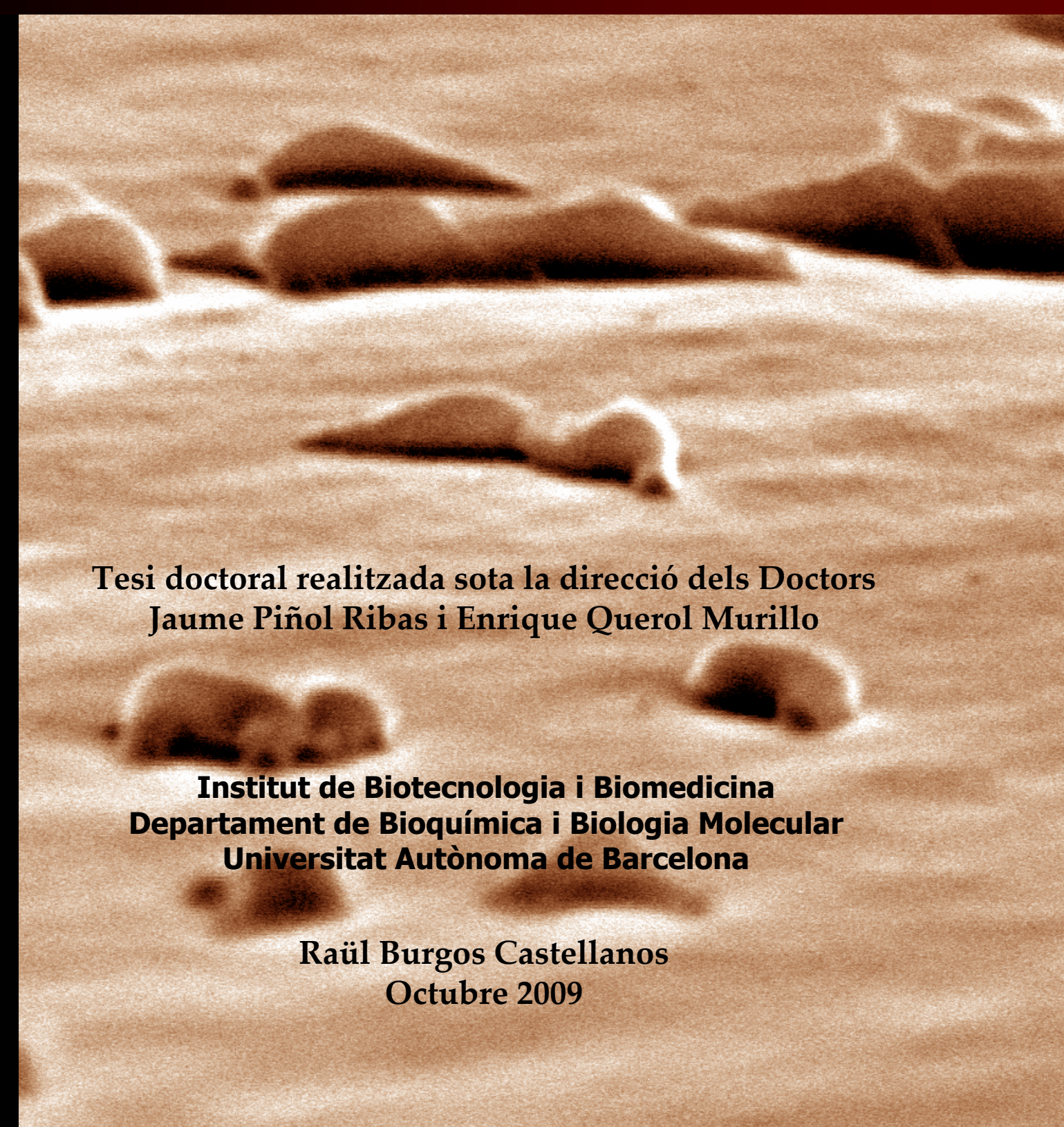


Raül Burgos Castellanos – Paper de les Proteïnes P110, P140, MG312 i MG217 en l'Estructura i Funció de l'Organela Terminal de *Mycoplasma genitalium*

Paper de les Proteïnes P110, P140, MG312 i MG217 en l'Estructura i Funció de l'Organela Terminal de *Mycoplasma genitalium*



