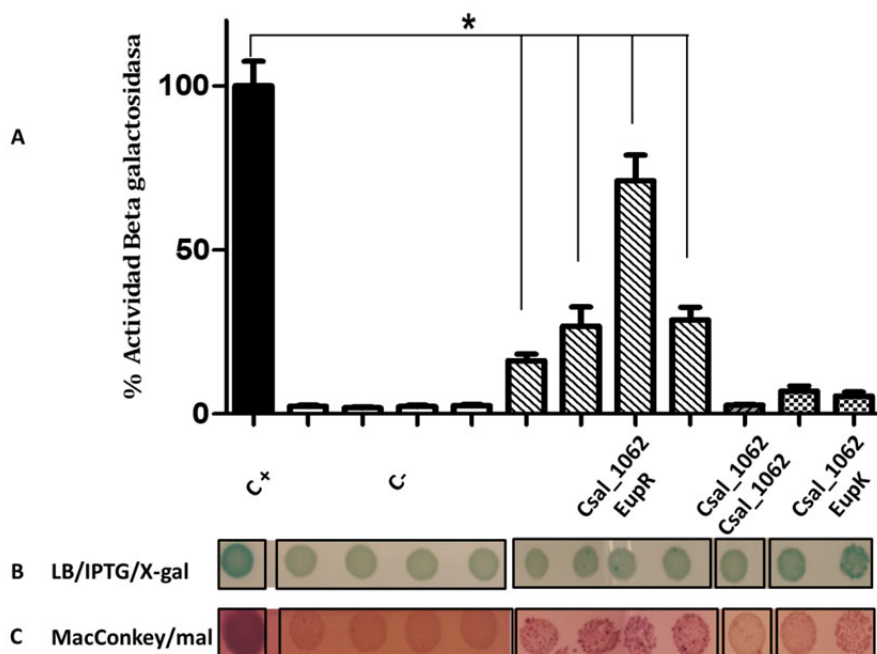
pUT18 pKT25	pUT18 pKNT25	pUT18C pKT25	pUT18C pKNT25	pKT25-Zip pUT18C-Zip		
pUT18-0866 pKT25-1062	pUT18C-0866 pKT25-1062	pKT25-0866 pUT18C-1062	pKNT25-0866 pUT18C-1062	pUT18C-1062 pKT25-1062	pUT18C-0869 pKT25-1062	pKT25-0869 pUT18C-1062
pUT18-0866 pKT25-1635	pUT18C-0866 pKT25-1635	pKT25-0866 pUT18C-1635	pKNT25-0866 pUT18C-1635	pUT18C-1635 pKT25-1635	pUT18C-0869 pKT25-1635	pKT25-0869 pUT18C-1635
pUT18-0866 pKT25-2667	pUT18C-0866 pKT25-2667	pKT25-0866 pUT18C-2667	pKNT25-0866 pUT18C-2667	pUT18C-2667 pKT25-2667	pUT18C-0869 pKT25-2667	pKT25-0869 pUT18C-2667

**Figura 42. Combinaciones de plásmidos testadas en el experimento de interacción proteína-proteína con las histidinas quinasa híbridas.** En rojo losos controles negativos, en verde el control positivo en naranja las interacciones con el regulador de respuesta EupR, en azul las interacciones entre histidinas quinasa (homodímeros) y en violeta las interacciones entre histidinas quinasa (heterodímeros).

pUT18 pKT25	pUT18 pKNT25	pUT18C pKT25	pUT18C pKNT25	pKT25-Zip pUT18C-Zip		
pUT18-0866 pKT25-1062	pUT18C-0866 pKT25-1062	pKT25-0866 pUT18C-1062	pKNT25-0866 pUT18C-1062	pUT18C-1062 pKT25-1062	pUT18C-0869 pKT25-1062	pKT25-0869 pUT18C-1062
pUT18-0866 pKT25-1635	pUT18C-0866 pKT25-1635	pKT25-0866 pUT18C-1635	pKNT25-0866 pUT18C-1635	pUT18C-1635 pKT25-1635	pUT18C-0869 pKT25-1635	pKT25-0869 pUT18C-1635

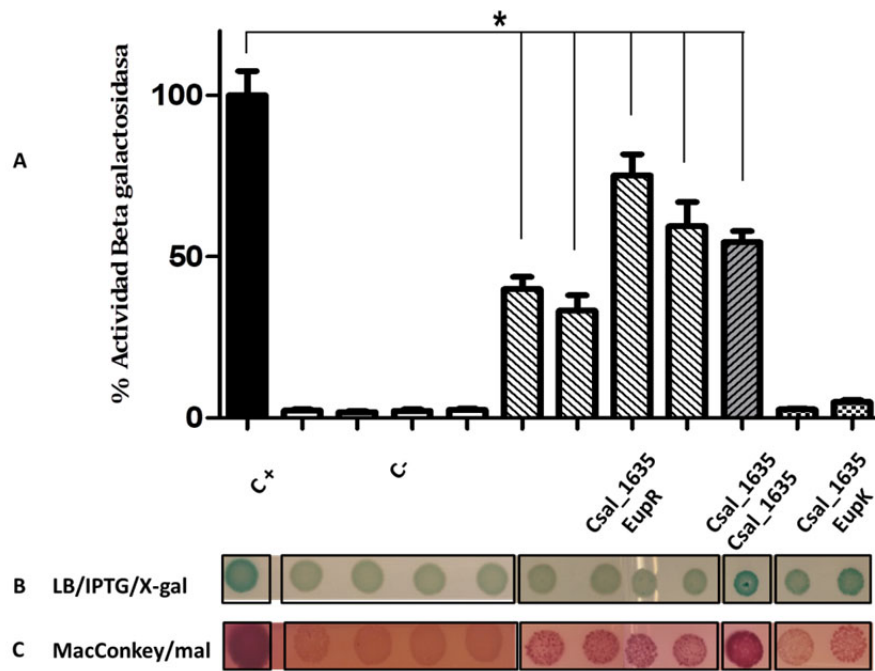
Para identificar de forma preliminar las posibles interacciones in vivo, se realizó una co-transformación de los distintos plásmidos fusionados en una cepa informadora (*E. coli* BTH101). Las distintas combinaciones se ensayaron cualitativamente mediante la siembra de gotas en los distintos medios indicadores LB+IPTG+X-Gal y MacConkey-maltosa para tener una idea preliminar y rápida de las posibles interacciones. Los resultados se observaron tras 1-4 días incubados a 30°C. Los resultados que se muestran a continuación son una selección de los resultados más representativos obtenidos en tres réplicas para cada uno de los distintos ensayos. Para comprobar los resultados obtenidos, se realizaron ensayos cuantitativos de actividad β-galactosidasa (Figura 43 A). Como se puede observar en la Figura 43, los resultados demuestran que existe una interacción entre el regulador de respuesta EupR y la histidina quinasa Csal\_1062 en todos los casos testados, pero no se observa interacción entre la propia histidina quinasa

(homodimerización) ni entre las dos histidina quinasa, EupK y Csal\_1062 (no produce heterodímeros).



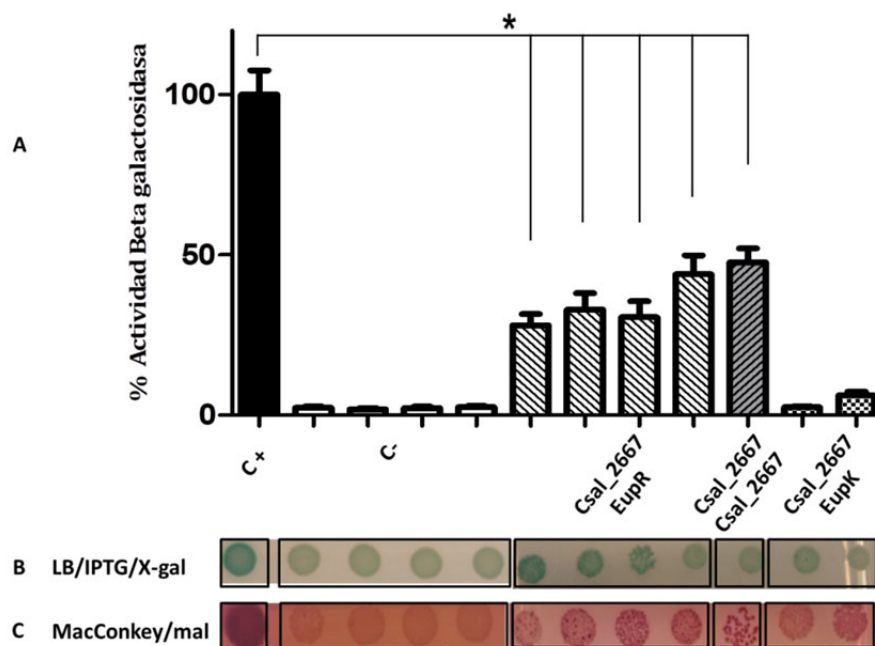
**Figura 43. Resultados de interacción entre Csal\_1062, EupR y EupK mediante el ensayo de doble híbridos.** Las eficiencias de la complementación funcional entre proteínas híbridas se cuantificaron midiendo las actividades de  $\beta$ -galactosidasa en suspensiones de *E. coli* BTH101 tratadas con tolueno que albergan los plásmidos correspondientes. Los resultados se expresan en %de actividad  $\beta$ -galactosidasa y son la media  $\pm$  desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. La significación estadística se determinó mediante la prueba t de Student ( $p < 0.01$ ).

Del mismo modo, en el caso de la histidina quinasa Csal1635, observamos en la Figura 44, que existe de nuevo una interacción con el regulador de respuesta EupR en todos los casos testados, y volvemos a no observar interacción entre las dos histidina quinasa, EupK y Csal\_1635 (no produce heterodímeros). Por lo contrario, sí que existe una clara interacción entre las dos construcciones de la propia histidina quinasa Csal\_1635, por lo que sí que produciría homodímeros.



**Figura 44. Resultados de interacción entre Csal\_1635, EupR y EupK mediante el ensayo de doble híbridos.** Las eficiencias de la complementación funcional entre proteínas híbridas se cuantificaron midiendo las actividades de  $\beta$ -galactosidasa en suspensiones de *E. coli* BTH101 tratadas con tolueno que albergan los plásmidos correspondientes. Los resultados se expresan en %de actividad  $\beta$ -galactosidasa y son la media  $\pm$  desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. La significación estadística se determinó mediante la prueba t de Student ( $p < 0.01$ ).

Ya por último, en el caso de la histidina quinasa Csal\_2667, los resultados obtenidos (Figura 45) son muy similares a los obtenidos en el caso de la histidina quinasa Csal\_1635, produciéndose una interacción en todos los casos con el regulador de respuesta EupR, no existiendo heterodímeros con la histidina quinasa EupK, pero si homodímeros entre las dos construcciones de Csal\_2667.



**Figura 45. Resultados de interacción Csal\_2667, EupR y EupK mediante el ensayo de doble híbridos.** Las eficiencias de la complementación funcional entre proteínas híbridas se cuantificaron midiendo las actividades de  $\beta$ -galactosidasa en suspensiones de *E. coli* BTH101 tratadas con tolueno que albergan los plásmidos correspondientes. Los resultados se expresan en %de actividad  $\beta$ -galactosidasa y son la media  $\pm$  desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. La significación estadística se determinó mediante la prueba t de Student ( $p < 0.01$ ).

Del mismo modo que en el experimento de interacción entre EupR y EupK, utilizamos el medio M63 como medio selectivo, para confirmar las interacciones y a la vez dilucidar los posibles estímulos implicados en la interacción de las proteínas problema, probando los mismos estímulos que en el caso anterior, es decir 0 o 0.5% de NaCl para probar la salinidad y dos concentraciones de ectoína, 1mM (uso como osmoprotector) o 10 mM (uso como fuente de carbono). Debido a las características específicas de la cepa BTH101, en las placas con ectoína se añadió también maltosa para permitir el crecimiento de la cepa. Todas las placas se sembraron también mediante gotas y se incubaron a 30°C durante un periodo variable de 5 a 15 días. Como podemos observar en la Figura 46, los experimentos en medio mínimo confirman la interacción entre el regulador de respuesta EupR y la histidina quinasa híbrida Csal\_1062, así como la no formación de heretodímeros con la histidina quinasa híbrida EupK en todos los caso testados independientemente de la salinidad o la presencia de ectoína. Por lo contrario, en los ensayos con medio mínimo sí que observamos dimerización consigo mismo, es decir que se producirían homodímeros. En este caso, los homodímeros estarían condicionados a la presencia de ectoína en el medio, sobre todo en presencia de sal. Este hecho puede ser el motivo de los resultados negativos en medios indicadores.

Medios		Interacciones				
		Control +	Control -	Csal_1062 EupR	Csal_1062 Csal_1062	Csal_1062 EupK
M63 + 0%NaCl	Glucosa 10 mM					
	Maltosa 0.2%					
	Maltosa 0.2% +1mM Ectoína					
	Maltosa 0.2% +10m M Ectoína					
M63 + 0.5% NaCl	Glucosa 10 mM					
	Maltosa 0.2%					
	Maltosa 0.2% +1mM Ectoína					
	Maltosa 0.2% +10m M Ectoína					

**Figura 46. Resultados del ensayo de interacción proteína-proteína de Csal\_1062 en las distintas condiciones del medio mínimo M63.** Las celdas en color blanco, en las filas de los medios adicionados de glucosa, representan un control global que da validez al resto del ensayo en M63. Las celdas en color rojo indican resultados negativos (ausencia de crecimiento), mientras que las celdas verdes muestran resultados positivos (crecimiento).

En cuanto a la histidina quinasa híbrida Csal\_1635 los resultados corroboran los obtenidos anteriormente en los medios indicadores, sugiriendo la no interacción con EupK en ninguna de las condiciones ensayadas (Figura 47). Además, también se corroboró la interacción entre el regulador de respuesta EupR y Csal\_1635, pero únicamente en condiciones de baja salinidad, independientemente de la concentración de ectoína en el medio. Con respecto al ensayo de homodimerización, se aprecia crecimiento en todas las condiciones estudiadas en ausencia de NaCl, independientemente de la presencia o no de ectoína en el medio externo, sin embargo, en presencia de NaCl sólo se observa crecimiento cuando la ectoína está presente en el medio, sugiriendo que a elevada salinidad, el estímulo que desencadena la homodimerización podría ser la presencia de ectoína, independientemente de su concentración.



Medios		Interacciones				
		Control +	Control -	Csal_1635 EupR	Csal_1635 Csal_1635	Csal_1635 EupK
M63 + 0%NaCl	Glucosa 10 mM					
	Maltosa 0.2%					
	Maltosa 0.2% +1mM Ectoína					
	Maltosa 0.2% +10m M Ectoína					
M63 + 0.5% NaCl	Glucosa 10 mM					
	Maltosa 0.2%					
	Maltosa 0.2% +1mM Ectoína					
	Maltosa 0.2% +10m M Ectoína					

**Figura 47. Resultados del ensayo de interacción proteína-proteína de Csal\_1635 en las distintas condiciones del medio mínimo M63.** Las celdas en color blanco, en las filas de los medios adicionados de glucosa, representan un control global que da validez al resto del ensayo en M63. Las celdas en color rojo indican resultados negativos (ausencia de crecimiento), mientras que las celdas verdes muestran resultados positivos (crecimiento).

Por último, con respecto a la histidina quinasa híbrida Csal\_2667, los resultados de los experimentos en medio mínimo M63 sugieren que en ausencia de sal (0% NaCl) Csal\_2667 interaccionaría tanto con el regulador de respuesta EupR, la histidina quinasa EupK y con ella misma siempre y cuando la ectoína esté presente como fuente de carbono (10 mM). En presencia de sal, esta interacciones se mantendrían excepto con el regulador de respuesta, pero únicamente cuando la concentración de ectoína es menor (1 mM) y actuaría como osmoprotector (Figura 48).

Medios		Interacciones				
		Control +	Control -	Csal_2667 EupR	Csal_2667 Csal_2667	Csal_2667 EupK
M63 + 0%NaCl	Glucosa 10 mM					
	Maltosa 0.2%					
	Maltosa 0.2% +1mM Ectoína					
	Maltosa 0.2% +10m M Ectoína					
M63 + 0.5% NaCl	Glucosa 10 mM					
	Maltosa 0.2%					
	Maltosa 0.2% +1mM Ectoína					
	Maltosa 0.2% +10m M Ectoína					

Figura 48. Resultados del ensayo de interacción proteína-proteína de Csal\_2667 en las distintas condiciones del medio mínimo M63. Las celdas en color blanco, en las filas de los medios adicionados de glucosa, representan un control global que da validez al resto del ensayo en M63. Las celdas en color rojo indican resultados negativos (ausencia de crecimiento), mientras que las celdas verdes muestran resultados positivos (crecimiento).

#### 2.2.4. Funcionalidad de las interacciones entre EupR y las histidina quinasa híbridas Csal1062, Csal1635, Csal2667

Demostrada la interacción entre las histidinas quinasa híbridas y el regulador de respuesta EupR, decidimos verificar que dichas interacciones eran funcionales, es decir, que la histidina quinasa correspondiente fosforilaba al regulador de respuesta. Para ello se realizaron experimentos de seguimiento de fosfato similares a los realizados en el apartado 2.1.10.

Del mismo modo que con el regulador de respuesta EupR y la histidina quinasa EupK, nos decantamos por la producción de las proteínas de forma heteróloga en *E. coli* empleando el vector de clonación pET151. De igual forma, decidimos no solo eliminar las

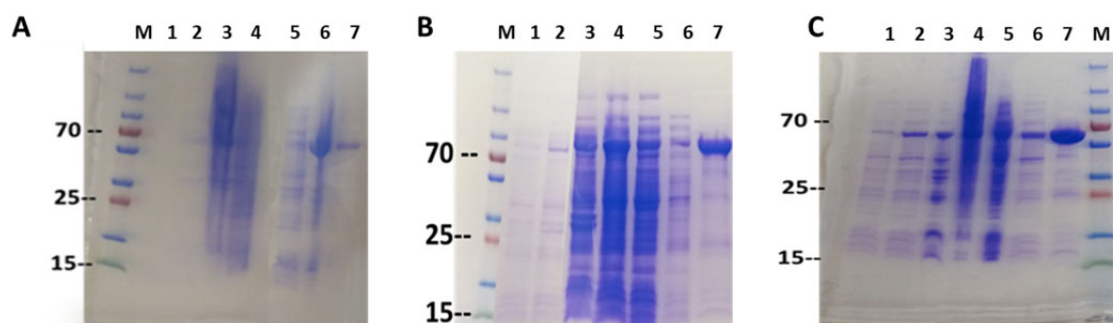


## CAPÍTULO 1. RESULTADOS

regiones transmembrana de las histidinas quinasa sino también todos los dominios implicados en la detección de señales o en regulación y de ese modo eliminar posibles interferencias con la cepa hospedadora, dejando únicamente los dominios implicados en la transmisión del fosfato. Es por ello que la histidina quinasa Csal\_1062 se truncó tras las regiones transmembrana, a partir del aminoácido 167; la histidina quinasa Csal\_1635 se truncó tras del dominio HAMP, a partir del aminoácido 250 y la histidina quinasa Csal\_2667 se truncó tras las regiones transmembrana, a partir del aminoácido 215.

Los insertos amplificados que contenía las secuencias de ADN de las construcciones de tres histidinas quinasa se introdujeron en el vector pET 151 en pauta de lectura con una cola de 6 histidinas en posición N-terminal necesarias para la posterior purificación de la proteína resultante. Después de comprobar por secuenciación todas las construcciones génicas (pET151D TOPO-Csal\_1062, pET151D TOPO-Csal\_1635 y pET151D TOPO-Csal\_2667), éstas se introdujeron en la cepa *E. coli* BL21, y se procedió a la expresión de las proteínas mediante un protocolo estándar (apartado 1.9.5.).

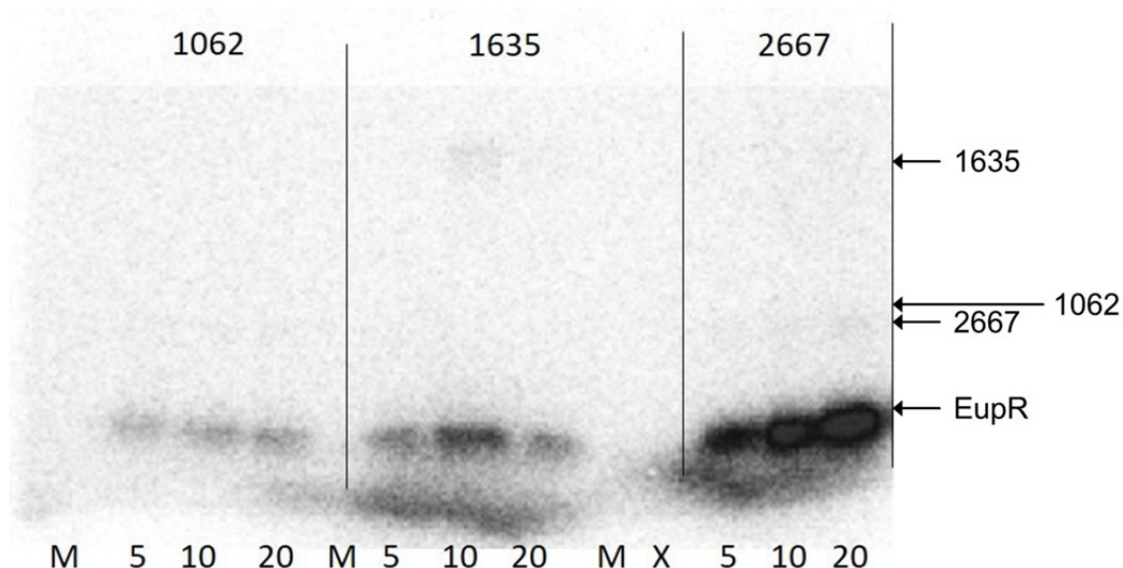
Del mismo modo que en el apartado 2.1.10.1., la purificación de las distintas proteínas se realizó en dos pasos cromatográficos: una columna de afinidad seguida de una columna de exclusión molecular (ver materiales y métodos). Estos pasos de purificación fueron suficientes para obtener las proteínas con una pureza cercana al 95% según geles de SDS PAGE teñidos con Azul de Coomasie (Figura 49).



**Figura 49. Gel de acrilamida con las diferentes fracciones de la superproducción y purificación de Csal\_1062 (A), Csal\_1635 (B) y Csal\_2667 (C).** M, marcador de peso molecular en kilodaltons (kDa); 1, cultivo antes de inducir la producción; 2, cultivo tras la superproducción; 3, sedimento; 4, sobrenadante; 5, fracción no retenida en la columna; 6, fracción de elución; 7, Preparación final tras unir y concentrar todas las fracciones.

Una vez purificadas las proteínas, se realizaron en primer lugar ensayos de fosforilación in vitro para determinar si las histidinas quinasa eran funcionales y se autofosforilaban y en segundo lugar, se realizaron ensayos de transmisión de fosfato para ver si EupR era fosforilada por ellas. Como podemos apreciar en la Figura 50, todas las histidinas quinasa híbridas son funcionales y fosforilan al regulador de respuesta EupR que aparece al final del gel. La eficiencia en la fosforilación depende mucho de la histidina quinasa implicada, viéndose en este caso una mayor eficiencia en el caso de la histidina

quinasa Csal\_1635 a los 10 minutos. Sin embargo, se observa que la histidina quinasa Csal\_2667 tiene mucha mayor eficiencia a los 20 minutos de incubación. En cualquier caso, estos datos corroboran los anteriormente obtenidos de interacción *in vivo* entre las histidinas quinasa híbridas y el regulador de respuesta EupR, sugiriendo que formarían parte de una posible red de regulación compleja de tipo “many to one”.



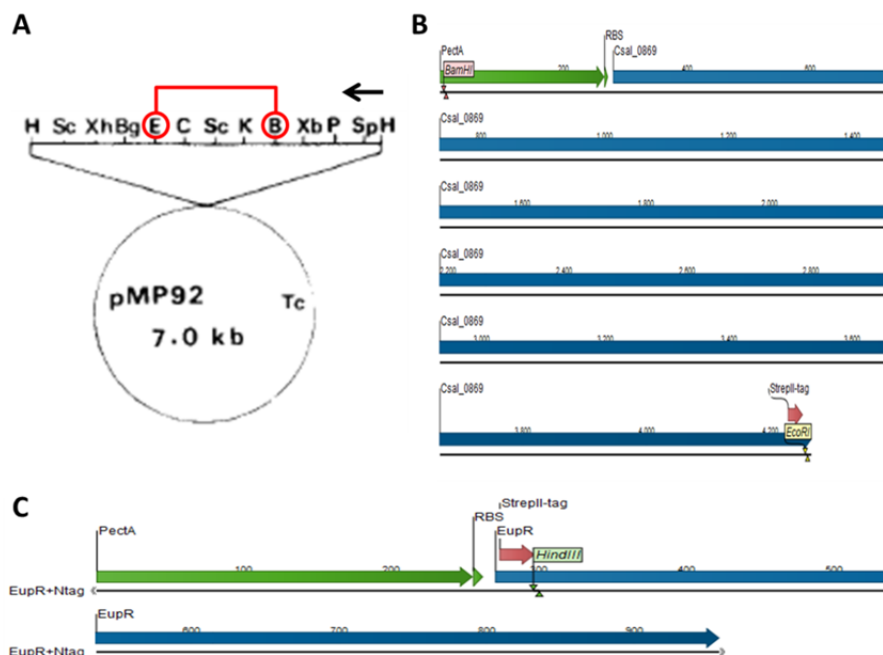
**Figura 50. Experimentos de autofosforilación de las histidinas quinasa híbridas y transmisión del fosfato al regulador de respuesta EupR.** Se indican con flechas las distintas proteínas, Csal\_1062 de 58KDa; Csal\_1635 de 74 KDa; Csal\_2667 de 56 KDa y EupR de 14KDa. M es el marcador de peso molecular, X es un carril en blanco y los tiempos de incubación están en minutos.

### 2.2.5. Ensayos de interacción *in vivo* proteína-proteína en *Chromohalobacter salexigens*

Todos los experimentos realizados hasta ahora han sido mediante expresión heteróloga en *E. coli*, ya sea mediante la producción de proteínas híbridas en los experimentos de BACTH o bien producción de proteínas a mayor escala. Es por eso que decidimos poner a punto estudios de interacción *in vivo* en la bacteria *C. salexigens*. Para ello empleamos, tanto técnicas de “Membrane-SPINE” como de co-inmunoprecipitación a fin de corroborar estos resultados obtenidos anteriormente.

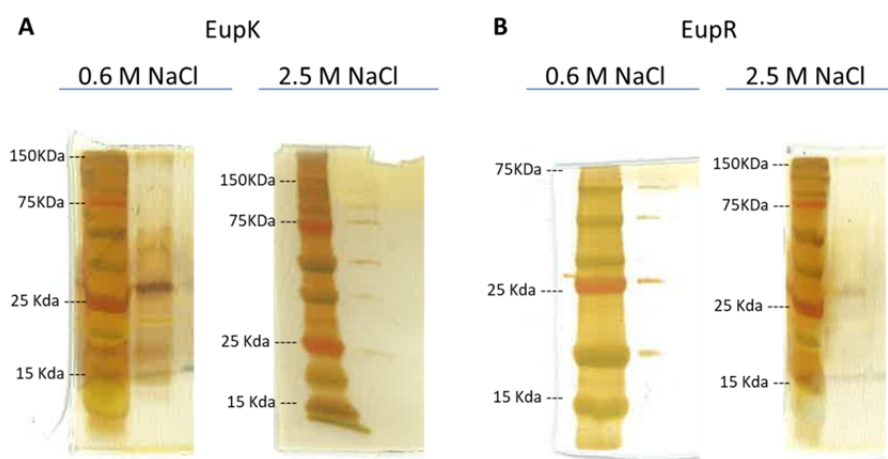
Los plásmidos derivados de las distintas construcciones (Figura 51) se introdujeron en una cepa silvestre de *C. salexigens* mediante conjugación triparental y las cepas resultantes se cultivaron tanto a baja (0,6 M NaCl) como a elevada salinidad (2,5 NaCl) en medio mínimo M63 con ectoína como única fuente de carbono, a 37°C y 200 rpm. Una vez alcanzada la mitad de la fase exponencial, se fijaron las interacciones proteína-proteína mediante formaldehído y seguidamente se purificaron las proteína de membrana

siguiendo el protocolo establecido por Müller y colaboradores (Müller *et al.*, 2011) (Ver apartado 2.11.2 de Materiales y Métodos).



**Figura 51. Estudio de interacción proteína-proteína en *C. salexigens*.** (A) plásmido pMP92 con el MCS. En rojo, los dos sitios de enzimas de restricción se usan para la construcción. (B) Construcción utilizada para la sobreproducción de la histidina quinasa transmembrana EupK (C) Construcción utilizada para la sobreproducción del regulador de respuesta EupR. El promotor PectA se usó como un promotor semi-constitutivo y osmoregulado. También se agregó una etiqueta Strep (WSHPQFEK) en la región N terminal. Los sitios de restricción de BamHI y EcoRI se agregaron para la clonación en el plásmido pMP92.

Los resultados preliminares muestran unas bandas correspondientes a posibles proteínas que interaccionan con el sistema EupK/EupR (Figura 52 A y B) y que podrían formar parte de la red de regulación cruzada. Estas proteínas están siendo identificadas actualmente.



**Figura 52. Ensayos de interacción *in vivo* proteína-proteína en *Chromohalobacter salexigens*.** Resultados preliminares empleando EupK (A) o EupR (B) como proteína de cebo, tanto a baja salinidad (0,6 M de NaCl) como a elevada salinidad (2,5 M NaCl) en medio mínimo M63 con 20 mM de glucosa como fuente de carbono. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE. Los carriles representan las fracciones de elución y hervidas (el hervido revierte los enlaces entre proteínas producidos por el formaldehído). La visualización se realizó mediante tinción de plata.

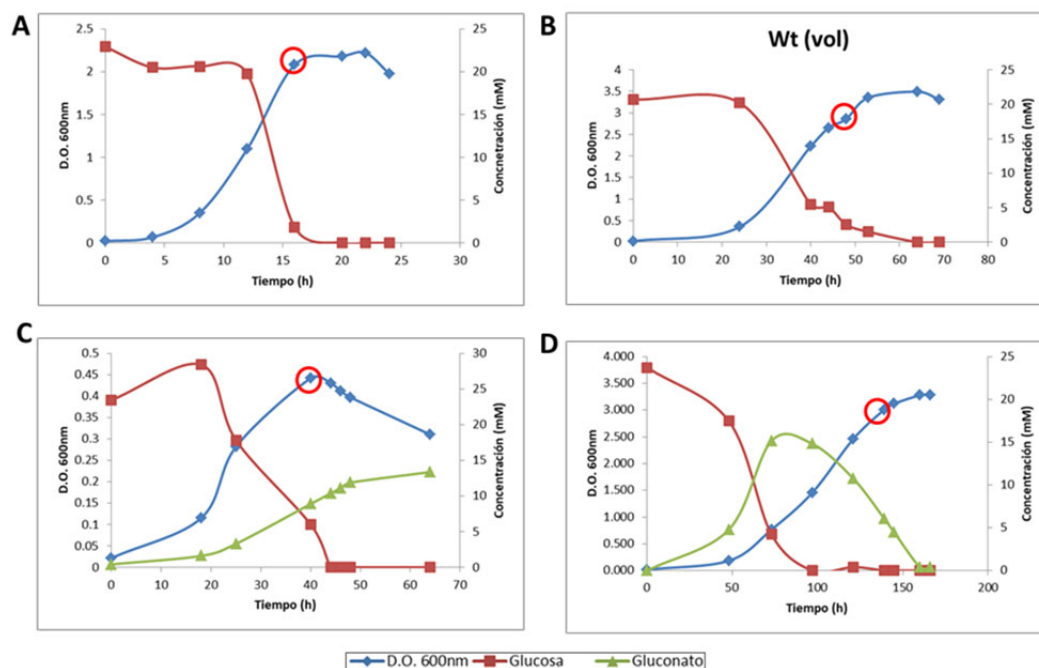
## **2.3. Transcriptoma diferencial del mutante *eupR* en respuesta a salinidad.**

Debido a los resultados anteriores, parece ser que *eupR* desempeña un papel regulador clave en el metabolismo central de *C. salexigens*, ya que está involucrado tanto en el control del metabolismo de la glucosa como en el de la ectoína dependiendo de la salinidad. Es por ello que decidimos hacer un análisis global de dicho regulador. Para ello se obtuvo el regulón de EupR mediante secuenciación masiva por Illumina para hacer un análisis diferencial del transcriptoma con respecto a la cepa silvestre a 0,6 M y 2,5 M de NaCl.

### **2.3.1. Obtención de las muestras**

Con la idea de asegurar la reproducibilidad entre los distintos experimentos de análisis multiómicos del grupo y permitir su posterior comparación e incorporación de los datos a un posible modelo de regulación, todas las muestras se recogieron en el mismo punto de la fase exponencial de crecimiento, respetando el estado metabólico de las distintas cepas.

Con el fin de estudiar las diferencias de expresión génica entre los distintos grupos de muestras, Wt (Controles), y EupR, se cultivaron las distintas cepas (CHR 61 y CHR 183) en medio mínimo M63 a baja salinidad (NaCl 0,6 M a 37 °C) y elevada salinidad (NaCl 2,5 M a 37 °C). En la Figura 53 se indican las densidades ópticas (D.O.) y el tiempo en el que fueron recogidas las muestras. Se seleccionaron dichas D.O. por ser aquellos puntos en el crecimiento en el que las células todavía se encontraban en fase exponencial, y en el que se podía recoger mayor biomasa, facilitando con ello la obtención de cantidad suficiente de ARN para la correcta medición en la plataforma de análisis global. Además, es importante señalar que en dicho punto del crecimiento, aunque en la cepa CHR 183 ya no se detectó glucosa extracelular, se detectó gluconato, por lo que se sigue considerando que el estado metabólico es similar al de la cepa silvestre debido a los estudios realizados por Pastor y colaboradores (José M. Pastor *et al.*, 2013).



**Figura 53. Monitorización del estado metabólico de las muestras tomadas para el análisis transcriptómico.** Medidas de glucosa extracelular (línea roja), densidad óptica (línea azul), gluconato extracelular (línea verde y puntos de recogida de muestra (círculos rojos) para el análisis de transcriptómica a 37 °C con 0,6 M NaCl para la cepa silvestre (A) o el mutante EupR (C) y a 37 °C con 2,5 M NaCl para la cepa silvestre (B) y el mutante EupR (D).

### 2.3.2. Obtención del ARNm libre de ARNr

Para analizar la expresión diferencial del mutante eupR frente a la cepa silvestres se secuenció el ARN mensajero libre de ARN ribosómico extraídas de 3 ml de los cultivos anteriormente mencionados.

Una vez que se extrajo el ARN y se eliminó el ADN asociado (ver m y m), se cuantificó el ARN total por Nanodrop y se evaluó su calidad por electroforesis capilar de microfluidos en nanochip de Bioanalyzer (Figura 54). Obtuvimos muestras con unas concentraciones entre 304 y 1079.5 ng/μl con un valor de RIN entre 7.2 y 9,1. En todos los casos, los perfiles indicaron que no había degradación

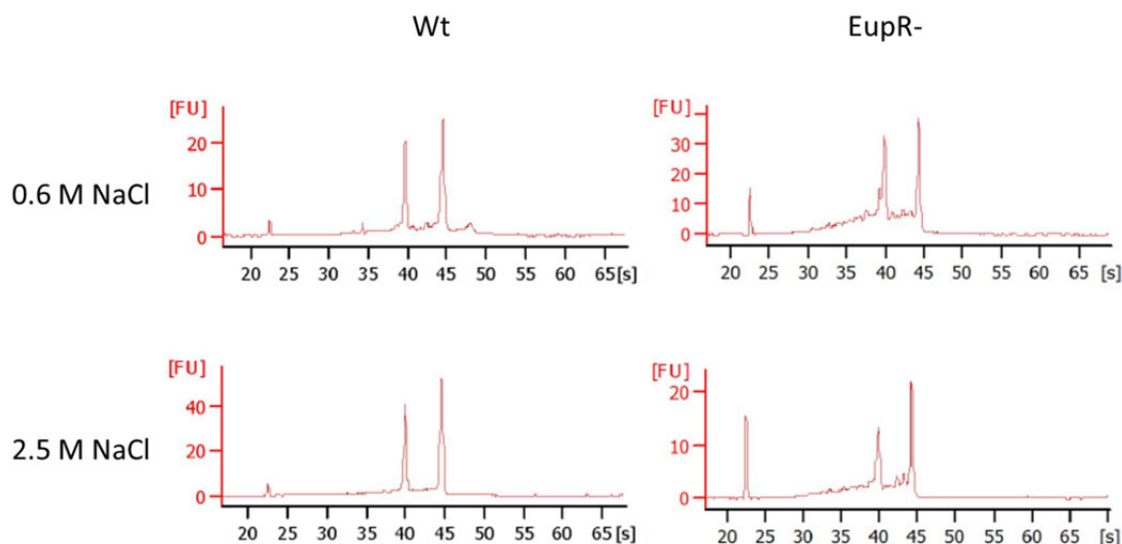


Figura 54. Análisis de la calidad del ARN total mediante electroforesis capilar. Perfiles promedio de ARN total en nanochip de BioAnalyzer (Agilent) para la cepa silvestre y el mutante EupR a 0,6 M NaCl y 37 °C y 2,5 M NaCl y 37 °C.

Para la obtención del ARN mensajero (ARNm) a partir de las muestras de ARN total, se utilizaron de forma secuencial dos kits diferentes para eliminar el ARN ribosómico (ARNr) en un 99 % (ver material y métodos). Tras los dos pasos, se evaluaron los perfiles de los ARNm obtenidos usando Agilent RNA 6000 pico kit (Figura 55) y se cuantificaron por fluorimetría.

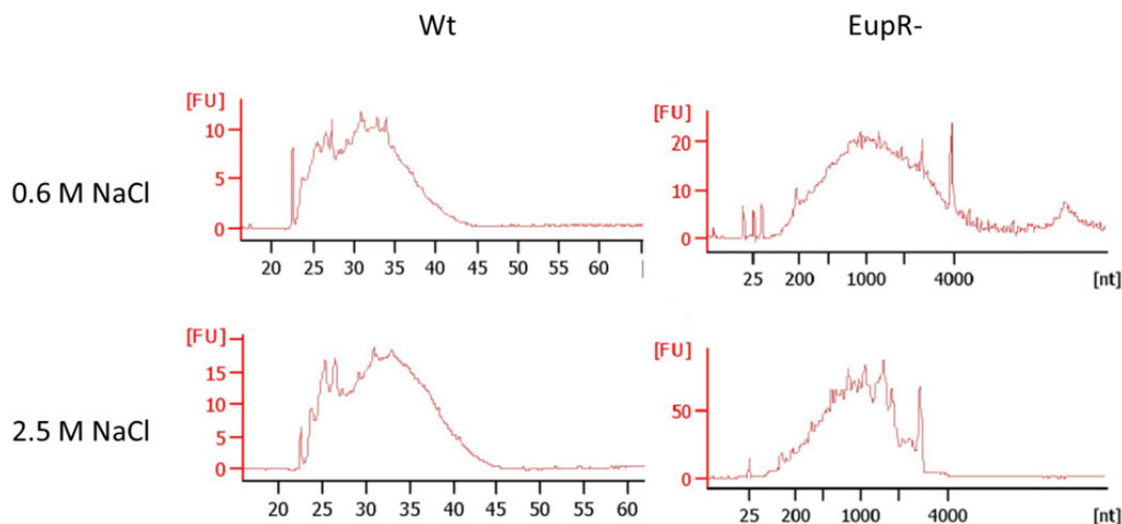


Figura 55. Perfiles promedio en picochip de BioAnalyzer (Agilent) obtenidos tras la eliminación total del ARN ribosómico 23 y 16 S para la cepa silvestre y el mutante EupR a 0,6 M NaCl y 37 °C y 2,5 M NaCl y 37 °C.

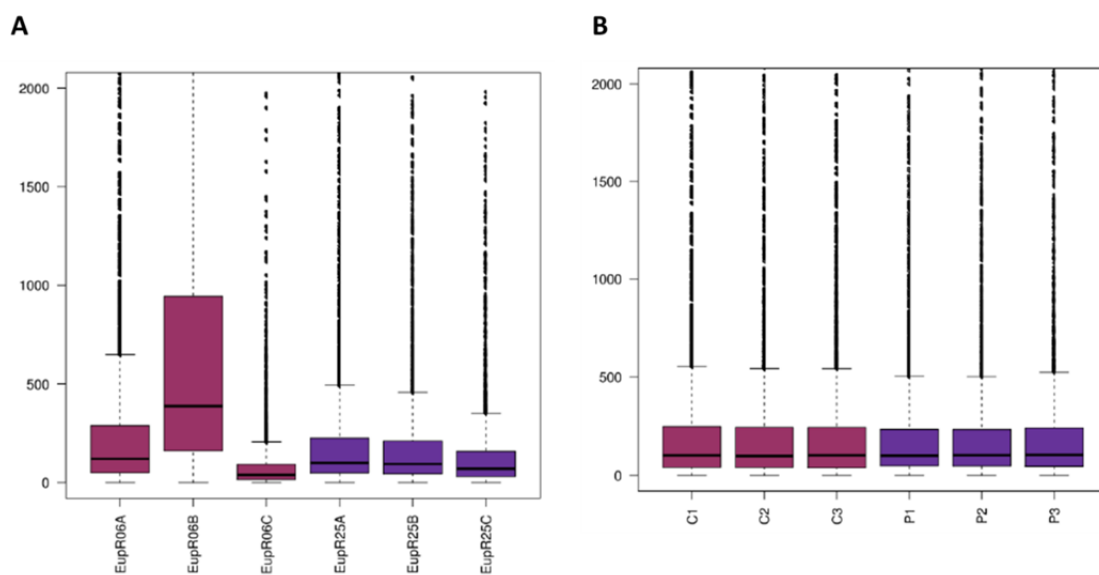
### 2.3.3. Secuenciación del ARNm por ILUMINA

La secuenciación por plataforma Illumina se realizó en la empresa sistemas genómicos de Valencia, donde se obtuvieron más de 3312 millones de lecturas mapeables comprendidas entre 52 y casi 1200 millones de lecturas por muestra.

Para llevar a cabo la secuenciación se utilizó la estrategia de paired-ends. Esta estrategia, permite secuenciar ambos extremos de un fragmento y generar datos de secuencia alineables de alta calidad. La secuenciación en pares facilita la detección de reordenamientos genómicos y elementos de secuencia repetitivos, así como fusiones de genes y transcripciones novedosas. Además de producir el doble de lecturas con el mismo tiempo y esfuerzo en la preparación de la librería, las secuencias alineadas como pares de lectura permiten una alineación de lectura más precisa y la capacidad de detectar variantes de inserción-eliminación, lo que no es posible con datos de lectura única.

### 2.3.4. Normalización de las muestras

Existen numerosos estudios (Risso *et al.*, 2011; Hansen *et al.*, 2012) que indican la necesidad de normalizar los datos de cuantificación para la eliminación de diferentes desviaciones estadísticas que pueden distorsionar todo el análisis posterior. Debido a la naturaleza de la secuenciación mediante RNA-SEQ, las desviaciones de mayor peso son la longitud del gen y el tamaño de librería por muestra, contenido en GC entre otros. En estos pasos de normalización que permiten eliminar o minimizar estos efectos. Se utilizó como valor para representar la expresión de un gen el número de lecturas normalizado por el tamaño de la librería. Este valor junto a los diferentes procesos estadísticos que describen en Trapnell y colaboradores (Trapnell *et al.*, 2013) permite eliminar las bias estadísticas anteriormente mencionadas. El resultado de la normalización puede ser observado en la Figura 56 A antes de normalizar y en la Figura 56 B después de normalizar. En la carpeta matrix\_stats están contenidas todos los boxplot después de normalizar en cada comparación de interés.



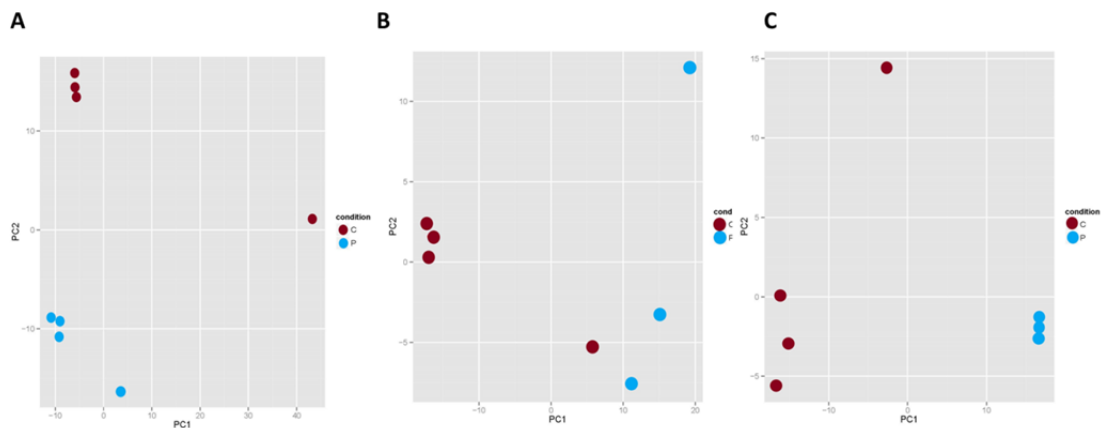
**Figura 56. Normalización de las muestras.** (A) Distribución de la cuantificación por gen para cada condición sin normalizar (B) Distribución de la cuantificación por gen para cada muestra normalizada por tamaño de librería.

En el presente trabajo no se observó ningún desplazamiento en los diferentes pasos de normalización, siendo el resultado óptimo. En todas las condiciones y en todas las muestras, tanto controles como otras condiciones la distribución de la expresión génica fue reproducible.

### 2.3.5. Verificación de la reproducibilidad entre las muestras de cada condición

Con la finalidad de definir que muestras fueron consideradas réplicas biológicas para cada condición, se realizó un estudio de PCA entre las diferentes muestras considerando todo su transcriptoma normalizado.

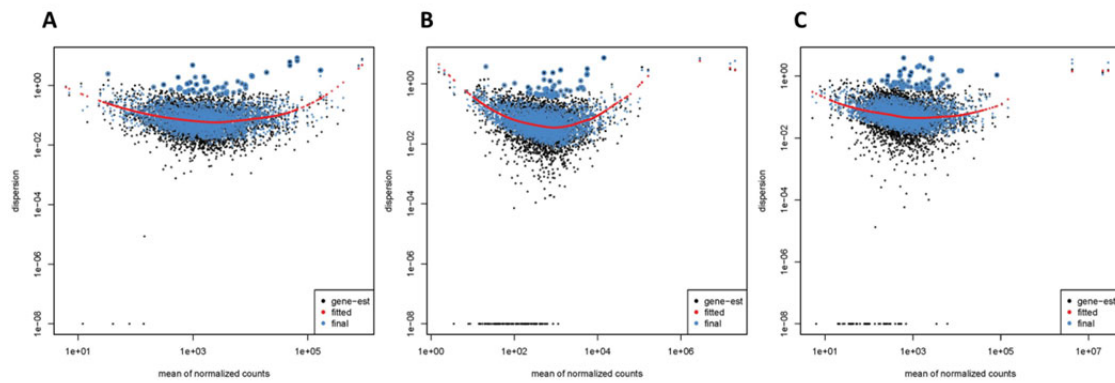
En la Figura 57 A se puede observar la comparativa entre la cepa silvestre a baja y elevada salinidad. Se observó cierta dispersión en uno de los controles de baja salinidad (Wt06A), pero no se identificó como outlier por lo que no se eliminó ninguna muestra en la comparación. En la Figura 57 B, la comparativa se realizó entre la cepa silvestre y el mutante EupR a baja salinidad, donde no se eliminó ninguna muestra en la comparación. Por último, en la Figura 57 C se observa la comparativa entre la cepa silvestre y el mutante eupR a elevada salinidad, donde tampoco se eliminó ninguna muestra en la comparación.



