

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Proteínas de unión al nucleóide en *Streptococcus pneumoniae*
como nuevas dianas de antibacterianos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Antonio Alexandre de Vasconcelos Júnior

DIRIGIDA POR

Adela María González de la Campa

Mónica Amblar Esteban

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

Proteínas de unión al nucleóide en *Streptococcus pneumoniae*
como nuevas dianas de antibacterianos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Antonio Alexandre de Vasconcelos Júnior

Directoras

Adela María González de la Campa

Mónica Amblar Esteban

Madrid, 2024

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a Dios pues este logro no habría sido posible sin tu guía constante y tu gracia inquebrantable. En especial, agradezco a mi mujer Lorena que estuvo conmigo durante todo el difícil camino hasta aquí, por su apoyo, su amor y cariño. ¡Esta tesis también es tuya! Y claro, a mi padre Alexandre y mi madre Marilac por todo el apoyo y amor incondicional, aunque estando a miles de kilómetros de distancia. No podría dejar de agradecer también a mis hermanas LÍlian, Kamilla y Bruna por todo el apoyo y cariño. A mis suegros y cuñados que brindaron comprensión y ánimo en cada paso del camino para superar las dificultades a lo largo de esta tesis.

A lo largo de este arduo pero gratificante viaje académico, me encuentro profundamente agradecido por el apoyo y la colaboración de muchas personas que han contribuido de manera significativa a la realización de esta tesis doctoral. Quiero, expresar mi sincera gratitud a mis directoras de tesis, Dra. Adela González de la Campa, jefa de la Unidad de Genética Bacteriana del ISCIII, por brindarme la oportunidad de realizar la tesis en su laboratorio, por su guía experta, dedicación y sobre todo paciencia. Y a la Dra. Mónica Amblar Esteban. Sus conocimientos y sabios consejos han sido fundamentales en cada etapa de este proceso de investigación y, sus ideas y sugerencias enriquecieron este trabajo.

A Dra María José Ferrándiz, por las sugerencias y ayuda en muchos experimentos. A mi colega de laboratorio MÍriam García López por la ayuda en la poyata. Su amistad, apoyo y el intercambio de conocimientos fueron cruciales para abordar los desafíos y superar obstáculos. A Noelia, técnica del laboratorio, por la ayuda en los experimentos para concluir una etapa importante en el laboratorio. A Susana, del ISCIII, por sus palabras de ánimo y amistad que me ayudaron durante este trabajo.

Al Dr. Pablo Hernández, del Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas, por la realización del análisis de los datos de RNA-Seq que se presentan en este trabajo.

Al Dr. Diego Megías, de la Unidad de Microscopía Confocal del ISCIII, por su contribución con la adquisición de las imágenes de microscopía confocal. Mi agradecimiento se extiende a todos los profesionales del ISCIII que, de alguna manera, contribuyeron para realización de esta tesis.

Por último, pero no menos importante, agradezco a Michelle, Fernando y Ana, por la confianza y el apoyo que fueron muy importantes en los momentos en que yo no tenía donde alojarme.

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a la concesión de una beca del “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq) de Brasil

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	x
SUMMARY	xii
INTRODUCCIÓN	1
1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	2
1.1 Aspectos históricos	2
1.2 Características generales	2
1.3 Importancia clínica	3
1.4 La resistencia a los antimicrobianos en SPN	4
2 <i>Propiedades topológicas y superenrollamiento del DNA</i>	6
3 <i>Organización topológica del nucleoide bacteriano</i>	9
3.1 DNA topoisomerasas	11
3.1.1 DNA topoisomerasas de tipo I	12
3.1.2 DNA topoisomerasas de tipo II	13
3.2 Proteínas de unión al nucleoide (NAPs)	15
3.2.1 NAPs, disparidad de tipos y funciones	15
3.2.2 NAPs y la fisiología bacteriana	17
4 <i>NAPs de S. pneumoniae, un relevante campo de estudio</i>	18
OBJETIVOS	21
MATERIALES Y MÉTODOS	23
1 <i>Cepas bacterianas y plásmidos</i>	24
2 <i>Medios de cultivo</i>	25
3 <i>Enzimas y Reactivos</i>	26
3.1 Enzimas	26
3.2 Reactivos	26
3.2.1 Antibióticos	26
3.2.2 Productos químicos	26
3.2.3 Oligonucleótidos	27
4 <i>Cultivo de bacterias y curvas de crecimiento</i>	29
5 <i>Transformación genética</i>	30
6 <i>Aislamiento y manipulación del DNA</i>	31
6.1 Extracción de DNA cromosómico	31
6.2 Purificación de plásmidos	31
6.3 Electroforesis del DNA	32
6.4 Amplificación de fragmentos mediante PCR	32
6.5 Digestión y ligación de fragmentos de PCR	33
7 <i>Inactivación de genes por el mecanismo de inserción/delección</i>	33

8	<i>Construcción de plásmidos para purificar StaR y Spr0488</i>	35
8.1	Construcción del pET28a- <i>staR</i>	35
8.2	Construcción del pET28b- <i>spr0488</i>	35
9	<i>Ensayos de análisis de Sc</i>	35
9.1	Electroforesis bidimensional	35
9.2	Determinación de la densidad de Sc (σ)	36
10	<i>Purificación de proteínas</i>	37
10.1	Hiperproducción y purificación de Topo I y Girasa (GyrA ₂ GyrB ₂)	37
10.2	Hiperproducción y purificación de StaR	38
10.3	Hiperproducción y purificación de Spr0488	39
11	<i>Electroforesis SDS-PAGE</i>	40
12	<i>Análisis de proteínas por "Western blot"</i>	40
13	<i>Purificación de anticuerpos</i>	41
13.1	Para ensayos de "Western blot"	41
13.2	Anticuerpos para ensayos de Col-P	41
14	<i>Cuantificación de proteínas</i>	42
15	<i>Digestión de Spr0488 con trombina</i>	42
16	<i>Cromatografía de exclusión por tamaño</i>	43
17	<i>Ensayos de actividad de topoisomerasas</i>	44
17.1	Ensayos de actividad de Topo I	44
17.2	Ensayos de actividad de Girasa	45
18	<i>Ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA)</i>	45
19	<i>Ensayos de Co-inmunoprecipitación (Co-IP) in vitro</i>	46
20	<i>Ensayos de Co-inmunoprecipitación (Co-IP) in vivo</i>	47
21	<i>Manipulación de RNA y preparación de librerías para RNA-Seq</i>	48
21.1	Extracción de RNA total	48
21.2	Construcción de librerías y análisis de RNA-Seq	48
22	<i>Microscopía confocal e inmunofluorescencia</i>	49
23	<i>Programas informáticos y análisis estadístico</i>	49

RESULTADOS51

CAPÍTULO I. ESTUDIO FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA StaR52

1	<i>Cepa deficiente en StaR y cepas sobreproductoras</i>	52
1.1	Cepa Δ <i>staR</i>	52
1.2	Cepa Δ <i>staRP</i> _{Zn} <i>staR</i>	53
1.3	Cepa Δ <i>staR</i> [pLS1R- <i>staR</i>]	54
2	<i>Caracterización funcional de StaR</i>	55
2.1	StaR como miembro de la familia de proteínas NA37	55
2.2	Los niveles de StaR afectan la susceptibilidad a la NOV	56
2.3	StaR afecta el nivel de Sc bajo tratamiento con NOV	61
2.4	La alteración de los niveles de StaR no induce cambios globales en el transcriptoma	63
2.5	StaR es una proteína de unión a nucleóide (NAP)	66
2.6	Purificación de StaR	68
2.7	StaR activa específicamente la Topo I de <i>S. pneumoniae</i>	69
2.8	Interacción física entre StaR y Topo I	72

CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE OTRAS PROTEÍNAS DEL NUCLEOIDE DE SPN	74
1 Construcción de las cepas $\Delta spr0488$, $\Delta rapZ$ y $\Delta yhbY$	74
1.1 Cepa $\Delta spr0488$	74
1.2 Cepa $\Delta rapZ$	75
1.3 Cepa $\Delta yhbY$	75
2 Construcción de las cepas sobreproductoras de $Spr0488$, $RapZ$ y $YhbY$	77
3 Efecto de los niveles de $RapZ$, $YhbY$ y $Spr0488$ en el crecimiento de SPN	78
3.1 La delección de $spr0488$ aumenta la susceptibilidad a NOV, pero no la delección de $rapZ$ o $yhbY$	78
3.2 La sobreexpresión de $rapZ$, $yhbY$ y $spr0488$ afecta el crecimiento de SPN	80
4 Análisis funcional de la proteína $Spr0488$	82
4.1 $Spr0488$ presenta características similares a proteínas de unión a ácidos nucleicos	82
4.2 La sobreexpresión de $spr0488$ no induce cambios globales en el transcriptoma de SPN	83
4.3 Hiperproducción y purificación de la proteína $Spr0488$	87
4.4 $Spr0488$ activa la relajación del DNA por parte de Topo I	89
4.5 Digestión con trombina de $Spr0488$	90
4.6 $Spr0488$ es una proteína dimerica	91
4.7 Actividad de $Spr0488$ digerida con trombina	94
4.8 $Spr0488$ es una proteína de unión a DNA bicatenario	95
DISCUSIÓN	98
CONCLUSIONES	107
BIBLIOGRAFÍA	109
ANEXOS	122

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución temporal de los aislados de SPN resistentes a antimicrobianos en Europa (excluido el Reino Unido) por grupo antimicrobiano.....	5
Figura 2. Esquema representativo de los tipos de Sc.	8
Figura 3. Esquema del paso principal del mecanismo de acción de la Topo I y de la DNA Girasa.	12
Figura 4. Esquema de la inactivación de genes por el método de inserción/delección.....	34
Figura 5. Esquema de la distribución de topoisómeros del plásmido pLS1 tras electroforesis bidimensional.	36
Figura 6. Estructura genética de la cepa $\Delta staRP_{Zn} staR$ derivada de $\Delta staR$	54
Figura 7. Clonaje de <i>staR</i> en pLS1ROM.	55
Figura 8. Comparación entre StaR de SPN y Yejk de <i>E. coli</i>	56
Figura 9. Efecto de la ausencia de StaR en la susceptibilidad a la NOV.....	57
Figura 10. Efecto de la expresión de <i>staR</i> bajo el control de P_{Zn}	59
Figura 11. Efecto de la sobreexpresión de <i>staR</i> en la susceptibilidad a NOV.	60
Figura 12. Determinación del nivel de Sc en la cepa R6 $\Delta staRP_{Zn} staR$ [pLS1] crecida en diferentes concentraciones de ZnSO ₄ y NOV.	62
Figura 13. Número y localización de DEGs en el cromosoma de $\Delta staRP_{Zn} staR$ tras el tratamiento con NOV en presencia o ausencia de StaR.	65
Figura 14. StaR se localiza en el nucleoide.	67
Figura 15. Purificación de H ₆ -StaR a partir de <i>E. coli</i> BL21-CodonPlus (DE3) conteniendo el plásmido pET28- <i>staR</i>	69
Figura 16. StaR activa la actividad de relajación de Topo I pero no tiene efecto sobre la girasa.	71
Figura 17. Co-IP de StaR y Topo I.....	73
Figura 18. Esquema del procedimiento utilizado para la delección de <i>spr0488</i> , <i>rapZ</i> y <i>yhbY</i>	76
Figura 19. Amplicones generados a partir del genoma de tres clones transformantes de R6 $\Delta rapZ$, $\Delta yhbY$ y $\Delta spr0488$	77
Figura 20. Esquema de los plásmidos recombinantes obtenidos para la construcción de cepas sobreproductoras.	78
Figura 21. Efecto de la delección de <i>rapZ</i> , <i>yhbY</i> y <i>spr0488</i> en el crecimiento de SPN en presencia de NOV.....	79

Figura 22. Efecto de la sobreexpresión de <i>rapZ</i> , <i>yhbY</i> y <i>spr0488</i> en el crecimiento de SPN en ausencia y presencia de NOV.	80
Figura 23. Efecto de la expresión de <i>spr0488</i> en el crecimiento de SPN en ausencia o presencia de NOV.	81
Figura 24. Predicción de la estructura terciaria de Spr0488.	82
Figura 25. Número y localización de DEGs en el cromosoma de $\Delta spr0488$ [pLS1R- <i>spr0488</i>] tras el tratamiento con NOV en presencia o ausencia de Spr0488.	86
Figura 26. Purificación de H ₆ -Spr0488 a partir de <i>E. coli</i> BL21-CodonPlus (DE3) [pET28- <i>spr0488</i>].	88
Figura 27. Efecto de Spr0488 sobre la actividad de Topo I y Girasa.	89
Figura 28. Digestión de H ₆ -Spr0488 con trombina.	91
Figura 29. Análisis de oligomerización de Spr0488. El estado de oligomerización de H ₆ -Spr0488 y Spr0488 _D se analizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño.	93
Figura 30. Efecto de Spr0488 _D sobre la actividad de Topo I y Girasa.	94
Figura 31. Spr0488 se une a dsDNA pero no a ssDNA.	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas	24
Tabla 2. Vectores plasmídicos	25
Tabla 3. Plásmidos recombinantes	25
Tabla 4. Oligonucleótidos	27
Tabla 5. DEGs detectados en $\Delta staRP_{Zn} staR$ en presencia de $ZnSO_4$ comparado con los detectados en su ausencia	63
Tabla 6. DEGs detectados en $\Delta spr0488$ [pLS1R- <i>spr0488</i>] en presencia de M frente a S con y sin NOV	83

ABREVIATURAS

Además de las unidades y abreviaturas aceptadas por el Sistema Internacional de medidas (SI) (<http://physics.nist.gov/cuu/Units/index.html>) y la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) (<https://iupac.org/what-we-do/nomenclature/>), en esta Tesis Doctoral se han utilizado las siguientes abreviaturas:

Amp	Ampicilina
Amp ^r	Resistencia a ampicilina
ATP	Adenosina trifosfato
A+Y	Medio AGCH + 0,2 % extracto de levadura
BrEt	Bromuro de etidio
CCC	Plásmido circular covalentemente cerrado
cDNA	DNA complementario
Cm	Cloranfenicol
Cm ^r	Resistencia a cloranfenicol
Co-IP	Co-inmunoprecipitación
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótidos fosfatados
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
DO ₆₂₀	Densidad óptica a 620 nm
DOC	Desoxicolato sódico
dsDNA	DNA de cadena doble
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(β-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético
Erm	Eritromicina
Erm ^r	Resistencia a eritromicina
FQ	Fluoroquinolona
IPTG	Isopropil β-d-1-tiogalactopiranosido
Km	Kanamicina
Km ^r	Resistencia a Kanamicina
LB	Medio Luria-Bertani
M	0,8 % Maltosa
NAP	Proteína asociada al nucleoide
NOV	Novobiocina
OC	Plásmido circular abierto
PBS	Tampón salino de fosfato
P _{Zn}	Promotor inducible por Zn
RNA	Ácido ribonucleico
RNAP	RNA polimerasa
rRNA	RNA ribosómico

S	0,8 % Sacarosa
Sc	Superenrollamiento
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SM	0,4 % Sacarosa + 0,4 % Maltosa
SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
ssDNA	DNA de cadena sencilla
TAE	Tampón Tris acetato EDTA
TBE	Tampón Tris borato EDTA
TBS	Tampón Tris salino
TTBS	Tampón Tris salino con 0,1 % Tween
TE	Tris EDTA
TEMED	N,N,N',N' -Tetrametiletilendiamina
Tc	Tetraciclina
Tc ^r	Resistencia a tetraciclina
Tm	Temperatura de anillamiento
Tris-HCl	Hidroximetilaminometano con ácido
UV	Ultravioleta
σ	Densidad de superenrollamiento

RESUMEN

Streptococcus pneumoniae (SPN, neumococo), es el principal agente etiológico de la neumonía bacteriana adquirida en comunidad y una causa importante de otitis media y sinusitis, especialmente en niños y adultos mayores. La resistencia de SPN a los antibióticos ha aumentado en las últimas décadas. La aparición de cepas resistentes ha centrado la atención en las medidas de prevención como son las vacunas. Sin embargo, la aparición de serotipos no vacunales y otros con renovada patogenicidad ha llevado a un aumento de infecciones por SPN y, en consecuencia, a un aumento de la presión antibiótica. La incidencia de aislados de SPN resistentes a β -lactámicos y macrólidos ha llevado a la utilización de antimicrobianos alternativos, como las fluoroquinolonas (FQs), que inhiben las DNA topoisomerasas, enzimas responsables del mantenimiento del superenrollamiento (Sc) del DNA. La comprensión de las bases moleculares del control de Sc es esencial para encontrar nuevas dianas terapéuticas y una antibioticoterapia más adecuada. Las proteínas asociadas al nucleoide (NAPs) también modulan el Sc. La caracterización funcional de nuevas NAPs de SPN, el conocimiento de su papel en la compactación del DNA, sea por la acción directa sobre el material genético o por la interacción con otras proteínas, permitirá avanzar en el establecimiento de nuevas dianas moleculares y el desarrollo de nuevos fármacos más activos frente a SPN. Hasta el presente estudio, solamente se habían caracterizado dos NAPs en neumococo, HU y SMC. Datos previos del laboratorio proponían como posibles NAPs a las proteínas codificadas por los genes *spr0929* (*staR*), *spr0488*, *spr1424* (*rapZ*) y *spr1593* (*yhbY*). Estas proteínas no tenían una función asignada, pero su recuperación en la fracción del nucleoide sugería que podrían ejercer una acción directa o indirecta sobre la compactación de los ácidos nucleicos y participar en la regulación y organización del material genético. El objetivo de este trabajo ha sido la caracterización de estas posibles NAPs y de su influencia en los mecanismos del control topológico del nucleoide. Para ello, se estudió el efecto de la interrupción y sobreexpresión de estos genes en el crecimiento de SPN en ausencia y presencia de concentraciones subinhibitorias de novobiocina (NOV), un inhibidor de la girasa.

Las cepas con alteraciones en *spr1424* (*rapZ*) y *spr1593* (*yhbY*) no presentaron diferencias significativas en su crecimiento cuando se compararon con la cepa parental R6. Sin embargo, sí se observaron diferencias en el crecimiento de las cepas con alteraciones en *staR* y *spr0488* en presencia de NOV. En base a esto, las proteínas StaR y Spr0488 han sido objeto de un estudio más profundo a lo largo de esta tesis para determinar su participación en el control del Sc o en el empaquetamiento del nucleoide de SPN.

Para estudiar la función de StaR y su posible efecto en el Sc se analizó el crecimiento de la cepa silvestre R6 y del mutante $\Delta staR$ en presencia o ausencia de NOV. En ausencia de NOV, ambas cepas mostraron tasas de crecimiento equivalentes, mientras que en presencia de concentraciones subinhibitorias, $\Delta staR$ creció más lentamente que R6. Una sobreexpresión de *staR* de aproximadamente 3,5 veces también afectó negativamente al crecimiento de la bacteria, lo que indica que la susceptibilidad a NOV aumenta tanto en ausencia de StaR como cuando hay un exceso de ésta. Esto sugeriría que StaR podría tener un papel en el mantenimiento del Sc en condiciones en las que hay un cambio significativo de éste, como ocurre en presencia de NOV, y que sus niveles tienen que estar regulados de forma precisa. El tratamiento con NOV en la cepa $\Delta staR$ produjo además un cambio en la densidad de Sc (σ) *in vivo*, que fue mayor en ausencia de StaR ($\sigma = -0.049$) que cuando StaR fue superproducida a partir de una copia ectópica de su gen codificante ($\sigma = -0.045$). Este cambio del Sc podría deberse a la alteración de la actividad de las topoisomerasas. Mediante ensayos *in vitro*, demostramos que StaR estimula la actividad de relajación de la Topo I, mientras que no tiene ningún efecto sobre la actividad de la girasa, y esta activación parece llevarse a cabo gracias a la interacción entre ambas proteínas, tal y como se detectó tanto *in vitro* como *in vivo* mediante co-inmunoprecipitación (Co-IP). Por otro lado, cambios en los niveles de StaR no afectaron al transcriptoma global de SPN, por lo que su efecto en Sc parece deberse exclusivamente a su capacidad de activación de la Topo I. Además, la detección de la proteína StaR *in vivo* mediante microscopía confocal de super-resolución demostró que ésta colocaliza con el nucleoide de SPN. Todos estos resultados en conjunto sugieren que StaR es una nueva NAP de SPN y puede actuar como regulador de la Topo I.

En lo que respecta a la proteína Spr0488, su sobreproducción afectó de forma significativa el crecimiento bacteriano en presencia de NOV, pero no así su ausencia. Al igual que StaR, Spr0488 fue capaz de estimular la actividad de relajación del DNA por parte de Topo I, alcanzando unos niveles de activación incluso mayores que los detectados con StaR, mientras que no tuvo ningún efecto sobre la actividad de la girasa. Nuestros resultados demuestran, además, que Spr0488 es una proteína dimérica de unión al DNA que se une específicamente a DNA bicatenario, cuya sobreexpresión no afecta el transcriptoma global de SPN. El estudio de ésta proteína continúa en el laboratorio para discernir si, al igual que StaR, Spr0488 interacciona directamente con Topo I, si participa en la regulación del Sc *in vivo* y si se localiza en el nucleoide. Todo ello permitirá determinar si, como apuntan los resultados obtenidos hasta ahora, se trata de una nueva NAP del neumococo.

Este trabajo demuestra que tanto StaR como Spr0488 son proteínas que afectan la compactación del nucleóide en SPN. El conocimiento de sus funciones abre nuevas vías para el desarrollo de nuevos antimicrobianos capaces de actuar en estas rutas.

SUMMARY

Streptococcus pneumoniae (SPN, the pneumococcus), is the main ethiological agent of bacterial community-acquired pneumonia and a main cause of otitis media, and sinusitis, especially in children and the elderly. Resistance of SPN to antibiotics, such as penicillin and macrolides, has increased in recent decades. The emergence of resistant strains has focused attention on preventive measures, such as vaccines. However, the appearance of non-vaccine serotypes and other serotypes with renewed pathogenicity has led to an increase in SPN infections and, consequently, an increase in antibiotic pressure. The incidence of β -lactam and macrolide-resistant SPN isolates has led to the use of alternative antimicrobials, such as the fluoroquinolones (FQs) that inhibit DNA topoisomerases, which are responsible for maintaining DNA supercoiling (Sc). Understanding the molecular bases of Sc control is essential to find new therapeutic targets and a more appropriate antibiotic therapy. In addition to topoisomerases, nucleoid-associated proteins (NAPs) also modulated Sc. Until the present study, HU and SMC were the only NAPs characterized in the pneumococcus. In a previous study from our laboratory, potential NAPs were identified in SPN, including four encoded by genes *spr0929* (*staR*), *spr0488*, *spr1424* (*rapZ*), and *spr1593* (*yhbY*), which do not have an assigned function but could exert a direct or indirect action on nucleic acids compaction and participate in the regulation and organization of genetic material. The aim of this work was to characterize these potential NAPs and their influence on nucleoid topological control mechanisms. To this end, the effect on SPN growth of disruption and overexpression of these genes was studied in the absence and presence of subinhibitory concentrations of the gyrase inhibitor novobiocin (NOV).

While strains with alterations in *spr1424* (*rapZ*) and *spr1593* (*yhbY*) showed no differences in growth when compared to the parental R6 strain in the presence of NOV, differences were observed in strains with alterations in *staR* and *spr0488*.

To study the function of StaR and its possible effect on Sc, the growth of the wild-type R6 strain and the Δ *staR* mutant was analyzed in the presence or absence of NOV. While in the absence of NOV both strains showed equivalent growth rates, in the presence of subinhibitory NOV concentrations, Δ *staR* grew more slowly than R6. Overexpression of *staR* of about 3.5-fold also negatively affected bacterial growth. Our

data indicate that susceptibility to NOV increased both in the absence of StaR and when its levels increase. This suggest that StaR could play a role in Sc maintenance under NOV treatment, when significant Sc changes are induced, and that its levels must be precisely regulated. Treatment with NOV of the $\Delta staR$ strain triggered a change in Sc density (σ) *in vivo*, that was higher in the absence of StaR ($\sigma = -0.049$) than when StaR was overproduced ($\sigma = -0.045$). This Sc change could be due to the alteration of topoisomerases activity. *In vitro* assays showed that StaR activates Topo I relaxation activity, while it has not effect on gyrase activity. This activation take place through the interaction between Topo I and StaR, as detected by co-immunoprecipitation (Co-IP) *in vitro* and *in vivo*. On the other hand, no significant alteration in the transcriptome was observed with the variation of StaR amount, suggesting that its role on Sc is exclusively due to its ability to activate Topo I. In addition, *in vivo* detection of StaR through super-resolution confocal microscopy showed that this protein colocalizes with the pneumococcal nucleoid. These results suggest that StaR is a new NAP of SPN that is acting as a Topo I regulator.

Regarding the Spr0488 protein, its overexpression significantly affected bacterial growth in the presence of NOV. Like StaR, Spr0488 stimulated the DNA relaxation activity of Topo I, achieving activation levels surpassing those induced by StaR. Notably, Spr0488 exhibited no discernible effect on gyrase activity. Our findings further characterize Spr0488 as a dimeric DNA-binding protein with specific affinity for double-stranded DNA, with its overexpression showing negligible influence on the global transcriptome of SPN. Further studies on this protein are ongoing in the laboratory to elucidate whether, as occurs with StaR, Spr0488 directly interacts with Topo I, participates in Sc control in the pneumococcus or colocalizes with the nucleoid. These investigations will allow to know whether Spr0488 is indeed a novel NAP of SPN.

This study underscores the roles of both StaR and Spr0488 in modulating nucleoid compaction in SPN. Insights into their functionalities would pave the way for novel antimicrobial development targeting these regulatory pathways.

INTRODUCCIÓN

1 *Streptococcus pneumoniae*

1.1 Aspectos históricos

Streptococcus pneumoniae (SPN), conocido también como neumococo, fue descubierto a finales del siglo XIX cuando dos microbiólogos, Louis Pasteur y George Sternberg, de forma independiente y casi a la vez, describieron bacterias en forma de cocos en la saliva humana. Pasteur aisló el microorganismo de la sangre de un conejo tras inocular la saliva de un niño muerto por rabia (Pasteur, 1881) mientras que Sternberg inoculó su propia saliva y también recuperó la bacteria de la sangre del conejo inoculado (Sternberg, 1881).

En 1884 el bacteriólogo Christian Gram desarrolló la tinción que lleva su nombre para facilitar la visualización de neumococo en el tejido pulmonar, por lo tanto fue una de las primeras bacterias patógenas observadas durante el desarrollo de la tinción de Gram, una herramienta que todavía se usa más de dos siglos después (Gram, 1884). El neumococo tuvo muchas denominaciones desde su descubrimiento, en el mismo año del desarrollo de la tinción de Gram fue denominado *Micrococcus pneumoniae* por el microbiólogo Emanuel Klein (Klein, 1884), dos años después como *Diplococcus pneumoniae* debido su disposición en pares (Weichselbaum, 1886) y en 1901 fue denominado como *Streptococcus pneumoniae* (Chester, 1901), nombre que se aceptó oficialmente en 1980 (Skerman et al., 1980).

En 1928, el bacteriólogo británico Frederick Griffith obtuvo la primera evidencia de transformación genética bacteriana trabajando con SPN. Griffith hizo estudios sobre virulencia de distintos tipos de neumococos y demostró que, si células capsuladas muertas por calor se inyectaban junto con células no capsuladas vivas, se producía una septicemia letal en ratones y las células que se recuperaban del animal eran de tipo capsulado. O sea, las células no capsuladas inyectadas cambiaron su fenotipo, pasando a tener cápsula y producir la infección. Al factor responsable de este cambio se le denominó "principio transformante". Dicho estudio tuvo un papel importante en el surgimiento de la biología molecular (Griffith, 1928). Posteriormente se purificó este principio transformante (Avery et al., 1944) y se relacionó el DNA con el material genético.

1.2 Características generales

SPN es una bacteria Gram-positiva y anaerobia facultativa que puede catabolizar muchos azúcares. Morfológicamente se encuentra formando cadenas cortas o en pares

de cocos (diplococos) colonizando el tracto respiratorio superior de humanos (Henriques-Normark and Tuomanen, 2013; Li et al., 2023). Una característica fenotípica que ha sido muy utilizada para identificar aislados clínicos de SPN es su sensibilidad a la optoquina (Lund and Henrichsen, 1978), aunque se han descrito algunos aislados resistentes (de la Campa et al., 1997) que recomiendan utilizar otros métodos adicionales para identificar neumococo en el laboratorio.

Las células de neumococo tienen una pared celular compuesta por muchas moléculas, entre las que destacan los ácidos teicoicos y lipoteicoicos siendo la colina un componente estructural de estas moléculas e imprescindible para el crecimiento de este microorganismo. El peptidoglicano también es un componente estructural importante de la pared celular (Tomasz, 1967; Vollmer et al., 2019). Además, las células son sensibles a sales biliares como el desoxicolato sódico. Su sensibilidad se debe principalmente a que disparan un proceso bioquímico que degrada la pared celular (Mosser and Tomasz, 1970). SPN tiene una cápsula formada por polisacáridos que es un importante factor de virulencia, ya que bloquea mecanismos de defensa del hospedador. Además, su cápsula es la base para la clasificación de este microorganismo en serotipos (Scelfo et al., 2021; Watson et al., 1993). A lo largo de los años se han descrito más de 100 serotipos diferentes de este patógeno (Ganaie et al., 2020; Pimenta et al., 2021).

1.3 Importancia clínica

Las infecciones neumocócicas incluyen desde enfermedades leves y más comunes como sinusitis, y otitis media, hasta las más graves como meningitis, neumonía y sepsis. Son además unas de las principales causas de morbimortalidad en todo el mundo, principalmente en niños menores de 5 años y adultos de más de 65 años. SPN coloniza con frecuencia la nasofaringe humana y se propaga de persona a persona a través de aerosoles, por lo tanto, la colonización nasofaríngea es un requisito previo para la enfermedad. Se cree que los niños pequeños son el principal reservorio de este agente (Henriques-Normark and Tuomanen, 2013; WHO, 2007). Aproximadamente un 25 % de las muertes que ocurren en niños menores de 5 años en el mundo son provocadas por neumonía, sepsis y meningitis, y SPN es la principal causa bacteriana de estas enfermedades (Johnson et al., 2010).

La aparición de cepas resistentes a la penicilina y a otros antibióticos ha centrado la atención en las medidas de prevención. A lo largo de los años se han desarrollado diferentes vacunas antineumocócicas. En la actualidad existen dos tipos de vacunas frente a SPN, la vacuna polisacárida y la vacuna conjugada, basadas ambas en

polisacáridos capsulares. Como ya se ha mencionado, existen más de 100 serotipos diferentes de SPN y antes de la introducción de las vacunas conjugadas tan solo 20 de ellos eran responsables del 80-90 % de las enfermedades neumocócicas invasivas (Scelfo et al., 2021).

La implementación de estas vacunas ha reducido la incidencia de enfermedades neumocócicas, sin embargo, la aparición de serotipos no vacunales y otros serotipos con renovada patogenicidad, junto con áreas con cobertura vacunal baja han sido un problema, y por lo tanto, las tasas de morbimortalidad permanecen elevadas en todo el mundo (Musher et al., 2022; Scelfo et al., 2021).

La introducción de las vacunas ha sido una medida importante para el descenso en las tasas de resistencia antibiótica en SPN, sin embargo, con el fenómeno de reemplazo de serotipos y el uso abusivo de antibióticos, ha aumentado el número de aislados clínicos resistentes a los antibióticos (Cassiolato et al., 2018; Feldman & Anderson, 2011; Song, 2013).

1.4 La resistencia a los antimicrobianos en SPN

El aumento del uso de antimicrobianos para el tratamiento de infecciones respiratorias ha llevado a una considerable presión selectiva sobre los patógenos que causan dichas enfermedades, lo que favorece la aparición de resistencias. Además, otras bacterias colonizadoras del tracto respiratorio, como los estreptococos del grupo viridans, también desarrollan resistencia, que a su vez puede transferirse a otros patógenos respiratorios, como SPN (Balsalobre et al., 2013, 2003; Jacobs, 2004). Las infecciones causadas por SPN fueron tratadas con penicilina durante muchos años. Sin embargo, desde los años 60 del siglo pasado hasta hoy, la resistencia a este antibiótico ha aumentado en todo el mundo. El mecanismo de resistencia a la penicilina y otros β -lactámicos, se da a través de modificaciones genéticas en las proteínas de unión a penicilina (PBPs) (Li et al., 2023; Spratt, 1994). La recombinación es un mecanismo importante para la evolución de la resistencia a los β -lactámicos, pero la diseminación clonal es también fundamental para la propagación de la resistencia en SPN (Cornick and Bentley, 2012).

La resistencia a la penicilina condujo a un aumento del uso de otros antimicrobianos no β -lactámicos y esto ha llevado a un aumento de la resistencia a esos otros antibióticos. Desde 1990 ha aumentado rápidamente la resistencia a los macrólidos (Liñares et al., 2010). El uso generalizado de macrólidos semisintéticos como azitromicina y claritromicina, fue un factor importante en el incremento su resistencia en

neumococo (Schroeder and Stephens, 2016). Este aumento se debió, fundamentalmente, a la propagación de clones resistentes a la penicilina (Liñares et al., 2010). La resistencia a penicilina y macrólidos en SPN se incrementó en Europa en los últimos años (Figura 1). El informe europeo de 2023 muestra una subida del números de aislados de enfermedades invasivas por neumococo resistentes (European Centre for Disease Prevention and Control, 2023).

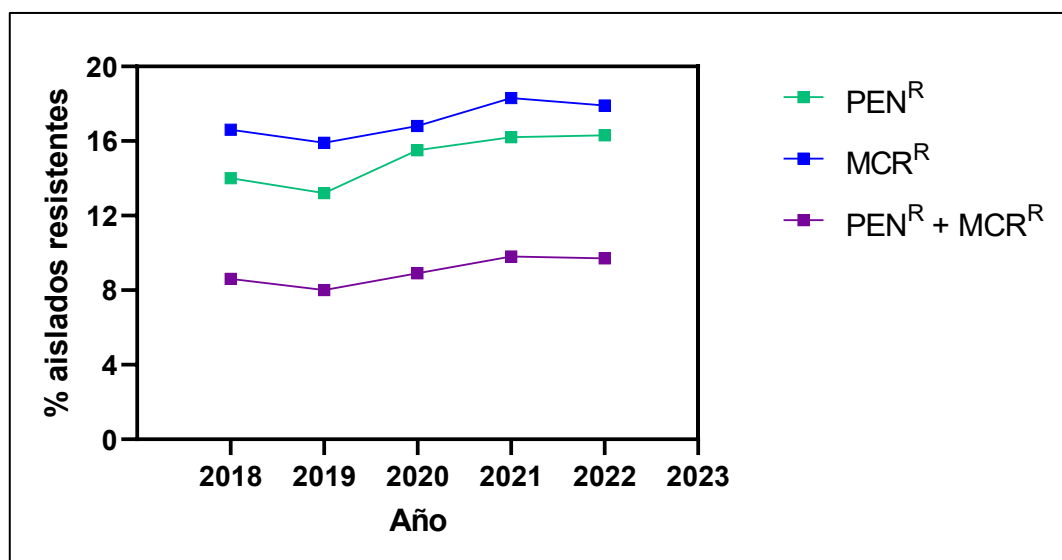


Figura 1. Evolución temporal de los aislados de SPN resistentes a antimicrobianos en Europa (excluido el Reino Unido) por grupo antimicrobiano. PEN^R son los aislados con sensibilidad intermedia o resistente a penicilina, MCR^R aislados resistentes a macrólidos. Datos del informe “Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual epidemiological report for 2022” del ECDC 2023.

Además de la resistencia a β -lactámicos y macrólidos, la resistencia de SPN a otras clases de antibióticos no es una novedad y se ha descrito en muchos estudios. En 1979, en Australia, se aisló una cepa de neumococo resistente a diferentes clases de antibióticos como cloranfenicol, tetraciclina y con baja susceptibilidad a la penicilina (Hussein et al., 1989). Otro estudio en España, en 1982, describió una elevada incidencia de cepas de SPN resistentes a la tetraciclina y cloranfenicol (Casal, 1982).

El número de aislados de SPN con multirresistencia (resistencia a dos o más clases de antibióticos) ha aumentado mucho en las últimas décadas y son endémicos en muchos países (Chenoweth et al., 2000; Cherazard et al., 2017; Jacobs, 2004). Los factores de riesgo de SPN multirresistentes son el uso previo de antibióticos, edad avanzada y hospitalización. La incidencia de SPN multirresistentes ha llevado a la utilización de antimicrobianos alternativos cuyo mecanismo de acción está dirigido al

mantenimiento de la topología del DNA, como son las fluoroquinolonas (FQs). Las FQs son antimicrobianos sintéticos, incluyendo levofloxacin y moxifloxacin entre otros, que actúan en dos dianas distintas pero que están relacionadas, la DNA girasa y la topoisomerasa IV, que son enzimas responsables del control de la topología del DNA bacteriano (Andriole, 2005; Hooper, 2001; Varon and Gutmann, 2000). Aunque se usan ampliamente, la tasa de resistencia a estos antimicrobianos no es tan alarmante (Balsalobre et al., 2013; Domenech et al., 2014; Sempere et al., 2022). Sin embargo, junto con el aumento del uso de FQs podría ocurrir un aumento de la resistencia a estos antibióticos, ya sea debido a alteraciones en los genes de las DNA topoisomerasas o por la acción de bombas de eflujo que disminuyen la concentración de las FQs dentro de la célula (Amblar et al., 2022; Balsalobre et al., 2013; Hooper, 1999).

Mutaciones en las topoisomerasas suelen surgir de forma espontánea, pero también por transferencia horizontal de genes de otras especies de estreptococos a SPN (Balsalobre et al., 2013; Ferrándiz et al., 2000). La creciente resistencia a FQs amenaza su eficacia contra una variedad de enfermedades, incluyendo las neumonías, y los esfuerzos científicos se han centrado en comprender los mecanismos responsables de la resistencia (Bush et al., 2020). Comprender las propiedades topológicas del DNA y su compactación es clave para detectar nuevas y diferentes formas de combatir las infecciones bacterianas.

2 Propiedades topológicas y superenrollamiento del DNA

La doble hélice del DNA es una estructura flexible y extremadamente dinámica. Uno de los primeros estudios sobre la topología del DNA fue publicado en el año 1965 cuando Vinograd y colaboradores examinaron al microscopio electrónico el DNA circular del virus del polio y observaron que éste podía presentar distintas formas topológicas, los topoisómeros (Vinograd et al., 1965). Los topoisómeros son distintas formas que pueden adoptar las moléculas de DNA circulares covalentemente cerradas (CCCs) sin que cambie su masa. Esta observación se extendió a todas las moléculas de DNA circulares de doble cadena (Cozzarelli, 1980).

La topología del DNA afecta decisivamente a muchos de los procesos biológicos en los que participa. Influye en la unión de factores reguladores de la iniciación de la replicación, en la separación de los cromosomas, la compactación del DNA, la transcripción y la reparación del material genético (Dorman, 2019; Dorman and Dorman, 2016; Schwartzman and Stasiak, 2004).

El superenrollamiento (Sc , del inglés “supercoiling”) es una de las propiedades topológicas del DNA mejor estudiadas y es, literalmente, la medida del enrollamiento de la doble hélice sobre sí misma. El parámetro que mejor define la topología de una molécula CCC es el índice de enlace o ligamiento (Lk). Este índice se define matemáticamente como el número de veces que una cadena de la doble hélice cruza a la otra en un plano. El Lk es una constante topológica que depende de dos propiedades geométricas del DNA que pueden variar con la deformación de la molécula denominadas índice de torsión (Tw) e índice de Sc (Wr). Estas propiedades topológicas se pueden medir matemáticamente.

El Tw indica el número de veces que las dos cadenas del DNA giran una vuelta completa en el espacio alrededor del eje axial de la doble hélice. Su valor viene dado por la ecuación:

$$Tw = N / 10,5$$

Siendo N el número de pb de la molécula de DNA y 10,5 el número de pb por vuelta completa en el espacio de cada una de las dos cadenas de la doble hélice.

El Wr es la medida del Sc en su sentido más literal. Es una medida de la torsión del eje axial y mide el número de veces que el eje de la doble hélice se cruza sobre sí mismo en un plano (Bates and Maxwell, 1997; Kornberg and Lorch, 1992).

Estas dos propiedades están relacionadas entre sí y con el Lk por la ecuación:

$$Lk = Tw + Wr$$

Esta ecuación indica que en todo dominio topológico cerrado el Tw está directamente relacionado con el Wr y ambas variables se compensan entre sí dando como resultado el valor del Lk (Lilley, 2001). El Lk sólo puede cambiar si se producen roturas en el DNA (Wang, 1996).

Una molécula de DNA circular cerrada y relajada tiene un número de enlace (Lk^0) dado por la ecuación:

$$Lk^0 = N / h$$

Donde N es el número de pares de bases y h es la repetición helicoidal en las condiciones experimentales (un giro de la hélice a la derecha que en un DNA de conformación B contiene 10,5 pares de bases).

El nivel de Sc se suele dar en forma de densidad de Sc (σ) que viene dada por la ecuación:

$$\sigma = \Delta Lk / Lk^0$$

Donde $\Delta Lk = Lk - Lk^0$. Un plásmido extraído de *Escherichia coli* en crecimiento exponencial medio suele estar superenrollado hasta el punto de $\sigma = -0,06$ (Lilley, 2001; Liu et al., 2018; Marko, 2010).

El Sc del DNA tiene un papel importante en la replicación, recombinación y transcripción (Duprey & Groisman, 2021). La capacidad de enrollarse o retorcerse bajo tensión de torsión es una propiedad importante para que la molécula de DNA pueda sufrir transiciones conformacionales biológicamente importantes. Muchas especies de DNA bacteriano son circulares y están superenrolladas negativamente. Se dice que una molécula de DNA está superenrollada negativamente (Sc -) cuando el enrollamiento del DNA se da hacia la derecha, por lo que el enrollamiento se produce en el sentido de las agujas del reloj. El Sc positivo (Sc +) es el enrollamiento del DNA hacia la izquierda, por lo que el enrollamiento se produce en el sentido contrario a las agujas del reloj (Duprey & Groisman, 2021; Schwartzman & Stasiak, 2004). Un ejemplo que ilustra de forma práctica los tipos de Sc se muestra en la Figura 2.

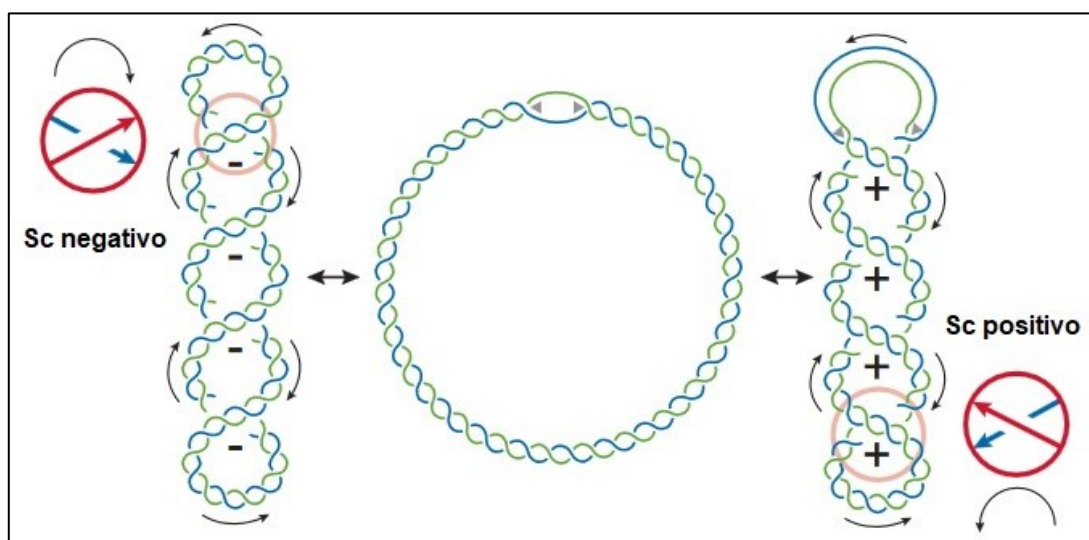


Figura 2. Esquema representativo de los tipos de Sc. Se demuestra el sentido de la torsión para el Sc negativo y Sc positivo. Figura adaptada de Schwartzman y Stasiak (2004).

3 Organización topológica del nucleoide bacteriano

El cromosoma de las bacterias suele existir como una única molécula de DNA bicatenario covalentemente cerrada. Durante mucho tiempo se creyó que el cromosoma bacteriano (nucleoide), era una estructura amorfa dispersa en el citoplasma. Sin embargo, el desarrollo de técnicas avanzadas de microscopía y biología molecular ha permitido comprender mejor la estructura interna de la célula bacteriana, incluyendo el nucleoide (Kois et al., 2007). El cromosoma bacteriano debe compactarse alrededor de 1.000 veces para encajar dentro de células de apenas 1-2 μm de longitud (Holmes & Cozzarelli, 2000; Wang et al., 2013). La compactación del DNA da como resultado un nucleoide que ocupa sólo una pequeña parte (aproximadamente 1/4) del espacio intracelular (Dame, 2005; Kois et al., 2007). Al mismo tiempo, el nucleoide debe tener un nivel de compactación que permita que el genoma siga siendo accesible y funcional (Teleman et al., 1998). En las bacterias, distintos procesos fisiológicos pueden ocurrir simultáneamente y el nucleoide bacteriano se caracteriza por ser una estructura dinámica y heterogénea con regiones específicas involucradas en estos procesos celulares (Dame, 2005). La topología del nucleoide depende del Sc del DNA que, además, debe ser capaz de tener respuestas homeostáticas a diversos tipos de estímulos como temperatura, estrés osmótico, estrés oxidativo, fármacos que actúan en las topoisomerasas (Drlica, 1992; Duprey & Groisman, 2021) e incluso ciclos circadianos como ocurren en las cianobacterias (Woelfle et al., 2007).

La topología del cromosoma debe gestionarse con precisión. El control topológico del DNA se ejerce a varios niveles. El primer nivel implica la acción de las topoisomerasas, como la girasa, la topoisomerasa I (Topo I) y la topoisomerasa IV (Topo IV), que regulan activamente el grado de Sc mediante la introducción o eliminación de vueltas en la estructura del DNA (Champoux, 2001; Witz & Stasiak, 2010). El segundo nivel involucra a una serie de proteínas asociadas al nucleoide (NAPs, del inglés “nucleoid-associated proteins”) que forman una red funcional para el mantenimiento del Sc. En algunas bacterias estas proteínas controlan la transcripción a través de la modulación del Sc (Dorman, 2013; Luijsterburg et al., 2006). Además, otras proteínas que se unen al DNA, como por ejemplo las helicasas, pueden cooperar con las topoisomerasas para estabilizar la estructura del cromosoma durante los procesos de replicación y transcripción (Duguet, 1997). En *E. coli*, aproximadamente la mitad del Sc está constreñido por la interacción con proteínas (Dorman & Dorman, 2016). El tercer nivel implica la curvatura del DNA que permite una mejor interacción con la RNA polimerasa (RNAP) (Pérez-Martín et al., 1994) y afecta la transcripción de genes clave, como los que codifican las topoisomerasas (Balas et al., 1998). Finalmente, el cuarto

nivel implica la organización del cromosoma en dominios con comportamiento topológico intrínseco. Estos mecanismos de regulación del Sc han sido estudiados en muchas bacterias como *E. coli* (Postow et al., 2004; Worcel & Burgi, 1972) y SPN (Ferrándiz et al., 2010, 2016) pero aún hay mucho para ser elucidado.

El genoma de neumococo tiene un tamaño relativamente pequeño, de aproximadamente 2 Mb, si lo comparamos con las 4,6 Mb del genoma de *E. coli*. Además, tiene un elevado contenido A+T (60 %). En SPN los genes que responden a cambios de relajación del DNA de manera coordinada se encuentran agrupados en dominios topológicos. Existen cuatro tipos de dominios, definidos por su respuesta transcripcional a la relajación del DNA y su contenido en AT: regulado positivamente, es decir que la expresión de sus genes aumenta tras la relajación (UP), regulado negativamente, en los que la expresión de sus genes baja (DOWN), no regulado (NR) y ricos en AT (Ferrándiz et al., 2010). Los dominios NRs se dividen a su vez en pcNR (posición conservada NR) y pvNR (posición variable NR) (Martín-Galiano et al., 2017).

Los dominios DOWN se caracterizan por la presencia de genes esenciales, como el que codifica la Topo I, y genes implicados en el metabolismo de aminoácidos y producción de energía. Los dominios UP están enriquecidos en genes implicados en el metabolismo de nucleótidos y sistemas de defensa (Ferrándiz et al., 2010). Los dominios pcNR se caracterizan por una expresión génica más elevada y constante de sus genes. Estos codifican proteínas esenciales para el mantenimiento de la fisiología celular, y aparentemente un gran número de ellas establece interacciones proteína-proteína. Sin embargo, en los dominios pvNR se localizan genes relacionados con factores de virulencia y determinantes inmunogénicos, en especial proteínas que desencadenan una respuesta de anticuerpos en los pacientes, y proteínas de la pared celular (Martín-Galiano et al., 2017). Los cambios en la localización de los genes pueden provocar alteraciones en la fisiología celular de neumococo (Ferrándiz et al., 2014; Martín-Galiano et al., 2017), como se ha demostrado en *E. coli* (Gerganova et al., 2015). Se ha descrito que regiones del genoma con alto contenido en AT favorecen el acceso de la RNAP a sus promotores (Ferrándiz et al., 2010).

El control del Sc en SPN se produce principalmente mediante la regulación de la transcripción de los genes de las topoisomerasas. La relajación desencadena una regulación positiva de la girasa y una regulación negativa de la Topo I y Topo IV, mientras que un Sc hiper-negativo baja la expresión de Topo I que tiene un papel fundamental en la regulación del Sc y del nivel de transcripción (Ferrándiz et al., 2016).

3.1 DNA topoisomerasas

Las DNA topoisomerasas son enzimas esenciales para la viabilidad celular. Estas enzimas crean roturas transitorias en el DNA que ayudan a resolver los problemas topológicos que surgen durante la replicación, reparación, recombinación y transcripción, alterando el nivel de Sc y la topología cromosómica (Gellert, 1981; Wang, 1985, 2002). La primera caracterización de una topoisomerasa fue en 1971 cuando Wang describió una proteína en *E. coli*, que llamó proteína ω que era capaz de interaccionar con el DNA y relajar específicamente las moléculas de DNA con Sc negativo (Wang, 1971). Años más tarde, esa proteína pasó a llamarse Topo I (Liu & Wang, 1979). Tras el descubrimiento de la proteína ω , un estudio con células de ratones permitió identificar otra proteína capaz de relajar DNA superenrollado (Champoux & Dulbecco, 1972). Posteriormente, se caracterizó otra enzima en *E. coli* con actividad dependiente de ATP capaz de introducir Sc negativo en el DNA relajado, a la que se llamó DNA girasa (Gellert et al., 1976). La introducción de Sc negativo esencial en el genoma, trabajando así contra las tensiones mecánicas que se acumulan en el DNA superenrollado (Nöllmann et al., 2007).

Todas las células contienen dos tipos de topoisomerasas altamente conservadas que se diferencian en función de sus propiedades físicas y mecánicas. A pesar de las diferencias en el mecanismo catalítico y las funciones celulares, todas las topoisomerasas actúan produciendo roturas transitorias en el DNA (Froelich-Ammon & Osheroff, 1995) y pasan una cadena de DNA (sencilla o doble) a través de la rotura producida, con posterior sellado de la rotura inicial. En base a su mecanismo de acción, las DNA topoisomerasas se pueden dividir en dos tipos (I y II). Las topoisomerasas de tipo I introducen roturas transitorias en una de las cadenas del DNA, mientras que las de tipo II introducen roturas transitorias en la doble cadena (Figura 3) modificando la tensión generada en la replicación y transcripción (Bush et al., 2015; Champoux, 2001; Junier et al., 2023; Wang, 2002).

En *E. coli* se han descrito cuatro topoisomerasas: Topo I (Wang, 1971), girasa (topoisomerasa II) (Gellert et al., 1976), Topo III (Dean et al., 1983) y Topo IV (Kato et al., 1990). Sin embargo, SPN tiene tres topoisomerasas, una enzima de tipo I, Topo I, y dos de tipo II, Topo IV y girasa (de la Campa et al., 2017; Ferrándiz et al., 2010).

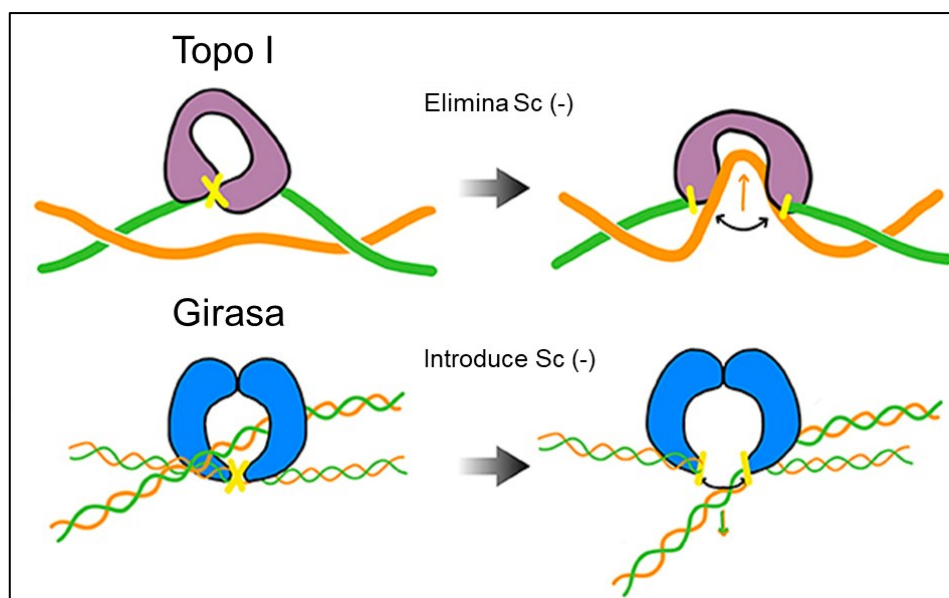


Figura 3. Esquema del paso principal del mecanismo de acción de la Topo I y de la DNA Girasa. Topo I corta una sola cadena de DNA y hace que la otra cadena pase a través del corte antes de que el DNA se vuelva a ligar. La enzima hace que el cambio de torsión sea de una sola unidad. La DNA girasa corta ambas cadenas de un dúplex de DNA y hace que otro dúplex pase a través del corte antes de que el DNA se religue. El esquema de la girasa omite detalles estructurales específicos pues el complejo completo de la girasa incluye un dímero adicional de GyrB. Figura adaptada de Junier et al., 2023.

3.1.1 DNA topoisomerasas de tipo I

Estas enzimas eliminan el Sc negativo que se genera durante la replicación y la transcripción. Cortan una cadena de la doble hélice y rotan uno de los extremos generados sobre la cadena intacta una vuelta completa para finalmente volver a unir los extremos cortados (Brown & Cozzarelli, 1981). Como resultado, se elimina una vuelta en el DNA relajándolo. Todas las enzimas de tipo I tienen un mismo mecanismo químico para romper el enlace fosfodiéster. Un grupo hidroxilo de un residuo Tyr de la enzima ataca un enlace fosfodiéster en el DNA y permanece unido covalentemente a un lado de la rotura mientras libera una cadena hidroxilada. Posteriormente, el ataque del enlace fosfo-Tyr por el extremo hidroxilo de la cadena libre restaura el enlace fosfodiéster y libera la enzima para el siguiente ciclo catalítico. Como la energía del enlace fosfodiéster se conserva en el intermediario proteína-DNA la reacción no requiere hidrólisis de ATP (Forterre et al., 2007).

Las dos enzimas de tipo I en *E. coli* son la Topo I y la Topo III (Wang, 2002). Las primeras evidencias de la homeostasis del Sc regulado por topoisomerasas de tipo I se describieron en *E. coli*. En esta bacteria la transcripción del gen *topA* (Topo I) disminuye con la relajación del DNA (Tse-Dinh, 1985). Mutaciones en este gen son aparentemente

no letales debido a mecanismos compensatorios (Pruss et al., 1982). Sin embargo, la mutación simultánea de *topA* (Topo I) y *topB* (Topo III) resulta deletérea para la bacteria (Stupina & Wang, 2005). Topo III tiene una estructura parecida a la de Topo I excepto por la presencia de un bucle cargado positivamente que puede estar involucrado en la catenación y decatenación (Mondragón & DiGate, 1999). Su papel es importante para el proceso de segregación del cromosoma bacteriano (Perez-Cheeks et al., 2012). Sin embargo, se ha demostrado que incluso en ausencia de esta enzima suele ocurrir una separación completa de los nucleoides pues la Topo IV puede actuar globalmente para eliminar los enlaces entre los cromosomas hermanos (Lee et al., 2019).

A diferencia de *E. coli*, SPN tiene una única topoisomerasa de tipo I, la Topo I codificada por el gen *topA* (Ferrándiz et al., 2010; García et al., 2011). Estudios *in vitro* revelan que hay una interacción física entre la Topo I y la RNAP tanto en neumococo (Ferrándiz et al., 2021) como en *E. coli* (Cheng et al., 2003). La Topo I tiene un papel en la formación y estabilización del complejo RNAP-DNA en el promotor y durante la transcripción en neumococo (Ferrándiz et al., 2021). Además, se ha evidenciado la co-localización de Topo I y la RNAP en *Mycobacterium tuberculosis* (Ahmed et al., 2017) y en SPN (Ferrándiz et al., 2021).

El equilibrio entre las actividades de Topo I y la girasa dentro de la célula es fundamental para el mantenimiento del Sc y la compactación del nucleoide. Topo I es esencial y una mutación puntual que afecte la actividad de esta enzima es letal para SPN (García-López et al., 2022). Esta enzima es fundamental para el control del Sc y la arquitectura del genoma en neumococo y por lo tanto una diana idónea para nuevos antimicrobianos. La identificación de compuestos dirigidos específicamente a la familia de las topoisomerasas de tipo I es escasa, y hasta la fecha solo se conoce una molécula capaz de inhibir la Topo I de SPN, la seconeolitsina (García et al., 2011).

3.1.2 DNA topoisomerasas de tipo II

En contraste con las enzimas de tipo I, las topoisomerasas de tipo II producen roturas transitorias de la doble cadena, pudiendo catalizar el Sc, encadenamiento, desencadenamiento, anudamiento y desanudamiento de dobles hélices de DNA (Bush et al., 2015; Schwartzman & Stasiak, 2004). Las reacciones de rotura del DNA y religación son químicamente similares a las realizadas por las topoisomerasas de tipo I, con una ligación fosfo-Tyr entre el DNA y la enzima, excepto que hay rotura de las dos cadenas del DNA (Gellert et al., 1976). Además, las reacciones llevadas a cabo por este tipo de enzimas son dependientes de la hidrólisis de ATP (Champoux, 2001; Forterre et

al., 2007). Todas las topoisomerasas de tipo II son enzimas multiméricas con simetría de diáda. Estas topoisomerasas tienen en su estructura un dominio ATPasa y un dominio de unión y rotura del DNA con un residuo Tyr en su sitio catalítico. Las principales representantes de esta clase de enzimas en bacterias son la DNA girasa y la topoisomerasa IV (Topo IV), que están constituidas por dos subunidades, GyrA y GyrB para la girasa, y ParC y ParE para la Topo IV. El dominio ATPasa está localizado en las subunidades GyrB o ParE, mientras que el sitio activo donde está la Tyr involucrada en la formación de la unión covalente con el DNA, está localizado en las subunidades GyrA o ParC (Kampranis & Maxwell, 1996; Liu & Wang, 1978a, 1978b; Peng & Marians, 1993; Reece & Maxwell, 1991).

La girasa y la Topo IV tienen funciones diferentes *in vivo*. La primera introduce Sc negativo en el DNA y participa en la replicación, recombinación y transcripción, mientras que la Topo IV, al igual que la Topo I, relaja el DNA y actúa principalmente en la segregación de cromosomas hermanos después de la replicación (Ullsperger & Cozzarelli, 1996; Zechiedrich & Cozzarelli, 1995). En *E. coli* un defecto en la Topo I puede ser compensado por un incremento en la expresión de los genes *parC* y *parE* (Kato et al., 1990).