Tesi doctoral realitzada sota la direcció dels Doctors
Jaume Piñol Ribas i Enrique Querol Murillo

Institut de Biotecnologia i Biomedicina
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Universitat Autònoma de Barcelona

Raül Burgos Castellanos
Octubre 2009



**Paper de les Proteïnes P110, P140, MG312 i MG217 en
l'Estructura i Funció de l'Organela Terminal de
*Mycoplasma genitalium***

Raül Burgos Castellanos

Octubre 2009

Tesi doctoral presentada per Raül Burgos Castellanos, llicenciat en biologia, per optar al grau de Doctor en Biotecnologia per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Aquest treball ha estat realitzat a l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la Universitat Autònoma de Barcelona sota la direcció dels Doctors Jaume Piñol Ribas i Enrique Querol Murillo.

Dr. Jaume Piñol Ribas

Dr. Enrique Querol Murillo

**A excepció del home,
cap ésser es meravella de la seva pròpia existència.**

(Arthur Schopenhauer)

**Als meus pares i a totes aquelles persones que
m'han ajudat en aquesta empresa.**

PRÒLEG

Mycoplasma genitalium disposa només de 525 gens, convertint-se amb el microorganisme auto-replicatiu amb el genoma més petit descrit fins al moment. Per aquest motiu, molts científics el consideren un model idoni per determinar quin seria el conjunt de gens essencials pel manteniment de la vida. No obstant, *M. genitalium* és també un paràsit i per tant, cal contextualitzar el seu component genètic dins d'un estil de vida molt particular. En aquest sentit, l'anàlisi del seu genoma ha revelat l'existència de gens que codifiquen per proteïnes completament noves i cada cop hi ha més evidències, que existeix una diversificació funcional dels seus gens per compensar la minimització del seu genoma. Davant aquest escenari, *M. genitalium* representa un model extraordinari d'adaptació, i la presència d'una estructura tan especialitzada i complexa com l'organela terminal n'és un clar exemple. L'organela terminal és una estructura única dins la comunitat biològica i juga un paper essencial en la biologia de molts micoplasmes. Una de les seves funcions principals és proporcionar capacitat de desplaçament a les cèl·lules, una habilitat més aviat pròpia d'organismes més complexos. Per comprendre millor l'arquitectura d'aquesta estructura i les seves funcions associades, en aquest treball de tesi s'ha plantejat estudiar algunes de les seves proteïnes integrants. El treball que es presenta a continuació consta de tres capítols independents, però connectats entre si per un mateix fil conductor: l'estructura i funció de l'organela terminal de *M. genitalium*.

TAULA DE CONTINGUTS

ABREVIATURES	1
I. INTRODUCCIÓ GENERAL	3
I.1. INTRODUCCIÓ A LA BIOLOGIA DELS MICOPLASMES.....	5
I.2. <i>Mycoplasma genitalium</i> : CONCEPTE DE GENOMA MÍNIM	6
I.3. <i>Mycoplasma genitalium</i> : UN PATOGEN HUMÀ EMERGENT	8
I.3.1. Manifestacions clíniques	8
I.3.2. Diagnòstic clínic	9
I.3.3. Tractament i naturalesa persistent de les infeccions.....	10
I.4. FACTORS DE VIRULÈNCIA	10
I.4.1. Adhesió i motilitat	11
I.4.2. Efectes citopàtics i toxines.....	12
I.5. PERSISTÈNCIA I EVASIÓ IMMUNITÀRIA.....	13
I.5.1. Invasió i persistència intracel·lular	13
I.5.2. Variabilitat antigènica.....	14
I.6. L'ORGANELA TERMINAL.....	17
I.6.1. Organela terminal i morfologia cel·lular.....	17
I.6.2. Citoesquelet dels micoplasmes i ultraestructura de l'organela terminal.....	18
I.6.3. Arquitectura de l'organela terminal i proteïnes integrants	21
I.7. MUTIFUNCIONALITAT DE L'ORGANELA TERMINAL.....	24
I.7.1. Motilitat dels micoplasmes: “gliding motility”	24
I.7.2. Divisió cel·lular dels micoplasmes	28
I.8. CULTIU I EINES DE MANIPULACIÓ GENÈTICA	31
II. OBJECTIUS	35
III. RESULTATS I DISCUSSIÓ: CAPÍTOL 1	39
INTRODUCCIÓ	41
RESULTATS PART 1	43
III.1. OBTENCIÓ I CARACTERITZACIÓ DE SOQUES DEFECTIVES PEL GEN <i>mg191</i> I <i>mg192</i> A <i>M. genitalium</i>	43
III.1.1. Construcció dels plasmidis p Δ mg191 i p Δ mg192 i assaig de transformació	43