**Figura 57. Clasificación de las muestras mediante el transcriptoma global.** PCA utilizando todo el transcriptoma normalizado entre la cepa silvestre a baja y elevada salinidad(A), entre la cepa silvestre y el mutante EupR a baja salinidad (B) y entre la cepa silvestre y el mutante EupR a elevada salinidad (C).

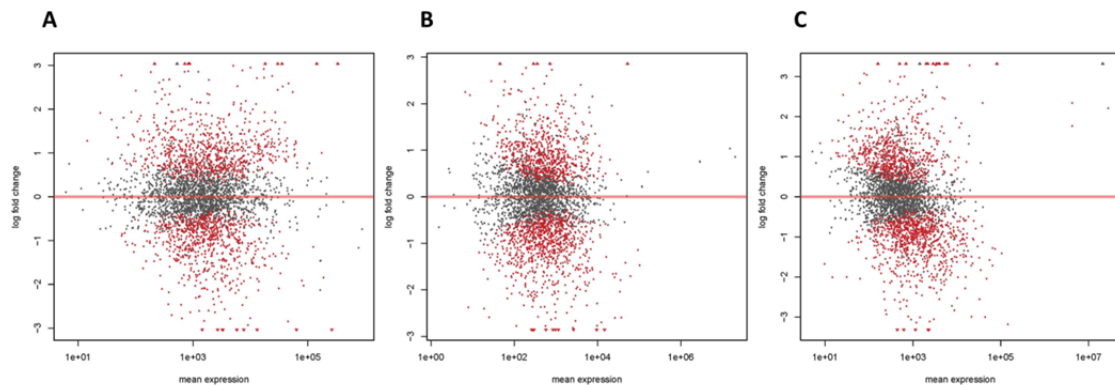
En cuanto a la expresión diferencial entre grupos de muestras, esta se basó en un modelo binomial negativo beta. El ajuste del modelo teórico a los datos experimentales de dispersión para cada condición se puede observar en la Figura 58. En todos los casos se observó un ajuste óptimo del modelo teórico.





**Figura 58. Ajuste del modelo teórico de dispersión génica.** Se puede observar como el modelo teórico obtenido (línea roja) se ajusta a la dispersión génica observada (puntos negros) para un amplio abanico de magnitud de expresión génica (ejeX), entre la cepa silvestre a baja y elevada salinidad(A), entre la cepa silvestre y el mutante EupR a baja salinidad (B) y entre la cepa silvestre y el mutante EupR a elevada salinidad (C).

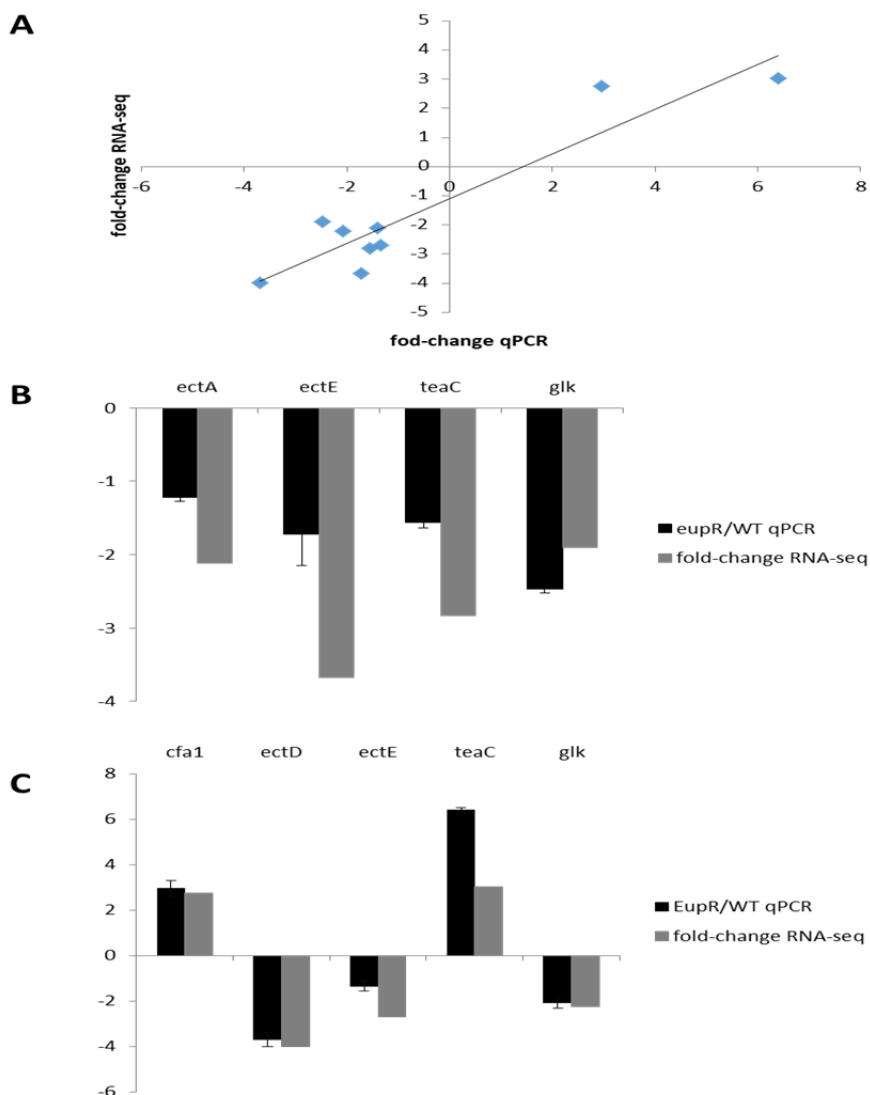
En el presente estudio no se detectó ninguna bia o alteración en la inferencia de la expresión diferencial. En el estudio de RNASEQ es muy importante que las distribuciones sean los más homogéneas posibles para asegurar un test de expresión diferencial óptimo y reproducible. En la Figura 59 se puede observar “MA plot” para cada condición.



**Figura 59. MAplot.** Estudio de expresión entre M (Expresión de Casos/Control) en el eje y y A ( $\log_2$  Expresión de Controles y Casos) en el eje x. Se puede observar una independencia entre el nivel de expresión (eje X) y el estudio de expresión diferencial significativa (puntos rojos), entre la cepa silvestre a baja y elevada salinidad(A), entre la cepa silvestre y el mutante EupR a baja salinidad (B) y entre la cepa silvestre y el mutante EupR a elevada salinidad (C).

### 2.3.6. Validación mediante qPCR

Para validar los resultados de RNA-seq, seleccionamos genes relacionados con la síntesis de ectoínas (ectA, ectD y ectE) el transporte de ectoína (teaC), la síntesis de ácidos grasos de ciclopropano (cfa1) y del metabolismo de la glucosa (glk), que se encontraron expresados diferencialmente en el ARN-seq, y se midió su expresión en las mismas condiciones experimentales mediante qPCR. Se encontró una alta correlación de Pearson (0,935) entre los dos métodos (Figura 60). Además, el patrón cualitativo de regulación de estos genes por RNA-seq fue idéntico a los medidos por semi-qRT-PCR, lo que condujo a la validación de los resultados de RNA-seq para el análisis comparativo de transcriptomas.

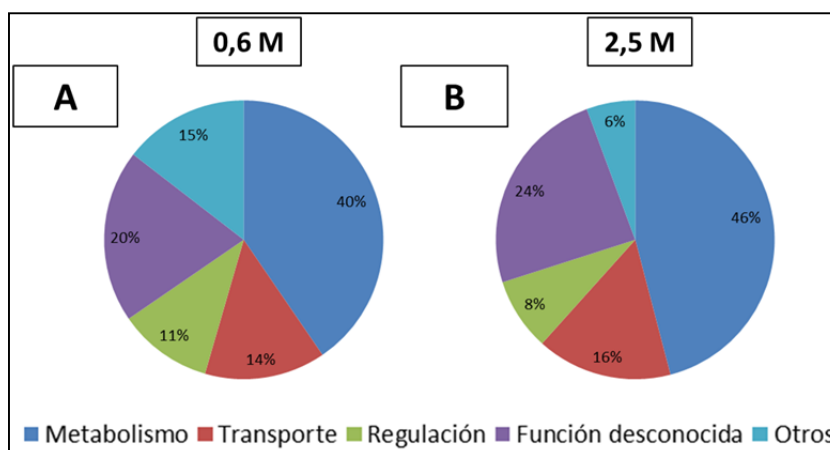


**Figura 60. Validación mediante qPCR de distintos genes expresados diferencialmente.** Correlación del fold-change de los niveles de expresión de genes determinados por qPCR y por RNA-seq (A). El fold-change de la expresión génica determinada por qPCR (columnas negras) se muestra junto a los resultados obtenidos en el análisis de RNA-seq (columnas grises) para cultivos a NaCl 0.6 M a 37 ° C (B) y a 2.5 M NaCl a 37 ° C (C). Los resultados de q-PCR se expresan como medias  $\pm$  DE para tres experimentos distintos realizados por duplicado

### 2.3.7. Análisis del transcriptoma diferencial

Ya centrándonos en el análisis de los resultados, se consideró que un gen se encontraba diferencialmente expresado cuando la media de número de lecturas por gen de cada una de las réplicas biológicas tuvo una variación de  $>1,8$  y un valor de p-value ajustado mediante “False discovery rate” de  $<0,05$  (Benjamini and Hochberg, 1995). De esta forma, se obtuvieron un total de 634 y 772 genes diferencialmente expresados a baja (0,6 M NaCl) y elevada salinidad (2,5 M NaCl), respectivamente, con respecto a la cepa silvestre. Para realizar un primer análisis acerca de la función de los genes diferencialmente expresados, se comparó el porcentaje del número de genes sobreexpresados que se localizaron dentro de cada categoría definida en los clúster de

grupos ortólogos (“Clusters of orthologous groups”; COG) (Tatusov *et al.*, 2003) para cada una de las comparaciones. Cuando se analizaron las categorías funcionales, se observó que, en ambas comparaciones, los genes sobreexpresados se distribuyeron a lo largo de cada una de las categorías funcionales descritas por los clústeres de grupos ortólogos, desde el metabolismo energético, hasta las categorías asociadas con funciones específicas tales como el transporte o la regulación de genes. En concreto, más del 60% estaban relacionados con el metabolismo central, el transporte o la regulación (Figura 61).



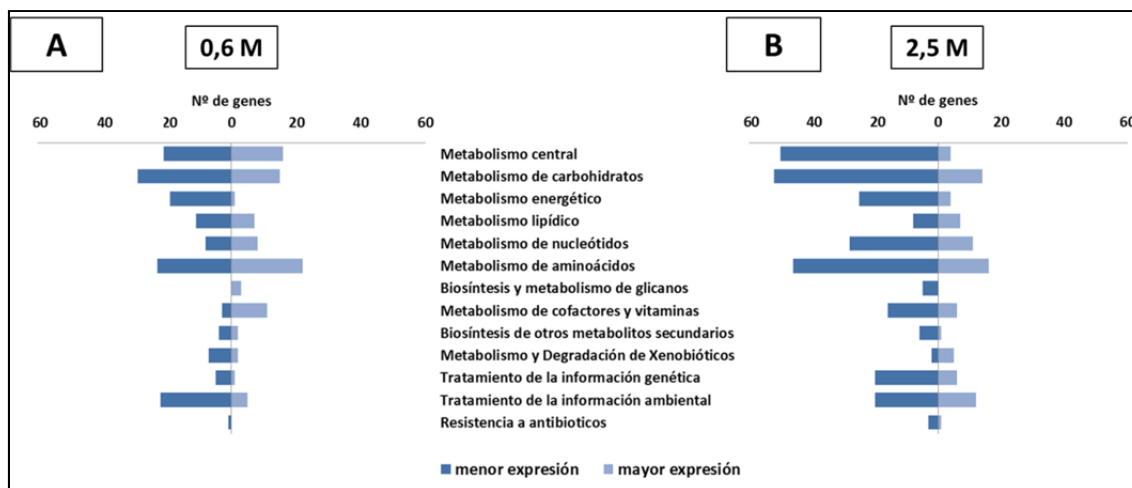
**Figura 61. Distribución del porcentaje de genes diferencialmente expresados en el mutante *eupR-* con respecto a la cepa silvestre según la clasificación global de KEGG. Se muestra el porcentaje de los genes en los grupos más representativos a baja (A) y elevada salinidad (B).**

### 2.3.8. Análisis funcional

Demostrada la importancia del regulador EupR, y considerándolo un regulador global se realizó un análisis más profundo de los principales grupos funcionales dentro de cada categoría mayoritariamente representada, que fueron, el metabolismo central, el transporte y la regulación.

#### 2.3.8.1. Genes diferencialmente expresados relacionados con la respuesta metabólica general

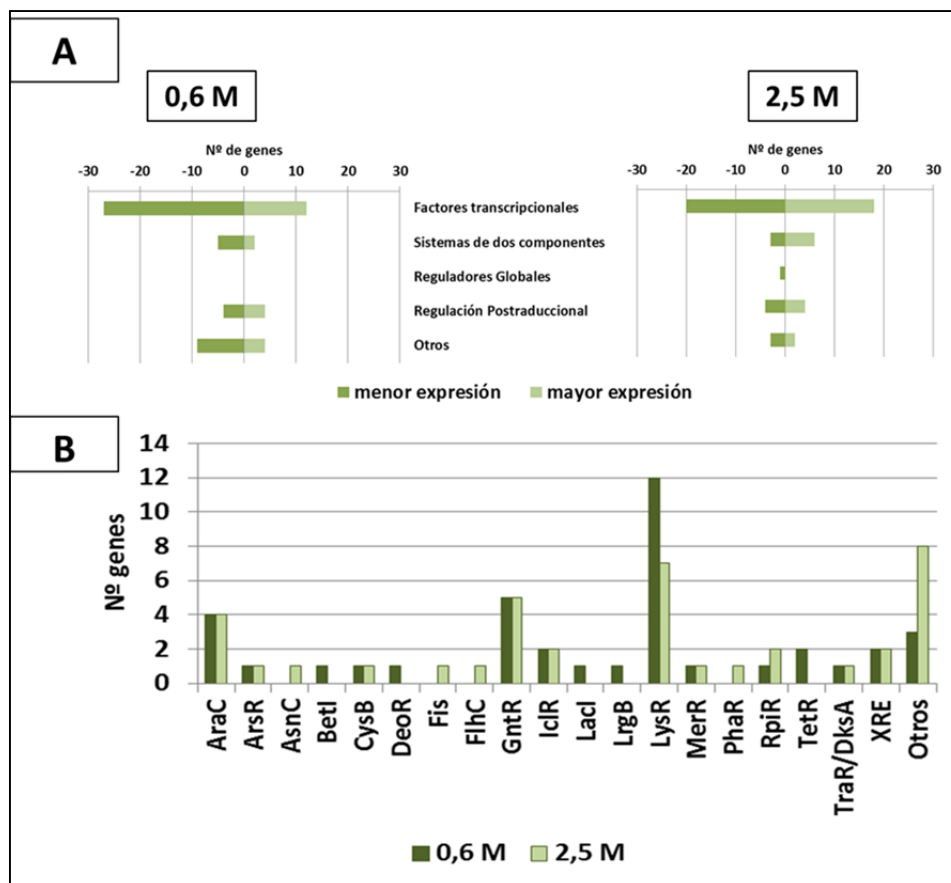
En cuanto a los genes metabólicos diferencialmente expresados a baja (248) y elevada salinidad (333) (Figura 62), cabe destacar el elevado número de genes que aparecen con una menor expresión en el mutante *eupR-*, sobre todo a elevada salinidad. Esto pone de manifiesto el posible papel activador del regulador EupR.



**Figura 62. Distribución del número de genes metabólicos diferencialmente expresados en eupR-.** Se muestran los genes según el nivel de expresión diferencial con respecto a la cepa silvestre (oscuro—menor; claro - mayor expresión) a baja (A) y elevada (B) salinidad en cada categoría metabólica definida por la ortología de KEGG.

### 2.3.8.2. Genes relacionados con la regulación

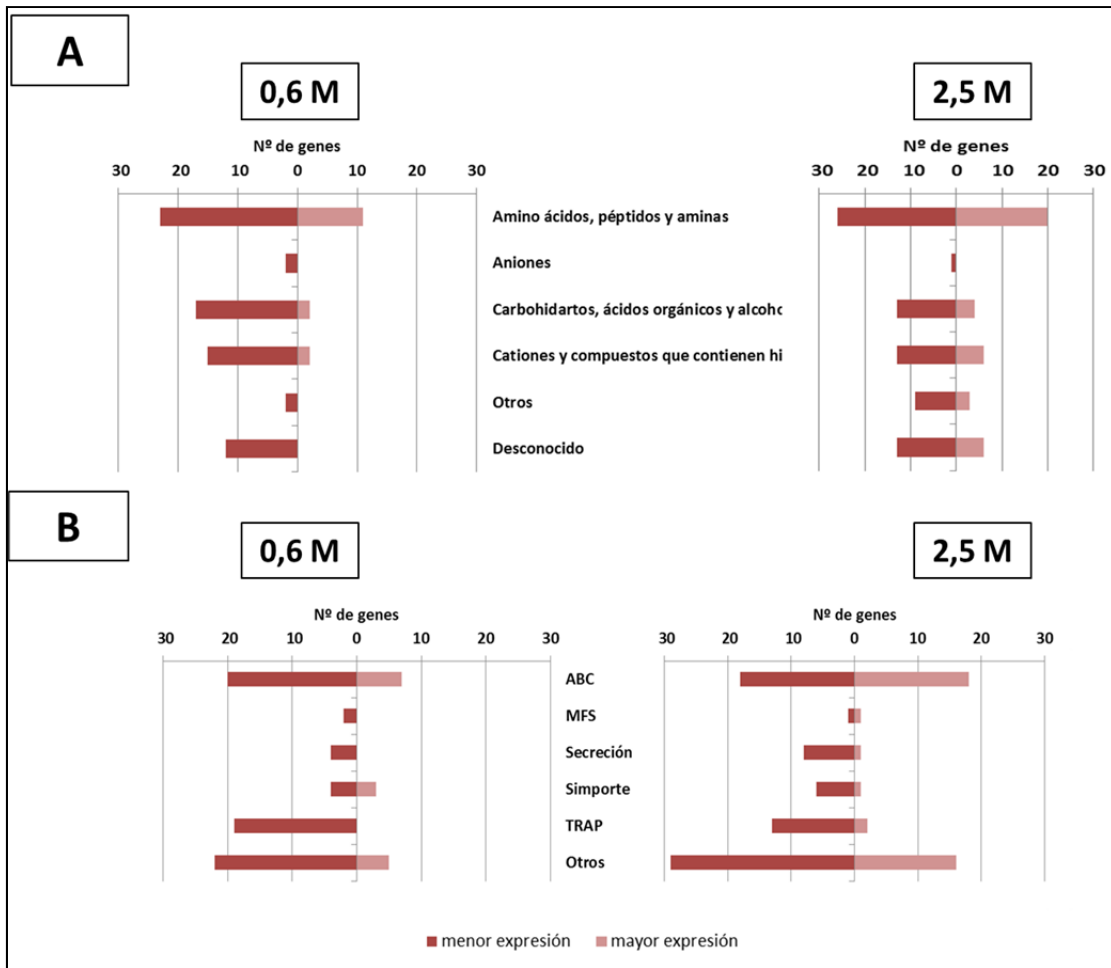
Por último, se analizaron más detenidamente los genes relacionados con la regulación ya sea transcripcional o postraduccional. De nuevo se ve un claro papel activador por parte del regulador EupR, sobre todo a baja salinidad (Figura 63). Se estudiaron por separado los factores transcripcionales al ser el grupo más abundante. Del mismo modo que ocurre en el genoma de *C. salexigens*, los grupos más representados fueron los reguladores de tipo AraC, GntR y LysR (Figura 63 B). Cabe destacar, que 18 genes (46%) diferencialmente expresados a baja salinidad también lo están a elevada salinidad conservando el mismo perfil de expresión, lo que sugiere un papel regulador por parte de EupR independiente de la salinidad.



**Figura 63. Distribución del número de genes de regulación diferencialmente expresados.** Se muestran los genes de regulación según su nivel de expresión diferencial con respecto a la cepa silvestre, dependiendo del tipo de regulador al que pertenezcan (A). Subdivisión de los factores transcripcionales según la familia a la que pertenezcan (B).

### 2.3.8.3. Genes relacionados con el transporte

Con respecto al análisis de los genes implicados en el transporte, se observa de nuevo el claro efecto activador del regulador EupR, ya que entre el 60 y el 80% de los genes, ven disminuida su expresión en el mutante eupR- con respecto a la cepa silvestre (Figura 64 A). Además, cabe destacar que la mayoría de los transportadores diferencialmente expresados son de tipo ABC (dependiente de ATP) o tipo TRAP (independientes de ATP pero dependientes de Na<sup>+</sup>) (Figura 64 B).



**Figura 64. Distribución del número de genes implicados en el transporte diferencialmente expresados en el mutante *eupR*-.** Se muestran los genes implicados en el transporte según su nivel de expresión diferencial con respecto a la cepa silvestre, dependiendo de la naturaleza del metabolito que transporte (A) o del tipo de transportador (B).

### **3. DISCUSIÓN**

Como ya hemos mencionado anteriormente, la explotación de *C. salexigens* en biotecnología como productor de ectoínas requiere una comprensión integral de su fisiología, genética y regulación. La disponibilidad de su secuencia genómica, las investigaciones fisiológicas, bioquímicas y genéticas así como a obtención de datos de alto rendimiento previos de nuestro Grupo de Investigación junto con los estudios de regulación (este trabajo), nos permitirán obtener una idea más sistémica del metabolismo de las ectoínas en *C. salexigens*. Los resultados presentados en este trabajo proporcionan pistas para una mejor comprensión de la regulación compleja de esta bacteria moderadamente halófila y de su adaptación para sobrevivir en ambientes extremos. Estos análisis se añadirán al ya existente modelo metabólico mejorado basado en el genoma y en análisis globales de alta calidad y servirán para facilitar el diseño racional de nuevas cepas de ingeniería metabólica.

### **3.1. El sistema de dos componentes EupK/EupR está implicado en el metabolismo y transporte de ectoínas.**

La transducción de señales a través de sistemas de dos componentes es una de las señalizaciones más importantes que ocurren en bacterias. En este estudio se ha descrito un nuevo sistema de dos componentes implicado en osmodetección en la bacteria halófila *Chromohalobacter salexigens*.

Los estudios tanto de osmoadaptación como de transporte realizados en esta Tesis Doctoral, confirman resultados preliminares (Rodríguez-Moya *et al.*, 2010) y demuestran que el gen *eupR* está directamente implicado tanto en el transporte de las ectoínas como en la regulación del mismo en *C. salexigens* ya que en la cepa mutante CHR 183 deficiente en dicho gen afecta a su crecimiento con glucosa como única fuente de carbono a baja salinidad y los datos de expresión génica muestran una expresión mayor del gen *tea* a baja salinidad que la observada en la estirpe silvestre.

En los sistemas clásicos de dos componentes se incluye una histidina quinasa que es la encargada de detectar el estímulo y, mediante la transferencia de fosfato activar al regulador de respuesta asociado (Stock *et al.*, 2000). Habitualmente esta histidina quinasa suele estar codificada en el mismo operón o en genes adyacentes, aunque esto no es siempre así (Gao *et al.*, 2007), complicando la identificación del sistema.

El gen *Csal\_0869*, separado por dos genes del regulador *eupR* en dirección 3' fue el identificado *in silico* como la posible histidina quinasa asociada a *EupR* (Rodríguez-Moya *et al.*, 2010) por lo que se decidió estudiar más a fondo dicha histidina quinasa y su asociación con dicho regulador de respuesta.



## CAPÍTULO 1. CONCLUSIONES

Tras la obtención del mutante defectivo en el gen de la histidina quinasa EupK, se realizaron experimentos tanto de osmoadaptación como de expresión génica. Una vez analizados todos los resultados en conjunto, podemos suponer que el sistema de dos componentes EupK/EupR es un sistema clave en *C. salexigens* ya que estaría implicado en los mecanismos de detección de condiciones de estrés osmótico y en la osmorregulación y parece controlar tanto los genes de síntesis, degradación y transporte de ectoínas, como del catabolismo de la glucosa. Sin embargo esta relación no se da en todas las condiciones ensayadas, por lo que, cabía la posibilidad de no estar ante un sistema de dos componentes real. En estos casos, la asociación mediante el análisis “in silico” entre la histidina quinasa y su regulador de respuesta asociado no son suficientes y, al no encontrarse en el mismo operón, son necesarios experimentos adicionales como los de interacción proteína-proteína in vivo y o los de medida de la fosfotransferencia utilizando P32 para poder determinar que estos sistemas son reales (Skerker *et al.*, 2005). En nuestro caso estos experimentos demostraron ya no sólo que las dos proteínas interaccionaban entre sí, sino de que realmente se trataba de un sistema de dos componentes funcional al ser capaz la histidina quinasa EupK de fosforilar al regulador de respuesta EupR.

Cierto es que los resultados seguían sugiriendo una regulación adicional o alternativa. En concreto, los resultados sugieren la existencia de un circuito más complejo de regulación alternativo relacionado con en el transporte y/o el catabolismo de ectoína y que podría ser dependiente de NaCl. Por una parte, sugieren la existencia de otro elemento regulador que activaría a EupR y que parece causar el que exista cierto nivel de inhibición en la expresión de los genes *teaABC* en un mutante en la histidina quinasa. Por otra parte, sugieren que la histidina quinasa estaría activando a otro regulador transcripcional que actuaría como inhibidor de los genes de catabolismo de ectoínas y posiblemente a otro relacionado con el catabolismo de la glucosa. Por ello se ha planteado al existencia de un sistema de señalización más complejo de tipo ramificado y cruzado en el que dos o más histidinas quinasa fosforilan al mismo regulador de respuesta en distintas condiciones, del mismo modo que una histidina quinasa sería capaz de fosforilar a más de un regulador de respuesta.

### **3.2. La red de señalización que controla la producción de ectoínas está formada por al menos cuatro sistemas de dos componentes**

Aunque la gran cantidad de parejas quinasa-regulador de respuesta tienen una alta especificidad y las interacciones heterólogas de parejas proteínas no canónicas suele estar muy controlada (Hoch and Varughese, 2001) sí que existen algunos casos una regulación cruzada o “cross-regulation” (Laub and Goulian, 2007). En estos casos, las posibles asociaciones hacen necesario experimentos adicionales de interacción proteína-proteína in vivo y de medida de la fosfotransferencia utilizando P32 para poder determinar estos sistemas de regulación cruzada (Skerker *et al.*, 2005).

En cuanto a la interacción proteína-proteína, esta suele ocurrir normalmente entre grandes superficies y suele ser el resultado de muchas interacciones débiles de distintos residuos conservados cercanos al aspártico del regulador de respuesta, acercando de este modo también a los residuos catalíticos (Tzeng and Hoch, 1997; Zapf *et al.*, 2000) definiéndose de este modo los posibles aminoácidos de reconocimiento que serían muy variables y prevendrían la interacciones heterólogas (Hoch and Varughese, 2001).

Por otra parte, la tasa de transferencia de fosfato in vitro entre quinasa y regulador de respuesta de distintos sistemas suele ser menor que la que ocurre entre parejas canónicas, jugando de nuevo un papel importante los determinantes de reconocimiento entre ambas proteínas (West and Stock, 2001).

Por tanto, la fosforilación cruzada suele ser escasa en la naturaleza, y además de lo anteriormente mencionado, existen dos factores importantes que la mantienen en un nivel bajo. Estos son la competencia entre reguladores, donde aunque una quinasa pueda interaccionar con varios, esta interacción será mayor con el de su propio sistema (Laub and Goulian, 2007), y la actividad fosfatasa de la quinasa, que eliminaría fosforilaciones inapropiadas de su regulador de respuesta. Un ejemplo de ello es lo ocurre con la histidina quinasa PhoR, de *Salmonella*, que puede activar al regulador de respuesta VanR de *E. coli*, aunque solo cuando su histidina quinasa asociada, VanS, está ausente (Haldimann *et al.*, 1997). Agrawal y colaboradores hipotetizaron que estas interacciones cruzadas se debían a la eliminación o falta de actividad fosfatasa de las histidinas quinasa asociadas a dichos reguladores de respuesta (Agrawal *et al.*, 2016).

A pesar de ello, se han encontrado varios ejemplos de regulación ramificada en numerosas bacterias. Algunos ejemplos son: el sistema de quimiotaxis en *Escherichia coli*, donde la histidina quinasa CheA fosforila a dos reguladores de respuesta CheB y CheY (Laub and Goulian, 2007); el caso de *Bacillus subtilis*, en el que cuatro histidinas quinasa

## CAPÍTULO 1. CONCLUSIONES

(KinA-KinD) fosforilan a un mismo regulador de respuesta Spo0, que controla la entrada en el proceso de esporulación (Jiang *et al.*, 2000); la regulación cruzada en *E. coli* entre el sistema EnvZ/OpmR y AcrB/ArcA que relacionan de este modo la osmoadaptación con la anerobiosis (Matsubara *et al.*, 2000) o entre el sistema de dos componentes PmrB-PmrA con QseC-QseB (Guckes *et al.*, 2013); la interacción cruzada que muestran los sistemas de dos componentes NarX-NarL y NarQ-NarP en *E. coli*. implicados en detectar y discriminar la presencia de nitratos y nitritos en el medio (Noriega *et al.*, 2010; Huynh, Lin, *et al.*, 2015); la regulación que existe entre las histidinas quinasa híbridas EspA y EspC de *Myxococcus xanthus* (Schramm *et al.*, 2012). Otra regulación más compleja puede ser la que encontramos por ejemplo entre las histidina quinasa RetS y LadS con el sistema de dos componentes GacS/GacA de *Pseudomonas aeruginosa* donde estas dos histidina quinasa median en el proceso de fosforilación de GacA por parte de GacS ejerciendo funciones tanto activadoras como inhibitoras (Laub and Goulian, 2007; Chambonnier *et al.*, 2016; Willett and Crosson, 2017). Y de un modo similar a la anterior estaría el caso de la regulación de los genes de virulencia de *Bordetella pertussis* donde estarían implicado el sistema de dos componentes BvgA/BvgS y RisA/RisS junto con la histidina quinasa Risk (Dupré *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2017).

Es por ello que en los últimos años, se ha profundizado aún más en el funcionamiento de estos sistemas, sus interconexiones, y la ventaja adaptativa que suponen en relación a la detección e integración de estímulos. En ciertos casos, una misma histidina quinasa perteneciente a un sistema de dos componentes fosforila a dos reguladores de respuesta diferentes (“many-to-one”). O al contrario, un regulador de respuesta es fosforilado por varias histidinas quinasa en condiciones concretas (“one-to-many”) (Laub and Goulian, 2007). Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito ningún sistema de regulación ramificada o cruzada en bacterias halófilas, ni tampoco ninguno que relacione la osmodetección con el transporte y el catabolismo en general, como parece que ocurre en *C. salexigens*.

En nuestro caso, otro de los factores a tener en cuenta es la naturaleza de la histidina quinasa EupK. Como ya hemos mencionado en la introducción, se trata de una histidina quinasa híbrida (Wuichet *et al.*, 2007, 2010), que posee, además de los dominios típicos de las histidinas quinasa, un dominio REC fusionados a la región C terminal. Las histidinas quinasa híbridas suelen formar parte de una red de transferencia del fósforo, o phosphorelay, en las que el fosfato sigue una ruta His-Asp-His-Asp. El fosfato se transferiría desde el residuo His del dominio DHp de la histidina quinasa al Asp del dominio REC. Aquí es donde aparecería el dominio Hpt (Histidine phosphotransfer) con una histidina conservada y que sería el enlace con el aspártico del dominio REC perteneciente

## CAPÍTULO 1. CONCLUSIONES

esta vez al regulador de respuesta (Foussard *et al.*, 2001; Galperin *et al.*, 2001; West and Stock, 2001; Gao and Stock, 2009). Este tipo de circuito permite que las bacterias tengan una mayor versatilidad tanto de señalización como de regulación al tener más posibles puntos de control (Perraud *et al.*, 1999; Galperin, 2009; Salvado *et al.*, 2015; Willett and Crosson, 2017). Es por ello que los phosphorelays regulan fenómenos celulares complejos tales como el desarrollo y el control del ciclo celular en bacterias (Romanel *et al.*, 2012) entre otros, y existen datos que indican que estos phosphorelay a veces no se limitan a una única histidina quinasa híbrida. Por ello, estudiar esta cadena de transferencia del fósforo y la posible regulación compleja entre los sistemas de dos componentes es de gran importancia.

Teniendo en cuenta que EupK no posee dominio Hpt y que el fosfato sólo se trasfiere de un residuo de histidina a uno de aspártico, cabe esperar que exista una proteína que haga de enlace entre EupK y el regulador de respuesta EupR. En el genoma de *C. salexigens* no se han encontrado fosfotransferasas citoplasmáticas, sin embargo, existen tres histidina quinasas híbridas con dominios Hpt que podrían actuar como intermediarias en la donación del grupo fosfato entre el dominio REC de EupK y el dominio REC de EupR, de manera similar a como ocurre en el sistema CblmyxS/CbIT/CbIR de *Burkholderia cenocepacia* (Tomich and Mohr, 2004) o como lo que ocurre en el fosforelay Rcs de *E. coli* o *Salmonella* (Majdalani and Gottesman, 2006; Clarke, 2010; Pescaretti *et al.*, 2013).

Tras analizar todos los resultados de interacción proteína-proteína in vitro así como los de transferencia de fosfato en conjunto, podemos suponer que nos encontramos ante una red o circuito de regulación ramificada y/o cruzado en el que EupK y EupR serían uno de los sistemas de dos componentes implicados. Esta red sería del tipo “many to one” a través de fenómenos de cross-talk con las histidinas quinasas híbridas Csal\_1062, Csal\_1635 y Csal\_2667. Además, dicho sistema sería capaz de detectar tanto salinidad como concentración de ectoína extracelular. Este cross-talk con el regulador de respuesta podría tener lugar de dos formas: bien por fosforilación directa del dominio REC de EupR a partir de los dominios HisKA de las histidinas quinasas híbridas, o bien a través de un mecanismo de phosphorelay. Con los experimentos realizados hasta ahora no podemos descartar ninguna de estas posibilidades, por tanto se necesitarían experimentos adicionales. La forma más sencilla de averiguarlo sería realizando mutaciones puntuales en los distintos aminoácidos conservados (tanto histidina como aspártico) de los diferentes dominios y repetir los experimentos de transferencia de fosfato. De ese modo podríamos conseguir una trazabilidad del fosfato, lo que sería muy útil a para tener un mejor conocimiento de la regulación que tendría esta red de regulación.

## CAPÍTULO 1. CONCLUSIONES

Los resultados también muestran que en principio no parece que se formen heterodímeros entre la histidina quinasa híbrida EupK y las demás histidinas quinasa híbridas, aunque existe una leve interacción con la histidina quinasa Csal\_2667 en presencia de ectoína a distintas concentraciones dependiendo de la sal.

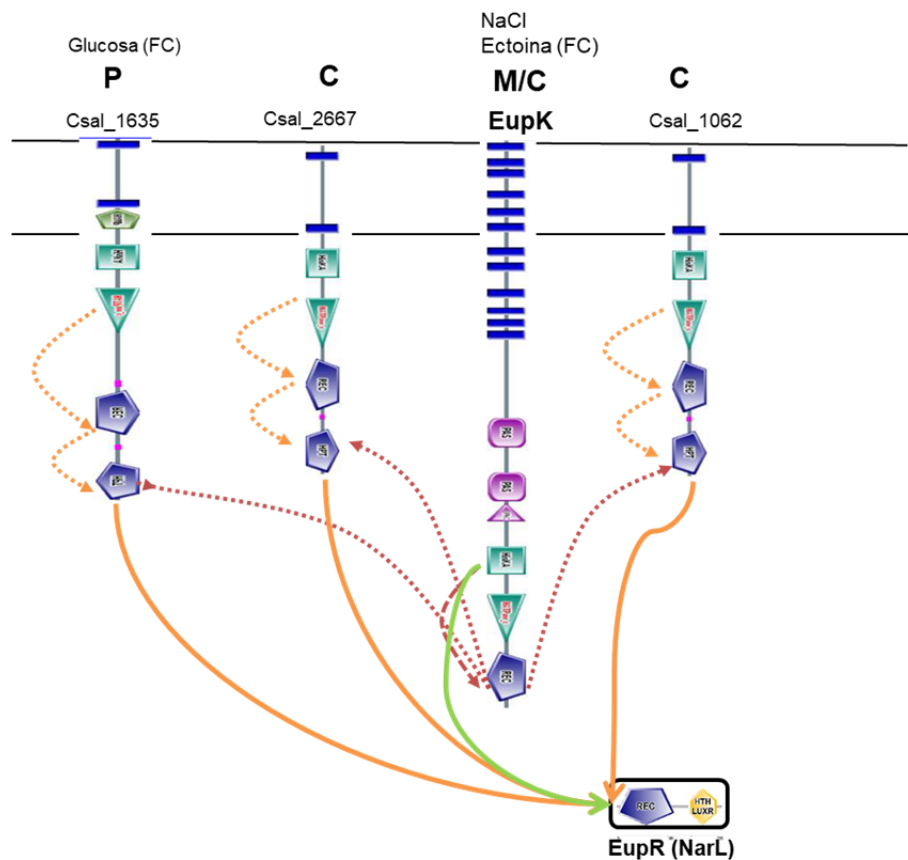
Esto puede dar lugar a distintas interpretaciones: (i) que no exista esta interacción y el sistema que tendríamos sería similar al caso anteriormente mencionado de *Bacillus subtilis*, en el que cuatro histidinas quinasa (KinA-KinD) fosforilan a un mismo regulador de respuesta Spo0 (Jiang *et al.*, 2000) o (ii) que debido a las limitaciones en la técnica, al trabajar en un sistema heterólogo donde las condiciones testadas no son las que se dan en condiciones normales en *C. salexigens* no estemos observando dichas interacciones correctamente.

Para estar seguros de que no se debía a las limitaciones de la técnica y se comenzaron los experimentos de Membrane-SPINE, donde ya las interacciones se realizan en la bacteria problema y con las distintas condiciones fisiológicas deseadas. Los resultados preliminares son muy esperanzadores en cuanto a la posibilidad de identificar a las distintas proteínas que puedan intervenir en la red de regulación aunque nos hemos encontrado con ciertas limitaciones por lo que se necesitará poner a punto el sistema. Una de esas limitaciones ha sido la producción de proteínas en la bacteria halófila, por lo que el estudio y mejora de plásmidos de expresión en este tipo de bacterias sería uno de los puntos a mejorar en un futuro. Del mismo modo, la detección y posterior identificación de las proteínas es otro posible punto de mejora.

De confirmarse una interacción entre EupK y las demás histidinas quinasa híbridas, de nuevo habría que averiguar a través de dominios se efectuaría la transmisión de fosfato. En este caso podríamos estar ante un sistema del tipo Rcs (Majdalani and Gottesman, 2006), o el sistema Cbls/CbIT/CbIR de *Burkholderia cenocepacia* (Tomich and Mohr, 2004) donde la transferencia de fosfato entre las dos histidinas quinasa se daría a través de un mecanismo de phosphorelay en el que el dominio Hpt de la híbrida transferiría el grupo fosfato desde el dominio REC de EupK hasta el dominio REC de EupR. Otra consideración a tener en cuenta es el hecho de que el dominio REC de EupK, no es un dominio típico, por lo que cabría la posibilidad de que no fuera funcional del todo, es decir, que no interviniese en la cascada de fosfato, sino que fuera un elemento regulador más como ocurre en *Myxococcus xanthus* ya sea con RodK (Wegener-Feldbrügge and Søgaard-Andersen, 2009) o en el caso de FrzE, que regula la actividad de la histidina quinasa CheA (Inclán *et al.*, 2008). Para poder confirmar este hecho serían necesarios experimentos de mutaciones puntuales adicionales similares a los mencionado anteriormente, donde el

seguimiento de fosfato en este caso se realizaría entre histidinas quinastas, siendo tanto las donadoras como las receptoras del fosfato.

Así pues, y a falta de más resultados, proponemos una posible red de regulación compleja (Figura 65) donde el regulador de respuesta EupR tendría un papel central, regulando tanto el transporte como la síntesis de ectoína a elevada salinidad mediado por EupK que detectaría la ectoína y la salinidad del medio. Además EupR podría regular los genes responsables del transporte/catabolismo de la glucosa, pero en este caso sería la histidina quinasa híbrida Csal\_1635 la encargada de detectar la glucosa y activar a EupR.



**Figura 65. Esquema de la posible red de regulación cruzada en la que se encontraría integrado el sistema de dos componentes EupK/EupR y las histidinas quinasa híbridas.** Las flechas representan las posibles transferencias de fosfato. En continuo se representan las vías directas entre las histidinas quinastas y el regulador de respuesta EupR y en discontinuo las vías de fosfortransferencia o fosforelay. En verde se representa el sistema EupK/EupR., en naranja los fosforelay de las histidinas quinasa híbridas y en rojo las posibles regulaciones cruzadas ente EupK y las demás histidinas quinastas híbridas. P: periplásmica, C: citoplásmica, M/C: transmembrana y citoplásmica.

Por último, en este estudio no se han incluido a los reguladores de respuesta de las histidinas quinasa híbridas, por lo que podíamos estar seguramente también ante una red de tipo “one to many” ampliando tanto la red de regulación como su complejidad.

### **3.3. EupR es un regulador global implicado en la adaptación metabólica a salinidad de *C. salexigens***

Nuestros resultados revelan la importancia del regulador EupR en la adaptación metabólica de *C. salexigens* en respuesta a elevada salinidad, siendo éste un elemento clave en la red de regulación que controla la producción de ectoínas.

Los datos de la transcriptómica diferencial sugieren que las condiciones hipo e hiperosmóticas representan una situación de estrés para *C. salexigens*. Por lo tanto, a baja salinidad, el regulón rpoH (Tilly et al., 1986) parece activarse en respuesta al estrés proteico citoplasmático desplegado. En *Treponema denticola*, *Vibrio parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, las condiciones hipoosmóticas también dieron como resultado una respuesta al estrés proteico desplegado (McHardy et al., 2010; Yang et al., 2010; Rao et al., 2013). A diferencia de *Vibrio*, donde la respuesta se limitó a la expresión del sistema GroEL (Yang et al., 2010; Rao et al., 2013), en *C. salexigens* el regulón de rpoH completo aparentemente estaba regulado en exceso a baja salinidad. De acuerdo con nuestros hallazgos, se ha propuesto una estrategia híbrida entre los mecanismos de "sal adentro" y "sal afuera" para hacer frente al estrés osmótico para *C. salexigens*, basada en el punto isoeléctrico de las proteínas citoplasmáticas (Saum et al., 2013). En este modelo, a baja salinidad, las proteínas tenderían a desplegarse debido a la falta de la concentración de iones necesaria. Además, Siglioccolo y colaboradores (2011) informaron una disminución significativa del área de la superficie apolar de proteínas de microorganismos halófilos que siguió una estrategia de "soluto". Propusieron que el mantenimiento de la solubilidad y la estabilidad de las proteínas a una concentración de osmolitos decimolar requerían remodelación de la superficie, lo que implica una disminución parcial de la superficie apolar. La acidificación de las proteínas citoplasmáticas, y la reducción de su área de superficie apolar, está de acuerdo con la hipótesis de una evolución convergente entre las proteínas pertenecientes a bacterias halofílicas y arqueas extremadamente halofílicas (Ghandbhir et al., 1995). La pregunta ahora es: ¿por qué *C. salexigens* está desencadenando esta respuesta de proteína desplegada mediada por rpoH a baja salinidad? ¿No sería más fácil producir en exceso ectoínas a baja salinidad, sabiendo que sus proteínas las están demandando? La respuesta a estas preguntas radica en su naturaleza de osmolitos. La síntesis de ectoínas está osmorregulada de modo que si la presión osmótica interna es mayor que la externa, se produce la plasmólisis celular. Además, los canales inespecíficos y otras proteínas de transporte podrían extruir las ectoínas si no se equilibraran con la presión osmótica externa (Pflüger y Müller, 2004). Eso podría generar un desperdicio de intermedios metabólicos y energía. De acuerdo con esta hipótesis, los genes y enzimas de síntesis de

## CAPÍTULO 1. CONCLUSIONES

ectoínas respondieron positivamente a los incrementos en la concentración de sal (Ono et al., 1999; Calderón et al., 2004; este trabajo).

*C. salexigens* utiliza la vía Entner-Duodoroff para la oxidación y asimilación de la glucosa (Pastor et al., 2013). Nuestro análisis global sugiere que, aunque a baja salinidad, la asimilación de glucosa se llevó a cabo principalmente por la variante periplásmica de Entner-Duodoroff, a alta salinidad ocurrió a través de la variante citoplásmica de Entner-Duodoroff y la derivación de fosfato de pentosa. Aparentemente, este efecto fue aún más pronunciado a alta salinidad y alta temperatura. Se informó que, en ausencia de fosfofructoquinasa, se espera que la ruta de la pentosa fosfato opere parcialmente cíclica, por lo que la fructosa 6-fosfato formada por transaldolasa o transcetolasa se isomeriza a glucosa 6-fosfato, que ingresa nuevamente en la ruta oxidativa de la pentosa fosfato (Kruger y Von Schaewen 2003; Richhardt et al. 2012). Por lo tanto, 1 mol de glucosa 6-fosfato a través del Entner-Duodoroff produce 2 mol de acetato o acetyl-CoA, 2 mol de CO<sub>2</sub>, 2 mol de ATP y 4 mol de NADPH, mientras que la metabolización de glucosa 6-fosfato a través de fosfato de pentosa, en ausencia de fosfofructoquinasa, produce 1 mol de acetato o acetyl-CoA, 4 mol de CO<sub>2</sub>, 2 mol de ATP y 8 mol de NADPH (Richhardt et al. 2012). La síntesis de ectoínas consume 3 equivalentes de NADPH, y las vías utilizadas para el metabolismo de la glucosa deben ser capaces de proporcionar no solo el esqueleto de carbono sino también los equivalentes reductores necesarios. La existencia de vías alternativas para el metabolismo de la glucosa que difieren en el estado redox puede permitir que el microorganismo controle la tasa de producción de equivalentes redox y sintonice finamente su estado redox para maximizar el crecimiento y la biosíntesis de ectoínas (Pastor et al., 2013). A alta salinidad y temperatura, Entner-Duodoroff periplásmico se inhibe por completo, como lo demuestra el análisis transcriptómico y la falta de gluconato extracelular, lo que sugiere una mayor producción de equivalentes reductores por la vía de fosfato de pentosa parcialmente cíclico.



**IV. CAPÍTULO 2:  
EXPLORATION OF THE ECTOIN AS  
NEUROPROTECTOR**

# **1. INTRODUCTION**

## 1.1. Protein misfolding and aggregation

Proteins are one of the most abundant groups of organic molecules in the biological world. Each protein has a characteristic and unique spatial structure, which is called native structure or conformation, which is absolutely necessary to be fully functional.

The protein folding begins during translation, and tends to, spontaneously, adopt the minimum energy conformation. Correct folding into native functional conformation is a challenging task inside the cell (Zaman *et al.*, 2019). Protein folding is a very sensitive process that is influenced by several external factors like temperature, pH, chemicals, protein concentration and salts. These factors influence the ability of proteins to fold into their correct functional forms. In the cell, a protein can exist in several different states in addition to its native structure (Figure 66). The transition between the different folding states is determined by their relative thermodynamics and kinetic stability (Knowles *et al.*, 2014).

