



Títol del Treball:

**Caracterització individual de les sintetases de ppGpp
(RelA i SpoT) en soques adherents invasives
d'*Escherichia coli* (AIEC)**

Estudiant: Àlex Justicia Kádár

Correu electrònic: alexjusticiakadar@gmail.com

Grau en Biotecnologia

Tutor: Margarita Martinez Medina

Correu electrònic: marga.martinez@udg.edu

Tutor extern: Llorenç Fernandez Coll

Correu electrònic: llorens.fernandez@udg.edu

Empresa/Institució: Universitat de Girona

Data de dipòsit de la memòria a través de la plataforma de TFG: 04/07/2023

ÍNDEX

REFLEXIÓ SOBRE ÈTICA	i
REFLEXIÓ SOBRE SOSTENIBILITAT	i
REFLEXIÓ SOBRE PERSPECTIVA DE GÈNERE.....	i
RESUM	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT.....	iv
1. INTRODUCCIÓ	1
1.1 <i>Escherichia coli</i> i la microbiota intestinal	1
1.2 Malalties inflamatòries intestinals. Relació amb AIEC	1
1.3 La resposta estricta. Importància de ppGpp.....	3
1.4 Metabolisme de ppGpp (RelA/SpoT)	4
1.5 Soques MG1655 i LF82; mutants $\Delta relA$ i ppGpp ⁰	5
2. OBJECTIVES	6
3. MATERIALS I MÈTODES	7
3.1 Medis de cultiu	7
3.2 Alineament de les seqüències aminoacídiques de SpoT	7
3.3 Assaig de competència	7
3.4 Corbes de creixement	9
3.5 Assaig de motilitat	9
3.6 Assaig de la capacitat de formació de biofilm	10
3.7 Assaig adhesió-invasió	10
3.8 RT-qPCR: <i>iraP</i>	12
3.9 Anàlisi estadístic.....	14
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	15
4.1 Identificació de la mutació T13N en SpoT de LF82	15
4.2 Índex de competència.....	16

4.3 Taxa específica de creixement.....	17
4.4 Determinació de la motilitat	19
4.5 Capacitat de formació de biofilm (LB i CFA).....	21
4.6 Determinació de la capacitat adherent invasiva	23
4.7 Determinació dels nivells d'expressió de <i>iraP</i>	24
5. CONCLUSIONS.....	27
6. BIBLIOGRAFIA.....	28

REFLEXIÓ SOBRE ÈTICA

En el laboratori de microbiologia es treballa amb una gran varietat de microorganismes que sovint poden arribar a ser patògens. Per aquest, motiu és imprescindible treballar en un entorn de bioseguretat respectant la legislació vigent (ANEXO I: Clasificación de Microorganismos Según Grupos de Riesgo (OMS, Manual De, n.d.). En aquest projecte s'ha treballat amb la soca AIEC LF82, classificada com a grup de risc 2, requerint un laboratori de microbiologia bioseguretat 2. Per aquest motiu s'ha respectat mesures de seguretat com l'ús de diferents bates en funció al laboratori de treball, la presència d'un contenidor específic pel rebuig de cultius, així com el treball amb guants sempre que hagi sigut possible. Alhora, al treballar amb mutants resistents a antibiòtics, s'ha tingut la certificació de manipulació, contenció i eliminació de d'Organismes modificats genèticament.

REFLEXIÓ SOBRE SOSTENIBILITAT

La contaminació per l'ús excessiu del plàstic és una de les problemàtiques que genera un impacte major en el canvi climàtic. Només en el 2014, els laboratoris d'investigació mèdica van rebutjar al voltant de 5.5 milions de tones de plàstic (Paula Leighton, 2023). Tot aquest plàstic deriva de material d'un sòl, provocant un excés de residus i la necessitat de consumir recursos no renovables, agreujant així la problemàtica climàtica. Una alternativa a aquest problema és promoure la utilització de material de vidre i metall, com la nansa de Kolle metàl·lica que permet la seva esterilització amb la flama, augmentant així els seu nombre d'usos.

REFLEXIÓ SOBRE PERSPECTIVA DE GÈNERE

El grup de recerca en microbiologia intestinal de la Universitat de Girona presenta una equitat en la presència dels dos sexes en els seus integrants. A més, el càrrec d'investigadora principal es troba ocupat per una dona. Tot i això, aquest fet és poc present dins de la comunitat científica, ja que segons les dades publicades pel Ministeri de Ciència i Innovació, la categoria laboral més elevada en investigació és ocupada majoritàriament per homes. Un altre nivell de reflexió es troba en la distribució de pacients per sexe en la malaltia de Crohn, on s'observa una major freqüència en homes en edats prematures, mentre que la freqüència en pacients superiors als 25 anys és major en dones (Greuter et al., 2020). Així doncs, el nombre de dones i homes en els assajos clínics de la malaltia de Crohn, hauria de ser igualitari.

RESUM

La malaltia de Crohn és un tipus de malaltia inflamatòria intestinal crònica amb etiologia desconeguda. Tot i això, s'ha observat la presència d'una soca adherent-invasiva d'*Escherichia coli* (AIEC) en un gran nombre de pacients. Aquest patotip d'*E. coli* presenta la capacitat d'adherir-se i envair les cèl·lules epitelials intestinals a la vegada que pot sobreviure i replicar-se dintre dels macròfags, desencadenant la resposta inflamatòria crònica característica de la malaltia de Crohn.

La interacció entre AIEC i les cèl·lules epitelials intestinals és deu a una gran varietat de factors de virulència regulats per dos nucleòtids, el tetrafosfat i pentafosfat de guanosina ((p)ppGpp). Aquests nucleòtids regulen la transcripció d'una gran varietat de gens involucrats en la resposta estricta de la cèl·lula, que es dona quan la cèl·lula es troba en situacions d'estrès, limitació de nutrients i en el procés infectiu en els casos de soques patògenes.

En *Escherichia coli*, els nivells de (p)ppGpp són regulats pels enzims RelA i SpoT. Aquests enzims estan formats per un domini sintetasa i un hidrolasa, exceptuant RelA que només presenta el domini sintetasa funcional. En aquest treball es pretén caracteritzar les sintetases de (p)ppGpp (RelA/SpoT) de la soca AIEC i comparar-les amb les de la soca comensal MG1655, que es troba formant part de la microbiota intestinal.

En aquest estudi, s'ha utilitzat les soques salvatges de MG1655 i LF82 (AIEC) i dues respectives mutants, una deficient pel gen *relA* ($\Delta relA$) i l'altra deficient per *relA* i *spoT* (*ppGpp*⁰). La caracterització s'ha dut a terme a partir d'una valoració inicial de l'efecte de les mutacions en la fisiologia bacteriana a través d'un assaig de competència, corbes de creixement, motilitat i capacitat de formació de biofilm. També s'ha valorat el paper de ppGpp en la capacitat adherent-invasiva d'AIEC i finalment s'han estimat als nivells de ppGpp a partir de la seva detecció indirecta mitjançant una qPCR del gen *iraP*.

Els resultats obtinguts suggereixen que les mutacions en *relA* i *spoT* no afecten la competència ni en les taxes de creixement, però sí a la motilitat i la capacitat de formació de biofilm entre MG1655 i LF82, suggerint que el paper del ppGpp podria dependre de si la soca presenta fenotip patogen o no. Finalment, els resultats de la qPCR suggereixen una diferència en els nivells de ppGpp, i per tant en la seva regulació, entre MG1655 i LF82.

RESUMEN

La enfermedad de Crohn es una patología inflamatoria intestinal crónica cuya etiología es desconocida. Sin embargo, se ha observado la presencia de una cepa adherente-invasiva d'*Escherichia coli* (AIEC) en la mayoría de los pacientes. Este patotipo de *E. coli* presenta la capacidad de adherirse e invadir las células epiteliales intestinales a la vez que es capaz de sobrevivir y replicarse dentro de los macrófagos, desencadenando la respuesta crónica inflamatoria propia de la enfermedad de Crohn.

La interacción entre AIEC y las células epiteliales intestinales viene dada por una gran variedad de factores de virulencia regulados por dos nucleótidos, el tetrafosfato y pentafosfato de guanosina ((p)ppGpp). Estos nucleótidos regulan la transcripción de una gran variedad de genes involucrados en la respuesta estricta de la célula, producida ante el estrés celular y limitación de nutrientes, así como en los procesos infectivos de cepas patógenas.

Los niveles de (p)ppGpp. Son regulados por las enzimas RelA y SpoT en *Escherichia coli*. Estas enzimas están formadas por un dominio sintetasa y uno hidrolasa, a excepción de RelA que solamente presenta el dominio sintetasa funcional. En este trabajo se pretende caracterizar las sintetasas (RelA/spoT) de (p)ppGpp de la cepa AIEC y compararlas con las de la cepa comensal MG1655, que se encuentra formando parte de la microbiota intestinal.

En este estudio, se ha utilizado las cepas salvajes de MG1655 i LF82 (AIEC) y dos respectivas mutantes, una deficiente por el gen *relA* ($\Delta relA$) y otra deficiente de por *relA* y *spoT* (ppGpp⁰). La caracterización se ha llevado a cabo a partir de una valoración inicial del efecto de las mutaciones en la fisiología bacteriana a través de un ensayo de competencia, curvas de crecimiento, motilidad y la capacidad de formación de biofilm. También se ha valorado el papel de ppGpp en la capacidad de adherente-invasiva de AIEC y finalmente se han estimado los niveles de ppGpp a partir de una detección indirecta mediante una qPCR del gen *iraP*.

Los resultados obtenidos sugieren que las mutaciones en *relA* y *spoT* no afectan en la competencia ni en la tasa de crecimiento específico, pero sí en la motilidad y la capacidad de formación de biofilm entre MG1655 y LF82, sugiriendo que el papel de ppGpp podría recaer en si la cepa presenta un fenotipo patógeno o no. En último lugar, los resultados de la qPCR sugieren una diferencia en los niveles de ppGpp y, por lo tanto en su regulación, entre MG155 y LF82.

ABSTRACT

Crohn's disease is a chronic inflammatory bowel pathology whose etiology is unknown. However, it has been observed the presence of adherent-invasive strain of *Escherichia coli* (AIEC) in many patients. This pathotype of *E. coli* can adhere and invade the intestinal epithelial cells besides is capable to survive and replicate within macrophages, triggering the common chronic inflammatory response of Crohn's disease.

The interaction between AIEC and intestinal epithelial cells is mediated by a wide variety of virulence factors regulated by two nucleotides, tetra- and pentaphosphate guanosine ((p)ppGpp). These nucleotides regulate the transcription of wide range of genes involved in the stringent cell response, which occurs in the presence of cellular stress and nutrient starvation, as well as in the infective processes of pathogenic strains.

The levels of (p)ppGpp are regulated by RelA and SpoT enzymes in *Escherichia coli*. The structure of this enzymes is based in a synthetase domain and hydrolase domain, except for RelA, which only has the functional synthetase domain. This project aims to characterize the RelA/SpoT synthetases of (p)ppGpp in AIEC strain and compare them with those of commensal strain MG1655, which is part of the intestinal microbiota.

In this study, wild-type strains of MG1655 and LF82 (AIEC) were used, along with their respective mutant, one deficient in the *relA* gene ($\Delta relA$) and another deficient in both *relA* and *spoT* (ppGpp⁰). Characterization was carried out through an initial evaluation of the mutation's effect on bacterial physiology using a nutrient competition assay, growth curves, motility and biofilm formation capability. It was also evaluated the role of ppGpp in the adherent-invasive capacity of AIEC and finally the ppGpp levels were indirectly estimated by qPCR detection of the *iraP* gene.

The results suggest that mutations in *relA* and *spoT* do not affect nutrient fitness or specific growth rate but do impact motility and biofilm formation capacity between MG1655 and LF82, suggesting that the role of ppGpp could be determined whether the strain is pathogenic or not. Lastly, the qPCR results indicate a difference in ppGpp levels, and therefore its regulation, between MG1655 and LF82.