En neumococo la girasa y la Topo IV responden de manera distinta a los cambios topológicos del nucleoide. La relajación del DNA lleva a una disminución de la transcripción de los genes *parC* y *parE* (Topo IV) y a una regulación positiva de los genes de la girasa (*gyrA* y *gyrB*) (Ferrándiz et al., 2010), de acuerdo con lo que se ha observado en *E. coli* (Menzel & Gellert, 1983; Peter et al., 2004). Además, la regulación de la transcripción en SPN depende del nivel de Sc, de la existencia de reguladores específicos, y de la curvatura de la región promotora de la transcripción de los genes de la girasa (Ferrándiz et al., 2010).

Desde hace muchos años se dispone de moléculas con actividad antimicrobiana que inhiben las topoisomerasas de tipo II. El ácido nalidíxico, la primera quinolona que inhibe la girasa, es un subproducto de la producción de cloroquina (Leshner et al., 1962). Otro inhibidor de la girasa es la novobiocina (NOV) (Maxwell, 1993) que se descubrió entre los años 1950 y 1960 (Smith et al., 1956). Las topoisomerasas bacterianas de tipo II son dianas muy estudiadas para antibacterianos y se han desarrollado muchos otros antimicrobianos, como los derivados de las quinolonas (Pham et al., 2019).

3.2 Proteínas de unión al nucleóide (NAPs)

En todas las células, tanto eucariotas como procariotas, se han identificado proteínas que alteran la topología del DNA y tienen el potencial de influir en la replicación, recombinación, reparación y transcripción. En eucariotas, estas proteínas se conocen como histonas y participan en la estructura de la cromatina y por lo tanto en la fisiología celular. En bacterias se han identificado proteínas que llevan a cabo tareas similares y fueron, por algún tiempo, denominadas “proteínas similares a histonas” (HLP o del inglés “histone-like protein”) (Dorman & Deighan, 2003; Drlica & Rouviere-Yaniv, 1987). Actualmente, reflejando su ubicación dentro de la célula bacteriana y sin implicar similitud con las histonas, esas proteínas son denominadas NAPs (Luijsterburg et al., 2006). Las NAPs son proteínas abundantes y de baja masa molecular y la capacidad de unirse al DNA es una característica de la mayoría de ellas. Muchas de esas proteínas pueden alterar la estructura de la molécula de DNA, doblándola, envolviéndola o uniéndola, o cambiando la arquitectura del genoma de la bacteria, y conforman el segundo nivel de control topológico. La participación en la organización y compactación de la cromatina, convierte a las NAPs en excelentes reguladores de la expresión génica y pueden afectar la transcripción de manera global (Dillon & Dorman, 2010), además de realizar funciones protectoras (Hołówka & Zakrzewska-Czerwińska, 2020). La combinación de funciones estructurales y reguladoras de las NAPs afecta el funcionamiento del nucleóide y como consecuencia, a la virulencia y viabilidad de las bacterias (Dadinova et al., 2023; Stojkova et al., 2019).

3.2.1 NAPs, disparidad de tipos y funciones

El estudio de las NAPs se ha centrado, principalmente, en la capacidad de unión al DNA de la mayoría de ellas y la gran mayoría de los estudios de caracterización de NAPs se hicieron en *E. coli* (Azam & Ishihama, 1999; Dorman & Deighan, 2003; Hengge-Aronis, 1999). En 2006 un estudio introdujo una clasificación para dichas proteínas basándose en su efecto estructural sobre el DNA, es decir, la capacidad de doblar o hacer puentes en la molécula de DNA (Luijsterburg et al., 2006). Aunque no hay una clasificación consenso, las NAPs podrían dividirse en tres grupos principales: (i) proteínas que unen sitios separados dentro de la misma molécula DNA, (ii) proteínas que doblan el DNA, y (iii) proteínas que participan en mecanismos alternativos de organización y compactación del DNA (Dadinova et al., 2023).

El primer grupo tiene como principal representante H-NS, una proteína de 15,6 kDa que une sitios distantes entre sí dentro de la molécula de DNA provocando su

compactación (Dorman et al., 1999), esta proteína tiene preferencia por regiones ricas en AT (Azam & Ishihama, 1999) y puede unirse a muchos sitios en el genoma, afectando la expresión de centenares de genes, generalmente de manera negativa y por lo tanto es conocida como un represor global de la transcripción en bacterias Gram-negativas (Dorman, 2007, 2004). Otro representante de este grupo es Lrp (proteína reguladora sensible a la leucina), que tiene una masa molecular de 15 kDa y forma estructuras en forma de discos que envuelven las moléculas de DNA sobre sí misma, acercando así regiones distantes del DNA (Brinkman et al., 2003). Lrp tiene una amplia influencia en la expresión génica y es especialmente importante en el control de la transcripción de operones implicados en virulencia (de los Rios & Perona, 2007; Hung et al., 2002; Tani et al., 2002). Las SMC (proteínas de mantenimiento estructural de los cromosomas) también pertenecen al primer grupo de NAPs, están altamente conservadas, desde las bacterias hasta humanos, y tienen una gran masa molecular (por encima de 150-200 kDa) (Losada & Hirano, 2005; Nasmyth & Haering, 2005). El dímero SMC forma una estructura en forma de V con dos hombros largos de doble hélice que pueden interactuar con varias regiones del DNA al mismo tiempo, lo que permite que esta proteína participe en la separación de cromosomas recién replicados (Strunnikov, 2006).

Las proteínas del segundo grupo son las que doblan el DNA y están ampliamente distribuidas entre los procariontes, las más conocidas son HU e IHF (Swinger & Rice, 2004). HU fue una de las primeras NAPs caracterizadas, cuyo nombre se deriva de una "histone-like protein" de la cepa U93 de *E. coli* (Dorman, 2015). Es una proteína pequeña y estable a altas temperaturas que se une fácilmente al DNA y una de las NAPs más abundantes en *E. coli* (Kamashev & Rouviere-Yaniv, 2000; Rouvière-Yaniv & Gros, 1975). En la mayoría de las bacterias, HU se presenta como un homodímero con una masa monomérica de aproximadamente 10 kDa, excepto en enterobacterias, donde es un heterodímero formado por las subunidades α y β . Ambas subunidades exhiben una homología del 70 % y sus estructuras 3D están altamente conservadas (Kamashev et al., 2017). Las HU homodiméricas se asignan al tipo α o β dependiendo de la similitud con cada una de las subunidades. HU muestra una mayor afinidad por el DNA con distorsiones estructurales como roturas de cadena doble o simple y horquillas de replicación (Kamashev et al., 2019; Kamashev & Rouviere-Yaniv, 2000). Estudios de microscopía han demostrado que el cromosoma de *E. coli* se altera cuando se inactivan los genes que codifican HU (Ohniwa et al., 2013). Esta proteína modula genes que responden a la anaerobiosis, a alta osmolaridad, a estrés ácido e inducción de reparación del DNA (Oberto et al., 2009). Además, regula la distribución espacial de la RNAP en el nucleóide, lo que implica su papel en la coordinación de la estructura

genómica y regulación transcripcional en *E. coli* (Berger et al., 2010). IHF es un heterodímero que está presente sólo en enterobacterias. La masa molecular de la subunidad α es de alrededor de 11 kDa, y de la subunidad β , alrededor de 9.5 kDa. De manera similar a HU, IHF utiliza intercalación de dos residuos de prolina conservados, induciendo y estabilizando la curvatura del DNA (Swinger & Rice, 2004). En este segundo grupo de NAPs se incluye también la proteína Fis, homodímero con subunidades de 98 aminoácidos cada una (Kostrewa et al., 1991). Fis, de igual modo que HU tiene preferencia por regiones del DNA ricas en AT (Azam & Ishihama, 1999; Dorman, 2015).

El tercer grupo de NAPs incluye a Dps, proteína que promueve la formación de una estructura compacta, un complejo Dps-DNA cristalino estable, que protege el DNA contra los factores adversos, incluidos los antibióticos. El descubrimiento de estructuras cristalinas en las células vivas y la asociación de este fenómeno con la resistencia a los medicamentos bacterianos despertó un gran interés. Se ha sugerido que Dps se une al DNA a través de interacciones electrostáticas de los dominios N-terminales ricos en lisina con las cargas negativas de los grupos fosfato del DNA (Ceci et al., 2004; Nair & Finkel, 2004).

3.2.2 NAPs y la fisiología bacteriana

Dada la variedad de funciones supervisadas por las NAPs, no sorprende que su patrón de expresión difiera durante el crecimiento (Azam & Ishihama, 1999; Claret & Rouviere-Yaniv, 1997). Fis y HU son las proteínas más abundantes durante la fase exponencial del crecimiento bacteriano. Las células en la fase estacionaria producen NAPs que pueden condensar el cromosoma de manera más efectiva, como es el caso de la Dps, mientras que otras, como la H-NS, se expresan constantemente en un nivel relativamente bajo, lo que las hace disponibles para alterar la expresión de ciertos genes bajo un estímulo determinado (Hołówka & Zakrzewska-Czerwińska, 2020).

Durante muchos años, los estudios sobre las NAPs y la fisiología bacteriana rara vez se relacionaron entre sí. La conexión se evidenció cuando se descubrió que mutaciones en los genes que codifican las NAPs alteran la expresión de genes que contribuyen de manera obvia a los procesos metabólicos. Por ejemplo, el funcionamiento de los promotores de los genes que expresan las moléculas de tRNA y rRNA esenciales para la traducción está modificado por Fis, H-NS y Lrp (Hillebrand et al., 2005; Hirvonen et al., 2001; Pul et al., 2007). Ciertas proteínas asociadas a nucleóide también regulan el inicio de la transcripción en promotores específicos y trabajan en

conjunto con factores de transcripción que regulan la expresión génica en respuesta a la fase de crecimiento y al cambio ambiental. Algunos ejemplos específicos involucran a las proteínas IHF y Fis de *E. coli* (Browning et al., 2010).

Nuestro conocimiento de las funciones de cada NAP en la fisiología bacteriana ha avanzado. Muchas de estas proteínas han sido ampliamente estudiadas en *E. coli* y en otras Gram-negativas, como *Salmonella*. Sin embargo, el conocimiento de estas proteínas en otras bacterias es limitado. Hasta el momento, se han identificado homólogos de las NAPs de *E. coli* en otras bacterias, como las micobacterias (Bhowmick et al., 2014; Kriel et al., 2018) y en bacterias Gram-positivas, (Ohniwa et al., 2011; Ushijima et al., 2017; Zhang et al., 2021) incluyendo SPN (Ferrándiz et al., 2018) o *Bacillus spp*, cuya proteína HU muestra una identidad de secuencia de más de 50 % con la HU de *E. coli* (Swinger & Rice, 2004). Además, aunque presenten similitudes estructurales entre las especies, el papel de las NAPs en la fisiología bacteriana puede ser diferente (Dillon & Dorman, 2010). En *Staphylococcus aureus*, por ejemplo, algunas de sus NAPs regulan la transcripción de genes que tienen un papel relevante en la protección frente al estrés oxidativo (Ushijima et al., 2017). Así mismo, aunque algunas NAPs tengan homólogos en otras especies, para una determinada bacteria puede ser esencial y para otra no, como es el caso de la HU de *E. coli*, que no es esencial para viabilidad celular de esta especie, mientras que su homólogo estreptocócico es esencial para el crecimiento de *Streptococcus pyogenes* (Bugrysheva et al., 2011; Liu et al., 2008) y SPN (Ferrándiz et al., 2018).

4 NAPs de *S. pneumoniae*, un relevante campo de estudio

Dado que el tamaño del cromosoma de SPN es relativamente pequeño, probablemente no requiera de la mayoría de las NAPs que posee *E. coli*. En SPN se desconocen las funciones de las NAPs en la arquitectura cromosómica y, como en otras especies de estreptococos, están ausentes proteínas importantes implicadas en la organización del nucleoide, como H-NS, IHF ó Fis. Hasta el momento apenas dos NAPs han sido identificadas en neumococo: SMC, que participa en el proceso de segregación del cromosoma pero no es esencial para la célula y tampoco altera la sensibilidad de la bacteria a antibióticos inhibidores de la girasa (Minnen et al., 2011), y HU, que tiene un papel fundamental en el mantenimiento del Sc y es esencial para la viabilidad celular (Ferrándiz et al., 2018).

HU está codificada en SPN por el gen *hlp*, y como otras HUs, muestra preferencia para unirse a DNA superenrollado. Esta unión al DNA permite a la proteína influir en

diversos procesos biológicos, incluida la compactación del genoma (Ferrándiz et al., 2018). El gen *hlp* se encuentra en un dominio DOWN en respuesta a la relajación del DNA desencadenada por la inhibición de la DNA girasa con NOV. La disminución transcripcional de *hlp* forma parte de la respuesta homeostática a la relajación del DNA, en la que los niveles de *gyrA* y *gyrB* aumentan y *topA* disminuye (Ferrándiz et al., 2010). HU juega un papel crítico en la organización estructural y la regulación genica de SPN. Es un homodímero, capaz de formar un complejo helicoidal, y se ha estimado que hay aproximadamente 34.000 dímeros de HU por célula. La formación de curvaturas flexibles inducidas por dímeros de HU ha sido propuesta para explicar la compactación del DNA (Ferrándiz et al., 2018). Se ha demostrado que tanto una disminución en Topo I como un aumento en la cantidad de HU pueden atenuar el efecto de la relajación del DNA inducida por NOV, restaurando un equilibrio adecuado del Sc y permitiendo así que las células crezcan a una concentración inhibitoria de NOV. La cantidad de HU es crítica para la supervivencia del neumococo, así como para su capacidad de enfrentar cambios moderados en el Sc (Ferrándiz et al., 2018). Por tanto, HU es una NAP bien estudiada en SPN que es esencial para el crecimiento. Sin embargo, el estudio de otras NAPs sin función asignada podría aportar luz sobre la regulación de procesos esenciales en este patógeno.

Los cocos Gram-positivos poseen muchas proteínas aún de función desconocida. Varios genes, que pueden estar implicados en mecanismos fisiológicos bacterianos, codifican proteínas hipotéticas, es decir, aquellas de las que no se puede inferir una función exacta. Un estudio previo de nuestro laboratorio identificó 44 proteínas hipotéticas conservadas en SPN y otros microorganismos Gram-positivos, con potencial importancia fisiológica y biomédica. Muchas de esas 44 proteínas posiblemente establecen interacción con otras proteínas o son proteínas que se pueden unir a ácidos nucleicos, sea DNA o RNA. Una de esas proteínas, un polipéptido de 324 aminoácidos codificado por el locus *spr0929*, fue preliminarmente clasificada como una proteína de unión a DNA (Martín-Galiano et al., 2014). Esta proteína tiene una secuencia muy conservada en SPN, y se han encontrado genes que codifican homólogos de Spr0929 en otros patógenos Gram-positivos, incluyendo los géneros *Clostridium*, *Enterococcus* y *Listeria*.

Por otro lado, el aislamiento de nucleoides de SPN llevado a cabo en nuestro laboratorio, permitió identificar una serie de proteínas hipotéticas presentes únicamente en la fracción del nucleoide y no detectadas en la fracción citoplásmica (datos no publicados). Algunas de estas proteínas tienen motivos de unión a ácidos nucleicos en su secuencia y poseen características que sugieren su potencial biológico como NAPs

en SPN. Este es el caso de las proteínas codificadas por los genes *spr0929* (*staR*), *spr0488*, *sp1424* y *spr1593*. Todas ellas han sido objeto de estudio en este trabajo donde se ha investigado su posible implicación en el control del Sc del DNA y la compactación de nucleóide en SPN.

El mundo desconocido de las NAPs no está exento de desafíos. La complejidad de las interacciones entre estas proteínas con otras proteínas o el DNA, plantean obstáculos significativos en el camino hacia la comprensión completa de su función y potencial terapéutico. A pesar de dichos desafíos, el estudio de las NAPs en SPN representa una prometedora línea en la investigación biomédica. Al descifrar los secretos de estas proteínas, podemos abrir nuevas vías para combatir las enfermedades causadas por esta bacteria y mejorar la salud y el bienestar de millones de personas en todo el mundo.

OBJETIVOS

La caracterización funcional de nuevas NAPs de SPN, el conocimiento de su papel en la compactación del DNA sea por acción directa en el material genético o interacción con otras proteínas, como por ejemplo las topoisomerasas, permitirá avanzar en el establecimiento de nuevas dianas moleculares y el desarrollo de nuevos fármacos más activos frente a SPN.

El objetivo general de este trabajo es la identificación y caracterización de posibles NAPs de neumococo y el estudio de su influencia en los mecanismos de control topológico del nucleoide. Los objetivos específicos de esta tesis son:

1. Construcción de cepas mutantes con deleciones en los genes *spr0929 (staR)*, *spr0488*, *rapZ* y *yhbY*, y de cepas sobreproductoras de los mismos.
2. Estudio del efecto de la deleción y sobreexpresión de estos genes en el crecimiento de SPN con y sin tratamiento con novobiocina, y su efecto en el Sc.
3. Estudio del efecto de la deleción y sobreexpresión de estos genes en la transcripción global.
4. Estudio de las interacciones de las NAPs con las principales topoisomerasas del neumococo.
5. Estudio de la capacidad de unión al DNA de Spr0488.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas de *E. coli* y SPN empleadas en la realización de esa tesis se describen en la Tabla 1. Los vectores plasmídicos y plásmidos recombinantes se describen en las Tablas 2 y 3.

Tabla 1. Cepas bacterianas

Cepa	Genotipo / Fenotipo relevante	Referencia
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus (DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (DE3)	(Studier & Moffatt, 1986)
<i>E. coli</i> M15 (PREP4)	F ⁻ , $\Phi 80\Delta lacM15$, <i>thi</i> , <i>lac</i> ⁻ , <i>mtl</i> ⁻ , <i>recA</i> ⁺ , <i>Km</i> ^r	(Villarejo & Zabin, 1974)
SPN R6	Cepa tipo de laboratorio, derivada de R36A, variante de la cepa de serotipo 2 D39	(Ottolenghi & Hotchkiss, 1962)
SPN $\Delta staR$	R6 <i>staR</i> :: <i>Cm</i> ^r	(Martín-Galiano et al., 2014)
SPN $\Delta staRP_{Zn}staR$	$\Delta staR spr1806::P_{Zn}staR$	Este trabajo
SPN $\Delta staRP_{Zn}staR$ [pLS1]	$\Delta staRP_{Zn}staR$ con el plásmido pLS1	Este trabajo
SPN $\Delta staR$ [pLS1ROM]	$\Delta staR$ con el vector pLS1ROM	Este trabajo
SPN $\Delta staR$ [pLS1R- <i>staR</i>]	$\Delta staR$ con el plásmido recombinante pLS1R- <i>staR</i>	Este trabajo
SPN $\Delta spr0488$	R6 <i>spr0488</i> :: <i>Km</i> ^r	Este trabajo
SPN $\Delta spr0488$ [pLS1ROM]	$\Delta spr0488$ con el vector pLS1ROM	Este trabajo
SPN $\Delta spr0488$ [pLS1R- <i>spr0488</i>]	$\Delta spr0488$ con el plásmido recombinante pLS1R- <i>spr0488</i>	Este trabajo
SPN $\Delta rapZ$	R6 <i>rapZ</i> :: <i>Km</i> ^r	Este trabajo
SPN $\Delta rapZ$ [pLS1ROM]	$\Delta rapZ$ con el vector pLS1ROM	Este trabajo
SPN $\Delta rapZ$ [pLS1R- <i>rapZ</i>]	$\Delta rapZ$ con el plásmido recombinante pLS1R- <i>rapZ</i>	Este trabajo
SPN $\Delta yhbY$	R6 <i>yhbY</i> :: <i>Km</i> ^r	Este trabajo
SPN $\Delta yhbY$ [pLS1ROM]	$\Delta yhbY$ con el vector pLS1ROM	Este trabajo
SPN $\Delta yhbY$ [pLS1R- <i>yhbY</i>]	$\Delta yhbY$ con el plásmido recombinante pLS1R- <i>yhbY</i>	Este trabajo

Tabla 2. Vectores plasmídicos

Nombre	Tamaño (pb)	Descripción y Uso	Referencia
pBR322	4361	Amp ^r . Ensayos de actividad de Topo I y Girasa	(Bolívar et al., 1977)
pLS1	4408	Tc ^r . Estudio del nivel de Sc	(Lacks et al., 1986)
pLS1ROM	6805	Erm ^r . Expresión inducible por maltosa en SPN de genes clonados bajo el promotor P _{Mal} .	(Ruiz-Masó et al., 2012)
pQE-1	3466	Amp ^r . Hiperexpresión de proteínas de fusión en <i>E. coli</i>	Qiagen
pET28b	5368	Km ^r . Hiperexpresión de proteínas de fusión en <i>E. coli</i>	Novagen

Tabla 3. Plásmidos recombinantes

Nombre	Vector	Inserto (pb)	Descripción	Referencia
pQE-SPN _{topA}	pQE-1	2088	Sobreexpresión de H ₆ - <i>topA</i> en <i>E. coli</i>	(García et al., 2011)
pET28a- <i>staR</i>	pET28a	6317	Sobreexpresión de H ₆ - <i>staR</i> en <i>E. coli</i>	Este trabajo
pET28b- <i>spr0488</i>	pET28b	396	Sobreexpresión de H ₆ - <i>spr0488</i> en <i>E. coli</i>	Este trabajo
pLS1R- <i>staR</i>	pLS1ROM	1034	Expresión de <i>staR</i> inducible por maltosa	Este trabajo
pLS1R- <i>spr0488</i>	pLS1ROM	592	Expresión de <i>spr0488</i> inducible por maltosa	Este trabajo
pLS1R- <i>rapZ</i>	pLS1ROM	930	Expresión de <i>rapZ</i> inducible por maltosa	Este trabajo
pLS1R- <i>yhbY</i>	pLS1ROM	396	Expresión de <i>yhbY</i> inducible por maltosa	Este trabajo

2 Medios de cultivo

Para el crecimiento de *E. coli* se utilizó medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al., 1989). Para los cultivos en medio sólido, al LB se le añadió agar (Condalab) a una concentración final de 1,5 % (p/v).

Para el crecimiento de SPN se utilizó medio semidefinido AGCH (Lacks, 1966) con 0,2 % de extracto de levadura (A+Y), suplementado con sacarosa y/o maltosa a distintas concentraciones de acuerdo con los protocolos experimentales. Para cultivos en medio sólido se añadió agar a una concentración final de 1 % (p/v). Para el crecimiento de las cepas portadoras de construcciones génicas bajo el control del promotor inducible por zinc (P_{Zn}), se eliminó el contenido inicial de zinc del medio AGCH, para ajustarlo mediante la adición de $ZnSO_4$ según las condiciones experimentales.

Los componentes de los medios de cultivo fueron adquiridos de las casas comerciales Sigma, Merck, Difco, Condalab y Bionova.

3 Enzimas y Reactivos

3.1 Enzimas

Para las amplificaciones por PCR se emplearon las DNA polimerasas, Phusion Hot Start HiFi y DNA Polymerase Platinum™ *Taq* High Fidelity, de Thermo Fischer. La DNA T4 ligasa de Invitrogen se empleó para las ligaciones de fragmentos de PCR. Además, se utilizaron en este trabajo las enzimas de restricción BamHI, HindIII, KpnI, NdeI, NheI, SacI, Sall y XbaI del tipo “Fast Digest” de Invitrogen (ThermoFischer).

3.2 Reactivos

3.2.1 Antibióticos

Los antibióticos se disolvieron en los diluyentes recomendados y se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los antimicrobianos ampicilina (Amp), eritromicina (Erm), kanamicina (Km), tetraciclina (Tc) y novobiocina (Nov), fueron suministrados por Sigma-Aldrich; el cloranfenicol (Cm) fue adquirido de Boehringer Mannheim.

3.2.2 Productos químicos

Los compuestos orgánicos, sales inorgánicas, glicerol, ácidos y bases fueron suministrados por la casa comercial Merck, así como la sero albúmina bovina (BSA) y el dimetilsulfóxido (DMSO). El bromuro de etidio (BrEt), lisozima, isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG), desoxicolato (DOC), DNasa y RNasa A fueron proporcionados por Sigma-Aldrich. La proteinasa K se adquirió de Roche. El GelRed Nucleic Acid Gel Stains fue suministrado por Biotium.

El β -mercaptoetanol, los reactivos para electroforesis, marcadores de peso molecular, solución 30 % acrilamida, geles SDS-PAGE precast, geles de poliacrilamida TBE precast, TEMED y dodecil sulfato sódico (SDS) se adquirieron de Bio-Rad. La agarosa se adquirió de Condalab y Thermo Scientific.

3.2.3 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo en reacciones de PCR o como cebadores en reacciones de secuenciación fueron proporcionados por Merck. En la Tabla 4 se detallan dichos oligonucleótidos.

Tabla 4. Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia (5'-3') ^a	Coordenadas	Referencia
Km_Kpn	gcgc ggtacc AAGGGCCCGTTTGATTTTT AATG	(-75) – (-53) de <i>km'</i>	Este trabajo
Km_Bam	gcgc ggtacc ATCGATACAAATTCCTC	938 – 954 de <i>km'</i>	Este trabajo
488UpF	GTCAAGGCTATCATGAAGGGACT	1128 – 1151 de <i>spr0486</i>	Este trabajo
488_Kpn	gcgc ggtacc AATCCTTTCAATAAAAAATC CCTGCT	(-28) – (-3) de <i>spr0488</i>	Este trabajo
488_Bam	gcgc ggtacc TGAAAGAAAATGGCATCAAG TTC	367 – 389 de <i>spr0488</i>	Este trabajo
488DownR	ACGTTCCAATTTCTCCTGATGAC	118 – 140 de <i>spr0489</i>	Este trabajo
488_F_ext	TTGGTAATGGCTATCTTTCAGTCG	928 – 951 de <i>spr0486</i>	Este trabajo
488_R_ext	GGCAACAAGTCGCTCAAGAAT	267 – 287 de <i>spr0489</i>	Este trabajo
RapZUpF	AATATGACTCTCTCCAGCCACTT	427 – 449 de <i>spr1423</i>	Este trabajo
RapZ_Bam	gcgc ggtacc CCATGGGATGTACGGGTGG	754 – 772 de <i>rapZ</i>	Este trabajo
RapZ_Kpn	gcgc ggtacc CCCTGTCACAATCACCAAGT	19 – 38 de <i>rapZ</i>	Este trabajo
RapZDownR	TTCATCCTCTTTTCATCTGTCAGC	516 – 539 de <i>yihA</i>	Este trabajo
RapZ-F_ext	ATCATGTCACTTTCAAGGATGGTC	536 – 559 de <i>spr1423</i>	Este trabajo
RapZ_R_ext	GATTCCAGTCATCATTGTGGCG	407 – 428 de <i>yihA</i>	Este trabajo
yhbYUpF	GACCTTGGGCAAGGAAGTCC	545 – 564 de <i>spr1592</i>	Este trabajo

MATERIALES Y MÉTODOS

yhbY_Bam	gcgc ggatcc GTCAAAGAAATCTAAGACC GAAACTC	297 – 322 de <i>yhbY</i>	Este trabajo
yhbY_Sac	cgcb gagct CTGAAGTGGTGACGGACG	(-34) – (-51) de <i>yhbY</i>	Este trabajo
yhbYDownR	ATGGCTCACTACTTGACGGC	684 – 703 de <i>yqeH</i>	Este trabajo
yhbY_F_ext	CACGCTCCACACCTAGACAAT	714 – 734 de <i>spr1592</i>	Este trabajo
yhbY_R_ext	TGCTATTATCCAAGAAATCACGGG	542 – 565 de <i>yqeH</i>	Este trabajo
Km-SacI	cgcb gagctc AAGGGCCCGTTTGATTTTAA ATG	(-75) – (-53) de <i>km'</i>	Este trabajo
spr0929_LiUF	AGACTCTTGCTATTGAACGC	224 – 243 de <i>spr0928</i>	(Martín-Galiano et al., 2014)
spr0929_LiURNh2	gcgc gctagc GAACTGGTGAATAATGGCT TTC	18 – 39 de <i>staR</i>	(Martín-Galiano et al., 2014)
spr0929_LiDFNo2	gcgc gcgccgc GGAACCTACTCTATCTT AATC	925 – 945 de <i>staR</i>	(Martín-Galiano et al., 2014)
spr0929_LiDR	AAGTGGCGATTTGTCACCTA	302 – 320 de <i>spr0930</i>	(Martín-Galiano et al., 2014)
catup_Nh	gcgc gctagc gcACCCATTAGTTCAACAAA CG	(-166) – (-146) de <i>cat</i>	(Martín-Galiano et al., 2014)
catdown_No	gcgc gcgccgc gaagGATATGGATCTGGA GCTG	736 – 755 de <i>cat</i>	(Martín-Galiano et al., 2014)
spr929_ScIF	gcgc gagctc ATGGATATTTATATTAAGAA AGCC	1 – 24 de <i>staR</i>	Este trabajo
spr929_SIIR	gcgc gtcgac TTATTTACTTTGGATATCCT CG	954 – 975 de <i>staR</i>	Este trabajo
spr0929_F	gcgc gctagc ATGGATATTTATATTA GAAAGCC	1 – 24 de <i>staR</i>	Este trabajo
spr0929_R	gcgc ggatcc TTATTTACTTTGGATAT CCTCG	954 – 975 de <i>staR</i>	Este trabajo
spr1806_ExF	CATAGGTCTCCACATCGAAA	474 – 493 de <i>spr1804</i>	Este trabajo
spr1806_LiURB1	GCGC GGATCCA ACAGCTAGAAAATTC TATTCT	(-1) – (-23) del <i>spr1806</i>	Este trabajo
spr1806_LiDFXb	gcgc tctaga TACTGAACCATCTGGGAAT G	667 – 686 del <i>spr1806</i>	Este trabajo
spr1806_ExR	TTGCCCGTCAAAATGATTTG	610 – 629 del <i>spr1808</i>	Este trabajo
KmR_B1_Rv	cgcb ggatcc AGGATCCATCGATACAAAT TCC	940 – 961 de <i>km'</i>	Este trabajo
pZK_Xb1_Rv	gcgc tctaga CACCATAAAAAATGAACTTG G	27– 47 del terminador	Este trabajo
929HindF	cgca agcttggagg ACTTTTATGGATATTTAT ATTAAGAAAGC	(-11) – 23 de <i>staR</i>	Este trabajo
929BamR	gc ggatcc GCAAAAAGGAAGACTGCTAG TACAAG	998 – 1023 de <i>staR</i>	Este trabajo

MATERIALES Y MÉTODOS

488HindF	gcg aagctt ggaggTTTATCATGTCAAAGAA ACTCAATCG	(-6) – 20 de <i>spr0488</i>	Este trabajo
488BamR	gc ggatCC AAGCCCGCATCTTTAGTC	564 – 584 de <i>spr0488</i>	Este trabajo
rapZHindF	gcg aagctt ggagGAAAAAGATGACAAAG AAACAACCTTC	(-7) – 19 de <i>rapZ</i>	Este trabajo
rapZBamR	gc ggatCC TCCACCAATCACCGTTATC	901 – 921 de <i>rapZ</i>	Este trabajo
yhbYHindF	gcg aagctt ggaggtAAATTATGTCATTAACA TCAAACAACG	(-5) – 23 de <i>yhbY</i>	Este trabajo
yhbYBamR	gc ggatcc GGAGTCAATAGTTCGATTGT CATAG	(-2) – 23 de <i>spr1592</i>	Este trabajo
MCS_F	AGATTATCACTCTCTAAACAC	(-335) – (-356) del TSS del P _{Mal}	Este trabajo
MCS-R	CGAAACAAGCGCTCATGA	209 – 194 del TSS del P _{Mal}	Este trabajo
488F_NdeI	gcgcat ATG TCAAAGAAACTCAATCG	1 – 20 de <i>spr0488</i>	Este trabajo
488R_SacI	cg gagctc TTACTTGAACCTTGATG	380 – 396 de <i>spr0488</i>	Este trabajo
DprA1_F	(Biot)CCAACAAAAGCTCCTGATCAAC	90 – 111 de <i>dprA</i>	Este trabajo
DprA1_R	(Biot)CGATAGTGCCAAGACTATCG	635 – 655 de <i>spr1145</i>	Este trabajo
Cy-80	(Cy5)GAAGAAGGTAACGAGCGAGTGT GCATTACTGACTACCTGAACGCATCTT AGCCTCTGCTACAATCACACCACGAC AAAGT	464 – 513 de <i>dprA</i>	Este trabajo
Cy-50	(Cy3)GACTACCTGAACGCATCTTAGCC TCTGCTACAATCACACCACGACAAAGT	464 – 513 de <i>dprA</i>	Este trabajo
Cy-dT	(Cy5)ACTTTGTCGTGGTGTGATTGTAG CAGAGGCTAAGATGCGTTCAGGTAGT CTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT T	464 – 513 de <i>dprA</i>	Este trabajo
N80	ACTTTGTCGTGGTGTGATTGTAGCAGA GGCTAAGATGCGTTCAGGTAGTCTCAT TACGTGTGAGCGAGCAATGGAAGAAG	464 – 513 de <i>dprA</i>	Este trabajo

^aLa secuencia del oligonucleótido que no hibrida con el molde se indica en minúscula y los sitios de restricción incluidos se indican en negrita. Las coordenadas de cada oligonucleótido se refieren a su posición con respecto a la A del ATG del gen con el que hibridan, excepto cuando se indique lo contrario. TSS, sitio de inicio de la transcripción (+1)

4 Cultivo de bacterias y curvas de crecimiento

E. coli creció a 30 ó 37 °C en agitación. SPN creció en medio líquido a 37 °C sin agitación o en medio sólido a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO₂. Los cultivos se conservaron a -80 °C en el medio líquido con el antibiótico correspondiente y glicerol al 10 %.

Para las curvas de crecimiento en lector de placas automático primero se crecieron preinóculos en baño estático termostatzado en el medio correspondiente en cada caso.

Para la cepa $\Delta staRP_{Zn}staR$ el preinóculo se creció en medio A+Y sin $ZnSO_4$, con 0,3 % sacarosa hasta una $DO_{620nm} = 0,3$, medida con un espectrofotómetro UV-VIS (Evolution 201, Thermo Scientific). Los preinóculos se diluyeron 1:100 el mismo medio hasta una $DO_{620nm} = 0,1$ dos veces consecutivas como mínimo. Posteriormente el cultivo se diluyó 200 veces en medio sin $ZnSO_4$ ó con 150 μM $ZnSO_4$. Para las cepas portadoras del plásmido pLS1ROM y derivados, los preinóculos se crecieron en A+Y con 0,8 % sacarosa hasta $DO_{620nm} = 0,3$ y luego se diluyeron 200 veces en medio A+Y fresco suplementado con 0,8 % sacarosa (S), 0,8 % maltosa (M) ó 0,4 % S + 0,4 % M (SM). Todos los cultivos se crecieron en placas multipocillo de poliestireno (Costar 3595; Corning Incorporated) a 37 °C y el crecimiento se siguió por medición de la DO_{620nm} en un lector de placas TECAN Infinite 200 PRO, tomando medidas cada 15 min durante 16h.

Para las curvas de crecimiento manuales los preinóculos crecidos hasta una $DO_{620nm} = 0,3$ se diluyeron 1:100 en el medio correspondiente y el crecimiento se siguió midiendo la DO_{620nm} en un espectrofotómetro (Evolution 201, Thermo Scientific), cada 30 minutos.

En ambos casos, el tiempo de generación o duplicación bacteriano se determinó según las siguientes ecuaciones (Pope et al., 2010):

$$G = \frac{\log 2}{K}$$

$$K = \frac{\log N_T - \log N_0}{t}$$

Donde G es el tiempo de generación, K es la velocidad de crecimiento, N_T es la DO_{620nm} a tiempo t , N_0 es la DO_{620nm} a tiempo 0 min y t es el tiempo transcurrido entre medidas de DO_{620nm} .

5 Transformación genética

La transformación de *E. coli* se llevó a cabo según el método descrito previamente (Hanahan, 1983). A las células en estado de competencia se le añadió DNA a una concentración final de 200 ng/ml, se incubaron 30 min a 4°C y se les dio un choque térmico a 42 °C durante 2 min, se incubaron nuevamente 2 min a 4°C seguidos de 1 h a 37 °C. Las células se sembraron en placas de medio LB sólido y se incubaron a 37 °C en presencia de los antibióticos correspondientes para la selección de transformantes.

Para la transformación de SPN se siguió esencialmente un método previamente descrito (Lopez et al., 1984). Las células competentes, previamente obtenidas tras varios pasos de dilución y crecimiento hasta una $DO_{620nm} = 0,2$, se diluyeron 1:20 en medio A+Y con 0,3 % de sacarosa y con 0,001 % $CaCl_2$ y se incubaron a 30 °C durante 20 min. Se añadió el DNA (~100 ng) y 25 ng/ml de factor de competencia (CSP). Las células se incubaron 40 min a 30 °C para permitir la captación del DNA y 90 min a 37 °C para permitir la expresión génica. Cuando los antibióticos usados para la selección de mutantes eran de expresión inducible (Cm o Erm), a los 70 min a 37 °C se añadieron concentraciones subinhibitorias del antibiótico y la incubación continuó otros 20 min hasta completar los 90 min. Las células se sembraron en el medio sólido A+Y 0,3 % de sacarosa en presencia de los antibióticos correspondientes para la selección de transformantes. Las placas se incubaron en estufa a 37 °C y 5 % de CO_2 . Como control se siguió el mismo procedimiento, pero sin adición de DNA.

6 Aislamiento y manipulación del DNA

6.1 Extracción de DNA cromosómico

El DNA cromosómico de SPN fue obtenido mediante el DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen) según protocolo de la casa comercial.

6.2 Purificación de plásmidos

Para la obtención de plásmidos de *E. coli* y de SPN, usados en construcciones genéticas y ensayos de actividad de topoisomerasas, se utilizó Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

La extracción de plásmidos de SPN usados para los ensayos de Sc mediante electroforesis bidimensional se realizó mediante el método de lisis neutra (Martín-Parras et al., 1998). Se recogieron por centrifugación ($6.000 \times g$, 15 min a 4 °C) 50 ml de cultivo en fase exponencial ($DO_{620nm} = 0,4$). Se lavaron las células con 1 ml de STE (0,1 M NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0), se centrifugaron durante 10 min a $12.000 \times g$ y 4 °C, y se resuspendieron en 250 μ l de 25 % (p/v) sacarosa, 0,25 M Tris-HCl pH 8,0. Se hizo un tratamiento con lisozima (10 mg/ml) y RNasa A (0,1 mg/ml) durante 5 min en hielo. Se añadieron 100 μ l de 0,25 M EDTA pH 8,0 y se incubó la mezcla 5 min en hielo. La lisis se llevó a cabo en hielo durante 15 min tras añadir 400 μ l de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 63 mM EDTA pH 8,0; 1 % Brij58; 0,4 % DOC). El lisado se centrifugó a $27.000 \times g$ durante 45 min a 4 °C. El DNA plasmídico se

precipitó durante 18 h a 4 °C, añadiendo al sobrenadante 2/3 del volumen total de 25 % (p/v) PEG 6000, 1,25 M NaCl en TE. Tras centrifugar (6.000 × g, 15 min a 4 °C), se resuspendió el precipitado en 250 µl de tampón de Proteinasa K (1M NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 9,0; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,1 % SDS) y se llevó a cabo un tratamiento con Proteinasa K (100 µg/ml) durante 30 min a 37 °C. Se extrajeron las proteínas mediante tratamiento con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (24:24:1) dos veces y una última vez con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se precipitó el DNA con 2,5 volúmenes de 100 % de etanol (-20 °C) durante 18 h. Se recogió el DNA tras centrifugación (9.000 × g, 45 min a 4 °C) y se lavó con 70 % de etanol frío, volviendo a centrifugar (9.000 × g, 15 min a 4 °C). Se dejó secar al aire en cabina de flujo laminar y se resuspendió en 20 µl de agua destilada estéril.

6.3 Electroforesis del DNA

La separación preparativa y analítica de los plásmidos, fragmentos de restricción, y productos de PCR se realizó en geles de agarosa (Condalab) al 0,8 ó 1 % preparado en tampón TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA). Como marcador de peso molecular se utilizó el 1kb Plus (Invitrogen) o NZYDNA Ladder III (NZYTech). La visualización de las bandas se realizó por tinción con GelRed Nucleic Acid Gel Stains diluido 1:20.000 en la matriz del gel. Las imágenes se adquirieron por iluminación con luz UV en el sistema Gel Doc XR o GelDoc Go Gel Imaging System (Bio-Rad).

6.4 Amplificación de fragmentos mediante PCR

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 50 µl, con 10 ng de DNA molde, 0,02 U/µl de la enzima Phusion Hot Start HiFi DNA Polymerase, 10 µl del tampón 5×, 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada oligonucleótido, y agua hasta completar el volumen. La amplificación se llevó a cabo con un ciclo inicial de desnaturalización de 1 min a 98 °C, seguido de 30 ciclos de hibridación/extensión de: 10 seg a 98 °C, 30 seg a la temperatura de fusión (T_m) correspondiente para cada par de oligonucleótidos y 30 seg a 72 °C por cada kb de DNA a amplificar. Finalmente, se añadió 1 ciclo de 5 min a 72 °C para completar todos los fragmentos amplificados y enfriamiento hasta 4 °C. La T_m de los oligonucleótidos se calculó con la herramienta "T_m-calculator" disponible en la página web de Thermo Fisher Scientific (<https://www.thermofisher.com/es/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>). La T_m utilizada en cada caso correspondió a la del oligonucleótido con la T_m más baja. Cuando los oligonucleótidos incluían colas 5' con

sitios de restricción que no hibridaban con el DNA molde, los 30 ciclos de hibridación/extensión se llevaron a cabo en dos pasos con 10 ciclos a la T_m de la región inicial de hibridación seguidos de 20 ciclos a la T_m del oligonucleótido completo.

Para la generación de los dsDNA usados en los ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA), las reacciones se llevaron a cabo con 2 μ l de DNA genómico de R6, 1.25 U/reacción de Taq Platinum DNA Polymerase, 5 μ l del tampón 10 \times , 200 μ M de cada dNTP y 0,2 μ M de cada oligonucleótido, en un volumen final de 50 μ l. La amplificación se llevó a cabo con un ciclo inicial de 30 seg a 94 °C, 35 ciclos de 15 seg a 94 °C, 30 seg a 59 °C y 30 seg a 68 °C, y enfriamiento hasta 4 °C.

Todas las PCRs se realizaron en un termociclador Veriti 96-Well (Applied Biosystems) y fueron purificadas utilizando el sistema NZyGelpure de Nzytech, Posteriormente se cuantificaron usando el Infinite 200 Pro Tecan y fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa para comprobar el tamaño de los amplicones.

6.5 Digestión y ligación de fragmentos de PCR

Cada reacción de digestión se hizo con aproximadamente 1 μ g del DNA, 6 μ l de tampón FD 10 \times (ThermoScientific), 3 μ l de la enzima de restricción y se ajustó el volumen hasta 60 μ l con agua grado biología molecular. La reacción se incubó 30 min a 37 °C para la digestión seguido de la inactivación de las enzimas por calentamiento a 65 °C ó 80 °C durante 5 ó 10 min. Las ligaciones se realizaron con aproximadamente 400 ng de cada fragmento de DNA digerido, 0,5 mM de ATP, 5 U de T4 DNA ligasa (ThermoScientific). La reacción se incubó 18h a 22 °C seguido de 10 min a 65 °C para inactivar la ligasa, según el protocolo del fabricante.

7 Inactivación de genes por el mecanismo de inserción/delección

Para la inactivación de genes se utilizó un método de inserción/delección en el cual el gen a inactivar es reemplazado total o parcialmente por un determinante de resistencia a kanamicina (Km^r), siguiendo el esquema mostrado en la Figura 4. Para ello se amplificó, por un lado, un fragmento de DNA que determina la resistencia a Km mediante PCR (PCR A) a partir de DNA genómico de cepa mutante previamente construida en el laboratorio con el Km^r insertado (Martín-Galiano et al., 2014), utilizando los oligonucleótidos Km_Kpn y Km_Bam . La reacción se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.4 con una T_m de 61.8 °C. Por otro lado, se amplificaron dos fragmentos de PCR de ~500pb correspondientes a las regiones flanqueantes 5'

(“upstream” PCR B) y 3’ (“downstream” PCR C) del gen a inactivar. Los oligonucleótidos utilizados en todos los casos incluían en su secuencia dianas de restricción para su posterior digestión y ligación. Dicha ligación se llevó a cabo de forma secuencial ligando primero las PCRs A y B entre sí, amplificando el fragmento de ligación (PCR D), y ligando después éste con la PCR C (Figura 2). Después, esta ligación es amplificada con el oligonucleótido 5’ de la PCR B y el oligonucleótido 3’ de la PCR C obteniendo así la PCR E que incluye el casete de Km^r flanqueado por las regiones “upstream” y “downstream” del gen a inactivar. Finalmente, se usaron ~300 ng de PCR E para transformar R6 y los transformantes fueron seleccionados con 250 $\mu\text{g/ml}$ de Km . Los clones aislados se crecieron en presencia de antibiótico y se extrajo su DNA cromosómico. Para comprobar la inserción/delección del gen en cuestión, se amplificó un fragmento de PCR con oligonucleótidos que hibridan con regiones que flanquean la zona de inserción y se confirmó su secuencia mediante secuenciación.

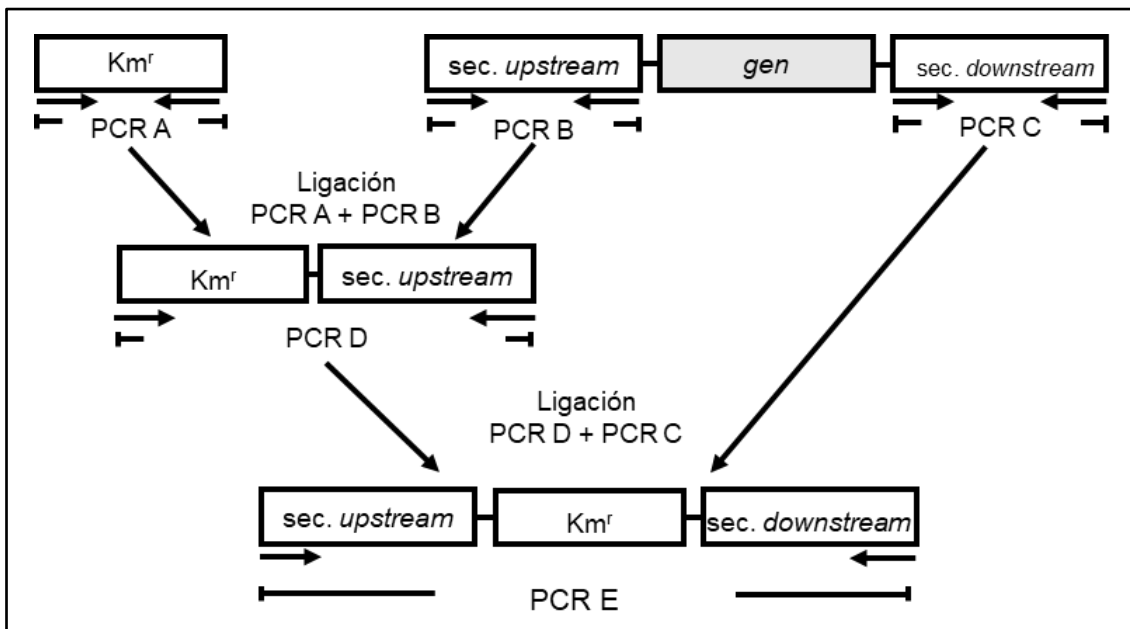


Figura 4. Esquema de la inactivación de genes por el método de inserción/delección. PCR A es el producto de la amplificación de Km^r . PCR B y PCR C son amplicones de regiones “upstream” y “downstream” del gen a deleccionar. PCR D amplicon del producto de la ligación de la PCR A y PCR B. El producto final obtenido tras la ligación de la PCR D y PCR C fue amplificado (PCR E) y usado para transformar SPN R6.

El casete Km^r (incluyendo un terminador de la transcripción) se insertó de forma que su secuencia codificante estuviera en la misma orientación que el gen interrumpido.

El fragmento resultante tiene secuencias homólogas (“upstream” y “downstream”) al genoma de R6 para permitir su recombinación e inserción en el *locus* a interrumpir.

8 Construcción de plásmidos para purificar StaR y Spr0488

8.1 Construcción del pET28a-*staR*

Para sobreproducir y purificar StaR, se amplificó un fragmento de PCR que contiene su gen codificante a partir del DNA genómico de R6 con los cebadores spr0929_F y spr0929_R (Tabla 4). El amplicón fue digerido con NheI y BamHI y clonado en pET28a cortado con las mismas enzimas. El plásmido fue transferido a células de *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) y los transformantes se seleccionaron 50 µg/ml de Km. Las colonias seleccionadas se crecieron en presencia del antibiótico, los plásmidos recombinantes fueron aislados como se describe en el apartado 6.2 y su secuencia fue confirmada mediante secuenciación.

8.2 Construcción del pET28b-*spr0488*

Para expresar y purificar la proteína Spr0488, se construyó el plásmido recombinante pET28b-*spr0488*. Para ello, *spr0488* fue amplificado con los oligonucleótidos 0488F_NdeI y 0488R_SacI. La reacción se hizo como se describe en 6.4 con una Tm de 66 °C. El amplicón y el plásmido pET28b se cortaron con *NdeI* y *SacI* y se ligaron como se describe en 6.5. El producto de la ligación se introdujo por transformación en *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) y los transformantes se seleccionaron con 50 µg/ml de Km. Las colonias seleccionadas se crecieron en presencia del antibiótico, los plásmidos recombinantes fueron aislados como se describe en el apartado 6.2 y su secuencia fue confirmada mediante secuenciación.

9 Ensayos de análisis de Sc

9.1 Electroforesis bidimensional

La electroforesis en geles de agarosa para el estudio del nivel de Sc de los plásmidos se realizó siguiendo el protocolo originalmente descrito (Brewer & Fangman, 1987), adaptado según el tamaño del plásmido analizado (Schvartzman et al., 2013). Para la primera dimensión, se corrieron geles de agarosa al 0,4 % (p/v) en TBE (90 mM Tris, 90 mM ácido bórico, 2 mM EDTA), a 1,5 V/cm durante 20 h y a temperatura ambiente. Tanto al gel como al tampón de desplazamiento se les añadió cloroquina (Sigma) a una concentración de 1 µg/ml. La segunda dimensión se realizó en geles de

1 % de agarosa en TBE y se corrieron a 7,5 V/cm durante 9 h. La electroforesis se realizó a 4 °C en presencia de 2 µg/ml de cloroquina, tanto en el gel como en el tampón de corrida. Para su visualización, los geles se tiñeron en una solución de BrEt a 0,5 µg/ml en TBE durante 1 h y se adquirieron imágenes en un transiluminador de luz UV con GelDoc Go Gel Imaging System.

9.2 Determinación de la densidad de Sc (σ)

Para calcular la densidad de Sc del DNA (σ) se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$\sigma = \frac{\Delta Lk}{Lk_0}$$

$$Lk_0 = N/10.5$$

Donde N es el tamaño de la molécula de DNA en pb y 10.5 corresponde al número de pb por una vuelta completa de cada una de las dos cadenas de polinucleótidos de la doble hélice (Schvartzman et al., 2013; Vologodskii, 1998). ΔLk se corresponde con el ΔWr del topoisómero más abundante. La determinación del ΔWr del topoisómero más abundante se llevó a cabo a partir del valor de ΔWr del topoisómero que migró con un $\Delta Lk = 0$ en la segunda dimensión (Figura 5). En el caso del pLS1 este topoisómero se corresponde con un $\Delta Wr = -14$ si se emplean 2 µg/ml de cloroquina en la segunda dimensión.

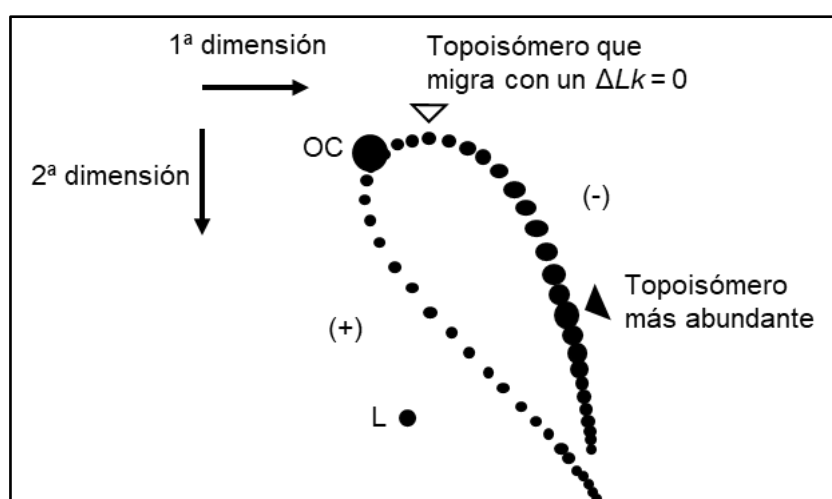


Figura 5. Esquema de la distribución de topoisómeros del plásmido pLS1 tras electroforesis bidimensional. La electroforesis se lleva a cabo en geles de agarosa en presencia de 1 y 2 µg/ml de cloroquina en la primera y segunda dimensiones, respectivamente. Las flechas en la esquina superior

izquierda indican la dirección de ejecución de la primera y segunda dimensión. OC, forma circular; L, forma lineal. Los topoisómeros superenrollados negativamente (-) están a la derecha del topoisómero con $\Delta Lk = 0$ y los topoisómeros superenrollados positivamente (+) a la izquierda. La punta de flecha blanca indica el topoisómero que migra con ΔLk de 0 en la segunda dimensión, la punta negra indica el topoisómero más abundante.

10 Purificación de proteínas

10.1 Hiperproducción y purificación de Topo I y girasa (GyrA₂GyrB₂)

Para Topo I se utilizó el sistema de expresión del vector pQE-1 (Quiagen), que permite la hiperproducción de las proteínas fusionadas a una cola de 6 His en su extremo N-terminal. En este sistema, el gen que codifica la proteína de interés se encuentra bajo el control de un promotor del fago T5, reconocido por la RNA polimerasa de *E. coli*, y dos secuencias del operador *lac*, que permiten la represión del promotor por medio de la proteína represora LacI. La inducción de la expresión se llevó a cabo mediante la adición de IPTG, que se une a la proteína LacI inactivándola, permitiendo así la expresión de los genes bajo el control de promotor de T5. Para la expresión de Topo I, la cepa de *E. coli* M15(pREP4) se transformó con el plásmido pQE-SPN*topA*. La inducción de los cultivos y la purificación de Topo I se realizó siguiendo el protocolo descrito por García y colaboradores (García et al., 2011) modificado. Se crecieron 500 ml de cultivo a 37 °C en medio LB con 100 µg/ml de Amp (para seleccionar el plásmido derivado de pQE-1), y 25 µg/ml Km (para la selección de pREP4), hasta $DO_{600nm} = 0,6$. Se añadió 1 mM de IPTG y el cultivo se incubó 1 h a 37 °C. Las células se recogieron por centrifugación ($6.000 \times g$, 15 min a 4 °C), se lisaron durante 1 h a 4 °C en 10 ml de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol) con 1 mM PMSF, 1 mg/ml de lisozima y 0,2 % Triton X-100 y se sonicaron (sonicador Q500, Qsonica LLC) mediante 15 pulsos de 20 s con 1 min de enfriamiento entre pulsos al 100 % de amplitud. Las muestras se centrifugaron ($10.000 \times g$, 10 min a 4 °C) y el sobrenadante resultante, conteniendo las proteínas solubles, se filtró con un filtro de jeringa de 0,45 µm. La proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad con agarosa Ni-NTA (Qiagen). Los 10 ml del sobrenadante filtrado se mezclaron con 5 ml de resina Ni-NTA al 50 % mediante agitación lenta a 4 °C durante 1 h y la mezcla se empaquetó por gravedad en una columna. Se realizó un primer lavado con 15 ml de tampón de lisis y un segundo lavado con 15 ml de tampón de lavado (50 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 60 mM imidazol) y se eluyeron las proteínas en 3 ml de tampón de elución (50 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol). El eluido se dializó con casetes de diálisis Slide-A-

Lyzer, 20K de MWCO (Thermo Scientific) frente a tampón de diálisis (50 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 1 mM DTT), se hicieron dos cambios de tampón (a 1 h y 2 h de diálisis) y luego se dejó dializando a 4 °C durante toda la noche. Las proteínas purificadas se almacenaron a -20 °C con 50 % de glicerol.

Para la hiperproducción y purificación de la girasa se realizó un protocolo ya descrito (Balsalobre et al., 2011). Las cepas de *E. coli* M15(pREP4) que llevaban plásmidos recombinantes pQE1 con los genes *gyrA* o *gyrB* de R6 se cultivaron durante la noche a 37 °C en medio LB, se diluyeron 20 veces en 1 l de medio con 100 µg/ml de Amp y se cultivaron a 37 °C (para sobreproducción de la subunidad GyrB) o a 30 °C (para sobreproducción de la subunidad GyrA) hasta alcanzar $OD_{600} = 0,6$. En este momento, se añadió IPTG 1 mM y el crecimiento continuó durante otros 30 min. Las bacterias se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 4 ml de tampón de columna (50 mM NaH_2PO_4 y 300 mM NaCl) que contenía 10 mM de imidazol, antes de congelarlas en hielo seco. La suspensión se descongeló a 0 °C y se incubó durante 30 min con 1 mg/ml de lisozima y 0,2 % de Triton X-100. Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación ($10.000 \times g$ durante 20 min a 4 °C) y el sobrenadante se mezcló con 2 ml de suspensión de resina Ni-NTA al 50 % (Qiagen) por agitación lenta a 4 °C durante 1 h. La mezcla se empaquetó por gravedad en una columna y se lavó con 8 ml de tampón de columna que contenía 20 mM de imidazol, seguido de dos lavados con 50 mM y 100 mM de imidazol en tampón de columna. Las proteínas con 6×His se eluyeron con 250 mM imidazol en tampón de columna. Las fracciones con el eluido se examinaron mediante electroforesis SDS-PAGE, y aquellas que contenían proteínas del tamaño esperado se dializaron a 4 °C frente a TrisHCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM, 0,2 mM EDTA, ditiotreitól (DTT) 1 mM y glicerol al 50 %.

10.2 Hiperproducción y purificación de StaR

Para la hiperexpresión de Spr0929 se utilizaron las condiciones de inducción previamente estandarizadas en el laboratorio. Spr0929 se purificó mediante cromatografía de afinidad utilizando columnas HiTrap Chelating HP (Amersham-Merck, Madrid, España) y un sistema AKTA Prime (Amersham Bioscience, Amersham, Reino Unido) a partir de células *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) que albergan el plásmido recombinante pET28-*staR*. La cepa se cultivó en medio LB con 50 µg/ml de Km a 37 °C durante la noche (~18 h). El cultivo se diluyó 1:1000 en medio LB con 50 µg/ml de Km y se creció hasta una $DO_{600\text{ nm}} = 0,6$. La superproducción de StaR se consiguió con 1 mM de IPTG durante 1 h a 37 °C. Las células se recogieron mediante centrifugación (11.400

×g 15 min a 4 °C), se lavaron con PBS 1× (137 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4) y se resuspendieron en 72 ml de tampón A (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 0,5 M). Las células se trataron con 10 µg/ml DNasa, 20 µg/ml de lisozima y 1,3 µg/ml de PMSF durante 10 min en hielo, se sonicaron (8 ciclos de 20 segundos sonicación/ 60 segundos de enfriamiento) y los extractos se clarificaron mediante ultracentrifugación a 100.000 × g durante 1 h a 4 °C. Se realizó un fraccionamiento de proteínas en dos pasos con sulfato amónico al 40 % y 60 % de saturación. El sedimento con una saturación del 60 % se suspendió en 51 ml de tampón A suplementado con 40 mM de imidazol y se aplicó a una columna HiTrap de 5 ml equilibrada con el mismo tampón. La elución de proteínas se realizó con 100 ml de un gradiente lineal de imidazol (100 a 400 mM) y se recogieron fracciones de 5 ml que luego se analizaron mediante SDS-PAGE. El imidazol se eliminó de las muestras mediante diálisis frente a Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 0,1 M y glicerol al 50 %.