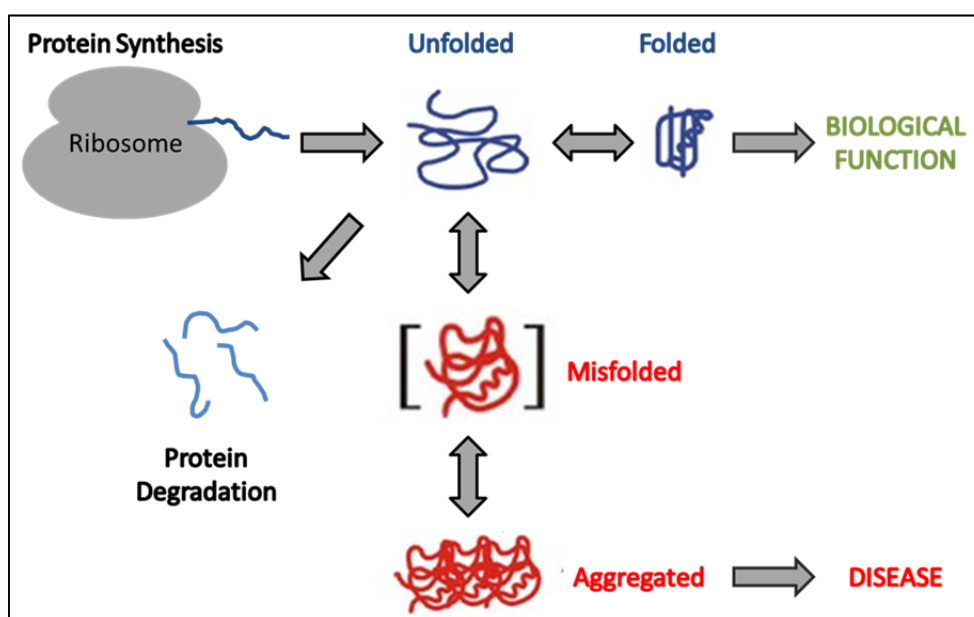


Figura 66. Schematic representation of the possible conformational states of proteins in the cell.

Transitions between the different proteins conformational states are highly regulated by the environment and by the presence of molecular chaperones, proteolytic enzymes and other factors. Failure of such regulatory mechanisms may result in pathological conditions known as protein misfolding diseases (Chiti and Dobson, 2017).

### 1.1.1. Protein misfolding diseases

Misfolded proteins easily denature and lose their structure and function producing inactive or toxic proteins and facilitating their aggregation. Amyloid fibrils are only one of the types of aggregates that proteins can form. Due to their high organization, their kinetic

stability is greater than normal, allowing these aggregates to last for long periods of time allowing their progressive accumulation in tissues (Dobson, 2003).

There are at least more than 50 disorders associated with peptides and protein misfolding (Chiti and Dobson, 2006). The number of diseases associated with incorrect protein formation, where the result of anomalous folding is a different fibrillar structure called "amyloid", is increasing (Chiti and Dobson, 2017). Among these diseases an important subgroup are neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Huntington's disease, Parkinson's disease, Spongiform encephalopathies, Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and Familial amyloidotic polyneuropathy (Knowles *et al.*, 2014; Chiti and Dobson, 2017).

### **1.2. Alzheimer's disease**

Dementia affects about 50 million people worldwide (Patterson, 2018), of which 60-70% are due to Alzheimer's disease (AD). The total number of people with dementia is expected to reach 82 million in 2030 and 152 million in 2050 (World Health Organisation; 2017).

Alzheimer's disease is a degenerative and progressive disorder of the central nervous system associated with the loss of neuronal function and a gradual cognitive, functional and behavioural deterioration (Kumar and Tsao, 2019). Today, despite the advances in molecular characterization, the diagnosis of AD remains both clinical and by exclusion of any other type of dementia, but its definitive diagnosis remains through post-mortem patients studies. This is due to the absence of valid biological markers (Perl, 2010). However, certain tools have been achieved to facilitate diagnosis, such as neuroimaging techniques, whether by magnetic resonance imaging (MRI) or positron emission tomography (PET). In fact, these two techniques have contributed very effectively to both improving diagnosis and understanding of disease progression (Buckner *et al.*, 2005; Masters *et al.*, 2015; Scheltens *et al.*, 2016; Chen and Mobley, 2019). In addition, there is currently no effective drug treatment to cure the disease or at least modifies the course of it, they only treat the symptoms. This is mainly due to lack of therapeutic targets (Cummings *et al.*, 2019). The only drugs currently used to treat AD belong to two types, acetyl cholinesterase inhibitor or glutamate antagonists, although they only produce a partial delay in the cognitive deficit of the patients (Scheltens *et al.*, 2016). For all this, an effective treatment should avoid or delay the loss of synaptic contacts and progressive neuronal death, which would significantly improve the quality of life of the patient and his relatives-caregivers.

### **1.2.1. Pathogenesis and physiopathology**

As stated above, the main manifestation of AD is the neuronal death that causes both dementia and other disorders (Kumar *et al.*, 2015).

The brain of Alzheimer's patients has very characteristic anatomical and pathological characteristics, both macroscopic and microscopic (Perl, 2010; Serrano-Pozo *et al.*, 2011; Scheltens *et al.*, 2016; Chen and Mobley, 2019). Neuropathological characteristics are manifested mainly in the brain areas involved in memory, learning, and focal cognitive processes. At a macroscopic level, the most relevant is cortical atrophy, the thinning of the convolutions and widening of the grooves, the thickening of the meninges among others. Neuroimaging techniques allow visualization of cerebral atrophy and are helpful for diagnosis and disease progression (Halliday *et al.*, 2003; Rathore *et al.*, 2017). Moreover, main microscopic alterations characteristic of AD are: accumulation of protein aggregates (extracellular deposits of  $\beta$ -amyloid peptide and intraneuronal neurofibrillary tangles of hyperphosphorylated Tau) (Kumar and Tsao, 2019), decreased synaptic density and neuronal degeneration in the affected brain areas and the neuroinflammatory process mediated by glial cells (Heneka *et al.*, 2015). It is postulated that this neurodegeneration has a multiple origin, involving different processes such as protein aggregation, oxidative stress, or inflammatory response, among others, and which, in turn, may be interconnected. (Anand *et al.*, 2014). Due to this multiple and complex etiology, the pharmacological alternatives of prevention and therapy of this disease could be more successfully addressed by the use of drugs that act at the level of several of these dysfunctions simultaneously. It is also desirable to find the optimum concentration of such drugs, which enables effective prevention and treatment of neurodegenerative diseases without causing tissue or cellular toxicity. Finally, preferably such drugs must be able to cross the blood-brain barrier so that, upon administration, they may exert their effect on the affected area.

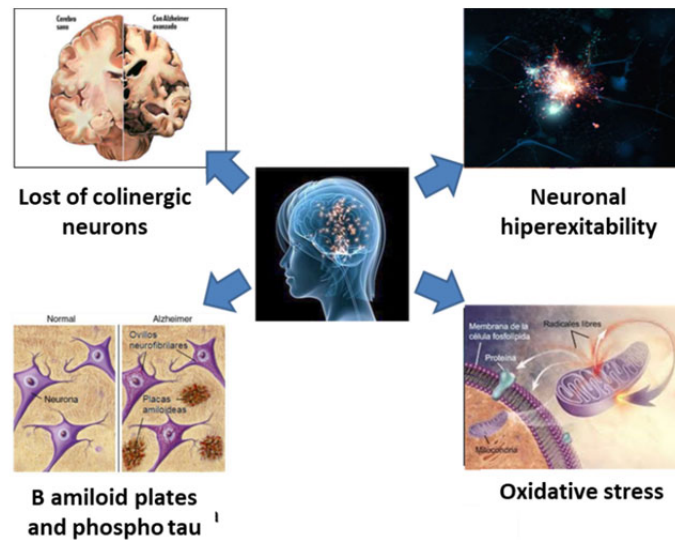


Figura 67. Pathogenesis and physiopathology of Alzheimers disease.

### 1.2.2. Amyloid theory

Hardy and Higgins proposed in 1992 the theory of the amyloid cascade, where it is established that the accumulation of the A $\beta$  peptide in the brain is the initial cause of the development of Alzheimer's disease (Hardy and Higgins, 1992).

Since then, many experimental evidences have been found to support it (Barge and Sonawane, 2015), but there are still gaps in this hypothesis, such as the fact that there is no correlation between amyloid load and cognitive damage (Ricciarelli and Fedele, 2017). Another problem with this theory is that no cognitive improvement has been found in individuals immunized against A $\beta$ 42 despite the decrease in amyloid load observed (Benilova *et al.*, 2012; Shimizu *et al.*, 2013; Sevigny *et al.*, 2016; Selkoe, 2019)

That is why a review of this hypothesis has been made where it is proposed that neurodegeneration is produced by the gradual accumulation of toxic oligomeric forms that are released into the environment and that would trigger a cascade that leads to synaptic alterations, activation of microglia and astrocytes, modification of the solubility of the tau protein and progressive neuronal loss (Hardy and Selkoe, 2002; Haass and Selkoe, 2007; Selkoe and Hardy, 2016).

#### 1.2.2.1. APP and $\beta$ amyloid

The A $\beta$  peptide is a physiological peptide of 36 to 43 amino acids, which is produced in healthy individuals and whose levels are achieved by a balance between synthesis and degradation (Kang *et al.*, 1987; Suh and Checler, 2002; Iwata *et al.*, 2005). Some of its biological functions include kinases activation, protection against oxidative stress, regulation of cholesterol transport acting as a transcription factor and

antimicrobial activity (especially associated with its pro-inflammatory action) (Müller and Zheng, 2012; Coronel *et al.*, 2018).

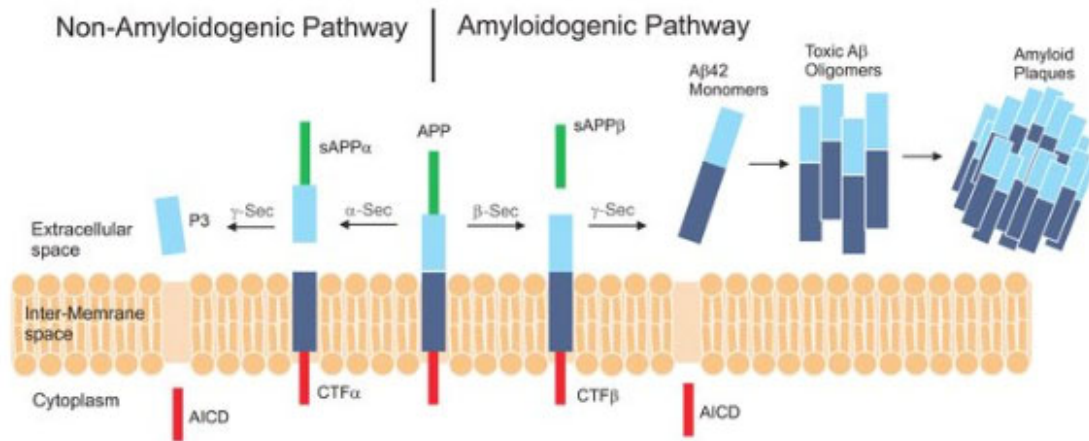
This peptide is derived from the amyloid precursor protein (APP) that belongs to a family of transmembrane proteins type I highly conserved evolutionarily and comprising a long N-terminal extracellular domain, a transmembrane region and an intracellular C-terminal domain (Gralle and Ferreira, 2007; Hefter and Draguhn, 2017; Zhang and Song, 2017). It presents eight isoforms derived from an alternative splicing process, of which three are the most common: APP695, APP751 and APP770 (Zhang and Song, 2017). The isoforms of 751 (APP751) and 770 (APP770) amino acids are mainly expressed in non-neural cells, while the isoform of 695 amino acids (APP695) is predominantly expressed in neurons (Haass *et al.*, 1991). The APP protein, in addition, undergoes a series of modifications from the time it is synthesized in the reticulum until it reaches its destination in the plasma membrane, including glycosylations, N- or O-, phosphorylations and sulphatations (Walter *et al.*, 1997). During its secretion and internalization through the secretory pathway, APP can undergo various proteolytic cleavages by the activity of three secretases ( $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -). Depending on which enzyme cleaves the APP protein, it will be processed by the non-amyloidogenic or by the amyloidogenic route. Under normal conditions, cleavage by  $\alpha$ -secretase (non-amyloidogenic pathway) exceeds the amyloidogenic pathway (Hefter and Draguhn, 2017; Zhang and Song, 2017).

### ***Non-amyloidogenic pathway:***

The first cleavage is performed by  $\alpha$ -secretase (ADAM10: A Disintegrin and Metalloproteinase 10), and a fraction of the N-terminal fragment of the APP is produced, which is called soluble APP alpha (APPs $\alpha$ ), with neuroprotective and synaptic plasticity properties (Endres and Deller, 2017; Hefter and Draguhn, 2017). After this cleavage, the C83 fragment is also generated, which when processed by the  $\gamma$ -secretase releases a p3 extracellular peptide and a soluble C-terminal fragment called AICD. AICD is released to the cytosol and has a very short half-life. It may be involved in gene transcription regulation (Hefter and Draguhn, 2017; Zhang and Song, 2017).

### ***Amyloidogenic pathway:***

Excision of APP by the enzyme  $\beta$ -secretase (BACE-1) (Vassar *et al.*, 2009) generates a soluble fragment called APP soluble beta (APPs $\beta$ ) with unknown, non-neurotrophic function (Hefter and Draguhn, 2017), and the C99 fragment which is anchored in the membrane. C99 is subsequently processed by the  $\gamma$ -secretase releasing the neurotoxic peptide A $\beta$  and AICD (Zhang and Song, 2017)(Takami *et al.*, 2009; Zhang and Song, 2017).

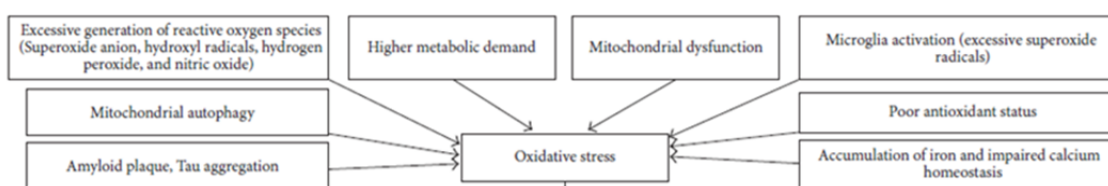


**Figura 68. Amyloidogenic and non Amyloidogenic pathway of  $\beta$  amyloid.** The type 1 transmembrane protein APP is processed by two pathways: the nonamyloidogenic pathway and the amyloidogenic pathway. In the nonamyloidogenic pathway, APP is cleaved by  $\alpha$ -secretase to produce the soluble sAPP $\alpha$  and the C-terminal fragments,  $\alpha$ -CTF (C83), which is then cleaved by  $\gamma$ -secretase to yield the APP intracellular domain (AICD) and P3 peptide; while in the amyloidogenic pathway,  $\beta$ -secretase cleaves APP to produce the soluble fragment sAPP $\beta$  and the C-terminal fragments,  $\beta$ -CTF (C99). C99 is then cleaved by  $\gamma$ -secretase to release AICD and Ab peptides of varying length.(Bachurin *et al.*, 2017).

### 1.2.3. Oxidative stress

There is a great number of evidence linking oxidative stress and neurodegeneration diseases, such as Alzheimer's disease or Parkinson's disease (Andersen, 2004; Chen *et al.*, 2012; Manoharan *et al.*, 2016). In fact, oxidative stress has been related to alteration of normal processing of the precursor protein of  $\beta$ -amyloid (APP) (Multhaup *et al.*, 2002) or Tau phosphorylation (Melov *et al.*, 2007), proteins closely linked to Alzheimer's disease. Another fact to consider is that the clinical treatment of oxidative stress reduces the incidence and severity of Alzheimer's disease (Esteves *et al.*, 2009). In fact, there are studies that indicate the use of antioxidants as one of the best preventive therapies for this disease, (Zhao, 2009; Manoharan *et al.*, 2016).

Moreover, the products of the oxidation of lipids, proteins, and nucleic acids have been considered as possible biomarkers for early AD diagnosis. Some examples are aldehydes malondialdehyde (MDA) or 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE) as products of lipid peroxidation; carbonyl proteins as protein oxidation; or the measurement of modified bases (nucleoside 8-OHdG) to determine oxidative damage to DNA (Skoumalová and Hort, 2012; Umeno *et al.*, 2017).



**Figura 69. Causes of oxidative stress in Alzheimer's disease.**



### 1.2.4. Neuroinflammation

The role of inflammation in Alzheimer's disease has been studied for many years (Morales *et al.*, 2014). This inflammation appears in response to a series of signals including lesions, infection, oxidative agents and certain degrees of oligomerization of the Tau protein and  $\beta$  amyloid. It appears that the neuroinflammatory response is activated in the areas surrounding the formation of senile plaque and releases proinflammatory signals such as cytokines. Specifically, within the immune system, microglial cells on the one hand phagocytose and degrade  $\beta$  amyloid (Lee *et al.*, 2009), acting as a repair system, but on the other hand, they may be responsible for tissue destruction and neuronal death. Thus, depending on the balance between activating and inhibitory signals, the microglia will participate more in the induction of neuronal death (favouring the disease) or in the decrease of  $\beta$  amyloid aggregates (inhibiting the development of the disease). It is very interesting to note that the phagocytosis of amyloid  $\beta$  *in vivo* is inhibited when proinflammatory cytokines (Koenigsknecht-Talboo, 2005). Moreover, an improvement in Alzheimer's disease has been observed in mice when, when treated with anti-inflammatory agents, an improvement in the phagocytic response to  $\beta$  amyloid (Heneka *et al.*, 2005).

Therefore, it remains to determine whether neuroinflammation is a secondary consequence to the pathological process that occurs in AD, or one of the causes that could lead to its onset and development.

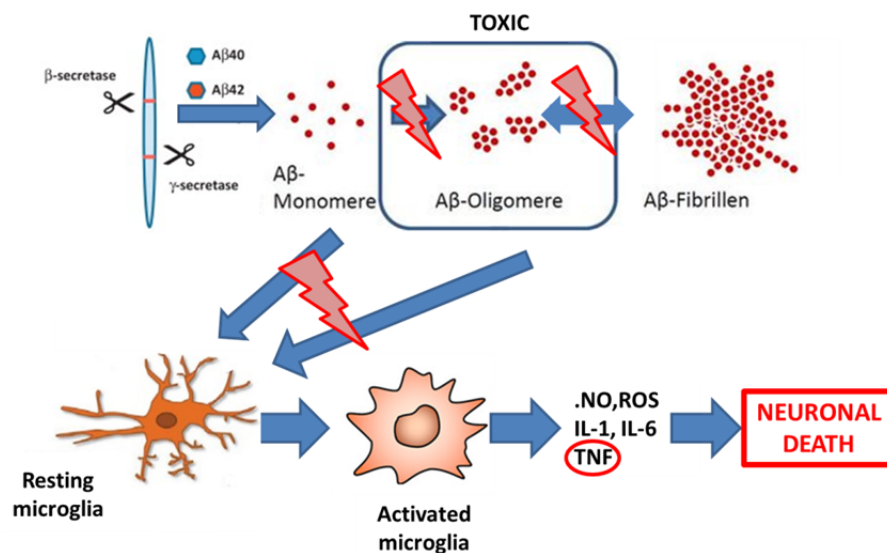


Figura 70. Inflammation model in Alzheimer's disease

### **1.2.5. Microglia activation**

Due to the presence of the blood brain barrier (BBB) the Central Nervous System has restricted access of mediators and immune cells to brain tissue. As previously mentioned, a neuroinflammatory reaction mediated primarily by components of the innate immune response occurs in most neurodegenerative diseases, in which microglia and astroglia participate (Heneka *et al.*, 2014).

Microglia is a type of macrophage with phagocytic function capable of activation in different ways (Tang and Le, 2016). Under normal conditions, the microglia, with its phagocytic capacity, removes dead cells, tissue debris or toxic products, such as A $\beta$  (Hirbec *et al.*, 2017; Shen *et al.*, 2017). It also can perform tissue reparation and secrete neurotrophic and protective factors. However, if the activation of the microglia is excessive, the effect can be detrimental, by secreting proinflammatory and anti-inflammatory mediators and releasing free radicals and causing a state of chronic inflammation in the tissue (Ramirez *et al.*, 2017).

#### ***Classical activation (M1)***

It occurs after exposure to IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , or to different inducers such as toxins or protein aggregates (Murray and Wynn, 2012; Patterson and Holahan, 2012). As a consequence, microglial cells produce the release of a series of neurotoxic factors, which includes reactive oxygen species (ROS), cytokines and chemokines (Boche *et al.*, 2013; Tang and Le, 2016).

All these factors are aimed at the activation and maintenance of a toxic inflammatory response that protects the CNS from the harmful agent. However, if the inflammatory response is uncontrolled it could cause cell damage and neurodegeneration due to the presence of these cytotoxic factors (Boillée and Cleveland, 2008).

#### ***Alternative activation (M2)***

The alternative response inhibits the classical activation of immune cells and promotes tissue repair and recovery from homeostasis, through the release of cytokines and anti-inflammatory receptors and growth factors (Imai *et al.*, 2007; Boche *et al.*, 2013; Chhor *et al.*, 2013). In these cases, the “alternative” profile implies a beneficial and neuroprotective role in the brain, since the microglia performs the cleaning of toxic material, such as apoptotic neurons or protein aggregates, the secretion of neurotrophic and protective factors such as glutathione and the withdrawal of the neurotoxic neurotransmitter glutamate (Kettenmann *et al.*, 2013; Tang and Le, 2016). The M2 phenotype is classified into three subtypes according to the mediators responsible for its activation and the characteristic markers they express (Colton *et al.*, 2006; Cherry *et al.*, 2014).

The microglia, therefore, could have a neuroprotective or neurotoxic role depending on the type of stimulus. The reality is that stimuli are not always clearly "classic" or "alternative". An example is what happens with beta-amyloid aggregates produced in neurodegenerative diseases (Ravichandran and Lorenz, 2007; Jaini *et al.*, 2013). Javier Vitorica's group has shown that in the hippocampus of the PS1xAPP mouse model there is a microglial activation with an alternative phenotype at the beginning of the pathology (at 6 months), and a classic cytotoxic phenotype at an advanced stage of the disease (at 18 months of age) (Jimenez *et al.*, 2008; Pintado *et al.*, 2011). Therefore, the accumulation of the A $\beta$  peptide in the advanced stages of AD may be indicative of poor microglia (Guerreiro *et al.*, 2013). In fact, in support of this hypothesis, several mutations with loss of function have been identified in TREM2 (receptor of the microglia involved in phagocytosis) that confer a high risk of developing AD (Griciuc *et al.*, 2013; Guerreiro *et al.*, 2013; Ramirez *et al.*, 2017) since they can trigger the loss of phagocytic capacity in microglial cells.

### **1.3. Compatible solutes: a type of natural compounds**

Historically, medicine has relied on natural compounds for inspiration. Many medications used today are natural products or derivatives of them. In recent years, much progress has been made in the understanding of both the synthesis and the possible uses of these compounds, opening the door to a new branch in research for both academia and industry (Clardy and Walsh, 2004; Sgarbossa, 2012). Some of these substances have been the subject of much research due to some of their chemical properties with a high antioxidant, anti-inflammatory and/or antiplatelet capacity (Sgarbossa, 2012; Kamat *et al.*, 2016; Zaman *et al.*, 2019). Some examples stand out as the polyphenolic compounds present in foods such as green tea (epigallocatechin-3-gallate), wine (resveratrol), plant extracts (bilobalide, crocin), nuts or roots such as turmeric (curcumin) (Iwata *et al.*, 2005; Masters and Beyreuther, 2006; Biancalana and Koide, 2010; Sgarbossa, 2012; Ansari and Khodaghali, 2013; Finley and Gao, 2017; Korani *et al.*, 2019).

A source of new bioactive compounds are extremophiles organisms, which are adapted to extremely high salinities and other environmental extremes like high (or low) temperature (Lentzen and Schwarz, 2006; Ryu *et al.*, 2008; Jorge *et al.*, 2016). One of these adaptations is the synthesis of compatible solutes

Compatible solutes are small organic molecules that accumulate in most organisms in response to different types of stress (osmotic, thermal, etc.) and that exert a protective effect *in vivo* due to their ability to stabilize cellular proteins but also toward whole cells and nucleic acids (Brown, 1976; Lippert and Galinski, 1992; Oren, 1999). These molecules can be of different nature, they can be sugars, such as trehalose or derivatives and also

amino acids (Figure 7).. Specifically in this work we will focus on ectoines, 2 compounds that are synthesized by *Chromohalobacter salexigens*, of amino acid nature (fig).

### **1.3.1. Ectoines**

Ectoine and its hydroxylated derivative, hydroxyectoine, are primarily synthesized by halophilic bacteria. Due to their biostabilizing and protective nature, both molecules are marketed as cosmetic components. There are currently more than 200 cosmetic products on the market that contain ectoine and some of them are only available in pharmacies ([www.bitop.de](http://www.bitop.de); [www.ectoin.net](http://www.ectoin.net)). In addition, ectoines are also marketed in biostabilizer solutions for the protection of nucleic acids or enzymes in laboratory tests (Lippert and Galinski, 1992; Harishchandra *et al.*, 2010; Bownik and Stępniewska, 2016; Zaccai *et al.*, 2016; Meyer *et al.*, 2017; Salmannejad and Nafissi-Varcheh, 2017).

### **1.3.2. Applications in medicine**

The potential applications in the field of biomedicine are mainly due to its anti-inflammatory (Buommino *et al.*, 2005) or antioxidant capacity (Lentzen and Schwarz, 2006). There are studies in vitro and with animal models demonstrating that ectoine protects both skin cells and lung cells with allergens and nanoparticles (Sydlik *et al.*, 2009, 2013; Autengruber *et al.*, 2014; Kroker *et al.*, 2015; Unfried *et al.*, 2016). It has also been described that ectoine prevents inflammatory responses associated with inflammatory bowel disease (IBD), using colitis as a model (Abdel-Aziz *et al.*, 2013, 2015).

Other applications are its use in nasal sprays or eye drops against allergic rhinitis (Sonnemann *et al.*, 2014; Werkhäuser *et al.*, 2014) or nasal sprays for acute rhinosinusitis (Eichel *et al.*, 2013, 2014; Mösges *et al.*, 2017; Dao *et al.*, 2019; Tran *et al.*, 2019) or its use in creams against dermatitis (Heinrich *et al.*, 2007; Marini *et al.*, 2014). In addition, its use in organ transplantation or in cancer has been considered (Pech *et al.*, 2013; Kanapathipillai, 2018)].

### **1.3.3. Ectoine in neuroprotection**

Its possible use in human neurodegenerative diseases is currently being studied not only because they possess antiaggregant capacity (Pastor *et al.*, 2010; Jorge *et al.*, 2016), but also with the combination also antioxidant and inhibitory properties of the inflammatory response (Buommino *et al.*, 2005) which gives them great added value as possible biopharmaceuticals.

In addition, the inhibitory effect of ectoines on amyloid aggregates, characteristic of neurodegenerative diseases, or the inhibitory activity of aggregation and neurotoxicity of prionic peptide 106-126, insulin amyloid formation, and apoptosis induced by the

## CAPÍTULO 2. INTRODUCTION

protein responsible for Machado's disease -Joseph, are examples that show their biomedical potential (Furusho *et al.*, 2005; Kanapathipillai *et al.*, 2005, 2008).

\*\*\*\*\*

All of this suggests that a molecule with antiaggregant properties that additionally decreases oxidative damage would be a good candidate as a drug against Alzheimer's disease, in which both oxidative stress and inflammation derived from protein aggregation (Mann, 1998; Kanapathipillai *et al.*, 2005; Bazazzadegan *et al.*, 2017).

## **2. MATERIAL AND METHODS**

## **2.1. *In vitro* neuroprotective capacity assay when neuronal death is caused by induced oxidative damage**

The measurement of the neuroprotective activity from oxidative damage was carried out in an human neuroblastoma SK-N-MC cell model (Recuero *et al.*, 2009) that involves cells being driven to apoptotic death by oxidative stress induced by a free radical-generating system (Fatokun *et al.*, 2007) on neuronal cells. Briefly, human neuroblastoma SK-N-MC cells were subjected to oxidative stress by means of the xanthine/xanthine oxidase system (XXO)(Ukeda *et al.*, 1999), in the presence or absence of ectoine and hydroxyectoine. Subsequently, cell viability was determined by quantifying the metabolic activity by means of the WST-1 test (Roche). In this way a neuroprotective compound will prevent or reduce the percentage of cell death produced by oxidative stress.

### **2.1.1. Cell culture and treatment.**

Cells were cultured in minimal essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100mUmL<sup>-1</sup> penicillin G and 100µgmL<sup>-1</sup> streptomycin in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. Exponentially growing stock cells at 80–90% confluency were placed in culture dishes with six multi-wells (M-6), or alternatively in 96-multiwell plates (M-96), one day before stimulation. On the day of stimulation, cells were placed in fresh medium for 1h before treatment to create the same conditions in each well. Previously to the neuroprotective assay, the concentration of XXO that produces the death of 50% of the cells, which corresponds to the lethal concentration 50 (LC<sub>50</sub>), was determined and was further used in later assays to induce cell death. The maximum tolerated dose (MTD) (concentration at which no cell death occurs) of the compounds to be tested, was established at 3 mM, since at this concentration more toxicity (up to 10%) was detected than with XXO. Thus, three independent tests were carried out with the ectoine and hydroxyectoine at decreasing concentrations in triplicate (3; 1; 0.2; 0.1; 0.02; 0.01; 0.002; 0.001 and 0.0001 mM) and together with XXO at a concentration equal to its LC<sub>50</sub>. In addition, a validated positive neuroprotection control was included in this system, as a control of the trial and also a blank by triplicate.

### **2.1.2. Cell viability.**

Cell viability was determined by quantifying the metabolic activity by means of the WST-1 test (Roche)(Ukeda *et al.*, 1999). This is a colorimetric assay that is based on the ability of the cells to obtain the necessary energy to maintain their metabolic functions and cell growth. Thus, metabolically active cells (viable) will be able to reduce by mitochondrial dehydrogenases (succinate-tetrazolium reductase) a tetrazolium salt (MTS)

to form formazan that could be colorimetrically detected. On the contrary, this reaction will not occur in highly damaged or dead cells. Briefly, cells were grown in a 96-well tissue culture plate (100  $\mu$ l/well) and incubated with a 1:10 dilution of WST-1 reagent (10  $\mu$ l/well) for 0.5-4 hours. The reaction was stopped by adding 1% Triton X-100/ 0.1% SDS (final concentration) and further incubated 5 min at 37 °C. After this incubation period, the formazan dye formed was quantified with a scanning multi-well spectrophotometer (ELISA reader) at 420 nm. The measured absorbance directly correlates to the number of viable cells. The data are represented as the percentage of death obtained for each concentration of the compounds tested referred to the death produced by the XXO.

Human neuroblastoma SK-N-MC cells were obtained from the American Type Culture Collection (HTB-10; ATCC). Xanthine was purchased from Sigma and xanthine oxidase from Roche. Culture medium components were purchased from Gibco Laboratories. Other chemicals were purchased from Merck or Sigma.

## **2.2. *In vitro* neuroprotective capacity assay using an inflammatory neuronal cell model**

### **2.2.1. Cell culture**

The N13 line is derived from murine primary cells immortalized by the use of oncogenic retroviruses. These immortalized cells, after their stimulation with LPS, produce a set of cytokines similar to the primary microglia (Righi *et al.*, 1989).

The cells were grown in RPMI 1640 (PAA, Linz, Austria) supplemented with 2 mM glutamine (PAA, Linz, Austria) and 10% (v/v) fetal bovine serum (PAA, Linz, Austria), 100 U/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin (PAA, Linz, Austria) at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Cells were grown to confluence in tissue flasks and then plated on 6-wells plastic plates (Nunc, Thermo Fisher Scientific, USA) in culture media, at 0.5 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/well cellular density.

In our assay, curcumin was used as an anti-inflammatory control compound at a concentration of 20  $\mu$ M. LPS (Lipopolysaccharide) and ADDL (Amyloid-beta Derived Diffusible Ligands), which have different mechanisms of action, were used as agents that induce inflammation. LPS is a bacterial lipopolysaccharide and ADDL is a soluble oligomer that is formed from the aggregation of beta-amyloid monomers.

### **2.2.2. A $\beta$ 42 oligomeric peptide preparation.**

In this case, ADDL was synthesized from the aggregation of artificial beta-amyloid, obtaining a product (A $\beta$  42 peptide) that produces an inflammatory effect very similar to that produced during Alzheimer's disease (Heneka and Banion, 2007) .



To prepare the A $\beta$ 42 peptides we follow a procedure very similar as previously described (Jimenez *et al.*, 2008; Ojha *et al.*, 2011). Briefly, 0.5 mg of synthetic lyophilized A $\beta$ 42 peptide (human sequence; AnaSpec) were dissolved in 100  $\mu$ l of HFIP (1,1',1'',3,3',3''-hexafluoro-2-propanol, Sigma) and incubated at 4 °C for one hour with soft shaking. Subsequently, 5 aliquots of 20  $\mu$ l were taken and the HFIP was totally evaporated using a centrifugal concentrator (Jouan RC10.22; Thermo Fisher Scientific) during 20 minutes. The pellet of one of the aliquots was dissolved in 4.43  $\mu$ l of DMSO and incubated 15 minutes at room temperature, obtaining monomeric A $\beta$ 42 peptide at a concentration of 5 mM. After that, ice-cold PBS 1X was added to reach a final A $\beta$ 42 concentration of 100  $\mu$ M (0.45  $\mu$ g /  $\mu$ l). In this way, we obtain the monomeric Abeta directly or, if we incubate it at 4 °C with gentle agitation for 24 hours, we will obtain oligomeric Abeta (OC-positive oligomeric A $\beta$ 42 peptide or ADDLs). Additionally, aliquots of monomeric A $\beta$ 42 peptide (5 mM or 0.5 mM) were also incubated in the presence of different concentration of ectoine (0.01; 0.1; 1; 10 and 100 mM). The presence of monomeric A $\beta$ 42 peptide or ADDLs was tested by Western blot using 6E10 antibody and also by Atomic Force Microscope (AFM).

### 2.2.3. Treatment

N13 neuronal cells from mouse microglia were incubated for 3 hours in the presence of LPS (0.01  $\mu$ g/ml) or oligomeric A $\beta$ 42 peptide (ADDL) (0.5  $\mu$ M or 5  $\mu$ M) to induce inflammation therein. As a control of anti-inflammatory treatment, cells were pre-incubated in the presence of curcumin (20  $\mu$ M) for 90 minutes and subsequently incubated in the presence of each of the inflammatory agents LPS or ADDL for 3 hours. On the other hand, cells were also incubated with monomeric A $\beta$ 42 peptide (0.5  $\mu$ M or 5  $\mu$ M) oligomerized in the presence of ectoine (0.01; 0.1; 1; 10 and 100 mM). Once the different treatments were finished, the cells were collected, the total RNA was isolated and the cDNA was obtained by retrotranscription. Subsequently, the expression levels of TNF $\alpha$  in the cells treated were measured by qPCR to observe the effect on cellular inflammation of the different treatments.

### 2.2.4. RNA and Protein Extraction

The method used for RNA and protein extraction is based on the different solubility of the different biomolecules in organic solvents (phenol and chloroform). The process is carried out using the Trisure (Bioline) or Tripure (Roche) reagents and following the manufacturer's recommendations. These reagents contain guanidine thiocyanate, a chaotropic agent that breaks down the membranes and denatures the proteins, including proteases, DNAases and RNAases. These last ones are very resistant to most physical agents, and their denaturation is essential to avoid RNA degradation.

The sample is homogenized and lysed before being separated into three phases: the upper aqueous phase corresponds to RNA, while proteins, lipids and DNA are found at the interface and organic lower phase. Therefore, from this three-phase solution, we can isolate both RNA and proteins, which are denatured, so they can only be used for WB studies.

### **2.2.4.1. RNA Extraction**

To obtain an RNA extraction as appropriate as possible, we have to minimize ribonuclease activity in the initial stages of extraction. For this, it is important that both reagents and work material are free of RNases, so we routinely choose to treat the water with diethylpyrocarbonate (DEPC; Sigma) at a concentration of 0.1% (w / v) (Fedorcsák and Ehrenberg, 1966), for 12 hours. After this period, excess DEPC is eliminated by heat treatment, since it can alter the RNA by carboxymethylation. All reagents and fungible material of commercial origin used during this process are acquired free of RNAs.

The RNA is extracted from the aqueous phase by isopropyl alcohol precipitation (Chomczynski and Sacchi, 2006). Briefly, the upper aqueous phase is carefully extracted and the RNA is then precipitated by adding isopropanol (Sigma) (0.5ml per initial ml of Tripure/Trisure added) and 0.5µl glycogen (Thermo Scientific) and incubated overnight at -20 °C. Next day, the RNA is incubated at room temperature for 10 min, and centrifuged at 12,000xg, for 15min at 4 ° C. The RNA pellet obtained is washed with 75% Ethanol (Scharlau) prepared with DEPC-water (1ml per ml of Tripure/Trisure) and then, centrifuged again at 12,000xg, for 15 min at 4 ° C. The pellet obtained is allowed to dry and resuspended in DEPC-water (RNAs free).

The highly effective RNase inhibitory property of the reagent protects the integrity of the RNA during the lysis and results in the isolation of high-quality material. The recovery of RNA was comparable in all groups (1.2–1.5 µg/mg of cell culture).

### **2.2.4.2. Total protein extraction**

From the previous three-phase solution, we use the intermediate phase and the lower organic phase to extract total proteins. First of all, in order to avoid contamination by genomic DNA, we precipitated it with ethanol (0.3 ml per initial ml of Tripure/Trisure). The proteins are then precipitated with isopropanol, using 1.5 ml of isopropanol for each ml of Tripure/Trisure reagent added in the homogenization. The protein pellets obtained were then resuspended in 4% SDS (Applichem) and 8 M urea (Applichem) in 40 mM Tris-HCl, pH 7.5 and incubated overnight at room temperature in a rotary incubator. The total recovery and integrity of these fractions were determined by Lowry method (Lowry *et al.*, 1951) and SDS-PAGE.

### **2.2.5. Reverse transcription**

Reverse transcription (RT) was performed using random hexamers primers, 3 µg of total RNA in DEPC water as template and the "High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit" (Applied Biosystems) following the manufacturer's recommendations as previously described (Ramos *et al.*, 2006; Jimenez *et al.*, 2008, Gavilán *et al.*, 2009).

### **2.2.6. Real-time PCR**

For real time RT-PCR, each specific gene product was amplified using commercial Taqman probes, following the instruction of the manufacturer (Applied Biosystems). PCR reactions were carried out in a ABI Prism 7900HT sequence detector systems (Applied Biosystems) as previously described (Gavilán *et al.*, 2009).

It is not necessary to carry out efficiency and specificity tests when Taqman probes are used since the hydrolysis probes supplied by Applied Biosystems have previously passed quality controls that guarantee the specificity for the target sequence and the amplification efficiency in the cycle threshold.

The cDNA levels of the different N13 cells culture were determined using GAPDH as housekeeper. Therefore, GAPDH amplification was done in parallel with the gene to be analysed, and this data used to normalize target gene results. Independently of the analysed gene, results were always expressed using the comparative Ct method, following the Bulletin number 2 from Applied Biosystems.

Taqman probes used to quantify mRNA expression of the different markers analysed in this work were: GAPDH (Mm99999915\_g1) and TNFα (Mm00443258\_m1).

### **2.2.7. Protein quantification (Lowry Method)**

Protein concentration is determined using the Lowry method (Lowry *et al.*, 1951). The standard curve is constructed using bovine serum albumin (BSA; Sigma) with a sensitivity range of 10-100 µg, and the absorbance is determined at 750 nm. When determining the concentration of proteins solubilized with 4% SDS -UREA 8M, we add to the standard curve the same percentage of urea and SDS. To each reaction, 25 µl of the copper-tartrate mixture is added (5% CuSO<sub>4</sub>; 10% Na K Tartrate and 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 0.5N NaOH in a 1: 1: 100 ratio) and incubate at room temperature for 10 min. Next, we add the Folin & Ciocalteu reagent (Sigma) diluted in water (1: 1), and wait 20 min. Finally, the absorbance of each sample is read at 595 nm and the standard curve is carried out to calculate the protein concentration of each sample.

### 2.2.8. Western Blot

Western blot analysis of the *in vitro* assay was performed with small differences as previously described (Sherman and Lesné, 2011). Briefly, 1  $\mu$ l of the peptide preparation was loaded in a Tis-Tricine gel and separated by SDS-PAGE and transfer to nitrocellulose (Hybond-C Extra; Amersham). After blocking, membranes were incubated overnight at 4 °C in the monoclonal 6E10 antibody (1:2000; Sigma-Aldrich). Membranes were incubated in the secondary antimouse biotinylated antibody (1:6000). Each blot was developed using the ECL-plus detection method (Amersham) and quantified using Image-Quant Las 4000 mini gold (GE Healthcare Bio-Sciences). For normalization purposes, proteins were first estimated by the Lowry protein assay and protein loading was corrected by beta-actin.

### 2.2.9. Atomic Force Microscope (AFM)

The size and morphology of preparations of A $\beta$ 42 peptide and of monomers aliquots that were incubated in the presence or absence of ectoine were evaluated by using an atomic force microscope (AFM/STM Molec, Imaging PicoPlus 2500) in "tapping mode". Additionally, a PPP-NCHR-20 microcantilever (Nanosensors) model with the following characteristics of resonance frequency and force constant respectively was also used:  $f = 204\text{-}497$  kHz,  $k = 10\text{-}130$  N / m. According to the manufacturer, the diameter of the tip of the probe was ranged between 10 and 15  $\mu$ m. 30  $\mu$ l of a 10  $\mu$ M A $\beta$ 42 samples solution was deposited on an, previously, exfoliated mica and incubated at room temperature, in a humid chamber, for 20 minutes. Afterwards, it was washed with abundant deionized water (MilliQ) and left to dry, taking special care to avoid any possible contamination of the surface (Cizas *et al.*, 2010). The images were acquired with low sweeping speeds, between 0.4 and 0.6 Hz, keeping the amplitude and the force to a minimum. The particle size was estimated by measuring the profile within the plane of the sample and the heights of the A $\beta$  aggregates ("Z height") were estimated using also the flattening module of the WSXM software (Horcas and Fernández, 2007). Thus, all the images obtained were treated using WSXM 4.0 Beta 4.2 software. Finally, some of the grayscale images were converted into a binary image to estimate the optical densities that were defined as pixel units. Then they were related to the size of the particles found to finally perform population distribution analyses of the different particles sizes.

### **2.3. *In vivo* assay to determine ectoine passage through the blood-brain barrier and quantitative brain time permanence**

#### **2.3.1. Animals**

C57 wild type (WT) male mice of 3 months age were purchased from the University of Seville (Centro de Producción y Experimentación Animal (Espartinas, Sevilla), Universidad de Sevilla, Spain).

#### **2.3.2. Treatment**

For the assay, 8 C57 male mice (age: 3 months) were used. They were injected in the peritoneal area with a sterile solution of 6 mg ectoine in PBS using a dose of 200-250 mg/kg. 3 mice groups (2 mice per group) were treated by injecting in the peritoneal area a sterile solution of 6 mg ectoine in PBS using a dose of 200-250 mg/kg and were exposed to different times: 30 min, 3 hours, 24 hours and 72 hours. As control, an additional 2 mice group was inoculated only with PBS and considered as ectoine negative group samples. Once the time of exposure to the compound was over, the animals were sacrificed to extract and analyse the brain.

#### **2.3.3. Perfusion and sacrifice of the mice.**

Prior to brain extraction, each mouse was perfused with phosphate buffered saline (PBS) to avoid contamination with circulating blood. Mice were anesthetized with sodium pentobarbital (Dolethal®, 60 mg / Kg) and transcardially perfused with 0.1 M PBS pH 7.4 for 5 minutes at a continuous flow of 10 ml / minute, using an infusion pump (DINKO Model D-25V). Next, the animals were decapitated for subsequent complete brain extraction and separation of the different fractions: cortex, hippocampus and rest. The cortex and the hippocampus are the areas in which the pathology produced by Alzheimer's is located.

#### **2.3.4. Soluble proteins (S1) isolation:**

This method allows us to separate the soluble fraction of extracellular and cytosolic proteins by differential ultracentrifugation in aqueous medium and in absence of detergents.

Each brain fraction was homogenized in a Dounce's homogenizer (Wheaton) using an isotonic salt tris-buffer solution (NaCl 140mM in Tris-HCl 20mM (AppliChem), pH 7.4) containing protease (Complete, Roche) and phosphatases inhibitors (NaF (Sigma) 50mM and Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Sigma) 1mM, pH). Subsequently, each sample was ultra-centrifuged

(Optima™ MAX Preparative Ultracentrifuge, Beckman Coulter) at  $100,000 \times g$  and  $4^\circ\text{C}$  for 60 min (Jimenez *et al.*, 2008; Tomic *et al.*, 2009; Esparza *et al.*, 2017).

The supernatant that we obtain from this ultracentrifugation corresponds to the soluble protein fraction or S1, while in the precipitate the remains of membranes, protein aggregates and insoluble proteins remain.

Immediately after centrifugation; the samples were aliquoted and store at  $-80^\circ\text{C}$  until use. The protein content in the soluble fractions was determined by the Lowry protein assay.

### **2.3.5. Ectoine extraction and quantification by LC-MS:**

S1 fractions are very rich in proteins that may interfere in posterior spectroscopy analysis (Nguyen *et al.*, 2010). That is why we proceed to protein elimination with a spin 10-kDa cut-off filter (Millipore, Ireland). Samples were then centrifuged during 20 min at 10,000 rpm and  $4^\circ\text{C}$ .

The result of filtration was treated with a solution of methanol: chloroform: water (10: 5: 4), following the modified protocol of Bligh and Dye (Bligh and Dyer, 1959) as described by Kraegeloh and Kunte (Kraegeloh and Kunte, 2002) to carry out the ectoine extraction of the samples and their subsequent quantification by UPLC-MS (Argandoña *et al.*, 2010; Salvador *et al.*, 2018).

Chromatographic separation was performed using a UPLC Acquity (Waters) coupled to a Xevo TQS-micro (Waters) consisting of a triple quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray ion source operated in positive mode. UPLC analyses were performed on a Kinetex HILIC column (100x2.1 mm,  $2.6\mu\text{m}$ ) from Phenomenex, at a flow rate was  $0.4\text{ mL min}^{-1}$ . Chromatographic separation was performed using a binary gradient consisting of (A) ACN:H<sub>2</sub>O (90:10) (v/v), and (B) ACN:H<sub>2</sub>O (50:50) (v/v), both containing 5mM ammonium acetate and injection volume was  $2\mu\text{L}$ . The elution profile was: 0 % B (1 min), linear gradient to 100% B (4 min), 100 %B (1 min) and finally 0 % B (1 min). Multiple Reaction Monitoring (MRM) was applied where the parent ions and fragments ions were monitored at Q1 and Q3, respectively. The transitions employed for ectoine are 143.0/96.9 and 143.0/67.9 and for hydroxyectoine are 159.0/112.9 and 159.0/93.0, choosing the first one for quantitation and the others as confirmatory. For UPLC-ESI-MS/MS analyses, the mass spectrometer was set to the following optimised tune parameters: Capillary Voltage: 3.0 kV, Desolvation Source Temperature:  $500^\circ\text{C}$  and Desolvation and Cone Source Gas Flow: 1000 and 50 L/h, respectively.

## **2.4. *In vivo* neuroprotective capacity of ectoine in an Alzheimer's murine APP/PS1 model**

### **2.4.1. Transgenic APP/PS1 and litter sisters-brother mice generation:**

In this study we use APP/PS1 (PS1 $\Delta$ exon9xAPPs) mice that are double transgenic mice PS1dE9/APPS. These mice overexpress the APP gene in its 695 isoform with the Swedish mutation (K594M/M596L) described in Familiar Alzheimer cases, and PS1 gene who present a deletion in exon 9 (PS1dE9), under PrP promotor control.