1. INTRODUCCIÓ

1.1 *Escherichia coli* i la microbiota intestinal

Escherichia coli és un bacteri que pertany a la família de les enterobacteriases i que es caracteritza per ser gram-negativa amb metabolisme anaerobi facultatiu. Majoritàriament, es troba colonitzant el tracte gastrointestinal d'humans i animals formant part de la seva microbiota, que està formada per comunitats microbianes que estableixen relacions simbiòtiques amb les cèl·lules de l'hoste (Adak & Khan, 2019).

La microbiota intestinal és coneguda per exercir un rol clau en multitud de processos metabòlics, nutricionals, fisiològics i immunològics. Al llarg de la vida de l'hoste, la microbiota incrementa la composició en diversitat i riquesa fins a arribar a tenir al voltant d'un centenar d'espècies bacterianes diferents. L'establiment d'aquests ecosistemes bacterians en etapes primerenques de la vida, suggereix una implicació entre la composició microbiana i la predisposició de patir algunes malalties. Així doncs, la composició d'una microbiota diferent està relacionada amb desordres inflamatoris crònics. (Ottman et al., 2012).

1.2 Malalties inflamatòries intestinals. Relació amb AIEC

Les malalties inflamatòries intestinals (IDB) són una família de malalties inflamatòries cròniques del tracte gastrointestinal que tradicionalment, es divideixen en la malaltia de Crohn (CD) i la colitis ulcerosa (UC) (Chloé Mirsepasi-Lauridsen et al., 2019). Aquestes dues malalties es diferencien en la simptomatologia i els hipotètics mecanismes patogènics. Concretament, CD és una malaltia crònica, segmental i localitzada que pot provocar diarrea, dolor abdominal, febre, obstrucció de l'intestí, entre altres símptomes (Xu et al., 2023).

L'etiologia d'aquestes malalties no està ben definida, però s'ha descrit que la microbiota intestinal i té un paper clau, amb canvis en la composició general i soques bacterianes selectes que se suggereixen com a patògens oportunistes. (Jellbauer & Raffatellu, 2014). Diversos estudis mostren un increment de soques virulentes d'*E. coli* aïllades a partir pacients d'IBD (Chloé Mirsepasi-Lauridsen et al., 2019). Concretament, s'ha trobat un fenotip d'*E. coli* patògen en pacients de CD anomenada soca adherent invasiva d'*Escherichia coli* (AIEC) (Martinez-Medina et al., 2009).

Les soca AIEC és considerada un patobiont perquè promou malalties inflamatòries a través de l'evolució adaptativa del seu genoma a un hoste específic i susceptible. A diferència dels patògens oportunistes, la influència del patobiont succeeix indirectament via estimulació del sistema

immunitari de l'hoste. (Palmela et al., 2018). La capacitat d'AIEC per adherir-se a la mucosa intestinal es dona a terme a partir de la unió de les fímbries de tipus I (adhesines) amb l'antigen carcinoembrionari 6 (CEACAM6). Posteriorment, AIEC utilitza els microfilaments d'actina i microtúbuls de la cèl·lula hoste, mitjançant un procés d'endocitosis per dur a terme la invasió. Addicionalment, s'ha demostrat la capacitat de sobreviure dintre dels macròfags estímulant la producció de $TNF\ \alpha$, que provoca una resposta inflamatòria granulomatosa, caracteritzada per ser un cúmul de macròfags activats, conjuntament amb limfòcits T, causants de la inflamació crònica descrita en CD (Chloé Mirsepasi-Lauridsen et al., 2019b) (Figura 1).

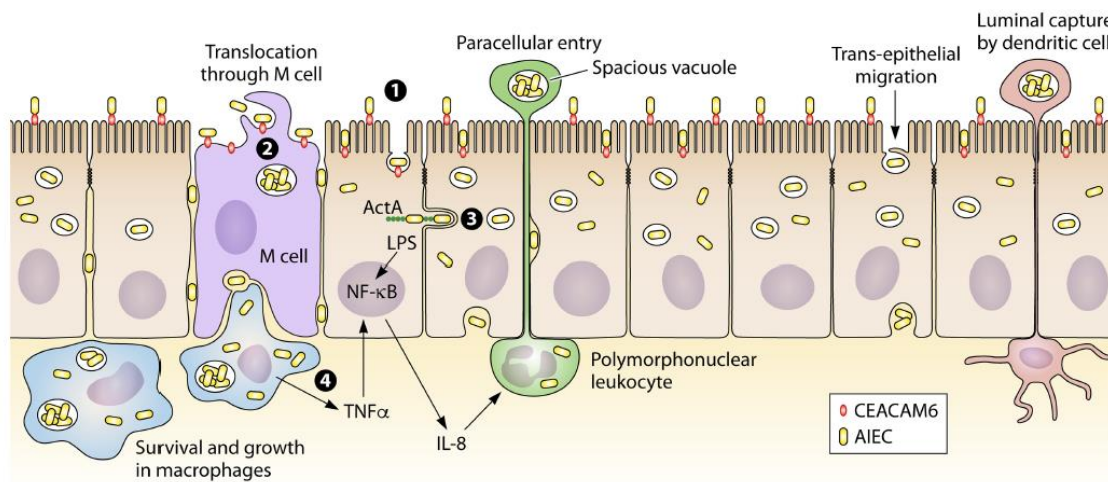


Figura 1. Procés invasiu d'AIEC a cèl·lules epitelials intestinals en la malaltia de Crohn. Figura extreta de Chloé Mirsepasi-Lauridsen et al., (2019b).

Les soques patògenes d'*E. coli* responsables de desordres intestinals i extraintestinals es classifiquen en 9 patotipus, que es diferencien per tenir mecanismes patogènics característics i presentar un perfil de factors de virulència específic. D'aquests 9 patotipus, 7 s'han descrit com a *E. coli* entero patogèniques i s'ha observat que comparteixen factors de virulència i estratègies. Tot i que la soca AIEC és considerada entero patogènica, no s'han descrit factors de virulència comuns amb els altres patotipus i els seus mecanismes patogènics *in vivo* o els gens específics involucrats són força desconeguts (Pakbin et al., 2021). Per tant, la caracterització d'AIEC i l'anàlisi dels seus mecanismes patogènics són dianes importants en els estudis sobre la patologia de la malaltia de Crohn.

1.3 La resposta estricta. Importància de ppGpp

Quan un bacteri s'enfronta a una limitació de nutrients, ràpidament destina tots els recursos cel·lulars en aturar la síntesi de DNA, proteïnes ribosomals i components de membrana per produir factors crucials per la resistència a l'estrès (Dalebroux & Swanson, 2012). Aquest procés s'anomena resposta estricta de la cèl·lula, la qual es dona, en part, per un canvi en el perfil transcripcional de molts gens, coordinats per la senyalització de dos nucleòtids, el pentafofosfat (pppGpp) i el tetrafofosfat de guanosina (ppGpp) (Wolz et al., 2010). En general, els bacteris presenten majors nivells de ppGpp que pppGpp i al realitzar una funció molt similar, és comú representar-los conjuntament com a (p)ppGpp o ppGpp (Mechold et al., 2013), essent el segon terme el que s'ha utilitzat al llarg d'aquest treball. Comunament, es denomina a aquest nucleòtid amb el terme alarmona, fent referència a les seves funcions que, principalment, provoquen redireccions en la transcripció de gens implicats en la supervivència bacteriana en situacions on manca la disponibilitat de nutrients i es dificulta el creixement cel·lular (Magnusson et al., 2005). Altrament, en soques patògenes s'ha observat la importància d'aquest nucleòtid en els processos implicats en la virulència i la infecció cel·lular (Spira & Ospino, 2020).

El ppGpp exerceix la majoria dels seus efectes fisiològics a través de la interacció directa amb la RNA polimerasa (RNAP) provocant un canvi de conformació, implicant l'activació o inhibició de la transcripció (Molodtsov et al., 2018; Mechold et al., 2013). S'han descrit característiques compartides entre els promotors inhibits per ppGpp, on s'observa la presència d'un discriminador (situat entre TAT-box (-10) i el lloc d'inici de la transcripció) ric en GC, mentre que els promotors activats per ppGpp presenten un discriminador ric en AT (Figura 2) (Sanchez-Vazquez et al., 2019). Altrament, l'efecte de ppGpp en l'expressió es pot donar de manera indirecta, a través de factors sigma, els quals són regulats per ppGpp (Magnusson et al., 2007).

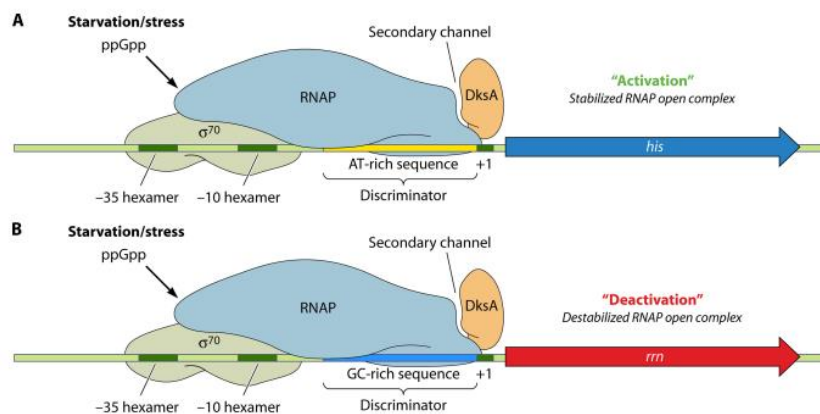


Figura 2. Control directe de la transcripció per la interacció entre ppGpp i la RNA polimerasa. Activació (A) o desactivació (B) del promotor en resposta a l'estrès. Extret de Dalebroux et al., (2010).

1.4 Metabolisme de ppGpp (RelA/SpoT)

La síntesi de pppGpp i ppGpp consisteix en la transferència d'un pirofosfat procedent d'un ATP al grup hidroxil 3' de la ribosa del GTP o GDP, respectivament. En funció del substrat inicial, el nombre de fosfats del nucleòtid final variarà, d'igual manera que ho faran les seves funcions. Inversament, es dona la hidròlisi de ppGpp, en què s'allibera el pirofosfat i es retorna al substrat inicial (Steinchen & Bange, 2016).

Els enzims RelA/SpoT homòlegs (RSH) són una superfamília d'enzims que es conserven en bacteris, algues i plantes, majoritàriament bifuncionals que són els encarregats de la síntesi i la hidròlisi de ppGpp, és a dir, del seu metabolisme (Atkinson et al., 2011). L'estructura d'aquests enzims es basa en una primera regió catalítica amino-terminal, la qual presenta un domini hidrolasa i un domini sintetasa, tal com s'observa a la figura 3. A més, aquests enzims presenten una regió reguladora carboxil-terminal, que està formada per quatre dominis (TSG, alfa, CC i ACT), encara que les funcionalitats precises de cada domini encara estan per entendre's (Steinchen & Bange, 2016). Addicionalment, en el món bacterià existeixen sintetases més petites que presenten només un domini sintetasa (SAS), o amb un sol domini hidrolasa (SAH) (Fernández-Coll & Cashel, 2020).

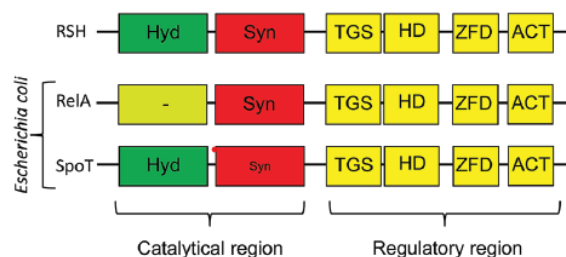


Figura 3. Representació esquemàtica de l'estructura dels enzims RSH, així com pels enzims RelA i SpoT d'*E. coli*. Extret de Fernández-Coll & Cashel, (2020).