III.1.2. Anàlisi genòmic dels transformants obtinguts amb els plasmidis pΔmg191 i pΔmg192	44
III.1.3. Anàlisi transcripcional del gen <i>mg192</i> en els mutants Δmg191	46
III.1.4. Capacitat d'adhesió dels mutants Δmg191 i Δmg192	47
III.1.5. Anàlisi del perfil proteic dels mutants Δmg191 i Δmg192.....	48
III.1.6. Morfologia cel·lular dels mutants Δmg191 i Δmg192.....	50
DISCUSSIÓ PART 1	53
RESULTATS PART 2	57
III.2. DETERMINACIÓ DE LA BASE GENÈTICA DELS MUTANTS ESPONTANIS CLASSE I I CLASSE II DE <i>M. genitalium</i>	
III.2.1. Assaig de complementació dels mutants de classe I-II	57
III.2.2. Base genètica dels mutants de classe I i classe II	59
III.2.3. Proposta d'un mecanisme regulador de "switch ON↔OFF" de l'adhesió cel·lular de <i>M. genitalium</i>	62
DISCUSSIÓ PART 2	64
IV. RESULTATS I DISCUSSIÓ: CAPÍTOL 2	67
INTRODUCCIÓ	69
RESULTATS	71
IV.1. OBTENCIÓ I CARACTERITZACIÓ D'UNA SOCA DEFECTIVA PEL GEN <i>mg312</i> A <i>M. genitalium</i>	
IV.1.1. Obtenció d'una soca defectiva pel gen <i>mg312</i>	71
IV.1.2. Capacitat d'adhesió i perfil proteic dels mutants Δmg312.....	72
IV.1.3. Morfologia cel·lular dels mutants Δmg312	74
IV.1.4. Anàlisi de la motilitat dels mutants Δmg312.....	74
IV.2. ANÀLISI FUNCIONAL DE DIFERENTS DOMINIS DE LA PROTEÏNA MG312	
IV.2.1. Disseny i obtenció de constructes derivatius del gen <i>mg312</i>	75
IV.2.2. Anàlisi funcional dels diferents constructes derivatius del gen <i>mg312</i> ..	78
IV.2.3. Contribució de diferents dominis de la proteïna MG312 en la motilitat.....	80
IV.2.4. Presència d'un motiu Walker A en el domini N-terminal de la proteïna MG312: implicacions funcionals.....	82
IV.3. ACCESSIBILITAT DE LA PROTEÏNA MG312 A LA SUPERFÍCIE	84
IV.4. EXPRESSIÓ RECOMBINANT I CARACTERITZACIÓ DE LA PROTEÏNA MG312	85
IV.4.1. Expressió recombinant de la proteïna MG312	85
IV.4.2. Estudis estructurals per microscòpia electrònica de transmissió.....	89
DISCUSSIÓ	91