Mice generation were developed at Neuron Bio company facility (Granada, Spain). Briefly, 6 APP/PS1 male mice of 3 months age were purchased from the University of Sevilla (Doctor Javier Vitorica colony maintained at the University of Seville, in the "Centro de Producción y Experimentación Animal", Espartinas, Spain.) with 16 female wild litter sisters and 20 commercial female mice C57BL/6 (Janvier) were crossed. For the assay, a total of 43 mice crosses (1♂ x 2-3♀ during a minimum of 10 days and a maximum of 28 days) were developed 1♂ x 2-3♀ to finally produce 33 APP/PS1 and 17 WT male-female litter sisters-brothers of APP/PS1 mice of 4.5 months age.

All animal experiments were performed in accordance with the guidelines of the Committee of Animal Research of the University of Seville (Spain) and the European Union Regulations (Directive 201/63/UE) following the Spanish normative (Real Decreto 53/2013).

### **2.4.2. Treatment.**

The mice obtained in the previous section were subjected to a treatment of 3 months, until reaching 7.5 months of age.

They were divided in 3 groups:

- WT male-female litter sisters-brothers of APP/PS1 mice (n= ) treated with ectoine (Group 1)
- APP/PS1 mice (n=....) treated with ectoine (Group 2)
- APP/PS1 mice (n=....) treated with the vehicle (physiological saline). (Group3)

A 3-times-per-week dose of 200 mg/kg of ectoine in physiological saline were administrated via intraperitoneal using a 30G x 8 mm – 0,5 ml (BD Micro-Fine) needle to Group 1 and 2 and only the vehicle was administrated in Group 3.

The weight of the mice was determined once a week both to adjust the inoculation volume and to control the health status of the mice. To administer the 200 mg/kg dose to each mouse, the volume to be inoculated was adjusted according to the

individual mouse weight. Initially, the volume used to administrate the 200 mg/kg dose was 100  $\mu$ l.

No mice showed visible abdominal damage due to the approximately 40 intraperitoneal administrations of treatment or vehicle.

### **2.4.3. Performance of the cognitive test of the water maze of Morris (MWM).**

One week after the end of the treatment, when mice were approximately at the age of 7.75 months, their cognitive state was determined by Morris Water Maze test (MWM test) as established by the PT-DD-112 technical protocol of MWM spatial memory. The processes used to carry out this test are based on the acquisition and spatial localization of visual signals that have to be processed, assimilated, stored and remembered in order to successfully find the platform and escape from the water (Kallai *et al.*, 2005). The time to reach the platform is considered as an index of learning, and the percentage of time in the target quadrant in the test at 24h as a memory index.

This test was developed in a 90 cm diameter pool containing water at  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . The pool was virtually divided into four quadrants. In the centre of the northeast quadrant a platform of 11 cm in diameter was placed and 1.5-2 cm submerged to hide it. Thus, the animals could only locate it based on pre-established extra labyrinth references. In addition, white tempera was poured into the pool in order to prevent mice from seeing the platform (also white). A total of 7 days of training were carried out with 4 trials each day, involving a total of 28 trials.

The eighth day of MWM testing and 24 hours after the last training, a test was performed to evaluate the memory of the mice. This test was recorded on video for further analysis using SMART v2.5 software from PanLab. In this test, the platform was removed from the pool and the animals were introduced into it from the quadrant opposite to that occupied by the platform during the entire training phase. Under these conditions the animals were allowed to swim for 60 seconds. The relationship between the percentages of time of permanence in the quadrant in which the platform was located (called the Target quadrant) and the average percentage of time in the rest of the quadrants was used as a memory index.

After the memory test a cued probe test were carried out to evaluate if the mice have any physical or visual problems that may affect them to correctly perform the test. In this case, the position of the platform is marked with a sphere that stands out from the water so the animals can visually locate the position of the same without the need to resort to extralabyrinthic signals. Those animals that did not correctly perform the



indicated test, that is, did not reach the platform in at least three of the four trials were discarded from the analysis of the memory test of the cognitive study. T-student was calculated to analyse the possible differences in learning and memory between the different groups.

Prior to the start of the cognitive study, the following exclusion criteria were established for animals to be taken into account during the analysis (Park *et al.*, 2011):

- **Learning test:** Those animals that showed a low exploratory tendency (low exploratory tendency in more than 30% of the trials) were excluded from the analysis.
- **Memory test:** Animals that have been excluded from the learning test; animals that showed Time in walls > 50%; animals that do not reach the platform during cued probe test in, at least, 3 trials.

### **2.4.4. Perfusion and sacrifice of the mice:**

After deep anaesthesia with sodium pentobarbital (Dolethal®, 60 mg/kg), mice were perfused transcardially with 0.1 M phosphate buffered saline (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1M (Merck) + NaHPO<sub>4</sub> 0.1M (Merck) + NaCl 0.132M (Panreac), pH 7.4) for 5 minutes at a continuous flow of 10 ml/minute, using a perfusion pump (DINKO Model D-25V). Brains were then removed and separated in two hemispheres: one for subsequent separation of the different fractions of interest (cortex and hippocampus) frozen in liquid nitrogen and maintained at -80°C until use. These samples were used for total protein and/or RNA extraction. The other hemisphere, destined to carry out immunohistochemical studies, is fixed during three days at 4°C by immersion in fixing solution PLP (paraformaldehyde 4% (Merk), L-Lysine 75 mM (Merk) y sodium meta-periodate 10mM (Merk)) in PBS 0.1 M pH 7.4, and changing the fixing solution every 24 hours. After fixation, the hemispheres are then immersed in a cryoprotective solution (30% sucrose (Applichem) and 0.02% sodium azide (Panreac)). Finally, the hemispheres are gradually frozen to avoid cell break, and maintained at -80°C until use.

### **2.4.5. Analysis of the brain, cortex and hippocampus regions:**

Dissected brain, cortex and hippocampal regions were treated to isolate RNA and proteins. Real-time PCR, western blots and immunohistochemistry was developed to analyse differences between ectoine-treated and not-treated APP/PS1 mice.

#### **2.4.5.1. RNA and Protein Extraction**

The method used for RNA and protein extraction is based on the different solubility of the different biomolecules in organic solvents (phenol and chloroform). The

process is carried out using the Trisure (Bioline) or Tripure (Roche) reagents and following the manufacturer's recommendations. See section 2.2.4.

For tissues, the process begins by adding about 1 ml tissue Trisure reagent per 50-100 mg tissue. Then we proceed to homogenize the sample with a polytron (Heidoph) for 15 seconds at maximum power. The homogenate is incubated 5 minutes at room temperature to allow complete dissociation of the nucleo-protein complexes.

### **2.4.5.2. Reverse transcription**

See section 2.2.5.

### **2.4.5.3. Real-time PCR**

After RT, the cDNA was diluted in sterile water and used as template for real-time qPCR. 40 ng of cDNA were mixed with Eagle Taq Master Mix (Sigma) and Taqman Gene Expression assay probes (Applied Biosystems) as previously described (Gavilán *et al.*, 2009). The following genes were analysed: Cd11b (ref. Mm00434455\_m1) CD45 (ref. Mm01293577\_m1), CD68 (ref. Mm03047340\_m1), Clec7a (Mm01183349\_m1), CX3CR1 (Mm02620111\_s1), GAPDH (ref. Mm99999915\_g1), Iba1 (ref. Mm00479862\_g1), P2ry12 (ref. Mm01950543\_s1), and TMEM2 (ref. Mm04209424\_g1). Quantitative PCR reactions (qPCR) were done using an ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems). The cDNA levels of the different samples were determined using GAPDH as housekeeper. The amplification of the housekeeper was done in parallel with the gene to be analysed. Thus, the results were normalized using the GAPDH expression. Threshold cycle (Ct) values were calculated using the software supplied by Applied Biosystems.

As a control condition, we selected 6-month-old WT mice. In consequence, the expression of all tested genes was referenced to the expression levels observed in 6-month-old WT mice.

### **2.4.5.4. Protein quantification (Lowry Method)**

Protein concentration is determined using the Lowry method (Lowry *et al.*, 1951). See section 2.2.7.

### **2.4.5.5. Western Blot**

Western blots of the *in vivo* assay were performed as described (Jimenez *et al.*, 2008). Briefly, 5–20 µg of proteins from the different samples were loaded on 16%-SDS-tris-tricine-PAGE or 12%-SDS-tris-glycine-PAGE and transferred to nitrocellulose or PVDF (Hybond-C Extra; Amersham). After blocking, using 5% non-fat milk in TPBS buffer (PBS1X + 0.1% Tween20), membranes were incubated overnight, at 4°C, with the appropriate antibody. Membranes were then incubated with the corresponding

horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibody at a dilution of 1:10000. Each blot was developed using the ECL-plus detection method (Amersham) and quantified using Image-Quant Las 4000 mini gold (GE Healthcare Bio-Sciences). For normalization purposes, proteins were first estimated by Lowry and protein loading corrected by beta-actin. In each experiment, the intensity of bands from control fed were averaged and considered as 1 relative unit. Data were always normalized by the specific signal observed in control group.

**2.4.5.5.1. Antibodies**

For this study the antibodies used are listed in the Table 7.

**Tabla 7. List of antibodies used for Western. The most relevant characteristics of each of them are detailed.**

ANTIBODY	PROTEIN / TARGET ANTIGEN	DILUTION	HOST	BAND SIZE	SUPPLIER
Primary antibodies					
6E10	anti-Abeta	1:6000	Mouse	4,5 kDa (1-mer)	Palex
82E1	anti-Abeta	1:5000	Mouse	4,5 kDa (1-mer)	IBL
Tau-46	total tau	1:1000	Mouse	79 kDa	IBL
AT8	anti-phospho-tau pSer202/Thr205	1:1000	Mouse	79 kDa	Cell Signalling
VGAT	vesicular GABA transporter	1:5000	Rabbit	60 kDa	Synaptic System
VGLUT	vesicular glutamate transporter	1:2000	Rabbit	60 kDa	Synaptic System
pSD 95	post synaptic density 95 kDa	1:2000	Rabbit	95 kDa	Cell Signalling
Synaptophysin	post synaptic density synaptophysin	1:1000	Rabbit	38 kDa	Synaptic System
Beta-Actin	Beta-actin	1:10000	Mouse	42 kDa	Sigma-Aldrich
Secondary antibodies					
Anti-rabbit	Anti-rabbit IgG HRP-linked antibody	1:10.000	Horse	-	Cell Signalling
Anti-mouse	Anti-mouse IgG HRP-linked antibody	1:10.000	Goat	-	Cell Signalling

**2.4.5.6. Immunohistochemistry**

Immunohistochemical techniques can detect the presence of molecules of interest in the tissue of study by the specificity of the antigen-antibody binding. However, in most cases it is necessary to amplify the signal in order to easily visualize it. In this work, sections of brains of different animals were always processed in parallel, using the same solutions in all conditions to minimize variability in the immunostaining.

**2.4.5.6.1. Sample Preparation**

Using a cryostat-microtome (Leica CM1850) coronal sections of 30 mm thickness of the hemiserebrum along the face-caudal axis where made. These sections were collected serially into multiwell plates containing an antifreeze solution (20% PB buffer

(0.6M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0.04M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 20% PEG or ethylene glycol, 30% glycerol, 20% water). Samples were stored at -80 ° C until use.

The anatomical delimitation of the hippocampal formation was performed following the Franklin and Paxinos atlas for the mouse brain (Franklin and Paxinos, 2008).

### **2.4.5.6.2. Immunohistochemical staining**

The free-floating coronal brain sections from mice were assayed. To increase or improve the exposure of the antigen it was necessary to perform a pre-treatment with heat. After washing the sections with PBS (3x 2 min) the tissue is incubated in sodium citrate buffer (50mM, pH = 6), at 80 ° C for 30 minutes. The sections are then allowed to cool for 10 minutes and proceed the staining. Sections were incubated 1 hour in PBS-Triton X-100 1% (PBS-T) at room temperature. To prevent antibodies' unspecific unions we incubate the sections from 1 to 3 hours in fresh PBS-T 1% with 5% bovine serum albumin (BSA). Then incubate overnight at 4°C with the primary antibody (IBA1 rabbit polyclonal ref.234003, Synaptic System) in a dilution 1:1000. Before the washing steps, allow the sections to temper at least 30 minutes and wash 6x 10 min with PBS-T 0.1%. Add biotinylated secondary antibody (Alexa Fluor 546 donkey anti-rabbit IgG ref. A10040, Invitrogene) in a 1:500 dilution, 1 h at room temperature. Finally, the last 6 washes are performed with PBS-T 0.1%. Before mounting the slides, stain with Thioflavin S.

### **2.4.5.6.3. Histological stains: Thioflavin S (ThioS)**

Thioflavin S (ThioS) is a green fluorescein that binds specifically to beta-amyloid fibrillar aggregates that have a  $\beta$ -folded leaf conformation, as well as neurofibrillary tangles.

The protocol used to carry out this staining was as variation of the previously described (Bussi re *et al.*, 2004): 2x 2 minutes washes of the tissue are carried out in PBS to subsequently incubate it for 5 minutes, in the dark, in the solution of Thioflavin S (Sigma-Aldrich) 0.02% (w / v) in 50% ethanol. Then, two washes in 50% ethanol and two washes with PBS are performed, 5 minutes each wash. The sections are then mounted on previously gelatinized slides with 50% glycerol mounting medium for fluorescence and allowed to dry for a few minutes. Place a cover, seal and stored in darkness at 4 ° C.

### **2.4.5.6.4. Confocal Microscopy**

The fluorescence images using confocal microscopy have been obtained with a confocal microscope ZEISS LSM 710, from the Microscopy Service of the Centro de Investigaci n Tecnol gica e Innovaci n de la Universidad de Sevilla (CITIUS). It is a confocal optical microscope that has a laser attached as a source of illumination, as well as

## CAPÍTULO 2. MATERIAL AND METHODS

an electronic system that allows digital images to be obtained. We have used the ZEN 2011 software for image acquisition. Finally, digital images have been processed using the ImageJ software.

### **3. RESULTS**

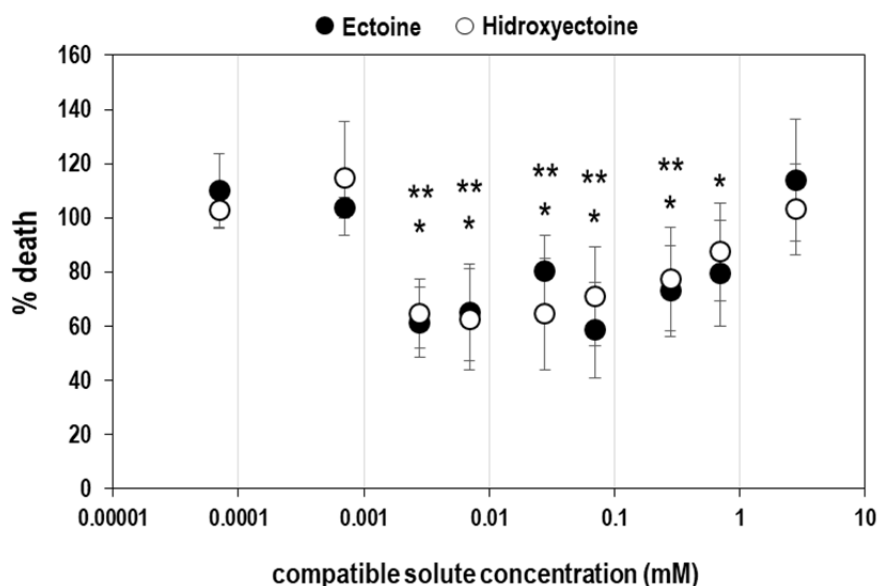
### 3.1. Evaluation of the antioxidant and neuroprotective activity of ectoines.

#### 3.1.1. *In vitro* neuroprotective capacity of ectoine and hidroxyectoine from oxidative damage

First, a study of the neuroprotective capacity against neuronal death caused by oxidative damage induced by the xanthine/xanthine oxidase system (XXO) in the presence of ectoine or hidroxyectoine was developed on a human neuroblastoma SK-N-MC cell model (Recuero *et al.*, 2009). In this assay, a neuroprotective compound will prevent or reduce the percentage of cell death produced by oxidative stress.

Cells were treated with XXO (at LC50 concentration, previously determined) and with different concentrations of ectoine and hidroxyectoine (3; 1; 0.3; 0.1; 0.03; 0.01; 0.003; 0.001 and 0.0001 mM) and cell viability was determined by the WST-1 test.

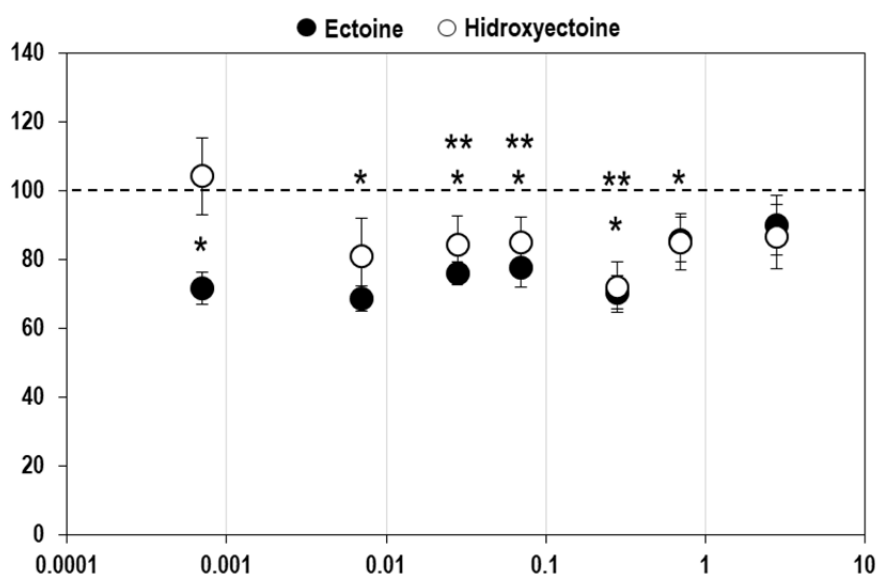
The results are shown in Figure 71, which represents the percentage of cell death obtained for each concentration of the ectoine and hidroxyectoine referred to the death produced by the XXO. It is observed that the pattern of cellular protection of both compounds is similar, showing a wide range of protection (0.001 to 1 mM). The highest protection capacity, between 39% -15%, was observed between 0.001 and 0.01 mM for both compounds. Regarding the positive control, a protection of 60% -20% was obtained (data not shown).



**Figura 71. Protective effect against XXO oxidative damage by ectoine and hidroxyectoine in neuronal cells.** The results showed the percentage of neuronal death in cells cultures treated with XXO and with different concentrations of ectoine (black circles) and hidroxyectoine (white circles). The value of cell death produced by LC50 of XXO was considered as 100% of neuronal death. The values are the averages and standard deviations of three replicates for each condition in three independent experiments. According to Student's t-test, significant differences ( $p$ -value  $\leq 0.05$ ) compared with the control (no compatible solute treatment) were showed by one (ectoine) or two (hidroxyectoine) asterisks.

### 3.1.2. *In vitro* antioxidant capacity of ectoine and hydroxyectoine.

To analyze the antioxidant capacity of both compounds, the same system was used to measure ROS production in the presence of XXO and different concentrations of ectoine and hydroxyectoine (3; 1; 0.3; 0.1; 0.03; 0.01; 0.001). Ascorbic acid (0.1 mM) was used as antioxidant positive control. In figure 72 results are shown as the percentage of ROS produced in the cells when ectoine or hydroxyectoine is present in the culture, normalized respect to cellular viability (internal LDH) and referred to a single XXO treatment (considered as 100% of ROS production). Thus it could be observed that both compounds showed moderate antioxidant behavior (15-30% inhibition of ROS production) compared with positive control (50-65%), from 0.001 to 0.3 mM, in the case of ectoine, and from 0.03 to 0.3 mM, for hydroxyectoine.



**Figura 72. Cellular antioxidant capacity of ectoine and hydroxyectoine.** The results showed the percentage of ROS in cultures treated with XXO and ectoine (white circles) and hydroxyectoine (black circles), measured as fluorescence from H2DCFDA probe ( $\lambda_{exc}485$  nm,  $\lambda_{emi}538$  nm) and corrected by internal LDH activity (cellular viability). 100% was considered as the value of ROS produced by XXO (10  $\mu$ M X / 100 mU/mL XO), marked as discontinuous line. The values are the averages and standard deviations of three replicates for each condition in three independent experiments. According to Student's t-test, significant differences ( $p$ -value  $\leq 0.05$ ) compared with the control (no compatible solute treatment) were showed by one (ectoine) or two (hydroxyectoine) asterisks.

### 3.2. Evaluation of anti-inflammatory and neuroprotective activity in mouse neuronal lines

For the development of the inflammation model in cell cultures, we opt for N13 cells since they are better induced than BV2 and therefore small differences can be more easily observed. Also, in previous studies of our lab it was observed that although ectoine had no anti-inflammatory effect "per se", it also did not induce inflammation at any of the concentrations tested (data not shown).



### 3.2.1. Capacity of ectoine to prevent inflammation in microglial mouse lines

Cultures of N13 neuronal cells from mouse microglia were used as a cellular model to study inflammation. In these cells an inflammatory process can be induced by incubating them with different inflammatory agents and subsequently quantifying the expression of the gene that codes for tumor necrosis factor ("tumor necrosis factor", TNF $\alpha$ ), a multifunctional cytokine whose expression is usually induced in inflammatory processes. If these inflamed cells are incubated in the presence of effective anti-inflammatory agents, a decrease in the expression of TNF $\alpha$  would be observed. Thus, it serves as an indicator of the reduction of inflammation.

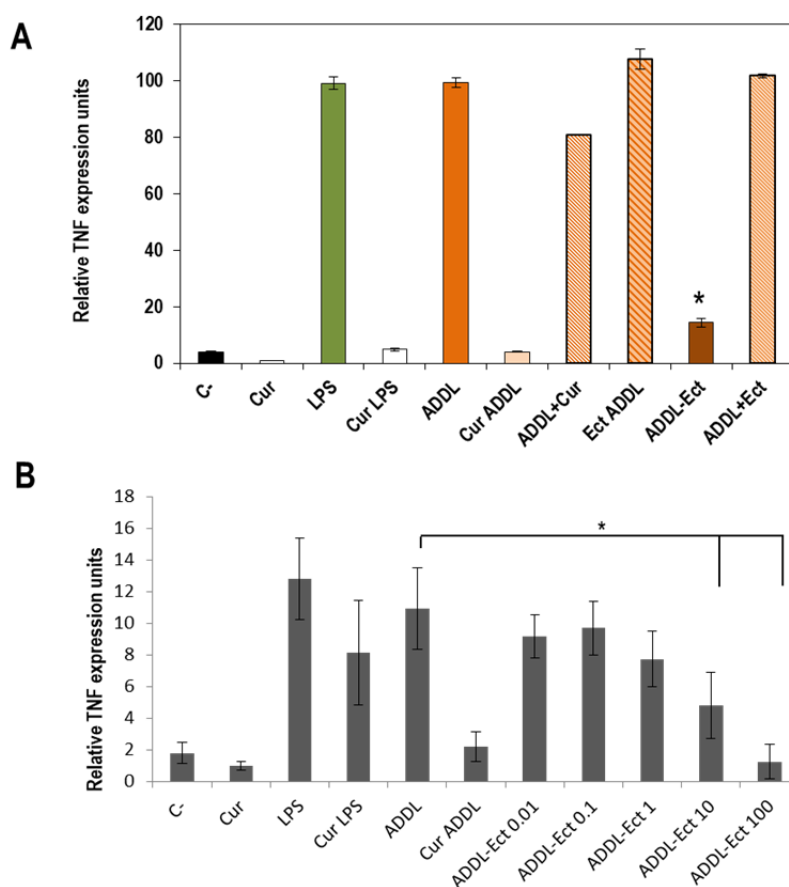
In this experiment we studied the effect of ectoine in inflammation caused by two agents, LPS and ADDL, which induce inflammation through different mechanisms of action. LPS is a bacterial lipopolysaccharide that in N13 cells produces a set of cytokines similar to primary microglia (Righi *et al.*, 1989) and ADDL (Amyloid-beta Derived Diffusible Ligands), a soluble oligomer that is formed from the aggregation of beta-amyloid monomer (Jimenez *et al.*, 2008). ADDL was synthesized from the aggregation of artificial beta-amyloid, obtaining a product (A $\beta$ 42 peptide) that produces an inflammatory effect very similar to that produced during Alzheimer's disease. The effects on inflammation in both cases could be observed by quantifying the expression of TNF $\alpha$  gene.

In a first assay, N13 cells were incubated for 3 hours with LPS (0.01  $\mu$ g/ml) or with  $\beta$  amyloid oligomers (ADDL) (5  $\mu$ M) to induce inflammation (samples LPS and ADDL). As a positive control of anti-inflammatory effect, cells were pre-incubated in the presence of curcumine (20  $\mu$ M) for 90 minutes and after that, incubated in the presence of each of the inflammatory agents during 3 hours (samples CurrLPS and CurrADDL). To test antiinflammatory capacity of ectoine, cells were also pre-incubated with this compound (10 mM). On the other hand, cells were also incubated with 5  $\mu$ M artificial amyloid monomers oligomerized in the presence of ectoine (10mM) to test if it would act as preventive agent of inflammation impeding the formation of oligomeric forms that cause inflammation. Once the different treatments were finished, the cells were collected, the total RNA was isolated and the cDNA was obtained by retrotranscription. Subsequently, the expression levels of TNF $\alpha$  were measured by qPCR to observe the effect on cellular inflammation of the different treatments.

The results indicated that ectoine has no antiinflammatory effect unlike curcumine, which diminished the TNF expression 23-fold (Figure 73 A). However, ectoine seemed to show effect on inflammation in those cells that were incubated with ADDL oligomerized in the presence of ectoine. In this case, TNF expression was diminished 6.8-fold. This could

be due to the antiaggregant capacity of ectoine that progressively prevents the oligomerization of beta-amyloid monomers responsible for the inflammatory response.

In a second assay it was analyzed if the preventive effect of inflammation, by impeding the formation of oligomeric forms, were ectoine dose-dependent. For that purpose cells were incubated with 5  $\mu$ M artificial amyloid monomers oligomerized in the presence of different concentrations of ectoine (0.01, 0.1, 1, 10 and 100 mM). The results obtained showed that even at low concentrations of ectoine (between 0.01-1 mM) a diminishing of cellular inflammation begins to be observed (1.5- 2.0 fold), which is clearly inhibited (4.1-4.8 fold) at higher concentrations (10 and 100 mM) (Figure 73 B).

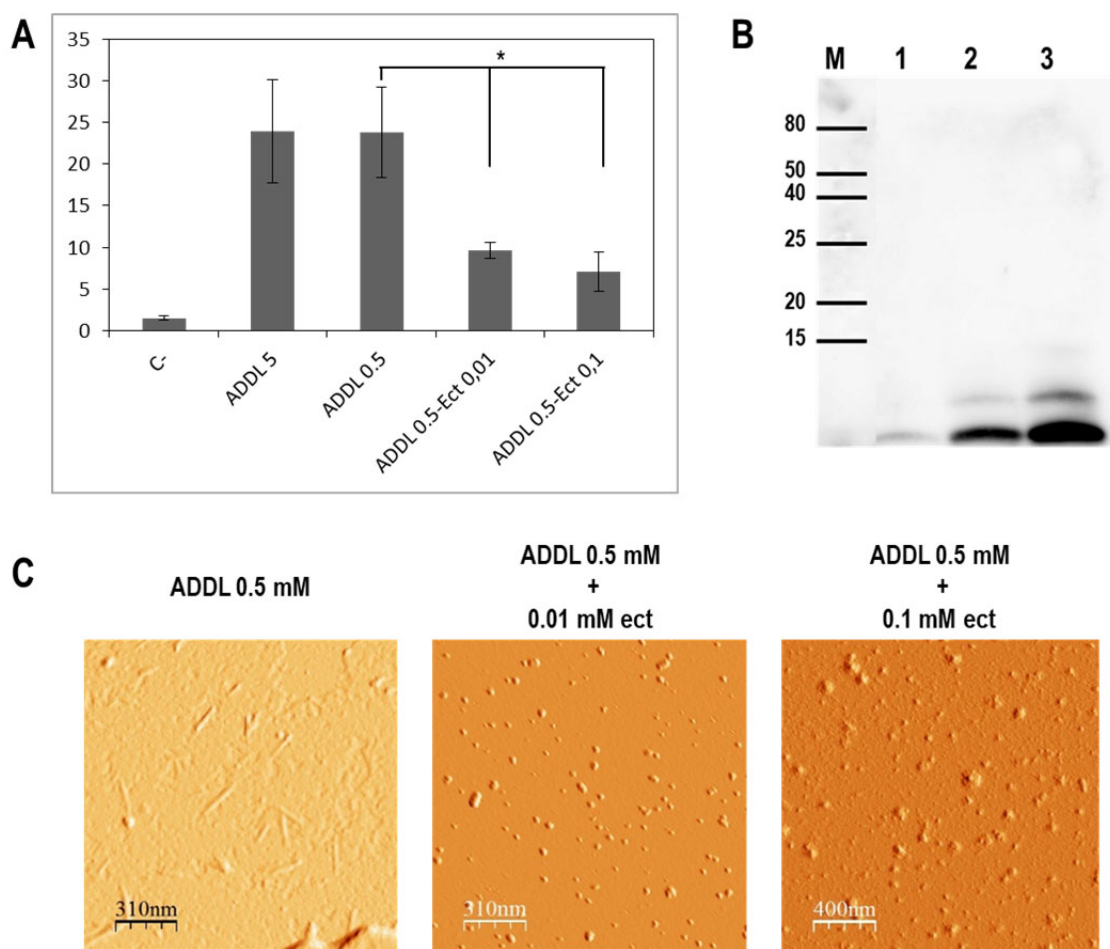


**Figura 73. Effect of ectoine in induction of inflammatory response mediated by ADDL in a N13 neuronal cell model.** N13 microglial cell were subjected to different treatments and Levels of inflammatory response were observed by TNF- $\alpha$  expression. LPS (0.01 $\mu$ g/ml) and ADDL (5  $\mu$ M) were used as inflammatory agents. A) To test anti-inflammatory activity, cells were preincubated 90 minutes with curcumin (0.02 mM) (used as control) or ectoine (10 mM) and subsequently incubated in the presence of each of the inflammatory agents (curLPS or curADDL or EctLPS or EctADDL). Additionally, cells were incubated 3h with ADDL (5  $\mu$ M) that was previously oligomerized in the presence of ectoine (10 mM) (ADDL-Ect). Levels of inflammatory response were observed by TNF- $\alpha$  expression. B) To test dose-dependent preventive effect of ectoine on inflammation, cells were incubated 3h with ADDL previously oligomerized in the presence of different concentration of ectoine (0.01; 0.01; 1; 10; 100 mM). Cells preincubated 90 min with curcumin previous to induction of inflammation (LPS or ADDL), were used as controls of the inflammatory cell model. Expression levels were normalized using GADPH and referred to levels of cells with no-treatment (control). For each experiment, duplicate culture wells were used. This experiment was repeated twice, using independent cultures. According to Student's t-test, significant differences (p-value  $\leq$  0.01) compared with the control (no ectoine treatment) were indicated by one asterisk.

To test concentrations of ADDL closer to physiological one, the assay was repeated but a solution of beta-amyloid monomer ten times lower (0.5  $\mu$ M) were used instead (Figure 74 A). This solution was oligomerized in the presence or absence of the lowest concentrations of ectoine used before, 0.01 and 0.1 mM. Subsequently, aliquots were used to incubate the cells and measure the expression of TNF $\alpha$  by qPCR. The results showed again that as the concentration of ectoin increases, less inflammation occurs (Figure 75 A). At this time, 0.1 mM of ectoine produced a higher reduction of inflammation levels (8-fold) that when was tested against 5  $\mu$ M ADDL (1.8-fold), suggesting that lower concentrations of ectoine could be used to be effective at physiological conditions (Figure 75A).

### **3.2.2. Mechanism action confirmation of ectoin in the prevention of inflammation by Western-Blot and AFM.**

Additionally to confirm if the effect of ectoine on inflammation levels were due to the prevention of beta-amyloid oligomer formation, aliquots of previous samples were used to test the formation of ADDL oligomers and fibers by Western-Blot and by Atomic Force Microscopy (AFM). For this analysis, aliquots of 3  $\mu$ l of beta-amyloid monomer solutions oligomerized or not in the presence of ectoine (0.01 and 0.1 mM) were run on a 10-20% (w/v) gradient polyacrylamide gel and subsequently transferred to a polyfluoride membrane of vinylidene (PVDF). Subsequently the membrane was incubated with the primary antibody 6e10 and the revealed was performed by chemiluminescence (Figure 74 B). Aliquots of 30 $\mu$ l of the same samples were treated to its observation by Atomic Force Microscopy (AFM). The results indicate that the higher the concentration of ectoine, the greater the accumulation of low molecular weight oligomers (monomers, dimers, trimers, etc.), and therefore, a lower proportion of high molecular weight oligomers, which are the cause of inflammation, are present (Figure 74 C). This indicates that samples incubated with a higher concentration of ectoine have a lower proportion of oligomers of high molecular weight, which prevents them from inducing inflammation in the treated N13 cells. Thus ectoine can act as a preventive agent of inflammation by preventing the aggregation of beta-amyloid monomers to form ADDL.



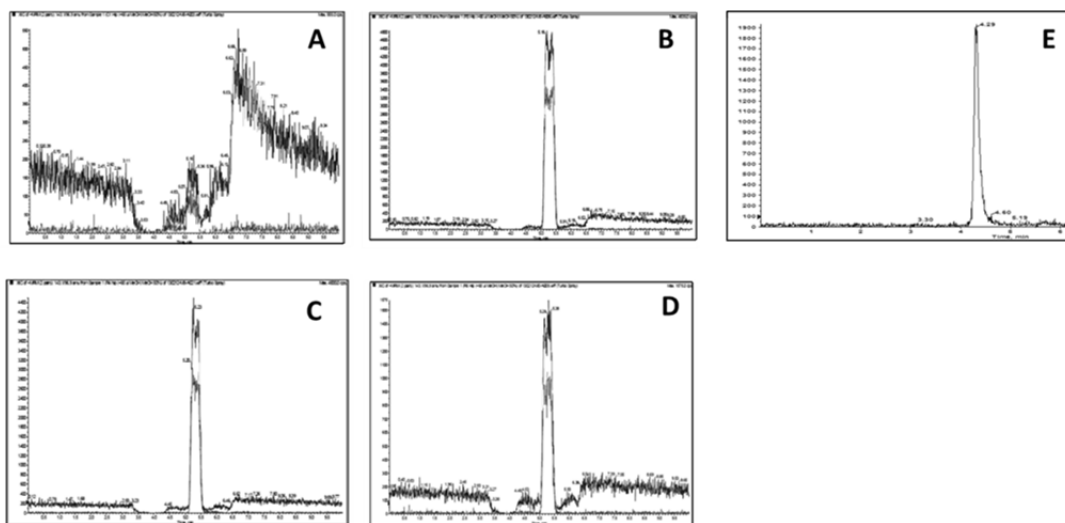
**Figura 74. Confirmation of the mechanism of action of ectoine in the prevention of inflammation by qPCR, Western blot and AFM.** A) TNF $\alpha$  expression levels in cultures of the mouse microglia N13 cell line incubated with 5  $\mu$ M ADDL oligomers (as an inducing agent of inflammation) (1), 90-minute pre-incubation with 20  $\mu$ M turmeric and subsequent incubation 3 hours with 5  $\mu$ M ADDL oligomers. According to Student's t-test, significant differences ( $p$ -value  $\leq 0.1$ ) compared with the control (no ectoine treatment) were indicated by one asterisk. (2); 3-hour incubation with oligomerized 0.5  $\mu$ M  $\beta$  amyloid monomers in the presence of different concentrations of 0 (3), 0.01 (4), 0.1 (5) mM ectoin. Expression levels are referred to those obtained in untreated cells (Control). B) SDS PAGE-Western-Blot in 10-20% gradient (w / v) polyacrylamide gel transferred to vinylidene polyfluoride (PVDF) membrane and incubated with primary antibody 6e10. M: Molecular weight marker; Aliquots of oligomerized 0.5  $\mu$ M  $\beta$  amyloid monomer solutions in the presence of different concentrations of 0 (3), 0.01 (4), 0.1 (5) mM ectoin used for the treatment of N13 cells in the experiment previous. C) Characterization of the oligomer by AFM

### 3.3. Blood-brain barrier crossing and prevalence time in brain of ectoine

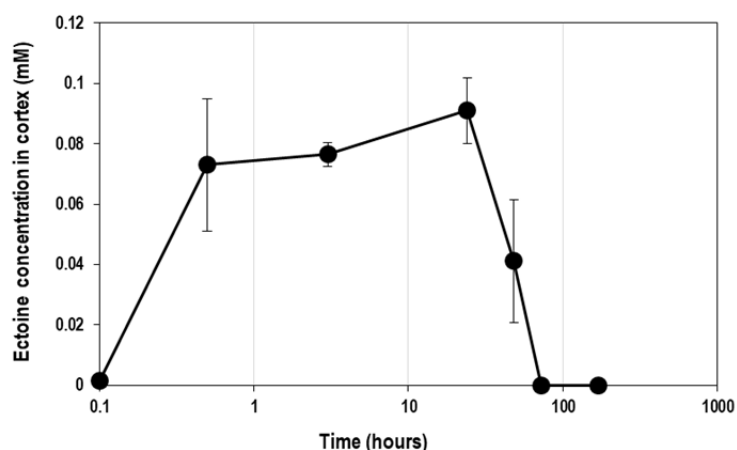
Initially, to test if ectoine was a molecule capable of crossing the blood-brain barrier and if so, to determine the prevalence time in brain, an *in vivo* test was performed using C57 wt mice. They were injected in the peritoneal area with a sterile solution of 6 mg ectoine in PBS using a dose of 200 mg/kg and later sacrificed after different exposure times. Subsequently the presence or absence of ectoine in the brain were detect and quantified by HPLC-MS.

Briefly, each brain fraction was homogenized in a Douce's using a PBS solution containing protease inhibitors and phosphatases. Subsequently, the sample was ultracentrifuged to obtain the fraction of soluble proteins (S1) and the supernatant was extracted with a solution of methanol: chloroform: water (10: 5: 4) by the modified protocol of Bligh and Dyer (Bligh and Dyer, 1959) to obtain the ectoine fraction. The samples obtained were analyzed by HPLC using a commercial ectoine solution as a control.

The analysis of the results showed that ectoine was detected in all brain regions (that is cortex, hippocampus and the rest of brain) in those mice treated during 30 min, 3h, 24h and 48h. Only the results in cortex were showed in Figure 75 and 76.



**Figura 75. Checking the passage of the blood-brain barrier of ectoine by LC-MS.** Using LC-MS, the presence of ectoine was detected in the different bark extracts from the brain of untreated mice (A) and treated with ectoine (200 mg / kg) for 30 minutes (B), 3 hours (C) and 24 hours (D). As control, a pure commercial ectoine solution (BITOP) (E) was used.



**Figura 76. Determination of ectoine passage through the blood-brain barrier and quantitative time-permanence in brain after intraperitoneal administration.** Ectoine was detected and quantified by LC-MS from brains of mice injected in the peritoneal area with a sterile solution of 6 mg ectoine in PBS using a dose of 200-250 mg/kg and exposed to different times (30 min, 3h, 24h 48h, 72 h 1 week). These results corresponds only to the analysis of cortex area. Estadística

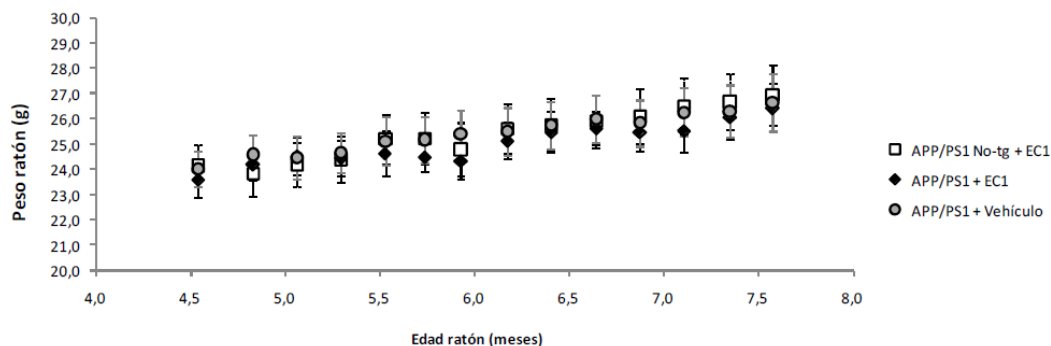
On the contrary, ectoine was not detected in those mice that were not exposed to ectoine (data not shown). These results indicated that ectoine is rapidly absorbed and could pass through the blood-brain barrier to reach regions in which the pathology produced by Alzheimer's is located, as cortex or the hippocampus, highlighting that it was detected only 30 minutes after exposure. Interestingly, results showed that ectoine could remain in the brain until 48h, reaching the maximum concentration at 24h ( $0.09 \pm \dots$  mM). Additionally, the administered dose (200 mg/kg) also allowed reaching levels of ectoine in brain that showed to be relevant in the previous *in vitro* assays (antioxidant and protective capacity against oxidative damage, and preventive capacity of inflammation). So that dose was selected for the further experiments with transgenic mice and the prevalence time results served to design the frequency of administration of the treatment.

### 3.4. *In vivo* analysis of neuroprotective capacity of ectoine in mice model APP/PS1

Thanks to the data obtained in the blood-brain barrier passage experiments, we have been able to establish both the concentrations as well as administration guidelines for *in vivo* experiments (section 2.4.2. of material and methods). A dose of 200 mg / kg of ectoine was administered 3 times per week during three months to mice 4.5 months old. These experiments were carried out in the company Neuron (Granada)

#### 3.4.1. Ectoine intraperitoneal administration is safe.

Once a week, the animals were weighed to determine the volume of EC1 compound solution that had to be administered for each mouse to receive a dose of 200 mg / kg. Similarly, the weight of the animals determined the volume of inoculated vehicle. Likewise, the weekly determination of the weight of the mice was used as a control of the general state of health, since the gain or loss of weight is an indicator thereof. Figure 77 shows the evolution of the weight of the mice throughout the test.

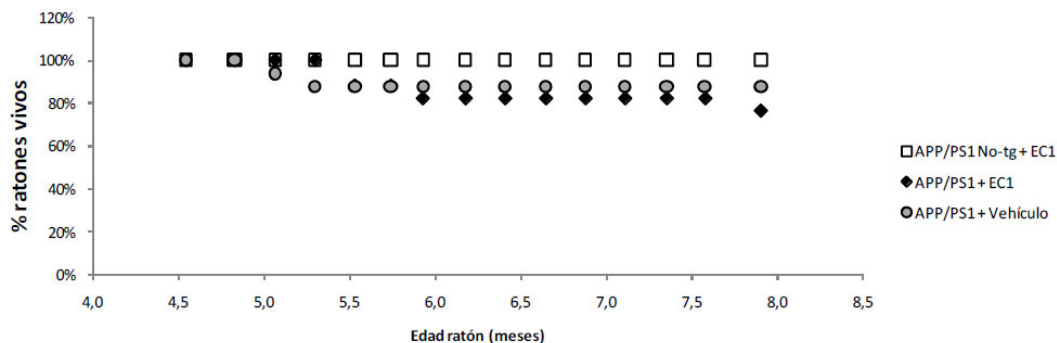


**Figura 77. Evolution of mice weight during the three months of treatment.** Error bars represent the standard error of the mean (SEM). At the start of the trial there were 17 mice in the APP / PS1 No-tg + EC1 group, 17 mice in the APP / PS1 + EC1 group and 16 mice in the APP / PS1 + Vehicle group. Each average weight is made up of at least the weight of 11 mice. No statistically significant differences in the weight of the

## CAPÍTULO 2. RESULTS

mice were detected between the three groups at any time of the study kinetics by the two-tailed and type 3 t-student methods.

Likewise, the eventual deaths of the animals along the kinetics were recorded (figure 78).

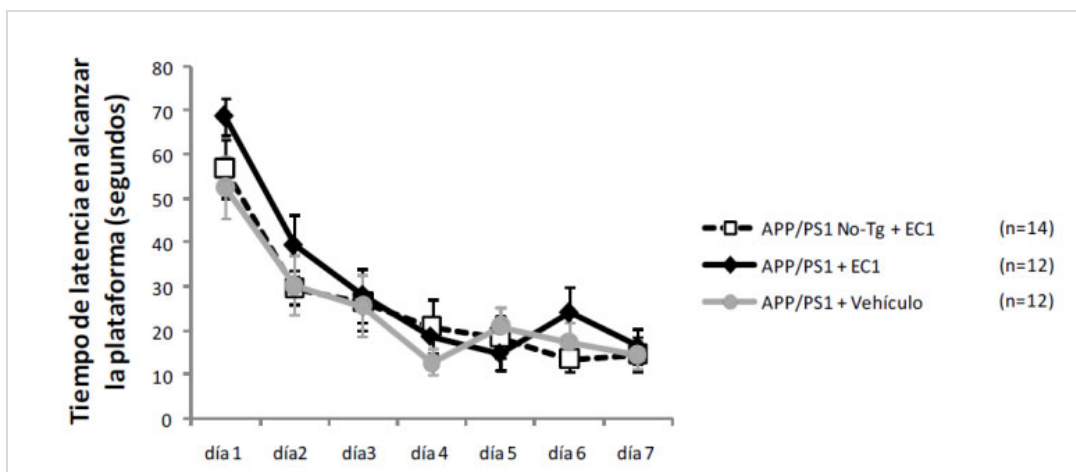


**Figura 78. Survival graph along the kinetics of administration of ectoine.** The % of live mice is shown from the beginning of the administration of the treatments and until the first week of the MWM. The initial number of mice was 17 mice in the APP / PS1 No-tg + EC1 group, 17 mice in the APP / PS1 + EC1 group and 16 mice in the APP / PS1 + Vehicle group. The final number of surviving mice sent to the client after the administration of the treatments and the MWM cognitive test was 17 mice in the APP / PS1 group No-tg + EC1, 3 mice in the APP / PS1 + EC1 group and 14 mice in the APP / PS1 + Vehicle group.

As can be seen in Figure 78, all groups of mice increased their average weight throughout the kinetics. In addition, it is found that there were no differences between them in weight due to the administration of ectoine. Likewise, the survival graph in Figure 79 indicates that treatment with ectoine is safe since no Wt mouse died as a result of the treatment and, in APP/PS1 mice, the treatment did not significantly increase the mortality associated with this type of mice (Gimbel *et al.*, 2012). These results demonstrate that the administration of 200 mg / kg of compound via intraperitoneal three times a week in these mice is safe.

### 3.4.2. Ectoine treatment rescued improves spatial memory deficits

One week after the end of the treatment, when the mice were approximately 7.5 months old, their cognitive status was determined by the Morris water maze test (MWM) according to the technical protocol PT-DD-112 "Test of spatial memory in the Morris water maze". This test allows you to evaluate learning and memory, and is based on the natural tendency that rodents have in escaping water (Vorhees and Williams, 2006). The processes involved in carrying out this test are based on the acquisition and spatial location of visual signals that must be processed, assimilated, stored and remembered in order to successfully find the platform and escape from the water (Kallai *et al.*, 2005). The time to reach the platform is used as a learning index, and the percentage of time in the target quadrant in the 24-hour test as a memory index.