En *E. coli*, els enzims RSH encarregats de regular els nivells de ppGpp a la cèl·lula són RelA i SpoT. La diferència entre aquests dos enzims recau en el domini catalític N-terminal, ja que en SpoT és bifuncional, és a dir, el domini sintetasa i hidrolasa són actius. En canvi, RelA és monofuncional, ja que només presenta el domini sintetasa actiu i el domini hidrolasa és no funcional (Figura 3). Per aquest motiu, SpoT és l'única via disponible de la cèl·lula per hidrolitzar el ppGpp. L'enzim RelA és capaç d'unir-se al ribosoma, de manera que la regió C-terminal queda enterrada en el ribosoma i només queda exposada la regió catalítica. La síntesi de ppGpp per part de RelA es dona quan hi ha una privació dels aminoàcids, provocant el reconeixement de ARN de transferència (ARNt)

descarregat al lloc A del ribosoma, que s'unirà a la regió C-terminal de RelA (Figura 4.A) (Bai et al., 2021). En canvi, no s'ha observat que SpoT interactuï amb el ribosoma, però si s'han descrit dues proteïnes que s'uneixen al domini TGS de SpoT en resposta a la falta de nutrients. Una d'aquestes proteïnes és la proteïna transportadora d'acil (ACP; *Acyl Carrier Protein*) que respon a la limitació d'àcids grassos. Quan ACP es troba acilada (presència d'àcids grassos) inclina a SpoT a actuar com hidrolasa, mentre que la forma no acilada (falta d'àcids grassos) promou la funció sintetasa de SpoT (Battesti & Bouveret, 2006). L'altra proteïna és Rsd, que promou la hidròlisi de ppGpp en resposta a la falta de glucosa (Figura 4.B) (Fernández-Coll & Cashel, 2020).

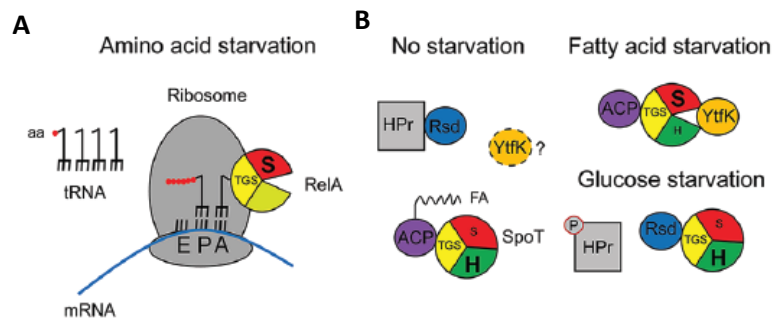


Figura 4. (A) Representació esquemàtica de la unió de RelA al ribosoma i la seva activació en condicions de manca d'aminoàcids. (B) Representació esquemàtica de les proteïnes que s'uneixen a SpoT en presència/absència d'àcids grassos i manca de glucosa. Extret de (Fernández-Coll & Cashel, 2020).

1.5 Soques MG1655 i LF82; mutants $\Delta relA$ i ppGpp⁰

La soca AIEC de referència utilitzada en aquest treball és LF82, una soca d'*E. coli* aïllada de les mucoses intestinals de pacients de CD (Miquel et al., 2010). Addicionalment, s'ha treballat amb la soca MG1655 K-12, abreviada com a MG1655, que es caracteritza per ser una soca d'*E. coli* comensal no patògena que es troba colonitzant l'intestí prim dels animals (Blattner et al., 1997). Aquestes dues soques s'han utilitzat per comparar i determinar les possibles diferències en l'impacte o els efectes de ppGpp en soques patògenes i no patògenes d'*E. coli*, ja que totes dues colonitzen el mateix ambient.

Tant per MG1655 com per LF82, s'ha treballat amb la soca salvatge i dues mutants, $\Delta relA$ i ppGpp⁰. La soca salvatge (wt), manté el fenotip original ja que no se li ha induït cap modificació i és a partir d'aquesta que s'han obtingut les dues mutants corresponents. La mutant $\Delta relA$ s'ha obtingut a partir d'una mutació per deleció de la sintetasa RelA, essent SpoT l'única sintetasa disponible per

la síntesi de ppGpp. La mutant ppGpp⁰ presenta les dues sintetases mutades per deleció, provocant que aquesta soca sigui deficitària per ppGpp. Les mutacions pertinents es van realitzar anteriorment al grup de recerca a partir de recombinació homòloga amb l'objectiu de substituir el gen en qüestió per un gen de resistència a antibiòtic. D'aquesta manera s'utilitzarà aquesta resistència com a marcador de detecció de la soca. El gen *relA* ha estat substituït pel gen de resistència a Kanamicina (Km) i el gen *spoT* per la resistència a Cloramfenicol (Cm).

2. OBJECTIVES

The main objective of this project is the characterization of the ppGpp synthetases, RelA and SpoT, in adherent invasives *Escherichia coli* strain LF82 by comparing with no-pathogenic *E. coli* strain MG1655. For this purpose, the following secondary objectives are presented:

- Evaluate and compare the effect of the mutations in RelA and SpoT on the physiology of the strains MG1655 and LF82 through the valuation of a nutrient competition assay, motility, biofilm formation and growth rate of the strains MG1655 and LF82.

- Determine the role of ppGpp in the adhesive-invasive phenotype of AIEC LF82 strain through an adherence and invasion assay using the I-407 intestinal epithelial cell culture.

- Evaluate the synthetase function of SpoT and the possible effect of the T13N mutation through the indirect detection of ppGpp levels using qPCR analysis of *iraP* gene expression.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1 Medis de cultiu

Per dur a terme els diferents assajos d'aquest treball, s'ha fet ús de diferents medis de cultiu:

Medi LB (Lennox): Medi de cultiu ric compost per 10 g/L de peptona, 4 g/L d'extracte de llevat i 5 g/L NaCl. La preparació ha consistit en la dissolució de 20 g/L del medi deshidratat en aigua destil·lada i posteriorment s'ha esterilitzat per calor humit mitjançant l'autoclau.

Medi CFA: medi de cultiu ric compost per 10 g/L de casamino àcids, 1.5 g/L d'extracte de llevat, 50 mg/L de MgSO₄ i 5 mg/L de MnCl.

Medi M9: Medi de cultiu mínim compost a base de Sals M9 1X, CaCl₂ 0.1 mM, MgSO₄ 1 mM, dissolució de metalls 1X, Vitamina B1 10 µg/mL i Vitamina B12 µM. Les Sals M9 i la solució de metalls s'han preparat com es descriu a Delmas et al., (2019).

Medi motilitat: Medi de cultiu ric preparat a partir de 10 g/L triptona, 5 g/L NaCl i 2,5 g/L Agar. Un cop autoclavat, s'ha afegit glucosa 0.2% (pes/volum).

3.2 Alineament de les seqüències aminoacídiques de SpoT

S'ha descrit la presència d'una mutació T13N en el domini hidrolasa en l'enzim SpoT en diferents soques d'*E. coli*. (Ferenci et al., 2011). Per comprovar si la soca LF82 presenta aquesta mutació, s'ha realitzat un alineament entre les seqüències aminoacídiques de SpoT de les soques MG1655 i LF82. Les seqüències aminoacídiques s'han obtingut de la base de dades del Centre Nacional per a la Informació Biotecnològica (NCBI), mentre que l'alineament s'ha executat amb el programa Multalin (Corpet, n.d.).

3.3 Assaig de competència

Primerament, s'han preparat cultius de nit (ON) de les tres soques (wt, RelA i ppGpp⁰) de MG1655 i LF82 a més d'un control negatiu (-) de medi sense inocular. Per fer-ho, s'ha afegit 1,5 mL de medi LB en tubs de vidre amb tap transpirable al qual s'ha inocularat la soca a partir d'un glicerinat guardat al congelador a -80°C i s'ha deixat incubar sense agitació tota la nit a 37°C.

Al següent dia, s'ha mesurat la DO_{600} dels cultius ON amb una dilució $\frac{1}{2}$ amb medi LB. A partir de les absorbàncies mesurades, s'ha calculat el volum necessari del cultiu de nit per obtenir una concentració de 10^5 ufc/mL en falcons en els quals prèviament s'ha afegit 15 mL de medi LB.

En 6 tubs falcon de 50 mL, s'ha inoculat 15 mL de LB amb les soques individuals, que han servit de control positiu, per verificar que aquestes creixen en les condicions estudiades. S'ha inoculat 6 falcons més amb barreges (1:1) de les soques que es volen comparar i finalment un control negatiu (LB sense inocular), un total de 13 falcons. Aquests s'han dut a incubar 24 hores en agitació a 200 revolucions per minut (rpm) a 37°C havent extret prèviament 100 μL per tal de realitzar un banc de dilucions i sembrar les mostres a temps=0 hores. S'han preparat les dilucions 10^{-1} , 10^{-2} i 10^{-3} amb Ringer i posteriorment s'han sembrat en plaques amb medi LB, LB+Km o LB+Cm, en funció de les soques presents a la competència, i posteriorment s'ha incubat 24 hores a 37°C .

Passades 24 hores, s'ha comprovat que hi hagi absència de creixement en el C- i s'ha realitzat de nou un banc de dilucions. En aquest cas s'han sembrat les dilucions 10^{-5} , 10^{-6} i 10^{-7} i s'han deixat incubar a 37°C unes 24 hores. Aquestes plaques corresponen a les mostres $t=24$ hores.

El recompte d'unitats formadores de colònia (ufc) s'ha realitzat a partir l'equació 1.

$$ufc/mL = \frac{\sum N}{V \cdot (n1 + (0,1 \cdot n2) \cdot d)} \quad (\text{eq. 1})$$

On $\sum N$ és el sumatori del recompte de colònies de plaques vàlides; V és el volum sembrat, en aquest cas 25 μL ; $n1$ és el nombre de plaques sembrades de la primera dilució comptada; $n2$ és el nombre de plaques sembrades de la segona dilució comptada; D és la menor dilució comptada.

S'han considerat plaques vàlides pel càlcul aquelles en què el nombre de colònies comptades estigui comprès entre 15 i 150 colònies. S'ha procedit al recompte de les plaques a $t=0$ i $t=24$, per posteriorment realitzar el càlcul de les unitats formadores de colònia (ufc) de la soques salvatges (wt) i mutants ($\Delta relA$ i $ppGpp^0$).

Al final del recompte, s'han obtingut 12 valors de ufc per cada soca (MG1655/LF82). Per cada competència s'ha determinat les ufc de la mutant (*ufc mut*) a 0 i 24 hores, i el mateix pel cas de la soca salvatge (*ufc wt*). Les *ufc mut* corresponen directament al recompte realitzat d'una competència en la placa amb medi LB+Km/Cm, ja que només les mutant són capaces de créixer en aquestes condicions. Les *ufc wt* corresponen al recompte de la competència en placa amb medi LB menys les *ufc mut* de la mateixa competència. Pel cas de la competència entre les mutants, s'ha definit com a *ufc wt* la mutant $\Delta relA$.

Finalment, per cada una de les competències realitzades, s'ha calculat l'índex de competència (IC) corresponent a partir de l'equació 2:

$$IC = \frac{\left(\frac{ufc\ mut\ 24\ h}{ufc\ wt\ 24\ h}\right)}{\left(\frac{ufc\ mut\ 0\ h}{ufc\ wt\ 0\ h}\right)} \quad (\text{eq. 2})$$

3.4 Corbes de creixement

Les diferents soques han estat crescudes en diferents medis (LB / M9 + 0.2 % casamino àcids + glucosa / M9 + glucosa) amb 1/5 del volum total de medi (20 mL) en Erlenmeyer de 100 mL amb taps de cel·lulosa. A partir de cultius ON crescuts en les mateixes condicions que l'assaig, en el medi de cultiu s'ha inoculat a una OD de 0.01 per LB i 0.05 pels dos medis restants. Finalment, s'han incubat els Erlenmeyers a 37°C en agitació a 200 rpm.

Aproximadament, cada hora es s'ha mesurat la OD dels Erlenmeyer i amb els resultats obtinguts s'ha calculat la taxa de creixement específica (μ).

Per a cada soca, a partir dels valors d'absorbància obtinguts s'ha dut a terme una regressió lineal la qual ha servit per detectar la fase exponencial de la corba, on la taxa de creixement específica (μ) correspon al pendent d'aquesta recta multiplicada per 2.3.

3.5 Assaig de motilitat

En aquest assaig s'ha realitzat 3 replicats biològics i 3 tècnics, per aquest motiu s'ha necessitat preparar 18 cultius ON i 54 plaques rodones amb medi de motilitat.

Per preparar els cultius ON, s'ha afegit 1,5 mL de medi LB líquid en tubs de vidre estèrils amb tap de cel·lulosa i s'han incubat a 37°C tota la nit.