10.3 Hiperproducción y purificación de Spr0488

Para estandarizar las condiciones de hiperexpresión de *spr0488*, la cepa de *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) con el plásmido pET28b-*spr0488* se cultivó en medio LB con 50 µg/ml de Km a 37 °C durante la noche (~18h). Al día siguiente, el cultivo se diluyó 1:50 en 50 ml de medio LB con 50 µg/ml de Km y se creció hasta una DO_{600 nm} = 0,4. La expresión de *spr0488* se indujo con 1 mM de IPTG a 37 °C y se sacaron muestras antes y 30 min, 1h ó 2h después de la inducción. Las células se recogieron mediante centrifugación (10.000 × g durante 15 a 4 °C), se resuspendieron en 50 mM de Tris-HCl pH 7,5, 2 mM EDTA, 0,1 % Triton X100 y 0,1 mg/ml de lisozima, y se incubaron 30 min a 37 °C. El lisado se pasó 3 veces a través de una aguja 25G para fragmentar el DNA. Se centrifugó de nuevo (13.000 × g durante 10 min a 4 °C), se recogió el sobrenadante (fracción soluble) y el precipitado se resuspendió en PBS1× (fracción insoluble), y ambas muestras se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE para determinar qué fracción contenía la proteína Spr0488. Puesto que, tras la inducción, la proteína se encontraba mayoritariamente en la fracción insoluble, se hicieron pruebas de inducción a 30 °C. Se tomaron muestras a distintos tiempos y se procesaron como se ha descrito anteriormente. Tras las pruebas realizadas el protocolo de inducción utilizado para la purificación de Spr0488 fue el siguiente. Se crecieron cultivos de BL21-CodonPlus (DE3)[pET28b-*spr0488*] a 37 °C durante 18h. El cultivo se diluyó 1:20 en 2 l de medio fresco y se creció a 37 °C hasta una DO_{600 nm} = 0,2. En ese momento, se bajó la temperatura a 30 °C y se cultivó de nuevo hasta una DO_{600nm} = 0,4. La expresión de *spr0488* se indujo con 1 mM de IPTG durante 1 h a 30 °C. Las células se recogieron

mediante centrifugación, se lavaron con PBS 1× y se suspendieron en 56 ml de tampón A (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 0,5 M) con 20 µg/ml de lisozima, 10 µg/ml de DNasa y 1 mM de PMSF. Las células se lisaron por sonicación en las mismas condiciones que las descritas anteriormente y los extractos se clarificaron mediante ultracentrifugación a $119.000 \times g$ durante 1 h a 4 °C. Se recogió el sobrenadante y se añadió imidazol hasta una concentración final de 20 mM. Se filtró con filtro de 0,45 µm y se aplicó a una columna HiTrap Chelating HP de 5 ml equilibrada en tampón A con 20 mM de imidazol. La elución de proteínas se logró con 120 ml de un gradiente de imidazol (20-400 mM) en el sistema AKTA prime y las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE. El imidazol se eliminó de las muestras mediante diálisis frente a Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 0,2 M, se hicieron cambios del tampón a 1 h y 2 h de diálisis a 4 °C y luego se dejó durante toda la noche tras lo cual, se añadió glicerol para conseguir una concentración final del 50 %.

11 Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis de proteínas se llevó a cabo en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes en presencia de SDS (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Para ello, se emplearon los geles “precast” Criterion™ TGX Stain-Free™ (Bio-Rad), Any kD™ ó con 4-20 % de gradiente de poliacrilamida. Las muestras se diluyeron en tampón de desnaturización (0,3 M Tris-HCl pH 6,8, 10 % p/v SDS, 50 % v/v glicerol, 0,05 % azul de bromofenol y 0,5 M β-mercaptoetanol) y se calentaron durante 5 min a 100 °C. La electroforesis se realizó a 200 V a temperatura ambiente, en tampón de corrida (25 mM Tris, 190 mM glicina, 0,1 % SDS). Como marcador de peso molecular se usó el Precision Plus Protein™ Dual Color (Bio-Rad). Para su visualización, los geles se tiñeron con Bio-Safe™ Coomassie Stain (Bio-Rad) según el protocolo indicado por el fabricante.

12 Análisis de proteínas por “Western blot”

Se obtuvieron células ($\sim 5 \times 10^5$) mediante centrifugación de 10 ml de cultivo a $OD_{620nm} = 0,4$. Las células se resuspendieron en PBS 1×, se diluyeron en tampón de desnaturización y se hirvieron durante 5 min. Los lisados se fraccionaron en geles de proteína Any kD™ Criterion™ TGX Stain-Free™. Se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0,2 µm con el sistema de transferencia Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) a 25 V, 1 A, durante 30 min. Las membranas se bloquearon con una solución de bloqueo de leche en polvo al 5 % (p/v) en TTBS (20 mM Tris-HCl pH 7,5,

500 mM NaCl, 0,1 % v/v Tween-20) durante 2 h, se realizaron 3 lavados de 5 min con TTBS y se incubaron con anti-Topo I (diluido 1:500), anti-GyrA (diluido 1:2000), anti-RpoB (diluido 1:2000), anti-StaR (diluido 1:1000), o anti-His (Millipore, diluido 1:1000) diluidos en solución de bloqueo. Como anticuerpo secundario se utilizó HRP-peroxidasa anti-IgG de conejo (Sigma) o Anti-IgG-HRP de ratón (para el primario anti-His). Para revelar la membrana se utilizó el kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent (Thermo-Fisher). La señal se detectó con un sistema ChemiDoc™ MP (Bio-Rad). Las imágenes se analizaron utilizando el software Image Lab™ (Bio-Rad).

13 Purificación de anticuerpos

13.1 Para ensayos de “Western blot”

Los anticuerpos primarios anti-Topo I, anti-GyrA, y anti-RpoB se purificaron por afinidad a partir de antisueros obtenidos de conejo, usando proteínas purificadas unidas a membranas de PVDF. Las membranas se incubaron durante 50 min en solución de bloqueo preparada con leche en polvo 5% (p/v) disuelta en tampón PBS 1×, se lavaron 3 veces durante 5 min con PBS 1× y seguidamente se incubaron durante 2 horas en agitación con el antisuero. Se retiró el antisuero y las membranas se lavaron durante 10 min, 3 veces, con PBS 1×. Para la elución del anticuerpo, se incubó la membrana durante 20 min en agitación con 0,2 M glicina, 1 mM EGTA pH 2,7. Se recogió el eluido y se neutralizó con 100 mM Tris base (sin ajuste de pH). Los anticuerpos purificados se almacenaron a -20°C.

13.2 Anticuerpos para ensayos de Co-IP

Para los ensayos de Co-IP *in vitro* e *in vivo* los anticuerpos anti-Topo I y anti-StaR se purificaron como se describió previamente (Ferrándiz et al., 2021) mediante un protocolo de tres pasos. Primero, se enriquecieron en IgG mediante la unión de los antisueros a una columna de 1 ml HiTrap Protein G HP (GE Healthcare). Para ello, los anticuerpos se diluyeron 2 veces en PBS 1×, se filtraron a través de un filtro de 0,20 µm y se pasaron por la columna. La columna se lavó con PBS 1× a un flujo de 1 ml/min durante 30 min usando una bomba peristáltica y los anticuerpos se eluyeron con 0,5 N NH₄OH. Se recogieron 10 fracciones de 0,5 ml y se midió la A_{280nm} de todas las fracciones. Se juntaron las fracciones con mayor valor de A_{280nm} y se dializaron frente a 500 volúmenes de PBS 1×.

El segundo paso fue la eliminación de IgGs no específicas utilizando 1,5 ml de solución de agarosa con glioxal (High Density Glyoxal 4 Rapid Run, ABT) unido a BSA.

Para ello la agarosa se lavó con 0,1 M bicarbonato sódico pH 10. Se añadió BSA previamente dializada en el mismo tampón y se incubó a temperatura ambiente 1 h. A la mezcla se le añadieron 10 mg de borohidruro de sodio para fijar la BSA al glioxal y se mezcló en agitador orbital durante 30 min a temperatura ambiente. Esta solución se empaquetó en una columna, se lavó 10 veces con PBS 1×, una vez con 0,5 N NH₄OH para eliminar el exceso de BSA no unido al glioxal, y se lavó de nuevo con PBS 1×. Después del lavado de la columna, las inmunoglobulinas eluidas en el primer paso se diluyeron en PBS 1× en un volumen de 10 ml y se incubaron con el glioxal-BSA empaquetado en columna durante 30 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 200 × g 2 min y se recogió el filtrado.

El tercer paso fue la purificación por afinidad antigénica específica con columnas de agarosa-glioxal unidas a ~ 6 mg de cada antígeno (H₆-Topo I o H₆-StaR), para lo cual se siguió el mismo protocolo que el descrito para BSA en el apartado anterior. Los anticuerpos obtenidos en el segundo paso se diluyeron en PBS 1× (volumen final de 10 ml) y se cargaron en las columnas con la resina unida al antígeno correspondiente. Se incubó 30 min a temperatura ambiente y se lavó 3 veces la columna con PBS 1×. Los anticuerpos purificados se eluyeron con 0,5 N NH₄OH.

14 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas y anticuerpos se realizó utilizando el sistema Qubit Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Para cuantificar proteínas a partir de imágenes de “Western blot” se utilizó el programa informático Image Lab (Bio-Rad) utilizando RpoB como proteína de referencia.

15 Digestión de Spr0488 con trombina

La eliminación de los 20 residuos adicionales fusionados en el extremo N-terminal de H₆-Spr0488 se llevó a cabo con el kit “Thrombin cleavage capture kit” de Novagen cuya trombina está unida covalentemente a biotina. Para la optimización a pequeña escala, se incubaron 2, 5, 10, 20 ó 40 mU de trombina biotinilada con 10 µg de H₆-Spr0488 purificada en un volumen final de 50 µl en el tampón recomendado por el fabricante. Las reacciones se incubaron a 21 °C en un termociclador y se tomaron muestras de 10 µl a las 2, 4, 6 y 8 h. Se añadió 4 × tampón de carga Laemmli (Bio-Rad) a cada muestra y se analizaron en un gel Criterion™ TGX Stain-Free™ 4-20 % de poliacrilamida (Bio-Rad) que se tiñó con Bio-Safe™ Coomassie Stain (Bio-Rad). Para la digestión a gran escala, se incubaron 650 µg de H₆-Spr0488 con 325 mU de trombina biotinilada a 21 °C durante toda la noche en volumen final de 3,25 ml. Posteriormente,

se añadieron a la reacción 25 μ l de una mezcla de agarosa-streptavidina al 50 % y se incubó 30 min a temperatura ambiente con agitación suave. La mezcla fue posteriormente filtrada utilizando las columnas suministradas en el kit centrifugando 5 min a $500 \times g$. El filtrado libre de trombina se analizó de nuevo en un gel Criterion™ TGX Stain-Free™ 4-20 % de poliacrilamida (Bio-Rad), se midió la concentración de proteína y se añadió glicerol al 50 % para su almacenamiento y posterior utilización.

16 Cromatografía de exclusión por tamaño

El estado de oligomerización de H₆-Spr0488 antes y después de su digestión con trombina (Spr0488_D) se analizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna de Superdex 200 10/30 GL (Cytiva) y el sistema AKTA prime. Para calibrar la columna se utilizó el kit "Gel Filtration Calibration kit LMW" (Cytiva), que incluye las proteínas aprotinina (Mr=6.500 Da), ribonucleasa A (Mr=13.700 Da), anhidrasa carbónica (Mr=29.000 Da), ovoalbumina (Mr=43.000 Da), conalbumina (Mr=75.000 Da), y azul de dextrano 2000 (Mr=2.000.000 Da). Además, se añadió alcohol deshidrogenasa (Mr=150.000 Da) (Sigma). Todas las proteínas se resuspendieron en tampón B (Tris 50 mM pH 8.0, 300 mM NaCl) a 20 mg/ml (ribonucleasa A, ovalbumina, conalbumina y alcohol deshidrogenasa) ó 10 mg/ml (aprotinina y anhidrasa carbonica). El azul de dextrano se resuspendió a 1 mg/ml.

Previamente a la calibración, la columna se equilibró con 2 volúmenes del tampón B y se inyectaron 100 μ l de azul de dextrano, cuyo elevado Mr hace que no pueda entrar en los poros de la matriz y eluya con el volumen de vacío de la columna (V_0). Tras pasar un volumen de columna se inyectaron 100 μ l de una mezcla conteniendo 3 mg/ml de ribonucleasa A, ovalbumina, conalbumina y alcohol deshidrogenasa, y 2 mg/ml de aprotinina y anhidrasa carbonica. La elución de las proteínas se siguió por absorbancia en el rango del ultravioleta (UV). Se generó la curva de calibración representando el coeficiente de distribución de cada proteína (K_{av}) frente al Log de su peso molecular (Log(Mr)) donde K_{av} se obtiene de a partir de la fórmula:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_c - V_0}$$

Siendo V_e el volumen de elución de la proteína y V_0 el volumen de vacío que corresponde al V_e del azul de dextrano. V_c es el volumen geométrico de la columna y responde a la fórmula:

$$V_c = r^2 \times \pi \times l$$

Donde r es el radio de la columna y l su longitud. Para la columna S200 Superdex 10/300 GL, $V_c=24$ ml.

El estado de oligomerización de H₆-Spr0488 o Spr0488_D se analizó en tampón Tris 50 mM pH 8 con 100, 200 ó 300 mM de NaCl, y en el tampón utilizado para los ensayos de actividad de la Topo I (20 mM Tris pH 7,8, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT). Para ello, 500 µl de cada proteína se dializaron frente a cada uno de los tampones a utilizar. Se equilibró la columna en el mismo tampón y se realizó una curva de calibración con cada uno de ellos. Finalmente, se inyectaron 100 µl de muestra conteniendo 0,03 mg de proteína, y se siguió el perfil de elución por absorbancia a luz UV. Para el lavado y equilibrado de la columna se utilizaron flujos de 0,75 ml/min y para las inyecciones el flujo se bajó a 0,5 ml/min. En todos los casos, las inyecciones se realizaron con una jeringa Hamilton y un "loop" de 100 µl. En cada uno de los tampones analizados se obtuvo un valor de V_e para H₆-Spr0488 y Spr0488_D y aplicando la fórmula (1) se determinó el valor de K_{av} para cada una de ellas. La estimación de su masa molecular se llevó a cabo representando el valor de K_{av} en la recta de regresión de la curva de calibración.

17 Ensayos de actividad de topoisomerasas

17.1 Ensayos de actividad de Topo I

La actividad de Topo I se estimó cuantificando su capacidad de relajación del plásmido pBR322 según el protocolo descrito previamente (García et al., 2011b). Las reacciones se realizaron en un volumen de 200 µl conteniendo 0,5 µg de pBR322 CCC, 20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 50 µg BSA/ml, 1 nM de Topo I y las concentraciones indicadas de StaR o Spr0488. Las mezclas se incubaron durante 1 h a 37 °C y la reacción se paró por adición de 50 mM EDTA e incubación durante 2 min a 37 °C. Posteriormente se añadieron 100 µg/ml de proteinasa K y 1 % SDS y se volvió a incubar durante 1 h a 37 °C. Se precipitó el DNA con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío y se incubó a -20 °C durante 18 h. Se centrifugó a 13.000 × g durante 15 min a 4 °C y el DNA se lavó con etanol al 70 %, volviendo a centrifugar a 16.000 × g, 15 min a 4 °C. Se secó el precipitado y se resuspendió en 20 µl de agua. Los productos de las reacciones se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % (p/v) preparada en TAE 1× (Tris 40 mM pH 7,5, ácido acético 19 mM, EDTA 1 mM), corriendo a 1,8 V/cm durante 18 h, a temperatura ambiente. Los geles se tiñeron con 0,5 µg/ml BrEt en TAE durante 1 h y se adquirieron imágenes en un transiluminador de luz UV. El DNA se cuantificó mediante densitometría usando el programa Image Lab de BioRad.

17.2 Ensayos de actividad de Girasa

Los ensayos de actividad de Sc de la girasa se llevaron a cabo como se describió previamente (Fernandez-Moreira et al., 2000) utilizando pBR322 relajado (Inspiralis, Reino Unido) como sustrato. La reacción se realizó en un volumen final de 100 μ l conteniendo: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1,5 mM ATP, 50 μ g/ml BSA, 20 mM KCl, 700 mM glutamato potásico, 0,45 μ g de pBR322 relajado, 4 nM de girasa reconstituída previamente (mezclando cantidades equimolares de las subunidades GyrA y GyrB incubadas durante 30 min en hielo) y las concentraciones indicadas de StaR o Spr0488. La mezcla se incubó durante 1 h a 37 °C y la reacción se paró añadiendo 35 mM de EDTA. Después de una incubación adicional de 1 min a 37 °C se añadieron 1 % SDS y 50 μ g/ml de proteinasa K y se incubó 15 min a 37 °C. Se precipitó el DNA con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío y se incubó a -20 °C durante 18 h. Se centrifugó a 12.000 \times g durante 15 min a 4 °C y el DNA se lavó con etanol 70 %, volviendo a centrifugar a 16.000 \times g, 15 min a 4 °C. Se secó el precipitado y se resuspendió en 24 μ l de tampón de electroforesis. Las muestras fueron analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % (p/v) preparada en TAE 1 \times , corriendo a 2 V/cm durante 12 h, a temperatura ambiente. Los geles se tñeron en una solución de 0,5 μ g/ml de BrEt en TAE y se adquirieron imágenes en un transiluminador de luz UV. Se cuantificó el DNA mediante densitometría.

18 Ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA)

Se estudió la capacidad de unión de Spr0488 a varios DNA sustratos diferentes. Para los ensayos con dsDNA con una A adicional en sus extremos 3' se generó un fragmento de PCR de 261 pb amplificando una región del gen *dprA* con los oligonucleótidos DprA1_F y DprA1_R biotinilados en el extremo 5'. Los ensayos de unión se llevaron a cabo en un volumen de 100 μ l con 200 fmoles del sustrato, 20 mM Tris-HCl pH 7,8, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, y distintas concentraciones de H₆-Spr0488 ó Spr0488_D. La mezcla de reacción se incubó durante 30 min a 37 °C, transcurrido lo cual se añadieron 11 μ l de una solución de 30 % glicerol, 1 % xilen cyanol, 1 % azul de bromofenol y 10 mM EDTA. Se cargaron 30 μ l de la mezcla en un gel de 5 % poliacrilamida (5 % Criterion TBE Polyacrylamide Gel, Bio-Rad) que se corrió a 150 V durante 1h y 50 min en cámara fría (4 °C). El DNA se transfirió a una membrana de Nylon-N+ durante 2 h a 300 mA en TAE 1 \times utilizando un sistema de transferencia semiseco. El DNA se fijó a la membrana mediante irradiación con luz UV (120000 μ J/cm²) durante 1 min. Para revelar se utilizó el "Chemiluminiscent Nucleic Acid

Detection Module” (ThermoFischer) siguiendo el protocolo del fabricante y las imágenes se adquirieron con el sistema ChemiDoc MP (Bio-Rad).

En los ensayos de unión con sustratos fluorescentes se utilizaron dos moléculas de ssDNA (Cy-80 y Cy-dT) y una molécula de dsDNA con un extremo 3'-protuberante (O_N) resultado de la hibridación del oligo fluorescente Cy-50 con el oligo N80. La secuencia de Cy-50 corresponde a una región aleatoria del locus *dprA*; Cy-80 es idéntico a Cy-50 con una secuencia adicional de 30 nt en su extremo 5', y el oligo Cy-dT es un polímero de timinas de 50 nt de longitud. Cy-50 y Cy-80 tienen un 47 % de GCs y un ΔG de -3,4 kcal/mol en 50 mM de NaCl para la formación espontánea de estructuras secundarias internas (según “Oligo Analyzer” de “Integrated DNA Technologies”; <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>). Este valor de ΔG implica una baja probabilidad de formación de estructuras secundarias, puesto que es superior al valor de tolerancia ($\Delta G = -5$ kcal/mol).

El sustrato O_N se generó hibridando cantidades equimoleculares (50 nM) de Cy-50 y el oligo N80 (80 nt, 50 de los cuales son complementarios a Cy-50) en presencia de 10 mM de Tris pH8 y 50 mM de NaCl. Las mezclas se incubaron en un termociclador 2 min a 95 °C, seguido de un ciclo de enfriamiento lento hasta 25 °C (“ramping rate” de 1,3 %, tiempo de enfriamiento 40 min), 5 min a 25 °C y enfriamiento rápido a 4 °C (“ramping rate” de 100 %).

Los ensayos de unión se realizaron incubando 10 nM de DNA con diferentes concentraciones de Spr0488_D ó H₆-Spr0488 en 20 μ l en presencia de 20 mM Tris pH7,8, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT y 150 mM NaCl, a 37 °C durante 20 min. Se añadieron 4 μ l de tampón de carga Blue Juice (Bio-Rad) a las mezclas de reacción y se cargaron en geles de TBE con 5 % de poliacrilamida (5 % Criterion TBE Polyacrylamide Gel, Bio-Rad). Las muestras se corrieron a 100 V durante 90 min a 4 °C y los geles se visualizaron en un ChemiDoc MP (Bio-Rad).

19 Ensayos de Co-inmunoprecipitación (Co-IP) *in vitro*

Para la Co-IP *in vitro*, el tampón utilizado fue 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,4, NaCl 50 mM, Nonidet P40 al 0,5 %. Topo I purificada se dializó frente a ese tampón y StaR se diluyó 1000 veces en el mismo. Se mezclaron 2 μ g de Topo I y 2 μ g de StaR en 200 μ l de tampón durante 2 h a 4 °C con rotación a temperatura ambiente. Por otro lado, los anticuerpos anti-Topo I y anti-StaR (purificados como se describe en el apartado 13.2) se unieron 4 μ g de a Dynabeads® Protein G (Invitrogen, ThermoFischer) durante 2 h a temperatura ambiente con rotación y se agregaron a la mezcla de proteínas. Después

de la incubación (2h) la mezcla se lavó 3 veces y se recogió de la gradilla magnética con tampón de carga (2 % SDS, 0,0004 % azul bromofenol, 10 % de glicerol y 125 mM Tris-HCl) sin β -mercaptoetanol. Las muestras se hirvieron durante 5 min, y se separaron en un gel SDS-PAGE 4-20 % durante 1 h a 170 V. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie (Bio-Rad) durante 1 h siguiendo protocolo del fabricante.

20 Ensayos de Co-inmunoprecipitación (Co-IP) *in vivo*

Para la Co-IP *in vivo*, se agregaron 10 ml de tampón de fijación (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM, EGTA 0,5 mM, EDTA 1 mM, 11 % de formaldehído (v/v)) a 100 ml de cultivo crecido hasta una $OD_{620nm} = 0,4$ (7×10^9 células) con o sin 150 μ M ZnSO₄. Esta mezcla se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. La fijación se detuvo añadiendo 10 ml de solución de *quenching* (glicina 1,25 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM, EGTA 0,5 mM, EDTA 1 mM). La mezcla se transfirió a un baño de hielo/agua y se incubó en agitación con un agitador orbital durante 30 min a 4 °C. Las células se recogieron mediante centrifugación a $10.000 \times g$ a 4 °C durante 2 min y se lavaron dos veces con 50 ml de PBS 1 \times frío. Finalmente, las células se recogieron mediante centrifugación y se resuspendieron en 1 ml de tampón de lisis (Hepes-KOH 50 mM, pH 7,5, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 1 % (v/v), 0,1 % (p/v) DOC, PMSF 1 mM), que contenía 100 μ g/ml de RNasa A. Se sonicaron utilizando 25 ciclos (30 seg encendido/30 seg enfriamiento) en un sonicador Bioruptor® Pico y la suspensión sonicada se centrifugó a $21.000 \times g$ durante 10 min a 4 °C. Se apartaron 100 μ l del sobrenadante y se almacenaron a -20 °C como control del extracto.

A continuación, se unieron 10 μ g de los anticuerpos anti-Topo I y anti-StaR (purificados como se describió en el apartado 13.2) a 50 μ l de proteína G Dynabeads® de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para la inmunoprecipitación, se agregaron 500 μ l de suspensión sonicada a 200 μ l del complejo Dynabeads®-anticuerpo y se incubaron en un mezclador rotatorio durante 4 h a 4 °C. Se colocó el tubo sobre una gradilla magnética y se eliminó el sobrenadante. Se lavó una vez con tampón de lisis, una vez con tampón de lisis suplementado con NaCl 500 mM y una vez con tampón de lisis con 250 mM de LiCl. Se eliminó el sobrenadante y las proteínas (antígenos) unidas al complejo Dynabeads®-anticuerpo se resuspendieron en 30 μ l de tampón de carga (0,3 M Tris-HCl pH 6,8, 10 % p/v SDS, 50 % v/v glicerol, 0,05 % azul de bromofenol y 0,5 M β -mercaptoetanol) con glicina 50 mM. El complejo antígeno-Dynabeads®-anticuerpo se incubó a 65 °C durante la noche con agitación para eluir las proteínas. Las muestras se fraccionaron en SDS-PAGE y las proteínas se detectaron mediante

“Western blot” utilizando anticuerpos anti-Topo I (dilución 1:500) y anti-StaR (dilución 1:1000).

21 Manipulación de RNA y preparación de librerías para RNA-Seq

21.1 Extracción de RNA total

La extracción de RNA total se llevó a cabo utilizando el kit RNeasy Mini (Qiagen), a partir de 10 ml de cultivo de SPN, siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA se trató dos veces consecutivas con DNasa I para evitar posibles contaminaciones de DNA utilizando el kit de tratamiento con DNasa en columna “RNase-Free DNase Set” de Qiagen. El RNA obtenido se cuantificó en un TECAN Infinite 200 PRO y se visualizó en geles de agarosa al 0,8 % teñido con Gel Red. Su integridad se estimó tomando como referencia la integridad de las bandas correspondientes al RNA ribosomal 16S y 30S.

21.2 Construcción de librerías y análisis de RNA-Seq

La obtención de librerías para la secuenciación masiva se llevó a cabo a partir de 1 µg de RNA total. El RNA ribosómico se eliminó enzimáticamente mediante el kit “Illumina Ribo-Zero Plus” y las librerías se prepararon usando el kit “Illumina Stranded Total RNA Prep Ligation”, siguiendo protocolos del fabricante. El RNA se fragmentó y desnaturalizó, y se usó como molde para la síntesis de cDNA, usando el kit “Illumina Ribo-Zero Plus” siguiendo el protocolo del fabricante. Los extremos 3’ de cada hebra del cDNA se adenilaron para evitar que los fragmentos se ligan entre sí y permitir la unión de los adaptadores. Finalmente, a ambos extremos del cDNA se ligaron y amplificaron mediante 12 ciclos de PCR los índices y los fragmentos de reconocimiento de los oligonucleótidos de secuenciación. Se realizó un control de calidad de la librería con un Bioanalizador Agilent 2100. La secuenciación de las librerías se llevó a cabo en la Unidad de Genómica del ISCIII y se empleó el sistema de secuenciación NovaSeq 6000.

El análisis de los datos de RNA-Seq se llevó a cabo mediante la plataforma Galaxy (The Galaxy Community, 2022). Este análisis lo realizó el Dr. Pablo Hernández del Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. La calidad de los datos se analizó mediante la herramienta FASTQC. Las lecturas de secuenciación se mapearon tomando de referencia el genoma de la cepa R6 de SPN (ASM704v1), usando el paquete BWA (Galaxy versión 0.7.17.4). El número de lecturas solapantes con los genes codificantes se obtuvo mediante la herramienta *feature count*, y los datos obtenidos se utilizaron para el análisis de expresión diferencial con DESeq2. Se consideró un valor *P* ajustado de 0,01.

22 Microscopía confocal e inmunofluorescencia

Las células se crecieron en medio A+Y y 0,3 % S hasta $OD_{620nm} = 0,4$ a 37 °C, se centrifugaron $10.000 \times g$ a temperatura ambiente y se resuspendieron en PBS 1× a una concentración de 8×10^9 células/ml. Las células se fijaron con formaldehído al 2 % durante 16 h. Se incubaron 8×10^7 células con 5 μ M de naranja SytoxTM (Invitrogen) a temperatura ambiente durante 5 min para teñir los ácidos nucleicos y se extendieron en un portaobjetos de vidrio previamente tapizado con 50 μ l de poli-L-Lisina (Sigma-Aldrich) diluída 1:20 en PBS durante 5 min y a temperatura ambiente. Las células se permeabilizaron sumergiendo el portaobjetos en metanol a -20 °C durante 10 min. El portaobjetos se incubó con BSA al 2 %, Triton X-100 al 0,2 % en PBS 1× (BSA-PBST). Posteriormente, se incubó con el anticuerpo policlonal anti-StaR de conejo diluído 1:100 en tampón BSA-PBST durante 1h, se lavó con PBS 1× y se incubó con el anticuerpo anti-conejo Abberior® STAR 488 a una dilución 1:200 durante 1h. Después de un lavado con PBS 1×, los portaobjetos se montaron con ProLongTM Gold Antifade Mountant (Invitrogen, ThermoFischer) y se sellaron. Se tomaron imágenes de nucleoides como se describió anteriormente (García-López et al., 2022) en un microscopio confocal STELLARIS 8 – FALCON/STED (Leica Microsystems) con un objetivo de inmersión HC PL APO 100 × / 1,40 NA × OIL. Las imágenes de súper resolución se adquirieron mediante microscopía de agotamiento de emisiones estimuladas (STED) utilizando un láser de agotamiento de 660 nm. El análisis se realizó con el software Cell Profiler v4.2.5 y se calculó el índice de correlación de colocación para cada bacteria con una rutina personalizada. Las imágenes fueron adquiridas y analizadas por el Dr. Diego Megías de la Unidad de Microscopía Confocal del ISCIII.

23 Programas informáticos y análisis estadístico

La visualización y alineamiento de secuencias de nucleótidos y proteínas se llevó a cabo mediante el software Clone Manager Suite 7.0. Para la predicción de estructuras de las proteínas se utilizó la herramienta iCn3D “Web based” disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/icn3d/full.html>. Se utilizó la herramienta CLUSTALW para alineamiento de secuencias.

La densitometría de geles de poliacrilamida, “Western blot”, los plásmidos separados en geles de agarosa bidimensionales y ensayos de actividad de enzimas se realizó con el programa Image Lab (Bio-Rad).

Para la representación y análisis estadístico de los datos se empleó el programa GraphPad Prism 8.3.0. y Microsoft Excel. Los datos mostrados son representativos de, al menos, tres réplicas independientes. Para el análisis estadístico se empleó la *t* de Student de dos colas. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con una $*P \leq 0,05$, muy significativas con valores $**P \leq 0,01$ y extremadamente significativas con valores $***P \leq 0,001$ y $**** P \leq 0,0001$.

RESULTADOS

CAPÍTULO I. ESTUDIO FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA StaR

Un estudio previo realizado en la cepa R6 de SPN identificó 44 proteínas hipotéticas altamente conservadas en SPN con homólogos presentes en otras bacterias Gram-positivas como *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus* (Martín-Galiano et al, 2014). Una de estas es una proteína de 324 aminoácidos codificada por el gen *spr0929*. Predicciones realizadas usando la base de datos STRING indicaron que es capaz de establecer 3 interacciones proteína-proteína y fue preliminarmente clasificada como una proteína de unión a DNA (Martín-Galiano et al, 2014). Esta proteína está presente en todos los aislados de SPN y su secuencia está altamente conservada en otras especies de *Streptococcus* (73.4 % de identidad). Así mismo, existen homólogos en otros patógenos Gram-positivos de los géneros *Clostridium*, *Enterococcus* y *Listeria*. Además, esta proteína fue detectada, en nuestro laboratorio como proteína del nucleoide de SPN. El análisis proteómico utilizando espectrometría de masas de nucleoides de SPN aislados por filtración en gel reveló que Spr0929 se encontraba exclusivamente en la fracción del nucleoide y no se detectó en las muestras control (datos no publicados).

En este capítulo se describe el estudio funcional de la proteína Spr0929. Los resultados indican que se trata de una nueva proteína localizada en el nucleoide y que modula la actividad de la Topo I. En base a su función, Spr0929 ha sido nombrada por nosotros como StaR (“Streptococcal Topoisomerase Activity Regulator”), nombre que será utilizado de aquí en adelante.

1 Cepa deficiente en StaR y cepas sobreproductoras

1.1 Cepa Δ staR

Para estudiar la función de StaR *in vivo* se utilizó una cepa de SPN previamente construida en el laboratorio que carecía del gen *staR*, denominada Δ staR (Martín-Galiano et al., 2014). Para su construcción, el gen *staR* fue reemplazado por el casete *cat* (cloranfenicol acetyl transferasa) que contiene el promotor y la secuencia codificante, y proporciona resistencia a Cm. Para minimizar los efectos de dicha inserción en la transcripción de las fases de lectura (ORFs) contiguas, el casete no incluía el terminador transcripcional y se introdujo en la misma orientación que el gen interrumpido. Además, los oligonucleótidos se diseñaron de manera que no eliminaran las regiones codificantes de los genes flanqueantes, los sitios de unión al ribosoma o los terminadores de transcripción. Las regiones flanqueantes “upstream” y “downstream” se amplificaron con

oligonucleótidos spr0929_LiUF/spr0929_LiURNh2 y spr0929_LiDFNo2/spr0929_LiDR, respectivamente, que contenían sitios de restricción NheI y NotI. Ambas PCRs se digirieron y se ligaron con el casete *cat* amplificado con los oligonucleótidos catup_Nh/catdown_No y digerido con las mismas enzimas. El producto de ligación se volvió a amplificar y se usó finalmente para transformar la cepa R6 (Martín-Galiano et al., 2014).

1.2 Cepa Δ *staRP*_{Zn}*staR*

Para analizar el efecto de la sobreexpresión de *StaR* *in vivo* en SPN se construyó la cepa Δ *staRP*_{Zn}*staR*. Para ello, se introdujo en la cepa Δ *staR* una copia del gen *staR* en el locus *spr1806* bajo el control de un promotor inducible por Zn (P_{Zn}), lo que permite la expresión controlada de *staR* mediante la adición de ZnSO₄ al medio de cultivo.

Para la construcción de esta cepa, primero se fusionó *staR* al promotor P_{Zn} utilizando el plásmido pZK (Kloosterman et al., 2008) que contiene la región "upstream" del gen *czcD* cuya expresión se activa con ZnSO₄. El gen *staR* se amplificó a partir del genoma de R6 con los oligonucleótidos spr0929_ScIF y spr0929_SlIR, se digirió con SacI y Sall (dianas incluidas en los oligonucleótidos) y se clonó en el plásmido pZK digerido con las mismas enzimas, fusionándolo con el promotor P_{Zn} seguido de su sitio de unión al ribosoma. El plásmido pZK*staR* así obtenido se usó para amplificar el fragmento de PCR que contenía la fusión P_{Zn} *staR* con los oligonucleótidos KmR_B1_Rv y pZK_Xb1_Rv. Por otro lado, se amplificaron fragmentos de DNA correspondientes a las regiones flanqueantes de *spr1806* con los oligonucleótidos spr1806_ExF y spr1806_ExR, para la región "upstream", y los oligonucleótidos spr1806_LiDFXb y spr1806_ExR para la región "downstream". Los amplicones se digirieron con *Bam*HI y *Xba*I y se ligaron con el fragmento P_{Zn} *staR*. El fragmento de ligación se introdujo finalmente en la cepa Δ *staR* mediante transformación, los transformantes fueron seleccionados con 250 µg/mL de kanamicina, obteniéndose así la cepa Δ *staRP*_{Zn}*staR* (Figura 6).

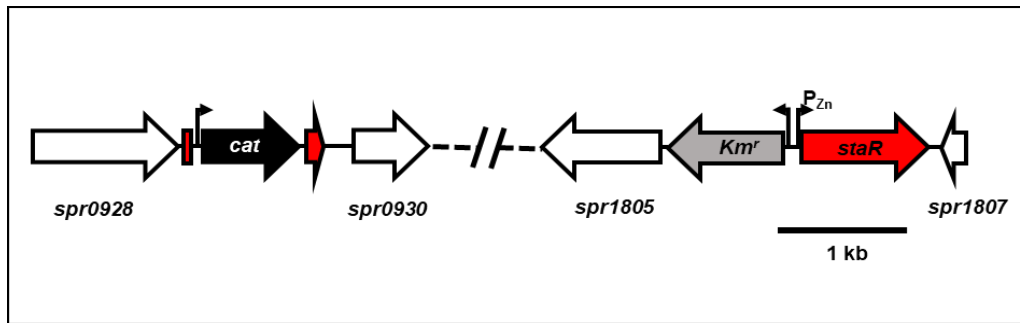


Figura 6. Estructura genética de la cepa $\Delta staR P_{Zn} staR$ derivada de $\Delta staR$. El gen *staR* fue sustituido por el casete *cat* que proporciona resistencia a Cm y *staR* fusionado a *P_{Zn}* fue insertado en el locus *spr1806*.

1.3 Cepa $\Delta staR$ [pLS1R-*staR*]

Para obtener mayores niveles de StaR se construyó la cepa $\Delta staR$ [pLS1R-*staR*]. Esta cepa, que carece de la copia cromosómica de *staR*, contiene el plásmido pLS1R-*staR*, derivado del pLS1ROM (Ruiz-Masó et al., 2012) que lleva clonado *staR* bajo el control del promotor *P_{Mal}* inducible por maltosa y reprimido por sacarosa. Para su construcción se amplificó *staR* a partir del cromosoma de R6 con los oligonucleótidos 0929HindF y 0929BamR (Tabla 4), en las condiciones descritas en materiales y métodos. pLS1ROM y el fragmento de PCR se digirieron con *HindIII* y *BamHI* y se ligaron, y el plásmido recombinante pLS1R-*staR* obtenido (Figura 7) se introdujo en la cepa $\Delta staR$. Además, como cepa control para los ensayos realizados *in vivo* se construyó la cepa $\Delta staR$ [pLS1ROM] por transformación de $\Delta staR$ con el vector pLS1ROM.

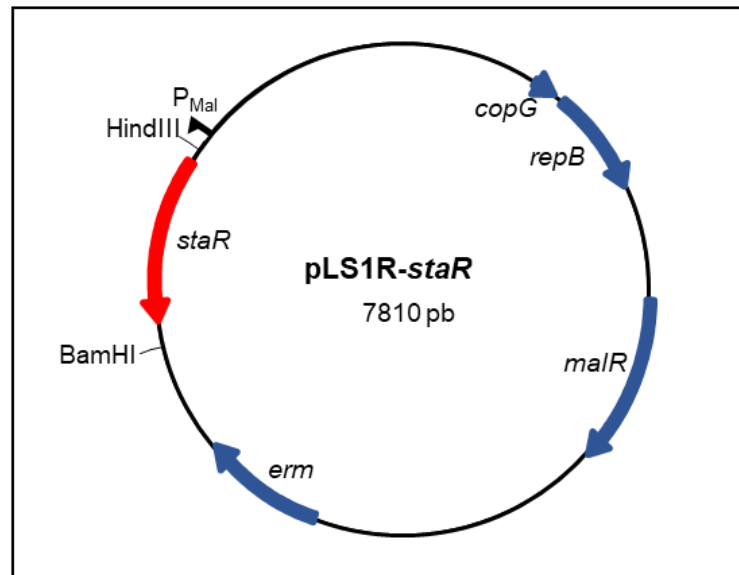


Figura 7. Clonaje de *staR* en pLS1ROM. El gen *staR* se clonó bajo el control de P_{Mal} utilizando los sitios HindIII y BamHI. El plásmido recombinante pLS1R-*staR* fue utilizado para transformar la cepa $\Delta staR$. Se indican los genes implicados en replicación del plásmido (*copG* y *repB*), el represor de P_{Mal} (*malR*) y el gen de resistencia (*erm*).

2 Caracterización funcional de StaR

2.1 StaR como miembro de la familia de proteínas NA37

Para investigar el papel de StaR, se realizó una búsqueda de homólogos bacterianos a través de InterPro que permite el análisis funcional de proteínas y su clasificación en familias. La mayor coincidencia se encontró con la familia NA37 que incluye NAPs de aproximadamente 37 kDa altamente conservadas en bacterias Gram-negativas. La proteína YejK de *E. coli*, descrita como una NAP, es el miembro más representativo de esta familia y la única proteína de la que se dispone de información experimental (Lee & Mariani, 2013). En base a esto, realizamos un análisis comparativo de secuencia entre YejK y StaR utilizando la herramienta de alineamiento de secuencias Clustal. Los resultados demostraron que hay un 19,4 % de identidad y un 46,6 % de similitud entre ambas proteínas (Figura 8A). Así mismo, se realizó una predicción de estructura terciaria de YejK y StaR y los modelos obtenidos para ambas proteínas presentaron una aparente similitud en su conformación espacial (Figura 8B).

YejK ha sido identificada como una NAP en *E. coli* que se asocia al nucleoide e inhibe la actividad de la girasa y la Topo IV. La homología encontrada entre ésta y StaR y sus características similares a las proteínas de la familia NA37 sugerían que StaR podría actuar como una NAP en SPN y jugar un papel en el control del Sc del DNA.

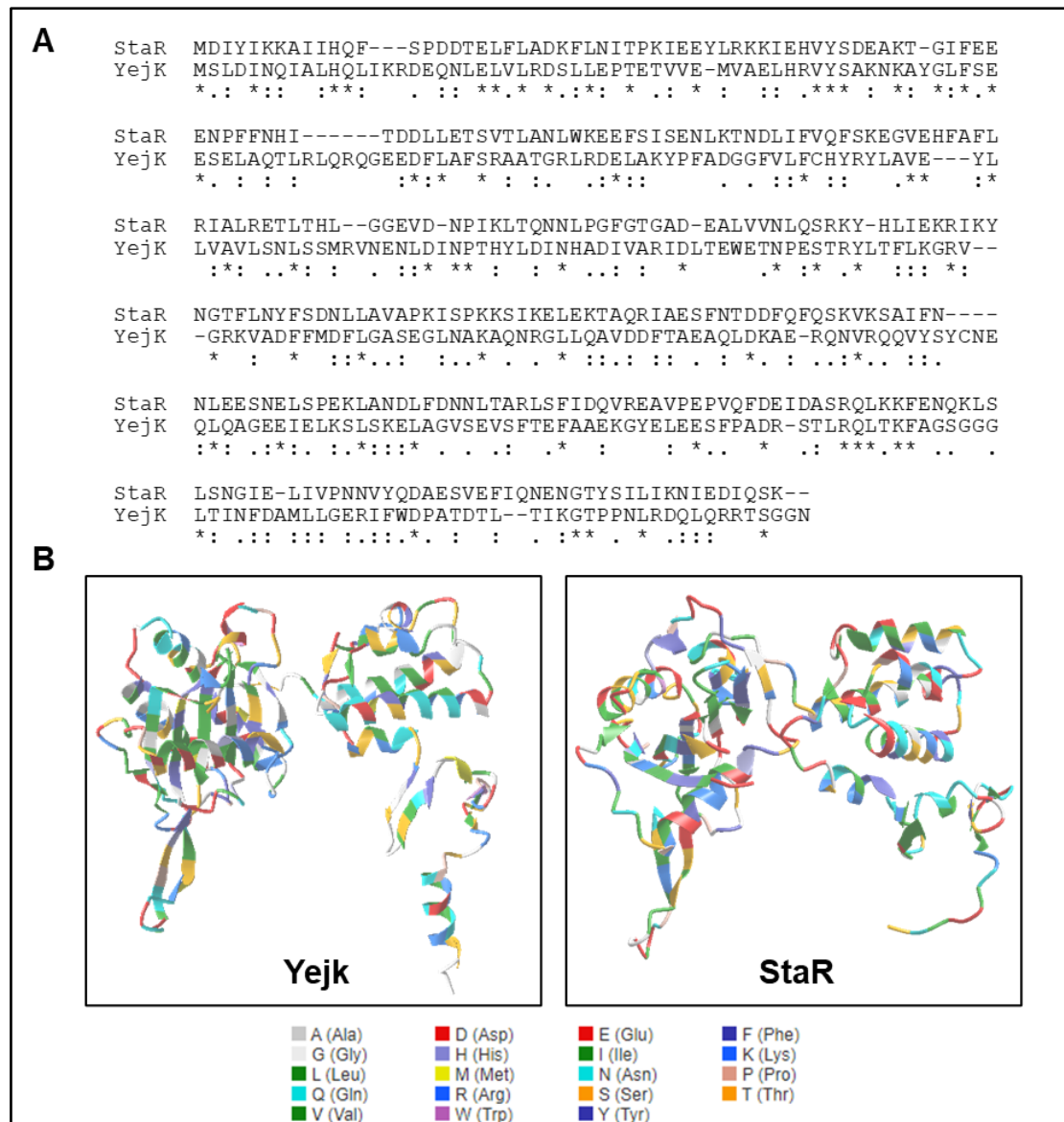


Figura 8. Comparación entre StaR de SPN y Yejk de *E. coli*. (A) Alineamiento de secuencias. Los asteriscos indican residuos idénticos entre ambas proteínas y los dos puntos indican residuos similares. (B) Estructuras terciarias de YeJK y StaR de SPN. Se utilizó la herramienta iCn3D de NCBI para construcción de los modelos estructurales. Los colores representan los residuos de los aminoácidos.

2.2 Los niveles de StaR afectan la susceptibilidad a la NOV

Para estudiar la función de StaR y su posible efecto en el Sc, se analizó el crecimiento de la cepa silvestre R6 y del mutante $\Delta staR$ en presencia o ausencia de NOV, antibiótico que inhibe la actividad ATPasa de la girasa provocando un aumento de la relajación del DNA. En ausencia de NOV, ambas cepas mostraron tasas de crecimiento equivalentes, mientras que en presencia de concentraciones subinhibitorias ($0,5 \times MIC$), $\Delta staR$ creció más lentamente que R6 con tiempos de duplicación de 112 ± 6 min y 89 ± 6 min ($P = 0,01$), respectivamente (Figura 9). Esto sugiere que StaR podría

tener un papel en el mantenimiento del Sc en condiciones en las que exista cambio de Sc.

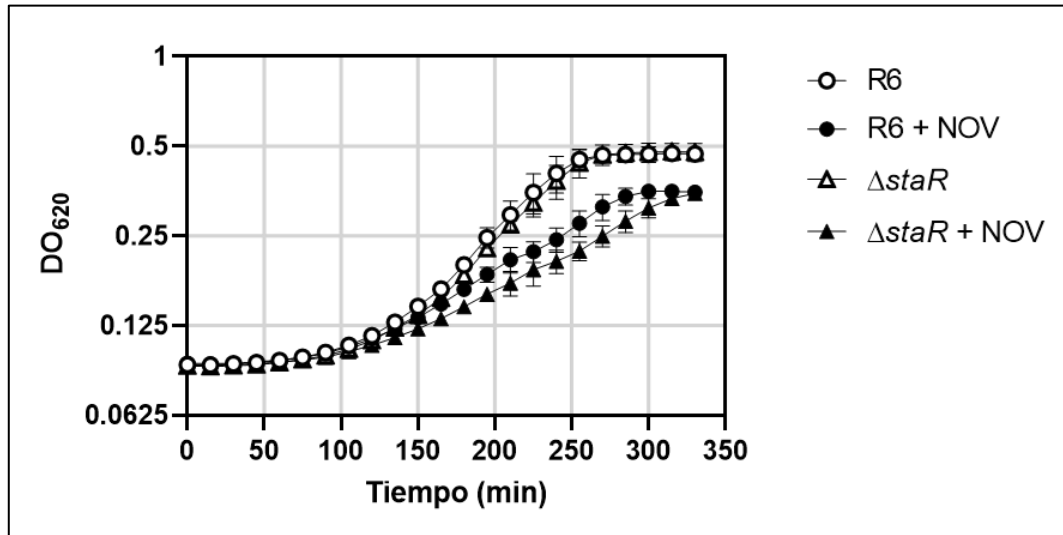


Figura 9. Efecto de la ausencia de StaR en la susceptibilidad a la NOV. La cepa R6, que lleva StaR silvestre, y su isogénica con una delección de *staR* se cultivaron hasta $DO_{620\text{ nm}} = 0,3$ en presencia de $2,5\ \mu\text{g/ml}$ de Cm, se diluyeron 200 veces en medio nuevo sin Cm y en ausencia o presencia de NOV a $0,5\times$ MIC y su crecimiento se registró en un lector TECAN Infinite 200 PRO. Los datos son el promedio de tres réplicas independientes \pm SEM.

Para dilucidar el papel de StaR en la susceptibilidad a NOV, se estudió el efecto de la superproducción de StaR sobre el crecimiento de SPN en presencia NOV. Se analizó el crecimiento de $\Delta\text{staR}_{P_{Zn}}\text{staR}$ en presencia de $150\ \mu\text{M}$ de ZnSO_4 para inducir la transcripción de la copia ectópica de *staR* y se comparó con R6. Además, se determinaron los niveles de StaR y de las topoisomerasas implicadas en la homeostasis de Sc (Topo I y girasa) a lo largo de la curva de crecimiento mediante “Western blot”. La cuantificación se realizó utilizando RpoB como control interno ya que no se ha observado cambio en su producción bajo tratamiento con NOV (Ferrández et al., 2010). En ausencia de NOV, R6 y $\Delta\text{staR}_{P_{Zn}}\text{staR}$ mostraron tiempos de duplicación equivalentes tanto en ausencia como en presencia de ZnSO_4 . Sin embargo, en presencia de $0,5\times$ MIC de NOV, $\Delta\text{staR}_{P_{Zn}}\text{staR}$ creció más lentamente que R6 (Figura 10A). Los tiempos de duplicación en ausencia de ZnSO_4 fueron $215\ \text{min} \pm 32$ y $94\ \text{min} \pm 10$ para $\Delta\text{staR}_{P_{Zn}}\text{staR}$ y R6 (promedio \pm SD, $n = 3$), respectivamente, confirmando que la deficiencia de StaR ralentiza el crecimiento bajo tratamiento con NOV. En presencia de ZnSO_4 , la cepa $\Delta\text{staR}_{P_{Zn}}\text{staR}$ creció de nuevo peor que R6 y las diferencias en el tiempo de duplicación entre ambas cepas fueron similares a las anteriores: $154\ \text{min} \pm 19$ para $\Delta\text{staR}_{P_{Zn}}\text{staR}$ y $89\ \text{min} \pm 10$ para R6.

Los niveles de StaR en la cepa $\Delta staRP_{Zn} staR$ con $ZnSO_4$ fueron unas 2 veces superiores que los niveles en R6 (Figura 8B). Esto demuestra que tanto el aumento de 2 veces en la cantidad de StaR, como su ausencia produjeron una mayor susceptibilidad a NOV. Con respecto a los niveles de expresión de las topoisomerasas, el tratamiento con NOV disminuyó el nivel de Topo I en R6 aproximadamente 4 veces a los 90 y 150 min, y 6 veces a los 210 min, en comparación con las células no tratadas. En la cepa $\Delta staRP_{Zn} staR$ se observaron disminuciones similares, con una reducción de aproximadamente 7 veces de los niveles de Topo I tras el tratamiento con NOV en todos los tiempos analizados (Figura 10B, C). Por lo tanto, las diferencias observadas en la susceptibilidad a NOV entre ambas cepas no se asocian con un desequilibrio de la topoisomerasa, sino a los distintos niveles de StaR. Estos datos indican que el mantenimiento de unos niveles adecuados de StaR son importantes para la respuesta homeostática de Sc contra el estrés topológico impuesto por las concentraciones subinhibitorias de NOV.

Para determinar si niveles más altos de StaR afectaban a la viabilidad celular, construimos la cepa $\Delta staR$ [pLS1R-*staR*] que permite la inducción controlada de *staR* mediante la adición de distintas concentraciones de maltosa (Figura 12B) a partir de una copia plasmídica. La tasa de crecimiento y los niveles de proteína de la cepa $\Delta staR$ [pLS1R-*staR*] se analizaron tras la inducción con diferentes concentraciones de maltosa en presencia o ausencia de NOV. El crecimiento en presencia del 0,4 % de sacarosa + 0,4 % de maltosa (SM) produjo un aumento de StaR de unas 10 veces a los 150 y 210 min con respecto a los cultivos crecidos en presencia de 0.8 % de sacarosa (S), pero este aumento no tuvo ningún efecto sobre la susceptibilidad a NOV (Figura 11A). Sin embargo, la inducción con 0,8 % de maltosa (M) sí aumentó la susceptibilidad a NOV. El tiempo de duplicación con 0,8 % M fue 52,1 min \pm 0,9, mientras que con 0,8% S fue 34,1 min \pm 0,6. En la condición con M los niveles de StaR fueron aproximadamente 30 veces mayores (a los 150 min y 210 min) que los observados en los cultivos crecidos con S (Figura 11B, C). La cuantificación de los niveles de StaR en estas condiciones revela que, en los cultivos crecidos con SM, los niveles de StaR son similares a los observados en R6 (Figura 10), lo que explica la ausencia de efecto sobre el crecimiento bacteriano (Figura 11A). Por el contrario, el tratamiento con M produjo un aumento de los niveles de StaR de 3,5 veces en todos los tiempos evaluados con respecto a R6, que sí afecta negativamente al crecimiento. Estos datos corroboran los obtenidos con la cepa $\Delta staRP_{Zn} staR$, y demuestran que la susceptibilidad a NOV aumenta tanto en ausencia de StaR (Figuras 9 y 10) como cuando sus niveles son de 2 a 3,5 veces superiores a los detectados en R6 (Figuras 10 y 11).

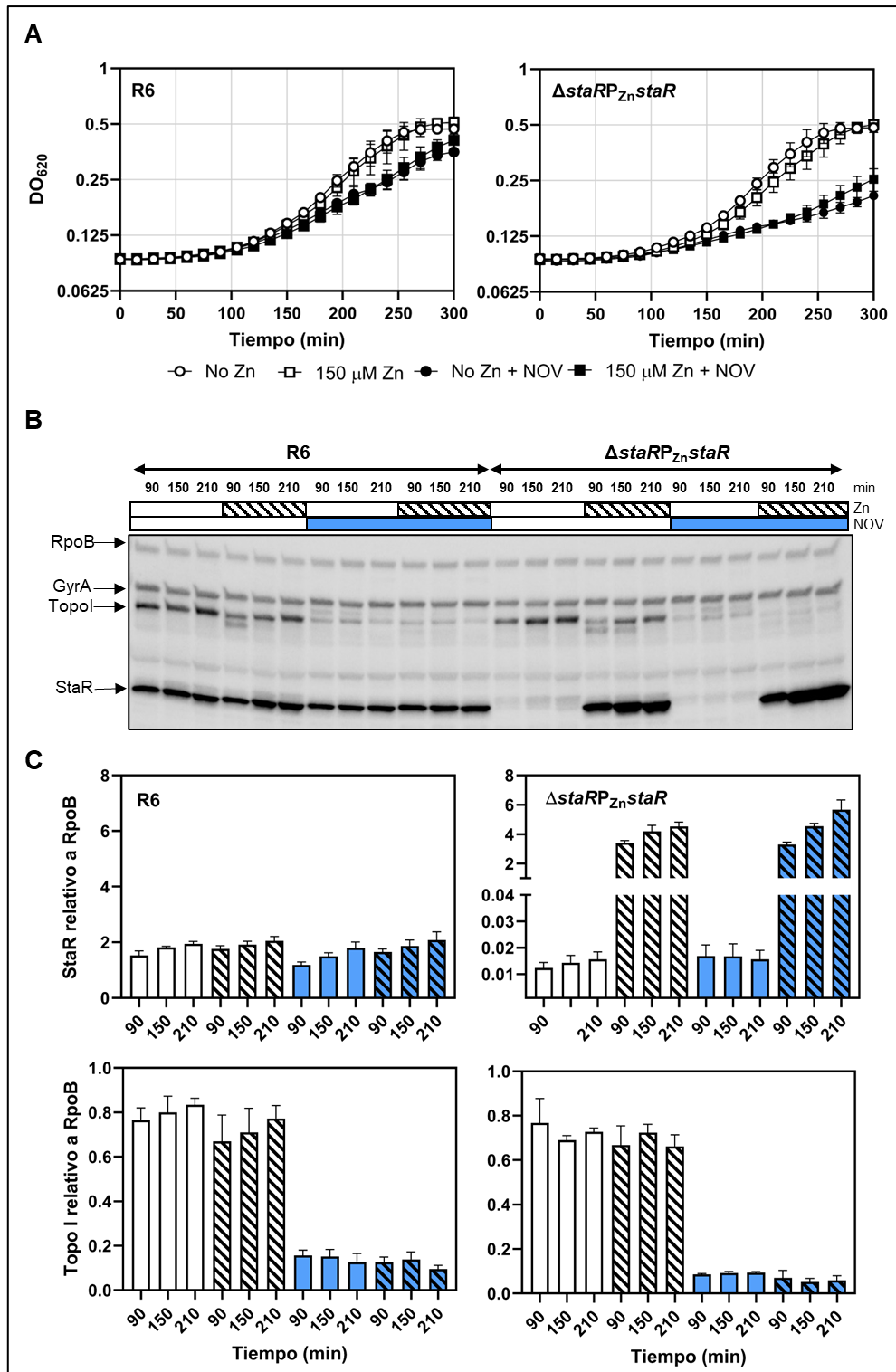


Figura 10. Efecto de la expresión de *staR* bajo el control de P_{Zn} . (A) Curva de crecimiento de las cepas R6 y $\Delta staRP_{Zn}staR$ sin ó con 150 μM de $ZnSO_4$ y en presencia o ausencia de 0,5 \times MIC de NOV. (B) Detección de las topoisomerasas mediante “Western blot” usando anticuerpos contra GyrA (1:2000), Topo I (1:500), StaR (1:1000) y RpoB (1:2000) como control interno. Se tomaron muestras en los tiempos indicados y se procesaron como se describe en materiales y métodos. Se muestra el gel correspondiente a un ensayo representativo (C) Niveles de StaR y Topo I en ausencia (barras vacías) o en presencia (barras rayadas) de Zn, y en ausencia (blanco) o en presencia (azul) de NOV. Se muestran los niveles de proteína en relación con RpoB. Los datos presentados son el promedio \pm SEM, n=3.