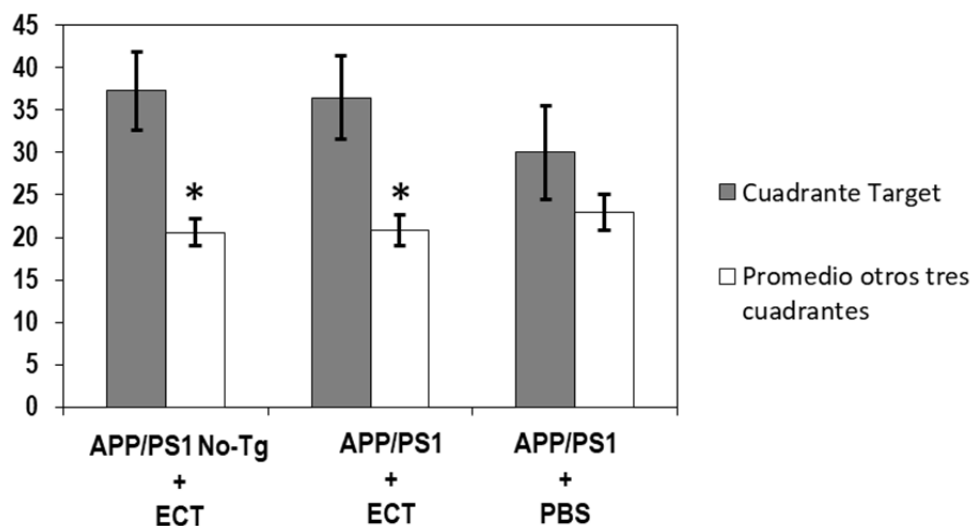


**Figura 79.** Representation of the latency time to reach the platform during the learning stage in the MWM test. The experimenter recorded the time each mouse used to get on the platform in each of the trials. It shows the average time to reach the platform of the four trials that are carried out every day. Error bars are the standard error of the mean (sem). This graphic does not include 3 APP / PS1 No-tg + EC1 mice, 1 APP / PS1 + EC1 mouse, or 2 APP / PS1 + vehicle mice due to a low exploratory tendency.

The mice of the three groups showed a progressive decrease in the latency time reaching the platform throughout the study kinetics, indicating that the mice learn the task. In addition, it is observed that there are no statistically significant differences in the latency time of each test day between the three groups ( $p > 0.05$  t-student). This result indicates that all mice regardless of genetic background and treatment have learning capacity (Figure 79).

In addition, in order to analyse the spatial memory of the animals, a test was carried out 24 hours after the last learning session. In this test, the pool platform was removed and all mice were consecutively introduced from the position opposite the quadrant in which the platform was located and allowed to swim for 60 seconds. This test was recorded on video. Subsequently, using the SMART v2.5 analysis software, the swimming trajectories were obtained and the percentage of time that each mouse spent in each of the virtual quadrants in which the pool was divided was determined. Figure 80 shows the percentage of residence time in the quadrant in which the platform was during the learning test (target quadrant) and the average percentage of time in the other three quadrants.



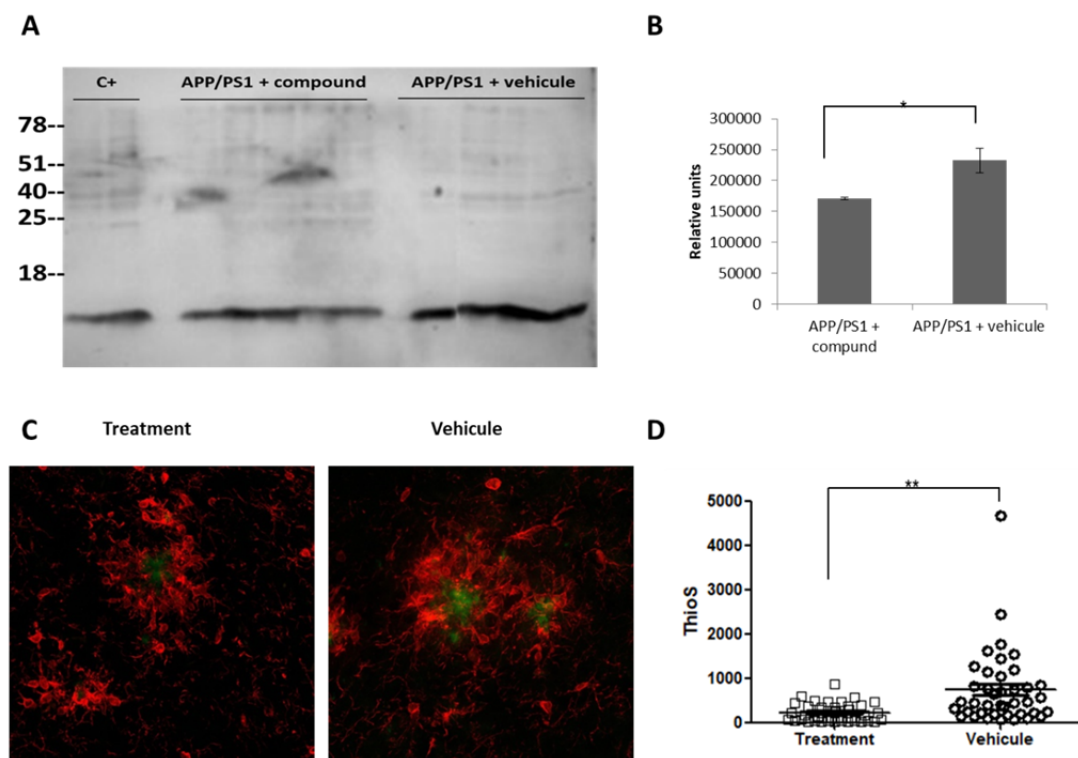


**Figura 80. Effects of ectoine on the spatial recognition memory.** Representation of the percentage of residence time in the quadrant in which the platform was located during the learning tests (target quadrant) and the average percentage of time in the other three quadrants. A percentage of time greater than 25% in the target quadrant indicates that these animals have spatial memory. This graphic does not include 3 APP / PS1 No-tg + EC1 mice, 1 APP / PS1 + EC1 mouse, or 2 APP / PS1 + vehicle mice discarded from the learning phase due to a low exploratory trend. Nor are included 2 APP / PS1 No-tg + EC1 mice, 1 APP / PS1 + EC1 mouse, or 1 APP / PS1 + vehicle mouse for not performing the indicated test correctly. And finally, 2 APP-PS1 No-tg + EC1 mice, 2 APP / PS1 + EC1 mice, and 4 APP / PS1 + vehicle mice are not included because of high anxiety (wall time > 50%). The final n of mice included in the analysis is 10 APP / PS1 Non-tg + EC1 mice, 9 APP / PS1 + EC1 mice and 6 APP / PS1 + vehicle mice. \*  $p < 0.05$  student t-test (2 queues; type 3) time in target quadrant vs. average time in the other three quadrants.

As shown in Figure 80, all groups of animals regardless of genotype and treatment showed a higher percentage of time spent in the target quadrant (the one with the platform) than in the rest of the quadrants, indicating that the animals showed spatial memory. However, only statistically significant difference was found in the time spent in the target quadrant compared to the other quadrants in the groups of animals that received the treatment with ectoine, indicating that it improved cognitive abilities to these mice.

### 3.4.3. Ectoine treatment reduces A $\beta$ accumulation and plaque size.

In our laboratory, we tested whether ectoine treatment could alter Abeta accumulation in APP/PS1 hippocampus. Our data indicated a decreasing of total monomeric and oligomeric Abeta (quantified by western blot and 6E10 and 82E1 antibodies). We did observe a significant reduction (~25%) in the monomer quantity in the hippocampus of ectoine-treated APP/PS1 mice, as compared with APP/PS1 control group (Figure 81 A and quantitatively in 81 B).

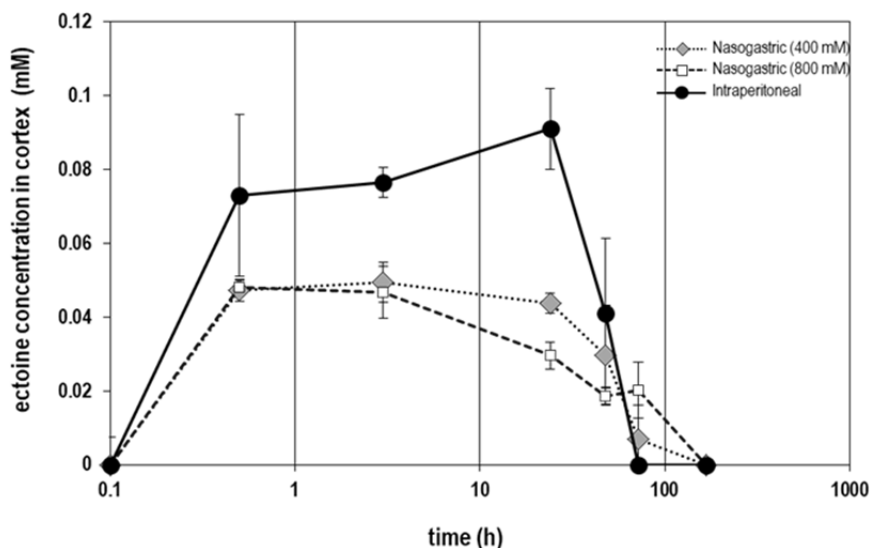


**Figura 81. Effects of ectoine in Abeta concentration and plaque size.** A) Representative image of Western blot analysis of the amount of Abeta (antibodies 6E10 and 82E1) in the hippocampus of APP/PS1 animals treated with or without ectoine B) Quantification C) Representative image of double immunohistochemistry by confocal microscopy, which show the relationship of microglia (Iba1, red) with Abeta plaques (thioflavine S, green). D) Hippocampus plaque area in mice treated with or without ectoine. \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$  in t-student test.

To find out if this decrease in Abeta corresponded with a smaller amount of plaques, or smaller plaques, immunohistochemistry experiments were performed by double staining using confocal microscopy. The figure 81 C shows the relationship of the microglia with the Abeta plates in mice treated with and without ectoine. The arrangement of the microglia (positive Iba1, red) around the Abeta plaques (thioflavin, green) is observed. We can deduce that in mice treated with ectoin the plaque size is significantly smaller than in control mice (Figure 81 D). In addition, the appearance of the microglia surrounding the plates is a poorly activated microglia.

### 3.5. Intra-gastric administration.

Since we knew that ectoin was able to cross the blood-brain barrier, we wanted to determine if by intra-gastric administration we were able to reach the same levels in the brain as with intraperitoneal administration. To do this and also determine both the dose and the time of permanence in the brain after an intra-gastric administration, a pilot study was conducted with C57 Wt mice inoculated intra-gastrically with two different doses of ectoine and different exposure times. These data were compared with the data obtained previously from intraperitoneal administration (section 3.3.).



**Figura 82. Quantification and time-permanence of ectoine in brain after gastric administration.** Ectoine was detected and quantified by LC-MS from brains of mice injected by nasogastric tube with a sterile solution of 6 mg ectoine in PBS using a dose of 400 or 800 mg/kg and exposed to different times (30 min, 3h, 24h 48h, 72 h 1 week). This result corresponds only to the analysis of cortex area. Results of gastric administration were compared with previous results of intraperitoneal administration with a dose of 200 mg/kg.

Similar to intraperitoneal administration, intragastric administration of the ectoine remained in the brain until 48 hours. However, the maximum concentration was reached between 30 minutes and three hours and was dose independent. In addition, the intragastric administration did not reach the concentrations obtained previously, despite having doubled or quadrupled the dose administered.

## **4. DISCUSSION**

The free radical-generating system of xanthine and xanthine oxidase is commonly used experimentally as a source of superoxide anion, which can produce oxidative stress, leading to cellular damage and death. Models of oxidative stress are important in elucidating pathologies associated with increased levels of reactive oxygen species, including stroke and neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's and Parkinson's diseases. Xanthine and xanthine oxidase can produce predominantly hydrogen peroxide instead of the superoxide anion (Fatokun *et al.*, 2007).

Hydroxyectoine has an *in vitro* moderate antioxidant capacity protecting LDH enzyme from denaturation (Andersson *et al.*, 2000) and ectoine has showed to *in vivo* alleviated oxidative stress induced by formaldehyde in daphnids by its antioxidative action (Bownik and Stępniewska, 2015).

The multifactorial nature of Alzheimer's disease (AD) calls for the development of multitarget agents addressing key pathogenic processes (Cai *et al.*, 2018). To date, the inhibition of acetylcholinesterase (AChE) and of  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) aggregation as well as the antioxidant activity and the removal and/or redistribution of metal ions at the level of the nervous system are the most common investigated targets for the treatment of AD (Piemontese *et al.*, 2018).

Over the last decade, significant research has focused on the potential use of natural antioxidants to target oxidative stress. However, clinical trial results have lacked success for the treatment of patients with neurological disorders. The knowledge that natural extracts show other positive molecular activities in addition to antioxidant activity, however, has led to further research of natural extracts for their potential use as prevention or treatment/management of neurodegenerative diseases. This review will cover several *in vitro* and *in vivo* research studies, as well as clinical trials, and highlight the potential of natural antioxidants (Pohl and Lin, 2018).

Tacrine was the first drug to display beneficial effects on cognitive impairment of Alzheimer Disease (AD) patients (Romero and Marco-Contelles, 2018). Unfortunately, many treated patients displayed related hepatotoxicity, and hence this drug was withdrawn. Notwithstanding, recent efforts have been directed to design small tacrine analogues targeting the underlying pathogenic mechanisms of AD. In this context, we have developed a number of pyranotacrines by changing the benzene fused ring in tacrine by a 4Hpyran. Based on this strategy, in this account we will show the tacrine analogues that we have designed, synthesized and evaluated as potential multipotent agents for AD in the last years. We have demonstrated that this approach is possible, and that a number of readily available tacrine analogues show cholinesterase inhibition power, as well as other pharmacological properties, such as calcium channel blockade, antioxidant properties,

neuroprotection, A $\beta$ -amyloid inhibition aggregation capacity, etc., making them suitable multipotent molecules for further development for the potential treatment of AD.

Over more than 30 years of research, no disease-modifying treatment has been approved by either the FDA or the EMA to treat Alzheimer's disease. Recently, the evidence of pathological alterations in the brain tissue has been gathered showing that the signs of brain damage appear more than 20 years before the onset of Alzheimer's dementia.

Researchers have tried several approaches to treat Alzheimer's. Few clinical trials in phase 3 were developed (that is when the efficacy of the drug was being tested,) with no observable efficacy in terms of cognition in either of them (Viña and Sanz-Ros, 2018), all of them are focused in patients with 55 years of age or older who had mild-to-moderate Alzheimer's disease symptoms. Among the therapeutic agents monoclonal antibodies against A $\beta$  both soluble and nonsoluble, modulators of  $\gamma$ -secretase activity, A $\beta$  aggregation inhibitors. have been tested but no attempt to improve cognition has been effective even though different approaches modulating different pathophysiological features of the disease were used. Only a relatively recent report of a phase Ib study using aducanumab, a monoclonal antibody directed against aggregated A $\beta$ , has offered some hope in terms of improving cognition. In this particular case, patients with prodromal or mild AD were treated, supporting the idea that we need to treat the disease in the earlier stages if we want to observe some clinical benefit.

## **V. GENERAL CONCLUSIONS**

## GENERAL CONCLUSIONS

1. La histidina quinasa EupK forma junto con EupR un sistema de dos componentes implicado en el transporte y el catabolismo de la bacteria halófila *C. salexigens*, siendo el primer sistema de este tipo que se caracteriza en bacteria halófilas.
2. Este sistema de dos componenetes detectaría e integraría las señales que desencadenarían la respuesta celular necesaria para adaptarse no sólo a la salinidad del medio sino también en función de la fuente de carbono (glucosa o ectoína).
3. Todos los datos sugieren la existencia de una compleja red de regulación cruzada en al que estarían implicadas las demás histidinas quinastas híbridas presentes en *C. salexigens*
4. El regulador EupR actuaría como un regulador de tipo global y como un elemento clave en la red de regulación que controla la producción de ectoínas.
5. La ectoína ejerce un efecto protector *in vitro* frente al daño oxidativo en células neuronales.
6. La ectoina previene *in vitro* la formación de oligómeros A $\beta$  responsables de la inflamación.
7. La ectoina atraviesa la barrera hematoencefálica, alcanzando concentraciones dentro del rango de actividad *in vitro*, tanto cuando se administra por vía intraperitoneal como intragástrica, permaneciendo en el cerebro hasta 48 horas.
8. El tratamiento crónico con ectoína desde edades tempranas, antes de que se manifieste la patología A $\beta$ , produce una mejora en la memoria de un modelo A $\beta$  murino de la enfermedad de Alzheimer.
9. Se ha observado una disminución en el contenido total de monómeros A $\beta$ , así como una menor área de placas en los ratones APP/PS1 tratados con ectoina.



## **VI. BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Aziz, H., Wadie, W., Abdallah, D.M., Lentzen, G., and Khayyal, M.T. (2013) Novel effects of ectoine, a bacteria-derived natural tetrahydropyrimidine, in experimental colitis. *Phytomedicine* **20**: 585–591.
- Abdel-Aziz, H., Wadie, W., Scherner, O., and Khayyal, M.T. (2015) Bacteria-Derived Compatible Solutes Ectoine and 5  $\alpha$  -Hydroxyectoine Act as Intestinal Barrier Stabilizers to Ameliorate Experimental Inflammatory Bowel Disease. *J. Nat. Prod.*
- Adebali, O., Petukh, M.G., Reznik, A.O., Tishkov, A. V., Upadhyay, A.A., and Zhulin, I.B. (2017) Class III histidine kinases: A recently accessorized kinase domain in putative modulators of type IV pilus-based motility. *J. Bacteriol.* **199**: 1–12.
- Agrawal, R., Pandey, A., Rajankar, M.P., Dixit, N.M., and Saini, D.K. (2015) The two-component signalling networks of Mycobacterium tuberculosis display extensive cross-talk in vitro. *Biochem. J.* **469**: 121–134.
- Agrawal, R., Sahoo, B.K., and Saini, D.K. (2016) Cross-talk and specificity in two-component signal transduction pathways. *Future Microbiol.* **11**:
- Alegado, R.A., Chin, C.-Y., Monack, D.M., and Tan, M.-W. (2011) The two-component sensor kinase KdpD is required for Salmonella typhimurium colonization of Caenorhabditis elegans and survival in macrophages. *Cell. Microbiol.* **13**: 1618–1637.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389–3402.
- Anand, R., Dip, K., and Ali, A. (2014) Neuropharmacology Therapeutics of Alzheimer ' s disease : Past , present and future. *Neuropharmacology* **76**: 27–50.
- Anba, J., Bidaud, M., Vasil, M.L., and Lazdunski, A. (1990) Nucleotide sequence of the Pseudomonas aeruginosa phoB gene, the regulatory gene for the phosphate regulon. *J. Bacteriol.* **172**: 4685–9.
- Andersen, J.K. (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat. Rev. Neurosci.* **10**: S18–S25.
- Ansari, N. and Khodagholi, F. (2013) Natural products as promising drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease: molecular mechanism aspect. *Curr. Neuropharmacol.* **11**: 414–29.
- Appleby, J.L., Parkinson, J.S., and Bourret, R.B. (1996) Signal Transduction via the Multi-Step Phosphorelay : Not Necessarily a Road Less Traveled. *Cell* **86**: 845–848.
- Arahal, D.R., García, M.T., Vargas, C., Cánovas, D., Nieto, J.J., and Ventosa, a. (2001) Chromohalobacter salexigens sp. nov., a moderately halophilic species that includes Halomonas elongata DSM 3043 and ATCC 33174. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1457–1462.

## BIBLIOGRAFÍA

- Argandoña, M., Nieto, J.J., Iglesias-Guerra, F., Calderón, M.I., García-Esteba, R., and Vargas, C. (2010) Interplay between iron homeostasis and the osmotic stress response in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 3575–3589.
- Argandoña, M., Vargas, C., Reina-Bueno, M., Rodríguez-Moya, J., Salvador, M., and Nieto, J.J. (2012) An Extended Suite of Genetic Tools for Use in Bacteria of the Halomonadaceae : An Overview. In, *Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols.*, pp. 167–201.
- Autengruber, A., Sydlik, U., Kroker, M., and Hornstein, T. (2014) Signalling-Dependent Adverse Health Effects of Carbon Nanoparticles Are Prevented by the Compatible Solute Mannosylglycerate ( Firoin ) In Vitro and In Vivo. *PLoS One* 1–17.
- Bachurin, S.O., Bovina, E. V., and Ustyugov, A.A. (2017) Drugs in Clinical Trials for Alzheimer's Disease: The Major Trends. *Med. Res. Rev.* **37**: 1186–1225.
- Barage, S.H. and Sonawane, K.D. (2015) Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides* **52**: 1–18.
- Battesti, A. and Bouveret, E. (2012) The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in *Escherichia coli*. *Methods* **58**: 325–334.
- Bazazzadegan, N., Shasaltaneh, M.D., Saliminejad, K., Kamali, K., Banan, M., Nazari, R., et al. (2017) Effects of ectoine on behavior and candidate genes expression in ICV-STZ rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Adv. Pharm. Bull.* **7**: 629–636.
- Bello Gil, D., Carrera Bocourt, E., and Diaz Maqueira, Y. (2006) Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. *Icidca* **40**: 45–50.
- Benilova, I., Karran, E., and De Strooper, B. (2012) The toxic A $\beta$  oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat. Neurosci.* **15**: 349–357.
- Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995) Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc.* **57**: 289–300.
- Bergkessel, M. and Guthrie, C. (2013) Chapter 25: Colony PCR. *Lab. Methods Enzymol.* **529**: 299–309.
- Biancalana, M. and Koide, S. (2010) Biochimica et Biophysica Acta Molecular mechanism of Thio flavin-T binding to amyloid fi brils. *Biochim. Biophys. Acta* **1804**: 1405–1412.
- Bijlsma, J.J.E. and Groisman, E.A. (2003) Making informed decisions: regulatory interactions between two-component systems. *Trends Microbiol.* **11**: 359–366.
- Bilwes, A.M., Alex, L.A., Crane, B.R., and Simon, M.I. (1999) Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell* **96**: 131–141.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification.

## BIBLIOGRAFÍA

- Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 911–917.
- Blum, H., Beier, H., and Gross, H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93–99.
- Boche, D., Perry, V.H., and Nicoll, J.A.R. (2013) Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **39**: 3–18.
- Boillée, S. and Cleveland, D.W. (2008) Revisiting oxidative damage in ALS: Microglia, Nox, and mutant SOD1. *J. Clin. Invest.* **118**: 474–478.
- Bott, M. and Brocker, M. (2012) Two-component signal transduction in *Corynebacterium glutamicum* and other corynebacteria: On the way towards stimuli and targets. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**: 1131–1150.
- Bourret, R.B., Borkovich, K.A., and Simon, M.I. (1991) Signal Transduction Pathways Involving Protein Phosphorylation in Prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 401–441.
- Bownik, A. and Stępniewska, Z. (2016) Ectoine as a promising protective agent in humans and animals. *Arh Hig Rada Toksikol* **67**: 260–265.
- Bremer, E. and Krämer, R. (2019) Responses of Microorganisms to Osmotic Stress. *Annu. Rev. Microbiol.* **73**: annurev-micro-020518-115504.
- Brown, A.D. (1976) Microbial Water Stress. *Bacteriol. Rev.* **40**: 803–846.
- Brown, A.D. (1990) Microbial water stress physiology. Principles and perspectives. *Microb. water Stress Physiol. Princ. Perspect.*
- Buckner, R.L., Snyder, A.Z., Shannon, B.J., LaRossa, G., Sachs, R., Fotenos, A.F., et al. (2005) Molecular, structural, and functional characterization of Alzheimer's disease: Evidence for a relationship between default activity, amyloid, and memory. *J. Neurosci.* **25**: 7709–7717.
- Buommino, E., Schiraldi, C., Baroni, A., Paoletti, I., Lamberti, M., De Rosa, M., and Tufano, M.A. (2005) Ectoine from halophilic microorganisms induces the expression of hsp70 and hsp70B' in human keratinocytes modulating the proinflammatory response. *Cell Stress Chaperones* **10**: 197–203.
- Burbulys, D., Trach, K.A., and Hoch, J.A. (1991) Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* **64**: 545–552.
- Bussièrre, T., Bard, F., Barbour, R., Grajeda, H., Guido, T., Khan, K., et al. (2004) Morphological characterization of Thioflavin-S-positive amyloid plaques in transgenic Alzheimer mice and effect of passive A $\beta$  immunotherapy on their clearance. *Am. J. Pathol.* **165**: 987–995.
- Cai, P., Fang, S.Q., Yang, H.L., Yang, X.L., Liu, Q.H., Kong, L.Y., and Wang, X.B. (2018) Donepezil-butylated hydroxytoluene (BHT) hybrids as Anti-Alzheimer's disease agents with cholinergic, antioxidant, and neuroprotective properties. *Eur. J. Med.*

## BIBLIOGRAFÍA

- Chem.* **157**: 161–176.
- Cai, S.J. and Inouye, M. (2002) EnvZ-OmpR Interaction and Osmoregulation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**: 24155–24161.
- Calderon, M.I. (2004) Complex regulation of the synthesis of the compatible solute ectoine in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043T. *Microbiology* **150**: 3051–3063.
- Cánovas, D., Borges, N., Vargas, C., Ventosa, A., Nieto, J.J., and Santos, H. (1999) Role of N-acetyldiaminobutyrate as an enzyme stabilizer and an intermediate in the biosynthesis of hydroxyectoine. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3774–3779.
- Cánovas, D., Vargas, C., Calderón, M.I., Ventosa, a, and Nieto, J.J. (1998) Characterization of the genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043. *Syst. Appl. Microbiol.* **21**: 487–97.
- Cánovas, D., Vargas, C., Csonka, L.N., Ventosa, A., and Nieto, J.J. (1996) Osmoprotectants in *Halomonas elongata*: High-affinity betaine transport system and choline-betaine pathway. *J. Bacteriol.* **178**: 7221–7226.
- Cánovas, D., Vargas, C., Kneip, S., Morón, M.J., Ventosa, A., Bremer, E., and Nieto, J.J. (2000) Genes for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from choline in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043. *Microbiology* **146**: 455–463.
- Capra, E.J. and Laub, M.T. (2012) Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems. *Mol. Biol. Evol.* **66**: 1956–1970.
- Carlyon, R.E., Ryther, J.L., VanYperen, R.D., and Griffiths, J.S. (2010) FeuN, a novel modulator of two-component signalling identified in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* **77**: 170–82.
- Casino, P., Rubio, V., and Marina, A. (2010a) The mechanism of signal transduction by two-component systems. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**: 763–771.
- Casino, P., Rubio, V., and Marina, A. (2010b) The mechanism of signal transduction by two-component systems. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**: 763–771.
- Castelli, M.E., Cauerhff, A., Amongero, M., Soncini, F.C., and García Vescovi, E. (2003) The H box-harboring domain is key to the function of the *Salmonella enterica* PhoQ Mg<sup>2+</sup> sensor in the recognition of its partner PhoP. *J. Biol. Chem.* **278**: 23579–23585.
- Del Castillo, T., Ramos, J.L., Rodríguez-Herva, J.J., Fuhrer, T., Sauer, U., Duque, E., et al. (2007) Convergent peripheral pathways catalyze initial glucose catabolism in *Pseudomonas putida*: Genomic and flux analysis. *J. Bacteriol.* **189**: 5142–5152.
- Chambonnier, G., Roux, L., Redelberger, D., Fadel, F., Filloux, A., Sivaneson, M., et al. (2016)

## BIBLIOGRAFÍA

- The Hybrid Histidine Kinase LadS Forms a Multicomponent Signal Transduction System with the GacS/GacA Two-Component System in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genet.* **12**: 1–30.
- Chen, Q., Ng, V., Warfel, J.M., Merkel, T.J., and Stibitz, S. (2017) Activation of Bvg-Repressed Genes in *Bordetella pertussis* by RisA Requires Cross Talk from Noncooperonic Histidine Kinase RisK. *J. Bacteriol.* **199**:
- Chen, X.-Q. and Mobley, W.C. (2019) Alzheimer disease pathogenesis: Insights from molecular and cellular biology studies of oligomeric A $\beta$  and tau species. *Front. Neurosci.* **13**: 1–21.
- Chen, X., Guo, C., and Kong, J. (2012) Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural Regen. Res.* **7**: 376–385.
- Cherry, J.D., Olschowka, J.A., and O'Banion, M.K. (2014) Neuroinflammation and M2 microglia: The good, the bad, and the inflamed. *J. Neuroinflammation* **11**: 1–15.
- Chhor, V., Le Charpentier, T., Lebon, S., Oré, M.V., Celador, I.L., Josserand, J., et al. (2013) Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia In vitro. *Brain. Behav. Immun.* **32**: 70–85.
- Chiti, F. and Dobson, C.M. (2017) Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu. Rev. Biochem.* **86**: 27–68.
- Chiti, F. and Dobson, C.M. (2006) Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annu. Rev. Biochem.* **75**: 333–366.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate – phenol – chloroform extraction : twenty-something years on. *Nat. Protoc.* **1**: 581–586.
- Chung, C.T., Niemela, S.L., and Miller, R.H. (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Biochemistry* **86**: 2172–2175.
- Cizas, P., Budvytyte, R., Morkuniene, R., Moldovan, R., Broccio, M., Lösche, M., et al. (2010) Size-dependent neurotoxicity of  $\beta$ -amyloid oligomers. *Arch. Biochem. Biophys.* **496**: 84–92.
- Clardy, J. and Walsh, C. (2004) Lessons from natural molecules. *Nature* **432**: 829–837.
- Clarke, D.J. (2010) The Rcs phosphorelay: more than just a two-component pathway. *Future Microbiol.* **5**: 1173–84.
- Colton, C.A., Mott, R.T., Sharpe, H., Xu, Q., Van Nostrand, W.E., and Vitek, M.P. (2006) Expression profiles for macrophage alternative activation genes in AD and in mouse models of AD. *J. Neuroinflammation* **3**: 1–12.

## BIBLIOGRAFÍA

- Copeland, A., O'Connor, K., Lucas, S., Lapidus, A., Berry, K.W., Detter, J.C., et al. (2011) Complete genome sequence of the halophilic and highly halotolerant *Chromohalobacter salexigens* type strain (1H11T). *Stand. Genomic Sci.* **5**: 379–388.
- Coronado, M.J., Vargas, C., Kunte, H.J., Galinski, E.A., Ventosa, A., and Nieto, J.J. (1995) Influence of salt concentration on the susceptibility of moderately halophilic bacteria to antimicrobials and its potential use for genetic transfer studies. *Curr. Microbiol.* **31**: 365–371.
- Coronel, R., Bernabeu-Zornoza, A., Palmer, C., Muñoz-Moreno, M., Zambrano, A., Cano, E., and Liste, I. (2018) Role of Amyloid Precursor Protein (APP) and Its Derivatives in the Biology and Cell Fate Specification of Neural Stem Cells. *Mol. Neurobiol.* **55**: 7107–7117.
- da Costa, M.S., Santos, H., and Galinski, E. a (1998) An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **61**: 117–153.
- Csonka, L.N. (1982) A third L-proline permease in *Salmonella typhimurium* which functions in media of elevated osmotic strength. *J. Bacteriol.* **151**: 1433–43.
- Cummings, J., Lee, G., Ritter, A., Sabbagh, M., and Zhong, K. (2019) Alzheimer's disease drug development pipeline: 2019. *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* **5**: 272–293.
- Dao, V.A., Overhagen, S., Bilstein, A., Kolot, C., Sonnemann, U., and Mösges, R. (2019) Ectoine lozenges in the treatment of acute viral pharyngitis: a prospective, active-controlled clinical study. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology* **276**: 775–783.
- Deutscher, J., Francke, C., and Postma, P.W. (2006) How Phosphotransferase System-Related Protein Phosphorylation Regulates Carbohydrate Metabolism in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**: 939–1031.
- Dobson, C.M. (2003) Protein folding and misfolding. *Nature* **426**: 884–890.
- Dupré, E., Herrou, J., Lensink, M.F., Wintjens, R., Vagin, A., Lebedev, A., et al. (2015) Virulence regulation with Venus flytrap domains: structure and function of the periplasmic moiety of the sensor-kinase BvgS. *PLoS Pathog.* **11**: e1004700.
- Dutta, R., Qin, L., and Inouye, M. (1999) Histidine kinases: diversity of domain organization. *Mol. Microbiol.* **34**: 633–640.
- Eichel, A., Bilstein, A., Werkhäuser, N., and Mösges, R. (2014) Meta-Analysis of the Efficacy of Ectoine Nasal Spray in Patients with Allergic Rhinoconjunctivitis. *J. Allergy* **2014**: 1–12.
- Eichel, A., Wittig, J., Shah-Hosseini, K., and Mösges, R. (2013) A prospective, controlled study of SNS01 (ectoine nasal spray) compared to BNO-101 (phytotherapeutic dragées) in patients with acute rhinosinusitis. *Curr. Med. Res. Opin.* **29**: 739–746.

## BIBLIOGRAFÍA

- Endres, K. and Deller, T. (2017) Regulation of alpha-secretase ADAM10 in vitro and in vivo: Genetic, epigenetic, and protein-based mechanisms. *Front. Mol. Neurosci.* **10**: 1–18.
- Epstein, W. (2003) The roles and regulation of potassium in bacteria. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **75**: 293–320.
- Esparza, T.J., Zhao, H., Cirrito, J.R., Cairns, N.J., Bateman, R.J., Holtzman, D.M., and Brody, D.L. (2017) Amyloid-beta Oligomerization in Alzheimer Dementia vs. High Pathology Controls. *PLoS One* **32**: 736–740.
- Esteves, A.R., Arduíno, D.M., Swerdlow, R.H., Oliveira, C.R., and Cardoso, S.M. (2009) Oxidative Stress Involvement in  $\alpha$ -Synuclein Oligomerization in Parkinson's Disease Cybrids. *Antioxid. Redox Signal.* **11**: 439–448.
- Fallet, C., Rohe, P., and Franco-Lara, E. (2010) Process optimization of the integrated synthesis and secretion of ectoine and hydroxyectoine under hyper/hypo-osmotic stress. *Biotechnol. Bioeng.* **107**: 124–133.
- Fassler, J.S. and West, A.H. (2010) Genetic and Biochemical Analysis of the SLN1 Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. In, *Methods in Enzymology*, Elsevier Inc., pp. 291–317.
- Fatokun, A.A., Stone, T.W., and Smith, R.A. (2007) Hydrogen peroxide mediates damage by xanthine and xanthine oxidase in cerebellar granule neuronal cultures. *Neurosci. Lett.* **416**: 34–38.
- Fedorcsák, I. and Ehrenberg, L. (1966) Effects of diethyl pyrocarbonate and methyl methanesulfonate on nucleic acids and nucleases. *Acta Chem. Scand.* **20**: 107–112.
- Fernández-Piñar, R., Ramos, J.L., Rodríguez-Herva, J., and Espinosa-Urgel, M. (2008) A Two-Component Regulatory System Integrates Redox State and Population Density Sensing in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **190**: 7666–7674.
- Finley, J.W. and Gao, S. (2017) A Perspective on *Crocus sativus* L. (Saffron) Constituent Crocin: A Potent Water-Soluble Antioxidant and Potential Therapy for Alzheimer's Disease. *J. Agric. Food Chem.* **65**: 1005–1020.
- Finn, R.D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., et al. (2014) Pfam: The protein families database. *Nucleic Acids Res.* **42**: 222–230.
- Foussard, M., Cabantous, S., Pédelacq, J.D., Guillet, V., Tranier, S., Mourey, L., et al. (2001) The molecular puzzle of two-component signaling cascades. *Microbes Infect.* **3**: 417–424.
- Franklin, K.B.J. and Paxinos, G. (2008) The mouse brain in stereotaxic coordinates Boston.
- Furusho, K., Yoshizawa, T., and Shoji, S. (2005) Ectoine alters subcellular localization of inclusions and reduces apoptotic cell death induced by the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. *Neurobiol. Dis.*



## BIBLIOGRAFÍA

- 20**: 170–8.
- Galperin, M.Y. (2005) A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: Bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol.* **5**: 1–19.
- Galperin, M.Y. (2010) Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**: 150–159.
- Galperin, M.Y. (2009) Sensory transduction Bacteria. In, *Desk Encyclopedia of Microbiology.*, pp. 447–463.
- Galperin, M.Y. (2006) Structural classification of bacterial response regulators: Diversity of output domains and domain combinations. *J. Bacteriol.* **188**: 4169–4182.
- Galperin, M.Y. and Gomelsky, M. (2005) Bacterial signal transduction modules: From genomics to biology. *ASM News* **71**: 326–333.
- Galperin, M.Y., Higdon, R., and Kolker, E. (2010) Interplay of heritage and habitat in the distribution of bacterial signal transduction systems. *Mol. Biosyst.* **6**: 721–728.
- Galperin, M.Y. and Nikolskaya, A.N. (2007a) Identification of Sensory and Signal-Transducing Domains in Two-Component Signaling Systems. *Methods Enzymol.* **422**: 47–74.
- Galperin, M.Y. and Nikolskaya, A.N. (2007b) Identification of Sensory and Signal-Transducing Domains in Two-Component Signaling Systems. **422**: 47–74.
- Galperin, M.Y., Nikolskaya, A.N., and Koonin, E. V (2001) Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol. Lett.* **203**: 11–21.
- Gao, R., Bouillet, S., and Stock, A.M. (2019) Structural Basis of Response Regulator Function. *Annu. Rev. Microbiol.* **73**: 175–197.
- Gao, R., Mack, T.R., and Stock, A.M. (2007) Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. *Trends Biochem. Sci.* **32**: 225–234.
- Gao, R. and Stock, A.M. (2009) Biological Insights from Structures of Two-Component Proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**: 133–154.
- García-Esteba, R., Argandoña, M., Reina-Bueno, M., Capote, N., Iglesias-Guerra, F., Nieto, J.J., and Vargas, C. (2006a) The ectD gene, which is involved in the synthesis of the compatible solute hydroxyectoine, is essential for thermoprotection of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J. Bacteriol.* **188**: 3774–3784.
- García-Esteba, R., Argandoña, M., Reina-Bueno, M., Capote, N., Iglesias-Guerra, F., Nieto, J.J., and Vargas, C. (2006b) The ectD gene, which is involved in the synthesis of the compatible solute hydroxyectoine, is essential for thermoprotection of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J. Bacteriol.* **188**: 3774–3784.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D., and Bairoch, A. (2003) ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic*

## BIBLIOGRAFÍA

- Acids Res.* **31**: 3784–3788.
- Gavilán, M.P., Pintado, C., Gavilán, E., Jiménez, S., Ríos, R.M., Vitorica, J., et al. (2009) Dysfunction of the unfolded protein response increases neurodegeneration in aged rat hippocampus following proteasome inhibition. *Aging Cell* **8**: 654–665.
- Gimbel, D.A., Nygaard, H.B., Coffey, E.E., Gunther, E.C., Laurén, J., Gimbel, Z.A., and Strittmatter, S.M. (2012) Memory Impairment in Transgenic Alzheimer Mice Requires Cellular Prion Protein. *J. Neurosci.* **30**: 6367–6374.
- Gopal, G.J. and Kumar, A. (2013) Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein J.* **32**: 419–425.
- Gottesman, S. (1984) Bacterial regulation: Global regulatory Networks. In, *Annual Review of Genetics.*, pp. 18:415-41.
- Goulian, M. (2010) Two-component signaling circuit structure and properties. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**: 184–9.
- Gralle, M. and Ferreira, S.T. (2007) Structure and functions of the human amyloid precursor protein: The whole is more than the sum of its parts. *Prog. Neurobiol.* **82**: 11–32.
- Grammann, K., Volke, A., and Kunte, H.J. (2002) New type of osmoregulated solute transporter identified in halophilic members of the Bacteria domain: TRAP transporter TeaABC mediates uptake of ectoine and hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM 2581T. *J. Bacteriol.* **184**: 3078–3085.
- Grebe, T.W. and Stock, J.B. (1999) The Histidine Protein Kinase Superfamily. *Adv. Microb. Physiol.* **Volume 41**: 139–227.
- Griciuc, A., Serrano-Pozo, A., Parrado, A.R., Lesinski, A.N., Asselin, C.N., Mullin, K., et al. (2013) Alzheimer's disease risk gene *cd33* inhibits microglial uptake of amyloid beta. *Neuron* **78**: 631–643.
- Guan, N., Li, J., Shin, H., Du, G., and Chen, J. (2017) Microbial response to environmental stresses : from fundamental mechanisms to practical applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 3991–4008.
- Guckes, K.R., Kostakioti, M., Breland, E.J., Gu, A.P., Shaffer, C.L., Martinez, C.R., et al. (2013) Strong cross-system interactions drive the activation of the QseB response regulator in the absence of its cognate sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**: 16592–16597.
- Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogava, E., Majounie, E., et al. (2013) TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **368**: 117–127.
- Gunde-Cimerman, N., Plemenitaš, A., and Oren, A. (2018) Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS Microbiol. Rev.* **42**: 353–375.

## BIBLIOGRAFÍA

- Haass, C., Hung, A.Y., and Selkoe, D.J. (1991) Processing of  $\beta$ -amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favors an internal localization over constitutive secretion. *J. Neurosci.* **11**: 3783–3793.
- Haass, C. and Selkoe, D.J. (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**: 101–112.
- Haldimann, A., Fisher, S.L., Daniels, L.L., Walsh, C.T., and Wanner, B.L. (1997) Transcriptional regulation of the Enterococcus faecium BM4147 vancomycin resistance gene cluster by the VanS-VanR two-component regulatory system in Escherichia coli K-12. *J. Bacteriol.* **179**: 5903–13.
- Halliday, G.M., Double, K.L., Macdonald, V., and Kril, J.J. (2003) Identifying severely atrophic cortical subregions in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **24**: 797–806.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557–580.
- Hanke, T., Nöh, K., Noack, S., Polen, T., Bringer, S., Sahm, H., et al. (2013) Combined fluxomics and transcriptomics analysis of glucose catabolism via a partially cyclic pentose phosphate pathway in Gluconobacter oxydans 621H. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 2336–48.
- Hansen, K.D., Irizarry, R.A., and WU, Z. (2012) Removing technical variability in RNA-seq data using conditional quantile normalization. *Biostatistics* **13**: 204–216.
- Hardy, J. and Selkoe, D.J. (2002) The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science (80-. ).* **297**: 353–357.
- Hardy, J.A. and Higgins, G.A. (1992) Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science (80-. ).* **256**: 184–185.
- Harishchandra, R.K., Wulff, S., Lentzen, G., Neuhaus, T., and Galla, H.J. (2010) The effect of compatible solute ectoines on the structural organization of lipid monolayer and bilayer membranes. *Biophys. Chem.* **150**: 37–46.
- Hartley, J.L. (2006) Cloning technologies for protein expression and purification. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**: 359–366.
- Heermann, R. and Jung, K. (2004) Structural features and mechanisms for sensing high osmolarity in microorganisms. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**: 168–174.
- Heermann, R. and Jung, K. (2010) The complexity of the 'simple' two-component system KdpD/KdpE in Escherichia coli. *FEMS Microbiol. Lett.*
- Hefter, D. and Draguhn, A. (2017) APP as a protective factor in acute neuronal insults. *Front. Mol. Neurosci.* **10**: 1–16.
- Hefti, M.H., François, K.-J., De Vries, S.C., Dixon, R., and Vervoort, J. (2004) The PAS fold. *Eur. J. Biochem.* **271**: 1198–1208.

## BIBLIOGRAFÍA

- Heinrich, U., Garbe, B., and Tronnier, H. (2007) In vivo assessment of ectoin: A randomized, vehicle-controlled clinical trial. *Skin Pharmacol. Physiol.* **20**: 211–218.
- Hellingwerf, K.J. (2005) Bacterial observations: a rudimentary form of intelligence? *Trends Microbiol.* **13**: 152–8.
- Heneka, M.T. and Banion, M.K.O. (2007) Inflammatory processes in Alzheimer ' s disease. *J. Neuroimmunol.* **184**: 69–91.
- Heneka, M.T., Carson, M.J., Khoury, J. El, Landreth, G.E., Brosseron, F., Feinstein, D.L., et al. (2015) Neuroinflammation in Alzheimer ' s disease. *Neurology* **14**:
- Heneka, M.T., Kummer, M.P., and Latz, E. (2014) Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Immunol.* **14**: 463–477.
- Heneka, M.T., Sastre, M., Dumitrescu-Ozimek, L., Hanke, A., Dewachter, I., Kuiperi, C., et al. (2005) Acute treatment with the PPAR  $\gamma$  agonist pioglitazone and ibuprofen reduces glial inflammation and A $\beta$ 1-42 levels in APPV717I transgenic mice. *Brain* **128**: 1442–1453.
- Herzberg, C., Weidinger, L.A.F., Dörrbecker, B., Hübner, S., Stülke, J., and Commichau, F.M. (2007) SPINE: A method for the rapid detection and analysis of protein–protein interactions in vivo. *Proteomics* **7**: 4032–4035.
- Higuchi, R., Krummel, B., and Saiki, R.K. (1988) A general method of in vitro preparation and specific rautageoesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* **16**: 703–717.
- Hilbi, H. and Buchrieser, C. (2013) Methods in molecular biology: Legionella methods and protocols.
- Hirbec, H.E., Noristani, H.N., and Perrin, F.E. (2017) Microglia responses in acute and chronic neurological diseases: What microglia-specific transcriptomic studies taught (and did not teach) Us. *Front. Aging Neurosci.* **9**:
- Hoch, J. and Varughese, K.I. (2001) Keeping Signals Straight in Phosphorelay Signal Transduction. *J. Bacteriol.* **183**: 4941–4949.
- Hoch, J.A. (2000) Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**: 165–170.
- Hoch, J.A. and Silhavy, T.J. (1995) Two-component signal transduction. *Am. Soc. Microbiol.* **69**: 183–215.
- Hochuli, E. (1990) Purification of recombinant proteins with metal chelate adsorbent. *Genet. Eng. (N. Y).* **12**: 87–98.
- Horcas, I. and Fernández, R. (2007) WSXM : A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. 1–8.
- Hulo, N. (2006) The PROSITE database. *Nucleic Acids Res.* **34**: D227–D230.