S'ha abocat 20 mL del medi a cada placa i s'ha deixat solidificar sobre la poiat a temperatura ambient tota la nit. L'endemà, s'ha inoculat 5 μ L de la soca corresponent al centre de la placa i s'ha deixat incubar aproximadament 7 hores a 37°C sense invertir.

A l'estar les cèl·lules adherides en una superfície semisòlida com és l'agar, aquestes es mouen per *swarming* observant-se així, halos circulars un cop les plaques han estat incubades (Swiecicki et al., 2013). Per aquest motiu, a causa de la morfologia dels halos, s'ha mesurat el diàmetre de l'halo i s'ha calculat l'àrea per a cada placa (Equació 3).

$$\text{Area Halo (mm}^2\text{)} = \pi \cdot r^2 \quad (\text{eq. 3})$$

3.6 Assaig de la capacitat de formació de biofilm

S'ha realitzat un assaig de formació de biofilm en medi LB i medi CFA per a cada una de les soques, S'ha fet 3 rèpliques biològiques i 3 tècniques, per aquest motiu s'ha utilitzat una placa de 96 pous.

La primera part d'aquest protocol ha consistit en la preparació de placa. En primer lloc, s'han realitzat 18 cultius ON en medi LB a partir de glicerinars guardats al congelador de -80°C. L'endemà, s'ha mesurat la OD i s'ha ajustat a 0.1 amb medi LB o CFA atenent que el volum final de cada pou és de 200 µL.

Un cop preparada la placa, s'ha col·locat dins d'una carmanyola amb paper moll per crear humitat amb l'objectiu d'evitar l'evaporació i s'ha incubat a 37 °C durant 24 hores.

La segona part del protocol ha consistit en, treure la placa de l'incubador i mesurar la DO₆₀₀ de cada pou. A continuació, s'han descartat els bacteris no adherits amb una micropipeta procurant evitar tocar les parets i el fons del pou. Posteriorment, s'ha realitzat una tinció afegint 300 µL d'una solució de cristall violeta 1% i s'ha incubat 15 minuts a temperatura ambient. Passat aquest període de temps, s'ha descartat el cristall violeta, s'han realitzat 3 o 4 rentats amb 300 µL PBS assegurant que no queden restes de cristall violeta no unit al biofilm. Finalment, s'ha afegit 300 µL d'etanol 70% i s'ha mesurat la DO₅₉₆. La quantitat de cristall violeta (OD₅₉₆) s'ha normalitzat a la quantitat de bacteris (OD₆₀₀).

3.7 Assaig adhesió-invasió

En aquest assaig, s'ha comprovat la capacitat de les diferents soques de MG1655 i LF82 a adherir-se i envair un cultiu de cèl·lules epitelials intestinals (Int-407).

Primerament, s'han preparat les cèl·lules que s'utilitzaran en l'assaig. En primer lloc, s'ha comprovat que el cultiu cel·lular tingui una confluència al voltant del 80-90%, s'ha rentat amb 10 mL de PBS, s'ha afegit Tripsina i s'ha deixat incubar 5 minuts a 37°C amb 5 % de CO₂ per desadherir les cèl·lules a la paret del flascó. S'ha recollit les cèl·lules desadherides en un falcon de 15 mL amb 10 mL de medi EMEM complet i s'ha centrifugat 5 minuts a 1500 rpm. D'aquest falcon, s'ha descartat el sobrenedant per decantació i s'ha resuspès el *pellet* en 10 mL de medi EMEM complet tenint en compte de disgregar i homogeneïtzar bé amb una micropipeta de 1000 µL.

Seguidament, s'ha procedit al recompte de cèl·lules. S'ha realitzat una dilució 1/5 amb colorant *trypan blue* (10 µL de cèl·lules en 40 µL de colorant) i s'ha afegit 10 µL en una cambra Neubauer. A partir l'equació 4 s'ha calculat el nombre de cèl·lules/mL.

$$\frac{cel}{mL} = \frac{R1+R2+R3}{3} \cdot 5 \cdot 9 \cdot 1000 \quad (\text{eq. 4})$$

Un cop es coneix el nombre de cèl·lules, s'ha preparat una dilució amb medi EMEM de la qual s'ha afegit 1 mL a cada pou. En aquest assaig s'han sembrat $4 \cdot 10^5$ cel/pou, així doncs s'ha aplicat la següent fórmula per determinar el volum de cèl·lules i de medi EMEM necessaris per preparar la dilució.

S'han preparat dues plaques, una per adhesió i una per invasió. S'ha afegit 1 mL de la dilució preparada anteriorment i s'ha deixat incubar 24 hores a 37°C amb 5 % CO₂. També s'han preparat cultius ON a partir de colònies en placa a tubs de vidre de tap transpirable amb 1.5 mL de medi LB s'han deixat incubar ON a 37°C.

Per una banda, s'ha mesurat la DO₆₀₀ a partir una dilució ½ dels cultius ON i s'ha preparat una dilució amb medi EMEM+10 FBS per obtenir una DO₆₀₀=0,1.

Per altra banda, s'han dut a terme 2 rentats amb 1 mL de PBS de les dues plaques i s'ha afegit 1 mL de medi EMEM amb FBS inactivat (és necessari que el medi es trobi a temperatura ambient). Seguidament, s'ha procedit amb la infecció a una MOI de 10 afegint 25 µL de la dilució preparada anteriorment i s'ha incubat 3 hores a 37°C amb 5% CO₂. Durant el període d'incubació s'ha preparat una solució de gentamicina en medi EMEM a una concentració de 100 µg/mL.

Passades les 3 hores, s'han fet 3 rentats amb 1 mL de PBS. Seguidament, només a la placa d'invasió s'ha afegit 1 mL de la solució de gentamicina, s'ha incubat 1 hora a 37°C amb 5% CO₂ i posteriorment s'han realitzat 3 rentats amb 1 mL de PBS. En les dues plaques, s'ha afegit 500 µL de tritó a cada pou, procurant de rascar els fons amb la punta i provocar bombolles (el tritó és un detergent que desenganxarà i trencarà les membranes de les cèl·lules intestinals). És important tenir en compte que les cèl·lules bacterianes no poden estar en contacte més de 30 minuts ja que al contrari, aquestes moren.

S'ha realitzat un banc de dilucions amb *Ringer* per cada pou i s'han sembrat 25 µL en plaques de LB Agar. De la placa d'adhesió s'han sembrat les dilucions 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ i de la placa d'invasió s'han sembrat la dilució directa i les 10⁻¹ i 10⁻².

Finalment, s'ha procedit al recompte de les plaques d'adhesió i invasió. S'ha considerat com a plaques vàlides aquelles en què el recompte ha estat comprès entre 15 i 150 colònies.

Per una banda, per les plaques d'adhesió s'ha calculat el nombre de bacteris adherits per cèl·lula. Per aquest motiu, a partir les unitats formadores de colònia en cada pou (CFU/well) de les diferents mostres, s'ha calculat el nombre de bacteris adherits per cèl·lula (bacteri/cel) amb l'equació 5.

$$\frac{\text{bacteri}}{\text{cel}} = \frac{\text{CFU}}{\text{well}} / 4000000 \quad (\text{eq.5})$$

Per altra banda, en la placa d'invasió s'han realitzat els següents càlculs. D'igual manera que en la placa d'adhesió, s'ha calculat les CFU/well, per seguidament, mitjançant l'equació 6, calcular el percentatge d'invasió de cada pou (% inv).

$$\% \text{ inv} = \left(\frac{\frac{\text{ufc}}{\text{well}}}{4000000} \right) \cdot 100 \quad (\text{eq. 6})$$

3.8 RT-qPCR: *iraP*

En primer lloc, s'ha dut a terme una extracció de RNA total a partir de les mostres utilitzades durant la realització d'una de les corbes de creixement en medi LB i M9+Glu. Per cada una de les 6 soques, quan la mesura de DO₆₀₀ s'ha obtingut un valor aproximat de 0.5, s'ha extret 1 mL de l'Erlenmeyer en un Eppendorf. S'ha centrifugat a màxima velocitat (13000 rpm) durant dos minuts per posteriorment descartar el sobrenedant i guardar el pellet resultant al congelador a -20° C.

Extracció de RNA

L'extracció de RNA s'ha realitzat seguint el protocol de la casa comercial invitrogen, TRIzol™ Reagent. Seguidament, s'ha realitzat un tractament amb DNases per eliminar el possible DNA genòmic que hagi pogut quedar. Finalment, mitjançant l'ús d'un Nanodrop s'ha mesurat les concentracions de RNA de cada mostra. A continuació, a la taula 1 es mostren els valors de concentració obtinguts.

Taula 1. Concentracions de RNA (ng/mL) obtingudes de l'extracció per les 6 soques estudiades en els dos medis utilitzats pel creixement (M9+glu i LB).

Medi	Soca	Concentració RNA (ng/mL)	
M9+Glu	MG1655	Wt	42.8
		$\Delta RelA$	16.8
	LF82	Wt	20.4
		$\Delta RelA$	31.2
LB	MG1655	Wt	129.1
		$\Delta RelA$	117.2
		ppGpp ⁰	192.9
	LF82	Wt	100.8
		$\Delta RelA$	176.9
		ppGpp ⁰	145.4

Reverse Transcription PCR

A continuació, s'ha realitzat una RT-PCR amb l'objectiu d'obtenir cDNA a partir de tot el RNA aïllat. Els volums dels reactius emprats per la realització de la RT-PCR s'observen a la taula 2.

Taula 2. Reactius i els volums necessaris per dur a terme la reacció de RT-PCR. Atenent que s'han realitzat 10 mostres, i en cada reacció de RT-PCR s'han utilitzat 10 μ L de RNA i 10 μ L de mix, s'ha preparat un volum total de mix de 110 μ L.

Reactius	Volum x1 reacció (μ L)	Volum total mix (10+1) (μ L)
Buffer	2	22
dNTPs	0.8	8.8
R primers	2	22
Retrotranscriptasa	1	11
Aigua DEPC	4.2	46.2

Un cop acabada la RT-PCR, s'ha procedit a diluir en el cDNA obtingut amb els volums que mostren a la taula 3.

Taula 3. Volums necessaris de cDNA i aigua DEPC per tal de realitzar una dilució 1/100 en les mostres de LB i una 1/20 per les de M9+Glu. La dilució de M9+Glu és menor, ja que com es pot observar a la taula 1 la concentració de RNAm de partida és molt menor respecte les mostres en LB.

Mostra	Dilució	V cDNA (μ L)	V H ₂ O DEPC (μ L)
LB	1/100	495	95
M9+Glu	1/20	95	5

En aquest assaig, s'ha realitzat dues qPCR simultàniament utilitzant el kit *SYBR Green real-time PCR master mix* de la casa comercial ThermoFisher SCIENTIFIC i els primers que es mostren a la taula 4. Per una banda, s'ha amplificat el gen *iraP* per la detecció indirecta de ppGpp. Per altra banda, s'ha amplificat *gapA*, gen codificant per l'enzim gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa A, involucrat en la glicòlisi que catalitzant l'oxidació i fosforilació del gliceraldehid-3-fosfat a 1,3-bifosfoglicerat (Nelson et al., 1991). S'ha utilitzat *gapA* com a gen housekeeping (GH), ja que és un gen constitutiu que presenta els mateixos nivells d'expressió en les sis soques estudiades.

Taula 4. Seqüència dels primers Forward i Reverse dels gens *iraP* i *gapA* utilitzats per la qPCR.

Seqüència Primer (5' a 3')	<i>iraP</i>	<i>gapA</i>
Forward	GCGCAAATGATCAACAGC	CAACTTACGAGCAGATCGAAGC
Reverse	CTCCGTATCGTCGTCAGGAA	AGTTTCACGAAGTTGTCGTTCA

En les anàlisis de resultats es calcula el *fold-change* (Fc) a partir dels *cycle threshold* (Ct) obtinguts en les dues qPCR. S'ha utilitzat el mètode de doble comparativa (Equació 7), mètode relatiu de mesura de l'expressió gènica on l'expressió d'un gen es representa relativa a l'expressió d'un gen *housekeeping*. (Schmittgen & Livak, 2008).

$$F_c = 2^{-(Ct_{gen\ interès} - Ct_{gen\ control})_{condició\ A} - (Ct_{gen\ interès} - Ct_{gen\ control})_{condició\ B}} \quad (eq. 7)$$

3.9 Anàlisis estadístic

Per dur a terme els anàlisis estadístics de les dades obtingudes en els diferents assajos, s'ha realitzat un t-Student o test de Wilcoxon (segons sigui indicat) amb la versió 6.04 del GraphPad Prism per Windows, GraphPad Software, www.graphpad.com.