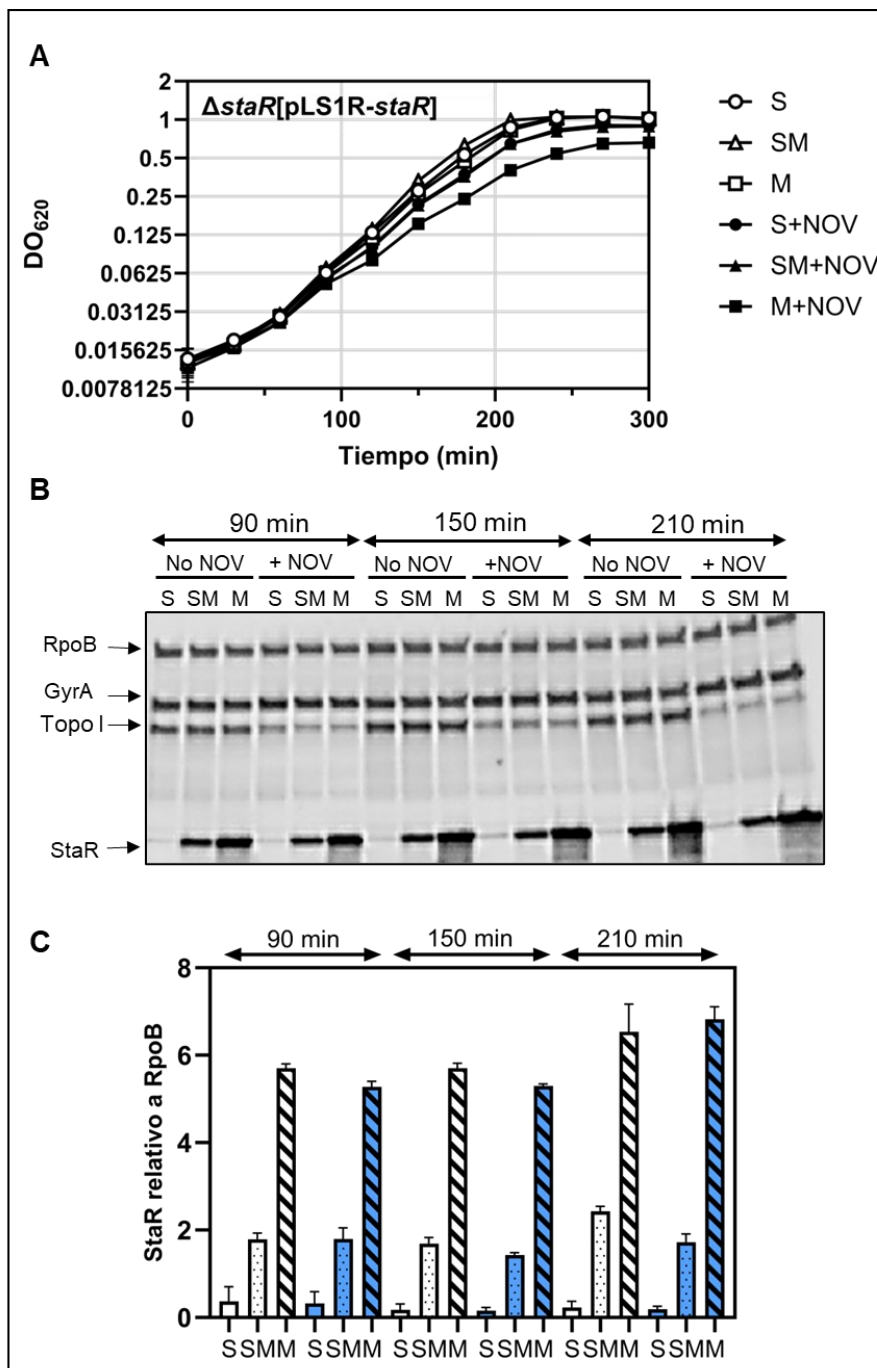


Figura 11. Efecto de la sobreexpresión de *staR* en la susceptibilidad a NOV. (A) Crecimiento de la cepa $\Delta staR$ [pLS1R-*staR*] en presencia de S, SM o M y en ausencia o presencia de NOV a 0,5× MIC. (B) Detección de GyrA, Topo I y StaR mediante “Western blot” utilizando anticuerpos contra GyrA (1:2000), Topo I (1:500), StaR (1:1000) y RpoB (1:500) como control interno. Las muestras se trataron como se describe en materiales y métodos. Se muestra un gel representativo de tres réplicas. (C) Niveles de StaR en cultivos crecidos con S (barras vacías), SM (barras con puntos) o M (barras rayadas), y en ausencia (blanco) o presencia (azul) de NOV, cuantificados a partir del “Western blot”. Se muestran los niveles de proteína en relación con RpoB. Los datos presentados son el promedio \pm SEM, n=3.

Estos resultados en su conjunto sugieren que StaR tiene un papel directo en la resolución del estrés por relajación del DNA. De hecho, *staR* está ubicado en un dominio DOWN en el genoma de R6 y su transcripción disminuye más de 2 veces por el tratamiento con NOV (Ferrándiz et al., 2010). Esta regulación negativa de los niveles de StaR podría ser necesaria para la recuperación de la célula tras la relajación del Sc causada por la NOV, y podría explicar la mayor susceptibilidad a ésta observada en la cepa $\Delta staRP_{Zn}staR$, donde *staR* se localiza ectópicamente en un locus no regulado por Sc y sujeto a la inducción por $ZnSO_4$, o en la cepa $\Delta staR$ [pLS1R-*staR*], donde su expresión está regulada por maltosa. Por otro lado, la ausencia de StaR en la cepa $\Delta staR$, también hace que la bacteria sea más susceptible a NOV, lo que implica que sus niveles deben regularse con precisión.

2.3 StaR afecta el nivel de Sc bajo tratamiento con NOV

Como parte de la respuesta homeostática de Sc, después del tratamiento con NOV se produce una disminución de los niveles de Topo I (Figura 10B) que coincide con la disminución de la transcripción de *topA* observada previamente (Ferrándiz et al., 2010). Para analizar si los niveles de StaR afectan el Sc del DNA *in vivo*, se transformó la cepa $\Delta staRP_{Zn}staR$ con el plásmido pLS1 y se determinó su densidad de Sc con o sin NOV y en presencia o ausencia de $ZnSO_4$. El estudio de la distribución de topoisómeros de pLS1 mediante electroforesis bidimensional en agarosa (Figura 12) permite obtener una medida de los niveles de Sc del plásmido, que es una estimación del Sc cromosómico.

Como se esperaba, el tratamiento de $\Delta staRP_{Zn}staR$ [pLS1] con NOV produjo la relajación del DNA en todas las condiciones testadas, pero esta relajación fue mayor en condiciones de sobreexpresión de StaR. Los resultados demostraron que en ausencia de StaR, es decir, sin $ZnSO_4$ en el medio, el valor de la densidad Sc de DNA (σ) fue inicialmente $-0,056$ y cambió a $-0,051$ y $-0,049$ tras el tratamiento con $0,5\times$ MIC ó $1\times$ MIC de NOV, respectivamente (Figura 12A). Sin embargo, en condiciones de sobreexpresión de StaR ($ZnSO_4$ $150 \mu M$) la variación de σ fue mayor, pasando de $-0,057$ en ausencia de NOV, a $-0,048$ y $-0,045$ en presencia de $0,5\times$ MIC y $1\times$ MIC de NOV, respectivamente (Figura 12B). La densidad de Sc negativa a $1\times$ MIC de NOV fue significativamente mayor ($P = 0,01$) en ausencia de StaR ($\sigma = -0,049$ a $1\times$ MIC) que en presencia del doble de su concentración basal ($\sigma = -0,045$), lo que sugiere que StaR aumenta el nivel de relajación del DNA inducido por NOV.

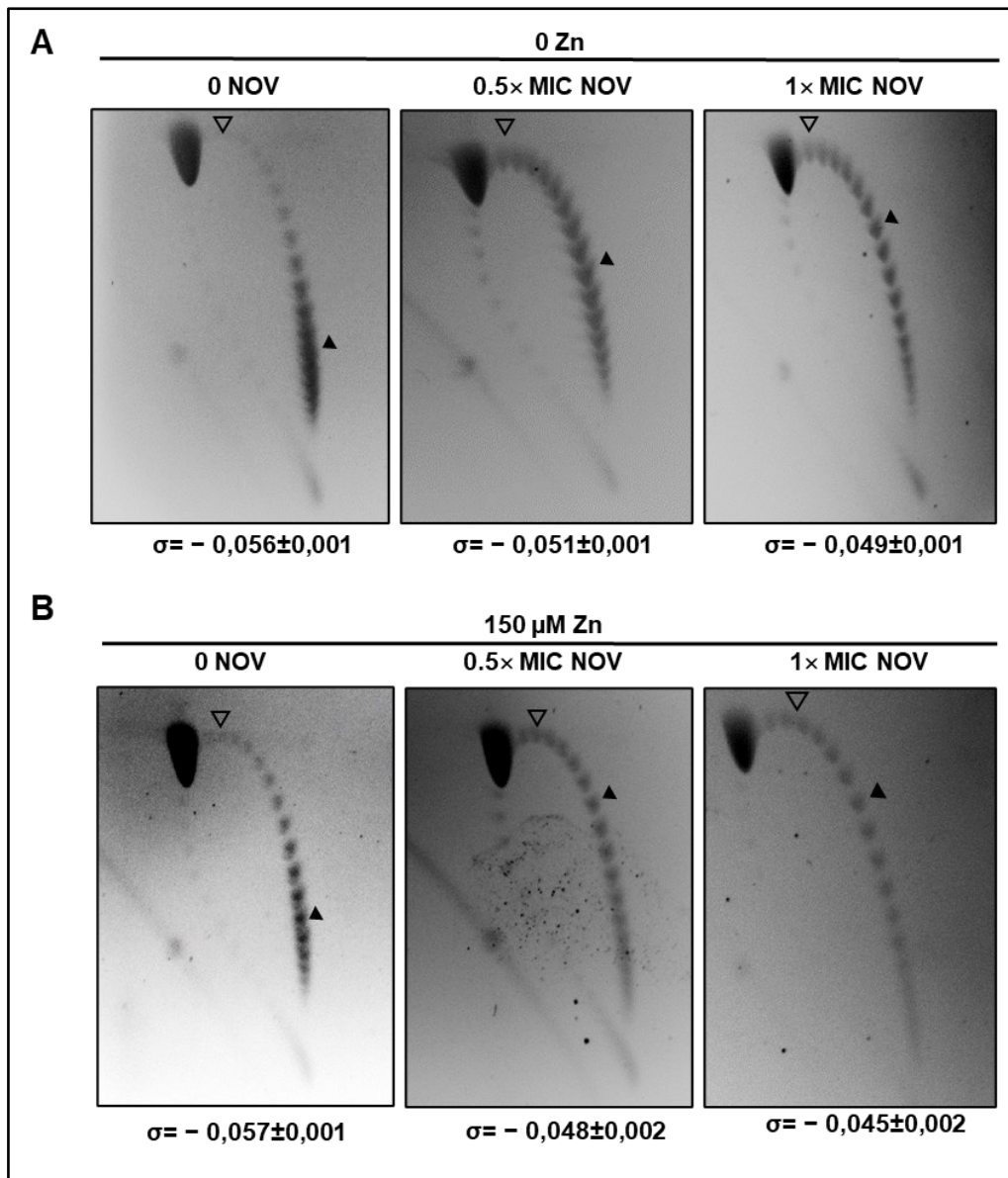


Figura 12. Determinación del nivel de Sc en la cepa R6 Δ staRP $_{Zn}$ staR [pLS1] crecida en diferentes concentraciones de ZnSO₄ y NOV. Cultivo sin ZnSO₄ (A) o con 150 μ M ZnSO₄ (B). Se tomaron muestras antes (0 NOV) o después de 30 min de tratamiento con 0,5x MIC o 1x MIC de NOV. Se extrajeron los plásmidos y se analizaron en geles de agarosa en presencia de 1 y 2 μ g/ml de cloroquina en la primera y segunda dimensión, respectivamente. Los valores son la media de réplicas independientes \pm SD, n=4. Se muestran imágenes de geles de uno de los experimentos. Las puntas de flecha vacías indican el topoisómero que migró con $\Delta Lk = 0$ en la segunda dimensión y tiene un $\Delta Wr = -14$ durante la primera dimensión (el número de Sc positivo introducidos por 2 μ g/ml de cloroquina). Las puntas de flecha negras indican el topoisómero más abundante.

2.4 La alteración de los niveles de StaR no induce cambios globales en el transcriptoma

Para determinar si variaciones en los niveles de StaR tienen un efecto global en el transcriptoma de SPN, llevamos a cabo un análisis de RNA-seq de la cepa $\Delta staRP_{Zn} staR$ en ausencia de StaR (sin $ZnSO_4$ añadido) y en presencia del doble de su concentración en la cepa silvestre ($ZnSO_4$ 150 μM). En condiciones de inducción, se detectaron 34 genes con expresión alterada frente a lo observado en ausencia de $ZnSO_4$, genes de expresión diferencial (DEGs, Tabla 5). De estos 34 genes, 17 presentaban mayor expresión y otros 17 presentaban menor expresión. Como era de esperar, entre estos DEGs se encontraron genes regulados por $ZnSO_4$ (Kloosterman et al., 2008), con siete regulados positivamente y seis regulados negativamente. Los genes regulados positivamente incluyeron el operón *psaBCA* que codifica un transportador Mn/Zn, *czcD* que codifica una proteína de eflujo de cationes, *prtA* que codifica un factor de virulencia y *adhB* involucrado en el metabolismo del carbono, mientras que *celA* estaba regulado negativamente. Los niveles de mRNA de StaR también aumentaron aproximadamente 400 veces en presencia de $ZnSO_4$, en concordancia con el aumento de los niveles de proteína detectados por “Western blot” en las mismas condiciones (aumento de 280 veces, Figura 10).

Tabla 5. DEGs detectados en $\Delta staRP_{Zn} staR$ en presencia de $ZnSO_4$ comparado con los detectados en su ausencia. Los cultivos se crecieron hasta $DO_{620\text{ nm}} = 0,2$, se diluyeron 50 veces en medio sin $ZnSO_4$ o con 150 μM $ZnSO_4$ y se crecieron hasta una $DO_{620\text{ nm}} = 0,4$.

Función	Descripción	Locus en R6 ^a	Variación expresión ^c
Metabolismo de carbohidratos	β -galactosidasa	<i>spr0059 (bgaC)</i>	-2.2
Proteína hipotética		<i>spr0066</i>	3.9
Transporte: carbohidratos	ABCT permeasa	<i>spr0082</i>	-2.2
Proteína hipotética		<i>spr0085</i>	-2.0
Metabolismo de carbohidratos	6-P- β -glucosidasa	<i>spr0276 (celA)</i>	-3.0
Factor de transcripción	Antiterminador	<i>spr0279 (bglG)</i>	-3.2
Transporte: carbohidratos	Componente EII azúcar-específico PTS	<i>spr0280 (celC)</i>	-2.3
Proteína hipotética		<i>spr0281</i>	-2.3
Factor de transcripción	Antiterminador	<i>spr0504</i>	-2.2
Patogénesis	Proteína LPxTG	<i>spr0561 (prtA)</i>	2.3
Proteína hipotética		<i>spr0600</i>	-2.0
		<i>spr0601</i>	-2.1

Proteína hipotética		spr0929 (staR)	438.1
Transporte: antibióticos		spr1289	-2.2
Proteína hipotética		spr1402	2.3
Transporte: cationes	ABCT union a ATP- Mn	spr1492 (psaB)	4.1
	ABCT permeasa - Mn	spr1493 (psaC)	4.7
	ABCT union a sustrato - Mn	spr1494 (psaA)	4.8
Metabolismo de carbohidratos	Galactosa-1-P uridiltransferasa	spr1667	2.1
	Galactokinasa	spr1668 (galK)	2.3
Metabolismo de carbohidratos	Alcohol dehidrogenasa	spr1670 (adhB)	73.7
Proteína hipotética		spr1671	105.3
Transporte: cationes	Facilitador de la difusión de cationes	spr1672 (czcD)	507.5
Metabolismo de carbohidratos	Glucosidasa de dextrano	spr1698	-3.2
Proteína hipotética		spr1940	-2.2
		spr1966	2.6
Transporte: otro	Proteína facilitadora del transporte de glicerol	spr1988 (glpF)	-2.2
Metabolismo de carbohidratos	Glicerol-3-P dehidrogenasa	spr1989	-2.6
	Glicerol-3-P dehidrogenasa	spr1990	-3.1
	Glicerol kinasa	spr1991 (glpK)	-2.0
Proteína hipotética		spr2037	3.1
		spr2038	3.4
		spr2039	3.4
		spr2040	2.0

^aABCT, transportador ABC; PTS, sistema fosfotransferasa. ^bLos genes sombreados en gris son aquellos que están regulados por niveles altos de ZnSO₄. ^cLos genes cuya transcripción está alterada (dos réplicas), incluyen aquellos que mostraron un cambio significativo (valor absoluto ≥ 2) y un valor de $P \leq 0,01$. Todos los datos de RNASeq están depositados en el “Gene Expression Omnibus” y son accesibles a través del número de acceso GEO GSE225261 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE225261>).

Cuando se comparó el efecto de la NOV sobre el transcriptoma en ausencia de StaR (-Zn) o en condiciones de sobreexpresión de StaR (+Zn), no se observaron diferencias importantes. Se detectaron un total de 324 (110 regulados positivamente) y 313 DEGs (108 regulados positivamente) en ausencia o presencia de StaR, respectivamente, 214 de los cuales fueron comunes a ambas condiciones (Figura 13A). Aproximadamente un tercio de los DEG bajo cada condición era específico. En ausencia de StaR, la NOV desencadenó cambios en la expresión de 110 genes (67 regulados negativamente y 43 regulados positivamente) que no cambiaron en presencia del doble de la concentración basal de StaR. De manera similar, cuando se sobreexpresó StaR, la NOV indujo cambios en la expresión de 99 genes (58 regulados negativamente y 41

regulados positivamente) que no se alteraron en ausencia de StaR. La comparación de las clases funcionales de los DEGs detectados no presentó diferencias significativas entre ambas condiciones. Además, no se detectó ninguna diferencia en la ubicación de los DEGs a lo largo del genoma en ausencia o presencia de ZnSO₄ (Figura 13B). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de StaR no afecta la transcripción global inducida por NOV y, por lo tanto, descarta a StaR como regulador transcripcional.

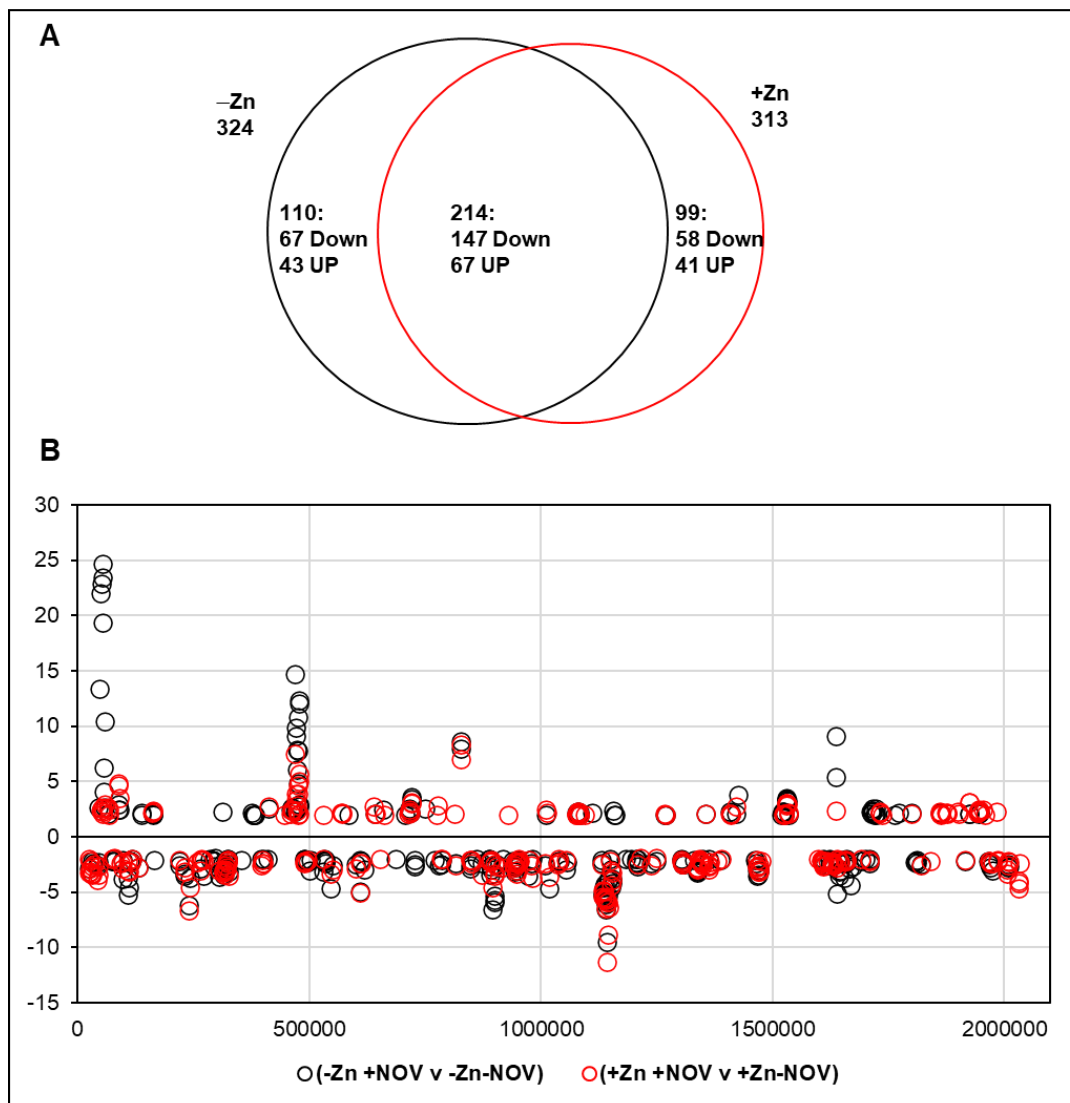


Figura 13. Número y localización de DEGs en el cromosoma de $\Delta staRP_{zn} staR$ tras el tratamiento con NOV en presencia o ausencia de StaR. Los cultivos crecieron hasta una $DO_{620\text{nm}} = 0,2$, se diluyeron 50 veces en medio con $150\ \mu\text{M}$ ZnSO₄ ó sin ZnSO₄ y se cultivaron hasta una $DO_{620\text{nm}} = 0,4$. Las muestras tomadas en este punto se consideraron no tratadas con NOV. Las muestras tratadas con NOV se cultivaron durante otros 30 min con NOV a $0,5\times$ MIC. Se aisló el RNA total y se secuenció como se describe en materiales y métodos. **(A)** Diagrama de Venn que muestra los DEGs tras el tratamiento con NOV en ausencia o presencia de ZnSO₄. **(B)** La variación relativa de cada gen representada frente a la ubicación 5' de cada ORF en el cromosoma de R6 (bases 1 a 2.038.615). Se consideró un cambio de ≥ 2 veces (valor absoluto) y un valor de $P \leq 0,01$.

2.5 StaR es una proteína de unión a nucleóide (NAP)

Para investigar la posible asociación de StaR con el nucleóide, se estudió su localización en la cepa silvestre R6 mediante inmunofluorescencia utilizando microscopía STED (“stimulated emission depletion”) de superresolución. La expresión de StaR en las bacterias fijadas se detectó con el anticuerpo primario anti-StaR y el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo Abberior® STAR 488, los nucleóides se tiñeron con Sytox naranja (Figura 14A), y se llevó a cabo un análisis de colocalización de ambas señales mediante la determinación del índice de correlación de Pearson (Figura 14C). Como control negativo, se tomaron imágenes de células de $\Delta staRP_{Zn} staR$ en las mismas condiciones de crecimiento, fijación y tinción en ausencia de $ZnSO_4$ para obtener imágenes de células carentes de StaR (Figura 14B). Esta cepa mostró áreas de color verde brillante sin ningún patrón conservado que podría atribuirse a la unión inespecífica de anticuerpos, y una señal verde de baja intensidad que podría corresponder a la autofluorescencia celular (Figura 14B). El promedio de la intensidad de la señal verde (StaR) detectada en $\Delta staRP_{Zn} staR$ en estas condiciones (0,042) se tomó como umbral mínimo de detección. Así mismo, un índice de correlación de Pearson (PCC) de 0,5 se tomó como umbral de colocalización. En general el PCC varía entre -1 y +1, siendo +1 una correlación perfecta, pero para este tipo de análisis no hay un valor definido. En la cepa R6 la distribución y la intensidad de la señal verde detectada difería drásticamente de la de $\Delta staRP_{Zn} staR$. El 66,2 % de las células ($n = 4.912$) expresaron niveles detectables de StaR, y según los criterios establecidos, en el 51,5 % de ellas (1.674) StaR colocalizó con el nucleóide (Figura 14C). Bajo estos mismos criterios, las células $\Delta staRP_{Zn} staR$ no mostraron colocalización (Figura 14C). Estos resultados demuestran que, al igual que su homólogo YejK, StaR se asocia con el nucleóide y, por tanto, debe considerarse una nueva NAP de SPN.

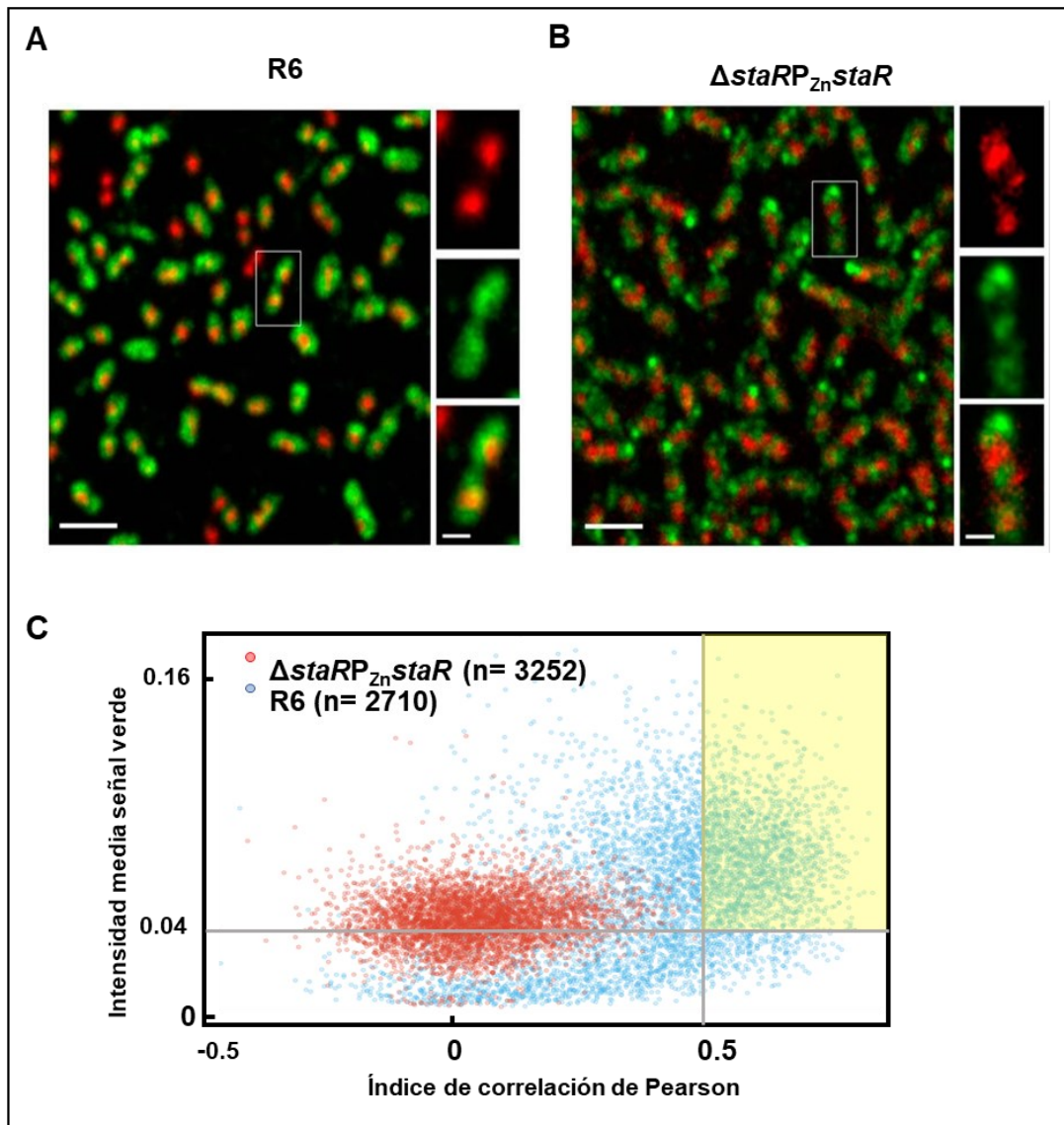


Figura 14. StaR se localiza en el nucleoide. R6 y $\Delta staRP_{zn} staR$ se crecieron en ausencia de $ZnSO_4$ hasta $DO_{620nm} = 0,4$. Las células se fijaron y los nucleoides se tiñeron con Sytox. StaR se detectó utilizando el anticuerpo primario anti-Star (1:100) y el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo Abberior Star 488 (1:200). Se utilizó microscopía STED para determinar la localización intracelular de nucleoides y de StaR. **(A)** Vista general (panel izquierdo) y ampliación (panel derecho) de una célula representativa de R6 que muestra nucleoides (rojo) y StaR marcado (verde) y la mezcla de las señales. **(B)** Vista general (panel izquierdo) y ampliación (panel derecho) de una célula representativa de $\Delta staRP_{zn} staR$, como control de ausencia de StaR. La barra de escala indica $2 \mu m$ en la imagen general ó $0,5 \mu m$ en la imagen ampliada. **(C)** Análisis de correlación de Pearson de las cepas indicadas en (A, B). El eje Y representa la intensidad media de la señal verde, para $\Delta staRP_{zn} staR$ (puntos rojos) y R6 (puntos azules) y el eje X indica la correlación de Pearson entre las señales verdes (StaR) y rojas (nucleoides). Las líneas grises en los ejes X e Y corresponden a los umbrales aplicados para calcular el número de células donde StaR colocaliza con el nucleoide. El cuadrado amarillo resalta la población R6 que muestra colocalización entre StaR y el nucleoide.

2.6 Purificación de StaR

Para corroborar *in vitro* los resultados obtenidos *in vivo* y caracterizar la función de StaR en SPN, se clonó su gen codificante (*staR*) en el sistema de expresión pET28a BL21-CodonPlus (DE3) de *E. coli* y se indujo con IPTG la sobreproducción de la proteína con una cola de 6 His fusionada en su extremo N-terminal (H₆-StaR). La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad utilizando columnas HiTrap Chelating HP en el sistema AKTA prime como se describe en el apartado 10.2 de materiales y métodos, usando un gradiente de 100-400 mM de imidazol (Figura 15A). Extractos crudos procedentes de muestras recogidas antes y después de la inducción del cultivo con IPTG se separaron en un gel de SDS-PAGE junto con las fracciones recogidas durante la aplicación del gradiente de imidazol (Figura 15B). En el extracto crudo inducido con IPTG se observó una banda de proteína que correspondía al tamaño esperado de H₆-StaR, que estaba ausente en el cultivo no inducido. Esta misma proteína se observó en las fracciones F6–F12 recogidas tras la aplicación del gradiente de Imidazol. El pico de elución de la proteína correspondió a las fracciones F8–F11 que equivale a una concentración de 130–190 mM de Imidazol. Las fracciones se dializaron para eliminar el imidazol.

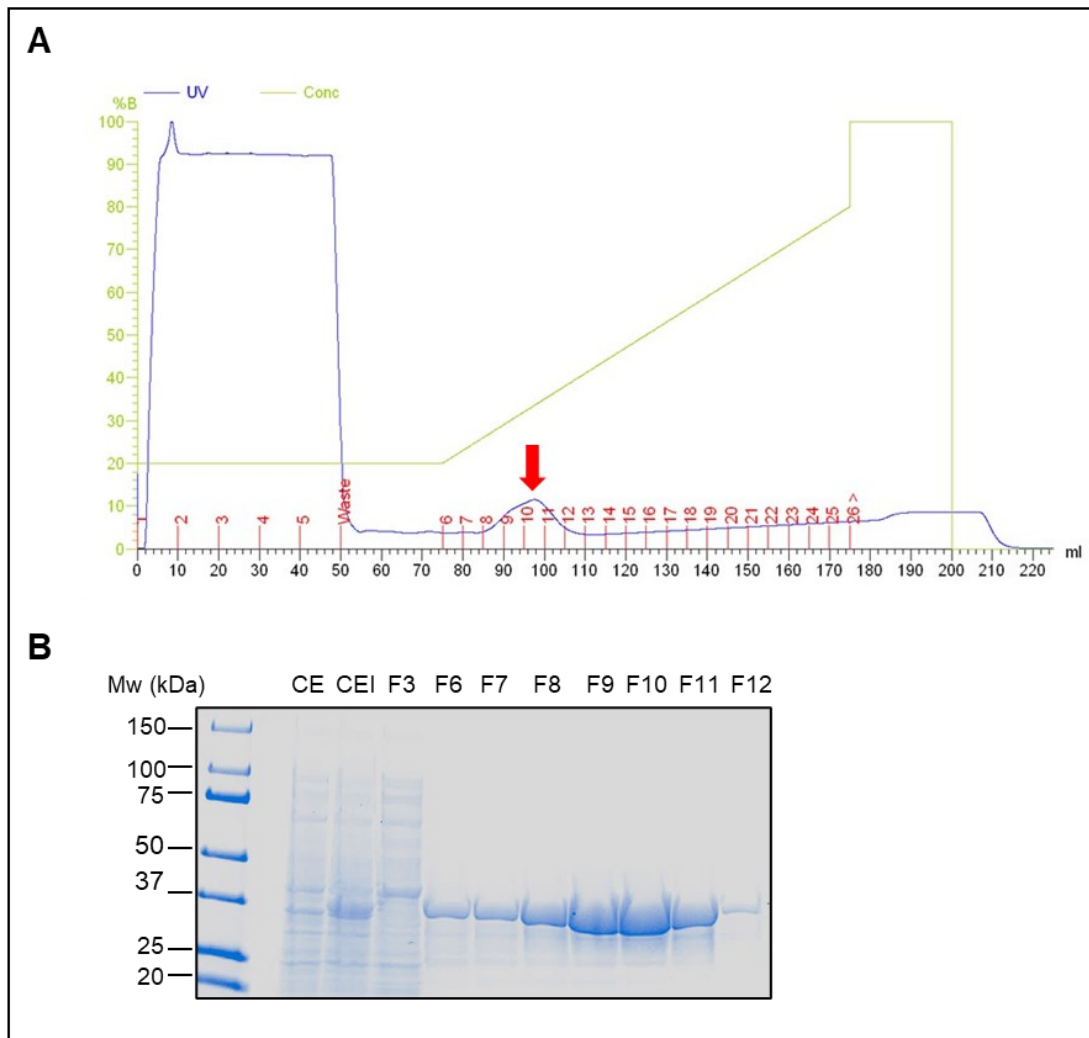


Figura 15. Purificación de H₆-StaR a partir de *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) conteniendo el plásmido pET28-*staR*. (A) Cromatograma de la purificación de StaR en el sistema AKTA en el que se observa un pico (flecha roja) de elución de la proteína con la absorbancia UV en azul y el gradiente de imidazol en verde. (B). SDS-PAGE de 30 µl de muestras de extracto crudo de cultivos no inducidos (CE) o inducidos con IPTG (CEI) en el gel teñido con azul de Coomassie. Se indican los números de las fracciones de 5 ml recogidas tras la aplicación del gradiente de imidazol. Los pesos moleculares se indican a la izquierda.

2.7 StaR activa específicamente la Topo I de *S. pneumoniae*

Los resultados de la variación de Sc *in vivo* en presencia o ausencia de StaR demuestran que la relajación del DNA en presencia de NOV es mayor cuando se sobreproduce StaR. Esto podría deberse bien a una activación de la actividad de Topo I por parte de StaR, o bien a una inhibición la actividad de Sc de la DNA girasa.

En base a esto, se estudió el efecto de StaR sobre la actividad de Topo I analizando *in vitro* su capacidad de relajación del plásmido pBR322 en presencia de distintas concentraciones de StaR. Como se observa en la Figura 16A, StaR activó la

relajación del pBR322 mediada por Topo I de forma dependiente de la cantidad de StaR. Esta activación se cuantificó considerando tanto la disminución de la forma CCC del plásmido como el aumento de sus formas relajadas, los topoisómeros (Figura 16B). Dado que las condiciones de corrida del gel no permiten diferenciar entre OC (círculo abierto) y RC (círculo relajado), se consideraron tanto los topoisómeros intermedios como las formas OC y RC para calcular la actividad Topo I. Los resultados mostraron una disminución de la forma CCC acompañada de un aumento simultáneo de los topoisómeros a medida que aumentaba la concentración de StaR. La forma CCC se redujo de un 63 % en ausencia de StaR hasta un 2,5 % en la concentración más alta de ésta, mientras que los topoisómeros aumentaron desde un 36,8 % hasta el 97,5 %, respectivamente. Además, la activación de Topo I por parte StaR dependió del tiempo de incubación, alcanzando el máximo de activación a los 30 min (Figura 16C). Por el contrario, StaR no mostró actividad topoisomerasa por sí sola en concentraciones iguales o superiores a las utilizadas en los ensayos de actividad Topo I (Figura 16D).

Por otro lado, se analizó el efecto de StaR sobre la actividad de Sc de la DNA girasa de SPN utilizando el plásmido pBR322 relajado como sustrato (Figura 14E y 16F). Los resultados revelaron que tanto el porcentaje del sustrato (formas relajadas OC/RC) como el de los productos de la reacción (suma de las formas CCC + topoisómeros) se mantuvieron constantes en todas las concentraciones de StaR analizadas (de 0,25 a 4 μM), demostrando que StaR no tiene ningún efecto sobre la actividad de la girasa. Por tanto, aunque se requiere un exceso de StaR sobre Topo I para la activación, estos resultados sugieren que StaR es un activador específico de Topo I.

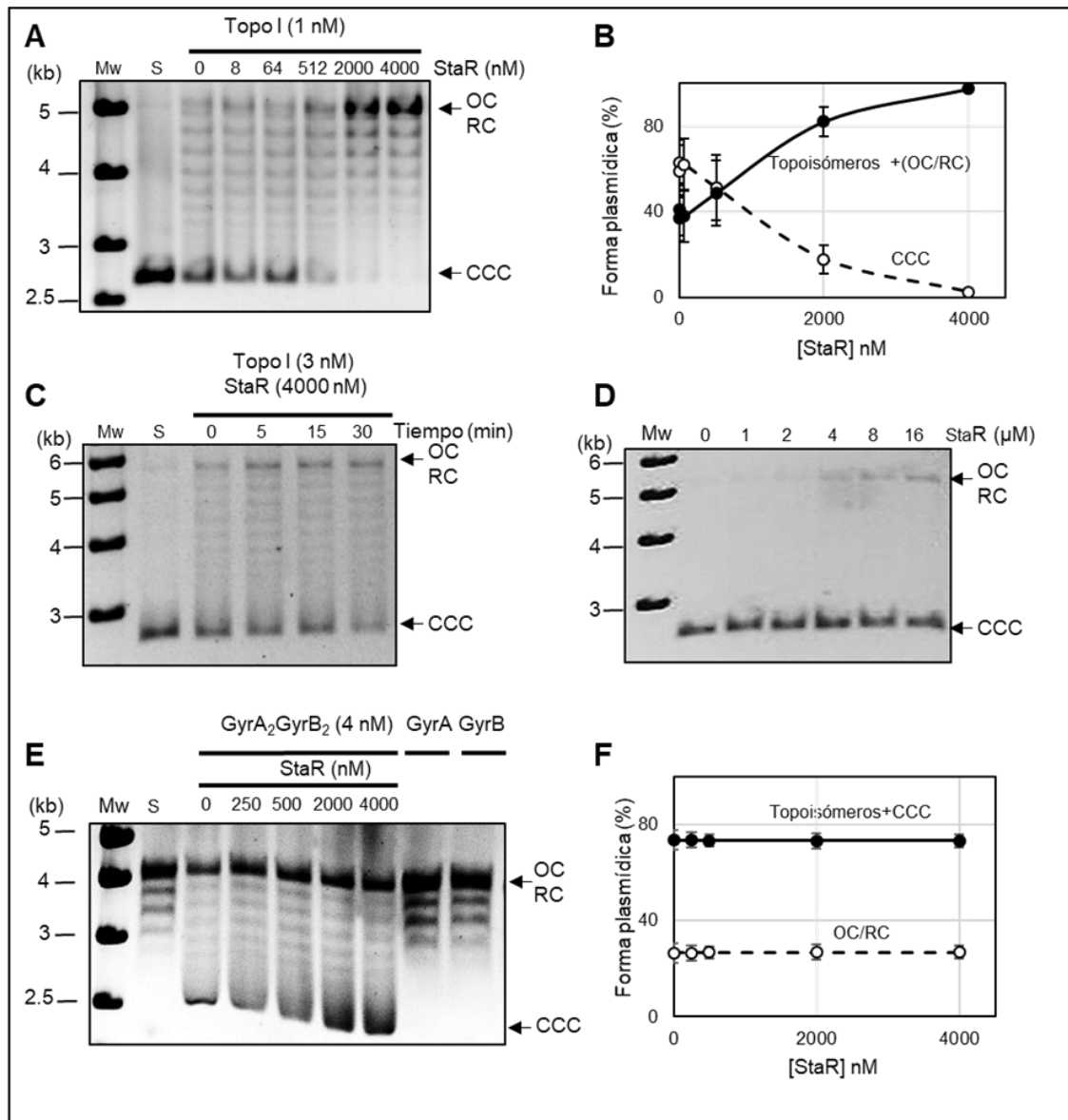


Figura 16. StaR activa la actividad de relajación de Topo I pero no tiene efecto sobre la girasa. (A) Activación de la capacidad de relajación de pBR322 utilizando 1 nM de Topo I y concentraciones crecientes de StaR. Las muestras se procesaron y analizaron como se describe en materiales y métodos. Mw, estándar de peso molecular; S, sustrato; CCC, formas circulares covalentemente cerradas; OC, formas circulares abiertas; RC, formas circulares relajadas. **(B)** Cuantificación de la actividad de Topo I determinada como aumento de los topoisómeros +OC +RC y disminución de formas CCC en presencia de StaR. Los resultados son el promedio \pm SEM, n=3. **(C)** Activación de Topo I en función del tiempo de reacción. **(D)** StaR no tiene actividad topoisomerasa por sí misma. Ensayos realizados con distintas concentraciones de StaR en ausencia de Topo I. **(E)** Determinación del efecto de StaR sobre la actividad de Sc de la girasa. Se midió la actividad de introducción de Sc negativo en pBR322 relajado utilizando 4 nM de girasa reconstituida y concentraciones crecientes de StaR. La incubación con GyrA y GyrB solas se incluye como control. **(F)** Cuantificación de la actividad girasa determinada como porcentaje de topoisómeros +CCC y porcentaje de formas OC + RC en presencia de StaR. Los resultados son el promedio \pm SEM, n=3.

2.8 Interacción física entre StaR y Topo I

La activación específica de Topo I por parte de StaR sugirió una posible interacción proteína-proteína entre ellas. Para verificar esta interacción, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación (Co-IP) *in vitro* con las proteínas purificadas. Para ello, las dos proteínas se incubaron conjuntamente y se inmunoprecipitaron utilizando anticuerpos policlonales anti-Topo I o anti-StaR, y las muestras se analizaron por SDS-PAGE. La presencia de Topo I en la fracción inmunoprecipitada con anti-StaR y la presencia de StaR en la fracción inmunoprecipitada con anti-Topo I (Figura 17A) indicaron una interacción directa *in vitro* entre estas proteínas.

Para verificar si esta interacción también ocurría *in vivo*, se utilizó la cepa $\Delta\text{staRP}_{\text{Zn}}\text{staR}$ crecida en ausencia o presencia de ZnSO_4 , es decir, en ausencia o presencia de StaR. Se fijaron las interacciones proteína-proteína en el interior de las bacterias con formaldehído y se llevó a cabo un ensayo de Co-IP *in vivo* con los anticuerpos mencionados anteriormente (Figura 17B). El “Western blot” mostró que el anticuerpo anti-StaR precipitó Topo I. Se observaron tres bandas inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-StaR: una banda correspondiente a Topo I (79 kDa), una correspondiente a StaR (37 kDa) y otra con un peso molecular aparente de 116 kDa, que podría corresponder al complejo Topo I-StaR. Esta última supuso el 26 % de la cantidad total de StaR inmunoprecipitada. Sin embargo, no se observó ninguna banda correspondiente a StaR en la fracción precipitada con el anticuerpo anti-Topo I. Esto puede deberse a que la cantidad de StaR que interacciona con Topo I en las condiciones analizadas es pequeña y está por debajo del límite de sensibilidad con el anticuerpo anti-Topo I.

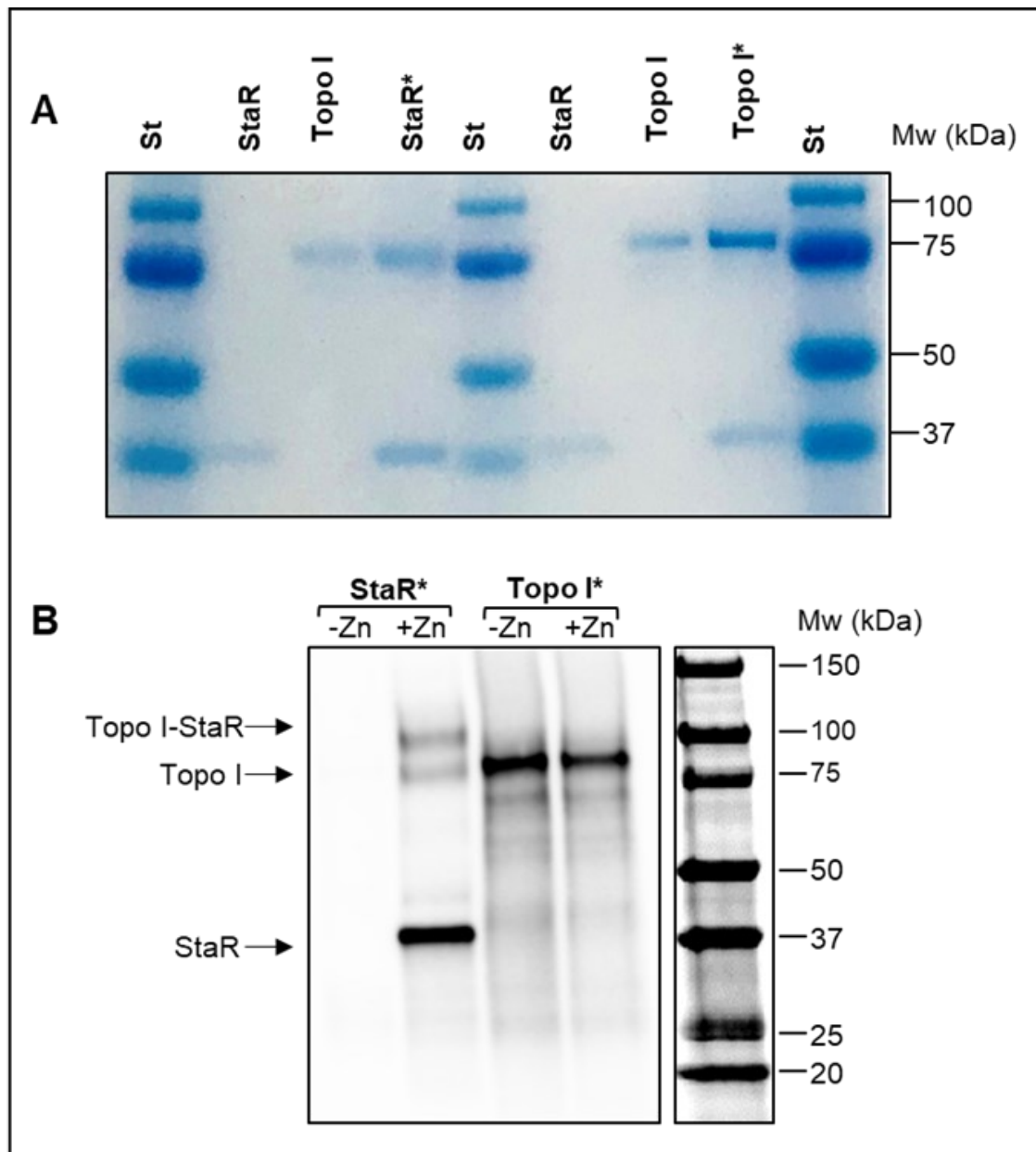


Figura 17. Co-IP de StaR y Topo I. (A) Ensayos *in vitro*. Las proteínas purificadas se incubaron conjuntamente en presencia del anticuerpo anti-StaR (StaR*) o de anti-Topo I (Topo I*). Las muestras se trataron como se describe en materiales y métodos y se fraccionaron en un gel de 4-20 % de poliacrilamida que se tiñó con azul de Coomassie. Se corrieron proteínas purificadas como control. (B) Ensayos *in vivo*. Los cultivos de $\Delta staR^{P_{Zn}} staR$ se crecieron en ausencia (-Zn) o presencia de 150 μ M ZnSO₄ (+Zn) a una DO_{620nm} = 0,4, se fijaron con formaldehído y se trataron como se describe en materiales y métodos. Las muestras se fraccionaron en un gel de 4-20 % de poliacrilamida y las proteínas se detectaron mediante "Western blot" utilizando anticuerpos anti-Topo I (dilución 1:500) y anti-StaR (dilución 1:1000). Se indican las posiciones esperadas de las proteínas Topo I y StaR y del complejo Topo I-StaR.

CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE OTRAS PROTEÍNAS DEL NUCLEOIDE DE SPN

Otras proteínas hipotéticas de SPN podrían tener un papel importante en la compactación del cromosoma. Estudios previos del laboratorio en los que se realizó aislamiento de nucleoides y análisis proteómico permitieron identificar una serie de proteínas que se encuentran en el nucleoide bacteriano (datos no publicados). Tres de ellas, codificadas por los genes *spr0488*, *spr1424* y *spr1593*, no tienen una función concreta asignada. Las tres proteínas poseen motivos de unión a ácidos nucleicos, lo que induce a pensar que podrían ejercer una acción directa o indirecta sobre la compactación de los ácidos nucleicos y participar en la regulación y organización del material genético. Los genes *spr1424* y *spr1593* presentan homología con *rapZ* y *yhbY*, respectivamente. El gen *rapZ* codifica una proteína multifuncional con un motivo KH de unión a RNA que en *E. coli* permite la degradación del pequeño RNA GlmZ por parte de la RNasa E, regulando así la síntesis de glucosamina-6-fosfato, precursor de la envuelta celular (Kalamorz et al., 2007). Por su parte, *yhbY* codifica una proteína con un motivo CRM de unión a RNA presumiblemente implicada en el ensamblaje del ribosoma (Gagarinova et al., 2016). El gen *spr0488* no presenta homología con ningún gen de la base de datos y su secuencia tiene un motivo *helix-hairpin-helix* de unión a DNA. En este capítulo se estudia el efecto de la deleción y de la sobreexpresión de los tres genes mencionados en el crecimiento de SPN en presencia de NOV, y se lleva a cabo la caracterización funcional de la proteína codificada por el gen *spr0488*.

1 Construcción de las cepas Δ *spr0488*, Δ *rapZ* y Δ *yhbY*

Las tres cepas se construyeron siguiendo el protocolo de inserción/deleción descrito en el apartado 7.2 de materiales y métodos introduciendo un casete de resistencia a Km en el gen a inactivar y delecionando el gen completo o parte de este. Los oligonucleótidos utilizados en cada caso y los tamaños de los fragmentos amplificados, así como las enzimas de restricción utilizados, se muestran en la Figura 18. El casete Km^r se introdujo en la misma orientación que los genes colindantes.

1.1 Cepa Δ *spr0488*

El gen *spr0488* tiene una longitud de 395 nt y codifica una proteína de 131 aminoácidos. Se localiza en la hebra codificante del genoma de SPN y está flanqueado por dos genes (*spr0487* y *spr0489*) que se transcriben en la misma dirección (Figura

18A). Los genes *spr0487* y *spr0488* están separados por una región intergénica de 95 nt en la que se encuentra el posible promotor de *spr0488*, y entre *spr0488* y *spr0489* existe una secuencia intergénica de 411 nt. Para inactivar *spr0488* se eliminó el gen completo, a excepción de los últimos 29 nt de su extremo 3', y se substituyó por el casete Km^r. Para ello, se amplificó un fragmento "upstream" (PCR B) que incluía todo el gen *spr0487* y 206 nt del extremo 3' de *spr0486*, y un fragmento "downstream" (PCR C) que incluía 29 nt del extremo 3' de *spr0488*, 137 pb del extremo 5' de *spr0489* y la región intergénica entre ambos.

1.2 Cepa $\Delta rapZ$

El gen *rapZ* está codificado en la hebra retrasada, tiene una longitud de 891 pb y codifica una proteína de 296 aminoácidos denominada RapZ. Está flanqueado por los genes *spr1423* y *ridA*, que se transcriben en la misma dirección (Figura 18B). Los genes *rapZ* y *spr1423* solapan en 4 nt, de manera que el codón stop de *rapZ* se localiza dentro del *spr1423* y comparte nucleótidos con el ATG de éste. Por su parte, el gen *ridA* está separado de *rapZ* por una región intergénica de 51 nt de longitud, que incluye la secuencia promotora de *rapZ*. En base a esto, y para minimizar efectos en los genes colindantes, la inactivación de *rapZ* se hizo mediante la delección parcial del mismo, eliminando el 80 % de su secuencia (715 nt de la parte central del gen). En consecuencia, el fragmento "upstream" (PCR B) utilizado para la inactivación contenía 449 nt de la región 5' de *spr1423* y 137 nt del extremo 3' de *rapZ*, y el fragmento "downstream" (PCR C) incluía 39 nt del extremo 5' de *rapZ*, la región intergénica de 51 nt, el gen *ridA* completo y 72 nt del extremo 3' gen *yihA* que se encuentra a continuación.

1.3 Cepa $\Delta yhbY$

El gen *yhbY*, también codificado en la hebra retrasada, tiene una longitud de 312 pb y codifica una proteína de 103 aminoácidos denominada YhbY. Está flanqueado por los genes *spr1592* y *yqeH* y todos se transcriben en la misma dirección. Los genes *spr1592* y *yhbY* están separados por una región intergénica de 52 nt, y entre *yhbY* y *spr1592* existe una secuencia intergénica de 215 nt en la que se encuentra la posible secuencia promotora de *yhbY*. Para inactivar *yhbY* se eliminó el gen completo, a excepción de los últimos 15 nt de su extremo 3', y se substituyó por el casete Km^r. Para ello, se amplificó un fragmento "upstream" (PCR B) que incluía parte (564 nt) del gen *spr1592* y 15 nt del extremo 3' de *yhbY*, y un fragmento "downstream" (PCR C) que incluía 424 nt del extremo 3' de *yqeH*, y 181 nt de la región intergénica entre ambos (Figura 18C).

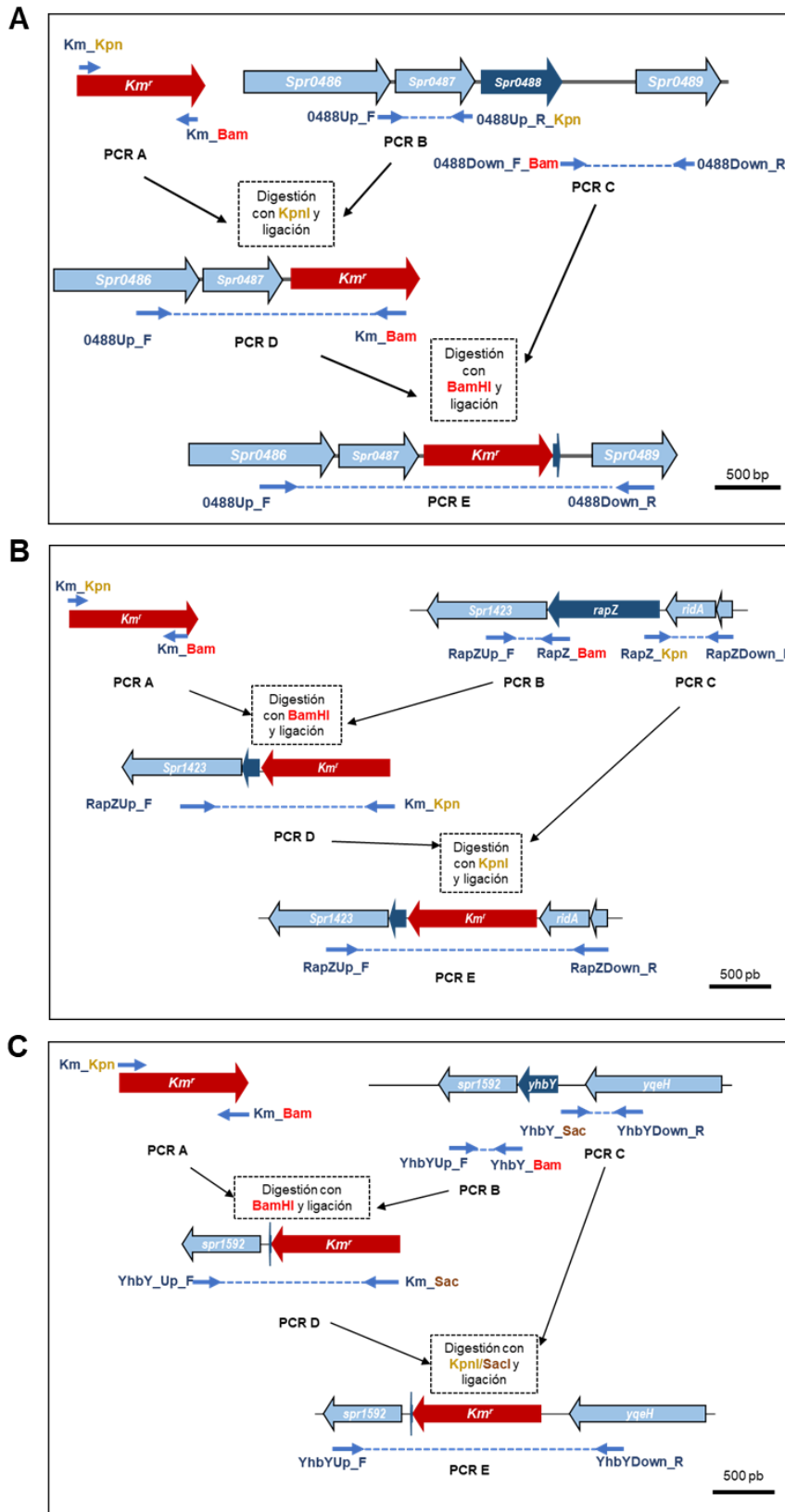


Figura 18. Esquema del procedimiento utilizado para la delección de *spr0488*, *rapZ* y *yhbY*. Las delecciones de (A) *spr0488*, (B) *rapZ* o (C) *yhbY* se llevaron a cabo por inserción/delección del casete *Km^r* en el locus a inactivar. Los genes se representan con flechas que indican el sentido de la transcripción. Se indican los oligonucleótidos utilizados para cada PCR y las enzimas de restricción. El fragmento de DNA resultante de la PCR E se insertó en el genoma de R6 mediante transformación.

Se extrajo DNA genómico de tres transformantes de cada construcción y se amplificó la región que lleva Km^r (Figura 19). Se eligió uno de los transformantes de cada construcción y se secuenció el DNA de la región modificada para comprobar la interrupción de los genes en estudio y la inserción del Km^r .

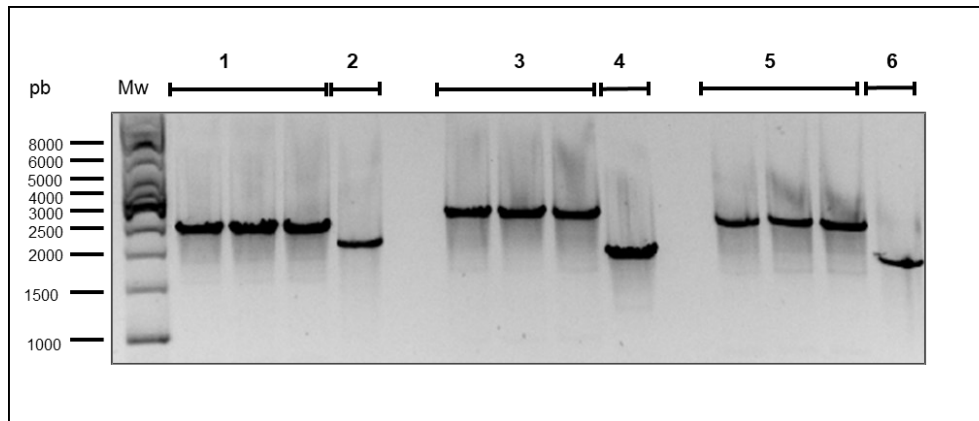


Figura 19. Amplicones generados a partir del genoma de tres clones transformantes de R6 $\Delta rapZ$, $\Delta yhbY$ y $\Delta spr0488$. 1, 3 y 5 representa bandas de amplicones de tres transformantes de $\Delta rapZ$ (2400 pb), $\Delta yhbY$ (2589 pb) y $\Delta spr0488$ (2531 pb) respectivamente. Los carriles 2 (2070 pb), 4 (1877 pb) y 6 (1861 pb) son amplicones de R6 usando los mismos oligonucleótidos.