## BIBLIOGRAFÍA

- Hunke, S. and Müller, V.S. (2009) Approaches to Analyze Protein-Protein Interactions of Membrane Proteins. In, *Protein Interactions*.
- Hunke, S. and Müller, V.S. (2012) Approaches to Analyze Protein-Protein Interactions of Membrane Proteins. *Protein Interact.*
- Hunsaker, W.R., Badri, H., Lombardo, M., and Collins, M.L. (1989) Nucleic acid hybridization assays employing dA-tailed capture probes. II. Advanced multiple capture methods. *Anal. Biochem.* **181**: 360–370.
- Huynh, T.N., Chen, L.-L., and Stewart, V. (2015) Sensor-response regulator interactions in a cross-regulated signal transduction network. *Microbiology* mic.0.000092-.
- Huynh, T.N., Lin, H.-Y., Noriega, C.E., Lin, A. V., and Stewart, V. (2015) Cross Talk Inhibition Nullified by a Receiver Domain Missense Substitution. *J. Bacteriol.* **197**: 3294–3306.
- Huynh, T.N., Noriega, C.E., and Stewart, V. (2010) Conserved mechanism for sensor phosphatase control of two-component signaling revealed in the nitrate sensor NarX. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 21140–21145.
- Huynh, T.N. and Stewart, V. (2011) Negative control in two-component signal transduction by transmitter phosphatase activity. *Mol. Microbiol.* **82**: 275–286.
- Ihaka, R. and Gentleman, R. (1996) R: A Language for Data Analysis and Graphics. *J. Comput. Graph. Stat.* **5**: 299–314.
- Imai, F., Suzuki, H., Oda, J., Ninomiya, T., Ono, K., Sano, H., and Sawada, M. (2007) Neuroprotective effect of exogenous microglia in global brain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **27**: 488–500.
- Immormino, R.M., Silversmith, R.E., and Bourret, R.B. (2016) A variable active site residue influences the kinetics of response regulator phosphorylation and dephosphorylation. *Biochemistry* **55**: 5595–5609.
- Inclán, Y.F., Laurent, S., and Zusman, D.R. (2008) The receiver domain of FrzE, a CheA-CheY fusion protein, regulates the CheA histidine kinase activity and downstream signalling to the A- and S-motility systems of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **68**: 1328–1339.
- Inouye, M. (2003) Histidine Kinases in Signal Transduction.
- Itou, H. and Tanaka, I. (2001) The OmpR-family of proteins: insight into the tertiary structure and functions of two-component regulator proteins. *J. Biochem.* **129**: 343–350.
- Iwata, N., Higuchi, M., and Saido, T.C. (2005) Metabolism of amyloid- $\beta$  peptide and Alzheimer's disease. *Pharmacol. Ther.* **108**: 129–148.
- Jaini, R., Popescu, D.C., Flask, C.A., Macklin, W.B., and Tuohy, V.K. (2013) Myelin antigen load influences antigen presentation and severity of central nervous system

## BIBLIOGRAFÍA

- autoimmunity. *J. Neuroimmunol.* **259**: 37–46.
- Jiang, M., Shao, W., Perego, M., and Hoch, J. a. (2000) Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in bacillus subtilis. *Mol. Microbiol.* **38**: 535–542.
- Jimenez, S., Baglietto-Vargas, D., Caballero, C., Moreno-Gonzalez, I., Torres, M., Sanchez-Varo, R., et al. (2008) Inflammatory Response in the Hippocampus of PS1M146L/APP751SL Mouse Model of Alzheimer's Disease: Age-Dependent Switch in the Microglial Phenotype from Alternative to Classic. *J. Neurosci.* **28**: 11650–11661.
- Jorge, C.D., Borges, N., Bagyan, I., Bilstein, A., and Santos, H. (2016) Potential applications of stress solutes from extremophiles in protein folding diseases and healthcare. *Extremophiles* **20**: 251–259.
- Jung, H. (2001) Towards the molecular mechanism of Na<sup>+</sup>/solute symport in prokaryotes. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1505**: 131–143.
- Jung, K. and Altendorf, K. (2002) Towards an understanding of the molecular mechanisms of stimulus perception and signal transduction by the KdpD/KdpE system of Escherichia coli. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 223–8.
- Jung, K., Fried, L., Behr, S., and Heermann, R. (2012) Histidine kinases and response regulators in networks. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**: 118–124.
- Kallai, J., Makany, T., Karadi, K., and Jacobs, W.J. (2005) Spatial orientation strategies in Morris-type virtual water task for humans. *Behav. Brain Res.* **159**: 187–196.
- Kamat, P.K., Kalani, A., and Rai, S. (2016) Mechanism of Oxidative Stress and Synapse Dysfunction in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease : Understanding the Therapeutics Strategies. *Mol. Neurobiol.* 648–661.
- Kanapathipillai, M. (2018) Treating p53 mutant aggregation-associated cancer. *Cancers (Basel)*. **10**..
- Kanapathipillai, M., Ku, S.H., Girigoswami, K., and Park, C.B. (2008) Small stress molecules inhibit aggregation and neurotoxicity of prion peptide 106-126. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **365**: 808–813.
- Kanapathipillai, M., Lentzen, G., Sierks, M., and Park, C.B. (2005) Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid. *FEBS Lett.* **579**: 4775–4780.
- Kanehisa, M. (2004) The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Res.* **32**: 277D – 280.
- Kang, J., Lemaire, H.-G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.-H., et al. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **325**: 733–736.

## BIBLIOGRAFÍA

- Karimova, G., Dautin, N., and Ladant, D. (2005) Interaction Network among Escherichia coli Membrane Proteins Involved in Cell Division as Revealed by Bacterial Two-Hybrid Analysis Interaction Network among Escherichia coli Membrane Proteins Involved in Cell Division as Revealed by Bacterial Two-Hybrid. *J. Bacteriol.* **187**: 2233–2243.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, a, and Ladant, D. (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 5752–5756.
- Karimova, G., Ullmann, A., and Ladant, D. (2000) A bacterial two-hybrid system that exploits a cAMP signaling cascade in Escherichia coli. *Methods Enzymol.* **328**: 59–73.
- Karniol, B. and Vierstra, R.D. (2004) The HWE Histidine Kinases, a New Family of Bacterial Two-Component Sensor Kinases with Potentially Diverse Roles in Environmental Signaling. *J. Bacteriol.* **186**: 445–453.
- Kato, J., Kim, H.-E., Takiguchi, N., Kuroda, A., and Ohtake, H. (2008) Pseudomonas aeruginosa as a model microorganism for investigation of chemotactic behaviors in ecosystem. *J. Biosci. Bioeng.* **106**: 1–7.
- Kato, M., Mizuno, T., Shimizu, T., and Hakoshima, T. (1997) Insights into multistep phosphorelay from the crystal structure of the C-terminal HPT domain of ArcB. *Cell* **88**: 717–23.
- Kay, E., Humair, B., Denervaud, V., Riedel, K., Spahr, S., Eberl, L., et al. (2006) Two GacA-Dependent Small RNAs Modulate the Quorum-Sensing Response in Pseudomonas aeruginosa. *J. Bacteriol.* **188**: 6026–6033.
- Kessler, B., De Lorenzo, V., and Timmis, K.N. (1992) A general system to integrate lacZ fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: Regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol. Gen. Genet.* **233**: 293–301.
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F., and Verkhratsky, A. (2013) Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron* **77**: 10–18.
- Kim, D. and Forst, S. (2001) Genomic analysis of the histidine kinase family in bacteria and archaea. *Microbiology* **147**: 1197–212.
- Knowles, T.P.J., Vendruscolo, M., and Dobson, C.M. (2014) The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**: 496–496.
- Koenigsnecht-Talboo, J. (2005) Microglial Phagocytosis Induced by Fibrillar -Amyloid and IgGs Are Differentially Regulated by Proinflammatory Cytokines. *J. Neurosci.* **25**: 8240–8249.
- Konstantinidis, K.T. and Tiedje, J.M. (2004) Trends between gene content and genome size

## BIBLIOGRAFÍA

- in prokaryotic species with larger genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 3160–5.
- Korani, S., Korani, M., and Sathyapalan, T. (2019) Therapeutic effects of Crocin in autoimmune diseases : A review. 1–9.
- Kraegeloh, A. and Kunte, H.J. (2002) Novel insights into the role of potassium for osmoregulation in *Halomonas elongata*. *Extremophiles* **6**: 453–462.
- Kramer, G. and Weiss, V. (1999) Functional dissection of the transmitter module of the histidine kinase NtrB in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 604–609.
- Krämer, R. (2010) Bacterial stimulus perception and signal transduction: Response to osmotic stress. *Chem. Rec.* **10**: 217–229.
- Krämer, R. and Morbach, S. (2004) BetP of *Corynebacterium glutamicum*, a transporter with three different functions: Betaine transport, osmosensing, and osmoregulation. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1658**: 31–36.
- Krell, T., Lacal, J., Busch, A., Silva-Jiménez, H., Guazzaroni, M.-E., and Ramos, J.L. (2010) Bacterial Sensor Kinases: Diversity in the Recognition of Environmental Signals. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**: 539–559.
- Kristin Wuichet, Cantwell, B.J., and Zhulin, I.B. (2010) Evolution and phyletic distribution of two-component signal transduction systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**: 219–225.
- Kroker, M., Sydlik, U., Autengruber, A., Cavelius, C., Weighardt, H., Kraegeloh, A., and Unfried, K. (2015) Preventing carbon nanoparticle-induced lung inflammation reduces antigen-specific sensitization and subsequent allergic reactions in a mouse model. *Part. Fibre Toxicol.* **12**: 20.
- Kuhlmann, A.U. and Bremer, E. (2002) Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 772–783.
- Kumar, A., Singh, A., and Ekavali (2015) A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: An update. *Pharmacol. Reports* **67**: 195–203.
- Kumar, A. and Tsao, J.W. (2019) Alzheimer Disease.
- Kwon, O., Georgellis, D., Lynch, A.S., Boyd, D., and Lin, E.C.C. (2000) The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli*: Genetic exploration of the transmembrane region. *J. Bacteriol.* **182**: 2960–2966.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Laub, M.T. and Goulian, M. (2007) Specificity in Two-Component Signal Transduction Pathways. *Annu. Rev. Genet.* **41**: 121–145.
- Lee, L.L., Ha, H., Chang, Y., and Delisa, M.P. (2009) Discovery of amyloid-beta aggregation inhibitors using an engineered assay for intracellular protein folding and solubility.



## BIBLIOGRAFÍA

- 18:** 277–286.
- Leigh, J.A. and Dodsworth, J.A. (2007) Nitrogen Regulation in Bacteria and Archaea. *Annu. Rev. Microbiol.* **61:** 349–377.
- Lentzen, G. and Schwarz, T. (2006) Extremolytes: Natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72:** 623–634.
- Letunic, I. and Bork, P. (2018) 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.* **46:** D493–D496.
- Lippert, K. and Galinski, E.A. (1992) Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37:** 61–65.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-C<sub>T</sub></sup> Method. *METHODS* **25:** 402–408.
- Lorence, A. (2004) Recombinant Gene Expression 3 Ed.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randal, R.J. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol reagent. *Readings* **193:** 265–275.
- Majdalani, N. and Gottesman, S. (2006) The Rcs Phosphorelay : A Complex Signal Transduction System \*.
- Mann, J. (1998) Studies in natural products chemistry.
- Manoharan, S., Guillemin, G.J., Abiramasundari, R.S., Essa, M.M., Akbar, M., and Akbar, M.D. (2016) The Role of Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Huntington's Disease: A Mini Review. *Oxid. Med. Cell. Longev.*
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M.K., Gonzales, N.R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L.Y., et al. (2015) CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res.* **43:** D222–D226.
- Marini, A., Reinelt, K., Krutmann, J., and Bilstein, A. (2014) Ectoine-containing cream in the treatment of mild to moderate atopic dermatitis: A randomised, comparator-controlled, intra-individual double-blind, multi-center trial. *Skin Pharmacol. Physiol.* **27:** 57–65.
- Martín-Mora, D., Fernández, M., Velando, F., Ortega, Á., Gavira, J.A., Matilla, M.A., and Krell, T. (2018) Functional annotation of bacterial signal transduction systems: Progress and challenges. *Int. J. Mol. Sci.* **19:** 1–22.
- Martinac, B. (2001) Mechanosensitive channels in prokaryotes. *Cell. Physiol. Biochem.* **11:** 61–76.
- Mascher, Thorsten, Helmann, J.D., and Uden, G. (2006) Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing Histidine Kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70:** 910–938.
- Mascher, T., Helmann, J.D., and Uden, G. (2006a) Stimulus Perception in Bacterial Signal-

## BIBLIOGRAFÍA

- Transducing Histidine Kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**: 910–938.
- Mascher, T., Helmann, J.D., and Uden, G. (2006b) Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing Histidine Kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**: 910–938.
- Masters, C.L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C.C., Sperling, R.A., and Cummings, J.L. (2015) Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **1**:
- Masters, C.L. and Beyreuther, K. (2006) Alzheimer's centennial legacy : prospects for rational therapeutic intervention targeting the A $\beta$  amyloid pathway. *Brain* **129**: 2823–2839.
- Matsubara, M., Kitaoka, S.I., Takeda, S.I., and Mizuno, T. (2000) Tuning of the porin expression under anaerobic growth conditions by his-to-Asp cross-phosphorelay through both the EnvZ-osmosensor and ArcB-anaerosensor in Escherichia coli. *Genes to Cells* **5**: 555–569.
- McClelland, M., Hanish, J., Nelson, M., and Nucleic, Y.P. (1988) KGB: a single buffer for all restriction endonudese Michael. *Aiche Symp. Ser.* **16**: 364.
- Melov, S., Adlard, P.A., Morten, K., Johnson, F., Golden, T.R., Hinerfeld, D., et al. (2007) Mitochondrial oxidative stress causes hyperphosphorylation of tau. *PLoS One* **2**:
- Merril, C.R. (1990) Gel-Staining Techniques. *Methods Enzymol.* **182**: 477–488.
- Metzker, M.L. (2010) Sequencing technologies the next generation. *Nat. Rev. Genet.* **11**: 31–46.
- Meyer, S., Schröter, M.A., Hahn, M.B., Solomun, T., Sturm, H., and Kunte, H.J. (2017) Ectoine can enhance structural changes in DNA in vitro. *Sci. Rep.* **7**: 1–10.
- Miller, G.L. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426–428.
- Miller, J.H. (1992) A Short Course in Bacterial Genetics: Handbook Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Miller, Jeffrey H. (1972) Assay o B-Galactosidase. In, *Experiments in Molecular Genetics.*, pp. 352–355.
- Miller, Jeffrey H (1972) Experiments in molecular genetics Cold Spring Harbor, N.Y Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Mitchell, A.L., Attwood, T.K., Babbitt, P.C., Blum, M., Bork, P., Bridge, A., et al. (2019) InterPro in 2019: Improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Res.* **47**: D351–D360.
- Möker, N., Krämer, J., Uden, G., Krämer, R., and Morbach, S. (2007) In vitro analysis of the two-component system MtrB-MtrA from Corynebacterium glutamicum. *J. Bacteriol.* **189**: 3645–3649.
- Möker, N., Reihlen, P., Krämer, R., and Morbach, S. (2007) Osmosensing properties of the

## BIBLIOGRAFÍA

- histidine protein kinase MtrB from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* **282**: 27666–27677.
- Morales, I., Guzmán-Martí-nez, L., Cerda-Troncoso, C., Farí-as, G.A., and Maccioni, R.B. (2014) Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Front. Cell. Neurosci.* **8**: 1–9.
- Morbach, S. and Krämer, R. (2002) Body shaping under water stress: Osmosensing and osmoregulation of solute transport in bacteria. *ChemBioChem* **3**: 384–397.
- Morrissey, D. V. and Collins, M.L. (1989) Nucleic acid hybridization assays employing dA-tailed capture probes. Single capture methods. *Mol. Cell. Probes* **3**: 189–207.
- Morrissey, D. V, Lombardo, M., Groody, E.P., Collins, M.L., Eldredge, K., and Kearney, R. (1989) Nucleic Acid Hybridization Capture Probes I . Multiple Capture Methods dA-Tailed. **9**..
- Mösges, R., Shah-Hosseini, K., Hucke, H.P., and Joisten, M.J. (2017) Dexpanthenol: An Overview of its Contribution to Symptom Relief in Acute Rhinitis Treated with Decongestant Nasal Sprays. *Adv. Ther.* **34**: 1850–1858.
- Mülhardt, C. (2009) *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics Spektrum* Akademischer Verlag.
- Müller, U.C. and Zheng, H. (2012) Physiological functions of APP family proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**: 1–17.
- Müller, V.S., Jungblut, P.R., Meyer, T.F., and Hunke, S. (2011) Membrane-SPINE: An improved method to identify protein-protein interaction partners of membrane proteins in vivo. *Proteomics* **11**: 2124–2128.
- Müller, V.S., Tschauner, K., and Hunke, S. (2013) Membrane-SPINE: A Biochemical Tool to Identify Protein-protein Interactions of Membrane Proteins *In Vivo*. *J. Vis. Exp.* 2013.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 335–350.
- Multhaup, G., Scheuermann, S., Schlicksupp, A., Simons, A., Strauss, M., Kemmling, A., et al. (2002) Possible Mechanisms of APP-mediated oxidative stress in Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* **33**: 45–51.
- Munson, G.P., Lam, D.L., Outten, F.W., and O'Halloran, T. V (2000) Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **182**: 5864–71.
- Murray, P.J. and Wynn, T.A. (2012) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* **11**: 723–737.

## BIBLIOGRAFÍA

- Nguyen, A.T., Aerts, T., Van Dam, D., and De Deyn, P.P. (2010) Biogenic amines and their metabolites in mouse brain tissue: Development, optimization and validation of an analytical HPLC method. *J. Chromatogr. B* **878**: 3003–3014.
- Nieto, J.J., Fernández-Castillo, R., Márquez, M.C., Ventosa, a., Quesada, E., and Ruiz-Berraquero, F. (1989) Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2385–2390.
- Nixon, B.T., Ronson, C.W., and Ausubel, F.M. (1986) Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntxB* and *ntxC*. *PNAS* **83**: 7850–7854.
- Noriega, C.E., Lin, H.Y., Chen, L.L., Williams, S.B., and Stewart, V. (2010) Asymmetric cross-regulation between the nitrate-responsive *NarX-NarL* and *NarQ-NarP* two-component regulatory systems from *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **75**: 394–412.
- Oakley, B.R., Kirsch, D.R., and Morris, N.R. (1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **105**: 361–363.
- Oberto, J. (2013) SyntTax: A web server linking synteny to prokaryotic taxonomy. *BMC Bioinformatics* **14**:
- Ojha, J., Masilamoni, G., Dunlap, D., Udoff, R.A., and Cashikar, A.G. (2011) Sequestration of Toxic Oligomers by HspB1 as a Cytoprotective Mechanism. *Mol. Cell. Biol.* **31**: 3146–3157.
- Oren, A. (1999) Bioenergetic Aspects of Halophilism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 334–348.
- Ouellette, S.P., Gaudiard, E., Antosová, Z., and Ladant, D. (2014) A Gateway®-compatible bacterial adenylate cyclase-based two-hybrid system. *Environ. Microbiol. Rep.* **6**: 259–267.
- Page, S.C., Immormino, R.M., Miller, T.H., and Bourret, R.B. (2016) Experimental analysis of functional variation within protein families: Receiver domain autodephosphorylation kinetics. *J. Bacteriol.* **198**: 2483–2493.
- Papworth, C., Bauer, J., Braman, J., and Wright, D. (1996) QuikChange site-directed mutagenesis. *Strategies* **9**: 3–4.
- Parish, T. (2014) Two-Component Regulatory Systems of Mycobacteria. *Microbiol. Spectr.* **2**: MGM2-0010–2013.
- Park, H., Saha, S.K., and Inouye, M. (1998) Two-domain reconstitution of a functional protein histidine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 6728–6732.
- Park, S.-S., Stranahan, A.M., Chadwick, W., Zhou, Y., Wang, L., Martin, B., et al. (2011) Cortical gene transcription response patterns to water maze training in aged mice. *BMC Neurosci.* **12**: 63.

## BIBLIOGRAFÍA

- Parkinson, J.S. and Kofoed, E.C. (1992) Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* **26**: 71–112.
- Pastor, Jose María, Bernal, V., Salvador, M., Argandona, M., Vargas, C., Csonka, L., et al. (2013) Role of central metabolism in the osmoadaptation of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J. Biol. Chem.* **288**: 17769–81.
- Pastor, José M., Bernal, V., Salvador, M., Argandona, M., Vargas, C., Csonka, L., et al. (2013) Role of Central Metabolism in the Osmoadaptation of the Halophilic Bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J. Biol. Chem.* **288**: 17769–81.
- Pastor, J.M., Salvador, M., Argandoña, M., Bernal, V., Reina-Bueno, M., Csonka, L.N., et al. (2010) Ectoines in cell stress protection: Uses and biotechnological production. *Biotechnol. Adv.* **28**: 782–801.
- Patterson, C. (2018) World Alzheimer Report 2018 The state of the art of dementia research: New frontiers. *Alzheimer's Dis. Int.*
- Patterson, Z.R. and Holahan, M.R. (2012) Understanding the neuroinflammatory response following concussion to develop treatment strategies. *Front. Cell. Neurosci.* **6**: 1–10.
- Pech, T., Ohsawa, I., Praktijnjo, M., Overhaus, M., Wehner, S., von Websky, M., et al. (2013) A Natural Tetrahydropyrimidine , Ectoine , Ameliorates Ischemia Reperfusion Injury. *Pathobiology* **80**: 102–110.
- Perl, D.P. (2010) Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Mt. SINAI J. Med.* 32–42.
- Perraud, A.L., Weiss, V., and Gross, R. (1999) Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trends Microbiol.* **7**: 115–120.
- Pescaretti, M.D.L.M., Farizano, J. V, Morero, R., and Delgado, M.A. (2013) A Novel Insight on Signal Transduction Mechanism of RcsCDB System in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *PLoS One* **8**: e72527.
- Pflüger, K. and Müller, V. (2004) Transport of Compatible Solutes in Extremophiles. *J. Bioenerg. Biomembr.* **36**: 17–24.
- Piemontese, L., Vitucci, G., Catto, M., Laghezza, A., Perna, F.M., Rullo, M., et al. (2018) Natural scaffolds with multi-target activity for the potential treatment of Alzheimer's disease. *Molecules* **23**: 1–12.
- Pintado, C., Revilla, E., Vizueté, M.L., Jiménez, S., García-Cuervo, L., Vitorica, J., et al. (2011) Regional difference in inflammatory response to LPS-injection in the brain: Role of microglia cell density. *J. Neuroimmunol.* **238**: 44–51.
- Piubeli, F., Salvador, M., Argandoña, M., Nieto, J.J., Bernal, V., Pastor, J.M., et al. (2018) Insights into metabolic osmoadaptation of the ectoines-producer bacterium *Chromohalobacter salexigens* through a high-quality genome scale metabolic model. *Microb. Cell Fact.* **17**: 1–20.

## BIBLIOGRAFÍA

- Pohl, F. and Lin, P.K.T. (2018) The potential use of plant natural products and plant extracts with antioxidant properties for the prevention/treatment of neurodegenerative diseases: In vitro, in vivo and clinical trials. *Molecules* **23**:
- Poolman, B. and Glaasker, E. (1998) Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol. Microbiol.* **29**: 397–407.
- Poolman, B., Spitzer, J.J., and Wood, J.M. (2004) Bacterial osmosensing: Roles of membrane structure and electrostatics in lipid-protein and protein-protein interactions. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1666**: 88–104.
- Pratt, L.A., Hsing, W., Gibson, K.E., and Silhavy, T.J. (1996) From acids to osmZ: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in Escherichia coli. *Mol. Microbiol.* **20**: 911–7.
- Quandt, J. and Hynes, M.F. (1993) Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* **127**: 15–21.
- Ramirez, A.I., de Hoz, R., Salobrar-Garcia, E., Salazar, J.J., Rojas, B., Ajoy, D., et al. (2017) The role of microglia in retinal neurodegeneration: Alzheimer's disease, Parkinson, and glaucoma. *Front. Aging Neurosci.* **9**: 1–21.
- Ramos, B., Baglietto-Vargas, D., Rio, J.C. del, Moreno-Gonzalez, I., Santa-Maria, C., Jimenez, S., et al. (2006) Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1 x APP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **27**: 1658–1672.
- Rathore, S., Habes, M., Iftikhar, M.A., Shacklett, A., and Davatzikos, C. (2017) A review on neuroimaging-based classification studies and associated feature extraction methods for Alzheimer's disease and its prodromal stages. *Neuroimage* **155**: 530–548.
- Ravichandran, K.S. and Lorenz, U. (2007) Engulfment of apoptotic cells: Signals for a good meal. *Nat. Rev. Immunol.* **7**: 964–974.
- Recuero, M., Vicente, M.C., Martínez-García, A., Ramos, M.C., Carmona-Ssaez, P., Sastre, I., et al. (2009) A free radical-generating system induces the cholesterol biosynthesis pathway: A role in Alzheimer's disease. *Aging Cell* **8**: 128–139.
- Reina-Bueno, M. (2010) Papel de los solutos compatibles hidroxietoína y trehalosa en la tolerancia al estrés térmico y a la desecación en las bacterias Chromohalobacter salexigens y Rhizobium etli.
- Reina-Bueno, M., Argandoña, M., Salvador, M., Rodríguez-Moya, J., Iglesias-Guerra, F., Csonka, L.N., et al. (2012) Role of trehalose in salinity and temperature tolerance in the model halophilic bacterium Chromohalobacter salexigens. *PLoS One* **7**: e33587.
- Ricciarelli, R. and Fedele, E. (2017) The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. *Curr. Neuropharmacol.* **15**: 926–935.

## BIBLIOGRAFÍA

- Righi, M., Mori, L., Libero, G. De, Sironi, M., Biondi, A., Mantovani, A., et al. (1989) Monokine production by microglial cell clones. *Eur. J. Immunol.* **19**: 1443–1448.
- Risso, D., Schwartz, K., Sherlock, G., and Dudoit, S. (2011) GC-Content Normalization for RNA-Seq Data. *BMC Bioinformatics* **12**: 480.
- Roberts, M.F. (2005) Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems* **30**: 1–30.
- Robichon, C., Karimova, G., Beckwith, J., and Ladant, D. (2011) Role of leucine zipper motifs in association of the Escherichia coli cell division proteins FtsL and FtsB. *J. Bacteriol.* **193**: 4988–4992.
- Rodríguez-Beltrán, J., Elabed, H., Gaddour, K., Blázquez, J., and Rodríguez-Rojas, A. (2012) Simple DNA transformation in Pseudomonas based on the Yoshida effect. *J. Microbiol. Methods* **89**: 95–98.
- Rodríguez-Moya, J., Argandoña, M., Reina-Bueno, M., Nieto, J.J., Iglesias-Guerra, F., Jebbar, M., and Vargas, C. (2010) Involvement of EupR, a response regulator of the NarL/FixJ family, in the control of the uptake of the compatible solutes ectoines by the halophilic bacterium Chromohalobacter salexigens. *BMC Microbiol.* **10**: 256.
- Rodríguez de Moya Vera, J. (2010) Manipulación genética de la bacteria halófila Chromohalobacter salexigens para la producción de los bioestabilizadores ectoína e hidroxietoína. *Tesis Dr.*
- Romanel, A., Jensen, L.J., Cardelli, L., and Csikász-Nagy, A. (2012) Transcriptional regulation is a major controller of cell cycle transition dynamics. *PLoS One* **7**:
- Romero, A. and Marco-Contelles, J. (2018) Recent Developments on Multi-Target-Directed Tacrines for Alzheimer's Disease. I. The Pyranotacrines. *Curr. Top. Med. Chem.* **17**: 3328–3335.
- Rosenberg, A.H., Lade, B.N., Dao-shan, C., Lin, S.W., Dunn, J.J., and Studier, F.W. (1987) Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* **56**: 125–135.
- Ryu, J., Kanapathipillai, M., Lentzen, G., and Park, C.B. (2008) Inhibition of  $\beta$ -amyloid peptide aggregation and neurotoxicity by  $\alpha$ -d-mannosylglycerate, a natural extremolyte. *Peptides* **29**: 578–584.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., et al. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (80- )*. **239**: 487–491.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (80- )*. **230**: 1350–4.

## BIBLIOGRAFÍA

- Salar-García, M.J., Bernal, V., Pastor, J.M., Salvador, M., Nieto, J.J., Vargas, C., and Cánovas, M. (2017) Understanding the interplay of carbon and nitrogen supply for ectoines production and metabolic overflow in high density cultures of *Chromohalobacter salexigens*. *Microb. Cell Fact.* 1–12.
- Salazar, M.E. and Laub, M.T. (2015) Temporal and evolutionary dynamics of two-component signaling pathways. *Curr. Opin. Microbiol.* **24**: 7–14.
- Salmannejad, F. and Nafissi-Varcheh, N. (2017) Ectoine and hydroxyectoine inhibit thermal-induced aggregation and increase thermostability of recombinant human interferon Alfa2b. *Eur. J. Pharm. Sci.* **97**: 200–207.
- Salvado, B., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., and Alves, R. (2015) A survey of HK, HPT, and RR domains and their organization in two-component systems and phosphorelay proteins of organisms with fully sequenced genomes.
- Salvador, M., Argandoña, M., Naranjo, E., Piubeli, F., Nieto, J.J., Csonka, L.N., and Vargas, C. (2018) Quantitative RNA-seq analysis unveils osmotic and thermal adaptation mechanisms relevant for ectoine production in *Chromohalobacter salexigens*. *Front. Microbiol.* **9**: 1–19.
- Salvador, M., Argandoña, M., Pastor, J.M., Bernal, V., Cánovas, M., Csonka, L.N., et al. (2015) Contribution of RpoS to metabolic efficiency and ectoines synthesis during the osmo- and heat-stress response in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *Environ. Microbiol. Rep.* **7**: 301–311.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning. A laboratory Manual* Third Edit. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanner F., M. (1999) Python: A programming Language for software integration and development. *J. Mol. Graph. Model.* **17**: 57–61.
- Santos-beneit, F. (2015) The Pho regulon : a huge regulatory network in bacteria. **6**: 1–13.
- Santos, H. and Da Costa, M.S. (2002) Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments. *Environ. Microbiol.* **4**: 501–509.
- Sarkar, M.K., Paul, K., and Blair, D. (2010) Chemotaxis signaling protein CheY binds to the rotor protein FliN to control the direction of flagellar rotation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 9370–9375.
- Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M.M.B., de Strooper, B., Frisoni, G.B., Salloway, S., and Van der Flier, W.M. (2016) Alzheimer's disease. *Lancet* **388**: 505–517.
- Schmidt, T.G.M. and Skerra, A. (2007) The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat. Protoc.* **2**: 1528–1535.
- Schramm, A., Lee, B., and Higgs, P.I. (2012) Intra- and interprotein phosphorylation between two-hybrid histidine kinases controls *Myxococcus xanthus* developmental



## BIBLIOGRAFÍA

- progression. *J. Biol. Chem.* **287**: 25060–72.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., et al. (2006) The RIN: An RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol. Biol.* **7**: 1–14.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., and Ponting, C.P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 5857–5864.
- Schwibbert, K., Marin-Sanguino, A., Bagyan, I., Heidrich, G., Lentzen, G., Seitz, H., et al. (2011) A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581 T. *Environ. Microbiol.* **13**: 1973–1994.
- Selkoe, D.J. (2019) Alzheimer disease and aducanumab: adjusting our approach. *Nat. Rev. Neurol.* **15**: 365–366.
- Selkoe, D.J. and Hardy, J. (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* **8**: 595–608.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E., and Hyman, B.T. (2011) Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **1**:
- Sevigny, J., Chiao, P., Bussière, T., Weinreb, P.H., Williams, L., Maier, M., et al. (2016) The antibody aducanumab reduces A $\beta$  plaques in Alzheimer's disease. *Nature* **537**: 50–56.
- Sgarbossa, A. (2012) Natural biomolecules and protein aggregation: Emerging strategies against amyloidogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **13**: 17121–17137.
- Sharma, P., Stagge, S., Bekker, M., Bettenbrock, K., and Hellingwerf, K.J. (2013) Kinase Activity of ArcB from *Escherichia coli* Is Subject to Regulation by Both Ubiquinone and Demethylmenaquinone. *PLoS One* **8**:
- Shen, Z., Li, X., Bao, X., and Wang, R. (2017) Microglia-targeted stem cell therapies for Alzheimer disease: A preclinical data review. *J. Neurosci. Res.* **95**: 2420–2429.
- Shendure, J. and Ji, H. (2008) Next-generation DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.* **26**: 1135–1145.
- Sherman, M.A. and Lesné, S.E. (2011) Detecting A $\beta$ \*56 Oligomers in Brain Tissues. In, Roberson, E.D. (ed), *Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 45–56.
- Shimizu, T., Yoshimune, K., Komoriya, T., Akiyama, T., Ye, X., and Kohno, H. (2013) Monoclonal antibodies against large oval aggregates of A $\beta$ 1-42. *J. Biosci. Bioeng.* **115**: 216–220.
- Siryaporn, A. and Goulian, M. (2010) *Characterizing Cross-Talk In Vivo* 1st ed. Elsevier Inc.
- Skerker, J.M., Prasol, M.S., Perchuk, B.S., Biondi, E.G., and Laub, M.T. (2005) Two-

## BIBLIOGRAFÍA

- Component Signal Transduction Pathways Regulating Growth and Cell Cycle Progression in a Bacterium: A System-Level Analysis. *PLoS Biol.* **3**: e334.
- Skoumalová, A. and Hort, J. (2012) Blood markers of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J. Cell. Mol. Med.* **16**: 2291–2300.
- Sleator, R.D. and Hill, C. (2002) Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 49–71.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., H, G.F., Provenzano, M.D., et al. (1985) Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid'. *Anal. Biochem.* **150**: 76–85.
- Sonnemann, U., Möller, M., and Bilstein, A. (2014) Noninterventional Open-Label Trial Investigating the Efficacy and Safety of Ectoine Containing Nasal Spray in Comparison with Beclomethasone Nasal Spray in Patients with Allergic Rhinitis. *J. Allergy* **2014**: 1–12.
- Sonnenburg, E.D., Sonnenburg, J.L., Manchester, J.K., Hansen, E.E., Chiang, H.C., and Gordon, J.I. (2006) A hybrid two-component system protein of a prominent human gut symbiont couples glycan sensing in vivo to carbohydrate metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 8834–8839.
- Spaink, H.P., Okker, R.J.H., Wijffelman, C. a., Pees, E., and Lugtenberg, B.J.J. (1987) Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI. *Plant Mol. Biol.* **9**: 27–39.
- Stewart, R.C. (2010) Protein histidine kinases: assembly of active sites and their regulation in signaling pathways. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**: 133–141.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N. (2000) Two-component signal transduction. *Reactions* **69**: 183–215.
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**: 113–130.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**: 60–89.
- Subow, N.N. (1931) Oceanographical Tables Subow, N.N. (ed) s.n.], S.I.
- Suh, Y.H. and Checler, F. (2002) Amyloid precursor protein, presenilins, and  $\alpha$ -synuclein: Molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol. Rev.* **54**: 469–525.
- Sumner, J.B. (1921) Dinitrosalicylic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. *J. Biol. Chem.* **47**: 5–9.
- Sydlik, U., Gallitz, I., Albrecht, C., Abel, J., Krutmann, J., and Unfried, K. (2009) The compatible solute ectoine protects against nanoparticle-induced neutrophilic lung inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **180**: 29–35.

## BIBLIOGRAFÍA

- Sydlík, U., Peuschel, H., Paunel-Görgülü, A., Keymel, S., Krämer, U., Weissenberg, A., et al. (2013) Recovery of neutrophil apoptosis by ectoine: a new strategy against lung inflammation. *Eur. Respir. J.* **41**: 433–42.
- Szklarczyk, D., Franceschini, A., Kuhn, M., Simonovic, M., Roth, A., Minguez, P., et al. (2011) The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Res.* **39**: D561–D568.
- Takami, M., Nagashima, Y., Sano, Y., Ishihara, S., Morishima-Kawashima, M., Funamoto, S., and Ihara, Y. (2009)  $\gamma$ -Secretase: Successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of  $\beta$ -carboxyl terminal fragment. *J. Neurosci.* **29**: 13042–13052.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., and Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**: 2725–2729.
- Tang, Y. and Le, W. (2016) Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol. Neurobiol.* **53**: 1181–1194.
- Tatusov, R.L., Fedorova, N.D., Jackson, J.D., Jacobs, A.R., Kiryutin, B., Koonin, E. V., et al. (2003) The COG database: An updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics* **4**: 1–14.
- Terpe, K. (2003) Overview of tag protein fusions: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**: 523–533.
- Thomas, S.A., Immormino, R.M., Bourret, R.B., and Silversmith, R.E. (2013) Nonconserved active site residues modulate CheY autophosphorylation kinetics and phosphodonor preference Stephanie. *Biochemistry* **52**: 2262–2273.
- Tomaras, A.P., Flagler, M.J., Dorsey, C.W., Gaddy, J. a., and Actis, L. a. (2008) Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. *Microbiology* **154**: 3398–3409.
- Tomic, J.L., Pensalfini, A., Head, E., and Glabe, C.G. (2009) Soluble fibrillar oligomer levels are elevated in Alzheimer's disease brain and correlate with cognitive dysfunction. *Neurobiol. Dis.* **35**: 352–358.
- Tomich, M. and Mohr, C.D. (2004) Genetic characterization of a multicomponent signal transduction system controlling the expression of cable pili in *Burkholderia cenocepacia*. *J. Bacteriol.* **186**: 3826–3836.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350–4354.
- Trajtenberg, F., Graña, M., Ruétalo, N., Botti, H., and Buschiazzo, A. (2010) Structural and enzymatic insights into the ATP binding and autophosphorylation mechanism of a

## BIBLIOGRAFÍA

- sensor histidine kinase. *J. Biol. Chem.* **285**: 24892–24903.
- Tran, B.H., Dao, V.A., Bilstein, A., Unfried, K., Shah-Hosseini, K., and Mösges, R. (2019) Ectoine-Containing Inhalation Solution versus Saline Inhalation Solution in the Treatment of Acute Bronchitis and Acute Respiratory Infections: A Prospective, Controlled, Observational Study. *Biomed Res. Int.* **2019**..
- Trapnell, C., Hendrickson, D.G., Sauvageau, M., Goff, L., Rinn, J.L., and Pachter, L. (2013) Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nat. Biotechnol.* **31**: 46–53.
- Trapnell, C., Williams, B. a, Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M.J., et al. (2010) Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat. Biotechnol.* **28**: 511–515.
- Turcatti, G., Romieu, A., Fedurco, M., and Tairi, A.P. (2008) A new class of cleavable fluorescent nucleotides: Synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. *Nucleic Acids Res.* **36**..
- Tusnády, G.E. and Simon, I. (1998) Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: Application to topology prediction. *J. Mol. Biol.* **283**: 489–506.
- Tzeng, Y.L. and Hoch, J.A. (1997) Molecular recognition in signal transduction: the interaction surfaces of the Spo0F response regulator with its cognate phosphorelay proteins revealed by alanine scanning mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **272**: 200–12.
- Ukeda, H., Kawana, D., Maeda, S., and Sawamura, M. (1999) Spectrophotometric Assay for Superoxide Dismutase Based on the Reduction of Highly Water-soluble Tetrazolium Salts by Xanthine-Xanthine Oxidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**: 485–488.
- Ullmann, A. and Danchin, A. (1983) Role of cyclic AMP in bacteria. Paul Greengard, G.A.R. (ed) Raven Press.
- Ulrich, L.E., Koonin, E. V, and Zhulin, I.B. (2005) One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol* **13**: 52–56.
- Ulrich, L.E. and Zhulin, I.B. (2009) The MiST2 database : a comprehensive genomics resource on microbial signal transduction. *Nucleic Acids Res.* **38**: 401–407.
- Umeno, A., Biju, V., and Yoshida, Y. (2017) In vivo ROS production and use of oxidative stress-derived biomarkers to detect the onset of diseases such as Alzheimer’s disease , Parkinson’s disease , and diabetes. *Free Radic. Res.* **51**: 413–427.
- Unfried, K., Krämer, U., Sydlik, U., Autengruber, A., Bilstein, A., Stolz, S., et al. (2016) Reduction of neutrophilic lung inflammation by inhalation of the compatible solute ectoine : a randomized trial with elderly individuals. *Int. J. COPD* **11**: 2573–2583.
- Vargas, C., Argandña, M., Reina-Bueno, M., Rodríguez-Moya, J., Fernández-Aunión, C., and Nieto, J.J. (2008) Unravelling the adaptation responses to osmotic and temperature

## BIBLIOGRAFÍA

- stress in *Chromohalobacter salexigens*, a bacterium with broad salinity tolerance. *Saline Systems* **4**: 1–9.
- Vargas, C., Fern, R., David, C., Ventosa, A., and Nieto, J.J. (1995) Isolation of cryptic plasmids from moderately halophilic eubacteria of the genus *Halomonas*. Characterization of a small plasmid from *H. elongata* and its use for shuttle vector construction. *Mol Gen Genet* **246**: 411–418.
- Vargas, C., Jebbar, M., Carrasco, R., Blanco, C., Calderón, M.I., Iglesias-Guerra, F., and Nieto, J.J. (2006) Ectoines as compatible solutes and carbon and energy sources for the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J. Appl. Microbiol.* **100**: 98–107.
- Vargas, C., Kallimanis, A., Koukkou, A.I., Calderon, M.I., Canovas, D., Iglesias-Guerra, F., et al. (2005) Contribution of chemical changes in membrane lipids to the osmoadaptation of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *Syst. Appl. Microbiol.* **28**: 571–81.
- Vasilescu, J., Guo, X., and Kast, J. (2004) Identification of protein-protein interactions using in vivo cross-linking and mass spectrometry. *Proteomics* **4**: 3845–3854.
- Ventosa, A., Nieto, J.J., and Oren, A. (1998) Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 504–44.
- Viña, J. and Sanz-Ros, J. (2018) Alzheimer's disease: Only prevention makes sense. *Eur. J. Clin. Invest.* **48**: 1–9.
- Vorhees, C. V and Williams, M.T. (2006) Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat. Protoc.* **1**: 848–58.
- Vreeland, R.H., Litchfield, C.D., Martin, E.L., and Elliot, E. (1980) *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**: 485–495.
- Waibel, A., Hanazawa, T., Hinton, G.E., Shikano, K., and Lang, K.J. (1989) Phoneme recognition using time-delay neural networks. *Acoust. Speech, Signal Process. IEEE Trans.* **37**: 328–339.
- Walderhaug, M.O., Polarek, J.W., Voelkner, P., Daniel, J.M., Hesse, J.E., Altendorf, K., and Epstein, W. (1992) KdpD and KdpE, proteins that control expression of the *kdpABC* operon, are members of the two-component sensor-effector class of regulators. *J. Bacteriol.* **174**: 2152–2159.
- Walter, J., Grünberg, J., Capell, A., Pesold, B., Schindzielorz, A., Citron, M., et al. (1997) Proteolytic processing of the Alzheimer disease-associated presenilin-1 generates an in vivo substrate for protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 5349–5354.
- Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M. (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* **10**: 57–63.

## BIBLIOGRAFÍA

- Wattam, A.R., Davis, J.J., Assaf, R., Boisvert, S., Brettin, T., Bun, C., et al. (2017) Improvements to PATRIC, the all-bacterial bioinformatics database and analysis resource center. *Nucleic Acids Res.* **45**: D535–D542.
- Wegener-Feldbrügge, S. and Søgaard-Andersen, L. (2009) The atypical hybrid histidine protein kinase RodK in *myxococcus xanthus*: Spatial proximity supersedes kinetic preference in phosphotransfer reactions. *J. Bacteriol.* **191**: 1765–1776.
- Welch, W.J. and Brown, C.R. (1996) Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell Stress Chaperones* **1**: 109–15.
- Welsh, D.T. (2000) Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms : from single cells to global climate. **24**..
- Werkhäuser, N., Bilstein, A., and Sonnemann, U. (2014) Treatment of Allergic Rhinitis with Ectoine Containing Nasal Spray and Eye Drops in Comparison with Azelastine Containing Nasal Spray and Eye Drops or with Cromoglycic Acid Containing Nasal Spray. *J. Allergy* **2014**: 1–13.
- West, A.H. and Stock, A.M. (2001) Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem. Sci.* **26**: 369–376.
- Willett, J.W. and Crosson, S. (2017) Atypical modes of bacterial histidine kinase signaling. *Mol. Microbiol.* **103**: 197–202.
- Willett, J.W. and Kirby, J.R. (2012) Genetic and Biochemical Dissection of a HisKA Domain Identifies Residues Required Exclusively for Kinase and Phosphatase Activities. *PLoS Genet.* **8**..
- Winkler, C., Denker, K., Wortelkamp, S., and Sickmann, A. (2007) Silver- and Coomassie-staining protocols: Detection limits and compatibility with ESI MS. *Electrophoresis* **28**: 2095–2099.
- Wolanin, P., Thomason, P., and Stock, J. (2002) Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol.* **3**: reviews3013.1-reviews3013.8.
- Wood, J.M. (2007) Bacterial Osmosensing Transporters. In, *Methods in Enzymology.*, pp. 77–107.
- Wood, J.M. (2006) Osmosensing by bacteria. *Sci. STKE* **2006**..
- Wood, J.M., Bremer, E., Csonka, L.N., Kraemer, R., Poolman, B., Van der Heide, T., and Smith, L.T. (2001) Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. In, *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology.*, pp. 437–460.
- Wuichet, K., Alexander, R.P., and Zhulin, I.B. (2007) Comparative genomic and protein sequence analyses of a complex system controlling bacterial chemotaxis. *Methods*

## BIBLIOGRAFÍA

- Enzymol.* **422**: 1–31.
- Wuichet, K., Cantwell, B.J., and Zhulin, I.B. (2010) Evolution and phyletic distribution of two-component signal transduction systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**: 219–225.
- Wuichet, K. and Zhulin, I.B. (2010) Origins and Diversification of a Complex Signal Transduction System in Prokaryotes. *Sci signal* **3**:
- www.bitop.de bitop Extremolytes for life.
- www.ectoin.net Ectoin®.
- Yaku, H., Kato, M., Hakoshima, T., Tsuzuki, M., and Mizuno, T. (1997) Interaction between the CheY response regulator and the histidine-containing phosphotransfer (HPT) domain of the ArcB sensory kinase in Escherichia coli. *FEBS Lett.* **408**: 337–340.
- Yamamoto, K., Matsumoto, F., Oshima, T., Fujita, N., Ogasawara, N., and Ishihama, A. (2008) Anaerobic regulation of citrate fermentation by CitAB in Escherichia coli. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**: 3011–3014.
- Yan, J., Nadell, C.D., Stone, H.A., Wingreen, N.S., and Bassler, B.L. (2017) Extracellular-matrix-mediated osmotic pressure drives Vibrio cholerae biofilm expansion and cheater exclusion. *Nat. Commun.* **8**:
- Yancey, P.H. (2005) Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.* **208**: 2819–2830.
- Yoshida, M., Ishihama, A., and Yamamoto, K. (2015) Cross talk in promoter recognition between six NarL-family response regulators of Escherichia coli two-component system. 601–612.
- Zaccai, G., Bagyan, I., Combet, J., Cuello, G.J., Demé, B., Fichou, Y., et al. (2016) Neutrons describe ectoine effects on water H-bonding and hydration around a soluble protein and a cell membrane. *Sci. Rep.* **6**: 1–12.
- Zaman, M., Khan, A.N., Wahiduzzaman, Zakariya, S.M., and Khan, R.H. (2019) Protein misfolding, aggregation and mechanism of amyloid cytotoxicity: An overview and therapeutic strategies to inhibit aggregation. *Int. J. Biol. Macromol.* **134**: 1022–1037.
- Zapf, J., Sen, U., Madhusudan, Hoch, J. a., and Varughese, K.I. (2000) A transient interaction between two phosphorelay proteins trapped in a crystal lattice reveals the mechanism of molecular recognition and phosphotransfer in signal transduction. *Structure* **8**: 851–862.
- Zhang, Y. and Song, W. (2017) Islet amyloid polypeptide: Another key molecule in Alzheimer's pathogenesis? *Prog. Neurobiol.* **153**: 100–120.
- Zhao, B. (2009) Natural antioxidants protect neurons in Alzheimer's disease and parkinson's disease. *Neurochem. Res.* **34**: 630–638.