Amb les anàlisis estadístics s'han comparat les dades obtingudes de les mutants amb la corresponent soca salvatge, per valorar l'existència de possibles diferències significatives emprant un nivell de confiança del 95%.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

Primer de tot, s'ha comprovat la mutació present en SpoT de LF82 a partir d'un alineament. En segon lloc, s'ha determinat l'efecte de les mutacions en *relA* i *spoT* en la fisiologia bacteriana en d'acord amb els resultats obtinguts en l'assaig de competència, corbes de creixement, motilitat i formació de biofilm. Seguidament, s'ha determinat i comparat la implicació de ppGpp en la capacitat d'adhesió i invasió en cèl·lules epitelials intestinal per la soca AIEC LF82 i la soca comensal MG1655. Finalment, a partir l'anàlisi de l'expressió de *iraP* mitjançant una RTqPCR s'ha estimat els nivells d'expressió de ppGpp en funció de si la soca ha estat crescuda en medi LB o medi mínim amb glucosa, alhora que s'ha comparat els resultats obtinguts de la soca salvatge amb les mutants $\Delta relA$ i ppGpp⁰ de LF82 i MG1655.

4.1 Identificació de la mutació T13N en SpoT de LF82

A partir de l'alineament realitzat amb el programa Multalin, es pot observar com les seqüències aminoacídiques de SpoT de les soques MG1655 i LF82 presenten una similitud total excepte en un aminoàcid, corresponent a la mutació T13N (Figura 5). Aquesta mutació s'expressa com a T13N, ja que té lloc en la Treonina (T) localitzada en la posició 13, esdevenint una Asparagina (N).

Per tant, l'alineament realitzat ha servit per comprovar i verificar que l'enzim SpoT de la soca LF82 presenta la mutació T13N, essent possible que causi algun efecte en l'activitat de l'enzim i els nivells de ppGpp.

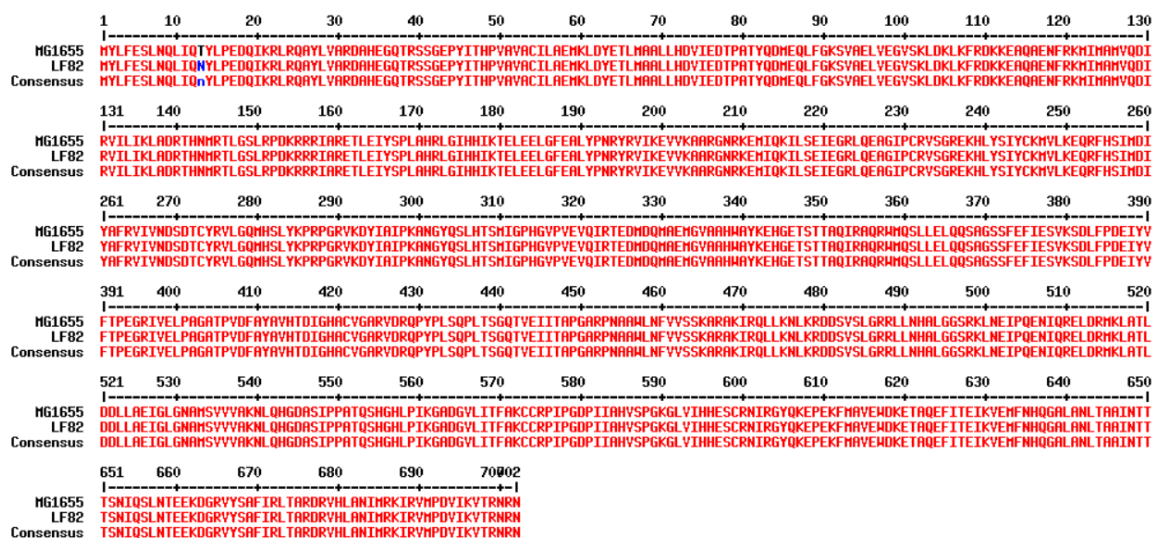


Figura 5. Alineament entre les seqüències aminoacídiques de l'enzim SpoT de les soques MG1655 i LF82 realitzat mitjançant Multalin.

4.2 Índex de competència

A la taula 5 es mostren els resultats de l'assaig de competència realitzat de les soques MG1655 i LF82 en medi LB.

Taula 5. Resultats obtinguts de l'assaig de competència. Es mostra la mitjana de l'índex de competència (CI) i la corresponent desviació estàndard (SD) per cada competència. Addicionalment, es mostra el p-value obtingut d'un anàlisi estadístic realitzat mitjançant un test de Wilcoxon. No ha sigut possible el càlcul del p-value de la competència wt/ $\Delta relA$ en MG1655 ja que són necessàries un mínim de 3 rèpliques biològiques per dur a terme l'anàlisi estadístic i en aquest cas només s'ha treballat amb dos.

	Soca	CI	SD	p-value
MG1655	Wt / $\Delta relA$	0.66	0.86	-
	Wt / ppGpp ⁰	1.04	0.76	>0.999
	$\Delta relA$ / ppGpp ⁰	0.63	0.17	0.25
LF82	Wt / $\Delta relA$	0.6	0.4	>0.999
	Wt / ppGpp ⁰	0.15	0.06	0.25
	$\Delta relA$ / ppGpp ⁰	0.09	0.04	0.25

Un índex de competència al voltant de 1 (0.5-1.5) indica que les dues soques tenen un comportament similar, per tant creixen equitativament a la placa. Un valor inferior a 0.5 indica que la soca salvatge competeix positivament enfront de les mutants, i un valor superior a 1.5 reflexa que la mutant es sobreposa per davant de la salvatge.

Es pot observar com per a totes les competències estudiades, el p-value obtingut de l'anàlisi estadístic és superior a 0.05. Com que s'ha treballat amb un nivell de confiança del 95%, no es poden considerar que les diferències obtingudes en les competències són significatives.

L'absència de diferències significatives entre els índexs de competència podria ser causada perquè s'ha treballat en medi LB, el qual és un medi ric en nutrients i que ha provocat que es donés una falta de necessitat de competència pels nutrients per part de les soques. En conseqüència, el creixement hauria estat independent de la capacitat de síntesi de ppGpp. Això suposaria que els efectes en la competència es trobessin presents només en situacions d'estrès per a la cèl·lula com podria ser la limitació de nutrients en el medi. És per això que seria convenient repetir l'experiment utilitzant en aquest cas, un medi mínim en nutrients.

A més, es podria realitzar l'assaig amb un major nombre de rèpliques per treballar una n superior, obtenint així resultats més precisos i la possible obtenció de diferències significatives.

4.3 Taxa específica de creixement

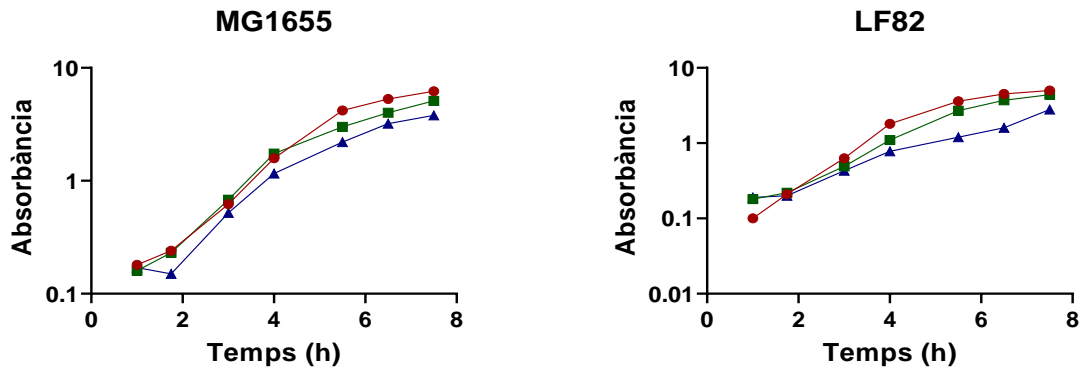
S'ha mesurat el creixement de les soques MG1655 i LF82 conjuntament amb els seus respectius mutants $\Delta relA$ i $ppGpp^0$ en medi LB i M9 amb casamino àcids (CAA) i glucosa (glu) durant un període aproximat de 8 hores. També s'ha mesurat el creixement en medi M9 amb glucosa de les soques MG1655 i LF82 amb els respectius mutants $\Delta relA$. Els mutants $ppGpp^0$ no es van mesurar en aquesta condició, ja que les soques deficitàries de $ppGpp$ no són capaces de créixer en medi mínim (Xiao et al., 1991).

Per a cada condició estudiada s'ha elaborat tres corbes, és a dir, s'han realitzat tres rèpliques biològiques. Els càlculs de resultats i anàlisis estadístics s'han efectuat de les tres rèpliques biològiques (Taula 6). Tot i això, en la figura 6 es representen només les corbes d'una de les tres rèpliques en els 3 medis analitzats.

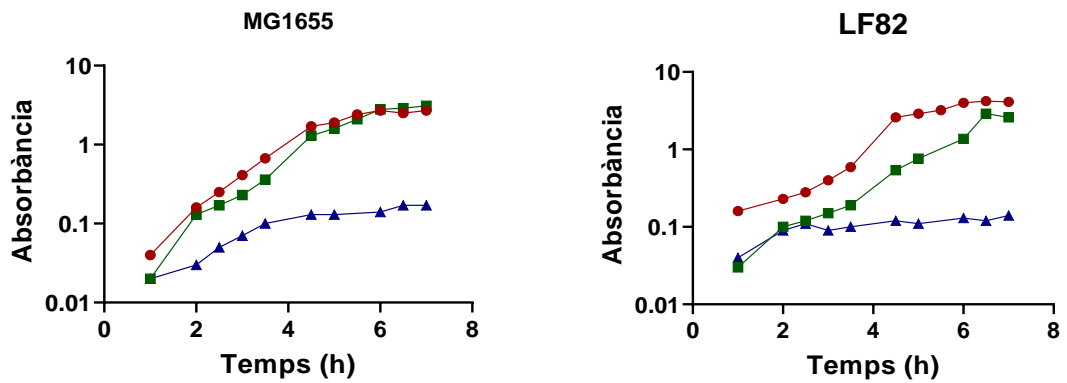
Taula 6. Resultats obtinguts de les corbes de creixement realitzades. Per cada condició, es mostra el càlcul de la mitjana de μ (h^{-1}) amb la corresponent desviació estàndard (SD) i el p-value obtingut a partir d'un anàlisi estadístic mitjançant un test t-Student.

		LB			M9+Glu+CAA			M9+Glu		
		μ	SD	p-value	μ	SD	p-value	μ	SD	p-value
MG1655	wt	0.93	0.14	-	0.77	0.16	-	0.49	0.04	-
	$\Delta relA$	1.15	0.22	0.21	0.75	0.19	0.66	0.47	0.06	0.91
	$ppGpp^0$	1.05	0.14	0.33	-	-	-	-	-	-
LF82	wt	1.09	0.15	-	0.67	0.05	-	0.51	0.14	-
	$\Delta relA$	0.86	0.19	0.18	0.61	0.16	0.55	0.6	0.1	0.59
	$ppGpp^0$	0.74	0.17	0.06	-	-	-	-	-	-

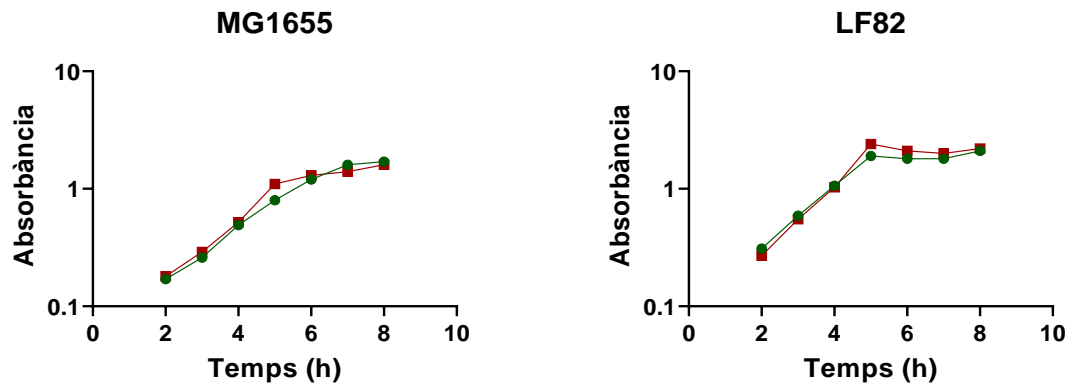
Medi LB



Medi M9+glu+CAA



Medi M9+glu



● wilde-type ■ $\Delta relA$ ▲ ppGpp⁰

Figura 6. Corbes de creixement realitzades de les soques MG1655 i LF82 i les respectives mutants en 3 condicions diferents (Medi LB; M9+glu+CAA; M9+glu).