2 Construcción de las cepas sobreproductoras de *Spr0488*, *RapZ* y *YhbY*

Para analizar *in vivo* el efecto de la sobreexpresión de *spr0488*, *rapZ* e *yhbY* se generaron plásmidos recombinantes derivados de pLS1ROM clonando dichos genes bajo el control del promotor P_{Mal} inducible por maltosa. Los genes se obtuvieron mediante PCR a partir del DNA genómico de R6 utilizando las parejas de oligonucleótidos 0488HindF/ 0488BamR, rapZHindF/ rapZBamR, e yhbYHindF/ yhbYBamR, respectivamente. La reacción se llevó a cabo en las condiciones mencionadas en materiales y métodos, usando una T_m de 62 °C en los 10 ciclos iniciales y 71.3 °C para los otros 20 ciclos. Los fragmentos de PCR y el vector se digirieron con *BamHI* y *HindIII*, se ligaron, y los plásmidos recombinantes pLS1R-*spr0488*, pLS1R-*rapZ* y pLS1R-*yhbY* obtenidos (Figura 20) se introdujeron por transformación en las cepas $\Delta spr0488$, $\Delta rapZ$ y $\Delta yhbY$, respectivamente. Los transformantes se seleccionaron con 1 $\mu g/ml$ de Erm, se eligió uno de los transformantes de cada construcción, se extrajo el plásmido y se secuenció para comprobar la inserción de los genes y posibles mutaciones.

Por otro lado, el vector pLS1ROM se introdujo también en las cepas $\Delta spr0488$, $\Delta rapZ$ y $\Delta yhbY$, así como en la cepa silvestre R6, con el objetivo de obtener las cepas

$\Delta spr0488$ [pLS1ROM], $\Delta rapZ$ [pLS1ROM], $\Delta yhbY$ [pLS1ROM] y R6 [pLS1ROM], que serán utilizadas como control en los estudios de sobreexpresión.

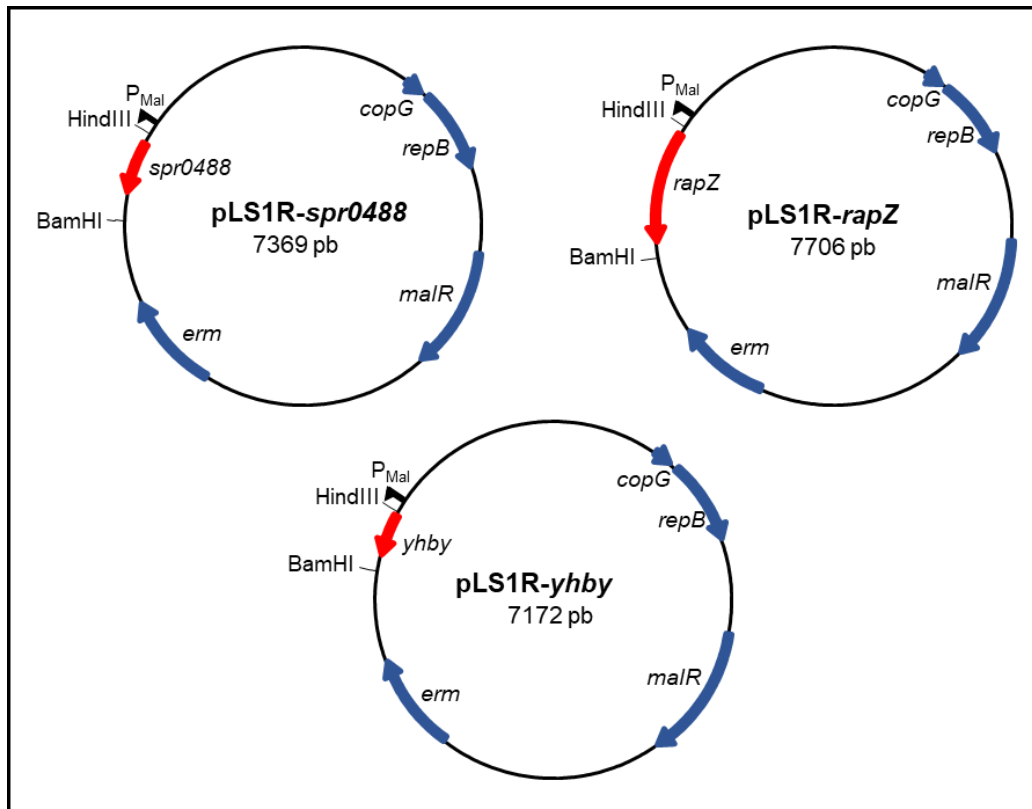


Figura 20. Esquema de los plásmidos recombinantes obtenidos para la construcción de cepas sobreproductoras. Los genes *spr0488*, *rapZ* y *yhbY* (flechas rojas) fueron clonados en el plásmido pLS1ROM obteniéndose los plásmidos recombinantes: pLS1R-*spr0488*, pLS1R-*rapZ* y pLS1R-*yhbY*. Los genes implicados en la replicación del plásmido (*copG* y *repB*), el que codifica el represor de P_{Mal} (*malR*), y el gen de resistencia a eritromicina (*erm*), se muestran en azul.

3 Efecto de los niveles de RapZ, YhbY y Spr0488 en el crecimiento de SPN

3.1 La delección de *spr0488* aumenta la susceptibilidad a NOV, pero no la delección de *rapZ* o *yhbY*

Para determinar si la ausencia de RapZ, YhbY ó Spr0488 afectan al crecimiento de SPN o a la susceptibilidad a NOV, se analizó el crecimiento de las cepas $\Delta rapZ$, $\Delta yhbY$ y $\Delta spr0488$ en A+Y suplementado con 0,3 % S, sin NOV ó con 0,5× MIC de NOV. Las curvas de crecimiento se compararon con la cepa silvestre R6 (Figura 21) y se determinaron los tiempos de duplicación de todas las cepas en las distintas condiciones.

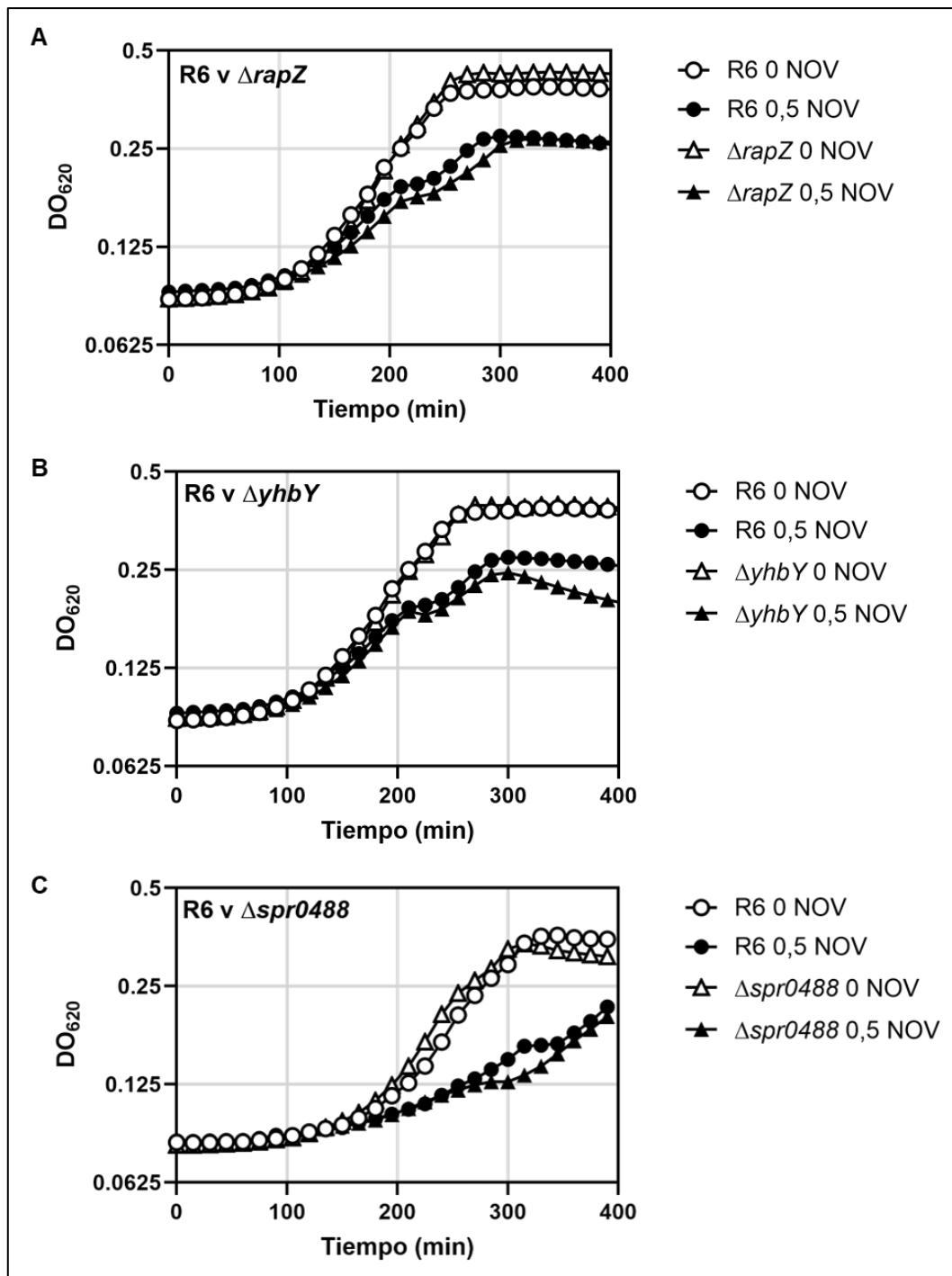


Figura 21. Efecto de la delección de *rapZ*, *yhbY* y *spr0488* en el crecimiento de SPN en presencia de NOV. Las cepas se crecieron hasta $DO_{620} = 0,3$ en medio con 0,3 % sacarosa, se diluyeron 200 veces en los medios indicados y se hizo seguimiento del crecimiento en un lector de TECAN Infinite 200 PRO. Las curvas de crecimiento de $\Delta rapZ$ (A), $\Delta yhbY$ (B) y $\Delta spr0488$ (C) se compararon con R6.

Como era de esperar, R6 creció peor en presencia de 0,5x MIC de NOV que en ausencia del antibiótico. Las tres cepas con delecciones en *rapZ*, *yhbY* y *spr0488* crecieron de manera similar a R6, por lo que la delección de estos genes no afectó el crecimiento en ausencia o presencia de NOV.

3.2 La sobreexpresión de *rapZ*, *yhbY* y *spr0488* afecta el crecimiento de SPN

Para determinar si un aumento de los niveles de RapZ, YhbY o Spr0488 afectan al crecimiento y/o a la susceptibilidad a NOV, se analizó el crecimiento de las cepas $\Delta rapZ$ [pLS1R-*rapZ*], $\Delta yhbY$ [pLS1R-*yhbY*] y $\Delta spr0488$ [pLS1R-*spr0488*] en presencia de 0,8 % de sacarosa (S) ó 0,8 % de maltosa (M) para inducir la transcripción de *rapZ*, *yhbY* y *spr0488*, y en ausencia o presencia de 0,5× MIC de NOV (Figura 22).

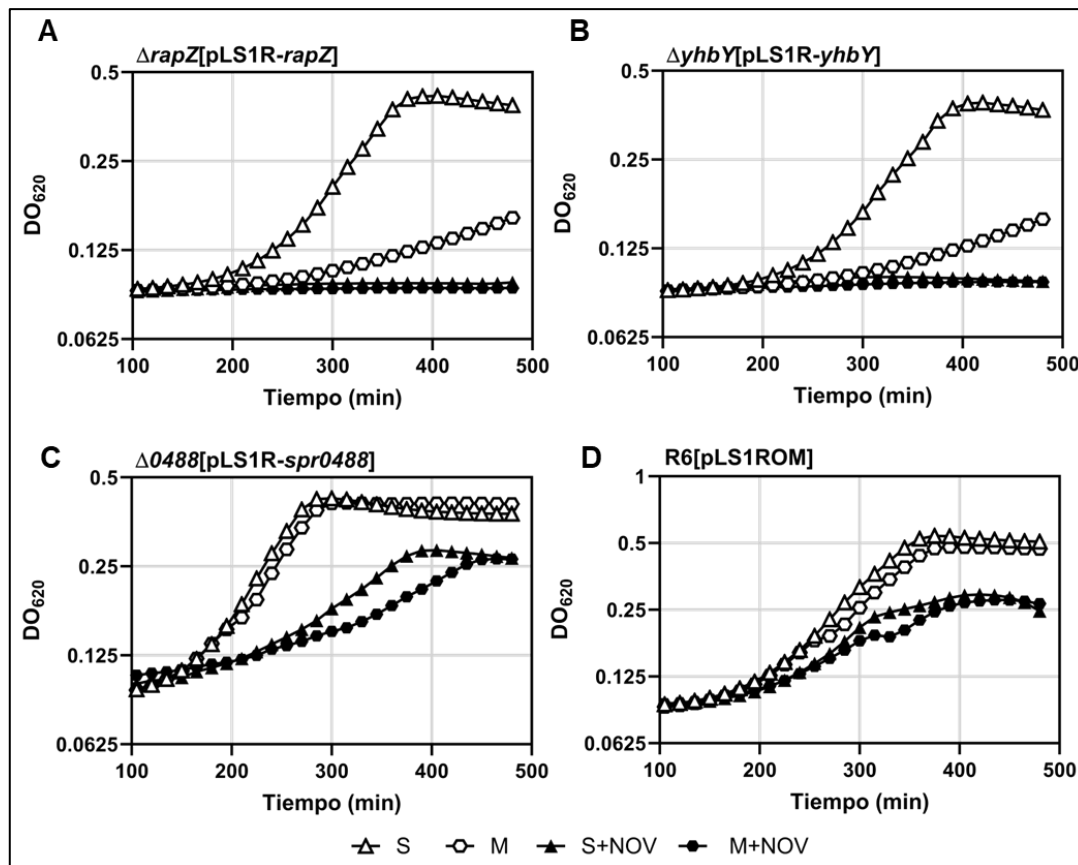


Figura 22. Efecto de la sobreexpresión de *rapZ*, *yhbY* y *spr0488* en el crecimiento de SPN en ausencia y presencia de NOV. Las cepas se crecieron hasta $DO_{620\text{ nm}} = 0,3$ en medio con S, se diluyeron 200 veces en los medios indicados y se hizo seguimiento del crecimiento en un lector de TECAN Infinite 200 PRO de (A) $\Delta rapZ$ [pLS1R-*rapZ*] y (B) $\Delta yhbY$ [pLS1R-*yhbY*] y (C) $\Delta spr0488$ [pLS1R-*spr0488*] y (D) de la cepa R6 [pLS1ROM].

Los resultados demostraron que la superproducción (tratamiento con M) de las proteínas RapZ y YhbY por separado afectó negativamente a la viabilidad celular de SPN tanto en presencia como en ausencia de NOV. Esto sugiere que el exceso de ambas proteínas es tóxico para la célula, pero aparentemente no está relacionado con el Sc, y por lo tanto no profundizamos en el estudio de dichas proteínas. Por otro lado, la sobreproducción de Spr0488 disminuyó el crecimiento de la cepa $\Delta spr0488$ [pLS1R-

spr0488] sólo en presencia de NOV, lo que puede implicar un efecto sobre el Sc. Para confirmar que, efectivamente, la sobreexpresión de *spr0488* aumenta la sensibilidad a NOV se analizó comparativamente el crecimiento de la cepa $\Delta spr0488$ [pLS1R-*spr0488*] y su cepa control $\Delta spr0488$ [pLS1ROM] en las mismas condiciones de inducción y con (0,5× MIC) o sin NOV, y se determinó el tiempo de duplicación (Figura 23).

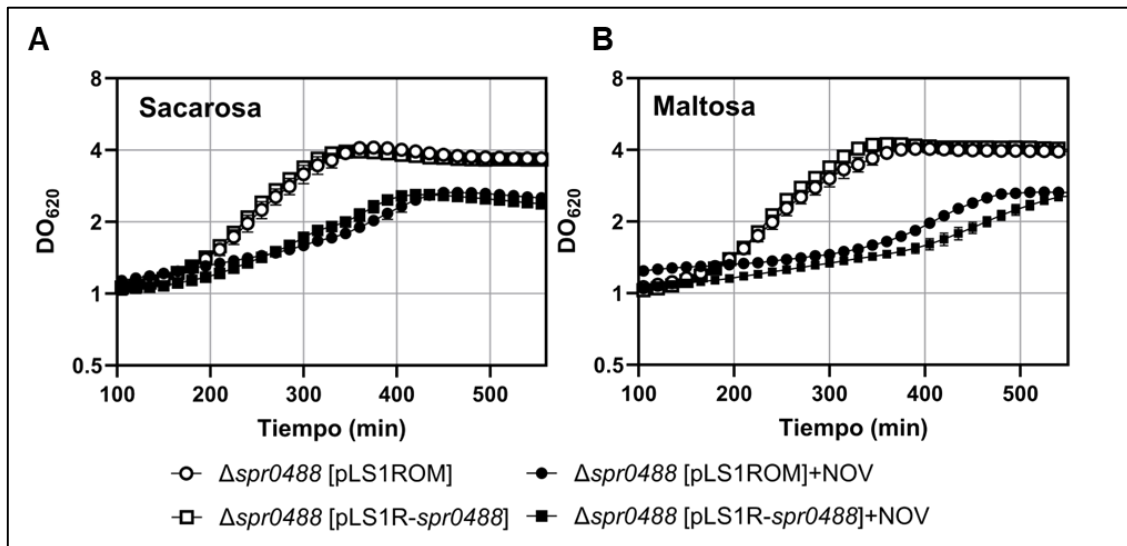


Figura 23. Efecto de la expresión de *spr0488* en el crecimiento de SPN en ausencia o presencia de NOV. Las cepas se crecieron hasta $DO_{620} = 0,3$ en medio con S, se diluyeron 200 veces en los medios indicados y se hizo seguimiento del crecimiento en un lector de TECAN Infinite 200 PRO. (A) Comparación de $\Delta spr0488$ [pLS1ROM] y $\Delta spr0488$ [pLS1R-*spr0488*] con sacarosa y sacarosa + 0,5 × MIC NOV, (B) $\Delta spr0488$ [pLS1ROM] y $\Delta spr0488$ [pLS1R-*spr0488*] con maltosa y maltosa + 0,5 × MIC NOV. Los datos presentados son el promedio \pm SEM, n=3.

En ausencia de NOV, $\Delta spr0488$ [pLS1ROM] y $\Delta spr0488$ [pLS1R-*spr0488*] mostraron tiempos de duplicación equivalentes, tanto en presencia de sacarosa como de maltosa: $\Delta spr0488$ [pLS1ROM] con S $88,8 \pm 2,4$ y con M $99,0 \pm 1,4$ y $\Delta spr0488$ [pLS1R-*spr0488*] con S $86,6 \pm 4,3$ y con M $85,1 \pm 1,5$. Tampoco se observaron diferencias en el crecimiento de las dos cepas cuando crecieron en presencia de S y 0,5× MIC de NOV. Los tiempos de duplicación fueron de $152,2 \pm 4,4$ y $155,3 \pm 5,4$ min para $\Delta spr0488$ [pLS1ROM] y $\Delta spr0488$ [pLS1R-*spr0488*], respectivamente. Sin embargo, la inducción de la expresión de *spr0488* con M, si afectó al crecimiento en presencia de NOV. Mientras que la cepa $\Delta spr0488$ [pLS1ROM], portadora del vector vacío, creció con un tiempo de duplicación de $139,9 \pm 4,3$, la cepa $\Delta spr0488$ [pLS1R-*spr0488*] lo hizo con un tiempo de duplicación mayor, de $173,4 \pm 7,4$ 3 ($P = 0,007$). Estos resultados corroboran que la sobreproducción de Spr0488 aumenta la susceptibilidad a

NOV, lo que sugiere que esta proteína podría tener algún papel en la regulación del Sc. En base a esto, se llevó a cabo el estudio funcional de dicha proteína.

4 Análisis funcional de la proteína Spr0488

4.1 Spr0488 presenta características similares a proteínas de unión a ácidos nucleicos

Con el objetivo de identificar patrones, firmas y características predictivas en la secuencia de la proteína Spr0488 se realizó un análisis InterPro de la misma. Los resultados obtenidos incluyeron a Spr0488 en la superfamilia 2 de las helicasas y predicen la presencia de un dominio “helix-hairpin-helix” (HhH) que se localiza entre los aminoácidos Arg-86 y Glu-125 (Figura 24). Este dominio suele estar involucrado en la unión a ácidos nucleicos y se encuentra comúnmente en helicasas y otras proteínas de unión a DNA como enzimas de reparación o factores de transcripción. Se caracteriza por su capacidad para reconocer DNA o RNA a través de interacciones no covalentes. Además, no está definido por secuencias específicas de aminoácidos, sino por su estructura tridimensional formada por un par de hélices alfa conectadas por un bucle corto. La presencia de este motivo en Spr0488 sugiere que podría interactuar directamente con los ácidos nucleicos.

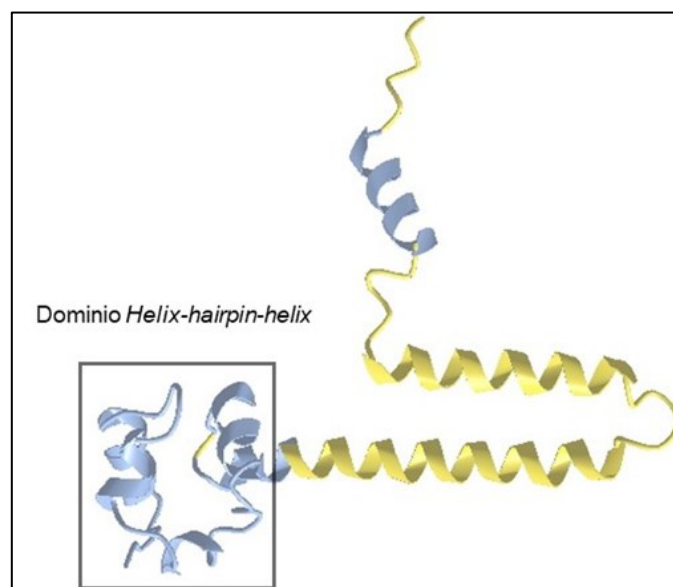


Figura 24. Predicción de la estructura terciaria de Spr0488. Se utilizó la herramienta iCn3D de NCBI para predicción de la estructura. En azul se indican las regiones con una puntuación pLDDT (predicted Local Distance Difference Test) > 90 y en amarillo las regiones con $70 > \text{pLDDT} > 50$. El sistema pLDDT es una métrica utilizada para evaluar la confianza en las predicciones estructurales de proteínas hechas por algoritmos de predicción como AlphaFold y se asignan puntuaciones pLDDT que varían de 0 a 100. El dominio *helix-hairpin-helix* (Arg-86 a Glu-125) encontrado en el análisis InterPro se recuadra en gris.

4.2 La sobreexpresión de *spr0488* no induce cambios globales en el transcriptoma de SPN

Para determinar si variaciones en los niveles de Spr0488 tienen un efecto global en el transcriptoma de SPN llevamos a cabo un análisis de RNA-seq de la cepa $\Delta spr0488$ [pLS1R-*spr0488*] en ausencia de Spr0488 (S) o con sobreproducción de ésta (M) (Anexos 1, 2 y Tabla 6). En condiciones de inducción de la expresión de Spr0488 (M) *versus* no inducción (S), se detectaron 35 y 33 genes con expresión alterada en ausencia y presencia de NOV, respectivamente, de los cuales 26 fueron comunes (18 de ellos con expresión aumentada) (Tabla 6). De los 35 DEGs observados en ausencia de NOV, 24 estaban regulados positivamente y 11 negativamente, y la mayoría de los DEGs (28) correspondieron a genes involucrados en el metabolismo y transporte de carbohidratos. Los 7 DEGs restantes mostraron una regulación positiva tras la inducción de Spr0488. Tres de ellos correspondieron a genes implicados en el metabolismo del RNA (*spr0357*, *spr0504* y *spr1940*), antiterminadores transcripcionales que, dada su localización, probablemente formen parte de operones relacionados con el metabolismo de carbohidratos. Otro (*spr0669*), está aparentemente implicado en el metabolismo del DNA, otro (*spr1643*) es una permeasa de sustrato desconocido y 2 corresponden a proteínas hipotéticas, entre las que se incluye Spr0488 (Tabla 6). De los 33 DEGs observados en presencia de NOV (24 regulados positivamente y 9 negativamente), 26 correspondieron a genes implicados en el metabolismo o transporte de azúcares. De los 7 restantes, sólo los genes *dprA* (implicado en el procesamiento del DNA durante la competencia) y *glpF* (transportador de glicerol) no fueron detectados en ausencia de NOV. Estos resultados demuestran que la inducción de Spr0488 no tiene un efecto significativo en el transcriptoma de SPN, a excepción de los genes relacionados con el metabolismo de azúcares, probablemente debido al sistema de inducción por maltosa utilizado.

Tabla 6. DEGs detectados en $\Delta spr0488$ [pLS1R-*spr0488*] en presencia de M frente a S con y sin NOV. Los cultivos se crecieron hasta $DO_{620\text{ nm}} = 0,3$, se diluyeron 200 veces en medio con S o con M.

Función	Descripción ^a	Locus	Variación de expresión sin NOV ^b	Variación de expresión con NOV ^b
Metabolismo de carbohidratos	Alfa 1-6-glucosidasa	<i>spr0310 (dexB)</i>	4,32	7,07
Proteína hipotética		<i>spr0311</i>	5,22	10,30
Transporte de azúcares	Manitol PTS EII	<i>spr0356 (mtlA)</i>	2,43	7,03
Metabolismo del RNA	Antiterminador transcripcional de la familia BglG	<i>spr0357</i>	2,45	4,67

RESULTADOS

Metabolismo de carbohidratos	Manitol-1-P 5-deshidrogenasa	<i>spr0359 (mtlD)</i>	2,05	
Proteína hipotética		spr0488	4,73	9,16
Metabolismo del RNA	Antiterminador transcripcional	<i>spr0504 (licT)</i>	2,72	
Transporte de azúcares	PTS componente EII de azúcar	<i>spr0505 (PTS-EII)</i>	2,11	2,88
Metabolismo de carbohidratos	6-P-beta-glucosidasa	<i>spr0506 (bglH)</i>	2,16	
	Componente IABC de la enzima PTS de glucosa	<i>spr0668 (ptsG)</i>	3,93	9,78
Metabolismo del DNA	Endonucleasa/exonucleasa/fo sfatasa	<i>spr0669</i>	4,56	9,64
Metabolismo de carbohidratos	Represor transcripcional del operón de la fructosa	<i>spr0778 (fruR)</i>	-2,91	-4,58
	Fructosa-1-P-quinasa	<i>spr0779 (fruB)</i>	-3,24	-5,53
	PTS componente IIBC de fructosa	<i>spr0780 (fruA)</i>	-2,97	-5,13
	Fosfo-beta-D-galactosidasa	<i>spr1069 (lacG)</i>	2,04	
Funciones reguladoras	Procesamiento de DNA	<i>spr1144(dprA)</i>		3,02
Metabolismo de carbohidratos	Alfa-amilasa	<i>spr1239</i>	6,55	22,61
	Fructoquinasa	<i>spr1565 (scrK)</i>	-3,05	-11,89
	PTS EII	<i>spr1566 (scrA)</i>		-6,10
	Sacarosa-6-P-hidrolasa	<i>spr1568 (scrB)</i>	-2,17	-4,63
	Proteína reguladora del regulón de sacarosa	<i>spr1569 (scrR)</i>	-2,72	-5,56
	Sacarosa-6-P-hidrolasa	<i>spr1617 (sacA)</i>	-2,94	-3,47
Transporte de azúcares	ABCT permeasa, azúcar	<i>spr1618 (ABC-MSP)</i>	-2,33	
	ABCT permeasa, azúcar	<i>spr1619 (ABC-MSP)</i>	-2,76	-8,85
	ABCT proteína de unión a sustrato	<i>spr1620 (ABC-SBP)</i>	-2,46	
Proteínas de transporte	ABCT permeasa, sustrato desconocido	<i>spr1643 (ABC-MSP)</i>	2,27	
Metabolismo de carbohidratos	Represor transcripcional del operón trehalosa	<i>spr1700 (treR)</i>	-2,04	
	Alcohol-acetaldehído deshidrogenasa	<i>spr1837 (adhE)</i>	2,09	
	Maltodextrina fosforilasa	<i>spr1916 (malP)</i>	6,26	14,71
	4-alfa-glucanotransferasa	<i>spr1917 (malM)</i>	5,15	9,01
	Regulador del operon mal	<i>Spr1918 (malX)</i>		4,48
	ABCT permeasa-maltosa/maltodextrina	<i>spr1919 (malC)</i>	3,42	8,66
	ABCT permeasa-maltosa/maltodextrina	<i>spr1920 (malD)</i>	4,01	16,38
	Transcetolasa (C-terminus)	<i>spr1936 (tktC)</i>	12,74	20,26
	Transcetolasa (N-terminus)	<i>spr1937 (tktN)</i>	9,68	17,49
	PTS subunidad IIC transportador de ascorbato	<i>spr1938</i>	8,41	16,22
	PTS subunidad IIC transportador de azucares	<i>spr1939</i>	5,85	6,09
	Metabolismo del RNA	Antiterminador transcripcional de la familia BglG	<i>spr1940</i>	3,39
Proteínas de transporte	Transporte de glicerol	<i>spr1988 (glpF)</i>		6,00
Metabolismo de carbohidratos	Glicerol-3-P-deshidrogenasa	<i>spr1989</i>		7,32
	Glicerol-3-P-deshidrogenasa	<i>spr1990</i>		7,92
	Glicerol quinasa	<i>spr1991 (glpK)</i>		7,02

^aABCT, transportador ABC, PTS, sistema fosfotransferasa. ^bLos genes cuya transcripción está alterada (dos réplicas), incluyen aquellos que mostraron un cambio significativo (valor absoluto ≥ 2) y un valor de $P \leq 0,01$.

Cuando se comparó el efecto de la NOV sobre el transcriptoma de la cepa *Δspr0488* [pLS1R-*spr0488*] crecida en S (sin Spr0488) con el de la cepa crecida en M (con sobreexpresión de Spr0488), se observó alguna diferencia. Tras el tratamiento con NOV se detectaron un total de 40 DEGs en el cultivo sin Spr0488 (19 genes regulados positivamente y 21 negativamente, Anexo 1) y 184 DEGs en el cultivo con sobreexpresión de Spr0488 (73 regulados positivamente y 111 negativamente, Anexo 2). De estos 184 DEGs, 155 fueron diferentes de la condición sin Spr0488, de los que 48 corresponden a genes con función desconocida (que codifican proteínas hipotéticas) y 24 están relacionados con el metabolismo o transporte de carbohidratos. Los DEGs restantes codifican proteínas de transporte (17), genes relacionados con procesos celulares o regulatorios (26), o genes implicados en rutas metabólicas o de síntesis (40). Fueron comunes a ambas condiciones 29 genes, de los cuales 17 regulados negativamente y 12 regulados positivamente (Figura 25A).

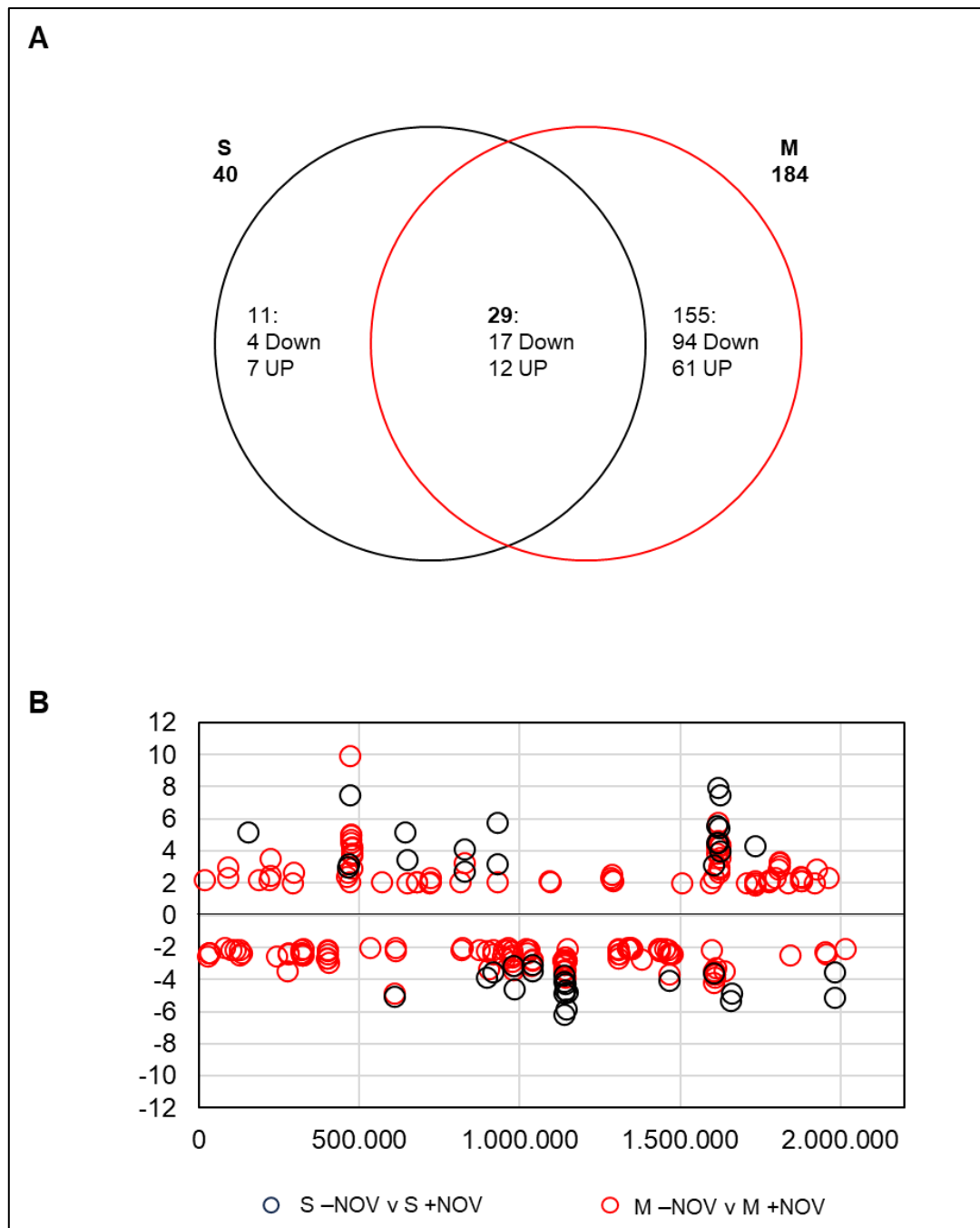


Figura 25. Número y localización de DEGs en el cromosoma de $\Delta spr0488$ [pLS1R-*spr0488*] tras el tratamiento con NOV en presencia o ausencia de *Spr0488*. Los cultivos crecieron hasta una $DO_{620\text{ nm}} = 0,3$ en A+Y con S, se diluyeron 100 veces en medio con S o M, y sin NOV (tras 210 min) o con $0,5\times$ MIC de NOV (270 min). Se aisló el RNA total y se secuenció como se describe en materiales y métodos. **(A)** Diagrama de Venn que muestra los DEGs tras el tratamiento con NOV en presencia de S o M. **(B)** La variación relativa de cada gen representada frente a la ubicación 5' de cada ORF en el cromosoma de R6 (bases 1 a 2.038.615). Se consideró un cambio de veces ≥ 2 (valor absoluto) y un valor de $P \leq 0,01$.

Por lo tanto, la sobreexpresión de *spr0488* en presencia de NOV parece no afectar la transcripción de global de SPN. Aunque hay un incremento en el número de DEGs en

presencia de NOV no se observa un aumento de expresión de genes funcionalmente relacionados con el Sc, sino de genes que se alteran en presencia de la maltosa o sacarosa, además de genes que codifican proteínas desconocidas. Tampoco se observó diferencia significativa en la ubicación de los DEG a lo largo del genoma en presencia de S o M (Figura 25B).

4.3 Hiperproducción y purificación de la proteína Spr0488

Para investigar la función de Spr0488 y llevar a cabo ensayos *in vitro*, se estandarizó un protocolo de inducción y purificación de la proteína. Para ello, se clonó un fragmento cromosómico que contenía su gen codificante en el sistema de expresión pET28b y se introdujo en la cepa BL21-CodonPlus (DE3) de *E. coli*, cuya inducción con IPTG permite la síntesis de la proteína de fusión H₆-Spr0488 (Spr0488 con una cola de 6 His fusionada a su extremo N-terminal). En primer lugar, se hicieron pruebas en las que tanto el crecimiento como la inducción se realizaron a 37 °C, pero Spr0488 estaba en su mayor parte en la fracción insoluble (no se muestra). En base a esto, y para incrementar la solubilidad de la proteína durante la hiperproducción, se bajó la temperatura de inducción a 30 °C. Se extrajeron muestras a distintos tiempos tras la adición de IPTG, separando la fracción soluble de la insoluble, y se analizó la hiperproducción de H₆-Spr0488 en geles de SDS-PAGE (Figura 26A). Tras 1 h de inducción con IPTG se observó una acumulación considerable de H₆-Spr0488, de la cual, el 50 % se encontraba en la fracción soluble. Los niveles de proteína no aumentaron a las 2 h de inducción por lo que 1h a 30 °C se consideraron las condiciones óptimas de inducción a utilizar para su purificación.

La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad en columnas HiTrap Chelating HP con el sistema AKTA prime como se describe en materiales y métodos, utilizando un gradiente de 20 a 400 mM de imidazol (Figura 23B). Los extractos crudos procedentes de muestras recogidas antes y después de la inducción del cultivo con IPTG se analizaron en un gel de SDS-PAGE junto con las fracciones recogidas durante la aplicación del gradiente de imidazol (Figura 26C). Entre las fracciones F23 y F25 se observó una banda de proteína, presente también en el extracto crudo inducido con IPTG, que se correspondía con el tamaño esperado de H₆-Spr0488 (~15,18 kDa) y que no se observó en el cultivo no inducido. Estas fracciones correspondieron a un pico de absorbancia en el cromatograma entre 190 y 222 mM de imidazol. Las fracciones se dializaron para eliminar el imidazol y la fracción F24 se usó para la realización de los ensayos posteriores.

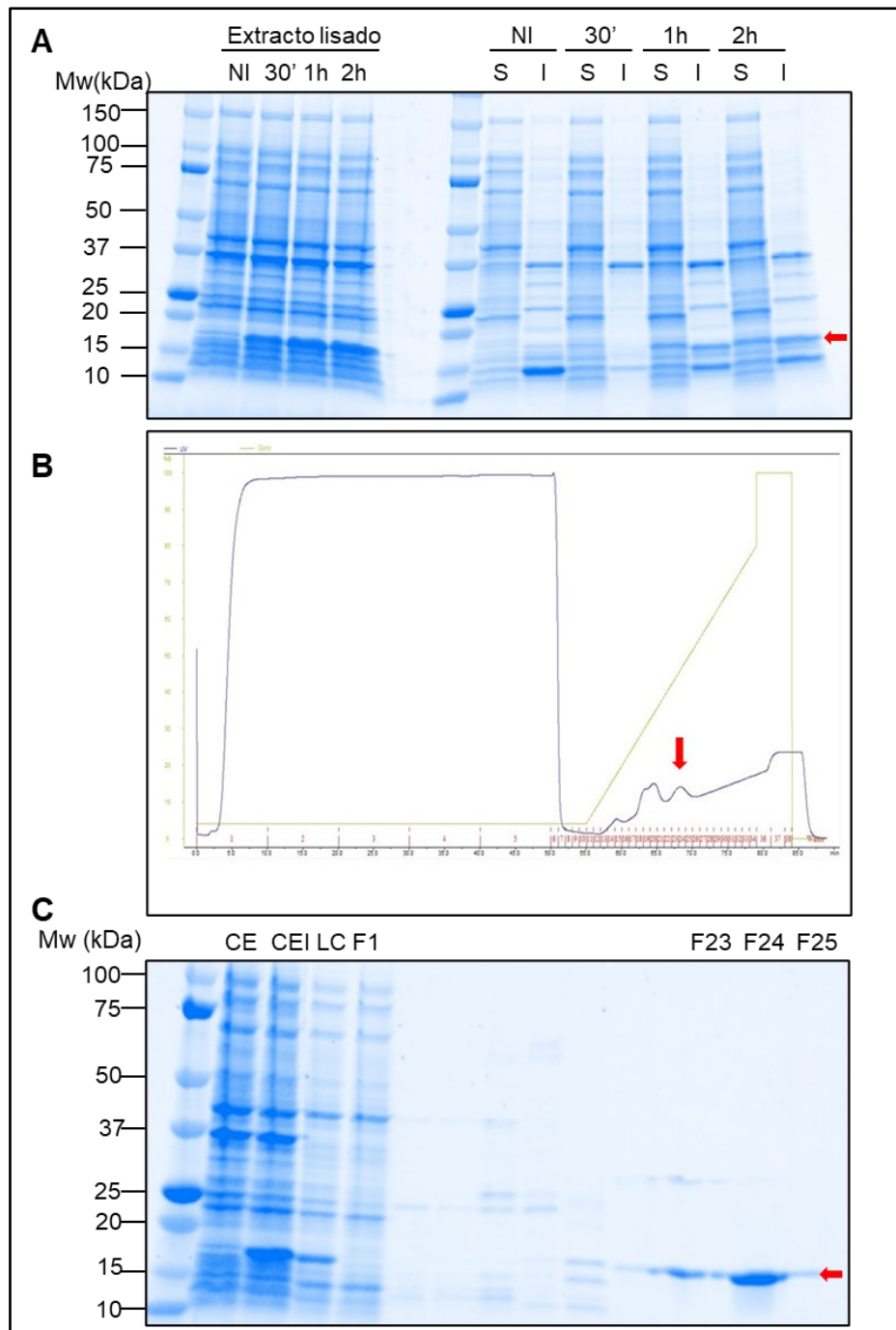


Figura 26. Purificación de H₆-Spr0488 a partir de *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) [pET28-*spr0488*]. (A) Pruebas de inducción de Spr0488 a 30 °C. NI, no inducido, S, fracción soluble e I, fracción insoluble del lisado. **(B)** Cromatograma de la purificación de Spr0488 en el sistema AKTA en el que se observa un pico de elución (flecha roja) de la proteína en la fracción 24. **(C)** SDS-PAGE de muestras de extracto crudo de cultivos no inducidos (CE) o inducidos (CEI) con IPTG durante 1 h a 30 °C y lisado cargado (LC) en el AKTA. Se indican los números de las fracciones eluidas de la columna. Se fraccionaron 30 µl de las muestras en el gel teñido con Coomassie Blue. Los pesos moleculares se indican a la izquierda.

4.4 Spr0488 activa la relajación del DNA por parte deTopo I

El hecho de que la sobreexpresión del gen *spr0488* confiera una mayor sensibilidad a NOV sugiere que podría haber alguna relación entre la proteína Spr0488 y las topoisomerasas. En base a ésto, se estudió el efecto de H₆-Spr0488 sobre la actividad enzimática de Topo I en la relajación del pBR322 *in vitro* (Figura 27A, B).

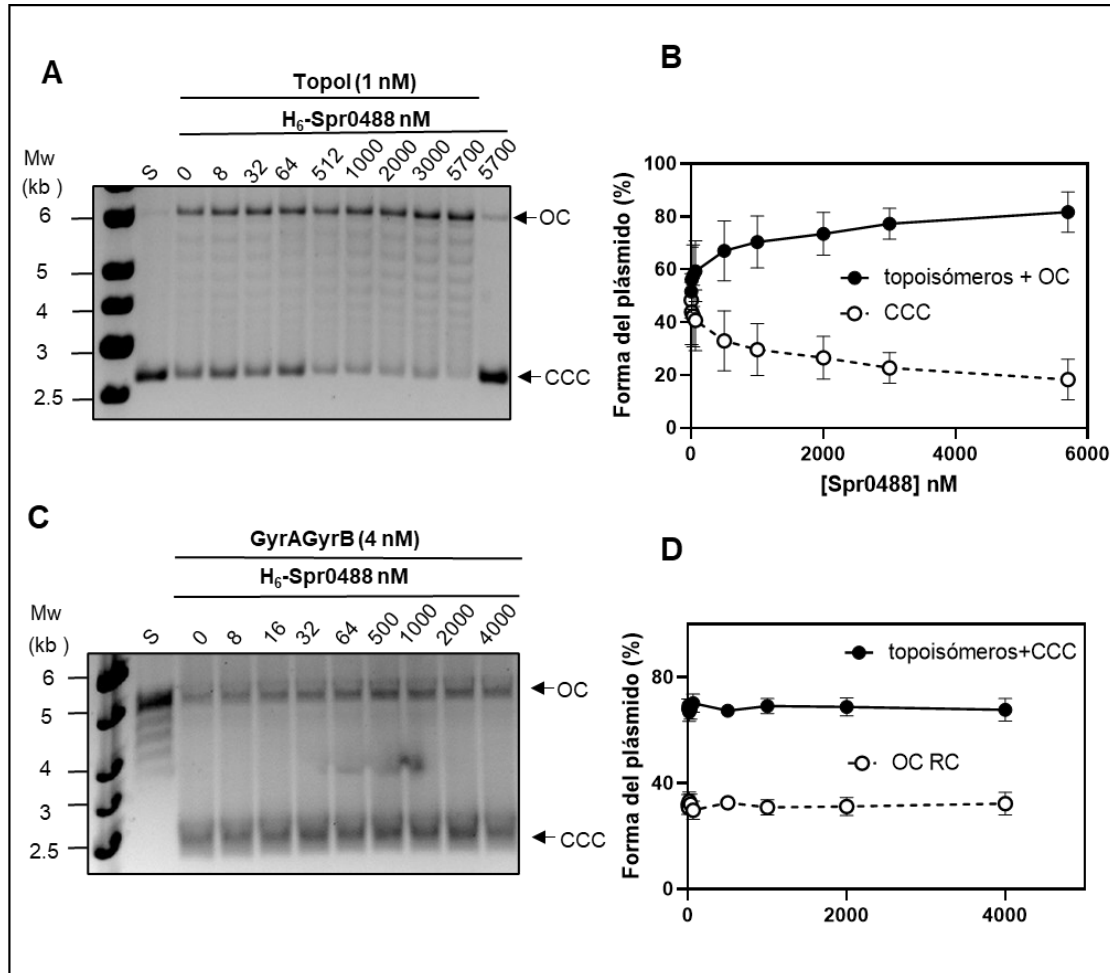


Figura 27. Efecto de Spr0488 sobre la actividad de Topo I y Girasa. (A) Activación de la relajación de pBR322 por Topo I en presencia de Spr0488. Las concentraciones de Spr0488 indicadas y la Topo I se agregaron simultáneamente a la mezcla de reacción. Las muestras se procesaron y analizaron como se describe en materiales y métodos. Mw, estándar de peso molecular (kb); S, sustrato; CCC, formas circulares covalentemente cerradas; OC, formas circulares abiertas; RC, formas circulares relajadas. (B) Actividad de Topo I determinada como el aumento en el porcentaje de los topoisómeros (OC/RC) y la disminución de la forma CCC en presencia de Spr0488. Los resultados son el promedio ± SEM, n=3. (C) Determinación del efecto de Spr0488 sobre la actividad de la girasa. La actividad de Sc de pBR322 relajado mediada por la DNA girasa no se ve afectada por Spr0488. Se midió la actividad de introducción de Sc negativo en pBR322 relajado utilizando 4 nM de girasa reconstituida y concentraciones crecientes de Spr0488. (D) Actividad de girasa determinada como porcentaje de topoisómeros +CCC y porcentaje de formas OC/RC en presencia de Spr0488. Los resultados son el promedio ± SEM, n=3.

Como se observa en la Figura 27A, Spr0488 activó la relajación del pBR322 mediada por Topo I de forma dependiente de la cantidad de Spr0488. Esta activación se cuantificó considerando tanto la disminución de la forma CCC del plásmido como el aumento de los topoisómeros + la forma OC (Figura 27B). Los resultados mostraron una disminución de la forma CCC acompañada de un aumento simultáneo de los topoisómeros, a medida que aumentaba la concentración de Spr0488. La suma de los topoisómeros + OC aumentó de un $51,6 \pm 3,2$ % en ausencia de Spr0488, hasta el $81,7 \pm 3,6$ % en la concentración más alta de ésta, al mismo tiempo que la forma CCC se redujo de un $48,4 \pm 3,2$ % hasta un $18,3 \pm 3,6$ %.

Por otra parte, no se observó efecto sobre la actividad de la girasa de SPN (Figura 27C, D), ya que la suma de las formas CCC + topoisómeros se mantuvieron alrededor de un 68 % en todas las concentraciones de Spr0488 analizadas. Estos resultados indican que Spr0488 activa específicamente la actividad de relajación de Topo I, si bien los niveles de activación alcanzados con $5,7 \mu\text{M}$ de Spr0488 fueron ligeramente inferiores a los observados previamente con $4 \mu\text{M}$ de la proteína StaR.

4.5 Digestión con trombina de Spr0488

Los ensayos descritos en el apartado anterior demostraron que H₆-Spr0488 activa específicamente la capacidad de relajación del DNA de la Topo I. Sin embargo, esta activación requiere un exceso de unas 500 veces de H₆-Spr0488 sobre Topo I. La proteína de fusión H₆-Spr0488 posee 20 aminoácidos adicionales con respecto a la proteína nativa Spr0488 de tan sólo 131, lo que puede alterar considerablemente su conformación y afectar a su actividad. H₆-Spr0488 posee en su secuencia un sitio de digestión con trombina que permite la eliminación 17 de los 20 aminoácidos fusionados, lo que daría como resultado una proteína digerida (Spr0488_D) con tan sólo 3 residuos adicionales en su extremo N-terminal. Con el objetivo de obtener dicha proteína, se llevaron a cabo ensayos de digestión con trombina a pequeña escala para optimizar la reacción de digestión usando distintas concentraciones de trombina y distintos tiempos de reacción (Figura 28). La digestión con trombina dio como resultado una única banda del tamaño correspondiente a la proteína digerida, alcanzándose un 100 % de digestión tras 8 h de incubación con 0,5 mU de enzima.

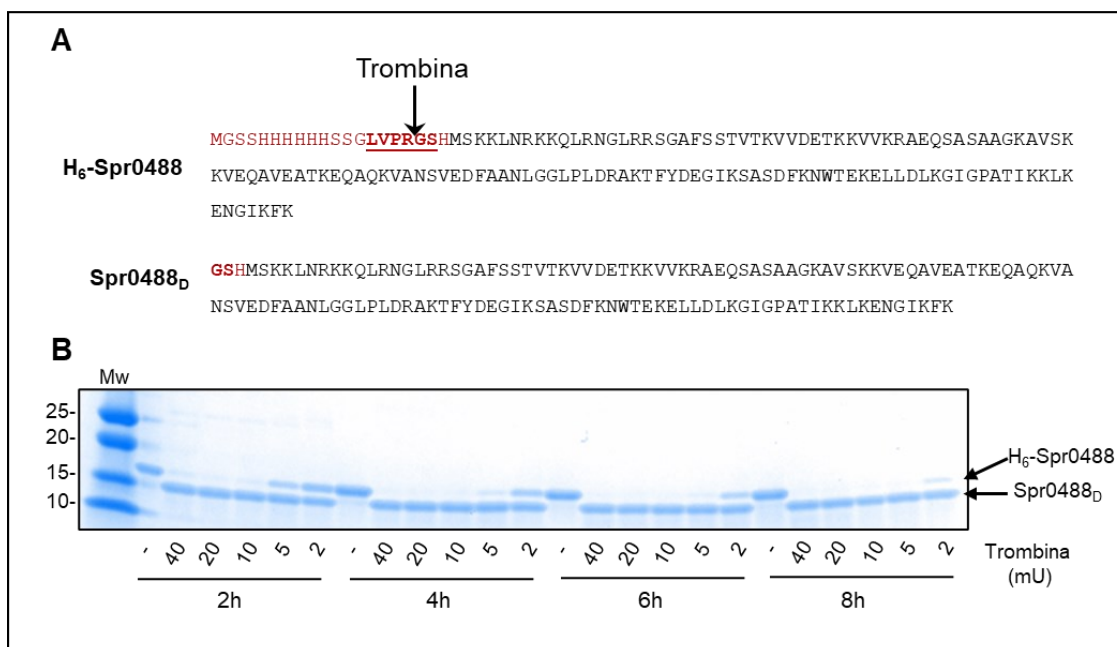


Figura 28. Digestión de H₆-Spr0488 con trombina. (A) Secuencia de aminoácidos de H₆-Spr0488 antes y después de su digestión con trombina. La secuencia de Spr0488 se muestran en negro y los 20 residuos adicionales fusionados en el extremo N-terminal en rojo. La secuencia de reconocimiento de la trombina se indica subrayada en negrita y la flecha señala el sitio de digestión. (B) Prueba de digestión con trombina. Se incubaron 10 µg de H₆-Spr0488 con las unidades de trombina y los tiempos de incubación indicados. Se corrieron 10 µl de cada muestra en un gel SDS-PAGE 4-20 % y se tiñó con coomassie para su visualización. La banda correspondiente a la proteína digerida (Spr0488_D) y no digerida (H₆-Spr0488) se indican con una flecha. Mw: estándar de peso molecular.

En base a estos resultados, 650 µg de H₆-Spr0488 fueron digeridos con 325 mU de trombina biotinilada. Posteriormente, la trombina se eliminó de la muestra con agarosa-Streptavidina como se describe en el apartado 15 y se almacenó con 50 % de glicerol.

4.6 Spr0488 es una proteína dimérica

Los estudios de predicción descritos en el apartado 4.1, predicen la presencia de un dominio HhH en Spr0488. Este dominio presenta muchas similitudes estructurales con el motivo SAM (Steril Alpha Motif), descrito como un módulo de interacción proteína-proteína implicado en multimerización. En base esto, se estudió el estado de oligomerización tanto de H₆-Spr0488 como de Spr0488_D mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Esta técnica permite separar biomoléculas en función de su tamaño en solución, pudiendo diferenciar y detectar agregados (monómeros, dímeros, trímeros, etc) de una misma molécula. El orden de elución de las moléculas de la columna depende de su masa molecular (MM). Las de mayor MM son poco retenidas

en los poros de la matriz empaquetada y eluyen antes, mientras que las de menor MM se retienen más y eluyen después. Si bien el mecanismo de exclusión se basa en el tamaño de la molécula en solución, está también influenciado por la forma de la proteína y la composición del eluyente.

Se llevó a cabo el análisis de oligomerización de Spr0488 mediante cromatografía de exclusión. Se testaron eluyentes con distinta fuerza iónica (Tris 20 mM, pH 8 con 100, 200 ó 300 mM de NaCl), así como el tampón de ensayo de actividad Topo I (20 mM Tris pH 7,8, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1mM DTT), y la MM de H₆-Spr0488 y Spr0488_D se estimó comparando su perfil de elución con el de las proteínas usadas como estándar de peso molecular (Figura 29A y B). Con 200 y 300 mM de NaCl se observó un pico estrecho que corresponde a MMs estimadas de 33 y 34-38 kDa para H₆-Spr0488 y Spr0488_D, respectivamente (Figura 29C y D). Estas MMs son compatibles, en ambas proteínas, con el valor teórico de un dímero (33,0 kDa para H₆-Spr0488 y 29,3 kDa para Spr0488_D), sugiriendo que Spr0488 es un dímero en solución, y que su dimerización no está afectada por la fusión de la cola de His en el extremo N-terminal. Sin embargo, con 100 mM de NaCl se observó un pico más ancho que indica una mayor heterogeneidad de la muestra. En el caso de Spr0488_D, se observó además una distribución bimodal en la que se pueden distinguir dos formas que corresponden a una MM estimada de 27,4 y 20,4 kDa.

Cuando el análisis se realizó en el tampón de actividad de la Topo I, se observaron dos picos, uno mayoritario correspondiente a una MM de 35,1 kDa y otro minoritario correspondiente a 19,4 kDa, compatibles con un dímero y un monómero, respectivamente. Del mismo modo, un pequeño hombro correspondiente a un MM de 20,8 kDa se puede apreciar también en tampón Tris con 300 mM de NaCl.

Estos resultados indican que Spr0488 se encuentra mayoritariamente en forma dimérica en soluciones con concentraciones de sal ≥ 100 mM. En el caso de la proteína Spr0488_D, existe una discrepancia entre la MM estimada y la teórica, siendo la primera ligeramente superior a la segunda en todos los casos. Tanto es así, que muestra una MM mayor que la de la forma no digerida, a pesar de ser ~ 2 kDa menor. Esto podría sugerir que la fusión de la cola de His afecta a la conformación de la proteína contribuyendo a su compactación.

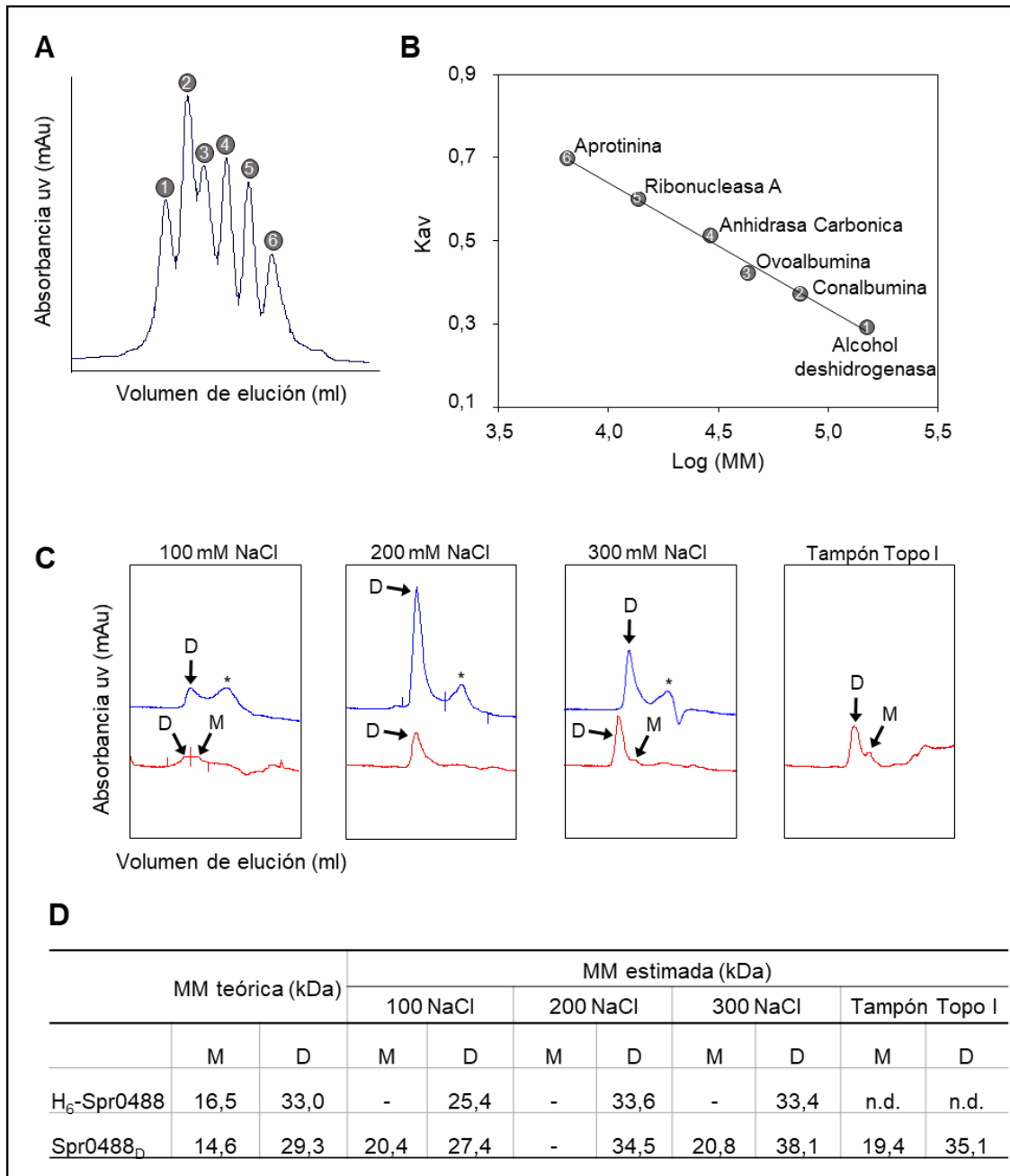


Figura 29. Análisis de oligomerización de Spr0488. El estado de oligomerización de H₆-Spr0488 y Spr0488_D se analizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño. **(A)** Cromatograma obtenido durante la calibración de la columna. Se inyectaron 100 µl de una mezcla que contenía entre 0,2 ó 0,3 mg de cada proteína a un flujo de 0,5 ml/min. **(B)** Curva de calibrado para la estimación de la MM. Representación del coeficiente medio de distribución (Kav) obtenido con las proteínas de calibración *versus* el logaritmo de su MM. La relación entre los puntos de la gráfica y los picos del cromatograma se indica con números. **(C)** Cromatograma obtenido para H₆-Spr0488 (azul) y Spr0488_D (rojo) con distintos eluentes. Se inyectaron 100 µl de cada muestra conteniendo ~0,03 mg de proteína a un flujo 0,5 mg/ml. Los picos correspondientes al dímero (D) y al monómero (M) se indican con una flecha. Otros picos correspondientes a fragmentos de menor tamaño se indican con asteriscos. **(D)** Tabla con las MM teóricas y las estimadas del monómero (M) y dímero (D) de H₆-Spr0488 y Spr0488_D con cada uno de los eluentes testados.