## **VII. ANEXOS**



## Tabla de cebadores

Nombre/experimento	Secuencia (5'-3')	Referencia
<b>Amplificación de la región eupK</b>		
quina_rv	GCCATCAATCCCAACATCAGC	Este estudio
quina_fw	TCAGGCGATAGAAAATGTAGGC	Este estudio
<b>Comprobación del mutante CHR212</b>		
quina_rv	GCCATCAATCCCAACATCAGC	Este estudio
quina_fw	TCAGGCGATAGAAAATGTAGGC	Este estudio
<b>Mutagénesis dirigida por PCR</b>		
quinHpa_fw	CGGCAATGTAGACCAGCGAGTTAACGATCAATAACCAGC	Este estudio
quinHpa_rv	GCTGTTATTGATCGTTAACTCGCTGGTCTACATTGCCG	Este estudio
<b>Organización génica de la región csal0869 (eupK)</b>		
F-868	CGAGTGCAGGTAGATGACATGG	Este estudio
R-868	GCTTCATTCTCGAACTGGTGCT	Este estudio
F-868/869	CACAGCAGGGTATAGCCGTAG	Este estudio
R-868/869	TCACCTCGACAATGAAGTCACC	Este estudio
F-869	TGGGAAATCTCGAAGCTCACTC	Este estudio
R-869	GATCGCCTACTTCGACAAGGAA	Este estudio
F-869/870	CGTAAAACGTCACCGAAGTGCAA	Este estudio
R-869/870	GGAGTTCTTCTCTATCGCTTCG	Este estudio
F-870	CGAAGCGATAGAGGAAGAACTCC	Este estudio
R-870	GATGCTCGGCTACCAGGTCTA	Este estudio
<b>qPCR</b>		
16S-RT-fw2	GGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATG	Argandoña e
16S-RT-Rv	GAAGGCACCCCGGAATCTCT	Argandoña e
ectA-qRT-fw	ACGAACTCGTCAAGGCATGC	Argandoña e
ectA-qRT-rv	TGCCATAGAAAAGTAGGTGTCCG	Argandoña e
RT-ectD-fw	ATTCGACATGAAGACGTGACATTC	Salvador et a
RT-ectD-rv	TCGGCCAGAAAATGGGGTTC	Salvador et a
doeA_FW	TGGCACAACGGTATCATC	Salvador et a
doeA_Rv	ATTCGCTGGTCAACTGGT	Salvador et a
doeD_FW	CACGACCACTTCGACCTG	Salvador et a
doeD_Rv	CATGAGCGAGCGGAGTTTTTC	Salvador et a
eutC_FW	GCTGATGATGGTGTCTCG	Salvador et a
eutC_Rv	CGAGACATCGACACCGT	Salvador et a
teaA_FW	ATGCGAAATATCGTCCTGAGTATC	Salvador et a
teaA_Rv	GCATAGCCGTAAGTGCACGCT	Salvador et a
teaC_FW	CACGCTGTTTATGATGTTTAC	Salvador et a
teaC_Rv	TACCCAACGCGGATACCGTT	Salvador et a
<b>BACTH</b>		
pKT125N rev	GGCGGAACATCAATGTGGCG	Este estudio
pKT25 fwd	GGCGGATATCGACATGTTCCG	Este estudio
pKT25 rev	ATCGGTGCGGGCTCTTCCG	Este estudio
pKT25N fwd	GCTCACTCATTAGGCACCCC	Este estudio
pUT18 rev	CCGTCGTAGCGGAACTGGCG	Este estudio
pUT18C fwd	TCGACGATGGGCTGGGAGCC	Este estudio
pUT18C rev	AGCAGACAAGCCCCTCAGGG	Este estudio
B-EupR Fw (XbaI)	CCCTTTCTAGACATGGCTTTTGCCAGAAATT	Este estudio
B-EupR Rv (BamHI)	AAATTGGATCCAAGGATTTCGACCTTGGGCG	Este estudio
B-EupK Fw (XbaI)	CCCTTTCTAGACTTCTGCTACATCTTCCGTG	Este estudio
B-EupK Rv (BamHI)	AAATTGGATCCGGATGTTTCTGCGCAT	Este estudio
B-Csal_1062 Fw (XbaI)	AAATTTCTAGAGCAGCAGGCAGAAGCGGCGAGT	Este estudio

BIBLIOGRAFÍA

B-Csal_1062 Rv (BamHI)	AAATTGGATCCGGAGACAGATCGACCCCTGA	Este estudio
B-Csal_1635 Fw (XbaI)	AAATTTCTAGACCGCCGGCTCACGGCG	Este estudio
B-Csal_1635 Rv (BamHI)	AAATTGGATCCGGGGCGTCGACCAGT	Este estudio
B-Csal_2667 Fw (XbaI)	AAATTTCTAGACGAGGCAGAAAGCGCCAAC	Este estudio
B-Csal_2667 Rv (BamHI)	AAATTGGATCCGGGTGAGGCATGTCGTTG	Este estudio
<b>Overexpression/SPINE</b>		
pHS15 Fw	CGGTGGATGACCTTTTGAATGACC	Este estudio
pHS15 Rv	GTAATACGACTCACTATAGGGC	Este estudio
pMP92 -check Fw	AGCTCGAATTCATGCAT	Este estudio
pMP92 -check Rv	ATCGATGAATTCGAGCT	Este estudio
pMP92 Fw	AACGGCCTCACCCAAAAAT	Este estudio
pMP92 Rv	GACTCACCAGTTGTCCTGCAA	Este estudio
EupR + C-His-tag Rv2e EcoRI	TTAAGAATTCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGGATTCGACCTT	Este estudio
EupR + C-His-tag Rv2f XbaI	TTAAAGATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGGATTCGACCTT	Este estudio
EupR + Ctag Fw2d	ATTGAGAACACATTCGCCATTTCCGGAGGAGACTCAATGGCTTTT	Este estudio
EupR + Ctag Rv2d EcoRI	TTAAGAATTCTCATTTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAGGATTCGACCTTGGGCGGTTCCG	Este estudio
EupR + Ntag Fw1c Sall	AAATTGTCGACTAATTCGTCACCATGCGGTCCGCTGT	Este estudio
EupR + Ntag Fw2c	TCCGGAGGAGACTCAATGTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAAGCTTTTGC	Este estudio
EupR + Ntag Rv1c	TGCGGGTGGCTCCACATGAGTCTCCTCCGAAATGGCGAATGTGTTCTCAAT	Este estudio
EupR + Ntag Rv2c	TTAAGAATTCTCAGGATTCGACCTTGGGCGGTTCCG	Este estudio
EupK Cterm + Ctag Fw2a	ATTGAGAACACATTCGCCATTATAAGGGAGGTCCCATGTTCTGCTAC	Este estudio
EupK Cterm + Ctag Fw2a1	CATTCGCCATTATAAGGGAGGTCCCATGTTCTGCTACATCTTCG	Este estudio
EupK Cterm + Ntag Fw2b	ATAAGGGAGGTCCCATGTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAATTCGCTACAT	Este estudio
EupK Cterm + Ntag Rv1b	TGCGGGTGGCTCCACATGGGACCTCCCTTATAATGGCGAATGTGTTCTCAAT	Este estudio
EupK Cterm + Ntag Rv2b EcoRI	TTAACTTAAGCTAATGTTCTCCTGCCGATGGCGGATTGGCC	Este estudio
EupK+Ctag Fw1 BamHI	AAATTGCATCCGTCACCATGCGGTCCGCTGT	Este estudio
EupK+Ctag Fw2	ATTGAGAACACATTCGCCATTATAAGGGAGGTCCCATGTTCCGCTGGC	Este estudio
EupK+Ctag Rv1	AATGGCGAATGTGTTCTCAAT	Este estudio
EupK+Ctag Rv2 EcoRI	TTAACTTAAGCTATTTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAATGTTCTCCTGCCGAT	Este estudio
<b>Expresión de proteínas pET28</b>		
BamHI-EupK Fw	CCTTTGGATCCATGTTCCGCTGGCTGGTTATT	Este estudio
EupK-EcoRI Rv	CCCTTGAATTCTAATGTTCCCTGCCGATGG	Este estudio
<b>Expresión de proteínas pKS-</b>		
BamHI-0866 Fw	AATTGGATCCGGAGGAGACTCAATGGCTTT	Este estudio
0866-EcoRI Rv	CCCTTGAATTTCGATGCGGATACAAGAAAGCC	Este estudio
BamHI-0869 Fw	AAATTGGATCCTACCATAGAATGGCCGCA	Este estudio
0869-EcoRI Rv	AATTGAATTCGAAATCGTACGCAGCATGCTA	Este estudio
BamHI-1062 Fw	AAATTGGATCCTTCGCTGCCTGTCTTGTC	Este estudio
1062-HindIII Rv	AAATTAAGCTTCACCCGCAAGCTCACATA	Este estudio
BamHI-1635 Fw	AAATTGGATCCTTACTGGCAGCAGCAACG	Este estudio
1635-HindIII Rv	AAATTAAGCTTGAGCAGCAACACGACCAT	Este estudio
BamHI-2667 Fw	AAATTGGATCCTACGTTTCCGCTCGGTCT	Este estudio
2667-EcoRI Rv	AAATTGAATTCCTGCGCATCTCGTCTGCT	Este estudio
<b>Expresión de proteínas pET151-</b>		
EupR Forward1	CACCCTGGTGCCGCGCGGAGCAGGAAACGCGTCCGCGA	Este estudio
EupR Forward2	CACCGAGGAACGCGTCCGCGAG	Este estudio
EupR Reverse	CTCTTCTCAGGGGAGCCACAC	Este estudio
EupK Forward1	CACCCTGGTGCCGCGCGGAGCCTCAGCTGTTTCCGAG	Este estudio
EupK Forward2	CACCCTCAGCTGTTTCCGAG	Este estudio
EupK Reverse	AGGCGTCGGCTTCTCCTAATGTTT	Este estudio
EupK Fw880	CACCGACATACCGAACGGCGC	Este estudio
EupK Fw940	CACCGCCAACGCTCCAAGACG	Este estudio
1062 Forward1	CACCCTGGTGCCGCGCGGAGCCAGTCTCAGGAACCTCAG	Este estudio
1062 Forward2	CACCAGTCTCAGGAACCTCAG	Este estudio
1062 Reverse	CGGTGCCGCTCAAGACAGATC	Este estudio
1635 Forward1	CACCCTGGTGCCGCGCGGAGCAACCATCGAAGTCAAG	Este estudio

## BIBLIOGRAFÍA

1635 Forward2b	CACCGAAACCATCGAAGTCAAGAACATCG	Este estudio
1635 Reverse b	CTCAGGGCGTCGACCAGTGT	Este estudio
2667 Forward1	CACCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCAGGCCGAGGACA	Este estudio
2667 Forward 2b	CACCCTGGAACATCTCAGTCAGGAGCT	Este estudio
2667 Reverse b	GTCAGTGAGGCATGTCGTTGGCCAT	Este estudio

## Sistemas de dos componentes de *C. salexigens*

Nº proteína	Nombre	Anotación automática	Posible regulador de respuesta asociado	Posible función biológica	Referencia bibliográfica
-------------	--------	----------------------	---	---------------------------	--------------------------

### Osmoadaptación

Csal_0631	FeuQ,	sensor signal transduction histidine kinase	Csal0630	osmodetección	Carlyon et al., 2010
Csal_0728		sensor signal transduction histidine kinase	<b>Csal_0727</b> ; Csal_1451	osmodetección	Itou and Tanaka, 2001
Csal_0869	EupK	multi-sensor hybrid histidine kinase	Csal_0866 - EupR	-	
Csal_1450		sensor signal transduction histidine kinase	<b>Csal_1451</b> ; Csal_0727; Csal_1783; Csal_2596	osmodetección	Itou and Tanaka, 2001
Csal_1782		sensor signal transduction histidine kinase	<b>Csal_1783</b> ; Csal_2596; Csal_0727; Csal_1451; Csal_0630	osmodetección	Itou and Tanaka, 2001
Csal_2417		signal transduction histidine kinase	Csal_2418	osmodetección	Itou and Tanaka, 2001
Csal_2595		periplasmic sensor signal transduction histidine kinase	Csal_2596	osmodetección	Itou and Tanaka, 2001

### Metabolismo

Csal_0245	GlnL, NtrB	signal transduction histidine kinase, nitrogen specific, NtrB	Csal_0246- NtrC	metabolismo del nitrógeno	Leigh and Dodsworth, 2007
Csal_0700	CitA	signal transduction histidine kinase regulating citrate/malate metabolism	Csal_0699	utilización del citrato	Yamamoto et al., 2008
Csal_3254	PhoR	PAS/PAC sensor signal transduction histidine kinase	Csal_3253	regulación de fosfato y nitrato	Anba et al., 1990

### Anaerobiosis

Csal_1062	ArcB	Hpt sensor hybrid histidine kinase	Csal_2018	sensor de anaerobiosis	Yaku et al., 1997
Csal_2667	ArcB	multi-sensor hybrid histidine kinase	Csal_2018	sensor de anaerobiosis	Yaku et al., 1997

BIBLIOGRAFÍA

**Quorum sensing/  
Quimiotaxis**

Csal_0670	BfmS	sensor signal transduction histidine kinase	Csal_0669	formación de biofilm, quorum sensing y quimiotaxis	Tomaras et al., 2008
Csal_1635	GacS	multi-sensor hybrid histidine kinase	Csal_2132	quorum sensing	Kay et al., 2006
Csal_2024	CheA	CheA signal transduction histidine kinase	Csal_2023; <b>Csal_2020-</b> CheY; Csal_2021 ; Csal_2017	quimiotaxis	Kato et al., 2008

**Otros**

Csal_0103	CztS, SilS, CopS	heavy metal sensor signal transduction histidine kinase	Csal_0102	respuesta al cobre	Munson et al., 2000
Csal_0715	QseE, GlrK	sensor signal transduction histidine kinase	Csal_0717	estrés/ patogénesis	Göpel et al., 2011
Csal_0969		sensor signal transduction histidine kinase	Csal_0968	desconocido	
Csal_1827	RegB ; PrrB	sensor signal transduction histidine kinase	Csal_1826	respuesta redox	Fernández-Piñar et al., 2008
Csal_2086		sensor signal transduction histidine kinase	Csal_2085 two component, sigma54 specific, Fis family transcriptional regulator	desconocido	
Csal_2406		sensor signal transduction histidine kinase	Csal_2407 two component, sigma54 specific, Fis family transcriptional regulator	desconocido	

## Genes diferencialmente expresados a baja salinidad

CLASSIFICATION	KO	COG NUMBER	FoldChange	padj
<b>DNA Replication Proteins</b>				
DNA Replication Elongation factors				
Elongation factors (bacterial)				
DNA polymerase III holoenzyme				
Csal_2921	K02339	COG2927L	1.514442054	0.00624738
Prevention of re-replication factors				
Csal_2110	K10763	COG0593L	1.548380137	0.00449145
DNA topo-isomerases				
Csal_1560	K03168	COG0550L	2.437840828	1.444E-07
<b>CHROMOSOME ASSOCIATED PROTEIN</b>				
Other nucleoid associated proteins				
Csal_2953	K04047	COG0783P	-6.80976822	1.8308E-08
Other chromosome partitioning proteins				
Csal_2240	K03569	COG1077D	1.975151532	5.2591E-08
Csal_2239	K03570	COG1792M	-2.2019516	0.00957418
<b>DNA Repair and Recombination Proteins</b>				
SSBR (single strand breaks repair)				
NER (nucleotide excision repair)				
GGR (global genome repair) factors				
Csal_1833	K03702	COG0556L	-3.0045729	1.822E-05
MMR (mismatch excision repair)				
Molecular matchmaker				
Csal_1275	K03572	COG0323L	-1.71241188	0.0030609
DNA polymerase III holoenzyme				
Csal_2921	K02339	COG2927L	1.514442054	0.00624738
DSBR (double strand breaks repair)				

## BIBLIOGRAFÍA

HR (homologous recombination)				
RecBC pathway proteins				
Csal_1847	K03550	COG0632L	1.729179305	7.7732E-06
RecFOR pathway proteins				
Csal_0085	K03655	COG2865K	-1.87895471	6.0347E-06
Csal_1460	K06187	COG0353L	-2.79662926	0.00025907
Csal_1847	K03550	COG0632L	1.729179305	7.7732E-06
AddAB pathway proteins				
Two-component NHEJ DNA repair complex				
SHIIR (short-homology-independent illegitimate recombination)				
Facilitator				
Csal_1560	K03168	COG0550L	2.437840828	1.444E-07
SHDIR (short-homology-dependent illegitimate recombination)				
RecET pathway				
Csal_1460	K06187	COG0353L	-2.79662926	0.00025907
Supressor				
Csal_1833	K03702	COG0556L	-3.0045729	1.822E-05
Other factors with a suspected DNA repair function				
Modulation of nucleotide pools				
Csal_0379	K00525	COG0209F	-2.96995717	3.4973E-33
Csal_0668	K00525	COG0209F	-1.6169575	5.2007E-05
Csal_0667	K00526	COG0208F	-4.3701453	1.1773E-30
Csal_0380	K00526	COG0208F	-1.87190481	0.00088201
<b>Transcription Machinery</b>				
RNA polymerase				
Other transcription-related factors				
Transcription elongation factors				
Csal_3060	K06204	COG1734T	4.145658131	3.0359E-05
Transcription termination factor				

BIBLIOGRAFÍA

Csal_0584	K03628	COG1158K	2.321542931	3.7277E-05
<b>Transcription Factors</b>				
Helix-turn-helix				
LysR family				
Csal_2433	K05596	COG0583K	-1.73230743	5.3852E-05
GntR family				
Csal_0722	K03710	COG2188K	-2.67343405	4.6275E-05
Csal_0403	K05799	COG2186K	-2.03514137	4.2876E-05
TetR/AcrR family				
Csal_1516	K02167	COG1309K	-2.22657308	1.0857E-10
Csal_0947	K03577	COG1309K	-1.53076731	0.00060536
Lrp/AsnC family				
Csal_1531	K03719	COG1522K	-1.5666884	0.00560608
MerR family				
Csal_1304	K13638	COG0789K	-2.10014023	0.0053784
IclR family				
Csal_0066	K13641	COG1414K	1.504483664	0.03724671
Others				
Csal_2503	K03704	COG1278K	-1.88951651	0.00498899
Csal_3060	K06204	COG1734T	4.145658131	3.0359E-05
<b>Ribosome</b>				
Small subunit				
Csal_0438	K02988	COG0098J	2.094694308	0.00128114
Csal_0417	K02992	COG0049J	3.504703333	0.00116651
Csal_0416	K02950	COG0048J	1.507914183	0.00679106
Csal_3016	K02959	COG0228J	2.947057236	2.5127E-05
Csal_0478	K02968	-	2.694573843	0.00016803
Large subunit				
Csal_0421	K02906	COG0087J	2.86010685	1.3273E-12
Csal_0410	K02867	COG0080J	2.437504955	2.3533E-05
Csal_2207	K02871	COG0102J	1.624217316	0.00030037
Csal_0431	K02874	COG0093J	2.342021508	0.00184993



## BIBLIOGRAFÍA

Csal_0432	K02895	COG0198J	2.365523293	0.0038835
Csal_1523	K02897	COG1825J	1.943863196	5.5241E-08
Csal_2971	K02902	COG0227J	1.639400838	0.00327839
Csal_0604	K02909	COG0254J	-2.41455974	0.01054551
Csal_2970	K02913	COG0267J	2.642780809	9.4368E-26
<b>Ribosome Biogenesis</b>				
rRNA transcription factors				
Csal_3060	K06204	COG1734T	4.145658131	3.0359E-05
rRNA modification factors				
16S rRNA modification factors				
Csal_1950	K06183	COG1187J	1.728624474	9.1122E-06
Csal_2198	K03438	COG0275M	2.865674266	4.4818E-06
Csal_1448	K06442	COG1189J	1.792827964	0.00719005
23S rRNA modification factors				
Csal_2412	K06968	COG2933R	-2.04690982	0.003517
Csal_1448	K06442	COG1189J	1.792827964	0.00719005
Csal_1593	K06179	COG0564J	4.004492932	2.4554E-09
ribosomal protein modification factors				
Csal_2901	K03817	COG1670J	-2.8031223	0.00184173
Csal_2286	K02687	COG2264J	3.244225419	3.3517E-06
rRNA helicases				
Csal_1139	K05592	COG0513LKJ	3.453391944	2.273E-24
Csal_3184	K05591	COG0513LKJ	1.520800991	0.00141783
GTPases				
Csal_1269	K06949	COG1162R	1.653950766	0.02139465
Csal_1349	K14540	COG1161R	-1.53217501	0.00127056
Other maturation factors				
Csal_1343	K03812	COG3130J	3.774809377	0.00106442
<b>Translation Factors</b>				
Initiation factors				
Csal_3074	K02519	COG0532J	1.534115047	0.00534549
Elongation factors				

## BIBLIOGRAFÍA

Csal_0564	K02357	COG0264J	2.370738033	7.9108E-05
Csal_2531	K02356	COG0231J	1.652751898	0.0069529
Release factors				
Csal_0566	K02838	COG0233J	2.490196393	0.04364879
<b>Transfer RNA Biogenesis</b>				
Aminoacyl-tRNA synthetases (AARSs)				
Csal_0625	K01872	COG0013J	1.588540164	1.183E-08
Csal_0006	K01879	COG0751J	1.566273009	0.00016485
Csal_2051	K01883	COG0215J	1.794866919	0.00267319
Csal_1211	K01885	COG0008J	-1.56759563	0.01361271
Csal_3061	K01894	COG0008J	3.199214159	0.00095571
tRNA modification factors				
Methyltransferases				
Csal_3014	K00554	COG0336J	2.197271529	4.9523E-08
Pseudouridine synthases				
Csal_2894	K06175	COG0564J	2.271734104	0.00158052
Other tRNA modification factors				
Csal_2118	K03151	COG0301H	2.334924734	9.4441E-05
Csal_0580	K04075	COG0037D	1.714961555	0.00670072
Csal_2438	K00685	COG2935O	-1.75024478	0.00071002
<b>Chaperones and folding catalysts</b>				
Heat shock proteins				
HSP90				
Csal_2497	K04079	COG0326O	-7.41581797	4.024E-10
HSP70 / DNAK				
Csal_3094	K04043	COG0443O	-3.14016855	0.00026566
HSP40 / DNAJ				
Csal_3093	K03686	COG0484O	-3.93997104	4.3603E-08
Protein folding catalysts				
Peptidyl prolyl isomerase				

## BIBLIOGRAFÍA

Cyclophilin				
Csal_2053	K03768	COG06520	1.784485904	2.1011E-05
Protein disulfide isomerase				
Csal_3035	K05838	COG31180	-3.52079585	7.3649E-14
<b>Bacterial Motility Proteins</b>				
Flagellar system				
Chemotaxis proteins				
Two component system proteins				
Csal_2020	K03412	COG2201NT	2.639635023	1.896E-05
Csal_2018	K03413	COG2204T	2.094085054	0.00516017
MCPs				
Csal_1099	K03406	COG0840NT	1.654375541	0.00237003
Csal_0126	K03406	COG0840NT	1.515123044	0.03976544
Csal_0906	K03406	COG0840NT	1.653825705	0.02586813
Csal_2022	K03406	COG0840NT	2.043681037	3.2133E-08
Flagellar assembly proteins				
Type-III secretion				
Csal_1964	K02418	COG3190N	-1.7362218	0.0301896
Csal_1967	K02421	COG1684NU	-1.71297046	0.04125283
Motor/switch				
Csal_1505	K02556	COG1291N	-1.7772035	0.01569307
Csal_2026	K02556	COG1291N	1.513603211	0.02062342
Csal_2025	K02557	COG1360N	2.243718915	4.3879E-06
C-ring				
Csal_1956	K02410	COG1536N	-1.92832791	0.04311686
M,S,P and L rings				
Csal_1979	K02386	COG1261NO	2.371874062	0.00782478
Rod,hook and filament				
Csal_1978	K02387	COG1815N	-1.5753201	0.01449156
Csal_1974	K02391	COG4787N	2.873223823	8.119E-05
Csal_1954	K02408	COG1677NU	-2.15353196	0.00201672
Csal_1985	K02406	COG1344N	-4.2944811	8.1516E-08
Csal_1993	K06603	COG1334N	-1.78118414	0.00249929

## BIBLIOGRAFÍA

Regulation				
Csal_2028	K02403	-	1.985584574	0.00101771
Pilus system				
Twitching motility proteins				
Csal_3053	K02669	COG2805NU	1.991213098	0.00124216
Csal_3052	K02670	COG5008NU	1.541430114	0.00613944
Pilus assembly proteins				
Csal_2173	K02650	COG4969NU	1.69002703	0.01962695
Csal_0492	K02673	COG4726NU	1.776339253	0.04057964
Csal_1656	K02651	-	-2.57587684	0.00547938
Csal_1658	K02280	COG4964U	-3.08795459	6.2917E-15
Csal_1659	K02283	COG4962U	-4.10390891	7.9102E-13
<b>Two-Component System</b>				
OmpR family				
PhoR-PhoB (phosphate)				
Csal_3254	K07636	COG5002T	-1.63918059	5.8617E-05
CusS-CusR				
Csal_0102	K07665	COG0745TK	1.620918871	0.0436294
CheA family				
CheA-CheYBV				
Csal_2018	K03413	COG2204T	2.094085054	0.00516017
Csal_2020	K03412	COG2201NT	2.639635023	1.896E-05
<b>Secretion System</b>				
Type II secretion system				
General secretion pathway protein				
Pilin secretion/fimbrial assembly protein				
Csal_2173	K02650	COG4969NU	1.69002703	0.01962695
Csal_3053	K02669	COG2805NU	1.991213098	0.00124216
Csal_3052	K02670	COG5008NU	1.541430114	0.00613944
Csal_0492	K02673	COG4726NU	1.776339253	0.04057964
Tight adherence (Tad) export apparatus				

## BIBLIOGRAFÍA

Csal_1658	K02280	COG4964U	-3.08795459	6.2917E-15
Csal_1659	K02283	COG4962U	-4.10390891	7.9102E-13
Csal_1660	K12510	COG4965U	-2.51536253	1.8298E-05
Csal_1661	K12511	-	-4.23689195	6.6431E-09
Csal_1656	K02651	-	-2.57587684	0.00547938
Type IVa pilus homolog protein				
Csal_3053	K02669	COG2805NU	1.991213098	0.00124216
Type III secretion system				
Type III protein secretion pathway protein				
Flagellar export apparatus protein				
Csal_1964	K02418	COG3190N	-1.7362218	0.0301896
Csal_1967	K02421	COG1684NU	-1.71297046	0.04125283
Type VI secretion system				
Imp/Vas secretion system protein				
Csal_2261	K11890	COG3913S	-2.02665539	1.1077E-05
Csal_2260	K11891	COG3523S	-1.53989405	0.03591082
Csal_2263	K11892	COG3455S	-2.0268066	0.02350148
Csal_2268	K11901	COG3516S	-1.79059147	0.01445866
Sec (secretion) system				
Bacterial Sec-SRP protein				
Csal_3077	K03075	COG1314U	1.659938237	0.00853321
<b>Transporters</b>				
ABC Transporters, Prokaryotic Type				
Mineral and organic ion transporters				
Sulfate transporter				
Molybdate transporter				
Csal_2677	K02020	COG0725P	2.175990225	0.00461579
Spermidine/putrescine transporter				
Csal_1194	K11070	COG1177E	-2.37083854	8.119E-05
Glycine betaine/proline transporter				
Csal_3102	K02002	COG2113E	-1.70066341	0.01053891
Csal_1901	K02002	COG2113E	2.370664882	0.00229446

## BIBLIOGRAFÍA

Osmoprotectant transporter				
Csal_2946	K05846	COG1174E	-2.163711	0.0066587
Saccharide and polyol transporters				
Glucose/mannose transporter				
Csal_2415	K17316	COG1175G	1.693894448	0.03352468
Trehalose/maltose transporter				
Csal_0258	K10236	COG1653G	-4.95255788	5.253E-09
Erythritol transporter				
Csal_0362	K17203	COG1172G	-2.20447945	0.00762802
Glycerol transporter				
Csal_2094	K17324	COG3839G	-3.06014459	1.0019E-05
Putative ABC transporter				
Csal_2220	K02065	COG1127Q	-2.00225952	0.00121226
Phosphate and amino acid transporters				
Phosphate transporter				
Csal_1476	K02040	COG0226P	-1.82366364	0.00030385
Glutamine transporter				
Csal_3297	K10037	COG0765E	-2.77336453	0.00034736
General L-amino acid transporter				
Csal_0120	K09969	COG0834ET	-1.59925861	0.02292108
Csal_0123	K09972	COG1126E	-1.77115606	0.0078043
D-Methionine transporter				
Csal_2101	K02072	COG2011P	1.844822538	0.00874931
Csal_2100	K02071	COG1135P	3.954906383	7.2205E-16
Putative amino-acid transporter				
Csal_2600	K16961	COG0834ET	-2.1034275	0.00587437
Csal_2601	K16962	COG0765E	-1.88845384	0.00048379
Oligopeptide transporter				

## BIBLIOGRAFÍA

Csal_2999	K15580	COG4166E	-2.67887593	6.9352E-16
Csal_3001	K15582	COG1173EP	-1.68544933	0.016273
Metallic cation, iron-siderophore and vitamin B12 transporters				
Iron complex transporter				
Csal_1041	K02015	COG0609P	-1.5927853	0.01476349
Csal_1042	K02015	COG0609P	-2.32560884	0.00048379
Csal_2702	K02013	COG1120PH	1.574824719	0.01220869
Zinc transporter				
Csal_0187	K09815	COG3443R	-5.98504506	7.5098E-05
Putative zinc/manganese transporter				
Csal_0220	K02077	COG0803P	-1.84971396	0.00532175
Csal_0222	K02074	COG1121P	-3.05412234	0.0008476
Major Facilitator Superfamily (MFS)				
Sugar transporters				
Fucose:H <sup>+</sup> symporter (FHS) family				
Csal_0364	K02429	COG0738G	-1.5071542	0.04796364
Nitrate/nitrite transporters				
Nitrate/nitrite porter (NNP) family				
Csal_1329	K02575	COG2223P	-2.5865832	0.00701463
Other Transporters				
Pores ion channels				
Csal_0709	K10716	COG1226P	-1.63573429	0.00059378
Csal_2231	K06213	COG2239P	-4.06154323	4.6951E-07
Csal_1505	K02556	COG1291N	-1.7772035	0.01569307
Csal_2026	K02556	COG1291N	1.513603211	0.02062342
Csal_1504	K02557	COG1360N		
Csal_2025	K02557	COG1360N	2.243718915	4.3879E-06
Csal_1617	K03561	COG0811U	1.674227195	0.04201252
Csal_3094	K04043	COG0443O	-3.14016855	0.00026566
Csal_0254	K02024	COG4580G	-1.84466931	0.00017439
Csal_0257	K16077	COG4580G	-2.39177402	0.00232826
Csal_3004	K06076	COG2067I	-3.72279862	4.5874E-14
Csal_0110	K05517	COG3248M	-2.2432702	0.0002583
Csal_1502	K16092	COG4206H	1.690839806	0.00248505
Csal_3258	K02014	COG4774P	-3.70250897	7.8005E-21

## BIBLIOGRAFÍA

Csal_1056	K02014	COG1629P	1.778535112	6.0283E-05
Electrochemical potential-driven transporters				
Csal_0108	K11741	COG2076P	-4.4986204	1.511E-08
Csal_2674	K15268	-	1.722114628	0.02579035
Csal_2746	K09771	COG1742S	2.072600216	0.02896398
Csal_2645	K02168	COG1292M	-3.54104234	9.6275E-09
Csal_2088	K02824	COG2233F	1.708522146	0.00919993
Csal_1742	K07240	COG2059P	-1.67486794	0.00176504
<b>KEGG Orthology (KO)</b>				
Carbohydrate metabolism				
Glycolysis / Gluconeogenesis				
Csal_0935	K00845	COG0837G	-1.90231788	0.01412204
Csal_0619	K01689	COG0148G	-1.55816771	0.01399209
Csal_1254	K00382	COG1249C	-4.58999698	5.981E-07
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.94474839	0.00040701
Csal_2657	K01610	COG1866C	1.573124942	0.01036818
Citrate cycle (TCA cycle)				
Csal_1254	K00382	COG1249C	-4.58999698	5.981E-07
Csal_2108	K01679	COG0114C	-2.60619022	7.1597E-07
Csal_1555	K01959	COG0439I	1.606789628	0.03468072
Csal_2657	K01610	COG1866C	1.573124942	0.01036818
Pentose phosphate pathway				
Csal_0354	K00616	COG0176G	-1.80736612	0.02031497
Csal_1524	K00948	COG0462FE	1.73737785	0.00062625
Csal_2831	K00117	COG4993G	-2.3693055	0.00088201
Csal_2779	K01053	COG3386G	-1.60414058	0.01027553
Pentose and glucuronate interconversions				
Csal_1860	K00012	COG1004M	1.692220149	0.01186173
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.94474839	0.00040701
Galactose metabolism				
Csal_1722	K01784	COG1087M	1.895709805	0.00096564
Csal_0935	K00845	COG0837G	-1.90231788	0.01412204
Ascorbate and aldarate metabolism				
Csal_1860	K00012	COG1004M	1.692220149	0.01186173
Csal_2779	K01053	COG3386G	-1.60414058	0.01027553
Csal_0369	K00064	COG0667C	-1.60904646	0.01828177
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.94474839	0.00040701



## BIBLIOGRAFÍA

Starch and sucrose metabolism				
Csal_1860	K00012	COG1004M	1.692220149	0.01186173
Csal_0935	K00845	COG0837G	-1.90231788	0.01412204
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism				
Csal_0935	K00845	COG0837G	-1.90231788	0.01412204
Csal_1860	K00012	COG1004M	1.692220149	0.01186173
Csal_1722	K01784	COG1087M	1.895709805	0.00096564
Csal_0586	K00523	COG0543HC	1.766732125	0.0030609
Pyruvate metabolism				
Csal_1254	K00382	COG1249C	-4.58999698	5.981E-07
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.94474839	0.00040701
Csal_0685	K01759	COG0346E	-1.50646798	0.00089304
Csal_0217	K01759	COG0346E	-6.10342349	1.7008E-20
Csal_1944	K01069	COG0491R	2.09204703	0.01637677
Csal_1555	K01959	COG0439I	1.606789628	0.03468072
Csal_2579	K00116	COG0579R	-1.92437919	8.8071E-08
Csal_2657	K01610	COG1866C	1.573124942	0.01036818
Csal_2515	K01649	COG0119E	-2.04172732	0.00622483
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism				
Csal_2449	K01637	COG2224C	-1.76149235	0.00199383
Csal_3029	K00023	COG1028IQR	-1.67250511	0.00011854
Csal_2688	K11472	COG0277C	-2.59123495	9.4596E-06
Csal_0803	K03781	COG0753P	-1.83630737	0.00022563
Csal_1857	K01091	COG0546R	1.545222575	0.00518094
Csal_3215	K01601	COG1850G	-2.33195478	0.00083346
Csal_1916	K00124	COG0437C	-2.60637038	1.0174E-06
Csal_1917	K00127	COG2864C	-1.657295	0.02362984
Propanoate metabolism				
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.94474839	0.00040701
Butanoate metabolism				
Csal_2823	K00209	COG3007S	2.162423101	8.1048E-08
Csal_3029	K00023	COG1028IQR	-1.67250511	0.00011854
C5-Branched dibasic acid metabolism				
Csal_2453	K01703	COG0065E	3.465714732	2.4599E-15
Csal_2452	K01704	COG0066E	1.934571714	0.00071253
Inositol phosphate metabolism				
Csal_2845	K01092	COG0483G	2.858674326	9.192E-14

## BIBLIOGRAFÍA

Energy metabolism				
Oxidative phosphorylation				
Csal_3132	K00330	COG0838C	-2.32262534	1.4605E-08
Csal_3126	K00337	COG1005C	-2.15260909	3.639E-05
Csal_3122	K00341	COG1009CP	-1.79151689	2.7821E-05
Csal_3121	K00342	COG1008C	-2.30635802	2.5784E-11
Csal_2001	K00425	COG1271C	-3.53845123	6.5211E-09
Csal_2000	K00426	COG1294C	-3.13050536	5.8848E-06
Csal_3285	K02115	COG0224C	1.848246682	0.04748694
Csal_0590	K00937	COG0855P	-2.17604732	0.00177831
Methane metabolism				
Csal_0995	K00148	COG1063ER	-2.13890358	0.00147069
Csal_1916	K00124	COG0437C	-2.60637038	1.0174E-06
Csal_1917	K00127	COG2864C	-1.657295	0.02362984
Csal_0619	K01689	COG0148G	-1.55816771	0.01399209
Csal_0096	K00058	COG0111HE	1.726379703	0.01337798
Nitrogen metabolism				
Csal_1329	K02575	COG2223P	-2.5865832	0.00701463
Csal_1874	K01673	COG0288P	-1.98534792	6.2596E-05
Sulfur metabolism				
Csal_1672	K01082	COG1218P		
Csal_2427	K00390	COG0175EH	-2.1443029	0.00876457
Lipid metabolism				
Fatty acid biosynthesis				
Csal_1600	K00645	COG0331I	1.576792881	0.00027089
Csal_2911	K09458	COG0304IQ	4.520817061	3.2332E-16
Csal_2760	K00059	COG1028IQR	-1.63279034	0.00927737
Csal_0785	K00059	COG1028IQR	1.820540979	0.00491786
Csal_0457	K01716	COG0764I	-2.26073431	0.00095244
Fatty acid elongation				
Fatty acid degradation				
Csal_1510	K06445	COG1960I	-2.52427903	1.3964E-10
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.94474839	0.00040701
Glycerolipid metabolism				
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.94474839	0.00040701
Csal_0972	K08591	COG0344S	2.556080943	0.00444606

## BIBLIOGRAFÍA

Glycerophospholipid metabolism				
Csal_2106	K00111	COG0578C	-2.11435344	0.00105727
Csal_0972	K08591	COG0344S	2.556080943	0.00444606
Csal_1446	K01058	COG2829M	-2.05857771	0.00139001
Csal_0568	K00981	COG0575I	-1.89132564	0.01772958
Ether lipid metabolism				
Csal_1446	K01058	COG2829M	-2.05857771	0.00139001
Arachidonic acid metabolism				
Csal_1446	K01058	COG2829M	-2.05857771	0.00139001
Linoleic acid metabolism				
Csal_1446	K01058	COG2829M	-2.05857771	0.00139001
alpha-Linolenic acid metabolism				
Csal_1446	K01058	COG2829M	-2.05857771	0.00139001
Biosynthesis of unsaturated fatty acids				
Csal_2760	K00059	COG1028IQR	-1.63279034	0.00927737
Csal_0785	K00059	COG1028IQR	1.820540979	0.00491786
Nucleotide metabolism				
Purine metabolism				
Csal_2556	K01515	-	1.822596665	0.00706637
Csal_1524	K00948	COG0462FE	1.73737785	0.00062625
Csal_1639	K04765	COG3956R	1.853754178	0.02602396
Csal_0529	K11177	COG1529C	-1.667515	6.576E-05
Csal_0527	K13483	COG2080C	-1.76002231	0.02343141
Csal_0379	K00525	COG0209F	-2.96995717	3.4973E-33
Csal_0668	K00525	COG0209F	-1.6169575	5.2007E-05
Csal_0667	K00526	COG0208F	-4.3701453	1.1773E-30
Csal_0380	K00526	COG0208F	-1.87190481	0.00088201
Csal_2921	K02339	COG2927L	1.514442054	0.00624738
Csal_0079	K14977	COG3257R	-3.25346143	1.4192E-05
Pyrimidine metabolism				
Csal_1342	K00254	COG0167F	3.077474396	6.4627E-22
Csal_3204	K00762	COG0461F	-1.91407947	0.00042691
Csal_2164	K00945	COG0283F	3.037095584	0.03205547
Csal_2921	K02339	COG2927L	1.514442054	0.00624738
Csal_2114	K01494	COG0717F	-1.85859489	0.00499134
Csal_2095	K00761	COG0035F	1.505729227	0.00019705
Csal_1639	K04765	COG3956R	1.853754178	0.02602396

## BIBLIOGRAFÍA

Csal_2959	K00384	COG0492O	-2.45075621	5.6864E-05
Csal_0379	K00525	COG0209F	-2.96995717	3.4973E-33
Csal_0668	K00525	COG0209F	-1.6169575	5.2007E-05
Csal_0667	K00526	COG0208F	-4.3701453	1.1773E-30
Csal_0380	K00526	COG0208F	-1.87190481	0.00088201
Amino acid metabolism				
Alanine, aspartate and glutamate metabolism				
Csal_2966	K00259	COG0686E	-1.56323017	0.00184173
Glycine, serine and threonine metabolism				
Csal_0096	K00058	COG0111HE	1.726379703	0.01337798
Csal_1815	K00605	COG0404E	1.513460556	0.00237264
Csal_1254	K00382	COG1249C	-4.58999698	5.981E-07
Csal_1515	K00130	COG1012C	-1.82792446	0.00983654
Csal_2723	K01754	COG1171E	1.72821468	6.1315E-06
Csal_1055	K13745	COG0076E	-2.54304696	0.00035713
Csal_2731	K15784	COG3608R	1.616359502	0.01593298
Csal_2725	K15786	COG1012C	-1.64881381	0.0018171
Cysteine and methionine metabolism				
Csal_2049	K07173	COG1854T	-2.18604917	0.00419965
Valine, leucine and isoleucine degradation				
Csal_1254	K00382	COG1249C	-4.58999698	5.981E-07
Csal_1707	K00020	COG2084I	1.759280504	0.02725686
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.94474839	0.00040701
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis				
Csal_2723	K01754	COG1171E	1.72821468	6.1315E-06
Csal_2453	K01703	COG0065E	3.465714732	2.4599E-15
Csal_2452	K01704	COG0066E	1.934571714	0.00071253
Csal_2451	K00052	COG0473CE	1.704566432	0.00048438
Csal_0504	K00053	COG0059EH	-1.87433875	0.00062731
Csal_2515	K01649	COG0119E	-2.04172732	0.00622483
Lysine biosynthesis				
Csal_2706	K01714	COG0329EM	-2.54421733	1.3579E-05
Csal_0560	K14267	COG0436E	1.524205315	0.02103198
Lysine degradation				
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.94474839	0.00040701
Arginine and proline metabolism				
Csal_1171	K01470	COG1402R	3.278751008	1.6903E-11

## BIBLIOGRAFÍA

Csal_1189	K10536	COG2957E	1.59286378	0.0465462
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.94474839	0.00040701
Csal_2806	K00673	COG3138E	-2.11112222	0.00518094
Histidine metabolism				
Csal_0518	K02501	COG0118E	2.617119544	8.5632E-05
Csal_0507	K00817	COG0079E	-2.51196997	0.00010353
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.94474839	0.00040701
Tyrosine metabolism				
Csal_0507	K00817	COG0079E	-2.51196997	0.00010353
Phenylalanine metabolism				
Csal_0507	K00817	COG0079E	-2.51196997	0.00010353
Csal_0130	K05710	COG2146PR	-1.83154199	0.02973843
Tryptophan metabolism				
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.94474839	0.00040701
Csal_0803	K03781	COG0753P	-1.83630737	0.00022563
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis				
Csal_2321	K01658	COG0512EH	1.555627877	0.01733051
Csal_1260	K01817	COG0135E	1.770468438	0.01722092
Csal_0507	K00817	COG0079E	-2.51196997	0.00010353
Metabolism of other amino acids				
beta-Alanine metabolism				
Csal_3067	K01579	COG0853H	-1.97917307	0.0052881
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.94474839	0.00040701
Taurine and hypotaurine metabolism				
Csal_2966	K00259	COG0686E	-1.56323017	0.00184173
Selenocompound metabolism				
Csal_2959	K00384	COG04920	-2.45075621	5.6864E-05
Lipopolysaccharide biosynthesis				
Csal_2184	K02535	COG0774M	-1.82553847	0.01449547
Csal_0618	K01627	COG2877M	1.681044809	0.00487351
Csal_0015	K11211	COG0478T	2.239621167	0.00084151
Metabolism of cofactors and vitamins				
Thiamine metabolism				

## BIBLIOGRAFÍA

Csal_0959	K03147	COG0422H	1.735967169	0.01229548
Csal_2118	K03151	COG0301H	2.334924734	9.4441E-05
Csal_0494	K03153	COG0665E	1.904619864	0.00692309
Csal_0099	K01662	COG1154HI	1.527003592	1.5704E-05
Riboflavin metabolism				
Csal_1172	K01497	COG0807H	1.783333031	0.01016738
Vitamin B6 metabolism				
Csal_1900	K00275	COG0259H	-1.88760802	0.00040319
Csal_3194	K00097	COG1995H	-1.74058358	0.04937562
Nicotinate and nicotinamide metabolism				
Csal_2870	K08281	COG1335Q	-1.96421992	0.00027126
Csal_2492	K00324	COG3288C	3.763371547	8.5562E-18
Csal_2491	K00325	COG1282C	2.735593829	6.4627E-22
Pantothenate and CoA biosynthesis				
Csal_0504	K00053	COG0059EH	-1.87433875	0.00062731
Csal_3065	K00606	COG0413H	2.121320367	0.00212496
Csal_3067	K01579	COG0853H	-1.97917307	0.0052881
Biotin metabolism				
Csal_2911	K09458	COG0304IQ	4.520817061	3.2332E-16
Csal_2760	K00059	COG1028IQR	-1.63279034	0.00927737
Csal_0785	K00059	COG1028IQR	1.820540979	0.00491786
Folate biosynthesis				
Csal_0191	K09007	COG1469S	-1.79662658	0.02580012
Csal_2076	K03639	COG2896H	-2.0706162	0.00269893
One carbon pool by folate				
Csal_2048	K01491	COG0190H	1.719831105	4.1786E-06
Csal_1815	K00605	COG0404E	1.513460556	0.00237264
Porphyrin and chlorophyll metabolism				
Csal_1211	K01885	COG0008J	-1.56759563	0.01361271
Csal_2863	K00228	COG0408H	-2.29152068	7.9108E-05
Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis				
Csal_0585	K03182	COG0043H	2.208725515	0.00052749
Metabolism of terpenoids and polyketides				

## BIBLIOGRAFÍA

Terpenoid backbone biosynthesis				
Csal_0099	K01662	COG1154HI	1.527003592	1.5704E-05
Csal_0567	K00806	COG0020I	-1.58096594	0.01705821
Monoterpenoid biosynthesis				
Limonene and pinene degradation				
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.94474839	0.00040701
Streptomycin biosynthesis				
Csal_0935	K00845	COG0837G	-1.90231788	0.01412204
Csal_2845	K01092	COG0483G	2.858674326	9.192E-14
Novobiocin biosynthesis				
Csal_0507	K00817	COG0079E	-2.51196997	0.00010353
Xenobiotics biodegradation and metabolism				
Benzoate degradation				
Csal_0130	K05710	COG2146PR	-1.83154199	0.02973843
Aminobenzoate degradation				
Csal_0130	K05710	COG2146PR	-1.83154199	0.02973843
Chloroalkane and chloroalkene degradation				
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.94474839	0.00040701
Csal_0130	K05710	COG2146PR	-1.83154199	0.02973843
Csal_0995	K00148	COG1063ER	-2.13890358	0.00147069
Chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation				
Csal_0130	K05710	COG2146PR	-1.83154199	0.02973843
Toluene degradation				
Csal_0130	K05710	COG2146PR	-1.83154199	0.02973843
Xylene degradation				
Csal_0130	K05710	COG2146PR	-1.83154199	0.02973843
Nitrotoluene degradation				
Csal_0508	K10680	COG1902C	-3.56866388	2.2211E-07
Ethylbenzene degradation				

## BIBLIOGRAFÍA

Csal_0130	K05710	COG2146PR	-1.83154199	0.02973843
Caprolactam degradation				
Csal_2779	K01053	COG3386G	-1.60414058	0.01027553
Csal_1140	K14519	COG1012C	-2.88919215	4.0983E-11
Dioxin degradation				
Csal_0130	K05710	COG2146PR	-1.83154199	0.02973843
Genetic Information Processing				
Translation				
Ribosome				
Csal_0438	K02988	COG0098J	2.094694308	0.00128114
Csal_0417	K02992	COG0049J	3.504703333	0.00116651
Csal_0416	K02950	COG0048J	1.507914183	0.00679106
Csal_3016	K02959	COG0228J	2.947057236	2.5127E-05
Csal_0478	K02968	-	2.694573843	0.00016803
Csal_0421	K02906	COG0087J	2.86010685	1.3273E-12
Csal_0410	K02867	COG0080J	2.437504955	2.3533E-05
Csal_2207	K02871	COG0102J	1.624217316	0.00030037
Csal_0431	K02874	COG0093J	2.342021508	0.00184993
Csal_0432	K02895	COG0198J	2.365523293	0.0038835
Csal_1523	K02897	COG1825J	1.943863196	5.5241E-08
Csal_2971	K02902	COG0227J	1.639400838	0.00327839
Csal_0604	K02909	COG0254J	-2.41455974	0.01054551
Csal_2970	K02913	COG0267J	2.642780809	9.4368E-26
Aminoacyl-tRNA biosynthesis				
Csal_1211	K01885	COG0008J	-1.56759563	0.01361271
Csal_2243	K02434	COG0064J	1.996702693	0.00015647
Csal_0625	K01872	COG0013J	1.588540164	1.183E-08
Csal_0006	K01879	COG0751J	1.566273009	0.00016485
Csal_2051	K01883	COG0215J	1.794866919	0.00267319
Folding, sorting and degradation				
Sulfur relay system				
Csal_2076	K03639	COG2896H	-2.0706162	0.00269893
Csal_2118	K03151	COG0301H	2.334924734	9.4441E-05
RNA degradation				
Csal_0619	K01689	COG0148G	-1.55816771	0.01399209
Csal_1139	K05592	COG0513LKJ	3.453391944	2.273E-24
Csal_0584	K03628	COG1158K	2.321542931	3.7277E-05