En la corba de creixement en medi LB (Figura 6), es poden diferenciar les tres fases pròpies del creixement bacterià. En les primeres hores no s'observa quasi creixement, ja que els bacteris es troben en fase de latència, seguidament es dona el creixement exponencial de les cèl·lules fins a arribar a un estat estacionari on quasi no s'observa creixement, possiblement degut a la falta de nutrient del medi (Dey et al., 2020).

Pel que fa a les taxes de creixement obtingudes (Taula 6), un cop realitzat l'anàlisi estadístic es pot observar com els p-value obtinguts són superiors al nivell de confiança establert (0.05), per tant, no es pot afirmar que existeixin diferències significatives entre les soques per a cada un dels medis estudiats.

Tot i això, es pot observar que les soques tenen tendència a presentar una μ més elevada al ser crescudes en medis més rics en nutrients com és el medi LB, que no pas en medis pobres com el medi mínim amb glucosa que presenta els nutrients mínims per la supervivència de la cèl·lula. Per aquest motiu, s'ha realitzat un segon anàlisi estadístic per t-student per comparar les mitjanes obtingudes entre dues condicions diferents (Taula 7). Els resultats mostren que existeixen diferències significatives entre els medis, resultats esperables ja que la disponibilitat de nutrients està directament relacionada amb la taxa específica de creixement del bacteri a relació de major disponibilitat de nutrients, major taxa. (Lucija Krce et al., 2019)

Taula 7. Comparatives realitzades entre les μ obtingudes de cada medi. Es mostren els p-value d'un anàlisi estadístic mitjançant un test t-Student.

Comparativa	p-value
LB / M9+Glu+CAA	0.0125
LB / M9+Glu	0.0006
M9+Glu / CAA-M9+Glu	0.0080

4.4 Determinació de la de motilitat

S'ha determinat la motilitat en plaques Agar 2.5 % (pes/volum) en el total de les 9 rèpliques realitzades per a cada una de les 6 soques estudiades

En la figura 7 es pot observar com la soca comensal MG1655 presenta una motilitat elevada respecte als dos mutants, ja que l'àrea de l'halo format en la soca salvatge és al voltant 3 vegades superior a la formada en les mutants ($\Delta relA/ppGpp^0$) que, entre ells, no presenten diferències

significatives en la motilitat que presenten. Contràriament, LF82 s'observa un comportament invers, ja que en aquest cas és la soca salvatge que presenta una motilitat menor respecte a les mutants, que presenten una motilitat semblant a la soca MG1655 salvatge. En aquest cas, si s'observen diferències significatives entre la mutant $\Delta relA$ i $ppGpp^0$, essent la primera la que presenta una motilitat major.

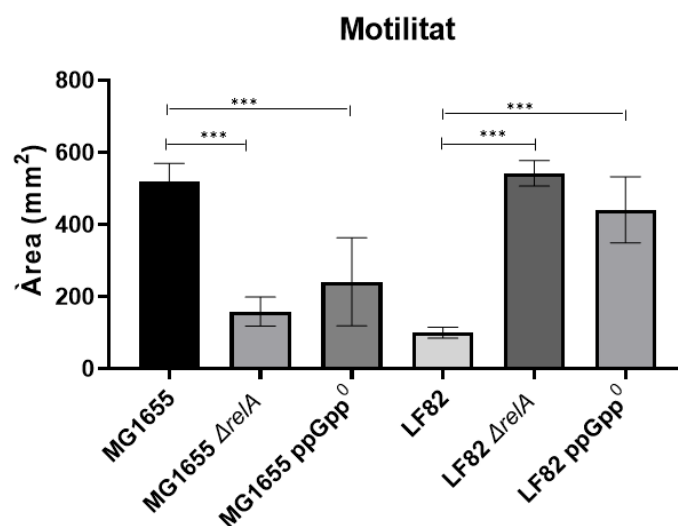


Figura 7. Gràfic de barres on es mostra la mitjana de l'àrea (mm^2) dels halos mesurats amb la corresponent desviació estàndard (SD). Per cada soca s'ha analitzat un total de 9 rèpliques, 3 biològiques i 3 tècniques. S'ha analitzat les diferències significatives (***) entre les soques mutants ($\Delta relA/ppGpp^0$) i la salvatge amb un anàlisi estadístic mitjançant un test t-Student.

Pel que fa a la soca MG165, els resultats obtinguts s'ajusten als descrits per Magnusson et. al (2007), en el qual demostren que els mutants defectius per $ppGpp^0$ presenten una deficiència en la motilitat respecte a la soca salvatge. Addicionalment, fan referència en què la deficiència en el moviment es troba relacionada amb el fet que aquests no presenten, o es trobava reduïda, la capacitat de síntesi flagel·lar.

En *E. coli*, s'ha descrit un mecanisme per a la transició entre l'estat de motilitat i l'adherència cel·lular mitjançant l'expressió de fimbries. Aquesta transició és causada pel sistema de regulació ci-di-GMP. Quan la cèl·lula entra en fase estacionària disminueix l'expressió de gens flagel·lars, amb la consegüent activació de gens reguladors de fimbries. Addicionalment, s'ha observat la elevada implicació de $ppGpp$ en aquest sistema, inhibint la motilitat quan la cèl·lula es troba en situacions d'estrès (Pesavento & Hengge, 2009). Els resultats obtinguts per la soca LF82 podrien basar-se en aquest sistema de regulació, ja que s'ha descrit la seva elevada importància en l'entrada a un estat d'adherència en les cèl·lules per a la patogènia. Podria ser que la soca salvatge es trobés en fase de creixement estacionari en el cultiu ON, promovent així la transició a un estat

d'adherència i menor mobilitat respecte les mutants. Pel que fa a les dues mutants, al presentar menors nivells de ppGpp, no podrien realitzar aquesta transició, essent menys efectiva, i provocant els elevats valors de motilitat observats.

Es podria realitzar el mateix assaig, aquest cop partint d'un cultiu en fase exponencial en comptes d'un cultiu ON, per així estudiar la motilitat de les dues soques quan aquestes expressen en major quantitat gens relacionats amb la motilitat.

4.5 Capacitat de formació de biofilm (LB i CFA)

S'ha mesurat la producció de biofilm de les soques MG1655 i LF82 i els seus respectius mutants $\Delta relA$ i ppGpp⁰ en medi LB i CFA. Per cada medi estudiat s'han realitzat dues mesures d'absorbància, una primera a 600 nm abans de realitzar la tinció del biofilm amb cristall violeta per determinar la quantitat de bacteris en cada pou, i una segona mesura a 596 nm, per quantificar el biofilm tenyit amb el cristall violeta. La determinació de la capacitat de formació de biofilm de cada soca ha consistit, per cada pou, en el càlcul del quocient del valor obtingut de la mesura realitzada a 596 nm entre el valor de la mesura a 600 nm.

S'ha de tenir en compte que abans de realitzar la divisió, és necessari restar el blanc a tots els pous en cada una de les mesures, i en els casos de les mesures a 596 nm en medi LB i CFA s'ha realitzat una dilució 1/10 i 1/5, respectivament. Per tant, en aquests dos casos ha sigut necessari multiplicar els valors de mesura obtinguts pel factor de dilució corresponent (LB:10; CFA: 5).

En la figura 8 es representen les mitjanes dels valors de $DO_{596/600}$ i les seves respectives desviacions estàndards (SD) de les 9 rèpliques per a cada una de les soques estudiades.

En primer lloc, al comparar les soques salvatges de LF82 i MG1655, s'observa un increment significatiu en la formació de biofilm per part de LF82. Aquests resultats són els esperats, ja que d'acord amb la literatura, la capacitat de formació de biofilm és superior en soques AIEC respecte a soques no AIEC, característica la qual estaria relacionada amb el seu fenotip patogen (Martinez-Medina et al., 2009).

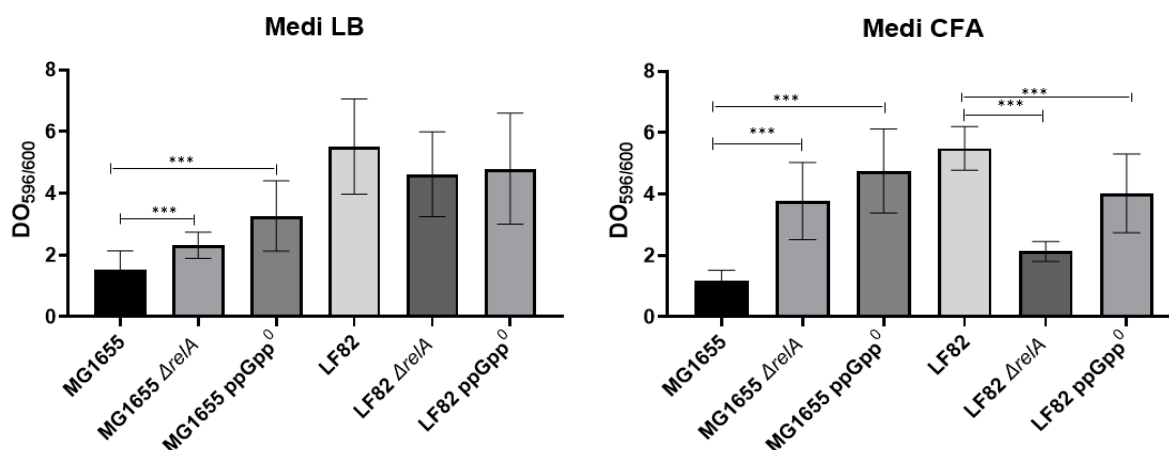


Figura 8. Gràfics de barres de l'assaig de formació de biofilm de les soques estudiades en medi LB (A) i CFA (B). Es mostren les mitjanes obtingudes dels valors de OD_{596/600} amb les respectives desviacions estàndard (SD), s'ha treballat amb un total de 9 rèpliques per a cada soca, 3 biològiques i 3 tècniques. S'ha analitzat les diferències significatives (***) entre les soques mutants ($\Delta relA/ppGpp^0$) i la salvatge amb un anàlisi estadístic mitjançant un test t-Student.

En referència al comportament de la soca MG1655, aquesta presenta una tendència similar en la capacitat de formació de biofilm en els dos medis estudiats, observant-se diferències significatives entre la soca salvatge i les mutants. La soca salvatge presenta una menor capacitat de formació de biofilm respecte a les dues mutants, essent la mutant ppGpp⁰ la que presenta major capacitat. Aquests resultats concorden amb el descrit en l'estudi de Balzen & McLean (2002), on també observen un augment en la formació de biofilm dels seus mutants $\Delta relA/\Delta SpoT$ (ppGpp⁰) en un medi ric en nutrients, equivalent als medis emprats en aquest assaig. En canvi, aquest comportament no l'observen en medi mínim i apunten a la importància d'aquests gens en la formació de biofilm en la resposta enfront l'estrès d'*E. coli*.

Finalment, pel que fa a la soca LF82, no s'observen diferències significatives entre la soca salvatge i les mutants crescudes en medi LB. Tot i això, en medi CFA s'observen diferències significatives essent la soca salvatge i la mutant $\Delta relA$ les que presenten una major i menor capacitat de formació de biofilm, respectivament.