4.7 Actividad de Spr0488 digerida con trombina

Para determinar si la eliminación de la cola de His fusionada a H₆-Spr0488 afectaba a su capacidad de activación de la Topo I se llevaron a cabo ensayos de relajación del plásmido pBR322 en presencia de concentraciones crecientes de Spr0488_D.

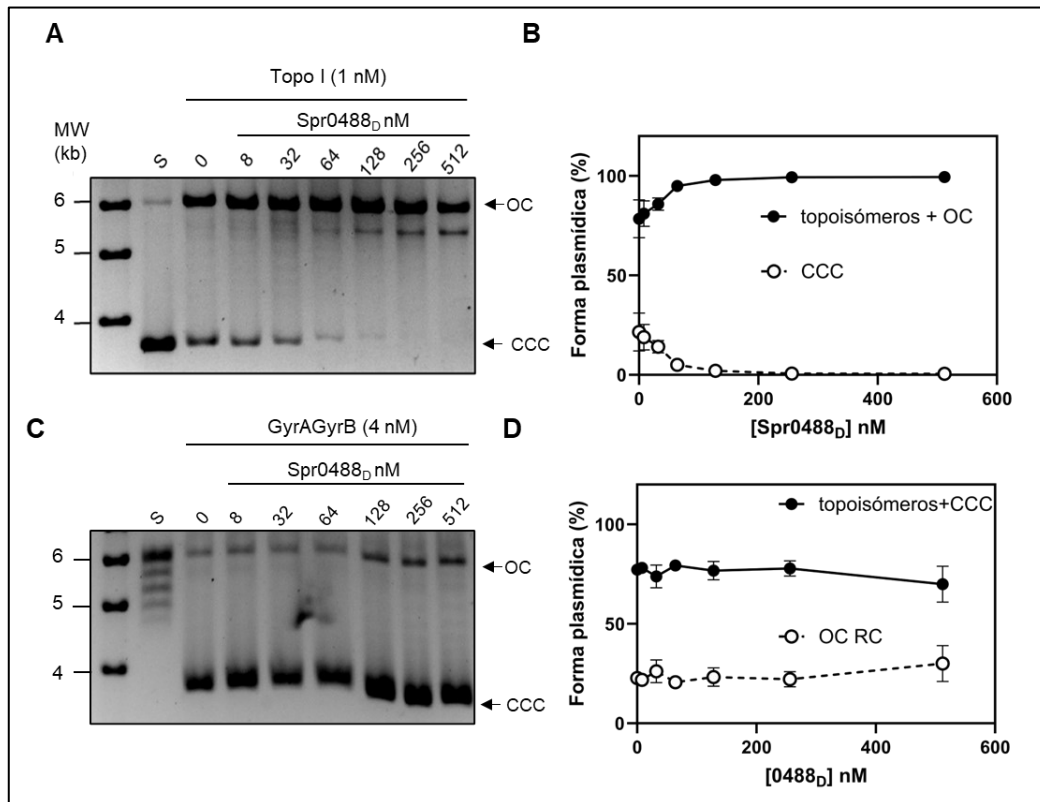


Figura 30. Efecto de Spr0488_D sobre la actividad de Topo I y Girasa. (A) Activación de la relajación de pBR322 por Topo I. Las concentraciones de Spr0488 indicadas y la Topo I se agregaron simultáneamente a la mezcla de reacción. Las muestras se procesaron y analizaron como se describe en materiales y métodos. Mw, estándar de peso molecular (kb); S, sustrato; CCC, plásmidos circulares covalentemente cerrados; OC, plásmidos circulares abiertos; RC, plásmidos circulares relajados. (B) Actividad de Topo I determinada como el aumento en el porcentaje de los topoisómeros (OC/RC) y la disminución de la forma CCC en presencia de Spr0488. (C) Determinación del efecto de Spr0488_D sobre la actividad de Sc de pBR322 relajado mediada por la DNA girasa. Se utilizaron 4 nM de girasa reconstituida y concentraciones crecientes de Spr0488. (D) Actividad de girasa determinada como porcentaje de topoisómeros +CCC y porcentaje de formas OC/RC en presencia de Spr0488. Los resultados son el promedio ± SEM, n=2

Como era de esperar, la proteína digerida Spr488_D también aumentó la relajación del pBR322 mediada por Topo I (Figura 30A) de forma dependiente de la cantidad de Spr0488_D. La forma CCC se redujo de un 21,5 ± 9,5% en ausencia de Spr0488_D hasta un 0,6 ± 0,3 % en su concentración más alta, y los topoisómeros + OC aumentaron desde un 78,5 ± 9,5% hasta el 99 % ± 0,3 % (Figura 30B). A diferencia de lo que ocurre

con la proteína H₆-Spr0488, son necesarias concentraciones mucho más bajas de Spr0488_D para activar la Topo I, observándose un incremento en la relajación del pBR322 a partir de 32 nM de Spr0488_D. Esto demuestra que la fusión de 20 aminoácidos en su extremo N-terminal reduce significativamente su capacidad de activación de Topo I. De igual modo, no hubo efecto sobre la actividad de Girasa (Figura 30C y D).

4.8 Spr0488 es una proteína de unión a DNA bicatenario

La activación de la Topo I por parte de Spr0488 puede deberse: a la interacción directa entre ambas proteínas, a la interacción de Spr0488 con el DNA haciendolo más accesible a Topo I, o a ambas. La segunda hipótesis requeriría la interacción de Spr0488 con el DNA y, de hecho, los estudios de predicción de estructura secundaria (apartado 3.1) apuntan a la presencia de motivos de unión a ácidos nucleicos. En base a esto, analizamos la capacidad de H₆-Spr0488 y Spr0488_D de unirse a distintos tipos de sustrato mediante ensayos de retraso en gel (EMSA). En primer lugar, se utilizó un dsDNA generado por PCR con oligonucleótidos marcados con biotina en su extremo 5'. Se amplificó un fragmento del locus *dprA* de 261 pb, único gen cuya expresión aumenta al inducir la sobreproducción de Sp0488 (maltosa) en presencia de NOV según los datos de RNAseq (Tabla 6). Este fragmento se incubó con distintas cantidades de H₆-Spr0488 y Spr0488_D y se analizó la movilidad electroforética de las muestras en geles de poliacrilamida no desnaturizantes (Figura 31A). Los resultados demostraron que las dos proteínas se comportaron de manera similar. En ambos casos, a 256 nM de proteína se observaron bandas poco definidas con menor movilidad electroforética, que presumiblemente corresponden a complejos proteína:DNA. Este retraso fue ligeramente superior con Spr0488_D, en la que todo el dsDNA quedó retenido en complejos de alto peso molecular. La aparición de estos complejos podría implicar la unión de varias moléculas de Spr0488 al fragmento de DNA. Para evitar esto, se utilizaron oligonucleótidos fluorescentes de 50 y 80 nt de longitud que permitían generar sustratos más pequeños y con distintas estructuras.

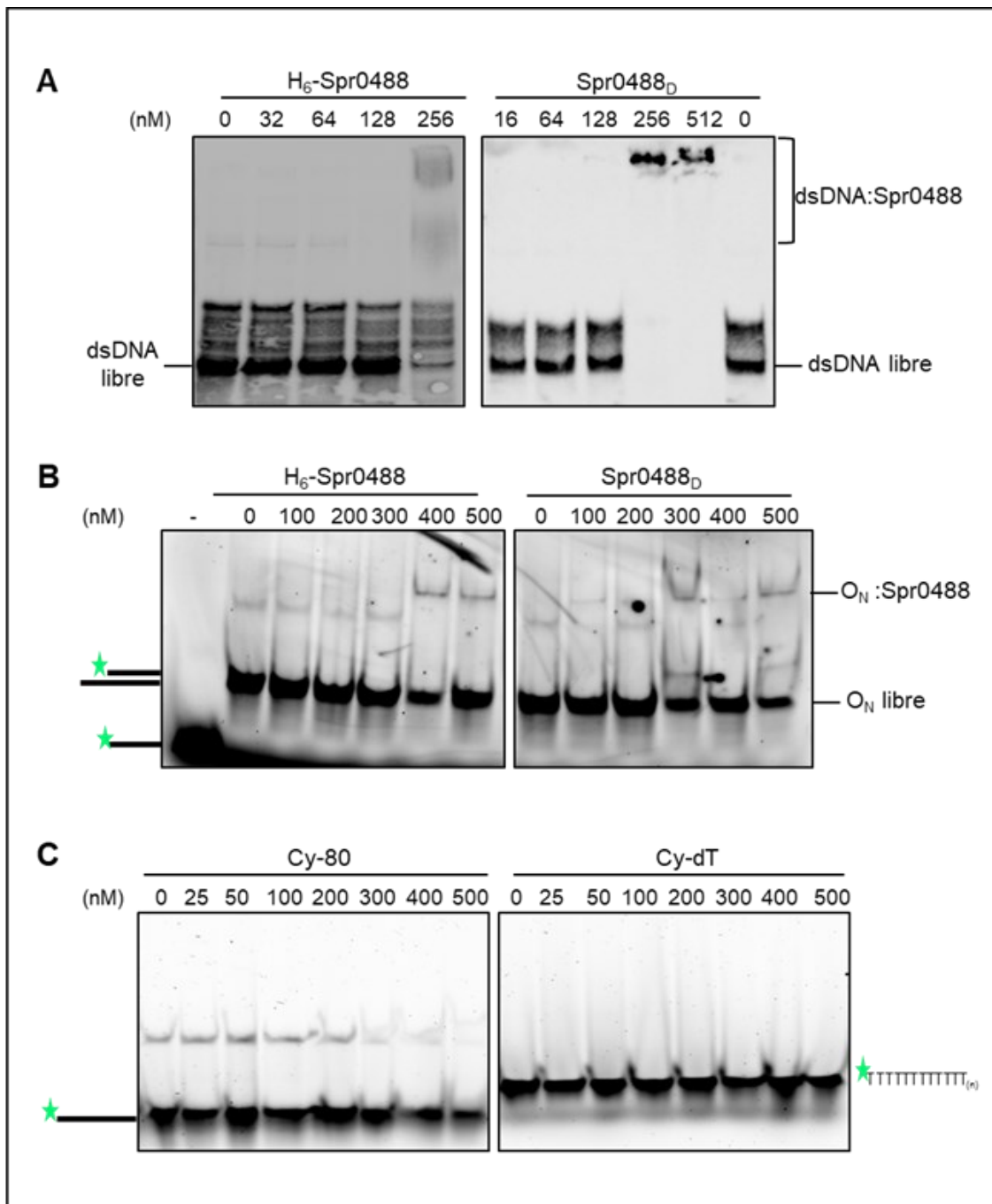


Figura 31. Spr0488 se une a dsDNA pero no a ssDNA. Se analizó la capacidad de unión de Spr0488 a distintos sustratos mediante EMSAs como se describe en materiales y métodos. **(A)** Unión de H₆-Spr0488 y Spr0488_D al fragmento de PCR DprA de 261 pb marcado con biotina. Las reacciones se realizaron incubando 2 nM de sustrato con las concentraciones indicadas de proteína a 37 °C durante 30 min. **(B)** Unión de H₆-Spr0488 y Spr0488_D al DNA bicatenario fluorescente O_N con una región protuberante de 30 nt en el extremo 3' (★). **(C)** Unión de Spr0488_D a ssDNA. Se utilizó el oligo fluorescente Cy-80 (★) y un polímero de timinas Cy-dT (★). Los ensayos con sustratos fluorescentes se realizaron incubando 10 nM de sustrato con las concentraciones indicadas de proteínas a 37 °C durante 20 min. Las reacciones se corrieron en geles no desnaturalizantes del 5 % de poliacrilamida en TBE.

Hibridando el oligo fluorescente Cy-50 con el oligo N80 se generó el substrato O_N , un dsDNA con una región protuberante de 30 nt en el extremo 3'. La incubación de H_6 -Spr0488 y Spr0488_D con este substrato dio lugar a una banda definida, de menor movilidad electroforética que el substrato libre, en presencia de 400 y 100 nM de proteína, respectivamente (Figura 31B). Por tanto, ambas proteínas son capaces de unir el substrato O_N formando un solo complejo DNA:proteína. Sin embargo, la capacidad de unión de la proteína digerida fue considerablemente mayor que la de la proteína sin digerir, y se detectaron complejos DNA:Spr0488_D con una relación estequiométrica de 1:10. Cuando se utilizaron los oligonucleótidos Cy-80 ó Cy-dT no se observó ninguna alteración en la movilidad electroforética con ninguna de las dos proteínas, lo que demuestra que H_6 -Spr0488 y Spr0488_D no son capaces unir ssDNA en las condiciones testadas, independientemente de su secuencia.

Estos resultados, demuestran que Spr0488 se une a DNA total o parcialmente bicatenario. Por otra parte, al igual que sucede con la activación de la Topo I, su capacidad de unión al DNA se ve disminuída por la fusión de una cola de 20 aminoácidos en su extremo N-terminal.

DISCUSIÓN

La compactación del DNA bacteriano en el nucleoide es esencial para la regulación de la replicación, la transcripción y la recombinación. Dicha compactación, esencial para la viabilidad de SPN, está íntimamente relacionada con el Sc, cuyos niveles están determinados por el equilibrio entre las actividades de la girasa y de la Topo I (Ferrándiz et al., 2010). SPN desencadena respuestas transcripcionales homeostáticas cuando la densidad de Sc disminuye en un 25 % (de la Campa et al., 2017) o cuando aumenta en un 40 % (Ferrándiz et al., 2016). Estas respuestas globales afectan la transcripción de las topoisomerasas. La relajación desencadena una regulación positiva (aproximadamente 2 veces) de los genes de la girasa (*gyrA* y *gyrB*) y una regulación negativa de Topo I (*topA*, de aproximadamente 10 veces) y Topo IV (*parE* y *parC*, de aproximadamente 3 veces) (Ferrándiz et al., 2010). Cuando el Sc aumenta, *topA* vuelve a estar regulado negativamente (aproximadamente 2 veces), mientras que *gyrA*, *gyrB*, *parE* y *parC* permanecen sin cambios (Ferrándiz et al., 2016). De esta forma, la regulación negativa de la transcripción de *topA*, aunque a diferentes niveles, permite la recuperación del Sc y el crecimiento celular.

Además de la actividad de las topoisomerasas, existen redes de proteínas que gobiernan la topología cromosómica de las bacterias, si bien éste sigue siendo un campo desconocido. Las NAPs suelen participar del control topológico del cromosoma bacteriano. En esta tesis se ha estudiado el efecto de cuatro proteínas presentes en el nucleoide de SPN: StaR, Spr0488, RapZ e YhbY. Dos de ellas, StaR y Spr0488, presentaron evidencias de efectos relacionados con el control del Sc, por lo que hemos profundizado en su estudio funcional.

En SPN, la respuesta transcriptómica de la cepa silvestre R6 a la relajación del DNA desencadenada por NOV, implica una regulación negativa, de aproximadamente 2 veces, del gen que codifica StaR, que de hecho está incluido en un dominio regulado negativamente (de la Campa et al., 2017). Sin embargo, el gen que codifica Spr0488 no sufre variación significativa de su expresión por cambios en el Sc y está incluido en un dominio no regulado, NR (Ferrándiz et al., 2016; de la Campa et al., 2017; Martín-Galiano et al., 2017). La disminución en la transcripción de *staR* es similar a la observada para el gen que codifica HU (alrededor de 3 veces), la única NAP descrita hasta ahora en SPN, y que es esencial para el mantenimiento del Sc (Ferrándiz et al., 2018). La regulación negativa de HU y StaR se produce a concentraciones inhibitorias de NOV, pero no a concentraciones subinhibitorias, donde no se observan cambios en la transcripción (Ferrándiz et al., 2018) o en la cantidad de StaR (Figura 10). Nuestros resultados demuestran que en ausencia de StaR, SPN es más sensible a NOV (Figura 9) y su ubicación en un dominio regulado negativamente es importante para la

supervivencia celular en presencia de NOV. Por otro lado, niveles de StaR correspondientes al doble de su concentración basal son suficientes para aumentar también la susceptibilidad a NOV. Además, reducen la recuperación del Sc a concentraciones inhibitorias de NOV, de modo que tras 30 minutos de tratamiento con el antibiótico la variación de Sc es del 21 % frente al 12,5 % observado en ausencia de inducción (Figura 12). Presumiblemente, esto se debe a la activación de Topo I por parte de StaR mediante la interacción proteína-proteína, demostrada en esta tesis. Todos estos resultados indican que StaR juega un papel importante en la homeostasis del Sc en SPN mediado por Topo I. Su ubicación en un dominio DOWN es consistente con esta función. La respuesta homeostática a la relajación implica una regulación negativa tanto de Topo I, a nivel del transcrito de *topA* (Ferrándiz et al., 2010) y de los niveles de proteína (Figura 10), como de StaR. Esto contribuiría a la recuperación de los niveles de Sc tras la relajación, disminuyendo los niveles de StaR e impidiendo la activación de Topo I.

SPN carece de la mayoría de las NAPs caracterizadas en *E. coli*, con la excepción de HU (Ferrándiz et al., 2018) y SMC (Minnen et al., 2011). En un estudio microscópico de *E. coli* utilizando DAPI como tinción para teñir el DNA, se demostró que HU y otras NAPs se localizan uniformemente dentro del nucleoide (Azam et al., 2000). En nuestro laboratorio se ha desarrollado un método que permite identificar y localizar con precisión nucleoides de SPN y determinar su nivel de compactación *in vivo*, utilizando microscopía confocal de superresolución y el intercalante de DNA Sytox para teñir los nucleoides (García-López et al., 2022). En esta tesis, hemos utilizado dicha técnica para demostrar que StaR, efectivamente, se localiza en el nucleoide (Figura 14). Un análisis estadístico realizado con más de 2.500 células mostró colocación de StaR con el nucleoide en más del 50 % de las bacterias analizadas. Estos estudios constituyen el primer análisis cuantitativo de co-localización realizado hasta el momento en SPN. Puesto que no existen datos previos que permitan establecer un umbral de colocación entre las NAPs y el nucleoide, hemos considerado que una colocación superior al 50 % refleja una co-localización real. Es importante señalar que los cultivos no fueron sincrónicos y la localización de StaR en el nucleoide podría depender de la fase del ciclo celular, tal como ocurre en *E. coli* (Azam et al., 1999; Dillon & Dorman, 2010). Nuestros resultados representan la primera demostración de una NAP localizada en el nucleoide en SPN.

Al igual que StaR regula la actividad de la Topo I, en otras bacterias también se han identificado NAPs que regulan las topoisomerasas. Este es el caso, por ejemplo, de Gyrl, que inhibe la girasa de *E. coli* (Nakanishi et al., 1998), GapR de *Caulobacter*

crescentus que estimula la actividad de girasa y Topo IV para eliminar Sc positivo durante la replicación del DNA (Guo et al., 2018), y HU que activa Topo I en *M. tuberculosis* (Ghosh et al., 2014). La proteína RecA de *E. coli* interactúa con la Topo I y es otro ejemplo de cooperación entre topoisomerasas y otras proteínas (Banda et al., 2016). Así mismo, se ha demostrado que la proteína YejK de *E. coli*, homóloga de StaR (Figura 8A), inhibe tanto la actividad de la girasa como la de la Topo IV (Lee & Marians, 2013). Por el contrario, nuestros datos demuestran que StaR no tiene ningún efecto sobre la actividad de Sc de la girasa y sólo modula la actividad de la Topo I, poniendo de manifiesto diferencias importantes entre YejK y StaR a nivel funcional. A diferencia de lo que ocurre *E. coli*, el Sc en *S. pneumoniae* está controlado principalmente por las actividades opuestas de Topo I y girasa (Ferrándiz et al., 2010, 2016) y la Topo IV contribuye en menor medida al mismo. También se ha observado en eucariotas una regulación de la actividad de la topoisomerasa I (TOP1). Se ha descrito que la actividad TOP1 está controlada por la RNAPII fosforilada que modula la elongación durante la transcripción (Baranello et al., 2016). En SPN, Topo I es la principal topoisomerasa implicada en la regulación del Sc (Ferrándiz et al., 2010, 2016) y en la transcripción (Ferrándiz et al., 2021), por lo tanto, su actividad debe estar finamente regulada. Además, mutaciones en la Topo I pueden cambiar su actividad y alterar la sensibilidad a inhibidores de esta enzima en SPN (García-López et al., 2023).

En este trabajo hemos demostrado también que existe una interacción física entre StaR y Topo I (Figura 17), mientras que Yejk se une a DNA formando un complejo proteína-DNA y no se ha demostrado interacción física con la girasa ni la Topo IV de *E. coli* (Lee & Marians, 2013). Otros estudios han demostrado la interacción funcional y física entre una topoisomerasa y otras proteínas. Así, por ejemplo, en *M. tuberculosis* HU también regula la actividad de Topo I a través de interacción física (Ghosh et al., 2014), las proteínas MukB (Hayama & Marians, 2010) o FtsK interaccionan con la Topo IV de *E. coli* y también modulan su actividad (Espeli et al., 2003). La interacción entre StaR y Topo I es importante para mantener la estabilidad genómica y para permitir respuestas rápidas y precisas a los cambios en el entorno, asegurando así la supervivencia y adaptación de SPN a diferentes condiciones que afectan la compactación del nucleóide.

El hecho de pertenecer a una misma familia Pfam no implica compartir exactamente las mismas propiedades. Sin embargo, nosotros hemos confirmado que, al igual que la proteína YejK de *E. coli*, StaR es una NAP, con un tamaño similar a YejK, y que también participa en la homeostasis del Sc regulando la actividad de las topoisomerasas. StaR es el primer modulador de Topo I caracterizado en SPN. Se han

realizado numerosos intentos por resolver la estructura StaR de SPN, pero todos ellos sin éxito, debido a la baja difracción de sus cristales. Sin embargo, la utilización de la herramienta de inteligencia artificial AlphaFold, ha demostrado que hay también similitudes estructurales entre StaR y YejK. (Figura 8B). Nuestro estudio sobre la proteína StaR en SPN amplía por tanto el conocimiento de la familia de proteínas NA37, cuyo único miembro caracterizado hasta la fecha era YejK.

En lo que respecta a Spr0488, en este trabajo se demuestra que su ausencia no afecta a la viabilidad de SPN en presencia de NOV, sin embargo, su sobreproducción conduce a una mayor sensibilidad a este antibiótico. Este efecto en el crecimiento no se debe a cambios globales en SPN, puesto que ni la ausencia ni la sobreexpresión de *spr0488* produjeron modificaciones sustanciales en el transcriptoma de SPN, con o sin tratamiento con NOV, excepto en los genes implicados en el metabolismo de los azúcares debido al método de inducción utilizado. Además, los estudios del efecto de H₆-Spr0488 sobre la actividad de la Topo I y la girasa de SPN, mostraron un incremento de la actividad de la Topo I en la relajación del sustrato pBR322 en presencia de 500 nM de H₆-Spr0488 (proporción Topo I:H₆-Spr0488 de 1:500), pero no así de la girasa (Figura 27). Este efecto activador fue aún mayor cuando se eliminó la cola de His fusionada al extremo amino terminal. La proteína digerida Spr0488_D, fue capaz de activar la Topo I a concentraciones mucho más bajas (proporción Topo I:Spr0488_D de 1:32), mostrando una actividad 16 veces mayor que la proteína de fusión (Figura 30).

Spr0488 es una proteína pequeña con 131 aminoácidos y peso molecular de 14,36 kDa. La oligomerización es una solución natural para formar grandes proteínas evitando problemas en la síntesis de largas cadenas polipeptídicas. Formar complejos proteicos grandes a partir de subunidades más pequeñas tiene varios beneficios. Estos complejos son menos propensos a errores de traducción, ya que sólo las subunidades defectuosas pueden descartarse y reemplazarse, en contraste con toda la proteína de cadena polipeptídica única y grande. La oligomerización es una característica común entre las proteínas que se unen a ácidos nucleicos. La formación de complejos multiméricos confiere propiedades funcionales únicas, como una mayor estabilidad estructural, una mayor afinidad por ácidos nucleicos o capacidad de interactuar y cooperar con otras proteínas. En esta tesis hemos estudiado el estado de oligomerización de Spr0488 y hemos demostrado que tanto H₆-Spr0488 como Spr0488_D se encuentran mayoritariamente en forma dimérica en solución a concentraciones salinas ≥ 100 mM. Esto implica que, si bien, la fusión de 20 aminoácidos en su extremo N-terminal parece afectar a su compactación (dada la discrepancia entre la MM estimada y la teórica), no influye en su oligomerización.

Las predicciones realizadas en este trabajo indican que Spr0488 tiene un dominio “helix-hairpin-helix” (HhH_5) en su extremo C-terminal. Estos dominios están compuestos generalmente por 4 ó 5 hélices α empaquetadas dos a dos en disposición ortogonal y separadas entre sí por un “hairpin”. Cada par de hélices α conforma un motivo HhH y cada dominio HhH_5 normalmente contiene 1 motivo HhH clásico y otro pseudo-HhH. El motivo HhH es un motivo de unión a DNA similar al motivo HtH (“hélix-turn-helix”), pero presenta diferencias importantes. Ambos tienen dos hélices conectadas por una vuelta corta, pero mientras en el motivo HtH, la segunda hélice contacta con el surco principal del DNA interaccionando específicamente con las bases nitrogenadas, en el motivo HhH, ésta hélice no sobresale de la superficie de la proteína y no puede contactar con el surco mayor, por lo que parece interaccionar con los grupos fosfato del DNA (Doherty et al., 1996; Thayer et al., 1995). La diferencia estructural entre los dominios HtH y HhH se refleja a nivel funcional; el dominio HtH se encuentra principalmente en proteínas reguladoras y se une al DNA de una manera específica de secuencia, sin embargo, el dominio HhH se encuentra más bien en proteínas involucradas en actividades enzimáticas y se une sin especificidad de secuencia. Las proteínas que contienen el dominio HhH_5 se engloban en una superfamilia cuyo prototipo es la proteína Rad51, homólogo humano de la proteína RecA de *E. coli* implicada en reparación y recombinación. Esta superfamilia incluye proteínas muy dispares, como DNA-glicosilasas, polimerasas, nucleasas o DNA-helicadas (Shao & Grishin, 2000; Trasviña-Arenas et al., 2021), muchas de las cuales son proteínas grandes con múltiples dominios.

Además del dominio HhH en su extremo C-terminal, Spr0488 posee una región desordenada del residuo 1 al 20 (análisis InterPro), una región de baja complejidad del 24 al 37 y una región “colied coil” del residuo 52 al 79 (las dos últimas según la herramienta SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/show_motifs.pl)). Spr0488 ha sido catalogada en InterPro como una helicasa de DNA perteneciente a la superfamilia 2 y la presencia de un motivo HhH sugería que, al igual que otras proteínas de la superfamilia 2 de helicadas (Shao & Grishin, 2000), podría ser una proteína de unión a DNA. Para evaluar la capacidad de unión al DNA de Spr0488, se hicieron ensayos de movilidad electroforética utilizando varios sustratos diferentes. En primer lugar, se utilizó un dsDNA (261 pb) biotinilado generado por PCR con una A-3' protuberante en cada uno de sus extremos. Tanto H₆-Spr0488 como Spr0488_D fueron capaces de unirse a dicho sustrato con una relación estequiométrica sustrato:proteína elevada (1:128) (Figura 31A). Los complejos generados tenían muy poca movilidad electroforética, presumiblemente por la unión de más de una molécula de Spr0488 con

el sustrato. Para evitar esto, utilizamos oligonucleótidos de 50 ó 60 nt de longitud para generar sustratos de cadena doble con un extremo 3' protuberante (O_N) y sustratos de cadena sencilla (Cy-80 y Cy-dT), marcados con fluorescencia en el extremo 5'. Tanto H_6 -Spr0488 como Spr0488_D, se unieron al dsDNA O_N pero no a ssDNA. Con la proteína digerida se detectaron complejos O_N :Spr0488_D con una relación estequiométrica 1:10, mientras que con H_6 -Spr0488 se observaron complejos a partir de una relación 1:40 (Figura 31B). Con los sustratos monocatenarios Cy-80 y Cy-dT, sin embargo, no se observaron complejos con ninguna de las proteínas (Figura 31C). Por lo tanto, nuestros ensayos demuestran que Spr0488 se une a DNA total o parcialmente bicatenario, pero no es capaz de unirse a DNA monocatenario en las condiciones ensayadas. Al igual que ocurre con la activación de la Topo I, la capacidad de unión a dsDNA aumenta considerablemente cuando se eliminan los 20 aminoácidos fusionados del extremo N-terminal, lo que sugiere que el mecanismo de activación de la Topo I puede ocurrir via modificación del DNA.

La capacidad de Spr0488 de discriminar entre distintos tipos de DNA es una característica común entre las helicasas. Éstas suelen reconocer sustratos con diferentes estructuras y a menudo lo hacen con distintas afinidades. Así por ejemplo, la helicasa PcrA de SPN se une tanto a dsDNA con extremos protuberantes como a sustratos parcialmente bicatenarios con estructuras tipo "hairpin" próximas a los extremos, siendo la unión con estos últimos mucho más estable (Ruiz-Masó et al., 2006). PriA es otra helicasa de SPN que pertenece a superfamilia 2, capaz de reconocer daños en el DNA y reclutar otras proteínas. Esta proteína se une tanto a ssDNA como a dsDNA, con una mayor afinidad por dsDNAs con extremos protuberantes o en forma de horquilla (Lin et al., 2020).

La replicación del DNA bacteriano es un proceso altamente coordinado en el que actúan las helicasas y las topoisomerasas que pueden actuar de manera sinérgica para garantizar su correcta ejecución. Además, esta cooperación dinámica entre helicasas y topoisomerasas garantiza una replicación eficiente y precisa del DNA bacteriano, un nivel de Sc funcional, la recombinación y reparación del DNA, minimizando la acumulación de daños en el material genético y asegurando la estabilidad del genoma (Duguet, 1997). La mayoría de los modelos sugieren que una helicasa funcional tiene múltiples sitios de unión al DNA, al menos dos, y este requisito parece haberse satisfecho por el hecho de que las formas funcionalmente activas de las helicasas son oligoméricas (Lohman, 1992; Lohman, 1993; Lohman & Bjornson, 1996). Así por ejemplo, en *E. coli*, se ha demostrado que solo un monómero de la helicasa UvrD no es capaz de separar completamente la cadena doble de un dsDNA, aunque sea de

cadena muy cortas. Y se ha sugerido que UvrD tiene actividad helicasa facilitada por la formación de dímeros (Maluf et al., 2003). Por otro lado, la multimerización tampoco es exclusiva de las helicasas, otras proteínas forman oligómeros y estos pueden variar en tamaño y composición según el entorno biológico y las condiciones específicas de la célula (Gotte & Menegazzi, 2023; Kumari & Yadav, 2019).

Como se mencionó anteriormente, el motivo HhH está involucrado en el reconocimiento no específico de secuencia tanto de DNA de cadena sencilla como de doble cadena a través de interacciones mediadas por enlaces de hidrógeno con el fosfato del DNA. Tales interacciones parecen ser esenciales para las funciones de muchas proteínas. La capacidad de unión a DNA es también una característica típica de las NAPs, que pueden actuar de diversas formas en la fisiología bacteriana y suelen trabajar en cooperación con otras proteínas formando una red de control de los procesos moleculares. Por ejemplo, las proteínas SSB (“single-strand DNA-binding”) que se han estudiado ampliamente en *E. coli*, se unen preferentemente a ssDNA formando complejos DNA:proteína participando en el metabolismo de ácidos nucleicos (Antony & Lohman, 2019; Chen et al., 2018). Estas proteínas pueden modular la actividad de RadD, otra proteína de unión a ácido nucleico, modulando su actividad de reparación del DNA (Osorio Garcia et al., 2023). Otro ejemplo de esto son las NAPs HU/ IHF, que se unen a dsDNA sin especificidad de secuencia alterando los procesos de replicación, transcripción o reparación del DNA (Dadinova et al., 2023; Kamashev et al., 2017). La GapR es una NAP dimérica en solución que activa la girasa pero con capacidad de unión a DNA en regiones ricas en AT actuando como un regulador de la replicación en *Caulobacter crescentus* (Huang et al., 2020). En un estudio en *E. coli*, la superproducción de SymE, una proteína de unión a DNA disminuyó la viabilidad celular. Se demostró que la toxicidad de la sobreexpresión de *symE* probablemente se debe a su capacidad para impulsar una alta condensación del nucleóide, que interrumpe la síntesis de DNA y RNA y conduce a daños en el material genético, similares a los efectos de la sobreproducción de la proteína H-NS asociada a nucleóides (Thompson et al., 2022).

En este trabajo, hemos demostrado que Spr0488 es una proteína dimérica en solución que se une solamente al DNA bicatenario. La superproducción de Spr0488 no afectó el crecimiento en ausencia de antibiótico, pero si aumentó significativamente la susceptibilidad a NOV, lo que sugiere que puede actuar en la maquinaria de control del Sc. De hecho, Spr0488 aumenta la relajación del DNA en presencia de Topo I. A pesar de haber sido clasificada como una helicasa de la superfamilia 2 en base a sus características estructurales, se ha demostrado que no todas las proteínas incluídas en

esta superfamilia tienen actividad helicasa (Byrd & Raney, 2012), por lo que es necesario confirmar si efectivamente Spr0488 posee la capacidad de abrir la doble cadena de DNA. Dada la importancia de las helicasas en la replicación y reparación del DNA, Spr0488 podría tener un papel fundamental en la biología de SPN. En este momento, en el laboratorio se están llevando a cabo los experimentos necesarios para discernir si Spr0488 tiene actividad helicasa, si es una proteína asociada al nucleóide, si interacciona directamente con otras topoisomerasas u otras proteínas y si cambia la compactación del nucleóide de SPN. Todo ello nos permitirá dilucidar la función que juega Spr0488 en el SC del DNA y la compactación del nucleóide de SPN. Por lo tanto, el estudio más detallado de Spr0488 puede proporcionar información sobre procesos bacterianos críticos que podrían ser aprovechados para el control de infecciones por SPN.

Las NAPs desempeñan funciones cruciales para la organización estructural del DNA y regulación de los procesos fisiológicos fundamentales, como la replicación, la transcripción, la respuesta a estrés o la virulencia en SPN. Muchos estudios se centran en una comprensión física de cómo las NAPs afectan la compactación del material genético (Dahlke & Sing, 2019; Szafran et al., 2020) pero los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis demuestran que tanto StaR como Spr0488 son proteínas que tienen, de algún modo, acción en el nucleóide de SPN, ya sea por la interacción física y funcional con la Topo I como es el caso de StaR, o posiblemente por la unión a DNA y cooperación con la Topo I en el caso de Spr0488. Por lo tanto, el estudio de ambas proteínas proporciona una comprensión más profunda de la regulación y la funcionalidad del genoma de este patógeno, lo que las convierte en potenciales dianas para la acción de futuros antimicrobianos o terapias combinadas.

CONCLUSIONES

1. Mediante la construcción de cepas con los genes *staR*, *spr0488*, *rapZ* y *yhbY* interrumpidos hemos demostrado que ninguno de estos genes es esencial para la viabilidad de SPN. Las cepas sobreproductoras de las proteínas codificadas por estos genes también fueron viables.
2. Tanto la ausencia como la sobreproducción de StaR incrementó la sensibilidad de SPN a NOV. Asimismo, la superproducción de Spr0488 también incrementó la susceptibilidad a NOV. La ausencia de los genes *rapZ* y *yhbY* no afectó el crecimiento mientras que su sobreproducción sí afectó negativamente al mismo, tanto en ausencia como en presencia de NOV. Esto implica que la sobreproducción de estas proteínas es tóxica para la célula, pero su toxicidad no está relacionada con alteraciones en el Sc.
3. El tratamiento de SPN con NOV produce un cambio en la densidad de Sc *in vivo* que fue mayor en ausencia de StaR que cuando StaR fue superproducida. Este cambio del Sc se debe a la alteración de la actividad de la Topo I por parte de StaR. Esta activación ocurre por interacción entre Topo I y StaR, tal y como se detectó tanto *in vitro* como *in vivo* mediante Co-IP.
4. Spr0488 es una proteína dimérica que activa la Topo I *in vitro* pero no afecta la actividad de la girasa, y se une a dsDNA pero no ssDNA
5. La fusión de una cola de 20 aminoácidos en su extremo N-terminal reduce considerablemente la capacidad de activar la Topo I y de unir DNA, pero no así su oligomerización.
6. La sobreexpresión de *staR* y *spr0488* no provoca ningún cambio significativo en el transcriptoma de SPN en las condiciones estudiadas. Se demuestra que ni StaR ni Spr0488 son reguladores globales de la transcripción en SPN.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, W., Sala, C., Hegde, S.R., Jha, R.K., Cole, S.T., Nagaraja, V., 2017. Transcription facilitated genome-wide recruitment of topoisomerase I and DNA gyrase. *PLoS Genet* 13, e1006754. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006754>
- Ali Azam, T., Iwata, A., Nishimura, A., Ueda, S., Ishihama, A., 1999. Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J Bacteriol* 181, 6361–6370.
- Amblar, M., Zaballos, Á., de la Campa, A.G., 2022. Role of PatAB transporter in efflux of levofloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antibiotics* 11, 1837. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121837>
- Andriole, V.T., 2005. The quinolones: past, present, and future. *Clin Infect Dis* 41, S113–S119. <https://doi.org/10.1086/428051>
- Antony, E., Lohman, T.M., 2019. Dynamics of *E. coli* single stranded DNA binding (SSB) protein-DNA complexes. *Semin Cell Dev Biol* 86, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.03.017>
- Avery, O.T., MacLeod, C.M., McCarty, M., 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J Exp Med* 79, 137–158.
- Azam, T.A., Hiraga, S., Ishihama, A., 2000. Two types of localization of the DNA-binding proteins within the *Escherichia coli* nucleoid. *Genes Cells* 5, 613–626. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2000.00350.x>
- Azam, T.A., Ishihama, A., 1999. Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*: sequence recognition specificity and DNA binding affinity. *J Biol Chem* 274, 33105–33113. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.33105>
- Balas, D., Fernández-Moreira, E., de la Campa, A.G., 1998. Molecular characterization of the gene encoding the DNA gyrase A subunit of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 180, 2854–2861.
- Balsalobre, L., Ferrándiz, M.J., de Alba, G., de la Campa, A.G., 2011. Nonoptimal DNA topoisomerases allow maintenance of supercoiling levels and improve fitness of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 1097–1105. <https://doi.org/10.1128/AAC.00783-10>
- Balsalobre, L., Ferrándiz, M.J., Liñares, J., Tubau, F., de la Campa, A.G., 2003. Viridans group Streptococci are donors in horizontal transfer of topoisomerase IV genes to *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 2072–2081. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.7.2072-2081.2003>
- Balsalobre, L., Ortega, M., de la Campa, A.G., 2013. Characterization of recombinant fluoroquinolone-resistant pneumococcus-like isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 254–260. <https://doi.org/10.1128/aac.01357-12>
- Banda, S., Tiwari, P.B., Darici, Y., Tse-Dinh, Y.-C., 2016. Investigating direct interaction between *Escherichia coli* topoisomerase I and RecA. *Gene* 585, 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.03.013>
- Baranello, L., Wojtowicz, D., Cui, K., Devaiah, B.N., Chung, H.-J., Chan-Salis, K.Y., Guha, R., Wilson, K., Zhang, X., Zhang, H., Piotrowski, J., Thomas, C.J., Singer, D.S., Pugh, B.F., Pommier, Y., Przytycka, T.M., Kouzine, F., Lewis, B.A., Zhao, K., Levens, D., 2016. RNA polymerase II regulates topoisomerase 1 activity to favor efficient transcription. *Cell* 165, 357–371. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.036>
- Bates, A.D., Maxwell, A., 1997. DNA topology: topoisomerases keep it simple. *Curr Biol* 7, R778–R781. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(06\)00403-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(06)00403-9)
- Berger, M., Farcas, A., Geertz, M., Zhelyazkova, P., Brix, K., Travers, A., Muskhelishvili, G., 2010. Coordination of genomic structure and transcription by the main

- bacterial nucleoid-associated protein HU. *EMBO Rep* 11, 59–64. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.232>
- Bhowmick, T., Ghosh, S., Dixit, K., Ganesan, V., Ramagopal, U.A., Dey, D., Sarma, S.P., Ramakumar, S., Nagaraja, V., 2014. Targeting *Mycobacterium tuberculosis* nucleoid-associated protein HU with structure-based inhibitors. *Nat Commun* 5, 4124. <https://doi.org/10.1038/ncomms5124>
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H., Falkow, S., 1977. Construction and characterization of new cloning vehicle. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2, 95–113. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(77\)90000-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(77)90000-2)
- Brewer, B.J., Fangman, W.L., 1987. The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*. *Cell* 51, 463–471. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90642-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90642-8)
- Brinkman, A.B., Ettema, T.J.G., de Vos, W.M., van der Oost, J., 2003. The Lrp family of transcriptional regulators. *Mol Microbiol* 48, 287–294. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03442.x>
- Brown, P.O., Cozzarelli, N.R., 1981. Catenation and knotting of duplex DNA by type 1 topoisomerases: a mechanistic parallel with type 2 topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 843–847.
- Browning, D.F., Grainger, D.C., Busby, S.J., 2010. Effects of nucleoid-associated proteins on bacterial chromosome structure and gene expression. *Curr Opin Microbiol* 13, 773–780. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.09.013>
- Bugrysheva, J.V., Froehlich, B.J., Freiberg, J.A., Scott, J.R., 2011. The histone-like protein Hlp is essential for growth of *Streptococcus pyogenes*: comparison of genetic approaches to study essential genes. *Appl Environ Microbiol* 77, 4422–4428. <https://doi.org/10.1128/AEM.00554-11>
- Bush, N.G., Diez-Santos, I., Abbott, L.R., Maxwell, A., 2020. Quinolones: mechanism, lethality and their contributions to antibiotic resistance. *Molecules* 25, 5662. <https://doi.org/10.3390/molecules25235662>
- Bush, N.G., Evans-Roberts, K., Maxwell, A., 2015. DNA topoisomerases. *EcoSal Plus* 6. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0010-2014>
- Byrd, A.K., Raney, K.D., 2012. Superfamily 2 helicases. *Front Biosci* 17, 2070–2088. <https://doi.org/10.2741/4038>
- Casal, J., 1982. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*: serotype distribution of penicillin-resistant strains in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 22, 222–225.
- Cassiolato, A.P., Almeida, S.C.G., Andrade, A.L., Minamisava, R., Brandileone, M.C. de C., 2018. Expansion of the multidrug-resistant clonal complex 320 among invasive *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A after the introduction of a ten-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil. *PLoS One* 13, e0208211. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208211>
- Ceci, P., Cellai, S., Falvo, E., Rivetti, C., Rossi, G.L., Chiancone, E., 2004. DNA condensation and self-aggregation of *Escherichia coli* Dps are coupled phenomena related to the properties of the N-terminus. *Nucleic Acids Res* 32, 5935–5944. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh915>
- Champoux, J.J., 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* 70, 369–413. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.369>
- Champoux, J.J., Dulbecco, R., 1972. An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA—a possible swivel for DNA replication (polyoma-ethidium bromide-mouse-embryo cells-dye binding assay). *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 143–146. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.1.143>
- Chen, K.-L., Cheng, J.-H., Lin, C.-Y., Huang, Y.-H., Huang, C.-Y., 2018. Characterization of single-stranded DNA-binding protein SsbB from *Staphylococcus aureus*: SsbB cannot stimulate PriA helicase. *RSC Adv* 8, 28367–28375. <https://doi.org/10.1039/c8ra04392b>

- Cheng, B., Zhu, C.-X., Ji, C., Ahumada, A., Tse-Dinh, Y.-C., 2003. Direct interaction between *Escherichia coli* RNA polymerase and the zinc ribbon domains of DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* 278, 30705–30710. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303403200>
- Chenoweth, C.E., Saint, S., Martinez, F., Lynch, J.P., Fendrick, A.M., 2000. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: Implications for patients with community-acquired pneumonia. *Mayo Clin Proc* 75, 1161–1168. <https://doi.org/10.4065/75.11.1161>
- Cherazard, R., Epstein, M., Doan, T.-L., Salim, T., Bharti, S., Smith, M.A., 2017. Antimicrobial resistant *Streptococcus pneumoniae*: prevalence, mechanisms, and clinical implications. *Am J Ther* 24, e361. <https://doi.org/10.1097/MJT.0000000000000551>
- Chester, F.D., 1901. A manual of determinative bacteriology. New York: The MacMillan Co.
- Claret, L., Rouviere-Yaniv, J., 1997. Variation in HU composition during growth of *Escherichia coli*: the heterodimer is required for long term survival. *J Mol Biol* 273, 93–104. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1310>
- Cornick, J.E., Bentley, S.D., 2012. *Streptococcus pneumoniae*: the evolution of antimicrobial resistance to beta-lactams, fluoroquinolones and macrolides. *Microbes Infect* 14, 573–583. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.01.012>
- Cozzarelli, N.R., 1980. DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science* 207, 953–960. <https://doi.org/10.1126/science.6243420>
- Dadinova, L.A., Petoukhov, M.V., Gordienko, A.M., Manuvera, V.A., Lazarev, V.N., Rakitina, T.V., Mozhaev, A.A., Peters, G.S., Shtykova, E.V., 2023. Nucleoid-associated proteins HU and IHF: Oligomerization in solution and hydrodynamic properties. *Biochemistry* 88, 640–654. <https://doi.org/10.1134/S0006297923050073>
- Dahlke, K., Sing, C.E., 2019. Influence of nucleoid-associated proteins on DNA supercoiling. *J Phys Chem B* 123, 10152–10162. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b07436>
- Dame, R.T., 2005. The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin. *Mol Microbiol* 56, 858–870. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04598.x>
- de la Campa, A.G., Ferrándiz, M.J., Martín-Galiano, A.J., García, M.T., Tirado-Vélez, J.M., 2017. The transcriptome of *Streptococcus pneumoniae* induced by local and global changes in supercoiling. *Front Microbiol* 8, 1447. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01447>
- de la Campa, A.G., García, E., Fenoll, A., Muñoz, R., 1997. Molecular bases of three characteristic phenotypes of pneumococcus: optochin-sensitivity, coumarin-sensitivity, and quinolone-resistance. *Microb Drug Resist* 3, 177–193. <https://doi.org/10.1089/mdr.1997.3.177>
- de los Rios, S., Perona, J.J., 2007. Structure of the *Escherichia coli* leucine-responsive regulatory protein Lrp reveals a novel octameric assembly. *J Mol Biol* 366, 1589–1602. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.12.032>
- Dean, F., Krasnow, M.A., Otter, R., Matzuk, M.M., Spengler, S.J., Cozzarelli, N.R., 1983. *Escherichia coli* type-1 topoisomerases: identification, mechanism, and role in recombination. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 47 Pt 2, 769–777. <https://doi.org/10.1101/sqb.1983.047.01.088>
- Dillon, S.C., Dorman, C.J., 2010. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat Rev Microbiol* 8, 185–195. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2261>
- Doherty, A.J., Serpell, L.C., Ponting, C.P., 1996. The helix-hairpin-helix DNA-binding motif: a structural basis for non-sequence-specific recognition of DNA. *Nucleic Acids Res* 24, 2488–2497.

- Domenech, A., Tirado-Vélez, J.M., Fenoll, A., Ardanuy, C., Yuste, J., Liñares, J., de la Campa, A.G., 2014. Fluoroquinolone-resistant pneumococci: dynamics of serotypes and clones in Spain in 2012 compared with those from 2002 and 2006. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 2393–2399. <https://doi.org/10.1128/AAC.02669-13>
- Dorman, C.J., 2019. DNA supercoiling and transcription in bacteria: a two-way street. *BMC Mol Cell Biol* 20, 26. <https://doi.org/10.1186/s12860-019-0211-6>
- Dorman, C.J., 2015. Function of nucleoid-associated proteins in chromosome structuring and transcriptional regulation. *J Mol Microbiol Biotechnol* 24, 316–331. <https://doi.org/10.1159/000368850>
- Dorman, C.J., 2013. Genome architecture and global gene regulation in bacteria: making progress towards a unified model? *Nat Rev Microbiol* 11, 349–355. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3007>
- Dorman, C.J., 2007. H-NS, the genome sentinel. *Nat Rev Microbiol* 5, 157–161. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1598>
- Dorman, C.J., 2004. H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat Rev Microbiol* 2, 391–400. <https://doi.org/10.1038/nrmicro883>
- Dorman, C.J., Deighan, P., 2003. Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr Opin Genet Dev* 13, 179–184. [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(03\)00025-x](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(03)00025-x)
- Dorman, C.J., Dorman, M.J., 2016. DNA supercoiling is a fundamental regulatory principle in the control of bacterial gene expression. *Biophys Rev* 8, 89–100. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0238-2>
- Dorman, C.J., Hinton, J.C., Free, A., 1999. Domain organization and oligomerization among H-NS-like nucleoid-associated proteins in bacteria. *Trends Microbiol* 7, 124–128. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(99\)01455-9](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(99)01455-9)
- Drlica, K., 1992. Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol Microbiol* 6, 425–433. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01486.x>
- Drlica, K., Rouviere-Yaniv, J., 1987. Histone-like proteins of bacteria. *Microbiol Rev* 51, 301–319. <https://doi.org/10.1128/mr.51.3.301-319.1987>
- Duguet, M., 1997. When helicase and topoisomerase meet! *J Cell Sci* 110, 1345–1350. <https://doi.org/10.1242/jcs.110.12.1345>
- Duprey, A., Groisman, E.A., 2021. The regulation of DNA supercoiling across evolution. *Protein Sci* 30, 2042–2056. <https://doi.org/10.1002/pro.4171>
- Espeli, O., Lee, C., Marians, K.J., 2003. A physical and functional interaction between *Escherichia coli* FtsK and topoisomerase IV. *J Biol Chem* 278, 44639–44644. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308926200>
- European Centre for Disease Prevention and Control, 2023. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual epidemiological report for 2022 <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2022> (accessed 10.9.24).
- Feldman, C., Anderson, R., 2011. Bacteraemic Pneumococcal pneumonia. *Drugs* 71, 131–153. <https://doi.org/10.2165/11585310-000000000-00000>
- Fernández-Moreira, E., Balas, D., González, I., de la Campa, A.G., 2000. Fluoroquinolones inhibit preferentially *Streptococcus pneumoniae* DNA topoisomerase IV than DNA gyrase native proteins. *Microb Drug Resist* 6, 259–267. <https://doi.org/10.1089/mdr.2000.6.259>
- Ferrándiz, M.J., Aranz, C., Martín-Galiano, A.J., Rodríguez-Martín, C., de la Campa, A.G., 2014. Role of global and local topology in the regulation of gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One* 9, e101574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101574>
- Ferrándiz, M.J., Carreño, D., Ayora, S., 2018. HU of *Streptococcus pneumoniae* is essential for the preservation of DNA supercoiling. *Front Microbiol* 9, 493. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00493>

- Ferrándiz, M.J., Fenoll, A., Liñares, J., de La Campa, A.G., 2000. Horizontal transfer of *parC* and *gyrA* in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 840–847.
- Ferrándiz, M.J., Hernández, P., de la Campa, A.G., 2021. Genome-wide proximity between RNA polymerase and DNA topoisomerase I supports transcription in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Genet* 17, e1009542. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009542>
- Ferrándiz, M.J., Martín-Galiano, A.J., Arnanz, C., Camacho-Soguero, I., Tirado-Vélez, J.-M., de la Campa, A.G., 2016. An increase in negative supercoiling in bacteria reveals topology-reacting gene clusters and a homeostatic response mediated by the DNA topoisomerase I gene. *Nucleic Acids Res* 44, 7292–7303. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw602>
- Ferrándiz, M.J., Martín-Galiano, A.J., Schwartzman, J.B., de la Campa, A.G., 2010. The genome of *Streptococcus pneumoniae* is organized in topology-reacting gene clusters. *Nucleic Acids Res* 38, 3570–3581. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq106>
- Forterre, P., Gribaldo, S., Gadelle, D., Serre, M.-C., 2007. Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie, DNA Topology* 89, 427–446. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.12.009>
- Froelich-Ammon, S.J., Osheroff, N., 1995. Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism. *J Biol Chem* 270, 21429–21432. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.37.21429>
- Gagarinova, A., Stewart, G., Samanfar, B., Phanse, S., White, C.A., Aoki, H., Deineko, V., Beloglazova, N., Yakunin, A.F., Golshani, A., Brown, E.D., Babu, M., Emili, A., 2016. Systematic genetic screens reveal the dynamic global functional organization of the bacterial translation machinery. *Cell Reports* 17, 904–916. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.040>
- Ganaie, F., Saad, J.S., McGee, L., van Tonder, A.J., Bentley, S.D., Lo, S.W., Gladstone, R.A., Turner, P., Keenan, J.D., Breiman, R.F., Nahm, M.H., 2020. A new pneumococcal capsule type, 10D, is the 100th serotype and has a large cps fragment from an oral *Streptococcus*. *mBio* 11, e00937-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00937-20>
- García, M.T., Blázquez, M.A., Ferrándiz, M.J., Sanz, M.J., Silva-Martín, N., Hermoso, J.A., de la Campa, A.G., 2011. New alkaloid antibiotics that target the DNA topoisomerase I of *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* 286, 6402–6413. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.148148>
- García-López, M., Hernández, P., Megias, D., Ferrándiz, M.J., de la Campa, A.G., 2023. Physiologic and transcriptomic effects triggered by overexpression of wild type and mutant DNA topoisomerase I in *Streptococcus pneumoniae*. *Int J Mol Sci* 24, 15800. <https://doi.org/10.3390/ijms242115800>
- García-López, M., Megias, D., Ferrándiz, M.J., de la Campa, A.G., 2022. The balance between gyrase and topoisomerase I activities determines levels of supercoiling, nucleoid compaction, and viability in bacteria. *Front Microbiol* 13, 1094692. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1094692>
- Gellert, M., 1981. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* 50, 879–910. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.50.070181.004311>
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O’Dea, M.H., Nash, H.A., 1976. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 3872–3876. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.11.3872>
- Gerganova, V., Berger, M., Zaldastanishvili, E., Sobetzko, P., Lafon, C., Mourez, M., Travers, A., Muskhelishvili, G., 2015. Chromosomal position shift of a regulatory gene alters the bacterial phenotype. *Nucleic Acids Res* 43, 8215–8226. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv709>
- Ghosh, S., Mallick, B., Nagaraja, V., 2014. Direct regulation of topoisomerase activity by a nucleoid-associated protein. *Nucleic Acids Res* 42, 11156–11165. <https://doi.org/10.1093/nar/gku804>

- Gotte, G., Menegazzi, M., 2023. Protein oligomerization. *Int J Mol Sci* 24, 10648. <https://doi.org/10.3390/ijms241310648>
- Gram, C., 1884. Ueber die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trokenpräparaten. *Fortschr. Med* 2, 185–189.
- Griffith, Fred., 1928. The significance of pneumococcal types. *J Hyg* 27, 113–159.
- Guo, M.S., Haakonsen, D.L., Zeng, W., Schumacher, M.A., Laub, M.T., 2018. A bacterial chromosome structuring protein binds overtwisted DNA to stimulate type II topoisomerases and enable DNA replication. *Cell* 175, 583-597.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.029>
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557–580. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)
- Hayama, R., Mariani, K.J., 2010. Physical and functional interaction between the condensin MukB and the decatenase topoisomerase IV in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 18826–18831. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008140107>
- Hengge-Aronis, R., 1999. Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol* 2, 148–152. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)80026-5](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)80026-5)
- Henriques-Normark, B., Tuomanen, E.I., 2013. The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3, a010215. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010215>
- Hillebrand, A., Wurm, R., Menzel, A., Wagner, R., 2005. The seven *E. coli* ribosomal RNA operon upstream regulatory regions differ in structure and transcription factor binding efficiencies. *Biol Chem* 386, 523–534. <https://doi.org/10.1515/BC.2005.062>
- Hirvonen, C.A., Ross, W., Wozniak, C.E., Marasco, E., Anthony, J.R., Aiyar, S.E., Newburn, V.H., Gourse, R.L., 2001. Contributions of UP elements and the transcription factor FIS to expression from the seven *rrn* P1 promoters in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183, 6305–6314. <https://doi.org/10.1128/JB.183.21.6305-6314.2001>
- Holmes, V.F., Cozzarelli, N.R., 2000. Closing the ring: links between SMC proteins and chromosome partitioning, condensation, and supercoiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1322–1324. <https://doi.org/10.1073/pnas.040576797>
- Hołowka, J., Zakrzewska-Czerwińska, J., 2020. Nucleoid associated proteins: the small organizers that help to cope with stress. *Front Microbiol* 11.
- Hooper, D.C., 2001. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 32, S9–S15. <https://doi.org/10.1086/319370>
- Hooper, D.C., 1999. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist Updates* 2, 38–55. <https://doi.org/10.1054/drup.1998.0068>
- Huang, Q., Duan, B., Dong, X., Fan, S., Xia, B., 2020. GapR binds DNA through dynamic opening of its tetrameric interface. *Nucleic Acids Res* 48, 9372–9386. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa644>
- Hung, S., Baldi, P., Hatfield, G.W., 2002. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of leucine-responsive regulatory protein. *J Biol Chem* 277, 40309–40323. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204044200>
- Hussein, S.S., Shibl, A.M., Bahakem, H.M., Sofan, M.M., 1989. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: a growing universal concern. *J Natl Med Assoc* 81, 937–941.
- Jacobs, M.R., 2004. *Streptococcus pneumoniae*: Epidemiology and patterns of resistance. *Am J Med Suppl* 117, 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2004.07.003>
- Johnson, H.L., Deloria-Knoll, M., Levine, O.S., Stoszek, S.K., Freimanis Hance, L., Reithinger, R., Muenz, L.R., O'Brien, K.L., 2010. Systematic evaluation of serotypes causing invasive pneumococcal disease among children under five:

- the pneumococcal global serotype project. *PLoS Med* 7, e1000348. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000348>
- Junier, I., Ghobadpour, E., Espeli, O., Everaers, R., 2023. DNA supercoiling in bacteria: state of play and challenges from a viewpoint of physics based modeling. *Front Microbiol* 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1192831>
- Kalamorz, F., Reichenbach, B., März, W., Rak, B., Görke, B., 2007. Feedback control of glucosamine-6-phosphate synthase GlmS expression depends on the small RNA GlmZ and involves the novel protein YhbJ in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 65, 1518–1533. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05888.x>
- Kamashev, D., Agapova, Y., Rastorguev, S., Talyzina, A.A., Boyko, K.M., Korzhenevskiy, D.A., Vlaskina, A., Vasilov, R., Timofeev, V.I., Rakitina, T.V., 2017. Comparison of histone-like HU protein DNA-binding properties and HU/IHF protein sequence alignment. *PLoS One* 12, e0188037. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188037>
- Kamashev, D., Rouviere-Yaniv, J., 2000. The histone-like protein HU binds specifically to DNA recombination and repair intermediates. *EMBO J* 19, 6527–6535. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.23.6527>
- Kamashev, D.E., Rakitina, T.V., Matyushkina, D.S., Evsyutina, D.V., Vanyushkina, A.A., Agapova, Yu.K., Anisimova, V.E., Drobyshch, A.L., Butenko, I.O., Pobeguts, O.V., Fisunov, G.Y., 2019. Proteome of HU-Lacking *E. coli* studied by means of 2D gel electrophoresis. *Russ J Bioorg Chem* 45, 366–373. <https://doi.org/10.1134/S1068162019050029>
- Kampranis, S.C., Maxwell, A., 1996. Conversion of DNA gyrase into a conventional type II topoisomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14416–14421. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14416>
- Kato, J., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Hiraga, S., Suzuki, H., 1990. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell* 63, 393–404. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90172-b](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90172-b)
- Klein, E., 1884. Micro-organisms and disease. XXXII, 321–352.
- Kloosterman, T.G., Witwicki, R.M., van der Kooi-Pol, M.M., Bijlsma, J.J.E., Kuipers, O.P., 2008. Opposite effects of Mn²⁺ and Zn²⁺ on PsaR-mediated expression of the virulence genes *pcpA*, *prtA*, and *psaBCA* of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 190, 5382–5393. <https://doi.org/10.1128/JB.00307-08>
- Kois, A., Swiatek, M., Zakrzewska-Czerwińska, J., 2007. Structure of bacterial chromosome. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 61, 534–540.
- Kornberg, R.D., Lorch, Y., 1992. Chromatin structure and transcription. *Annu Rev Cell Biol* 8, 563–587. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.08.110192.003023>
- Kostrewa, D., Granzin, J., Koch, C., Choe, H.W., Raghunathan, S., Wolf, W., Labahn, J., Kahmann, R., Saenger, W., 1991. Three-dimensional structure of the *E. coli* DNA-binding protein FIS. *Nature* 349, 178–180. <https://doi.org/10.1038/349178a0>
- Kriel, N.L., Gallant, J., van Wyk, N., van Helden, P., Sampson, S.L., Warren, R.M., Williams, M.J., 2018. Mycobacterial nucleoid associated proteins: an added dimension in gene regulation. *Tuberculosis* 108, 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.12.004>
- Kumari, N., Yadav, S., 2019. Modulation of protein oligomerization: an overview. *Prog Biophys Mol Biol* 149, 99–113. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2019.03.003>
- Lacks, S., 1966. Integration efficiency and genetic recombination in pneumococcal transformation. *Genetics* 53, 207–235.
- Lacks, S., López, P., Greenberg, B., Espinosa, M., 1986. Identification and analysis of genes for tetracycline resistance and replication functions in the broad-host-range plasmid pLS1. *J Mol Biol* 192, 753–765. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90026-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90026-4)
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

- Lee, C., Mariani, K.J., 2013. Characterization of the nucleoid-associated protein YejK. *J Biol Chem* 288, 31503–31516. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.494237>
- Lee, C.M., Wang, G., Pertsinidis, A., Mariani, K.J., 2019. Topoisomerase III acts at the replication fork to remove precatenanes. *J Bacteriol* 201, e00563-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00563-18>
- Leshner, G.Y., Froelich, E.J., Gruett, M.D., Bailey, J.H., Brundage R.P., 1962. 1,8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J. Med. Chem.* 5, 1063–1065. <https://doi.org/10.1021/jm01240a021>
- Li, L., Ma, J., Yu, Z., Li, M., Zhang, W., Sun, H., 2023. Epidemiological characteristics and antibiotic resistance mechanisms of *Streptococcus pneumoniae*: an updated review. *Microbiol Res* 266, 127221. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127221>
- Lilley, D.M.J., 2001. DNA supercoiling, in: Brenner, S., Miller, J.H. (Eds.), *Encyclopedia of Genetics*. Academic Press, New York, pp. 575–577. <https://doi.org/10.1006/rwgn.2001.1255>
- Lin, M.G., Li, Y.C., Hsiao, C.D., 2020. Characterization of *Streptococcus pneumoniae* PriA helicase and its ATPase and unwinding activities in DNA replication restart. *Biochem J* 477, 3911–3922. <https://doi.org/10.1042/BCJ20200269>
- Liñares, J., Ardanuy, C., Pallarés, R., Fenoll, A., 2010. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. *Clin Microbiol Infect* 16, 402–410. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03182.x>
- Liu, D., Yumoto, H., Murakami, K., Hirota, K., Ono, T., Nagamune, H., Kayama, S., Matsuo, T., Miyake, Y., 2008. The essentiality and involvement of *Streptococcus intermedius* histone-like DNA-binding protein in bacterial viability and normal growth. *Mol Microbiol* 68, 1268–1282. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06232.x>
- Liu, L.F., Wang, J.C., 1979. Interaction between DNA and *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. Formation of complexes between the protein and superhelical and nonsuperhelical duplex DNAs. *J Biol Chem* 254, 11082–11088.
- Liu, Leroy F., Wang, J.C., 1978. DNA-DNA gyrase complex: the wrapping of the DNA duplex outside the enzyme. *Cell* 15, 979–984. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(78\)90281-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(78)90281-7)
- Liu, L F, Wang, J.C., 1978. *Micrococcus luteus* DNA gyrase: active components and a model for its supercoiling of DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 2098–2102.
- Liu, Y., Hua, Z.C., Leng, F., 2018. DNA supercoiling measurement in bacteria. *Methods Mol Biol* 1703, 63–73. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7459-7_4
- Lohman, T.M., 1993. Helicase-catalyzed DNA unwinding. *J Biol Chem* 268, 2269–2272.
- Lohman, T.M., 1992. *Escherichia coli* DNA helicases: mechanisms of DNA unwinding. *Mol Microbiol* 6, 5–14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb00831.x>
- Lohman, T.M., Bjornson, K.P., 1996. Mechanisms of helicase-catalyzed DNA unwinding. *Annu Rev Biochem* 65, 169–214. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.001125>
- López, P., Espinosa, M., Lacks, S.A., 1984. Physical structure and genetic expression of the sulfonamide-resistance plasmid pLS80 and its derivatives in *Streptococcus pneumoniae* and *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* 195, 402–410. <https://doi.org/10.1007/BF00341440>
- Losada, A., Hirano, T., 2005. Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins. *Genes Dev* 19, 1269–1287. <https://doi.org/10.1101/gad.1320505>
- Luijsterburg, M.S., Noom, M.C., Wuite, G.J.L., Dame, R.T., 2006. The architectural role of nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin: a molecular perspective. *J Struct Biol* 156, 262–272. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.05.006>
- Lund, E., Henrichsen, J., 1978. Chapter XI Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*, in: Bergan, T., Norris, J.R. (Eds.),

- Methods Microbiol. Academic Press, pp. 241–262. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70365-9](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70365-9)
- Maluf, N.K., Fischer, C.J., Lohman, T.M., 2003. A dimer of *Escherichia coli* UvrD is the active form of the helicase in vitro. *J Mol Biol* 325, 913–935. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(02\)01277-9](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(02)01277-9)
- Marko, J.F., 2010. Linking topology of large DNA molecules. *Physica A* 389, 2997–3001. <https://doi.org/10.1016/j.physa.2010.01.003>
- Martín-Galiano, A.J., Ferrándiz, M.J., de la Campa, A.G., 2017. Bridging chromosomal architecture and pathophysiology of *Streptococcus pneumoniae*. *Genome Biol Evol* 9, 350–361. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw299>
- Martín-Galiano, A.J., Yuste, J., Cercenado, M.I., de la Campa, A.G., 2014. Inspecting the potential physiological and biomedical value of 44 conserved uncharacterised proteins of *Streptococcus pneumoniae*. *BMC Genomics* 15, 652. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-652>
- Martín-Parras, L., Lucas, I., Martínez-Robles, M.L., Hernández, P., Krimer, D.B., Hyrien, O., Schwartzman, J.B., 1998. Topological complexity of different populations of pBR322 as visualized by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 26, 3424–3432.
- Maxwell, A., 1993. The interaction between coumarin drugs and DNA gyrase. *Mol Microbiol* 9, 681–686. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01728.x>
- Menzel, R., Gellert, M., 1983. Regulation of the genes for *E. coli* DNA gyrase: homeostatic control of DNA supercoiling. *Cell* 34, 105–113. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90140-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90140-x)
- Minnen, A., Attaiech, L., Thon, M., Gruber, S., Veening, J.W., 2011. SMC is recruited to oriC by ParB and promotes chromosome segregation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 81, 676–688. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07722.x>
- Mondragón, A., DiGate, R., 1999. The structure of *Escherichia coli* DNA topoisomerase III. *Structure* 7, 1373–1383. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(00\)80027-1](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(00)80027-1)
- Mosser, J.L., Tomasz, A., 1970. Choline-containing teichoic acid as a structural component of pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. *J Biol Chem* 245, 287–298. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63393-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63393-9)
- Musher, D.M., Anderson, R., Feldman, C., 2022. The remarkable history of pneumococcal vaccination: an ongoing challenge. *Pneumonia (Nathan)* 14, 5. <https://doi.org/10.1186/s41479-022-00097-y>
- Nair, S., Finkel, S.E., 2004. Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase. *J Bacteriol* 186, 4192–4198. <https://doi.org/10.1128/JB.186.13.4192-4198.2004>
- Nakanishi, A., Oshida, T., Matsushita, T., Imajoh-Ohmi, S., Ohnuki, T., 1998. Identification of DNA gyrase inhibitor (Gyrl) in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 273, 1933–1938. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.4.1933>
- Nasmyth, K., Haering, C.H., 2005. The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu Rev Biochem* 74, 595–648. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133219>
- Nöllmann, M., Stone, M.D., Bryant, Z., Gore, J., Crisona, N.J., Hong, S.C., Mittelheiser, S., Maxwell, A., Bustamante, C., Cozzarelli, N.R., 2007. Multiple modes of *Escherichia coli* DNA gyrase activity revealed by force and torque. *Nat Struct Mol Biol* 14, 264–271. <https://doi.org/10.1038/nsmb1213>
- Oberto, J., Nabti, S., Jooste, V., Mignot, H., Rouviere-Yaniv, J., 2009. The HU regulon is composed of genes responding to anaerobiosis, acid stress, high osmolarity and SOS induction. *PLoS One* 4, e4367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004367>
- Ohniwa, R.L., Muchaku, H., Saito, S., Wada, C., Morikawa, K., 2013. Atomic force microscopy analysis of the role of major DNA-binding proteins in organization of

- the nucleoid in *Escherichia coli*. PLoS One 8, e72954. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072954>
- Ohniwa, R.L., Ushijima, Y., Saito, S., Morikawa, K., 2011. Proteomic analyses of nucleoid-associated proteins in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus aureus*. PLoS One 6, e19172. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019172>
- Osorio Garcia, M.A., Wood, E.A., Keck, J.L., Cox, M.M., 2023. Interaction with single-stranded DNA-binding protein modulates *Escherichia coli* RadD DNA repair activities. J Biol Chem 299, 104773. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.104773>
- Ottolenghi, E., Hotchkiss, R.D., 1962. Release of genetic transforming agent from pneumococcal cultures during growth and disintegration. J Exp Med 116, 491–519. <https://doi.org/10.1084/jem.116.4.491>
- Pasteur, L., 1881. Note sur la maladie nouvelle provoquée par la sa live d'un enfant mort de la rage. Bull Acad Med 10, 94–103.
- Peng, H., Marians, K.J., 1993. *Escherichia coli* topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. J Biol Chem 268, 24481–24490.
- Perez-Cheeks, B.A., Lee, C., Hayama, R., Marians, K.J., 2012. A role for topoisomerase III in *Escherichia coli* chromosome segregation. Mol Microbiol 86, 1007–1022. <https://doi.org/10.1111/mmi.12039>
- Pérez-Martín, J., Rojo, F., de Lorenzo, V., 1994. Promoters responsive to DNA bending: a common theme in prokaryotic gene expression. Microbiol Rev 58, 268–290.
- Peter, B.J., Arsuaga, J., Breier, A.M., Khodursky, A.B., Brown, P.O., Cozzarelli, N.R., 2004. Genomic transcriptional response to loss of chromosomal supercoiling in *Escherichia coli*. Genome Biol 5, R87. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-11-r87>
- Pham, T.D.M., Ziora, Z.M., Blaskovich, M.A.T., 2019. Quinolone antibiotics. Med Chem Comm 10, 1719–1739. <https://doi.org/10.1039/c9md00120d>
- Pimenta, F., Moiane, B., Gertz, R.E., Chochua, S., Snippes Vagnone, P.M., Lynfield, R., Sigaúque, B., Carvalho, M. da G., Beall, B., 2021. New pneumococcal serotype 15D. J Clin Microbiol 59, e00329-21. <https://doi.org/10.1128/JCM.00329-21>
- Pope, C.F., McHugh, T.D., Gillespie, S.H., 2010. Methods to determine fitness in bacteria, in: Gillespie, S.H., McHugh, T.D. (Eds.), Antibiotic Resistance Protocols: Second Edition, Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 113–121. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-279-7_9
- Postow, L., Hardy, C.D., Arsuaga, J., Cozzarelli, N.R., 2004. Topological domain structure of the *Escherichia coli* chromosome. Genes Dev 18, 1766–1779. <https://doi.org/10.1101/gad.1207504>
- Pruss, G.J., Manes, S.H., Drlica, K., 1982. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. Cell 31, 35–42. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90402-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90402-0)
- Pul, U., Wurm, R., Wagner, R., 2007. The role of LRP and H-NS in transcription regulation: involvement of synergism, allostery and macromolecular crowding. J Mol Biol 366, 900–915. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.11.067>
- Reece, R.J., Maxwell, A., 1991. The C-terminal domain of the *Escherichia coli* DNA gyrase A subunit is a DNA-binding protein. Nucleic Acids Res 19, 1399–1405. <https://doi.org/10.1093/nar/19.7.1399>
- Rouvière-Yaniv, J., Gros, F., 1975. Characterization of a novel, low-molecular-weight DNA-binding protein from *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A 72, 3428–3432.
- Ruiz-Masó, J.A., Anand, S.P., Espinosa, M., Khan, S.A., del Solar, G., 2006. Genetic and biochemical characterization of the *Streptococcus pneumoniae* PcrA helicase and its role in plasmid rolling circle replication. J Bacteriol 188, 7416–7425. <https://doi.org/10.1128/JB.01010-06>
- Ruiz-Masó, J.A., López-Aguilar, C., Nieto, C., Sanz, M., Burón, P., Espinosa, M., del Solar, G., 2012. Construction of a plasmid vector based on the pMV158 replicon

- for cloning and inducible gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *Plasmid* 67, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2011.09.001>
- Scelfo, C., Menzella, F., Fontana, M., Ghidoni, G., Galeone, C., Facciolongo, N.C., 2021. Pneumonia and invasive pneumococcal diseases: the role of pneumococcal conjugate vaccine in the era of multi-drug resistance. *Vaccines* 9, 420. <https://doi.org/10.3390/vaccines9050420>
- Schroeder, M.R., Stephens, D.S., 2016. Macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol* 6, 98. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00098>
- Schvartzman, J.B., Martínez-Robles, M.-L., Hernández, P., Krimer, D.B., 2013. Plasmid DNA topology assayed by two-dimensional agarose gel electrophoresis, in: Makovets, S. (Ed.), *DNA Electrophoresis, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 121–132. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-565-1_7
- Schvartzman, J.B., Stasiak, A., 2004. A topological view of the replicon. *EMBO Rep* 5, 256–261. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400101>
- Sempere, J., González-Camacho, F., Domenech, M., Llamosí, M., del Río, I., López-Ruiz, B., Gimeno, M., Coronel, P., Yuste, J., 2022. A national longitudinal study evaluating the activity of cefditoren and other antibiotics against non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* strains during the period 2004–20 in Spain. *J Antimicrob Chemother* 77, 1045–1051. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab482>
- Shao, Xuguang, Grishin, N.V., 2000. Common fold in helix–hairpin–helix proteins. *Nucleic Acids Res* 28, 2643–2650.
- Shao, X., Grishin, N.V., 2000. Common fold in helix-hairpin-helix proteins. *Nucleic Acids Res* 28, 2643–2650. <https://doi.org/10.1093/nar/28.14.2643>
- Skerman, V.B.D., McGOWAN, Vicki., Sneath, P.H.A., 1980. Approved lists of bacterial names. *Int Journal Syst Evol Microbiol* 30, 225–420. <https://doi.org/10.1099/00207713-30-1-225>
- Smith, C.G., Dietz, A., Sokolski, W.T., Savage, G.M., 1956. Streptonivcin, a new antibiotic. I. Discovery and biologic studies. *Antibiot Chemother* 6, 135–142.
- Song, J.H., 2013. Advances in pneumococcal antibiotic resistance. *Expert Rev Respir Med* 7, 491–498. <https://doi.org/10.1586/17476348.2013.816572>
- Spratt, B.G., 1994. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* 264, 388–393. <https://doi.org/10.1126/science.8153626>
- Sternberg, G.M., 1881. A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by the subcutaneous injection of human saliva. An experimental research. *Natl Board Health Bull* 2, 781–783.
- Stojkova, P., Spidlova, P., Stulik, J., 2019. Nucleoid-associated protein HU: a lilliputian in gene regulation of bacterial virulence. *Front Cell Infect Microbiol* 9, 159. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00159>
- Strunnikov, A.V., 2006. SMC complexes in bacterial chromosome condensation and segregation. *Plasmid* 55, 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2005.08.004>
- Studier, F.W., 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. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2)
- Stupina, V.A., Wang, J.C., 2005. Viability of *Escherichia coli* topA mutants lacking DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* 280, 355–360. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411924200>
- Swinger, K.K., Rice, P.A., 2004. IHF and HU: flexible architects of bent DNA. *Curr Opin Struct Biol* 14, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2003.12.003>
- Szafran, M.J., Jakimowicz, D., Elliot, M.A., 2020. Compaction and control—the role of chromosome-organizing proteins in *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev* 44, 725. <https://doi.org/10.1093/femsre/ruaa028>
- Tani, T.H., Khodursky, A., Blumenthal, R.M., Brown, P.O., Matthews, R.G., 2002. Adaptation to famine: a family of stationary-phase genes revealed by microarray

- analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13471–13476. <https://doi.org/10.1073/pnas.212510999>
- Teleman, A.A., Graumann, P.L., Lin, D.C.-H., Grossman, A.D., Losick, R., 1998. Chromosome arrangement within a bacterium. *Curr Biol* 8, 1102–1109. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70464-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70464-6)
- Thayer, M.M., Ahern, H., Xing, D., Cunningham, R.P., Tainer, J.A., 1995. Novel DNA binding motifs in the DNA repair enzyme endonuclease III crystal structure. *EMBO J* 14, 4108–4120. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00083.x>
- The Galaxy Community, 2022. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. *Nucleic Acids Res* 50, W345–W351. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac247>
- Thompson, M.K., Necedal, I., Culviner, P.H., Zhang, T., Gozzi, K.R., Laub, M.T., 2022. *Escherichia coli* SymE is a DNA-binding protein that can condense the nucleoid. *Mol Microbiol* 117, 851–870. <https://doi.org/10.1111/mmi.14877>
- Tomasz, A., 1967. Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in pneumococcus. *Science* 157, 694–697.
- Trasviña-Arenas, C.H., Demir, M., Lin, W.-J., David, S.S., 2021. Structure, function and evolution of the helix-hairpin-Helix DNA glycosylase superfamily: piecing together the evolutionary puzzle of DNA base damage repair mechanisms. *DNA Repair* 108, 103231. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103231>
- Tse-Dinh, Y.C., 1985. Regulation of the *Escherichia coli* DNA topoisomerase I gene by DNA supercoiling. *Nucleic Acids Res* 13, 4751–4763. <https://doi.org/10.1093/nar/13.13.4751>
- Ullsperger, C., Cozzarelli, N.R., 1996. Contrasting enzymatic activities of topoisomerase IV and DNA gyrase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 271, 31549–31555. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.49.31549>
- Ushijima, Y., Ohniwa, R.L., Morikawa, K., 2017. Identification of nucleoid associated proteins (NAPs) under oxidative stress in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol* 17, 207. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1114-3>
- Varon, E., Gutmann, L., 2000. Mechanisms and spread of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Res Microbiol* 151, 471–473. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)00167-4](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)00167-4)
- Villarejo, M.R., Zabin, I., 1974. β -Galactosidase from termination and deletion mutant strains. *J Bacteriol* 120, 466–474. <https://doi.org/10.1128/jb.120.1.466-474.1974>
- Vinograd, J., Lebowitz, J., Radloff, R., Watson, R., Laipis, P., 1965. The twisted circular form of polyoma viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 53, 1104–1111.
- Vollmer, W., Massidda, O., Tomasz, A., 2019. The cell wall of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiol Spectr* 7, 7.3.19. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0018-2018>
- Vologodskii, A., 1998. Exploiting circular DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4092–4093.
- Wang, J.C., 2002. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 430–440. <https://doi.org/10.1038/nrm831>
- Wang, J.C., 1996. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* 65, 635–692. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.003223>
- Wang, J.C., 1985. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* 54, 665–697. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.54.070185.003313>
- Wang, J.C., 1971. Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein ω . *J Mol Biol* 55, 523–IN16. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(71\)90334-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(71)90334-2)
- Wang, X., Llopis, P.M., Rudner, D.Z., 2013. Organization and segregation of bacterial chromosomes. *Nat Rev Genet* 14, 191–203. <https://doi.org/10.1038/nrg3375>
- Watson, D.A., Musher, D.M., Jacobson, J.W., Verhoef, J., 1993. A brief history of the pneumococcus in biomedical research: a panoply of scientific discovery. *Clin Infect Dis* 17, 913–924. <https://doi.org/10.1093/clinids/17.5.913>
- Weichselbaum, A., 1886. Ueber die aetiologie der acuten lungenund rippenfellentzündungen. *Med Jahrb* 1, 483.

- WHO, 2007. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization-WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 82, 93–104.
- Witz, G., Stasiak, A., 2010. DNA supercoiling and its role in DNA decatenation and unknotting. *Nucleic Acids Res* 38, 2119–2133. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1161>
- Woelfle, M.A., Xu, Y., Qin, X., Johnson, C.H., 2007. Circadian rhythms of superhelical status of DNA in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 18819–18824. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706069104>
- Worcel, A., Burgi, E., 1972. On the structure of the folded chromosome of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 71, 127–147. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(72\)90342-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(72)90342-7)
- Zechiedrich, E.L., Cozzarelli, N.R., 1995. Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 9, 2859–2869. <https://doi.org/10.1101/gad.9.22.2859>
- Zhang, X., Andres, S.N., Elliot, M.A., 2021. Interplay between nucleoid-associated proteins and transcription factors in controlling specialized metabolism in streptomyces. *mBio* 12, e0107721. <https://doi.org/10.1128/mBio.01077-21>

ANEXOS

Anexo 1. DEGs detectados en la cepa $\Delta spr0488$ [pLS1R-*spr0488*] crecida con S y NOV con respecto al crecimiento en S sin NOV.

Función	Gen	Locus	Descripción ^a	Variación de expresión ^b
Proteínas hipotéticas		<i>spr0141</i>		5,19
Procesos celulares	<i>dnaK</i>	<i>spr0455</i>	Chaperona de choque térmico	2,99
	<i>dnaJ</i>	<i>spr0456</i>	Chaperona de choque térmico	3,22
Proteínas hipotéticas	<i>blpT</i>	<i>spr0461</i>		7,5
Síntesis de proteínas	<i>rsuA</i>	<i>spr0597</i>	Pseudouridina sintasa A, subunidad pequeña ribosómica	-5,03
Proteínas hipotéticas		<i>spr0631</i>		5,18
Proteínas de transporte	<i>ctpA</i>	<i>spr0641</i>	Transportador de cobre	3,5
Proteínas hipotéticas		<i>spr0825</i>		4,16
		<i>spr0826</i>		2,77
Proteínas de transporte	<i>phtE</i>	<i>spr0908</i>	Precursor de la proteína E de la tríada de histidina neumocócica	-3,87
Proteínas hipotéticas		<i>spr0931</i>		-3,51
		<i>spr0945</i>		5,79
		<i>spr0946</i>		3,21
Metabolismo del DNA	<i>pcrA</i>	<i>spr0995</i>	DNA helicasa dependiente de ATP	-3,11
Funciones regulatorias	<i>radC</i>	<i>spr0996</i>	Proteína de reparación de DNA	-4,56
Metabolismo del RNA	<i>rnh</i>	<i>spr1044</i>	Ribonucleasa H	-3,09
Proteínas hipotéticas		<i>spr1045</i>		-3,46
		<i>spr1131</i>		-6,18
Biosíntesis de aminoácidos		<i>spr1133</i>	3-isopropilmalato deshidratasa	-3,71
		<i>spr1134</i>		-4,11
		<i>spr1136</i>	2-isopropilmalato sintasa	-4,85
		<i>spr1137</i>	2-isopropilmalato sintasa	-4,62
Metabolismo del DNA	<i>topA</i>	<i>spr1141</i>	DNA topoisomerasa I	-4,24
Proteínas hipotéticas		<i>spr1143</i>		-5,81
Funciones regulatorias	<i>DprA</i>	<i>spr1144</i>	Procesamiento del DNA	-4,79
Proteínas hipotéticas		<i>spr1488</i>		-4,08
Funciones regulatorias		<i>spr1629</i>		3,17
	<i>trpA</i>	<i>spr1631</i>	Cadena alfa de Trp sintasa	-3,57
Proteínas de transporte	<i>mgtC</i>	<i>spr1641</i>	Transporte de Mg(2+) ATPasa/permeasa	4,53
	<i>ABC-MSP</i>	<i>spr1643</i>	ABCT, permeasa	5,58

	ABC-SBP	<i>spr1645</i>	ABCT, proteína de unión a sustrato	7,95
Proteínas hipotéticas		<i>spr1646</i>		4,53
Metabolismo de carbohidratos	<i>galT</i>	<i>spr1648</i>	Galactosa-1-P-uridililtransferasa	5,48
Proteínas hipotéticas		<i>spr1650</i>		7,49
		<i>spr1652</i>		4,03
Proteínas de transporte	<i>fecE</i>	<i>spr1686</i>	ABCT, proteína de unión a ATP-hierro férrico	-5,29
	<i>fatB</i>	<i>spr1687</i>	ABCT, proteína de unión a hierro férrico	-4,86
Proteínas hipotéticas		<i>spr1765</i>		4,35
Metabolismo de carbohidratos		<i>spr1990</i>	Glicerol-3-P deshidrogenasa	-5,09
	<i>glpK</i>	<i>spr1991</i>	Glicerol quinasa	-3,49

^aABCT, transportador ABC. ^bLos genes cuya transcripción está alterada (dos réplicas), incluyen aquellos que mostraron un cambio significativo (valor absoluto ≥ 2) y un valor de $P \leq 0,01$.

Anexo 2. DEGs detectados $\Delta spr0488$ [pLS1R-*spr0488*] en presencia de M y NOV con respecto al crecimiento en M sin NOV.

Función	Gen	Locus	Descripción ^a	Variación de expresión ^b
Funciones regulatorias	<i>comX1</i>	<i>spr0013</i>	Modulador de la transcripción de genes de competencia	2,25
Metabolismo de RNA	<i>tadA</i>	<i>spr0022</i>	tRNA-adenosin-deaminasa	-2,54
Proteínas hipotéticas		<i>spr0027</i>		-2,35
Elementos genéticos móviles		<i>spr0029</i>	Transposasa degenerada	-2,3
Metabolismo del DNA	<i>polA</i>	<i>spr0032</i>	DNA polimerasa I	-2,34
Proteínas hipotéticas		<i>spr0072</i>	Glicosiltransferas de la familia A	-2,02
Proteínas de transporte	ABC-MSP	<i>spr0081</i>	Proteína transmembrana, azúcar	3
	ABC-MSP	<i>spr0082</i>	Transportador de membrana, azúcar	2,34
Proteínas hipotéticas		<i>spr0091</i>	Glicosiltransferas de la familia 2	-2,12
Biosíntesis de aminoácidos	<i>argH</i>	<i>spr0103</i>	Arg succinato liasa	-2,15
Proteínas hipotéticas		<i>spr0115</i>		-2,46
		<i>spr0117</i>		-2,13
Síntesis de proteínas	<i>trmU</i>	<i>spr0122</i>	tRNA (5-metilaminometil-2-tiouridilato)-metiltransferasa	-2,34
Proteínas hipotéticas		<i>spr0174</i>		2,22
Metabolismo carbohidratos	<i>pfIE</i>	<i>spr0226</i>	Piruvato formato-liasa 3	2,22
Proteínas de transporte	PTS-EIIA	<i>spr0229</i>	PTS, componente EIIA de azúcar	3,53
	PTS-EIIB	<i>spr0230</i>	PTS, componente EIIB de azúcar	2,5
Metabolismo central intermediario	<i>glmS</i>	<i>spr0245</i>	L-Gln-D-fructosa-6-P-amidotransferasa	-2,55
Metabolismo de carbohidratos	<i>bglA</i>	<i>spr0276</i>	6-P-beta-glucosidasa	-3,48

Proteínas de transporte	<i>PTS-EII</i>	<i>spr0278</i>	PTS, componente EII de azúcar	-2,37
Metabolismo del RNA	<i>bgIG</i>	<i>spr0279</i>	Antiterminador de transcripción familia BglG	-2,35
Metabolismo central intermediario	<i>gno</i>	<i>spr0290</i>	5-ceto-D-gluconato 5-reductasa	2,02
Proteínas de transporte	<i>PTS-EII</i>	<i>spr0291</i>	PTS, componente EII de azúcar	2,68
Virulencia	<i>cps2I</i>	<i>spr0316</i>	Cápsula tipo 2	-2,12
	<i>cps2K</i>	<i>spr0318</i>	Cápsula tipo 2	-2,36
	<i>cps2P</i>	<i>spr0319</i>	Cápsula tipo 2	-2,41
	<i>cps2L</i>	<i>spr0320</i>	Cápsula tipo 2	-2,32
	<i>cps2M</i>	<i>spr0321</i>	Cápsula tipo 2	-2,45
	<i>cpsN</i>	<i>spr0322</i>	dTDP-glucosa-4,6-deshidratasa	-2,47
	<i>cpsO</i>	<i>spr0323</i>	dTDP-L-ramnosa sintasa	-2,07
Proteínas de transporte	<i>aliA</i>	<i>spr0327</i>	ABCT, proteína de unión a oligopéptidos	-2,44
Biosíntesis de aminoácidos	<i>ilvB</i>	<i>spr0401</i>	Subunidad de acetolactato sintasa	-2,69
	<i>ilvN</i>	<i>spr0402</i>	Subunidad de acetolactato sintasa	-2,69
	<i>ilvC</i>	<i>spr0403</i>	Reductoisomerasa	-2,41
		<i>spr0404</i>		-2,11
		<i>spr0405</i>		-2,22
	<i>ilvA</i>	<i>spr0406</i>	Thr desaminasa	-2,92
Procesos celulares	<i>hrcA</i>	<i>spr0453</i>	Represor de transcripción inducible por calor	2,43
	<i>grpE</i>	<i>spr0454</i>	Chaperona de choque térmico	2,7
	<i>dnaK</i>	<i>spr0455</i>	Chaperona de choque térmico	2,36
Proteínas hipotéticas	<i>blpT</i>	<i>spr0461</i>		9,95
Funciones regulatorias	<i>rr13</i>	<i>spr0463</i>	Regulador de respuesta	2,1
	<i>ip</i>	<i>spr0465</i>	Péptido similar a bacteriocina	5,03
Proteínas hipotéticas		<i>spr0466</i>		5,08
		<i>spr0467</i>		4,7
		<i>spr0468</i>		4,56
		<i>spr0469</i>		4,29
		<i>spr0470</i>		2,96
	<i>blpY</i>	<i>spr0472</i>		3,75
	<i>blpZ</i>	<i>spr0473</i>		3,85
Proteínas de transporte	<i>pncP</i>	<i>spr0474</i>	ABCT, proteína de unión a ATP	4,18
Proteínas hipotéticas		<i>spr0531</i>		-2,03
Proteínas de transporte	<i>PTS-EII</i>	<i>spr0562</i>	PTS, componente EII de azúcar	2,1
Síntesis de proteínas	<i>rsuA</i>	<i>spr0597</i>	Pseudouridina sintasa A de subunidad pequeña ribosómica	-4,81
	<i>typA</i>	<i>spr0598</i>	Proteína de unión a GTP TypA/BipA	-2,22
Proteínas hipotéticas		<i>spr0599</i>		-2,01
		<i>spr0640</i>		2,03
Purinas, pirimidinas, nucleósidos y nucleótidos	<i>pyrDA</i>	<i>spr0672</i>	Dihidroorotato deshidrogenasa	2,06

Metabolismo del DNA	<i>hoIA</i>	<i>spr0673</i>	DNA polimerasa III, subunidad delta	2,09
	<i>gyrB</i>	<i>spr0715</i>	DNA girasa	2,01
Elementos genéticos móviles		<i>spr0717</i>	Transposasa	2,06
		<i>spr0718</i>	Transposasa	2,35
Proteínas hipotéticas		<i>spr0810</i>		2,07
		<i>spr0814</i>		-2,15
Metabolismo energético	<i>cad</i>	<i>spr0816</i>	Lys carboxilasa	-2
Proteínas hipotéticas		<i>spr0825</i>		3,26
Funciones regulatorias	<i>coiA</i>	<i>spr0881</i>	Proteína de competencia	-2,12
Proteínas de transporte	<i>phtE</i>	<i>spr0908</i>	Precursor de la proteína E de la tríada de histidina neumocócica	-2,21
	<i>mscL</i>	<i>spr0915</i>	Canal iónico mecanosensible	-3,35
Proteínas hipotéticas		<i>spr0931</i>		-2,14
Síntesis de proteínas		<i>spr0932</i>		-2,4
Proteínas hipotéticas		<i>spr0945</i>		2,08
		<i>spr0964</i>		-2,53
		<i>spr0966</i>		-2,13
		<i>spr0970</i>		-2,67
Proteínas de transporte	<i>ABC-MSP</i>	<i>spr0976</i>	ABCT, permeasa transmembrana	-2
	<i>ABC-NBD</i>	<i>spr0977</i>	ABCT, proteína de unión a ATP	-2,11
Envoltura celular B/D de mureína y peptidoglicano	<i>murZ</i>	<i>spr0989</i>	UDP-N-acetilglucosamina 1-carboxiviniltransferasa	-2,84
Proteínas hipotéticas		<i>spr0990</i>		-2,61
		<i>spr0991</i>		-2,48
Reciclaje de proteínas	<i>map</i>	<i>spr0992</i>	Met aminopeptidasa	-2,21
Metabolismo del DNA	<i>pcrA</i>	<i>spr0995</i>	DNA helicasa ATP dependiente	-3,36
Funciones regulatorias	<i>radC</i>	<i>spr0996</i>	Proteína reparadora del ADN	-3,11
Proteínas hipotéticas		<i>spr1035</i>		-2,09
Metabolismo del DNA	<i>rexB</i>	<i>spr1039</i>	Subunidad de la principal exonucleasa	-2,36
	<i>rexA</i>	<i>spr1040</i>	Subunidad de la principal exonucleasa	-2,14
Proteínas hipotéticas		<i>spr1041</i>		-2,11
		<i>spr1043</i>		-3,15
Metabolismo del RNA	<i>rnh</i>	<i>spr1044</i>	Ribonucleasa H	-2,8
Proteínas hipotéticas		<i>spr1045</i>		-2,72
Metabolismo intermediario		<i>spr1095</i>	O-acetilhomoserina sulfhidrilasa	2,15
Proteínas de transporte	<i>nirC</i>	<i>spr1097</i>	Transportador de formiato-nitrato	2,08
Proteínas hipotéticas		<i>spr1129</i>		-2,82
		<i>spr1130</i>		-2,82
		<i>spr1131</i>		-2,94
		<i>spr1132</i>		-2,94
Biosíntesis de aminoácidos		<i>spr1133</i>	3-isopropilmalato deshidratasa	-3,06

Proteínas hipotéticas		<i>spr1134</i>		-3,36
Biosíntesis de aminoácidos	<i>leuB</i>	<i>spr1135</i>	3-isopropilmalato deshidrogenasa	-3,05
		<i>spr1136</i>	2-isopropilmalato sintasa	-3,42
		<i>spr1137</i>	2-isopropilmalato sintasa	-2,81
		<i>spr1138</i>		-3,39
Proteínas de transporte	<i>cutC</i>	<i>spr1139</i>	Sensibilidad al cobre	-2,59
Proteínas hipotéticas		<i>spr1140</i>		-2,58
Metabolismo del DNA	<i>topA</i>	<i>spr1141</i>	DNA topoisomerasa I	-3,88
Proteínas hipotéticas		<i>spr1142</i>		-2,8
		<i>spr1143</i>		-2,78
Funciones regulatorias	<i>dprA</i>	<i>spr1144</i>	Procesamiento del DNA	-2,06
Proteínas de transporte	<i>ABC-N/P</i>	<i>spr1289</i>	ABCT, proteína transmembrana de unión a ATP	2,34
	<i>ABC-N/P</i>	<i>spr1290</i>	ABCT, proteína transmembrana de unión a ATP	2,24
Proteínas hipotéticas		<i>spr1291</i>		2,53
Proteínas de transporte	<i>ABC-NBD</i>	<i>spr1293</i>	ABCT, proteína transmembrana de unión a ATP	2,15
Proteínas hipotéticas		<i>spr1316</i>		-2,11
Metabolismo energético	<i>ogt</i>	<i>spr1317</i>	O6-metilguanina-DNA metiltransferasa	-2,09
Proteínas hipotéticas		<i>spr1318</i>		-2,4
		<i>spr1321</i>		-2,66
Biosíntesis de cofactores y grupos protésicos	<i>pdx1</i>	<i>spr1322</i>	Proteína de biosíntesis de piridoxina	-2,4
Proteínas de transporte	<i>glnH</i>	<i>spr1353</i>	ABCT, proteína de unión a Gln	-2,02
	<i>glnQ</i>	<i>spr1354</i>	ABCT, proteína de unión a ATP	-2,05
Metabolismo energético	<i>atpC</i>	<i>spr1359</i>	ATPasa de protones, sector F ₁ , subunidad epsilon	-2
	<i>atpD</i>	<i>spr1360</i>	ATPasa de protones, sector F ₁ , subunidad beta	-2,06
	<i>atpG</i>	<i>spr1361</i>	ATPasa de protones, sector F ₁ , subunidad gamma	-2,06
	<i>atpA</i>	<i>spr1362</i>	ATPasa de protones, sector F ₁ , subunidad alfa	-2,1
	<i>atpH</i>	<i>spr1363</i>	ATPasa, sector F ₁ , subunidad delta	-2
	<i>atpB</i>	<i>spr1365</i>	ATPasa de protones, sector F ₀ , subunidad a	-2,05
	<i>atpE</i>	<i>spr1366</i>	ATPasa de protones, sector F ₀ , subunidad c	-2,06
Proteínas hipotéticas		<i>spr1403</i>		-2,71
		<i>spr1449</i>		-2,06
Biosíntesis de cofactores y grupos protésicos	<i>pdxK</i>	<i>spr1450</i>	Piridoxina quinasa	-2,08
Síntesis de proteínas	<i>truA</i>	<i>spr1451</i>	RNA ^t pseudouridina sintasa A	-2,21
Proteínas hipotéticas		<i>spr1470</i>		-2,06
		<i>spr1486</i>		-2,42
Funciones regulatorias	<i>relA</i>	<i>spr1487</i>	GTP pirofosfocinasa	-2,11
Proteínas hipotéticas		<i>spr1488</i>		-3,63

Destino de proteínas	<i>pepO</i>	<i>spr1491</i>	Endopeptidasa O	-2,39
Proteínas hipotéticas		<i>spr1496</i>		-2,36
		<i>spr1498</i>		-2,43
Procesos celulares	<i>nanE</i>	<i>spr1529</i>	N-acetilmanosamina-6-P epimerasa	2,01
Proteínas de transporte	ABC-SBP	<i>spr1620</i>	ABCT, proteína de unión al sustrato	2,02
Proteínas hipotéticas		<i>spr1622</i>		-2,11
		<i>spr1629</i>		2,19
		<i>spr1630</i>		2,34
Funciones regulatorias	<i>trpA</i>	<i>spr1631</i>	Trp sintasa, cadena α	-3,47
	<i>trpB</i>	<i>spr1632</i>	Trp sintasa, cadena β	-4,15
Biosíntesis de aminoácidos	<i>trpF</i>	<i>spr1633</i>	P-ribosilantranilato isomerasa	-3,66
	<i>trpC</i>	<i>spr1634</i>	Indol-3-glicerol-P sintasa	-3,84
	<i>trpD</i>	<i>spr1635</i>	Antranilato-P-ribosiltransferasa	-3,51
	<i>trpG</i>	<i>spr1636</i>	Antranilato sintasa componente II	-3,68
	<i>trpE</i>	<i>spr1637</i>	Antranilato sintasa componente I	-3,29
Proteínas de transporte	<i>mgtC</i>	<i>spr1641</i>	Transporte de Mg(2+) ATPasa/permeasa	3,88
	ABC-MSP	<i>spr1643</i>	ABCT, permeasa transmembrana	4,28
	ABC-NBD	<i>spr1644</i>	ABCT, proteína de unión a ATP	4,54
	ABC-SBP	<i>spr1645</i>	ABCT, proteína de unión a ATP	4,66
Proteínas hipotéticas		<i>spr1646</i>		5,76
Metabolismo carbohidratos	<i>galE</i>	<i>spr1647</i>	UDP-glucosa 4-epimerasa	2,71
	<i>galT</i>	<i>spr1648</i>	Galactosa-1-P-uridililtransferasa	3
Proteínas hipotéticas		<i>spr1649</i>		2,87
		<i>spr1650</i>		4,34
		<i>spr1651</i>		3,58
		<i>spr1652</i>		4,42
		<i>spr1666</i>		-3,48
		<i>spr1766</i>		2,04
Procesos celulares	<i>cylM</i>	<i>spr1767</i>	Sistema de toxina citolítica	2,15
Metabolismo del RNA	<i>plcR</i>	<i>spr1803</i>	Activador transcripcional	2,18
Proteínas hipotéticas		<i>spr1804</i>		2,15
		<i>spr1805</i>		2,07
		<i>spr1810</i>		2,2
Funciones regulatorias	<i>comX 2</i>	<i>spr1819</i>	Modulador de la transcripción de genes de competencia	2,34
Metabolismo central intermediario	<i>bgl2</i>	<i>spr1833</i>	Beta-glucosidasa	2,86
Proteínas de transporte	<i>ptcC</i>	<i>spr1834</i>	PTS, componente IIC de celobiosa.	3,08
	<i>ptcB</i>	<i>spr1835</i>	PTS, componente IIB de celobiosa	3,31
	<i>ptcA</i>	<i>spr1836</i>	PTS, componente IIA de celobiosa	3,32
Metabolismo de carbohidratos	<i>adh</i>	<i>spr1866</i>	Alcohol deshidrogenasa	2,05
Metabolismo del RNA	<i>marR</i>	<i>spr1874</i>	Regulador transcripcional	-2,46

Proteínas de transporte	<i>pstS</i>	<i>spr1895</i>	ABCT, proteína de unión a P	2,39
	<i>pstA</i>	<i>spr1897</i>	ABCT, permeasa de P	2,14
	<i>pstB</i>	<i>spr1898</i>	ABCT, proteína-P de unión a ATP	2,13
Metabolismo del RNA	<i>phoU</i>	<i>spr1899</i>	Regulador negativo del regulón pho de transporte de P	2,36
Metabolismo de carbohidratos	<i>tktC</i>	<i>spr1936</i>	Tanscetolasa (C-terminus)	2,03
Procesos celulares	<i>pcpA</i>	<i>spr1945</i>	Proteína fijadora de colina	2,87
Metabolismo de carbohidratos	<i>fucl</i>	<i>spr1964</i>	L-fucosa isomerasa	-2,28
Proteínas hipotéticas		<i>spr1965</i>		-2,37
Metabolismo de carbohidratos	<i>fcsK</i>	<i>spr1973</i>	Fucosa quinasa	2,38
Metabolismo de proteínas	<i>gsp-781</i>	<i>spr2021</i>	Proteína de estrés general	-2,1

^aABCT, transportador ABC; PTS, sistema fosfotransferasa. ^bLos genes cuya transcripción está alterada (dos réplicas), incluyen aquellos que mostraron un cambio significativo (valor absoluto ≥ 2) y un valor de $P \leq 0,01$

Anexo 3: Publicación durante la realización de esta tesis

Article

StaR Is a Positive Regulator of Topoisomerase I Activity Involved in Supercoiling Maintenance in *Streptococcus pneumoniae*

Antonio A. de Vasconcelos Junior ¹, Jose M. Tirado-Vélez ¹, Antonio J. Martín-Galiano ², Diego Megias ³, María-José Ferrándiz ¹, Pablo Hernández ⁴, Mónica Amblar ^{1,*} and Adela G. de la Campa ^{1,5,*}

- ¹ Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain
² Unidades Centrales Científico-Técnicas, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain
³ Unidad de Microscopía Confocal, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain
⁴ Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28040 Madrid, Spain
⁵ Presidencia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28006 Madrid, Spain
* Correspondence: mamblar@isci.es (M.A.); agcampa@isci.es (A.G.d.l.C.); Tel.: +34-91-448-283 (M.A.); +34-91-448-944 (A.G.d.l.C.)

Abstract: The DNA topoisomerases gyrase and topoisomerase I as well as the nucleoid-associated protein HU maintain supercoiling levels in *Streptococcus pneumoniae*, a main human pathogen. Here, we characterized, for the first time, a topoisomerase I regulator protein (StaR). In the presence of sub-inhibitory novobiocin concentrations, which inhibit gyrase activity, higher doubling times were observed in a strain lacking *staR*, and in two strains in which StaR was over-expressed either under the control of the ZnSO₄-inducible P_{Zn} promoter (strain $\Delta staRP_{Zn,staR}$) or of the maltose-inducible P_{Mai} promoter (strain $\Delta staRP_{LSIROM,staR}$). These results suggest that StaR has a direct role in novobiocin susceptibility and that the StaR level needs to be maintained within a narrow range. Treatment of $\Delta staRP_{Zn,staR}$ with inhibitory novobiocin concentrations resulted in a change of the negative DNA supercoiling density (σ) in vivo, which was higher in the absence of StaR ($\sigma = -0.049$) than when StaR was overproduced ($\sigma = -0.045$). We have located this protein in the nucleoid by using super-resolution confocal microscopy. Through in vitro activity assays, we demonstrated that StaR stimulates TopoI relaxation activity, while it has no effect on gyrase activity. Interaction between TopoI and StaR was detected both in vitro and in vivo by co-immunoprecipitation. No alteration of the transcriptome was associated with StaR amount variation. The results suggest that StaR is a new streptococcal nucleoid-associated protein that activates topoisomerase I activity by direct protein-protein interaction.

Keywords: DNA supercoiling; DNA topoisomerase I; DNA gyrase; supercoiling regulation; supercoiling homeostasis; nucleoid-associated proteins; topoisomerase regulator; StaR



Citation: de Vasconcelos Junior, A.A.; Tirado-Vélez, J.M.; Martín-Galiano, A.J.; Megias, D.; Ferrándiz, M.-J.; Hernández, P.; Amblar, M.; de la Campa, A.G. StaR Is a Positive Regulator of Topoisomerase I Activity Involved in Supercoiling Maintenance in *Streptococcus pneumoniae*. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 5973. <https://doi.org/10.3390/ijms24065973>

Academic Editors: Joseph E. Dewese and Neil Osheroff

Received: 20 February 2023

Revised: 16 March 2023

Accepted: 18 March 2023

Published: 22 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The *Streptococcus pneumoniae* chromosome is confined within the nucleoid, in which it is compacted by up to 1000-fold [1], allowing 1.3 Mb to be accommodated within cells just 1–2 μ m long. Chromosome topology depends on DNA supercoiling (Sc), which is controlled by DNA topoisomerases [2]. *S. pneumoniae* possesses three of these enzymes: two type II topoisomerases (topoisomerase IV and gyrase), which cleave both DNA strands, and a single type I enzyme (topoisomerase I, TopoI), which cleaves only on one strand. Gyrase and TopoI actively regulate the degree of Sc solving topological problems associated with dynamic DNA remodeling in *Escherichia coli* [3–6] as well as in *S. pneumoniae* [7–9]. In addition, in other bacteria, a number of nucleoid-associated proteins (NAPs) [10] also control Sc, forming a functional network that maintains DNA topology via bending, wrapping, bridging and constraining supercoils [11]. Transcription also regulates Sc, given that

domains of negative and positive Sc are generated, behind and ahead of the moving RNA polymerase (RNAP), respectively [12]. In fact, physical interaction between TopoI and RNAP has been detected in vitro in both *E. coli* [13] and *S. pneumoniae* [14]. In addition, ChIP-Seq experiments have revealed in vivo co-localization of RNAP and TopoI in *Mycobacterium tuberculosis* [15] and *S. pneumoniae* [14], as well as co-localization of RNAP and gyrase in *M. tuberculosis*. Likewise, Sc also regulates transcription, structuring the bacterial chromosome into domains with intrinsic topological behavior [7,16–19]. Genes within the Sc domains of the pneumococcal chromosome have a coordinated transcription [7,16] and similar functions [20]. Four types of domains, defined by their transcriptional response to DNA relaxation and their AT content, have been identified: up-regulated, down-regulated, non-regulated and AT-rich. The genes encoding the topoisomerases are themselves located in regulated Sc domains: *topA* in a down-regulated domain [7], and *gyrB* in an up-regulated domain [21]. The control of Sc in *S. pneumoniae* occurs mainly through the regulation of transcription of the topoisomerase genes. Relaxation triggers up-regulation of gyrase and down-regulation of topoisomerases I and IV, while hyper-negative Sc down-regulates the expression of TopoI. Therefore, TopoI plays a fundamental role in the regulation of transcript levels by Sc, since transcription levels of *topA* in homeostasis correlate with the induced variation in the density of Sc [16].

S. pneumoniae is a devastating infectious human pathogen, causing community-acquired pneumonia, meningitis, bacteremia and otitis media and producing the death of one million children worldwide annually [22]. Although resistance in this bacterium to beta-lactams and macrolides antibiotics, which are directed against cell-wall and protein synthesis, respectively, has spread globally [23], no worrisome levels of resistance to antibiotics directed to DNA topology maintenance (fluoroquinolones) [24], which target the type II DNA topoisomerases, have been detected. However, an increase in resistance may occur in tandem with the increased use of fluoroquinolones either due to alterations in their target topoisomerase genes or to the action of active efflux ([25–30]. Therefore, knowledge of the molecular basis of Sc control in this important pathogen is essential for finding new antibiotic targets and adequate antibiotic therapies. As mentioned above, in addition to topoisomerases, Sc is also modulated by NAPs. Although several NAPs have been characterized in the Gram-negative bacterium, *E. coli*, very few have been detected in Gram-positive species, including *S. pneumoniae* [31]. HU [32] and SMC [33] are the only NAPs identified in *S. pneumoniae* so far. HU is essential for growth and for the preservation of Sc in this bacterium [32].

The role of many proteins, including NAPs, in bacterial pathogens remains to be described. A previous study identified 44 hypothetical proteins conserved in *S. pneumoniae* and other Gram-positive pathogens, with potential physiological and biomedical value [34]. One of these proteins, a 324-residue-long polypeptide encoded by the *spr0929* locus, was predicted to interact with three protein partners, and was preliminarily classified as a DNA binding protein [34]. Interestingly, the sequence of this protein is highly conserved and present in virtually all *S. pneumoniae* isolates. Notably, genes coding for Spr0929 homologs are found in other Gram-positive pathogens, including *Clostridium*, *Enterococcus* and *Listeria* genera. In this study, we investigated the role of this hypothetical protein in *S. pneumoniae*. We demonstrated that the product of *spr0929* localizes to the nucleoid and activates TopoI relaxation activity affecting Sc homeostasis when DNA relaxation increases. This topoisomerase regulator of *S. pneumoniae* can be considered a new NAP and will be herein renamed as StaR (streptococcal topoisomerase activity regulator).

2. Results

2.1. The Absence of StaR Affects Novobiocin Susceptibility in *S. pneumoniae*

To investigate the role of the hypothetical protein encoded by *spr0929*, herein named *staR*, we performed an InterPro analysis to search for bacterial homologues. The best hit found was the NA37 (Nucleotide-Associated proteins of 37 kDa) family. The YejK protein of *E. coli*, the representative member of this family and the only one with experimental

information, had 19.4% identity and a 46.6% similarity with pneumococcal StaR (Figure 1A). YejK has been described as a NAP [35]. To decipher the function of StaR, the growth of R6 (wild type) and the previously constructed $\Delta staR$ deletion mutant [34] was analyzed with or without NOV. NOV inhibits the ATPase activity of gyrase, which is necessary for its Sc activity. However, gyrase has relaxing activity in the absence of ATP hydrolysis, which could also contribute to the final effect in Sc relaxation induced by NOV [36,37]. While in the absence of NOV, both strains showed equivalent growth rates (Figure 1B); in the presence of sub-inhibitory NOV concentrations ($0.5 \times \text{MIC}$), $\Delta staR$ grew slower than R6: doubling time 112 ± 6 min versus 89 ± 6 min ($p = 0.01$), suggesting a role of StaR in Sc maintenance under challenging conditions. In order to purify and characterize StaR, a chromosomal fragment containing its coding gene (*staR*) was cloned into the *E. coli* pET28a BL21-CodonPlus (DE3) expression system, and overproduction of histidine-tagged Star (H_6 -StaR) was achieved by induction with IPTG (Figure 1C). A protein with an apparent molecular weight of 37.1 kDa, corresponding to the predicted molecular weight of the H_6 -StaR protein (39.3 kDa: 37 kDa + 6 His), was detected and further purified by affinity chromatography. Protein from fraction 10 in Figure 1C was collected and used in subsequent in vitro experiments.

2.2. The Expression Level of StaR Affects Novobiocin Susceptibility

To elucidate the role of StaR in NOV susceptibility, the $\Delta staR P_{Zn} staR$ strain was constructed by introducing an ectopic copy of *staR* under the control of a promoter inducible by zinc (P_{Zn}) in the $\Delta staR$ strain. The growth of this strain was analyzed in the presence of $150 \mu\text{M ZnSO}_4$ as the inducer of *staR* transcription and compared to R6 as control. In addition, the levels of StaR and topoisomerases involved in Sc homeostasis (TopoI and gyrase) were determined by Western blot along the growth curve. Quantification was performed using RpoB as an internal control since no change in its transcription was observed under NOV treatments [7]. While, in the absence of NOV, these strains showed equivalent growth rates both in the absence and in the presence of ZnSO_4 , in the presence of $0.5 \times \text{MIC}$ of NOV, $\Delta staR P_{Zn} staR$ grew slower than R6 (Figure 2A). The doubling times in the absence of ZnSO_4 were $215 \text{ min} \pm 32$ and $94 \text{ min} \pm 10$ for $\Delta staR P_{Zn} staR$ and R6 (average \pm SD, $n = 3$), respectively. In the presence of ZnSO_4 , these differences were similar: $154 \text{ min} \pm 19$ for $\Delta staR P_{Zn} staR$ and $89 \text{ min} \pm 10$ for R6. Growth in the presence of $150 \mu\text{M}$ of ZnSO_4 yielded StaR increases of about 280-fold at all times considered, either in the presence or absence of NOV. However, StaR levels in strain $\Delta staR P_{Zn} staR$ with ZnSO_4 were only about 2-fold higher than those in R6 (Figure 2B,C). Thus, a 2-fold increase in the amount of StaR as well as its absence produced a higher susceptibility to NOV.

Regarding expression levels of topoisomerases, treatment with NOV decreased the level of TopoI about 4-fold at time points 90 and 150 min, and 6-fold at 210 min, in R6 compared to non-treated cells. This was expected considering previous results [7]. Similar decreases were observed in the strain $\Delta staR P_{Zn} staR$, which showed a reduction of about 7-fold in TopoI level in NOV-treated versus non-treated cells at all times tested (90, 150, and 210 min; Figure 2B,C). Therefore, the differences observed in NOV susceptibility between both strains were not associated with a topoisomerase unbalance, but they were due to the distinct levels of StaR as a consequence of its ectopic location. Therefore, appropriate levels of StaR are important for the Sc homeostatic response against the topological stress imposed by sub-inhibitory NOV concentrations [7].

To test whether higher levels of StaR affect cell viability, we used a plasmid cloning approach. We cloned *staR* into pLS1ROM, rendering pLS1ROM*staR*, in which *staR* is under the control of the maltose-inducible P_M promoter. Accordingly, StaR was induced in the presence of maltose independently on NOV treatment (Figure 3B). The growth rate and protein levels of $\Delta staR$ strain containing pLS1ROM*staR* were analyzed upon induction with maltose in the presence or in the absence of NOV. Growth in the presence of 0.4% sucrose + 0.4% maltose (SM) yielded a StaR increase of about 10-fold at 150 and 210 min with respect to sucrose (S)-grown cultures, although no effect on NOV susceptibility

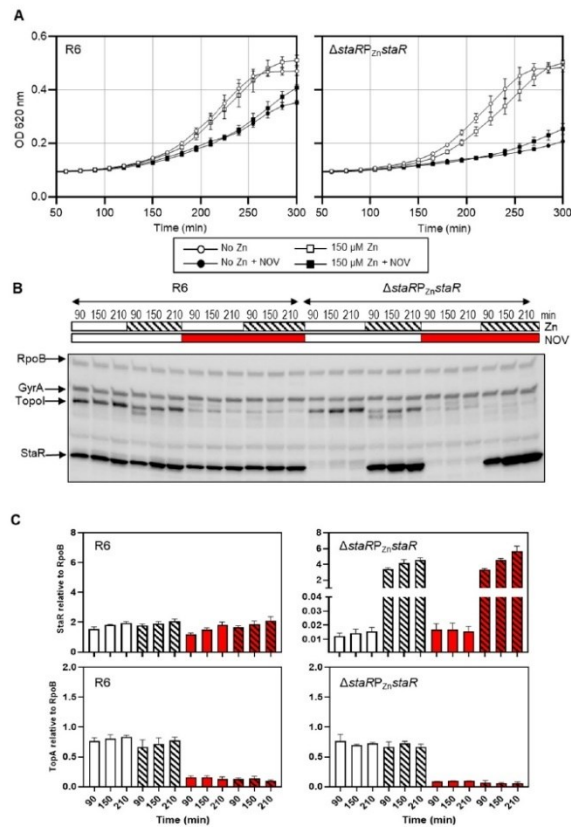


Figure 2. Effect of StaR expression under the control of P_{Zn} promoter. Wild-type R6 and $\Delta staRP_{Zn}staR$ strains were used. Strain $\Delta staRP_{Zn}staR$ carries a deletion of *staR* and a single ectopic copy of *staR* under the control of P_{Zn} promoter. (A) Expression of StaR under the control of P_{Zn} impairs growth under NOV treatment. Strains were grown to $OD_{620\text{ nm}} = 0.3$ in medium without $ZnSO_4$, diluted 200-fold in medium without (empty symbols) or with (black symbols) NOV ($0.5 \times MIC$) together with $150\ \mu M\ ZnSO_4$ (squares) or without $ZnSO_4$ (circles) and cultures were grown in a TECAN Infinite 200 PRO reader. (B) Western blot assays of one of the three replicates using antibodies against GyrA (1:2000), TopoI (1:500), StaR (1:1000) and RpoB (1:2000) as internal control. Samples from the cultures described in (A) were taken at the indicated time points and processed as described in the Materials and Methods section. (C) Levels of StaR and TopoI proteins in the absence (empty bars) or in the presence (striped bars) of $ZnSO_4$, and in the absence (white bars) or in the presence (red bars) of NOV, as quantified from Western blots. Protein levels relative to RpoB are shown. Data presented are the average of three independent replicates \pm SEM.