V. RESULTATS I DISCUSSIÓ: CAPÍTOL 3	101
INTRODUCCIÓ	103
RESULTATS	104
V.1. Aïllament de mutants de <i>M. genitalium</i> amb alteracions en el comportament de motilitat	104
V.2. Obtenció d'una soca defectiva pel gen <i>mg217</i>	105
V.3. Caracterització del perfil proteic dels mutants $\Delta mg217$	107
V.4. Anàlisi de les capacitats d'adhesió cel·lular dels mutants $\Delta mg217$	108
V.5. Caracterització del comportament mòbil dels mutants $\Delta mg217$	109
V.6. Caracterització morfològica dels mutants $\Delta mg217$	111
V.7. Localització cel·lular de la proteïna MG217	112
DISCUSSIÓ	115
VI. MATERIAL I MÈTODES	123
VI.1. EQUIP GENERAL UTILITZAT	125
VI.2. VECTORS I SOQUES BACTERIANES	126
VI.2.1. Vectors utilitzats en aquest treball	126
VI.2.2. Soques utilitzades en aquest treball	127
VI.3. MÈTODES MICROBIOLÒGICS	128
VI.3.1. Composició i preparació dels medis de cultius utilitzats en aquest treball	128
VI.3.2. Condicions de cultiu utilitzats en aquest treball	130
VI.3.3. Protocols de transformació bacteriana utilitzats en aquest treball	131
VI.3.4. Aïllament i recuperació de colònies pures	133
VI.4. MÈTODES D'ADN RECOMBINANT I MANIPULACIÓ DEL ADN	134
VI.4.1. Extracció d'ADN plasmídic	134
VI.4.2. Extracció d'ADN genòmic de <i>M. genitalium</i>	134
VI.4.3. Quantificació d'ADN en dissolució	135
VI.4.4. Tractaments enzimàtics	135
VI.4.5. Electroforesis d'ADN en gels d'agarosa	135
VI.4.6. Recuperació de fragments d'ADN a partir de gels d'agarosa	136
VI.4.7. Reacció de PCR (Polimerase chain reaction)	136
VI.4.8. Seqüenciació d'ADN	137
VI.4.9. Marcatge no radioactiu de sondes d'ADN	137
VI.4.10. Transferència de tipus Southern (Southern blot)	138
VI.4.11. Disseny i construcció dels diferents vectors utilitzats en aquest treball	140
VI.5. MÈTODES D'ANÀLISI I MANIPULACIÓ DEL ARN	147
VI.5.1. Extracció d'ARN	147
VI.5.2. RT-PCR (Reverse transcriptase PCR)	147

VI.6. MÈTODES D'ANÀLISI I MANIPULACIÓ DE PROTEÏNES.....	147
VI.6.1. Obtenció d'extractes de proteïnes de <i>M. genitalium</i>	147
VI.6.2. Electroforesi de proteïnes en gels de poliacrilamida amb SDS (SDS-PAGE).....	148
VI.6.3. Tinció amb blau de Coomassie.....	149
VI.6.4. Transferència de tipus Western (Western blot).....	149
VI.6.5. Identificació per espectrometria de masses de proteïnes aïllades a partir d'un gel d'acrilamida.....	151
VI.6.6. Expressió i purificació de la proteïna MG312 a <i>E. coli</i>	152
VI.7. OBTENCIÓ D'ANTICOSSOS MONOCLONALS CONTRA PROTEÏNES DE <i>M. genitalium</i>	153
VI.8. ASSAIG DE PROTEÒLISI LIMITADA DE PROTEÏNES EXPOSADES A MEMBRANA.....	153
VI.9. ANÀLISI DE LA CAPACITAT D'ADHESIÓ DE <i>M. genitalium</i>	154
VI.9.1. Assaig d'hemadsorció.....	154
VI.9.2. Assaig quantitatiu de la capacitat d'adhesió al plàstic.....	155
VI.10. AÏLLAMENT DE MUTANTS AMB ALTERACIONS EN EL COMPORTAMENT DE MOTILITAT.....	156
VI.11. ESTUDIS MICROKINEMATOGRAFICS.....	156
VI.12. MÈTODES D'ANÀLISI PER MICRSOCÒPIA ELECTRÒNICA.....	157
VI.12.1. Microscòpia electrònica de rastreig (SEM).....	157
VI.12.2. Microscòpia electrònica de transmissió (TEM).....	158
VI.12.3. Localització cel·lular de proteïnes per crio-immunomicroscòpia electrònica.....	159
VII. CONCLUSIONS.....	161
VIII. SUMARI.....	165
IX. BIBLIOGRAFIA.....	171