## BIBLIOGRAFÍA

Csal_3094	K04043	COG0443O	-3.14016855	0.00026566
Csal_0590	K00937	COG0855P	-2.17604732	0.00177831
Replication and repair				
DNA replication				
Csal_2921	K02339	COG2927L	1.514442054	0.00624738
Base excision repair				
Csal_2969	K10563	COG0266L	1.53014039	0.00527478
Nucleotide excision repair				
Csal_1833	K03702	COG0556L	-3.0045729	1.822E-05
Mismatch repair				
Csal_1275	K03572	COG0323L	-1.71241188	0.0030609
Csal_2921	K02339	COG2927L	1.514442054	0.00624738
Homologous recombination				
Csal_1460	K06187	COG0353L	-2.79662926	0.00025907
Csal_1847	K03550	COG0632L	1.729179305	7.7732E-06
Csal_0085	K03655	COG2865K	-1.87895471	6.0347E-06
Csal_2921	K02339	COG2927L	1.514442054	0.00624738

**Genes diferencialmente expresados a elevada salinidad**

<b>CLASSIFICATION</b>	<b>KO</b>	<b>COG NUMBER</b>	<b>FoldChange</b>	<b>padj</b>
<b>DNA Replication Proteins</b>				
DNA Replication Initiation Factors				
Initiation factors (bacterial)				
Csal_3249	K05787	COG0776L	-1.69183646	0.00324939
Csal_0001	K02313	COG0593L	-1.97524529	8.7125E-06
DNA Replication Elongation factors				
Elongation factors (bacterial)				
DNA polymerase III holoenzyme				
Csal_2921	K02339	COG2927L	-2.43818215	3.2463E-06
Csal_1458	K02343	COG2812L	1.531665165	0.00223346
Prevention of re-replication factors				
Csal_2110	K10763	COG0593L	2.347933399	0.00051666
DNA topo-isomerases				
Csal_1560	K03168	COG0550L	1.769034928	0.00553353
<b>CHROMOSOME ASSOCIATED PROTEIN</b>				
Nucleoid associated proteins				
HNS (histone-like nucleoid structuring protein)				
HU (heat unstable protein)				
Csal_3249	K05787	COG0776L	-1.69183646	0.00324939
Other nucleoid associated proteins				
Csal_0001	K02313	COG0593L	-1.97524529	8.7125E-06
Divisome proteins				
Csal_2186	K03590	COG0849D	1.766235693	1.2702E-06
Csal_0698	K03528	COG3115D	2.466069965	6.4929E-07
Other chromosome partitioning proteins				
Csal_2240	K03569	COG1077D	-1.61036201	0.00214656
Csal_2239	K03570	COG1792M	-4.79938275	2.0026E-07
Csal_2238	K03571	COG2891M	-1.87905953	3.5645E-06
Csal_3293	K03496	COG1192D	-2.32851642	9.5249E-06

## BIBLIOGRAFÍA

Csal_3294	K03501	COG0357M	-1.99343044	0.00074047
<b>DNA Repair and Recombination Proteins</b>				
SSBR (single strand breaks repair)				
BER (base excision repair)				
AP endonucleases				
Csal_1151	K05982	COG1515L	2.38375913	0.000197
TCR (transcription coupled repair) factors				
DNA-directed RNA polymerase complex (RNAP)				
Csal_0414	K03043	COG0085K	-1.5176162	0.00011077
MMR (mismatch excision repair)				
Molecular matchmaker				
Csal_1275	K03572	COG0323L	-1.80567478	0.00136861
DNA polymerase III holoenzyme				
Csal_2921	K02339	COG2927L	-2.43818215	3.2463E-06
Csal_1458	K02343	COG2812L	1.531665165	0.00223346
DSBR (double strand breaks repair)				
HR (homologous recombination)				
RecFOR pathway proteins				
Csal_0085	K03655	COG2865K	-1.60401421	0.00654444
AddAB pathway proteins				
Two-component NHEJ DNA repair complex				
SHIR (short-homology-independent illegitimate recombination)				
Facilitator				
Csal_1560	K03168	COG0550L	1.769034928	0.00553353
Supressor				
Csal_3249	K05787	COG0776L	-1.69183646	0.00324939
Other factors with a suspected DNA repair function				
Modulation of nucleotide pools				
Csal_0379	K00525	COG0209F	-3.16761459	9.5249E-06

## BIBLIOGRAFÍA

Csal_0668	K00525	COG0209F	-4.88261783	9.2881E-20
Csal_0667	K00526	COG0208F	-7.96555428	4.6768E-12
Csal_0380	K00526	COG0208F	-2.19910205	0.000443
<b>Transcription Machinery</b>				
RNA polymerase				
Core subunits				
Csal_0414	K03043	COG0085K	-1.5176162	0.00011077
Sigma factors				
Csal_1052	K03088	COG1595K	-2.8614419	3.3415E-07
Other transcription-related factors				
RNA polymerase-associated proteins				
Csal_0409	K02601	COG0250K	-2.00119939	0.00019543
<b>Transcription Factors</b>				
Helix-turn-helix				
GntR family				
Csal_0722	K03710	COG2188K	-2.13782126	0.00539174
MerR family				
Csal_1304	K13638	COG0789K	3.125703391	5.6488E-16
Others				
Csal_2503	K03704	COG1278K	-1.91400049	0.00101216
<b>Ribosome</b>				
Small subunit				
Csal_0563	K02967	COG0052J	-2.53451691	1.2434E-09
Csal_0427	K02982	COG0092J	-2.05853204	5.5852E-06
Csal_0416	K02950	COG0048J	-3.0915359	2.0628E-06
Csal_0443	K02952	COG0099J	-2.3511858	1.3206E-05
Csal_0889	K02963	COG0238J	-3.56354126	4.0569E-10
Large subunit				
Csal_0433	K02931	COG0094J	-1.73605285	0.00248314
Csal_0436	K02933	COG0097J	-2.08549147	5.7136E-05
Csal_2207	K02871	COG0102J	-2.4901741	1.186E-08
Csal_0428	K02878	COG0197J	-1.50500229	0.03436656

## BIBLIOGRAFÍA

Csal_0447	K02879	COG0203J	-3.32695768	3.4784E-17
Csal_1523	K02897	COG1825J	-2.55578275	3.8653E-05
Csal_2971	K02902	COG0227J	-2.9492119	1.2138E-08
Csal_0429	K02904	COG0255J	-1.52409916	0.02624744
Csal_0604	K02909	COG0254J	-3.33059843	1.5588E-05
Csal_2970	K02913	COG0267J	-2.45927955	9.922E-07
<b>Ribosomal RNAs</b>				
Csal_R0075	K01985		17.38514576	6.0733E-09
Csal_R0083	K01985		44.2608283	3.3189E-20
Csal_R0087	K01977		3.400705825	0.02962608
Csal_R0079	K01977		5.047243131	0.00445905
Csal_R0004	K01980		3.562331871	0.03133106
Csal_R0084	K01980		4.609517458	0.00718883
Csal_R0014	K01980		3.319602108	0.04290333
Csal_R0076	K01980		39.04169994	6.2818E-12
Csal_R0058	K01980		12.89049028	2.5236E-06
<b>Ribosome Biogenesis</b>				
rRNA transcription factors				
Csal_0409	K02601	COG0250K	-2.00119939	0.00019543
rRNA modification factors				
16S rRNA modification factors				
Csal_1950	K06183	COG1187J	1.54990823	0.01484367
Csal_3294	K03501	COG0357M	-1.99343044	0.00074047
Csal_1448	K06442	COG1189J	1.890878289	0.03334337
23S rRNA modification factors				
Csal_2968	K06969	COG1092R	-2.71031147	6.4311E-10
Csal_2412	K06968	COG2933R	-1.76922183	0.01429554
Csal_2851	K06941	COG0820R	-1.65168653	0.00306137
Csal_1448	K06442	COG1189J	1.890878289	0.03334337
Csal_1637	K03215	COG2265J	1.748802451	0.04836041
Csal_1593	K06179	COG0564J	5.206878909	8.12E-10
ribosomal protein modification factors				
Csal_2901	K03817	COG1670J	-2.30563126	0.00979886
GTPases				
Csal_1349	K14540	COG1161R	3.285273766	1.9732E-15
Other maturation factors				
Csal_3073	K02834	COG0858J	-2.02980545	4.7518E-05
Csal_3076	K09748	COG0779S	-1.74134932	0.0165101

## BIBLIOGRAFÍA

Csal_1343	K03812	COG3130J	9.654770834	1.0936E-10
<b>Translation Factors</b>				
Initiation factors				
Csal_3074	K02519	COG0532J	-2.06798279	0.00083152
Elongation factors				
Csal_0418	K02355	COG0480J	-2.43522695	9.6616E-07
Release factors				
Csal_1828	K02837	COG4108J	-2.20568615	1.4093E-06
Csal_0173	K15034	COG1186J	-1.68656124	0.00276662
Csal_1522	K01056	COG0193J	-3.03101658	8.6258E-09
<b>Transfer RNA Biogenesis</b>				
5'processing factors				
Ribonuclease P				
Csal_3317	K03536	COG0594J	-1.82382172	0.0002406
Aminoacyl-tRNA synthetases (AARSs)				
Csal_2997	K04567	COG1190J	-3.05236079	3.5245E-17
Csal_2922	K01873	COG0525J	-2.80055725	7.5044E-14
Csal_2315	K01875	COG0172J	-1.84585673	4.4343E-05
Csal_0007	K01878	COG0752J	-1.76488147	0.0006785
Csal_0006	K01879	COG0751J	-1.82626871	0.00014097
Csal_1211	K01885	COG0008J	-1.86331153	0.0018352
Csal_0602	K01887	COG0018J	-1.54377205	0.00047616
Csal_2855	K01892	COG0124J	-1.87923236	0.00050389
tRNA modification factors				
Methyltransferases				
Csal_2547	K15256	COG4106R	-1.56728457	0.01233889
Csal_3145	K03439	COG0220R	2.334433314	0.00468338
Csal_2161	K15396	COG0565J	2.170927416	4.0774E-06
Other tRNA modification factors				
Csal_2832	K07568	COG0809J	-1.59627074	0.0322543
Csal_2038	K06920	COG0603R	-2.60851669	1.012E-08
Csal_1353	K06879	COG2904S	1.764109369	0.00368756
Csal_2833	K00773	COG0343J	-2.31217793	2.702E-05
Csal_0580	K04075	COG0037D	2.376458197	0.00035236
Csal_2958	K06957	COG1444R	3.2121175	0.00011694

## BIBLIOGRAFÍA

<b>Chaperones and folding catalysts</b>				
Heat shock proteins				
HSP100				
Csal_0599	K03667	COG12200	1.762139039	0.00049789
HSP70 / DNAK				
Csal_3094	K04043	COG04430	2.497175884	6.1655E-07
HSP40 / DNAJ				
Csal_3093	K03686	COG04840	2.267024825	1.124E-10
HSP10				
Csal_2159	K04078	COG02340	5.532943696	9.1081E-07
Protein folding catalysts				
Peptidyl prolyl isomerase				
FKBP				
Csal_1297	K03775	COG10470	1.843942654	0.02939398
Protein disulfide isomerase				
Csal_3035	K05838	COG31180	1.662390092	0.00073649
Csal_2653	K03611	COG14950	1.914229819	6.9666E-07
<b>Cytoskeleton proteins</b>				
MinD / ParA				
Csal_3293	K03496	COG1192D	-2.32851642	9.5249E-06
<b>Bacterial Motility Proteins</b>				
Flagellar system				
Chemotaxis proteins				
Two component system proteins				
Csal_2024	K03407	COG0643NT	2.153956984	1.4714E-05
Csal_2023	K03408	COG0835NT	2.02468519	5.3161E-05
Csal_2021	K00575	COG1352NT	2.518771582	5.416E-12
Csal_2020	K03412	COG2201NT	5.207378623	7.1773E-18
Csal_2018	K03413	COG2204T	1.915060805	0.02550547
Csal_2017	K03414	COG3143NT	1.827379784	0.01678167

## BIBLIOGRAFÍA

MCPs				
Csal_1099	K03406	COG0840NT	2.012710372	8.7264E-05
Csal_0126	K03406	COG0840NT	2.699586224	9.1081E-07
Csal_0906	K03406	COG0840NT	1.97836616	0.00086995
Csal_2022	K03406	COG0840NT	4.36739154	1.815E-46
Flagellar assembly proteins				
Type-III secretion				
Csal_1958	K02412	COG1157NU	2.174877502	0.00074205
Csal_2014	K02404	COG1419N	1.976553951	0.0002033
Motor/switch				
Csal_2026	K02556	COG1291N	2.308544513	0.00089111
Csal_1504	K02557	COG1360N	3.023828233	1.7724E-09
Csal_2025	K02557	COG1360N	3.95079295	2.9883E-24
M,S,P and L rings				
Csal_1979	K02386	COG1261NO	2.173677325	0.00523199
Rod,hook and filament				
Csal_1974	K02391	COG4787N	2.520389645	0.0002115
Regulation				
Csal_2027	K02402	-	2.505284918	3.1813E-06
Csal_2028	K02403	-	3.52201722	9.4064E-20
Csal_1980	K02398	COG2747KNU	-1.52541466	0.02839145
Chaperones				
Csal_2031	K02423	-	1.717611339	0.00289379
Pilus system				
Pilus assembly proteins				
Csal_2173	K02650	COG4969NU	-4.7895194	6.9208E-13
Csal_0492	K02673	COG4726NU	1.943158931	0.03307037
Csal_1659	K02283	COG4962U	-1.85419107	0.03120652
<b>Two-Component System</b>				
OmpR family				
PhoR-PhoB (phosphate)				
Csal_3253	K07657	COG0745TK	-1.603591	0.00457484



## BIBLIOGRAFÍA

CusS-CusR				
Csal_0102	K07665	COG0745TK	2.062675722	0.00928747
CheA family				
CheA-CheYBV				
Csal_2024	K03407	COG0643NT	2.153956984	1.4714E-05
Csal_2018	K03413	COG2204T	1.915060805	0.02550547
Csal_2020	K03412	COG2201NT	5.207378623	7.1773E-18
<b>Secretion System</b>				
Type II secretion system				
General secretion pathway protein				
Pilin secretion/fimbrial assembly protein				
Csal_2173	K02650	COG4969NU	-4.7895194	6.9208E-13
Csal_0492	K02673	COG4726NU	1.943158931	0.03307037
Tight adherence (Tad) export apparatus				
Csal_1659	K02283	COG4962U	-1.85419107	0.03120652
Csal_1661	K12511	-	-2.17403851	0.00134632
Type IVa pilus homolog protein				
Csal_3056	K02221	COG0762S	-2.15328716	4.0398E-06
Type III secretion system				
Type III protein secretion pathway protein				
Flagellar export apparatus protein				
Csal_1958	K02412	COG1157NU	2.174877502	0.00074205
Type VI secretion system				
Imp/Vas secretion system protein				
Csal_2261	K11890	COG3913S	-2.19364412	1.4556E-08
Csal_2260	K11891	COG3523S	-1.64685999	0.00016449
Csal_2262	K11891	COG3523S	-1.7834924	4.3405E-07
Csal_2263	K11892	COG3455S	-3.48041517	1.331E-09
Csal_2264	K11893	COG3522S	-3.72052971	6.9666E-07
Csal_2268	K11901	COG3516S	-1.62570074	0.02038448
Csal_2258	K11903	COG3157S	-1.661097	0.00107396
Sec (secretion) system				

## BIBLIOGRAFÍA

Bacterial Sec-SRP protein				
Csal_2835	K03072	COG0342U	-2.18476174	4.4381E-06
Csal_0408	K03073	COG0690U	-2.54186309	0.00030974
Csal_2836	K03074	COG0341U	-5.49397009	3.9118E-12
Csal_2834	K03210	COG1862U	-1.92999387	1.6915E-05
Csal_3316	K03217	COG0706U	-2.85074856	7.8448E-08
<b>Transporters</b>				
ABC Transporters, Prokaryotic Type				
Mineral and organic ion transporters				
Sulfate transporter				
Molybdate transporter				
Csal_2677	K02020	COG0725P	3.242024688	8.8296E-06
Molybdate/tungstate transporter				
Tungstate transporter				
Csal_2082	K06857	COG1131V	1.969485749	4.9636E-08
Iron(III) transporter				
Csal_0549	K02012	COG1840P	-2.26564568	3.7684E-09
Glycine betaine/proline transporter				
Csal_2886	K02002	COG2113E	-2.10055996	0.00045803
Csal_3102	K02002	COG2113E	-1.92624636	0.00680924
Putative hydroxymethylpyrimidine transporter				
Csal_1932	K15600	COG1116P	2.255309988	0.00182572
Saccharide and polyol transporters				
Arabinogalactan oligomer/maltooligosaccharide transport system				
Csal_2614	K10111	COG3839G	1.94027438	0.01052739
Glucose/mannose transporter				
Csal_2416	K17315	COG1653G	-2.93362796	7.3109E-14
Trehalose/maltose transporter				
Csal_0258	K10236	COG1653G	-4.04949169	5.5433E-12

## BIBLIOGRAFÍA

Erythritol transporter				
Csal_0362	K17203	COG1172G	-3.34079573	2.4261E-05
Glycerol transporter				
Csal_2094	K17324	COG3839G	-3.2504517	2.2879E-05
Putative ABC transporter				
Csal_2218	K02067	COG1463Q	1.549331989	0.00500877
Csal_2219	K02066	COG0767Q	1.557716093	0.00180634
Phosphate and amino acid transporters				
Glutamine transporter				
Csal_3298	K10036	COG0834ET	3.359073822	1.206E-08
Csal_3297	K10037	COG0765E	-1.65635534	0.04755032
Branched-chain amino acid transporter				
Csal_1422	K01995	COG0411E	2.243307793	8.7842E-05
D-Methionine transporter				
Csal_2102	K02072	COG1464P	-2.31275132	0.00019573
Csal_2100	K02071	COG1135P	1.657646725	0.00021038
Putative glutamine transporter				
Putative amino-acid transporter				
Csal_2600	K16961	COG0834ET	-1.84062427	0.00105679
Csal_2601	K16962	COG0765E	-2.14328231	0.00134524
Csal_2602	K16963	COG1126E	-1.65218483	0.00386667
Putative polar amino acid transporter				
Csal_0533	K02029	COG4215E	1.650817395	0.01303081
Metallic cation, iron-siderophore and vitamin B12 transporters				
Iron complex transporter				
Csal_1043	K02016	COG0614P	-2.81967339	2.3682E-08
Csal_2699	K02016	COG0614P	-1.92619525	2.055E-06
Csal_1041	K02015	COG0609P	-2.63808899	6.9082E-05
Csal_1042	K02015	COG0609P	-2.14366592	0.00013618
Csal_2700	K02015	COG0609P	-1.54943716	0.00532207
Zinc transporter				

## BIBLIOGRAFÍA

Csal_0187	K09815	COG3443R	30.44967832	8.965E-59
Csal_0190	K09816	COG1108P	74.98094682	3.157E-183
Putative zinc/manganese transporter				
Csal_0220	K02077	COG0803P	8.542984591	4.8798E-57
Csal_0222	K02074	COG1121P	9.714641092	1.9094E-43
Other Transporters				
Pores ion channels				
Csal_0709	K10716	COG1226P	-2.25159193	0.00022884
Csal_2026	K02556	COG1291N	2.308544513	0.00089111
Csal_1504	K02557	COG1360N	3.023828233	1.7724E-09
Csal_2025	K02557	COG1360N	3.95079295	2.9883E-24
Csal_1617	K03561	COG0811U	2.014064886	0.03189091
Csal_3094	K04043	COG04430	2.497175884	6.1655E-07
Csal_0254	K02024	COG4580G	-3.44023115	1.445E-09
Csal_0257	K16077	COG4580G	-3.12222579	1.8849E-06
Csal_3004	K06076	COG2067I	-5.26681982	1.9577E-08
Csal_1502	K16092	COG4206H	-1.98520437	0.00056472
Csal_3182	K16088	COG4773P	-2.71181348	1.3259E-11
Csal_3258	K02014	COG4774P	-9.07422507	4.3896E-21
Csal_1056	K02014	COG1629P	-3.06583308	2.1997E-07
Csal_1044	K02014	COG1629P	-2.46076199	2.9509E-07
Csal_1045	K02014	COG4773P	-2.09789158	0.00095567
Electrochemical potential-driven transporters				
Csal_0395	K16264	COG1230P	-4.33050813	3.3183E-14
Csal_0108	K11741	COG2076P	-2.26958083	0.00131986
Csal_2674	K15268	-	2.150922902	0.00034501
Csal_0196	K11939	COG5006R	1.771533733	0.04621129
Csal_2746	K09771	COG1742S	2.516244557	0.0008597
Csal_2645	K02168	COG1292M	-2.02435839	0.00191557
Csal_0903	K05559	COG1009CP	-4.0643759	9.8103E-09
Csal_0902	K05560	COG1006P	-2.74373155	0.00022466
Csal_0901	K05561	COG0651CP	-2.77833348	4.4008E-09
Csal_0899	K05563	COG2212P	-2.93339529	0.00126055
Csal_2818	K03548	COG0628R	-2.17311521	3.8653E-05
Transmembrane electron carriers				
Others				
Csal_2512	K07507	COG1285S	2.049924623	2.8469E-05
<b>KEGG Orthology (KO)</b>				
Carbohydrate metabolism				
Glycolysis / Gluconeogenesis				

## BIBLIOGRAFÍA

Csal_0935	K00845	COG0837G	-2.24055634	6.052E-06
Csal_0375	K11645	COG1830G	-3.23043301	2.1892E-09
Csal_0937	K00134	COG0057G	-1.9688411	2.1755E-11
Csal_0619	K01689	COG0148G	-4.1964823	6.7924E-11
Csal_2912	K13953	COG1064R	-1.75790201	0.00146028
Csal_1091	K00001	COG1063ER	2.216004307	6.2516E-06
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.82992927	1.7115E-05
Citrate cycle (TCA cycle)				
Csal_1221	K01902	COG0074C	-1.87394594	0.00174915
Csal_1213	K00241	COG2009C		
Csal_1214	K00242	COG2142C	1.50297515	0.00082469
Csal_2108	K01679	COG0114C	2.184331102	1.2698E-06
Csal_1555	K01959	COG0439I	-3.81150825	2.2167E-10
Pentose phosphate pathway				
Csal_2741	K00036	COG0364G	-3.18115433	4.6941E-29
Csal_0666	K00033	COG1023G	-1.62762415	0.00315652
Csal_0936	K01690	COG0129EG	-1.76022588	0.00036837
Csal_0375	K11645	COG1830G	-3.23043301	2.1892E-09
Pentose and glucuronate interconversions				
Csal_1749	K01685	COG2721G	1.861338514	0.04229256
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.82992927	1.7115E-05
Fructose and mannose metabolism				
Csal_0375	K11645	COG1830G	-3.23043301	2.1892E-09
Galactose metabolism				
Csal_1722	K01784	COG1087M	2.131683215	0.00415217
Csal_0935	K00845	COG0837G	-2.24055634	6.052E-06
Ascorbate and aldarate metabolism				
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.82992927	1.7115E-05
Starch and sucrose metabolism				
Csal_0935	K00845	COG0837G	-2.24055634	6.052E-06
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism				
Csal_1591	K00075	COG0812M	1.694525109	0.03510514
Csal_0935	K00845	COG0837G	-2.24055634	6.052E-06
Csal_1722	K01784	COG1087M	2.131683215	0.00415217
Csal_0586	K00523	COG0543HC		
Pyruvate metabolism				

## BIBLIOGRAFÍA

Csal_2285	K01961	COG0439I	-3.86355787	2.0687E-22
Csal_1839	K01512	COG1254C	2.067629299	0.01313846
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.82992927	1.7115E-05
Csal_0685	K01759	COG0346E	-1.658755	0.02781913
Csal_2963	K00027	COG0281C	-2.5350409	0.00014507
Csal_1555	K01959	COG0439I	-3.81150825	2.2167E-10
Csal_2579	K00116	COG0579R	-2.7688045	1.0408E-11
Csal_1640	K01595	COG2352C	1.52141823	0.00462153
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism				
Csal_2688	K11472	COG0277C	-1.73985417	0.01537729
Csal_1594	K01091	COG0546R	1.935010941	2.164E-06
Csal_3215	K01601	COG1850G	-1.69229134	0.04201817
Csal_1917	K00127	COG2864C	1.86959947	0.0041645
Propanoate metabolism				
Csal_2285	K01961	COG0439I	-3.86355787	2.0687E-22
Csal_1289	K07250	COG0160E	2.743214322	1.7372E-10
Csal_1221	K01902	COG0074C	-1.87394594	0.00174915
Csal_2421	K03417	COG2513G	-3.81457545	2.9981E-11
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.82992927	1.7115E-05
Butanoate metabolism				
Csal_2823	K00209	COG3007S	-1.80376519	9.1885E-06
Csal_1214	K00242	COG2142C	1.50297515	0.00082469
Csal_1289	K07250	COG0160E	2.743214322	1.7372E-10
Csal_1825	K00019	COG1028IQR	1.637399998	0.00034408
C5-Branched dibasic acid metabolism				
Csal_1221	K01902	COG0074C	-1.87394594	0.00174915
Csal_2452	K01704	COG0066E	-1.79941825	4.0889E-06
Energy metabolism				
Oxidative phosphorylation				
Csal_3132	K00330	COG0838C	-1.56573068	0.03566306
Csal_3123	K00340	COG0713C	1.588231908	0.04298387
Csal_1214	K00242	COG2142C	1.50297515	0.00082469
Csal_2001	K00425	COG1271C	1.708051611	0.00586737
Csal_3283	K02114	COG0355C	-2.57350494	1.2994E-12
Csal_3284	K02112	COG0055C	-2.75691944	9.1794E-10
Csal_3286	K02111	COG0056C	-1.97764094	0.00112902
Csal_3289	K02110	COG0636C	-4.86769753	7.3503E-12
Csal_2281	K01507	COG0221C	-1.91706784	1.0324E-06
Csal_0590	K00937	COG0855P	-2.10630029	0.00411636
Methane metabolism				
Csal_1917	K00127	COG2864C	1.86959947	0.0041645

## BIBLIOGRAFÍA

Csal_0619	K01689	COG0148G	-4.1964823	6.7924E-11
Csal_1640	K01595	COG2352C	1.52141823	0.00462153
Csal_0375	K11645	COG1830G	-3.23043301	2.1892E-09
Nitrogen metabolism				
Csal_1116	K00363	COG2146PR	3.299646543	2.4857E-06
Csal_1874	K01673	COG0288P	-2.46921262	4.2558E-05
Sulfur metabolism				
Csal_2427	K00390	COG0175EH	-3.77594493	8.25E-06
Csal_0923	K02439	COG0607P	-3.14495807	5.5133E-06
Csal_1636	K12339	COG0031E	1.511917624	0.03625672
Csal_1268	K10764	COG0626E		
Lipid metabolism				
Fatty acid biosynthesis				
Csal_2285	K01961	COG0439I	-3.86355787	2.0687E-22
Csal_1600	K00645	COG0331I	1.868280143	0.00814517
Csal_0456	K00647	COG0304IQ	-2.62920582	2.9719E-06
Csal_2911	K09458	COG0304IQ	7.982029786	7.0381E-24
Csal_0785	K00059	COG1028IQR	1.686984939	0.03334337
Csal_0457	K01716	COG0764I	-2.71555491	4.8439E-06
Csal_0574	K02372	COG0764I	-1.95619704	1.6386E-07
Fatty acid elongation				
Fatty acid degradation				
Csal_1468	K01897	COG0318IQ	1.511185453	0.02423394
Csal_2912	K13953	COG1064R	-1.75790201	0.00146028
Csal_1091	K00001	COG1063ER	2.216004307	6.2516E-06
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.82992927	1.7115E-05
Synthesis and degradation of ketone bodies				
Csal_1825	K00019	COG1028IQR	1.637399998	0.00034408
Glycerolipid metabolism				
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.82992927	1.7115E-05
Csal_0356	K05878	COG2376G	-2.25742158	0.00048813
Csal_0972	K08591	COG0344S	3.218695581	0.00071571
Csal_0010	K01002	COG1368M	-1.51130179	0.01074798
Glycerophospholipid metabolism				
Csal_0972	K08591	COG0344S	3.218695581	0.00071571
Csal_1506	K01126	COG0584C	2.224931432	2.3935E-05
Csal_0568	K00981	COG0575I	-2.87460946	6.2189E-07

## BIBLIOGRAFÍA

Biosynthesis of unsaturated fatty acids				
Csal_0785	K00059	COG1028IQR	1.686984939	0.03334337
Nucleotide metabolism				
Purine metabolism				
Csal_1639	K04765	COG3956R	2.238315795	0.00411636
Csal_1788	K13482	COG4631F	2.972374734	1.5026E-24
Csal_0528	K11178	COG1319C	1.631210173	0.00183358
Csal_0527	K13483	COG2080C	1.906844044	5.9208E-05
Csal_0379	K00525	COG0209F	-3.16761459	9.5249E-06
Csal_0668	K00525	COG0209F	-4.88261783	9.2881E-20
Csal_0667	K00526	COG0208F	-7.96555428	4.6768E-12
Csal_0380	K00526	COG0208F	-2.19910205	0.000443
Csal_0414	K03043	COG0085K	-1.5176162	0.00011077
Csal_1458	K02343	COG2812L	1.531665165	0.00223346
Csal_2921	K02339	COG2927L	-2.43818215	3.2463E-06
Csal_1282	K01939	COG0104F	-1.97510897	2.8714E-05
Csal_0080	K01483	COG3194F	2.02082383	0.00017008
Pyrimidine metabolism				
Csal_1342	K00254	COG0167F	2.180648004	2.3698E-05
Csal_0617	K01937	COG0504F	-2.49810978	7.0731E-06
Csal_0414	K03043	COG0085K	-1.5176162	0.00011077
Csal_1458	K02343	COG2812L	1.531665165	0.00223346
Csal_2921	K02339	COG2927L	-2.43818215	3.2463E-06
Csal_2114	K01494	COG0717F	-1.98592333	0.0097288
Csal_1639	K04765	COG3956R	2.238315795	0.00411636
Csal_0379	K00525	COG0209F	-3.16761459	9.5249E-06
Csal_0668	K00525	COG0209F	-4.88261783	9.2881E-20
Csal_0667	K00526	COG0208F	-7.96555428	4.6768E-12
Csal_0380	K00526	COG0208F	-2.19910205	0.000443
Csal_2572	K00560	COG0207F	-2.91090905	2.959E-10
Amino acid metabolism				
Alanine, aspartate and glutamate metabolism				
Csal_1282	K01939	COG0104F	-1.97510897	2.8714E-05
Csal_1289	K07250	COG0160E	2.743214322	1.7372E-10
Glycine, serine and threonine metabolism				
Csal_1811	K00281	COG1003E	-2.28608933	3.384E-05
Csal_1815	K00605	COG0404E	-3.0422148	4.8852E-05
Csal_1515	K00130	COG1012C	-1.50401952	0.01038698
Csal_2844	K00130	COG1012C	-1.54656993	0.00549472
Csal_2723	K01754	COG1171E	1.843501258	0.00030799
Csal_1877	K00836	COG0160E	-1.83535465	6.2514E-08
Csal_0542	K10674	COG5285Q	-4.02228721	1.4499E-06
Csal_1055	K13745	COG0076E	-4.43491312	5.6595E-24



## BIBLIOGRAFÍA

Cysteine and methionine metabolism				
Csal_1636	K12339	COG0031E	1.511917624	0.03625672
Csal_0672	K00549	COG0620E	-2.5487944	0.00268068
Csal_2049	K07173	COG1854T	-2.31982865	0.00010657
Csal_3057	K00641	COG2021E	-2.72887604	1.0761E-11
Valine, leucine and isoleucine degradation				
Csal_1707	K00020	COG2084I	2.422999771	0.00082469
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.82992927	1.7115E-05
Csal_1289	K07250	COG0160E	2.743214322	1.7372E-10
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis				
Csal_2723	K01754	COG1171E	1.843501258	0.00030799
Csal_2452	K01704	COG0066E	-1.79941825	4.0889E-06
Csal_2451	K00052	COG0473CE	-1.81603559	3.3466E-08
Csal_0504	K00053	COG0059EH	-2.63402532	3.4425E-14
Lysine biosynthesis				
Csal_2706	K01714	COG0329EM	-7.11649751	8.8576E-09
Csal_0558	K00674	COG2171E	-1.82823558	4.5983E-05
Lysine degradation				
Csal_1054	K03897	COG3486Q	-4.22015451	3.8875E-17
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.82992927	1.7115E-05
Arginine and proline metabolism				
Csal_1171	K01470	COG1402R	2.865316125	0.0002816
Csal_1189	K10536	COG2957E	3.980411061	8.0371E-12
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.82992927	1.7115E-05
Csal_1198	K09471	COG0665E	-1.7768609	0.04217708
Csal_1541	K00147	COG0014E	1.859261644	1.832E-05
Histidine metabolism				
Csal_0507	K00817	COG0079E	-1.82550373	0.01974541
Csal_3157	K00817	COG0079E	-1.82550373	0.01974541
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.82992927	1.7115E-05
Tyrosine metabolism				
Csal_0507	K00817	COG0079E	-1.82550373	0.01974541
Csal_2912	K13953	COG1064R	-1.75790201	0.00146028
Csal_1091	K00001	COG1063ER	2.216004307	6.2516E-06
Phenylalanine metabolism				
Csal_0507	K00817	COG0079E	-1.82550373	0.01974541

## BIBLIOGRAFÍA

Csal_1318	K00285	COG0665E	-3.24957557	5.3025E-13
Csal_1708	K01451	COG1473R	1.662469061	0.01484367
Tryptophan metabolism				
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.82992927	1.7115E-05
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis				
Csal_2283	K03786	COG0757E	-1.78675189	0.00478835
Csal_2321	K01658	COG0512EH	-1.75977065	0.00112884
Csal_0507	K00817	COG0079E	-1.82550373	0.01974541
Metabolism of other amino acids				
beta-Alanine metabolism				
Csal_3067	K01579	COG0853H	-1.99254481	0.00718039
Csal_1289	K07250	COG0160E	2.743214322	1.7372E-10
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.82992927	1.7115E-05
Taurine and hypotaurine metabolism				
Csal_2684	K15373	COG4221R	2.131872998	0.00258308
Selenocompound metabolism				
Csal_0672	K00549	COG0620E	-2.5487944	0.00268068
Csal_1236	K11717	COG0520E	-1.83300856	0.00135726
D-Alanine metabolism				
Csal_2629	K01775	COG0787M	-2.03736913	5.0322E-05
Glutathione metabolism				
Csal_0666	K00033	COG1023G	-1.62762415	0.00315652
Csal_2741	K00036	COG0364G	-3.18115433	4.6941E-29
Lipopolysaccharide biosynthesis				
Csal_0573	K02536	COG1044M	-1.63220778	0.00667625
Csal_0618	K01627	COG2877M	-2.38547301	5.004E-05
Csal_0015	K11211	COG0478T	-1.60772625	0.02353021
Csal_0008	K03274	COG0451MG	-2.05503702	2.0756E-05
Lipopolysaccharide biosynthesis proteins				
Peptidoglycan biosynthesis				
Csal_1591	K00075	COG0812M	1.694525109	0.03510514
Metabolism of cofactors and vitamins				

## BIBLIOGRAFÍA

Thiamine metabolism				
Csal_1236	K11717	COG0520E	-1.83300856	0.00135726
Vitamin B6 metabolism				
Csal_3194	K00097	COG1995H	-1.89660187	0.00225109
Csal_1634	K03474	COG0854H	2.384101693	1.3196E-07
Nicotinate and nicotinamide metabolism				
Csal_2492	K00324	COG3288C	-1.84941955	1.2981E-05
Csal_2491	K00325	COG1282C	-2.10030513	2.1639E-08
Pantothenate and CoA biosynthesis				
Csal_0504	K00053	COG0059EH	-2.63402532	3.4425E-14
Csal_2147	K00077	COG1893H	1.820107745	0.00348121
Csal_3067	K01579	COG0853H	-1.99254481	0.00718039
Biotin metabolism				
Csal_0456	K00647	COG0304IQ	-2.62920582	2.9719E-06
Csal_2911	K09458	COG0304IQ	7.982029786	7.0381E-24
Csal_0785	K00059	COG1028IQR	1.686984939	0.03334337
Csal_0574	K02372	COG0764I	-1.95619704	1.6386E-07
Lipoic acid metabolism				
Csal_1552	K03644	COG0320H	1.727316417	0.00293895
Folate biosynthesis				
Csal_0191	K09007	COG1469S	74.57806429	8.132E-221
Csal_3064	K00950	COG0801H	-2.19773099	3.2977E-06
Csal_2038	K06920	COG0603R	-2.60851669	1.012E-08
Csal_1353	K06879	COG2904S	1.764109369	0.00368756
Csal_2076	K03639	COG2896H	-2.12819751	0.0033382
One carbon pool by folate				
Csal_1815	K00605	COG0404E	-3.0422148	4.8852E-05
Csal_2572	K00560	COG0207F	-2.91090905	2.959E-10
Porphyrin and chlorophyll metabolism				
Csal_1211	K01885	COG0008J	-1.86331153	0.0018352
Csal_0467	K03795	COG2138S	1.887533684	0.00279408
Metabolism of terpenoids and polyketides				
Terpenoid backbone biosynthesis				

## BIBLIOGRAFÍA

Csal_1525	K00919	COG1947I	-3.08171939	0.00037555
Csal_0567	K00806	COG0020I	-1.88479333	1.721E-05
Monoterpenoid biosynthesis				
Limonene and pinene degradation				
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.82992927	1.7115E-05
Tetracycline biosynthesis				
Csal_2285	K01961	COG0439I	-3.86355787	2.0687E-22
Streptomycin biosynthesis				
Csal_0935	K00845	COG0837G	-2.24055634	6.052E-06
Novobiocin biosynthesis				
Csal_0507	K00817	COG0079E	-1.82550373	0.01974541
Xenobiotics biodegradation and metabolism				
Aminobenzoate degradation				
Csal_1839	K01512	COG1254C	2.067629299	0.01313846
Csal_0308	K01576	COG0028EH	1.925803592	0.00449222
Chloroalkane and chloroalkene degradation				
Csal_2912	K13953	COG1064R	-1.75790201	0.00146028
Csal_1091	K00001	COG1063ER	2.216004307	6.2516E-06
Csal_2913	K00128	COG1012C	-1.82992927	1.7115E-05
Toluene degradation				
Csal_1214	K00242	COG2142C	1.50297515	0.00082469
Nitrotoluene degradation				
Csal_0508	K10680	COG1902C	2.464787288	9.9726E-07
Caprolactam degradation				
Csal_1140	K14519	COG1012C	3.894475584	2.3118E-20
Naphthalene degradation				
Csal_2912	K13953	COG1064R	-1.75790201	0.00146028
Csal_1426	K13953	COG1064R		
Csal_1091	K00001	COG1063ER	2.216004307	6.2516E-06
Genetic Information Processing				

## BIBLIOGRAFÍA

Transcription				
RNA polymerase				
Csal_0414	K03043	COG0085K	-1.5176162	0.00011077
Translation				
Ribosome				
Csal_0563	K02967	COG0052J	-2.53451691	1.2434E-09
Csal_0427	K02982	COG0092J	-2.05853204	5.5852E-06
Csal_0416	K02950	COG0048J	-3.0915359	2.0628E-06
Csal_0443	K02952	COG0099J	-2.3511858	1.3206E-05
Csal_0889	K02963	COG0238J	-3.56354126	4.0569E-10
Csal_0433	K02931	COG0094J	-1.73605285	0.00248314
Csal_0436	K02933	COG0097J	-2.08549147	5.7136E-05
Csal_2207	K02871	COG0102J	-2.4901741	1.186E-08
Csal_0428	K02878	COG0197J	-1.50500229	0.03436656
Csal_0447	K02879	COG0203J	-3.32695768	3.4784E-17
Csal_1523	K02897	COG1825J	-2.55578275	3.8653E-05
Csal_2971	K02902	COG0227J	-2.9492119	1.2138E-08
Csal_0429	K02904	COG0255J	-1.52409916	0.02624744
Csal_0604	K02909	COG0254J	-3.33059843	1.5588E-05
Csal_2970	K02913	COG0267J	-2.45927955	9.922E-07
Aminoacyl-tRNA biosynthesis				
Csal_1211	K01885	COG0008J	-1.86331153	0.0018352
Csal_0007	K01878	COG0752J	-1.76488147	0.0006785
Csal_0006	K01879	COG0751J	-1.82626871	0.00014097
Csal_2315	K01875	COG0172J	-1.84585673	4.4343E-05
Csal_2051	K01883	COG0215J		
Csal_2922	K01873	COG0525J	-2.80055725	7.5044E-14
Csal_2997	K04567	COG1190J	-3.05236079	3.5245E-17
Csal_0602	K01887	COG0018J	-1.54377205	0.00047616
Csal_2855	K01892	COG0124J	-1.87923236	0.00050389
Folding, sorting and degradation				
Protein export				
Csal_0408	K03073	COG0690U	-2.54186309	0.00030974
Csal_2835	K03072	COG0342U	-2.18476174	4.4381E-06
Csal_2836	K03074	COG0341U	-5.49397009	3.9118E-12
Csal_2834	K03210	COG1862U	-1.92999387	1.6915E-05
Csal_3316	K03217	COG0706U	-2.85074856	7.8448E-08
Sulfur relay system				
Csal_2076	K03639	COG2896H	-2.12819751	0.0033382
RNA degradation				

## BIBLIOGRAFÍA

Csal_0619	K01689	COG0148G	-4.1964823	6.7924E-11
Csal_3094	K04043	COG04430	2.497175884	6.1655E-07
Csal_0590	K00937	COG0855P	-2.10630029	0.00411636
Replication and repair				
DNA replication				
Csal_1458	K02343	COG2812L	1.531665165	0.00223346
Csal_2921	K02339	COG2927L	-2.43818215	3.2463E-06
Base excision repair				
Csal_2969	K10563	COG0266L	-2.4360454	3.8092E-05
Mismatch repair				
Csal_1275	K03572	COG0323L	-1.80567478	0.00136861
Csal_1458	K02343	COG2812L	1.531665165	0.00223346
Csal_2921	K02339	COG2927L	-2.43818215	3.2463E-06
Homologous recombination				
Csal_0085	K03655	COG2865K	-1.60401421	0.00654444
Csal_1458	K02343	COG2812L	1.531665165	0.00223346
Csal_2921	K02339	COG2927L	-2.43818215	3.2463E-06

**Datos recogidos de los animales tratados**

Nº muestra	Code	Sex	Genotype	F. Nac.	Age (M)	Grupo	Fecha inicio tto	Fecha Fin Tto	Nº envío
1C	M16057	♂	wt	14/02/2016	7.9	WT Comp	29/06/2016	28/09/2016	1
2C	M16059	♂	wt	14/02/2016	7.9	WT Comp	29/06/2016	28/09/2016	1
3C	M16060	♂	wt	14/02/2016	7.9	WT Comp	29/06/2016	28/09/2016	1
4C	M16064	♀	wt	14/02/2016	7.9	WT Comp	29/06/2016	28/09/2016	1
5C	M16072	♀	wt	14/02/2016	7.9	WT Comp	29/06/2016	28/09/2016	1
6C	M16074	♀	wt	14/02/2016	7.9	WT Comp	29/06/2016	28/09/2016	1
7C	M16206	♂	wt	10/03/2016	8.1	WT Comp	25/07/2016	24/10/2016	2
8C	M16210	♂	wt	10/03/2016	8.1	WT Comp	25/07/2016	24/10/2016	2
9C	M16211	♀	wt	10/03/2016	8.1	WT Comp	25/07/2016	24/10/2016	2
10C	M16215	♀	wt	15/03/2016	8	WT Comp	27/07/2016	26/10/2016	2
11C	M16224	♀	wt	17/03/2016	7.9	WT Comp	29/07/2016	28/10/2016	2
12C	M16214	♂	wt	15/03/2016	8	WT Comp	27/07/2016	26/10/2016	2
13C	M16326	♀	wt	23/03/2016	8.2	WT Comp	08/08/2016	07/11/2016	3
14C	M16327	♀	wt	23/03/2016	8.2	WT Comp	08/08/2016	07/11/2016	3
15C	M16372	♂	wt	05/04/2016	8.5	WT Comp	19/08/2016	18/11/2016	4
16C	M16374	♂	wt	11/04/2016	8.3	WT Comp	26/08/2016	25/11/2016	4
17C	M16382	♂	wt	11/04/2016	8.3	WT Comp	26/08/2016	25/11/2016	4
11V	M16062	♂	APP/PS1	14/02/2016	7.9	Tg Vehículo	29/06/2016	28/09/2016	1
12V	M16073	♀	APP/PS1	14/02/2016	7.9	Tg Vehículo	29/06/2016	28/09/2016	1
13V	M16207	♂	APP/PS1	10/03/2016	8.1	Tg	25/07/2016	24/10/2016	2

BIBLIOGRAFÍA

						Vehículo			
14V	M16212	♀	APP/PS1	10/03/2016	8.1	Tg Vehículo	25/07/2016	24/10/2016	2
15V	M16218	♀	APP/PS1	15/03/2016	8	Tg Vehículo	27/07/2016	26/10/2016	2
2V	M16223	♀	APP/PS1	17/03/2016	7.9	Tg Vehículo	29/07/2016	28/10/2016	2
3V	M16213	♂	APP/PS1	15/03/2016	8	Tg Vehículo	27/07/2016	26/10/2016	2
4V	M16323	♂	APP/PS1	23/03/2016	8.2	Tg Vehículo	08/08/2016	07/11/2016	3
5V	M16331	♀	APP/PS1	23/03/2016	8.2	Tg Vehículo	08/08/2016	07/11/2016	3
6V	M16375	♂	APP/PS1	11/04/2016	8.3	Tg Vehículo	26/08/2016	25/11/2016	4
7V	M16379	♂	APP/PS1	11/04/2016	8.3	Tg Vehículo	26/08/2016	25/11/2016	4
8V	M16380	♂	APP/PS1	11/04/2016	8.3	Tg Vehículo	26/08/2016	25/11/2016	4
9V	M16384	♂	APP/PS1	14/04/2016	8.2	Tg Vehículo	29/08/2016	28/11/2016	4
6T	M16061	♂	APP/PS1	14/02/2016	7.9	Tg Comp	29/06/2016	28/09/2016	1
8T	M16066	♀	APP/PS1	14/02/2016	7.9	Tg Comp	29/06/2016	28/09/2016	1
7T	M16071	♀	APP/PS1	14/02/2016	7.9	Tg Comp	29/06/2016	28/09/2016	1
9T	M16208	♂	APP/PS1	10/03/2016	8.1	Tg Comp	25/07/2016	24/10/2016	2
10T	M16209	♂	APP/PS1	10/03/2016	8.1	Tg Comp	25/07/2016	24/10/2016	2
1T	M16216	♀	APP/PS1	15/03/2016	8	Tg Comp	27/07/2016	26/10/2016	2
2T	M16221	♂	APP/PS1	17/03/2016	7.9	Tg Comp	29/07/2016	28/10/2016	2
3T	M16322	♂	APP/PS1	23/03/2016	8.2	Tg Comp	08/08/2016	07/11/2016	3
4T	M16330	♀	APP/PS1	23/03/2016	8.2	Tg Comp	08/08/2016	07/11/2016	3
5T	M16373	♀	APP/PS1	05/04/2016	8.5	Tg Comp	19/08/2016	18/11/2016	4
11T	M16378	♂	APP/PS1	11/04/2016	8.3	Tg Comp	26/08/2016	25/11/2016	4
12T	M16385	♂	APP/PS1	14/04/2016	8.2	Tg Comp	29/08/2016	28/11/2016	4
13T	M16388	♂	APP/PS1	14/04/2016	8.2	Tg Comp	29/08/2016	28/11/2016	4