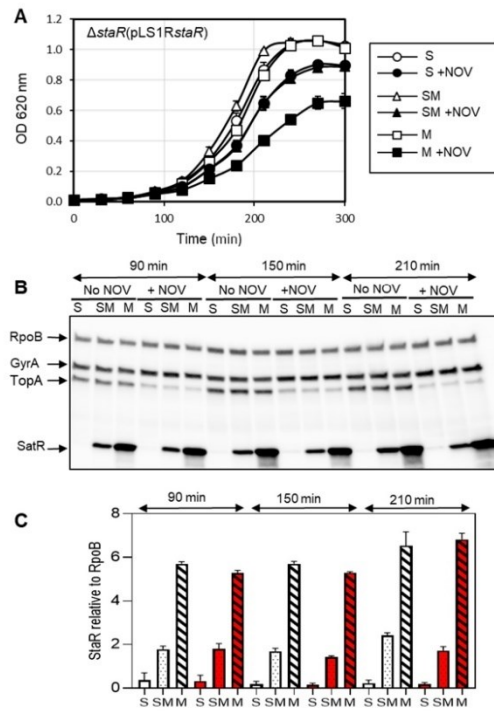


Figure 3. Effect on NOV susceptibility of increasing amounts of StaR. The strain used was $\Delta staR$ transformed with plasmid pLS1R-*staR*, which carries *staR* under the control of the maltose-regulated promoter P_M . (A) Growth curves in the presence of 0.8% sucrose (S), 0.4% sucrose + 0.4% maltose (SM), or 0.8% maltose (M) and in the absence or presence of NOV at $0.5 \times MIC$. The bacterial culture was grown to $OD_{620nm} = 0.3$ in medium with S. Cells were washed and diluted 100-fold in media containing either S, SM or M, in the absence or presence of NOV. (B) Western blot assays of GyrA, TopoI and StaR using antibodies against GyrA (1:2000), TopoI (1:500), StaR (1:1000) and RpoB (1:500) as internal control. Samples were collected at the indicated time points and treated as described in the Material and Methods section. A representative gel of three replicates is shown. (C) StaR levels in cultures grown with S (empty bars), SM (pointed bars), or M (striped bars), and in the absence (white bars) or in the presence (red bars) of NOV, quantified from Western blots. Protein levels relative to RpoB are shown. Data presented are the average of three independent replicates \pm SEM.

These results suggest that StaR has a direct role in resolving DNA relaxation stress and that its levels need to be precisely regulated. In fact, *staR* is located in a DOWN domain in the R6 genome, and its transcription decreases more than 2-fold under NOV treatment [7]. This explains the increased NOV susceptibility observed when *staR* is ectopically located in $\Delta staR P_{Zn} staR$ into a locus (*bgaA*) not located in a supercoiling domain, as well as when it is overproduced in the presence of $ZnSO_4$ or maltose.

2.3. The Supercoiling Level Is Affected by StaR under Novobiocin Treatment

As part of the Sc homeostasis response, a decrease in TopoI is produced after NOV treatment (Figure 3), coincidentally with a decrease in *topA* transcription [7]. The effect of StaR levels in DNA Sc was analyzed by measuring Sc density of pLS1 in $\Delta\text{staRP}_{Zn}\text{staR}$ with or without NOV. We analyzed the topoisomer distribution of the internal plasmid pLS1 by two-dimensional agarose electrophoresis, a suitable approach for studying Sc levels, which is a reflection of nucleoid compaction [7]. This technique allows separation of DNA molecules by mass and shape as an estimation of the chromosomal Sc. As expected, treatment of $\Delta\text{staRP}_{Zn}\text{staR}$ with NOV resulted in DNA relaxation. In the absence of StaR expression (i.e., no ZnSO_4 in the medium), the value of negative DNA Sc density (σ) was -0.056 , and it decreased to -0.051 and -0.049 at $0.5 \times \text{MIC}$ and $1 \times \text{MIC}$ NOV, respectively (Figure 4A). However, under StaR overexpression ($150 \mu\text{M ZnSO}_4$) this variation in σ was higher: from -0.057 to -0.048 and -0.045 at $0.5 \times \text{MIC}$ and $1 \times \text{MIC}$ NOV, respectively (Figure 4B). Therefore, under inhibitory concentrations of NOV, negative Sc density was higher without StaR ($\sigma = -0.049$) than with a 2-fold overproduction of StaR ($\sigma = -0.045$), $p = 0.01$. These results suggest that StaR increases the level of NOV-induced DNA relaxation.

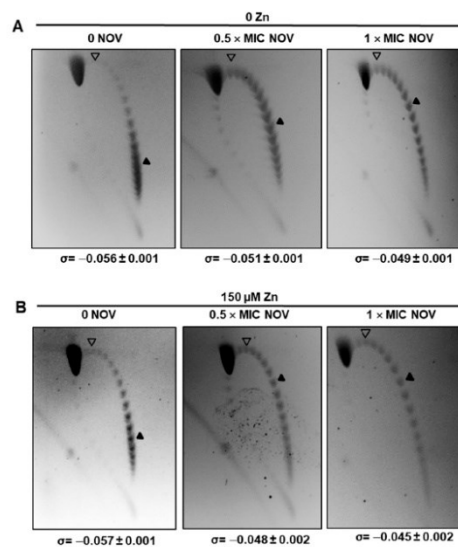


Figure 4. pLS1 topoisomers distribution in strain $\Delta\text{staRP}_{Zn}\text{staR}$ at the indicated ZnSO_4 and NOV concentrations. Cultures were grown to $\text{OD}_{620 \text{ nm}} = 0.2$, diluted 50-fold in medium without ZnSO_4 (A) or with ZnSO_4 (B) and grown to $\text{OD}_{620 \text{ nm}} = 0.4$. The samples taken at this point corresponded to those not treated with NOV. For NOV-treated samples, NOV was added to the cultures for 30 min so that the final concentration of NOV was $0.5 \times \text{MIC}$ or $1 \times \text{MIC NOV}$ and the ZnSO_4 concentration remained constant. Plasmids were extracted and run in 2D-agarose gels in the presence of 1 and 2 $\mu\text{g/mL}$ chloroquine in the first and second dimensions, respectively. Values are the mean of four independent replicates \pm SD. Gels of a typical experiment are shown. Empty arrowheads indicate the topoisomer that migrated with $\Delta Lk = 0$ in the second dimension and has a $\Delta Wr = -14$ during the first dimension (the number of positive supercoils introduced by 2 $\mu\text{g/mL}$ chloroquine). Black arrowheads indicate the most abundant topoisomer.

2.4. StaR Is a Nucleoid-Associated Protein

To investigate the possible association of StaR with the nucleoid, we performed Stimulated Emission Depletion (STED) super-resolution microscopy of the wild-type strain (R6). After fixation, the nucleoids were stained with Sytox orange and StaR was immunofluorescently labeled. A total of 66.2% of cells ($n = 4912$) expressed detectable levels of StaR. In these, co-localization was readily observed, indicating that StaR localizes to the nucleoid (Figure 5A). To confirm co-localization, images of these cells were used to calculate the Pearson's correlation index (Figure 5C). Thresholds corresponding to the average intensity of the green signal of the $\Delta staRP_{Zn} staR$ strain (0.042) and a Pearson correlation index of 0.5 were applied. Under these criteria, StaR co-localized with the nucleoid in 51.5% (1674) of the R6 cells analyzed (Figure 5C). As a control, $\Delta staRP_{Zn} staR$ cells were imaged under the same growth, fixation and staining conditions in the absence of $ZnSO_4$ to image StaR-depleted cells (Figure 5B). Consistently, the distribution of the background green signal detected drastically differed compared to that of R6. The $\Delta staRP_{Zn} staR$ strain showed brilliant green areas without any conserved pattern that could be attributed to nonspecific binding of antibodies, and a low-intensity green signal which could correspond to cellular auto-fluorescence (Figure 5B). Moreover, under the same co-localization criteria that was applied to the wild-type (R6) strain, none of the $\Delta staRP_{Zn} staR$ cells analyzed showed any co-localization (Figure 5C). This further reinforces the co-localization analysis and shows that, like its homolog YejK, StaR associates with the nucleoid and must be considered a new NAP in *S. pneumoniae*.

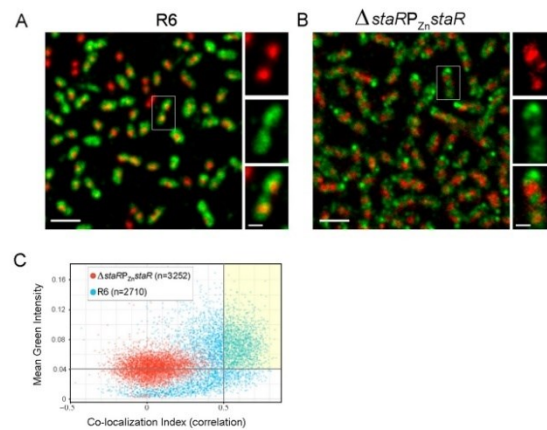


Figure 5. StaR localizes to the nucleoid. Strain R6 and $\Delta staRP_{Zn} staR$ were grown in the absence of $ZnSO_4$ to mid-log phase ($OD_{620\text{ nm}} = 0.4$). Cells were fixed, the nucleoids were stained with Sytox orange and StaR was immunostained using the Abberior Star 488 anti-rabbit secondary antibody as described in the Materials and Methods section. STED microscopy was used to determine the intracellular localization of nucleoids and StaR. (A) General view (left panel) and inset of a representative co-localizing cell of R6, showing nucleoids (red) and StaR labeling (green). Scale bar indicates $2\ \mu\text{m}$ in the general views or $0.5\ \mu\text{m}$ in the insets. (B) General view (left panel) and inset of a representative co-localizing cell of $\Delta staRP_{Zn} staR$, as a control of StaR depletion. (C) Pearson correlation analysis of the strains indicated in (A,B). y -axis represents the mean intensity of green label (StaR) for $\Delta staRP_{Zn} staR$ (red points) and R6 (blue points) and the x -axis indicated the Pearson correlation between green and red (nucleoids) labels. Gray lines in the x - and y -axis correspond to the thresholds applied to calculate the number of cells where StaR co-localizes with the nucleoid. A yellow square highlights the R6 population showing StaR-nucleoid co-localization.

2.5. StaR Specifically Activates *S. pneumoniae* TopoI

In vivo results of Sc variation in the presence or absence of StaR suggest a role of this protein in TopoI activation, since DNA relaxation in the presence of NOV is higher when StaR is overproduced. Alternatively, this protein could further inhibit DNA gyrase leading to the same observations.

The effect of StaR on the enzymatic relaxing activity of TopoI was tested. Results showed that StaR activates the relaxation of pBR322 by TopoI in vitro, depending on the amount of StaR used (Figure 6A). We have quantified the activation of TopoI by measuring both decrease of CCC plasmid form and increase of topoisomers (Figure 6B). Since the gel running conditions do not allow for differentiation between OC and RC, both topoisomers with intermediate linking numbers as well as OC/RC forms were considered for calculating TopoI activity. The results showed the simultaneous decrease of CCC and increase of topoisomers as the StaR concentration increases. The CCC and topoisomers reached 2.5% and 97.5%, respectively, at the highest StaR concentration. Moreover, activation of TopoI by StaR depended on the incubation time (Figure 6C). In contrast, StaR did not show topoisomerase activity by itself at concentrations equal to or higher than those used in TopoI activity assays (Figure 6D). In contrast, no activation of *S. pneumoniae* DNA gyrase activity was observed, since 73% of CCC plus topoisomers was observed at all StaR concentrations tested (from 0.25 to 4 μ M). Although an excess of StaR over TopoI is required for activation, these results suggest that StaR is a specific activator of TopoI.

2.6. Physical Interaction between StaR and TopoI

The specific activation of TopoI by StaR suggested a protein–protein interaction between them. To verify this, in vitro co-immunoprecipitation assays (Co-IP) were carried out with the purified proteins. The two proteins were incubated together and immunoprecipitated using polyclonal antibodies against either TopoI or StaR. The presence of TopoI in the anti-StaR pull-down fraction and the presence of StaR in the anti-TopoI pull-down fraction (Figure 7A) indicated a direct interaction between these proteins in vitro.

We also performed Co-IP in vivo after formaldehyde crosslinking (Figure 7B). We used extracts from cultures of Δ staRP_{Zn}staR grown in either the absence or presence of ZnSO₄, i.e., in the absence or presence of StaR. Western blots showed that StaR-Ab was able to pull down TopoI. Three bands were observed in the Western blot when the StaR-antibody was used in the Co-IP: a band presumably corresponding to TopoI (79 kDa), the band corresponding to StaR (37 kDa) and another band with an apparent molecular weight of 116 kDa, which may correspond to the TopoI-StaR complex. The last band corresponded to 26% of the total amount of the immunoprecipitated StaR. However, no pulldown of StaR by TopoI-Ab was observed, suggesting that the polyclonal antibody against TopoI dissociates the TopoI-StaR complex.

2.7. No Global Changes in Transcriptome Are Induced by the Absence or Presence of StaR

The transcriptome of the strain Δ staRP_{Zn}staR was analyzed either in the absence of StaR (no ZnSO₄ added) or in its presence (150 μ M ZnSO₄). In the presence of the P_{Zn} inductor, 34 differentially expressed genes (DEGs) were detected (Table 1), with the same number of genes (17) up- or down-regulated. As expected, genes known to be regulated by high concentration of ZnSO₄ [7] were found among these DEGs, with seven up-regulated and six down-regulated. Up-regulated genes included the *psaBCA* operon coding a Mn/Zn transporter, *czcD* coding a cation efflux protein, *prtA* coding a virulence factor, and *adhB* involved in carbon metabolism, while *celA* was down-regulated. Consistent with the increased StaR levels detected in Western blots (280-fold increase, Figure 2) upon ZnSO₄ induction, mRNA levels of *staR* also increased about 400-fold.

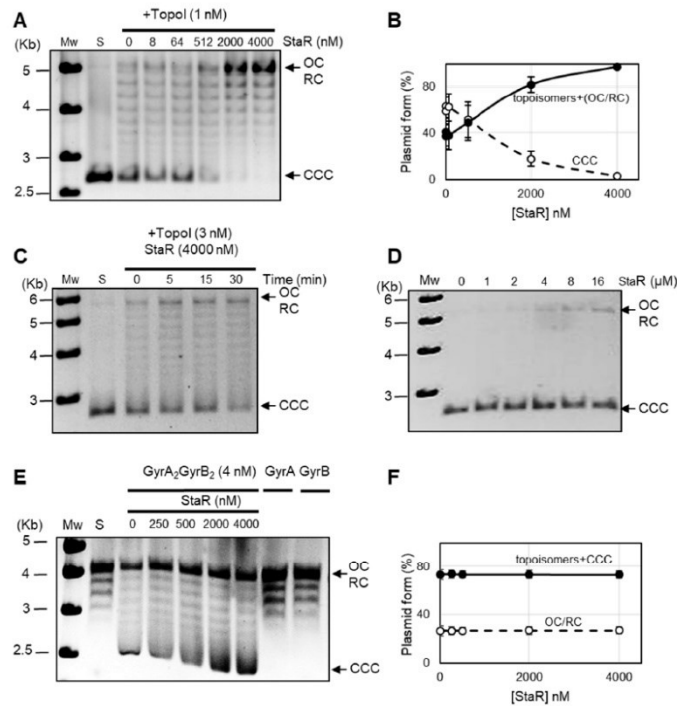


Figure 6. StaR activates the relaxation activity of *S. pneumoniae* TopoI but does not have any effect on gyrase. **(A)** Activation of TopoI as a function of StaR concentration. Plasmid pBR322 was incubated at 37 °C with purified TopoI for 1 h. The indicated StaR concentrations were added simultaneously to the reaction mix. Samples were processed and analyzed as described in the Materials and Methods section. Mw, molecular weight standard (Kb); S, substrate; CCC, covalently closed circles; OC, relaxed open circles; RC, relaxed circular plasmid forms. **(B)** Activity of TopoI determined as increase of the topoisomers (including OC/RC forms) and decrease of CCC form in the presence of StaR. Results are the average \pm SEM of three independent replicates. **(C)** Activation as a function of reaction time. Reactions were carried out as in **(A)**. **(D)** StaR does not have topoisomerase activity by itself. Reactions were carried out as in **(A)**, except that TopoI was not added. Concentrations of StaR are indicated. **(E)** DNA gyrase activity is not affected by StaR. Supercoiling activity over relaxed pBR322 using 4 nM of reconstituted gyrase was assayed in the presence of different StaR concentrations at 37 °C for 1 h. Incubation with GyrA or GyrB alone is included as a control. **(F)** Activity of gyrase determined as percentage of topoisomers +CCC and percentage of OC/RC forms in the presence of StaR. Results are the average \pm SEM of three independent replicates.

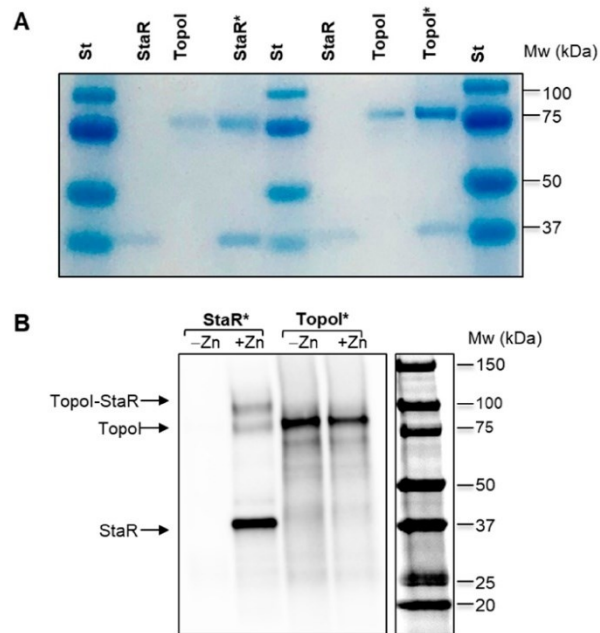


Figure 7. Co-immunoprecipitation of StaR and TopoI. **(A)** In vitro assays. Purified proteins were incubated together in the presence of the antibody against either StaR (StaR*) or TopoI (TopoI*). Samples were treated as described in the Materials and Methods section and run in a 4–20% polyacrylamide gel, which was stained with Coomassie blue. Purified proteins were loaded as controls. **(B)** In vivo assays. Cultures of $\Delta staR_{Zn}/staR$ were grown either in the absence (–Zn) or presence (+Zn) of 150 μM ZnSO_4 to $\text{OD}_{620\text{ nm}} = 0.4$, fixed with formaldehyde and treated as described in the Material and Methods section. The samples were run in a 4–20% polyacrylamide gel and Western blots were performed using antibodies against TopoI (1:500 dilution) and StaR (1:1000 dilution). The expected positions of TopoI and StaR proteins and of the TopoI–StaR complex are indicated.

When the effect of NOV on the transcriptome in the absence of StaR (–Zn) was compared with its effect when StaR was overexpressed (+Zn), no important differences were observed (Figure 8A). A total of 324 (110 up-regulated) and 313 (108 up-regulated) DEGs were detected in the absence or presence of StaR, respectively, with 214 DEGs common to both conditions (Figure 8A). However, a slightly differential response was observed, since about one-third of the DEGs under each condition was specific. In the absence of StaR, NOV triggered the expression of 110 genes (67 down-regulated and 43 up-regulated) that did not change in the presence of StaR. Similarly, when StaR was over-expressed, NOV changed the expression of 99 genes (58 down-regulated and 41 up-regulated) that did not change when *staR* was repressed. A comparison of the functional classes of the DEGs did not present significant differences between both conditions. In addition, no difference in the location of DEGs along the genome was detected in the absence or presence of ZnSO_4 (Figure 8B).

Table 1. DEGs detected in $\Delta staRP_{Zn} staR$ in the presence of $ZnSO_4$ versus in its absence. Cultures were grown to $OD_{620\text{nm}} = 0.2$, diluted 50-fold in medium either without $ZnSO_4$ or with $150 \mu\text{M}$ $ZnSO_4$ and grown to $OD_{620\text{nm}} = 0.4$.

Role o Subrole	Common Name	R6 Locus (Gene) ^a	Relative Fold Variation ^b
Carbohydrate metabolism	Beta-galactosidase	spr0059 (<i>bgaC</i>)	-2.2
Hypothetical proteins		spr0066	3.9
Transport: Carbohydrates	ABCT membrane permease	spr0082	-2.2
Hypothetical proteins		spr0085	-2.0
Carbohydrate metabolism	6-P-beta-glucosidase	spr0276 (<i>celA</i>)	-3.0
Transcription factors	Antiterminator	spr0279 (<i>bglG</i>)	-3.2
Transport: Carbohydrates	PTS sugar-specific EII component	spr0280 (<i>celC</i>)	-2.3
Hypothetical proteins		spr0281	-2.3
Transcription factors	Antiterminator	spr0504	-2.2
Pathogenesis	LPxTG protein	spr0561 (<i>prtA</i>)	2.3
Hypothetical proteins		spr0600	-2.0
Hypothetical proteins		spr0601	-2.1
Hypothetical proteins		spr0929 (<i>staR</i>)	438.1
Transport: antibiotics	ABCT ATP-binding/membrane	spr1289	-2.2
Hypothetical proteins		spr1402	2.3
Transport: cations	ABCT ATP-binding-Mn	spr1492 (<i>psaB</i>)	4.1
Transport: cations	ABCT membrane permease -Mn	spr1493 (<i>psaC</i>)	4.7
Transport: cations	ABCT substrate-binding-Mn	spr1494 (<i>psaA</i>)	4.8
Carbohydrate metabolism	Galactose-1-P uridylyltransferase	spr1667	2.1
Carbohydrate metabolism	Galactokinase	spr1668 (<i>galK</i>)	2.3
Carbohydrate metabolism	Alcohol dehydrogenase	spr1670 (<i>adhB</i>)	73.7
Hypothetical proteins		spr1671	105.3
Transport: cations	Cation diffusion facilitator	spr1672 (<i>czcD</i>)	507.5
Carbohydrate metabolism	Dextran glucosidase	spr1698	-3.2
Hypothetical proteins		spr1940	-2.2
Hypothetical proteins		spr1966	2.6
Transport: other	Glycerol uptake facilitator protein	spr1988 (<i>glpF</i>)	-2.2
Carbohydrate metabolism	Glycerol-3-P dehydrogenase	spr1989	-2.6
Carbohydrate metabolism	Glycerol-3-P dehydrogenase	spr1990	-3.1
Carbohydrate metabolism	Glycerol kinase	spr1991 (<i>glpK</i>)	-2.0
Hypothetical proteins		spr2037	3.1
Hypothetical proteins		spr2038	3.4
Hypothetical proteins		spr2039	3.4
Hypothetical proteins		spr2040	2.0

^a Genes shadowed in gray are those known to be regulated by high $ZnSO_4$. ^b The responsive genes from two replicates included those showing a significant fold change (absolute value ≥ 2) and a p -value-adjusted ≤ 0.01 .

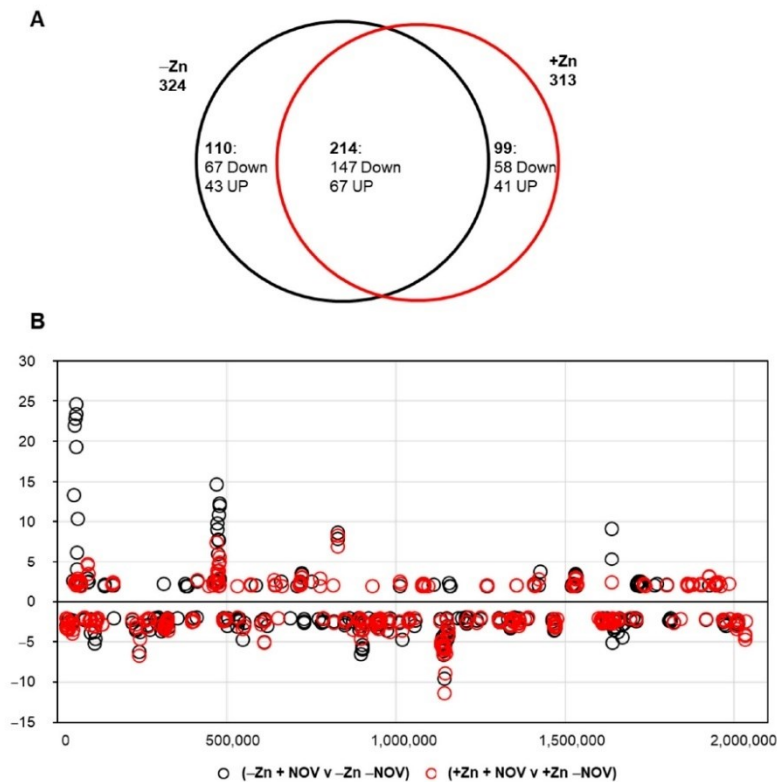


Figure 8. Number and localization of DEGs in the $\Delta staRP_{Zn} staR$ chromosome upon treatment with NOV in the presence or absence of StaR. Cultures were grown to $OD_{620\text{ nm}} = 0.2$, diluted 50-fold in medium either without or with $150\ \mu\text{M}$ ZnSO_4 and grown to $OD_{620\text{ nm}} = 0.4$. Samples taken at this point were considered as non-treated with NOV. NOV-treated samples were grown for another 30 min with $0.5 \times \text{MIC}$ of NOV. Total RNA was isolated and sequenced as described in the Materials and Methods section. (A) Venn diagram showing DEGs upon treatment with NOV in the absence or presence of ZnSO_4 . (B) The relative fold variation of each gene represented against the 5' location of each open reading frame in the *S. pneumoniae* R6 chromosome (bases 1 to 2,038,615). A fold change ≥ 2 (absolute value) and a p -value-adjusted ≤ 0.01 were considered.

These results suggest that the overexpression of StaR does not affect global transcription induced by NOV in a chromosomal-domain manner, and thus discard StaR as a transcriptional regulator.

3. Discussion

The existence of protein networks governing DNA chromosomal topology of pathogens remains an unknown field. Sc levels, nucleoid compaction and viability in *S. pneumoniae* are determined by the balance between gyrase and TopoI activities [7]. This bacterium triggers homeostatic transcriptional responses when Sc density decreases by 25% [8] or

when it increases by 40% [16]. These global responses affect transcription of topoisomerases. Relaxation triggers up-regulation (about 2-fold) of gyrase genes (*gyrA* and *gyrB*) and down-regulation of both TopoI (*topA*, around 10-fold) and TopoIV (*parE* and *parC*, around 3-fold) [7]. When Sc increases, *topA* is again down-regulated (about 2-fold), while *gyrA*, *gyrB*, *parE* and *parC* remain unchanged [16]. In this way, the down-regulation of *topA* transcription, although to different levels, allowed cell growth and the recovery of Sc.

In addition, the transcriptomic response of wild-type strain R6 to DNA relaxation, which is triggered by NOV, also involved down-regulation (about 2-fold) of the gene coding StaR (*spr0929*), which is indeed included in a down-regulated domain [8]. A similar decrease in transcription (around 3-fold) was observed for the gene coding HU, the only NAP described so far in *S. pneumoniae*, which is essential for Sc maintenance [32]. However, the down-regulation of HU and StaR only occurred at inhibitory NOV concentrations. No change in the transcription or amount of StaR (Figure 2) was observed at sub-inhibitory NOV concentrations. Nevertheless, the location of StaR in a down-regulated domain is important for cell survival in the presence of NOV (Figure 1). This location is consistent with the homeostatic response to relaxation, which involves the down-regulation of *topA* [7], and to the decrease of TopoI levels detected in Western blots (Figure 2). Therefore, relaxation triggers down-regulation of both *topA* and *staR*. This would contribute to the recovery of supercoiling levels after relaxation, since the levels of StaR, which would normally activate TopoI, would decrease. Accordingly, the overproduction of StaR observed in $\Delta\text{staR}_{\text{ZnSO}_4}$ upon addition of ZnSO_4 reduces recovery of Sc at inhibitory ($1 \times \text{MIC}$) concentrations of NOV: 21% of Sc variation after 30 min of NOV treatment versus 12.5% without induction (Figure 4). This is presumably due to TopoI activation by StaR. The role of StaR would be the activation of TopoI by protein–protein interaction. Although this activation would hypothetically affect transcription, a global effect was not detected in the RNA-Seq experiments carried out in the present paper at the concentration of NOV used.

S. pneumoniae lacks most of the NAPs characterized in *E. coli*, with the exception of HU [32] and SMC [33]. Using DAPI to stain DNA and immunostaining for NAPs, it has been shown in *E. coli* that HU and other NAPs localize to the nucleoid [38]. We have recently used super-resolution confocal microscopy and staining of the bacterial nucleoid with the DNA intercalant Sytox [9]. This technique allowed us to accurately identify and locate nucleoids and determine their level of compaction [9]. In this study, we took advantage of this technique to demonstrate that StaR indeed localizes in the nucleoid (Figure 5). A statistical analysis performed with more than 2500 cells showed co-localization of StaR and the nucleoid in more than 50% of analyzed bacteria. Although we cannot compare this number with previous reports, given that, to our knowledge, no statistical quantification has been performed previously for any NAP, we consider that a co-localization higher than 50% indeed reflects a true co-localization. It is important to notice that cultures were not synchronous, and the localization of StaR in the nucleoid could depend on the cell cycle phase. This is the first demonstration of a NAP localizing to the nucleoid in *S. pneumoniae*.

Therefore, StaR should be considered a new NAP, which regulates the activity of DNA topoisomerases. Other NAPs regulating topoisomerases have been identified in other bacteria. This is the case of GyrI, which inhibits *E. coli* gyrase [39], GapR from *Caulobacter crescentus* that stimulates gyrase and Topo IV to remove (+) Sc during DNA replication [40], and HU that activates Topo I in *M. tuberculosis* [41]. *E. coli* YejK, homologous to StaR, has been shown to inhibit both gyrase and TopoIV activities [42]. We have not found gyrase activity alteration by StaR, which probably reflects the low sequence identity between YejK and StaR (Figure 1). Activation of Topo IV has not been tested, given that *S. pneumoniae* Sc is mostly controlled by the opposing activities of Topo I and gyrase [7,16]. Regulation of the topoisomerase type I activity has also been observed in eukaryotes. It has been described that TOP1 activity is controlled by the phosphorylated RNAPII to modulate elongation during transcription [43]. In *S. pneumoniae*, TopoI is the main topoisomerase involved in the regulation of supercoiling [7,16] and in transcription [14]; therefore, its activity must be finely regulated.

While co-membership to the same Pfam family does not imply sharing exactly the same properties, we have confirmed that StaR is a NAP and has a similar size to *E. coli* YejK, indicating that NA37 is a proper global name for this protein family. In future studies, the structure–function relationship may add support at residue-level to the observations described here. Unfortunately, no homologous structural templates for modeling are currently available. Numerous attempts to resolve the StaR structure from *S. pneumoniae* and *Enterococcus faecalis* were unsuccessful since crystals showed low-resolution diffraction. In all, evidence indicate NA37 proteins are not prone to experimental structural analyses. In contrast, novel ab initio modeling tools based on artificial intelligence such as AlphaFold achieve unprecedented accuracy [44]. Such homology-free models may help to evaluate critical traits of StaR. These include the co-location of basic residues able to interact with DNA, the domain delineation, and the identification of interacting sides for docking studies.

To summarize, StaR is a new NAP of *S. pneumoniae* and is the first characterized TopoI modulator in this bacterium, playing an important role in the genome-relaxation-triggered homeostasis. Therefore, we propose that StaR is involved in the fine-tuning control of the activity of the essential TopoI, contributing to the homeostatic response to Sc changes.

4. Materials and Methods

4.1. Bacterial Strains, Growth Conditions and Transformation

S. pneumoniae strains were grown as static cultures at 37 °C in a casein hydrolysate-based liquid medium (AGCH) containing 0.2% yeast extract and 0.3% sucrose [45] (C + Y). *E. coli* was grown in LB medium at 37 °C with agitation. A strain with a deletion in *staR* was constructed as described [34]. Transformation of pneumococcal strains was performed as previously reported [45] and selection of transformants was in 1 µg/mL tetracycline, 250 µg/mL kanamycin, 2.5 µg/mL chloramphenicol, or 1 µg/mL erythromycin. Growth was followed by measuring the OD at 620 nm either with a UV-visible spectrophotometer (Evolution 201, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) or in a microplate reader (Infinite F200, Tecan, Männedorf, Switzerland). Both measures correlate linearly by means of the equation $y = 0.2163x + 0.1151$ (y = microplate reader measure, x = spectrophotometer), $R^2 = 0.98$ [32].

4.2. Construction of Strains and Plasmids

To overproduce and purify StaR, a PCR fragment containing its coding gene was amplified from R6 genomic DNA with primers *spr0929_F* (5'-GCGCGCTAGCATGGATATTTATA TTAAGAAAGCC) and *spr0929_R* (5'-GCGCGGATCCTTATTTACTTTGGATATCCTCG) [34]. Restriction enzyme sites are showed underlined in all oligonucleotides. The amplicon was digested with NheI and BamHI and cloned into pET28a cut with the same enzymes. The plasmid was transferred to BL21-CodonPlus (DE3) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) *E. coli* cells. To test the physiological effects of the overexpression of *staR*, a genetic fusion between the P_{Zn} -ribosome binding site and the *staR* coding region was made to render the $\Delta staR P_{Zn} staR$ strain. The *staR* gene was amplified with *spr0929_ScIF* (5'-GCGCGAGCTCATGGATATTTATTAAGAAAGCC) and *spr0929_SIIIR* (5'-GCGCGTTCGACTTATTTACTTTGGATATCCTCG) oligonucleotides using R6 chromosomal DNA as template. The amplicon was digested with SacI and SalI enzymes, targets included in the oligonucleotides, and introduced into pZK plasmid cleaved with the same enzymes to render plasmid pZK_0929. The pZK plasmid contains the upstream region of the *czcD* gene that shows up-regulation in the presence of zinc [46]. A PCR fragment containing the Zn-inducible promoter upstream the *spr0929* ORF was amplified from pZK_0929 with KmR_B1_Rv (5'-CGCGGATCCAGGATCCATCGATACAAATTCC) and pZK_Xb1_Rv (5'-GCGCTCTAGACACCATAAAAAATGAACCTTGG) oligonucleotides. This construction was introduced into the *spr1806* locus of the $\Delta staR$ strain. The *spr1806* gene codes for a surface protein, which in laboratory conditions, is not expressed; subsequently, the deletion mutant shows no relevant differences with respect to the wild-type strain [47]. For that, DNA fragments of ~1 Kb corresponding to the exact flanking regions of *spr1806*

were amplified with oligonucleotides spr1806_ExF (5'-CATAGGTCTCCACATCGAAA) and spr1806_LiURB1 (5'-GCGCCGATCCAACAGCTAGAAAATCTATTCT), for the upstream region, and oligonucleotides spr1806_LiDFXb (5'-GCGCTCTAGATACTGAACCATCTGGGAATG) and spr1806_ExR (5'-TTGCCCGTCAAAATGATTTG) for the downstream region. Amplicons were cut with BamHI and XbaI, respectively, and simultaneously ligated to the fragment containing the Zn-inducible promoter and spr0929 ORF. The ligation fragment was introduced into pre-competent Δ staR cells by natural transformation and transformants were selected with 50 μ g/mL kanamycin. Recombination was checked by PCR.

To test the role of staR overproduction, the gene was cloned into pLS1ROM vector under the control of P_{Mal} promoter, which is controlled by MalR transcriptional repressor that is cloned in pLS1ROM under the control of the constitutive P_{tet} promoter [48]. For this purpose, a PCR fragment containing staR was obtained from R6 chromosome using oligonucleotides 0929HindF (5'-CGCAAGCTTGGAGACTTTATGGATATTTATATTAAGAAAGC) and 0929BamR (5'-GCGGATCCGCAAAAAGGAAGACTGCTAGTACAAG), cut with HindIII and BamHI, and ligated to pLS1ROM cut with the same enzymes. The constructed plasmid pLS1ROMstaR was transformed into Δ staR strain and transformants were selected with 1 μ g/mL erythromycin.

4.3. Cloning, Expression and Purification of Proteins

H₆-StaR was purified by His-affinity chromatography using HiTrap Chelating HP columns (Amersham-Merck, Madrid, Spain) and an AKTA prime system (Amersham Bioscience, Amersham, UK) from *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) cells harboring pET28-StaR. The strain was grown in LB medium containing 50 μ g/mL kanamycin at 37 °C to OD_{600 nm} = 0.6 and staR transcription was induced with 1 mM isopropyl thio- β -D-galactoside (IPTG) for 1 h. The cells were harvested by centrifugation, washed with phosphate-buffered saline (PBS) and suspended in 72 mL of buffer A (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 M NaCl). The cells were sonicated (8 cycles of 20 sec ON/60 sec OFF) and cell extracts were clarified by centrifugation at 100,000 \times g for 1 h at 4 °C. A two-step protein fractionation with ammonium sulfate at 40% pellet and 60% saturation was performed. The pellet from 60% saturation was suspended in 51 mL of buffer A containing 40 mM imidazole and applied to a 5 mL HiTrap column equilibrated buffer A with 40 mM imidazole. Protein elution was achieved with 100 mL of a 100-to-500-mM imidazol gradient in buffer A, and fractions were analyzed by SDS-PAGE. Imidazol was removed from samples by dialysis against 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl, 50% glycerol. Protein concentration was determined with a Qubit 4 fluorimeter using the Qubit[®] Protein Assay Kit (Invitrogen-ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). TopoI, GyrA and GyrB were purified by affinity chromatography in a Ni-NTA (Quiagen, Hilden, Germany) column following manufacturer's instructions as described previously [26].

4.4. Confocal Microscopy

The cells were grown until OD_{620 nm} = 0.4, centrifuged and suspended in PBS to a number of 8×10^9 cells/mL. The cells were fixed with 2% formaldehyde for at least 16 h. For immunofluorescence microscopy, 8×10^7 cells were incubated with 5 μ M SytoxTM Orange Nucleic Acid Stain (Invitrogen) at room temperature for 5 min and extended into a poly-L-lysine coated glass slide. The cells were permeabilized by immersing the slide in methanol at -20 °C for 10 min. The slide was first incubated with 2% BSA, 0.2% Triton X100 in PBS (BSA-PBST), incubated with a rabbit StaR polyclonal antibody at 1/100 dilution in BSA-PBST buffer, washed with PBS and incubated with the anti-rabbit Abberior[®] STAR 488 antibody (Abberior, Göttingen, Germany) at 1/200 dilution. After a wash with PBS, the slides were mounted with ProLongTM Gold Antifade Mountant (Invitrogen) and sealed. Nucleoids and StaR were imaged as previously described [9] in a confocal microscope STELLARIS 8-FALCON/STED (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) with a HC PL APO 100 \times /1.40 NA \times OIL immersion objective. Super resolution images were acquired by Stimulated Emission Depletion (STED) microscopy using 660 nm depletion laser. Analysis

was performed with Cell profiler software v4.2.5, and co-localization-correlation index was calculated for each bacteria with a custom-made routine.

4.5. Western Blot Assays and Antibody Purification

Whole cell lysates ($\sim 5 \times 10^5$ cells) were obtained by centrifugation of 10 mL cultures ($OD_{620\text{ nm}} = 0.4$). They were suspended in 400 μL of sample loading buffer (0.3 M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 50% *v/v* glycerol and 0.05% bromophenol) supplemented with 0.5 M β -mercaptoethanol and incubated for 5 min at 100 $^\circ\text{C}$. Lysates were separated on Any kDTM CriterionTM TGX Stain-FreeTM Protein Gels (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). They were transferred to 0.2 μm PVDF membranes with a Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad) at 25 V, 1 A for 30 min. Membranes were blocked with 5% skim milk in Tris-buffered saline for 2 h and incubated with anti-TopoI and anti-GyrA [16], anti-RpoB [14] and anti-StaR (diluted 1:1000). Rabbit polyclonal antibody against StaR was obtained from Davids Biotechnologie from 0.5 mg of protein extracted from SDS-gel following a 28-day SuperFast immunization protocol. Anti-rabbit IgG-peroxidase Ab (Sigma-Aldrich-Merck, Madrid, Spain) was used as the secondary Ab. SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA) was used to develop the membranes. Signal was detected with a ChemiDocTM MP system (Bio-Rad). Images were analyzed using Image LabTM software (Bio-Rad). Molecular masses of GyrA and TopoI are 92 kDa and 79 kDa, respectively.

4.6. DNA Topoisomerase Assays

Relaxation reactions of pBR322 by TopoI were carried out exactly as described previously [49]. Reactions of 200 μL contained 0.5 μg of CCC pBR322 in 20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 50 μg BSA/mL and TopoI at the indicated concentrations. Incubation with TopoI was at 37 $^\circ\text{C}$ for 1 h and the reaction was terminated by 2 min incubation at 37 $^\circ\text{C}$ with 50 mM EDTA. Then an additional incubation of 1 h at 37 $^\circ\text{C}$ with 1% SDS, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ proteinase K was performed. Reaction products were ethanol precipitated, suspended in electrophoresis loading buffer and analyzed by electrophoresis in 1% agarose gels run at 18 V for 18 h. DNA quantification of agarose gels was done by scanning densitometry after electrophoresis and ethidium bromide staining. Quantification of TopoI activity was calculated by gel densitometry using the Image Lab program (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). To calculate activity, the OC form amount was determined and divided by the total amount of DNA in each well. Enzymatic reactions with gyrase were conducted as described previously [50].

4.7. Co-Immunoprecipitation (Co-IP) Assays

For *in vitro* Co-IP, the buffer used along the experiment was Co-IP buffer (10 mM sodium phosphate pH 7.4, 50 mM NaCl, 0.5% Nonidet P40). Purified TopoI (60 ng/ μL) was dialyzed against the buffer, and StaR (9.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was diluted 1000-fold in the same buffer. A total of 2 μg of TopoI and StaR, respectively, was mixed into 200 μL of buffer for 2 h at 4 $^\circ\text{C}$ with rotation at room temperature. Purified Abs (4 μg) were bound to Dynabeads[®] Protein G for 2 h in the buffer at room temperature with rotation as described by the manufacturer and were added to the protein mix. After incubation, the mix was washed 3 times and it was collected from the magnetic grid with SDS-loading buffer without β -mercaptoethanol. The samples were boiled for 5 min, loaded in a 4–20% SDS-polyacrylamide gel and run for 1 h at 170 v. Gels were stained with Coomassie blue for about 1 h.

For *in vivo* Co-IP, 10 mL of fixing buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 11% (*v/v*) formaldehyde) was added to 100 mL of culture grown to $OD_{620\text{ nm}} = 0.4$ (7×10^9 cells) with or without 150 μM ZnSO_4 . This mix was incubated for 30 min at room temperature. Crosslinking was stopped by adding 10 mL of cold quenching solution (1.25 M glycine in 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.5 mM EGTA, 1 mM EDTA). The mix was transferred to an ice/water bath and rotated for 30 min at 4 $^\circ\text{C}$. Cells were collected by centrifugation at 4 $^\circ\text{C}$ and suspended in 50 mL ice-cold PBS.

Washing was repeated twice. Finally, cells were collected by centrifugation and suspended in 1 mL of lysis buffer (50 mM Hepes-KOH pH 7.5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (*v/v*) Triton X-100, 0.1% (*w/v*) sodium deoxycholate, 1 mM PMSF), which contained 100 µg/mL of RNase A. Cells were sonicated using 25 cycles (30 s on/30 s off) in a Bioruptor[®] Pico sonicator (Diagenode, Ougrée, Belgium). The sonicated suspension was centrifuged at 21,000 × *g* for 10 min at 4 °C. 100 µL of the supernatant was kept at −20 °C as whole cell extract control.

TopoI and StaR antibodies were purified as described previously [14]. The antibodies (10 µg) were bound to 50 µL Dynabeads[®] Protein G. For immunoprecipitation, 500 µL of sonicated suspension (antigens) was added to 200 µL of the magnetic-bead–Ab complex and incubated on a rotating mixer for 4 h at 4 °C. The tube was placed on a magnet and the supernatant was removed. It was washed once with the lysis buffer, once with the lysis buffer containing 500 mM NaCl and once with the lysis buffer containing 250 mM LiCl. The supernatant was removed and proteins bound to Dynabeads were resuspended in 30 µL of the sample loading buffer containing 50 mM glycine. Dynabeads[®] Protein G–antigen was incubated at 65 °C overnight with shaking to elute DNA from the beads and reverse cross-links. Samples were fractionated in SDS/PAGE and proteins were detected by Western blot using TopoI-Ab (1:500 dilution) and StaR-Ab (1:1000 dilution) antibodies.

4.8. Analysis of the Topology of Plasmids

Plasmid DNA topoisomers were analyzed in neutral/neutral two-dimensional agarose gels. The first dimension was run at 1.5 V/cm in a 0.4% agarose (Seakem-Lonza, Basel, Switzerland) gel in 1 × Tris-borate-EDTA (TBE) buffer for 20 h at room temperature. The second dimension was run at 7.5 V/cm in 1% agarose gel in 1 × TBE buffer for 7–9 h at 4 °C. Chloroquine (Sigma-Aldrich-Merck, Madrid, Spain) was added to the TBE buffer in both the agarose and the running buffer. Chloroquine is a DNA intercalating agent that removes negative Sc in bacterial plasmids. Increasing the concentration of chloroquine progressively eliminates negative Sc until the plasmid is relaxed and can then introduce net positive Sc. In this way, the use of adequate concentrations of chloroquine during each dimension in the 2D analysis allows the efficient resolution of the different topoisomers [51]. Chloroquine concentrations used were 1 µg/mL and 2 µg/mL in the first and second dimension, respectively. Gels were stained with 0.5 µg/mL ethidium bromide for 1 h at room temperature. Images were captured in a ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad) and analyzed with the Image Lab software (BioRad). DNA supercoiling density (σ) was calculated from the equation $\sigma = \Delta Lk / Lk_0$. Linking number differences (ΔLk) were determined using the equation $\Delta Lk = Lk - Lk_0$, in which $Lk_0 = N/10.5$, being N the size of the molecule in bp (4408) and 10.5 the number of bp per one complete turn in B-DNA. To simplify it, $\sigma = Lk$ of the most abundant topoisomer / ($N/10.5$). The Lk of the most abundant topoisomer was calculated taking into account that the topoisomer that migrated with $\Delta Lk = 0$ in the second dimension has a $\Delta Wr = -14$ during the first dimension (the number of positive supercoils introduced by 2 µg/mL chloroquine).

4.9. RNA Library Preparation for RNA-Seq

Total RNA (5 µg) obtained from samples containing 2 to 4 × 10⁸ cells with the RNeasy mini kit (Quiagen) was depleted of ribosomal RNA using the Ribo-Zero Magnetic Kit (Bacteria) (Illumina, San Diego, CA, USA). Libraries for RNA sequencing (RNA-Seq) were prepared using the ScriptSeq v2 RNA-Seq system (Illumina). Briefly, 1 µg of RNA samples were chemically fragmented. Using randomly primed cDNA synthesis, cDNAs that were tagged at the 5' end (equivalent to the 3' end of the original RNA) were synthesized. The cDNAs were then tagged at the 3' end using Terminal-Tagging Oligos (TTO). These oligonucleotides randomly annealed to the cDNA and were extended by DNA polymerase. The resulting di-tagged cDNAs were purified with the Ampure bead XP system. The enrichment and barcoding of the purified di-tagged cDNAs were done with 15 cycles of PCR. The library size was determined with a 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent

Technologies). qPCR quantifications were done with a Kapa Library quantification Kit (Kapa Biosystems, Sigma-Aldrich-Merck, Madrid, Spain).

4.10. RNA Seq Data Analysis

Analysis of RNA-Seq data was carried out using the web-based platform Galaxy [14]. The quality of raw sequence data was analyzed with the FASQC tool. Sequencing reads were mapped against the *S. pneumoniae* R6 genome (ASM704v1) using the BWA software package (Galaxy version 0.7.17.4) in simple Illumina mode. The number of reads overlapping each coding gene was obtained using program feature Count. Count tables were used as input in DESeq2 for the analysis of differential expression. A threshold *p*-value-adjusted of 0.01 was considered.

Author Contributions: Conceptualization, A.G.d.I.C., M.A., M.-J.F. and P.H.; methodology, A.A.d.V.J., A.J.M.-G., J.M.T.-V., D.M. and M.-J.F.; software, P.H.; formal analysis, A.G.d.I.C., M.A., M.-J.F. and P.H.; investigation, A.A.d.V.J., J.M.T.-V., M.-J.F., A.J.M.-G., D.M. and M.A.; data curation, P.H.; writing—original draft preparation, A.G.d.I.C.; writing—review and editing, M.A., M.-J.F. and P.H.; supervision, A.G.d.I.C., M.A., M.-J.F. and P.H.; project administration, A.G.d.I.C.; funding acquisition, A.G.d.I.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research and the APC were funded by project PID2021-124738OB-I00 to A.G.d.I.C., financed by MCIN/AEI/10.13039/501100011033/FEDER, UE.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data discussed in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus and are accessible through GEO Series accession number GSE225261 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE225261>).

Acknowledgments: We thank Miguel Hernández-González (The Francis Crick Institute, London, UK) and Michael McConnell (Centro Nacional de Microbiología, ISCIII) for their critical reading and editing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Holmes, V.F.; Cozzarelli, N.R. Closing the ring: Links between SMC proteins and chromosome partitioning, condensation, and supercoiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 1322–1324. [CrossRef] [PubMed]
2. Champoux, J.J. DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 369–413. [CrossRef] [PubMed]
3. Gellert, M.; Mizuuchi, K.; O'Dea, M.H.; Nash, H.A. DNA gyrase: An enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 3872–3876. [CrossRef] [PubMed]
4. Mizuuchi, K.; O'Dea, M.H.; Gellert, M. DNA gyrase: Subunit structure and ATPase activity of the purified enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 5960–5963. [CrossRef]
5. DiNardo, S.; Voelkel, K.A.; Sternglanz, R.; Reynolds, A.; Wright, A. Escherichia coli DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell* **1982**, *31*, 43–51. [CrossRef]
6. Pruss, G.J.; Manes, S.H.; Drlica, K. Escherichia coli DNA topoisomerase I mutants: Increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. *Cell* **1982**, *31*, 35–42. [CrossRef]
7. Ferrándiz, M.-J.; Martín-Galiano, A.J.; Schwartzman, J.B.; de la Campa, A.G. The genome of *Streptococcus pneumoniae* is organized in topology-reacting gene clusters. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 3570–3581. [CrossRef]
8. de la Campa, A.G.; Ferrándiz, M.J.; Martín-Galiano, A.J.; García, M.T.; Tirado-Vélez, J.M. The Transcriptome of *Streptococcus pneumoniae* Induced by Local and Global Changes in Supercoiling. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1447. [CrossRef]
9. García-López, M.; Megias, D.; Ferrándiz, M.-J.; de la Campa, A.G. The balance between gyrase and topoisomerase I activities determines levels of supercoiling, nucleoid compaction, and viability in bacteria. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 1094692. [CrossRef]
10. Wang, X.; Llopis, P.M.; Rudner, D.Z. Organization and segregation of bacterial chromosomes. *Nat. Rev. Genet.* **2013**, *14*, 191–203. [CrossRef]
11. Dorman, C.J. Genome architecture and global gene regulation in bacteria: Making progress towards a unified model? *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 349–355. [CrossRef] [PubMed]

12. Liu, L.F.; Wang, J.C. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 7024–7027. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Cheng, B.; Zhu, C.-X.; Ji, C.; Ahumada, A.; Tse-Dinh, Y.-C. Direct Interaction between Escherichia coli RNA Polymerase and the Zinc Ribbon Domains of DNA Topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 30705–30710. [[CrossRef](#)]
14. Ferrándiz, M.-J.; Hernández, P.; de la Campa, A.G. Genome-wide proximity between RNA polymerase and DNA topoisomerase I supports transcription in Streptococcus pneumoniae. *PLoS Genet.* **2021**, *17*, e1009542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Ahmed, W.; Sala, C.; Hegde, S.R.; Jha, R.K.; Cole, S.T.; Nagaraja, V. Transcription facilitated genome-wide recruitment of topoisomerase I and DNA gyrase. *PLoS Genet.* **2017**, *13*, e1006754. [[CrossRef](#)]
16. Ferrándiz, M.-J.; Martín-Galiano, A.J.; Arnanz, C.; Camacho-Soguero, I.; Tirado-Vélez, J.-M.; de la Campa, A.G. An increase in negative supercoiling in bacteria reveals topology-reacting gene clusters and a homeostatic response mediated by the DNA topoisomerase I gene. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 7292–7303. [[CrossRef](#)]
17. Higgins, N.P.; Yang, X.; Fu, Q.; Roth, J.R. Surveying a supercoil domain by using the gamma delta resolution system in Salmonella typhimurium. *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 2825–2835. [[CrossRef](#)]
18. Sinden, R.R.; Pettijohn, D.E. Chromosomes in living Escherichia coli cells are segregated into domains of supercoiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 224–228. [[CrossRef](#)]
19. Worcel, A.; Burgi, E. On the structure of the folded chromosome of Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* **1972**, *71*, 127–147. [[CrossRef](#)]
20. Martín-Galiano, A.J.; Ferrándiz, M.J.; de la Campa, A.G. Bridging Chromosomal Architecture and Pathophysiology of Streptococcus pneumoniae. *Genome Biol. Evol.* **2017**, *9*, 350–361. [[CrossRef](#)]
21. Ferrándiz, M.-J.; Arnanz, C.; Martín-Galiano, A.J.; Rodríguez-Martín, C.; De La Campa, A.G. Role of Global and Local Topology in the Regulation of Gene Expression in Streptococcus pneumoniae. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e101574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. World Health Organization. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization—WHO position paper. *Wkly. Epidemiol. Rec.* **2007**, *82*, 93–104.
23. Jacobs, M.R.; Felmingham, D.; Appelbaum, P.C.; Gruneberg, R.N.; The Alexander Project Group. The Alexander Project 1998–2000: Susceptibility of pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infection to commonly used antimicrobial agents. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *52*, 229–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Domenech, A.; Tirado-Vélez, J.M.; Fenoll, A.; Ardanuy, C.; Yuste, J.; Liñares, J.; de la Campa, A.G. Fluoroquinolone-Resistant Pneumococci: Dynamics of Serotypes and Clones in Spain in 2012 Compared with Those from 2002 and 2006. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 2393–2399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Ardanuy, C.; de la Campa, A.G.; García, E.; Fenoll, A.; Calatayud, L.; Cercenado, E.; Pérez-Trallero, E.; Bouza, E.; Liñares, J. Spread of Streptococcus pneumoniae Serotype 8-ST63 Multidrug-Resistant Recombinant Clone, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 1848–1856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Balsalobre, L.; Ferrándiz, M.-J.; de Alba, G.; de la Campa, A.G. Nonoptimal DNA Topoisomerases Allow Maintenance of Supercoiling Levels and Improve Fitness of Streptococcus pneumoniae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 1097–1105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Balsalobre, L.; Ferrándiz, M.J.; Liñares, J.; Tubau, F.; de la Campa, A.G. Viridans Group Streptococci Are Donors in Horizontal Transfer of Topoisomerase IV Genes to Streptococcus pneumoniae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 2072–2081. [[CrossRef](#)]
28. de la Campa, A.G.; Ardanuy, C.; Balsalobre, L.; Pérez-Trallero, E.; Marimón, J.M.; Fenoll, A.; Liñares, J. Changes in Fluoroquinolone-Resistant Streptococcus pneumoniae after 7-Valent Conjugate Vaccination, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* **2009**, *15*, 905–911. [[CrossRef](#)]
29. Alvarado, M.; Martín-Galiano, A.J.; Ferrándiz, M.-J.; Zaballos, Á.; De La Campa, A.G. Upregulation of the PatAB Transporter Confers Fluoroquinolone Resistance to Streptococcus pseudopneumoniae. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2074. [[CrossRef](#)]
30. Amblar, M.; Zaballos, Á.; de la Campa, A.G. Role of PatAB Transporter in Efflux of Levofloxacin in Streptococcus pneumoniae. *Antibiotics* **2022**, *11*, 1837. [[CrossRef](#)]
31. Dillon, S.C.; Dorman, C.J. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 185–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ferrándiz, M.-J.; Carreño, D.; Ayora, S.; de la Campa, A. HU of Streptococcus pneumoniae Is Essential for the Preservation of DNA Supercoiling. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 493. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Minnen, A.; Attiech, L.; Thon, M.; Gruber, S.; Jan-Willem Veening, J.-W. SMC is recruited to oriC by ParB and promotes chromosome segregation in Streptococcus pneumoniae. *Mol. Microbiol.* **2011**, *81*, 676–688. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Martín-Galiano, A.J.; Yuste, J.; Cercenado, M.L.; De La Campa, A.G. Inspecting the potential physiological and biomedical value of 44 conserved uncharacterised proteins of Streptococcus pneumoniae. *BMC Genom.* **2014**, *15*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Murphy, L.D.; Rosner, J.L.; Zimmerman, S.B.; Esposito, D. Identification of Two New Proteins in Spermidine Nucleoids Isolated from Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 3842–3844. [[CrossRef](#)]
36. Gellert, M.; Mizuuchi, K.; O’Dea, M.H.; Itoh, T.; Tomizawa, J.-I. Nalidixic acid resistance: A second genetic character involved in DNA gyrase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 4772–4776. [[CrossRef](#)]
37. Pruss, G.J.; Franco, R.J.; Chevalier, S.G.; Manes, S.H.; Drlica, K. Effects of DNA gyrase inhibitors in Escherichia coli topoisomerase I mutants. *J. Bacteriol.* **1986**, *168*, 276–282. [[CrossRef](#)]
38. Azam, T.A.; Hiraga, S.; Ishihama, A. Two types of localization of the DNA-binding proteins within the Escherichia coli nucleoid. *Genes Cells* **2000**, *5*, 613–626. [[CrossRef](#)]

39. Nakanishi, A.; Oshida, T.; Matsushita, T.; Imajoh-Ohmi, S.; Ohnuki, T. Identification of DNA Gyrase Inhibitor (Gyrl) in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 1933–1938. [[CrossRef](#)]
40. Guo, M.S.; Haakonsen, D.L.; Zeng, W.; Schumacher, M.A.; Laub, M.T. A Bacterial Chromosome Structuring Protein Binds Overtwisted DNA to Stimulate Type II Topoisomerases and Enable DNA Replication. *Cell* **2018**, *175*, 583–597.e23. [[CrossRef](#)]
41. Ghosh, S.; Mallick, B.; Nagaraja, V. Direct regulation of topoisomerase activity by a nucleoid-associated protein. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 11156–11165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Lee, C.; Mariani, K.J. Characterization of the Nucleoid-associated Protein YejK. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 31503–31516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Baranello, L.; Wojtowicz, D.; Cui, K.; Devaiah, B.N.; Chung, H.-J.; Chan-Salis, K.Y.; Guha, R.; Wilson, K.; Zhang, X.; Zhang, H.; et al. RNA Polymerase II Regulates Topoisomerase I Activity to Favor Efficient Transcription. *Cell* **2016**, *165*, 357–371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Žídek, A.; Potapenko, A.; et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **2021**, *596*, 583–589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Lacks, S.A.; López, P.; Greenberg, B.; Espinosa, M. Identification and analysis of genes for tetracycline resistance and replication functions in the broad-host-range plasmid pLS1. *J. Mol. Biol.* **1986**, *192*, 753–765. [[CrossRef](#)]
46. Kloosterman, T.G.; Witwicki, R.M.; van der Kooi-Pol, M.M.; Bijlsma, J.J.E.; Kuipers, O.P. Opposite Effects of Mn²⁺ and Zn²⁺ on PsaR-Mediated Expression of the Virulence Genes pcpA, prtA, and psaBCA of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 5382–5393. [[CrossRef](#)]
47. Escolano-Martínez, M.S.; Domenech, A.; Yuste, J.; Cercenado, M.I.; Ardanuy, C.; Liñares, J.; de la Campa, A.G.; Martín-Galiano, A.J. DiiA is a novel dimorphic cell wall protein of *Streptococcus pneumoniae* involved in invasive disease. *J. Infect.* **2016**, *73*, 71–81. [[CrossRef](#)]
48. Ruiz-Masó, J.A.; López-Aguilar, C.; Nieto, C.; Sanz, M.; Burón, P.; Espinosa, M.; del Solar, G. Construction of a plasmid vector based on the pMV158 replicon for cloning and inducible gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *Plasmid* **2012**, *67*, 53–59. [[CrossRef](#)]
49. García, M.T.; Blázquez, M.A.; Ferrandiz, M.-J.; Sanz, M.J.; Silva-Martín, N.; Hermoso, J.; de la Campa, A.G. New Alkaloid Antibiotics That Target the DNA Topoisomerase I of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 6402–6413. [[CrossRef](#)]
50. Fernández-Moreira, E.; Balas, D.; González, I.; DE LA Campa, A.G. Fluoroquinolones Inhibit Preferentially *Streptococcus pneumoniae* DNA Topoisomerase IV Than DNA Gyrase Native Proteins. *Microb. Drug Resist.* **2000**, *6*, 259–267. [[CrossRef](#)]
51. Schwartzman, J.B.; Martínez-Robles, M.-L.; Hernández, P.; Krimer, D.B. Plasmid DNA Topology Assayed by Two-Dimensional Agarose Gel Electrophoresis. In *DNA Electrophoresis; Methods in Molecular Biology; Humana*: Totowa, NJ, USA, 2013; Volume 1054, pp. 121–132. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.