ABREVIATURES

ATCC	american Type Culture Collection
BCIP	5-brom-4-clor-3-idonil-fosfat
pb	parell de bases
cfu	unitat formadora de colònia
dNTP	desoxi-nucleòtid trifosfat
EAGR	enriched in aromatic and glycine residues
EB	electroporation buffer (tampó d'electroporació).
EDTA	etilendiamintetraacètic
g	constat gravitatòria 9,8 m ² /s
h.	hores
HA	hemadsorció
HCCA	àcid α -ciano-4-hidroxicinamínic
HEPES	4-(2-hidroxiètil)-piperazina-1-eta-àcid sulfònic
HMW	high molecular weight
IPTG	β -D-isopropil-tiogalactopiranòsid
kb	kilobase
kDa	kilodàlton
m/z	massa/càrrega
MALDI	matrix assisted laser desorption/ionization
MS	mass spectrometry (espectrometria de masses)
min.	minuts
NBT	4-nitrobluetetrazoli
o/n	overnight (tota la nit)
ORF	open reading frame (marc obert de lectura)
PBS	phosphate buffer saline (tampó fosfat salí)
RBS	ribosome binding site (lloc d'unió al ribosoma)
r.p.m	revolucions per minut
s.	segons
SDS	dodecil sulfat sòdic
SDS-PAGE	electroforesi de proteïnes en gels de poliacrilamida amb SDS
SEM	scanning electron microscopy (microscopi electrònic de rastreig)
SMC	structural maintenance of chromosomes (manteniment estructural dels cromosomes)
SSC	tampó: 3 M clorur sodi, 0,3 M citrat sodi)
subsp.	subespècie
T ^a	temperatura
TE	tampóTris-EDTA
TEM	transmission electron microscopy (microscopi electrònic de transmissió)
TEMED	N, N, N', N'- tetrametiletildiamina
tetM	gen de resistència a tetraciclina
Tris	tris (hidroximetil-amino metà)
WT	wild-type (soca salvatge)
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranòsid

I. INTRODUCCIÓ GENERAL

I.1. INTRODUCCIÓ A LA BIOLOGIA DELS MICOPLASMES

Els membres del gènere *Mycoplasma* constitueixen un grup ampli de microorganismes estretament relacionats amb bacteries Gram-positives, com ara els clostridis o els lactobacils. N' existeixen al voltant de 100 espècies reconegudes i es diferencien filogenèticament d'altres bacteries per l'absència de paret cel·lular. Aquest tret ha permès la seva classificació taxonòmica en la classe *Mollicutes* (*mollis*, suau; *cutis*, pell; en llatí), on també s'inclouen els gèneres *Ureaplasma*, *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroleplasma* i *Phytoplasma*. Els micoplasmes disposen de membranes riques en colesterol i lipoproteïnes. A diferència d'altres bacteries, utilitzen el codó UGA per incorporar l'aminoàcid triptòfan en lloc de codó de final de traducció (Taula 1). Aquesta particularitat dificulta l'expressió heteròloga de proteïnes de micoplasma. Per altra banda, els micoplasmes presenten genomes circulars amb un alt contingut en AT i de mides molt reduïdes, compreses entre els 580 kb de *Mycoplasma genitalium* i els 1358 kb de *Mycoplasma penetrans*. Com a conseqüència d'aquesta austeritat genòmica, els micoplasmes es caracteritzen per una reduïda capacitat biosintètica que es veu reflectida en la seva dependència d'obtenir la majoria de metabolits directament del medi ambient (Pollack *et al.*, 1997). Per aquest motiu, els micoplasmes es troben àmpliament distribuïts en la natura actuant com a paràsits o comensals d'un ampli rang d'hostes on s'inclouen humans, mamífers, rèptils, peixos, artròpodes i plantes. Algunes espècies de micoplasmes estan associades amb malalties humanes, així com amb malalties que afecten a l'àmbit de la ramaderia i l'agricultura i que comporten importants pèrdues econòmiques (Baseman i Tully, 1997).

Taula 1. Característiques distintives dels Mollicutes respecte altres bacteries

Característiques	Mollicutes	Altres bacteries
Paret cel·lular	Absent	Present
Membrana plasmàtica	Colesterol present en la majoria d'espècies	Colesterol absent
Mida del genoma	580-2.220 kb	1.050>10.000 kb
Contingut en G+C dels genomes	23-40 mol%	25-75 mol%
Nº de operons rARN	1 o 2 (3 operons rARN a <i>Mesoplasma lactucae</i>)	1-10
Longitud 5S rARN	104-113 nucleòtids	>114 nucleòtids
Nº de gens tARN	30 (<i>M. capricolum</i>), 33 (<i>M. pneumoniae</i>)	84 (<i>B. subtilis</i>), 86 (<i>E. coli</i>)
Ús del codó UGA	Codifica per triptòfan a <i>Mycoplasma</i> , <i>Ureoplasma</i> , <i>Spiroplasma</i> i <i>Mesoplasma</i>	Codó de stop
RNA polimerasa	Resistent a rifampicina	Sensible a rifampicina