Segons la bibliografia cercada, la via σ^E està involucrada en la patogènia de la soca LF82 a nivell de la regulació de l'adherència i invasió en cèl·lules epitelials intestinals, així com en la formació de biofilm (Chassaing et al., 2015). El σ^E és activat per dos mecanismes: l'acumulació de precursors de porines en la membrana externa i l'increment dels nivells de ppGpp al entrar en la fase estacionària del creixement (Mutalik et al., 2009). La relació directe entre σ^E i ppGpp, podria explicar els resultats obtinguts de LF82 en medi CFA, però no s'observaria aquest fet en medi LB.

4.6 Determinació de la capacitat adherent invasiva

S'ha mesurat el nombre de bacteris adherits per cèl·lula i el percentatge d'invasió de MG1655 i LF82 i els seus respectius mutants $\Delta relA$ i $ppGpp^0$ en un cultiu de cèl·lules epitelials intestinals. Tant de la placa d'adhesió com la d'invasió, el valor de cada mostra es representa relatiu al valor obtingut de la soca salvatge LF82. Finalment, s'ha calculat les mitjanes de les rèpliques realitzades, representades a la figura 9.

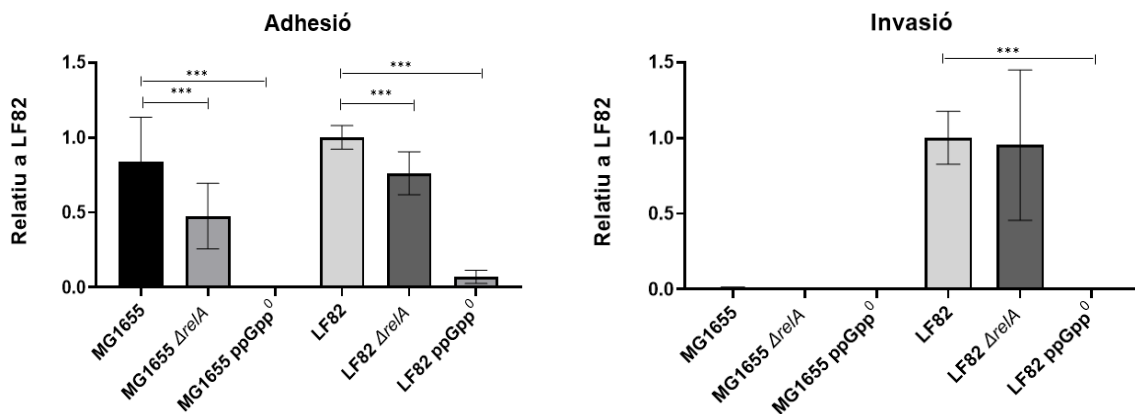


Figura 9. Gràfic de barres on es mostren les mitjanes obtingudes de les diferents soques relatives a LF82 wt amb la corresponent desviació estàndards (SD) tant de la placa d'adhesió com d'invasió. S'han realitzat 5 rèpliques de cada mostra exceptuant els mutants $\Delta relA$ en que només s'han realitzat 3. S'ha analitzat les diferències significatives amb un anàlisi estadístic mitjançant un test t-Student.

Pel que fa als resultats obtinguts en la placa d'adhesió, es pot observar com tant per MG1655 com LF82 tenen la capacitat d'adherir-se a les cèl·lules epitelials intestinals, no es pot afirmar que LF82 presenti més adhesió, ja que no s'observen diferències significatives entre les dues soques salvatges. En referència a les mutants $\Delta relA$ de ambdues soques, aquestes presenten una disminució en l'adhesió degut a les diferències significatives observades. Pel que fa a les mutants $ppGpp^0$, s'observa una pèrdua completa de la capacitat d'adhesió en MG1655, i pràcticament completa en LF82 existint, però, diferències significatives entre les dues mutants $ppGpp^0$.

Per altra banda, els resultats de la placa d'invasió es pot veure l'existència d'una capacitat invasiva de LF82, al contrari que MG1655 que no presenta aquesta capacitat. No s'observen diferències significatives entre la soca salvatge i la mutant $\Delta relA$ en LF82, per tant, no es pot afirmar que hi hagi una variació en la invasió de les dues soques. Contràriament, la mutant $ppGpp^0$ perd totalment la capacitat d'invasió, de la mateixa manera que succeïa en l'adherència de la soca.

Així doncs, es pot afirmar que la soca LF82 presenta una capacitat adherent-invasiva en cèl·lules epitelials intestinals, fet que s'esperava observar ja que aquesta soca correspon a un AIEC, que es caracteritzen per tenir aquest fenotip (Palmela et al., 2018). Per altra banda, els resultats obtinguts de la soca comensal MG1655 també han sigut els esperables, ja que s'ha observat només la capacitat d'adhesió, ja que aquesta soca també es troba adherida a les cèl·lules epitelials intestinals formant part de la microbiota, sense envair-les, resultant així beneficiària per l'hoste (Mokrzycki et al., 2018).

Altrament, es pot afirmar que ppGpp està directament implicat en el procés d'adhesió i invasió en AIEC, ja que no s'ha observat aquestes dues capacitats en les mutants ppGpp⁰, incapaces de sintetitzar aquest nucleòtid. D'igual manera succeeix en soques com la *E. coli* enterohemorràgica (EHEC), soca que comparteix el fenotip virulent cap a les cèl·lules epitelials intestinals amb AIEC, en què els nivells de ppGpp influeixen en l'expressió de gens implicats en l'adherència d'aquesta soca per colonitzar les cèl·lules intestinals (Spira & Ospino, 2020).

4.7 Determinació dels nivells d'expressió de *iraP*

IraP és un polipèptid anomenat proteïna anti-adaptadora, la seva principal funció és l'estabilització del factor sigma alternatiu, subunitat de la RNA polimerasa encarregada de la transcripció de gens involucrats en respostes d'estrès i missatgers secundaris del metabolisme (Bougourd & Gottesman, 2007). Dintre de la gran varietat de mecanismes i dianes que té ppGpp, s'ha descrit una activació directa del promotor de *iraP* (Girard et al., 2017). Per tant, s'ha utilitzat els nivells d'expressió de RNA missatger (RNAm) de *iraP*, per realitzar una detecció indirecta dels nivells de ppGpp per les diferents soques estudiades.

A partir del Ct obtinguts en les qPCR, es calcula el *fold-change* de les soques MG1655 i LF82 i els seus respectius mutants $\Delta relA$ en les dues condicions estudiades, medi M9 amb glucosa i medi LB. En aquest cas, cada soca es representa respecte a la seva soca salvatge en medi LB (Figura 10).

A la figura 10 es pot observar que la soca MG1655 no presenta un canvi en l'expressió de *iraP* en funció del medi pel creixement de les soques, M9 o LB. En tots dos medis, la mutant $\Delta relA$ presenta una disminució significativa en els nivells d'expressió al voltant d'un terç respecte la soca salvatge. Els resultats obtinguts s'ajusten als esperats ja que la mutant $\Delta relA$ només presenta una de les sintetases de ppGpp, SpoT; esperant així, que no sigui capaç de sintetitzar els mateixos nivells de ppGpp respecte a la soca salvatge, que manté les dues sintetases i, per tant, provocant que no hi hagi hagut menor expressió de *iraP* per part de la mutant deficient per *relA*.

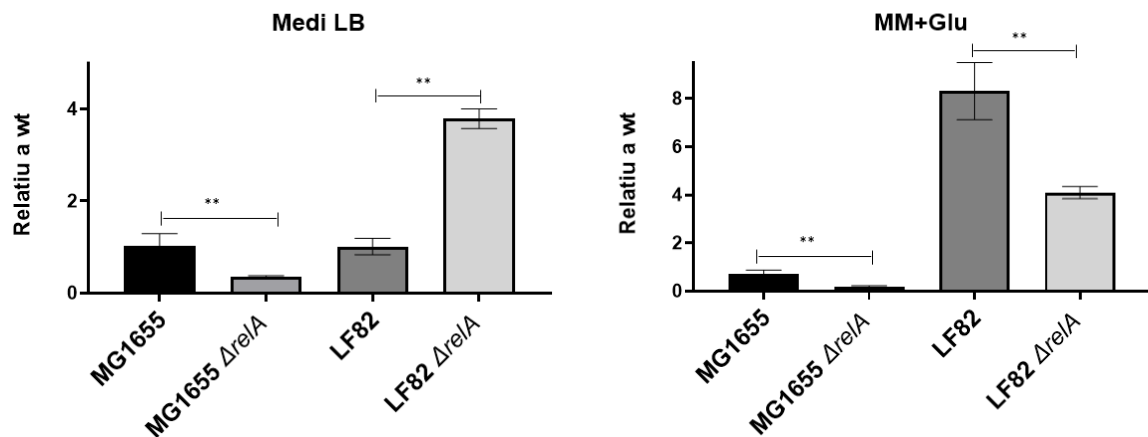


Figura 10. Mitjanes dels *fold-change* obtinguts de la qPCR per *iraP* de les soques MG1655 i LF82 i els respectius mutants, en les dues condicions estudiades (Medi LB i M9+glu); alhora que es mostren les respectives desviacions estàndards (SD). Els nivells d'expressió de *iraP* per cada soca es representen relatius a la soca wilde-type, en cada casa. S'ha analitzat les diferències significatives (**; p-value<0.001) amb un test estadístic t-student.

Pel que fa a la soca LF82, s'observa un comportament diferent en funció del medi. Per una banda, en medi LB s'observa un augment de l'expressió d'*iraP* en la mutant $\Delta relA$ respecte a la soca salvatge. En canvi, en medi mínim amb glucosa la soca salvatge sembla augmentar molt els nivells de ppGpp respecte al creixement en LB (fins a 8 vegades superior), mentre que en absència de *relA* l'increment és menor (4 vegades).

Quan la cèl·lula necessita regular els nivells de ppGpp en un medi ric en nutrients, s'ha descrit que la síntesi recau majoritàriament per part de RelA, mentre que SpoT exerceix el rol d'hidròlisi tot i presentar els dos dominis funcionals (Fernández-Coll & Cashel, 2020). Aquest mecanisme de regulació podria explicar els resultats obtinguts de la soca MG1655 en medi LB, on s'observen majors nivells de ppGpp de la soca salvatge respecte a la mutant $\Delta RelA$, ja que només s'expressa *spoT*. Aquest fet no s'observaria en LF82, on és la mutant $\Delta RelA$ que presenta majors nivells de ppGpp respecte a la soca salvatge. Aquests resultats podrien explicar-se per la mutació en el domini hidrolasa de SpoT en LF82 que podria provocar una disminució en l'activitat del domini hidrolasa (Ferenci et al., 2011). Així doncs, l'enzim SpoT de la mutant $\Delta RelA$ s'encarregaria de la síntesi i hidròlisi simultània, però a causa de la mutació seria possible que la síntesi es trobés incrementada respecte la hidròlisi i, per tant, els nivells de ppGpp fossin més alts que la soca salvatge.

Amb relació al medi mínim amb glucosa, no es dona la situació anteriorment esmentada ja que en aquest cas es tracta d'un medi pobre en aminoàcids, i com ja s'ha esmentat anteriorment la síntesi de ppGpp per part de *relA* respon a la falta d'aminoàcids. Per tant, en aquest medi, s'observa majors nivells de ppGpp en la soca salvatge ja que aquesta presenta l'enzim RelA, el qual sintetitzaria ppGpp al trobar-se en un medi amb falta d'aminoàcids. En canvi, per la mutant $\Delta relA$, s'ha descrit que SpoT respon més aviat a la falta d'àcids grassos o glucosa, nutrient el qual conté el medi utilitzat per créixer les soques en aquesta condició. (Wu & Xie, 2009).

Tot i això, les hipòtesis teoritzades a partir dels resultats obtinguts en aquest assaig no es podrien considerar concloents, ja que només s'ha realitzat una rèplica biològica. La desviació estàndard observada ve donada per la realització de tres rèpliques tècniques en la qPCR. Seria necessari la realització de dues rèpliques biològiques més per analitzar els resultats obtinguts i valorar si es mantenen les conclusions establertes.

5. CONCLUSIONS

According to the results, the conclusions of this project are:

-The deletion of *relA* and *spoT* has no effect over competition of nutrients or growth rate in either MG1655 or LF82 strains.

-In the MG1655 strain, mutations in *relA* and *spoT* negatively affect its motility. In contrast, both mutant strains of LF82 exhibit increased motility compared to the wild type.

-According to biofilm formation, there is a significant increase in both mutants compared to the wild-type strain MG1655, with the ppGpp⁰ mutant exhibiting a higher capacity in enriched medium LB and CFA. However, a significant decrease is observed in the LF82 mutants.

-Therefore, the role of ppGpp in the regulation of motility and biofilm formation capacity acts different between MG1655 and LF82 strains, suggesting this regulation would depend on whether the strain is pathogenic or not.

-The LF82 ppGpp-deficient strain shows a loss in the ability to adhere and invade intestinal epithelial cells, suggesting the necessary presence of ppGpp nucleotide for the adherent invasive phenotype in this AIEC strain.

-The ppGpp levels of the wild-type strain are higher than the Δ *relA* mutant in MG1655 for both conditions studied. Meanwhile, in strain LF82, a difference in ppGpp level is observed between the two conditions studied. This suggests a difference in the expression and regulation of ppGpp between the two strains, as well as in how they respond to ppGpp.

6. BIBLIOGRAFIA

- Adak, A., & Khan, M. R. (2019). An insight into gut microbiota and its functionalities. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 76, Issue 3, pp. 473–493). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2943-4>
- ANEXO I: Clasificación de microorganismos según Grupos de Riesgo (OMS, Manual de. (n.d.).
- Atkinson, G. C., Tenson, T., & Hauryliuk, V. (2011). The RelA/SpoT Homolog (RSH) superfamily: Distribution and functional evolution of ppgpp synthetases and hydrolases across the tree of life. *PLoS ONE*, 6(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023479>
- Bai, K., Yan, H., Chen, X., Lyu, Q., Jiang, N., Li, J., & Luo, L. (2021). *The Role of RelA and SpoT on ppGpp Production, Stress Response, Growth Regulation, and Pathogenicity in Xanthomonas campestris pv. campestris*.
- Balzer, G. J., & McLean, R. J. C. (2002). The stringent response genes *relA* and *spoT* are important for *Escherichia coli* biofilms under slow-growth conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(7), 675–680. <https://doi.org/10.1139/w02-060>
- Battesti, A., & Bouveret, E. (2006). Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Molecular Microbiology*, 62(4), 1048–1063. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05442.x>
- Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., & Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. In *Science* (Vol. 277, Issue 5331, pp. 1453–1462). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.277.5331.1453>
- Bougdour, A., & Gottesman, S. (2007). ppGpp regulation of RpoS degradation via anti-adaptor protein IraP. In *PNAS* (Vol. 104, Issue 31).
- Chassaing, B., Garénaux, E., Carriere, J., Rolhion, N., Guérardel, Y., Barnich, N., Bonnet, R., & Darfeuille-Michaud, A. (2015). Analysis of the σ E regulon in Crohn's disease-associated *Escherichia coli* revealed involvement of the *waaWVL* operon in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 197(8), 1451–1465. <https://doi.org/10.1128/JB.02499-14>
- Chloé Mirsepasi-Lauridsen, H., Vallance, B. A., Krogfelt, K. A., & Petersen, A. M. (2019a). *Escherichia coli Pathobionts Associated with Inflammatory Bowel Disease*. <https://doi.org/10.1128/CMR>
- Chloé Mirsepasi-Lauridsen, H., Vallance, B. A., Krogfelt, K. A., & Petersen, A. M. (2019b). *Escherichia coli Pathobionts Associated with Inflammatory Bowel Disease*. <https://doi.org/10.1128/CMR>
- Corpet, F. (n.d.). *Nucleic Acids Research Multiple sequence alignment with hierarchical clustering* (Vol. 16).
- Dalebroux, Z. D., Svensson, S. L., Gaynor, E. C., & Swanson, M. S. (2010). ppGpp Conjures Bacterial Virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(2), 171–199. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00046-09>
- Dalebroux, Z. D., & Swanson, M. S. (2012). PpGpp: Magic beyond RNA polymerase. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 10, Issue 3, pp. 203–212). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2720>
- Delmas, J., Gibold, L., Faïs, T., Batista, S., Lereboure, M., Sinel, C., Vazeille, E., Cattoir, V., Buisson, A., Barnich, N., Dalmaso, G., & Bonnet, R. (2019). Metabolic adaptation of adherent-invasive *Escherichia coli* to exposure to bile salts. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38628-1>
- Dey, A., Bokka, V., & Sen, S. (2020). Dependence of bacterial growth rate on dynamic temperature changes. *IET Systems Biology*, 14(2), 68–74. <https://doi.org/10.1049/iet-syb.2018.5125>

- Ferenci, T., Galbiati, H. F., Betteridge, T., Phan, K., & Spira, B. (2011). The constancy of global regulation across a species: The concentrations of ppGpp and RpoS are strain-specific in *Escherichia coli*. *BMC Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-62>
- Fernández-Coll, L., & Cashel, M. (2020). Possible Roles for Basal Levels of (p)ppGpp: Growth Efficiency Vs. Surviving Stress. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.592718>
- Girard, M. E., Gopalkrishnan, S., Grace, E. D., Halliday, J. A., Gourse, R. L., & Herman, C. (2017). *DksA and ppGpp Regulate the S Stress Response by Activating Promoters for the Small RNA DsrA and the Anti-Adapter Protein IraP*. <https://doi.org/10.1128/JB>
- Greuter, T., Manser, C., Pittet, V., Vavricka, S. R., & Biedermann, L. (2020). Gender Differences in Inflammatory Bowel Disease. In *Digestion* (Vol. 101, Issue Suppl1, pp. 98–104). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000504701>
- Jellbauer, S., & Raffatellu, M. (2014). An intestinal arsonist: Pathobiont ignites IBD and flees the scene. In *Gut* (Vol. 63, Issue 7, pp. 1034–1035). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-305589>
- Krce, L., Sprung, M., Maravic, A., & Aviani, I. (2019). A simple interaction-based *E. coli* growth model. *Physical Biology*, *16*.
- Lee, J. B., Kim, S. K., & Yoon, J. W. (2022). Pathophysiology of enteropathogenic *Escherichia coli* during a host infection. In *Journal of Veterinary Science* (Vol. 23). Korean Society of Veterinary Science. <https://doi.org/10.4142/JVS.21160>
- Magnusson, L. U., Farewell, A., & Nyström, T. (2005). ppGpp: A global regulator in *Escherichia coli*. In *Trends in Microbiology* (Vol. 13, Issue 5, pp. 236–242). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.03.008>
- Magnusson, L. U., Gummesson, B., Joksimović, P., Farewell, A., & Nyström, T. (2007). Identical, independent, and opposing roles of ppGpp and DksA in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *189*(14), 5193–5202. <https://doi.org/10.1128/JB.00330-07>
- Martinez-Medina, M., Naves, P., Blanco, J., Aldegue, X., Blanco, J. E., Blanco, M., Ponte, C., Soriano, F., Darfeuille-Michaud, A., & Garcia-Gil, L. J. (2009). Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC). *BMC Microbiology*, *9*. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-202>
- Mechold, U., Potrykus, K., Murphy, H., Murakami, K. S., & Cashel, M. (2013). Differential regulation by ppGpp versus pppGpp in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, *41*(12), 6175–6189. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt302>
- Miquel, S., Peyretailade, E., Claret, L., de Vallée, A., Dossat, C., Vacherie, B., Zineb, E. H., Segurens, B., Barbe, V., Sauvanet, P., Neut, C., Colombel, J. F., Medigue, C., Mojica, F. J. M., Peyret, P., Bonnet, R., & Darfeuille-Michaud, A. (2010). Complete genome sequence of crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* strain LF82. *PLoS ONE*, *5*(9), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012714>
- Mokrzycki, M. E., Leatham-Jensen, M., Steffensen, J. L., Zhang, Y., Krogfelt, K. A., Caldwell, M. E., Conway, T., & Cohen, P. S. (2018). A simple in vitro gut model for studying the interaction between *Escherichia coli* and the intestinal commensal microbiota in cecal mucus. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(24). <https://doi.org/10.1128/AEM.02166-18>
- Molodtsov, V., Sineva, E., Zhang, L., Huang, X., Cashel, M., Ades, S. E., & Murakami, K. S. (2018). Allosteric Effector ppGpp Potentiates the Inhibition of Transcript Initiation by DksA. *Molecular Cell*, *69*(5), 828–839.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.035>
- Mutalik, V. K., Nonaka, G., Ades, S. E., Rhodius, V. A., & Gross, C. A. (2009). Promoter strength properties of the complete sigma E regulon of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology*, *191*(23), 7279–7287. <https://doi.org/10.1128/JB.01047-09>

- Nelson, K., Whittam, T. S., & Selander, R. K. (1991). Nucleotide polymorphism and evolution in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (gapA) in natural populations of *Salmonella* and *Escherichia coli* (PCR/substitution rates/codon bias/enzyme electrophoresis/gene phylogeny). In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Vol. 88). <https://www.pnas.org>
- Ottman, N., Smidt, H., de Vos, W. M., & Belzer, C. (2012). The function of our microbiota: who is out there and what do they do? In *Frontiers in cellular and infection microbiology* (Vol. 2, p. 104). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00104>
- Pakbin, B., Brück, W. M., & Rossen, J. W. A. (2021). Virulence factors of enteric pathogenic *Escherichia coli*: A review. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 18). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22189922>
- Palmela, C., Chevarin, C., Xu, Z., Torres, J., Sevrin, G., Hirten, R., Barnich, N., Ng, S. C., & Colombel, J. F. (2018). Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. In *Gut* (Vol. 67, Issue 3, pp. 574–587). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314903>
- Paula Leighton. (2023, June 26). *Laboratorios científicos usan demasiados desechos plásticos*. Sci Dev Net.
- Pesavento, C., & Hengge, R. (2009). Bacterial nucleotide-based second messengers. *ELSEVIER*, 1–7.
- Sanchez-Vazquez, P., Dewey, C. N., Kitten, N., Ross, W., & Gourse, R. L. (2019). Genome-wide effects on *Escherichia coli* transcription from ppGpp binding to its two sites on RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(17), 8310–8319. <https://doi.org/10.1073/pnas.1819682116>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Spira, B., & Ospino, K. (2020). Diversity in *E. coli* (p)ppGpp Levels and Its Consequences. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01759>
- Steinchen, W., & Bange, G. (2016). The magic dance of the alarmones (p)ppGpp. In *Molecular Microbiology* (Vol. 101, Issue 4, pp. 531–544). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/mmi.13412>
- Swiecicki, J. M., Sliusarenko, O., & Weibel, D. B. (2013). From swimming to swarming: *Escherichia coli* cell motility in two-dimensions. *Integrative Biology (United Kingdom)*, 5(12), 1490–1494. <https://doi.org/10.1039/c3ib40130h>
- Wolz, C., Geiger, T., & Goerke, C. (2010). The synthesis and function of the alarmone (p)ppGpp in firmicutes. In *International Journal of Medical Microbiology* (Vol. 300, Issues 2–3, pp. 142–147). <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.08.017>
- Wu, J., & Xie, J. (2009). Magic spot: (p) ppGpp. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 220, Issue 2, pp. 297–302). <https://doi.org/10.1002/jcp.21797>
- Xiao, H., Kalman, M., Ikehara, K., Zemel, S., Glaser, G., & Cashel, M. (1991). Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of relA null mutants can be eliminated by spoT null mutations. *Journal of Biological Chemistry*, 266(9), 5980–5990. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)67694-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)67694-5)
- Xu, Y., Qian, W., Huang, L., Wen, W., Li, Y., Guo, F., Zhu, Z., Li, Z., Gong, J., Yu, Z., Zhou, Y., Lu, N., Zhu, W., & Guo, Z. (2023). Crohn's disease-associated AIEC inhibiting intestinal epithelial cell-derived exosomal let-7b expression regulates macrophage polarization to exacerbate intestinal fibrosis. *Gut Microbes*, 15(1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2193115>