Els micoplasmes també són ben coneguts en l'àmbit científic donat que és freqüent trobar-los com a contaminants dels cultius cel·lulars, a on són relativament difícils de detectar i d'eliminar. S'ha de tenir present que la seva reduïda mida (entre 0,2-0,8 µm de diàmetre) i l'absència de paret cel·lular fa que siguin filtrables per porus de 0,22 µm. En els últims anys els micoplasmes han atret considerablement l'atenció de molts científics, sobretot arrel de l'obtenció de la seqüència completa dels genomes de *M. genitalium* (Fraser *et al.*, 1995) i *Mycoplasma pneumoniae* (Himmelreich *et al.*, 1996). Aquestes dues espècies presenten els genomes més petits descrits fins ara per a organismes auto-replicatius (Taula 2) i estan considerats uns dels millors models experimentals per definir el conjunt mínim de gens essencials per mantenir una vida auto-replicativa (Glass *et al.*, 2006; Hutchison *et al.*, 1999).

Taula 2. Característiques principals de genomes bacterians

Característica	<i>H. influenzae</i>	<i>M. pneumoniae</i>	<i>M. genitalium</i>	<i>E. coli</i>
Nº pb	1.830.137	816.394	580.070	4.639.221
Contingut en G+C dels genomes (mol%)	38	40	32	50
Nº de possibles regions codificant (ORFs)	1.703	677	482	4.288

I.2. *Mycoplasma genitalium*: CONCEPTE DE GENOMA MÍNIM

Un dels aspectes que més ha intrigat els biòlegs moleculars ha estat la idea del concepte de genoma mínim, és a dir, l'estimació del número de gens que són suficients per constituir un organisme amb organització cel·lular. Dit amb altres paraules, identificar quins gens són indispensables per la vida i quins són únicament gens afegits que simplement milloren la competitivitat dels organismes en el seu entorn natural.

Actualment es consideren dues vies complementaries per arribar a tenir una idea aproximada del que es podria considerar un genoma mínim. Una seria la que amb termes anglosaxons es coneix com a "*bottom-up approach*". Aquesta aproximació consisteix en la construcció d'una cèl·lula mínima artificial, per exemple afegint pas a pas gens i components a una "cèl·lula buida" fins que aquesta arribi a poder sobreviure sola. Albert Libchaber és un dels científics que intenta aconseguir aquesta fita considerada èticament polèmica (Cho *et al.*, 1999). Ell i el seu equip han aconseguit un primer pas, creant una vesícula bioreactora consistent en una bicapa lipídica semipermeable que encapsula una solució nutricional consistent fonamentalment de

ribonucleòtids i aminoàcids. Aquests bioreactors permeten la transcripció i traducció de gens plasmídics durant 4 dies (Noireaux i Libchaber, 2004; Noireaux *et al.*, 2005). Relacionats amb aquesta idea, i no gens menys polèmics, hi han els avenços del equip del Dr. Craig Venter, que ha aconseguit construir el primer genoma sintètic de manera artificial (basat en el genoma de *M. genitalium*), posant a l'abast la tecnologia per fabricar un genoma a la carta (Gibson *et al.*, 2008). El seu equip també ha aconseguit trasplantar amb èxit el genoma de *Mycoplasma mycoides* LC en cèl·lules de *Mycoplasma capricolum* (Lartigue *et al.*, 2007), per la qual cosa i aplicant ambdues tecnologies, l'equip del Dr. Venter estaria a un sol pas de poder crear el primer microorganisme artificial.

L'altra aproximació seria la coneguda com a “*top-down approach*” que consisteix en el model invers; arribar a una cèl·lula mínima inactivant successivament diferents gens del genoma d'una bactèria. Per aquesta fi, el Dr. Venter ha utilitzat com a model base el genoma de *M. genitalium*, considerat fins ara amb tan sols 580 kb i 525 gens (482 ORFs i 43 gens codificant rARNs i tARNs), el microorganisme auto-replicatiu amb el genoma més petit (Fraser *et al.*, 1995). El genoma de *M. genitalium* només posseeix un gen involucrat en la síntesis d'aminoàcids i uns pocs gens per la síntesis de precursors de vitamines i àcids nucleics. Tampoc disposa de gens implicats en la síntesis d'àcids grassos o colesterol. El seu genoma també representa el conjunt mínim de gens involucrats en el metabolisme energètic, restringint les seves necessitats a un mode de vida parasitari. Per contrarestar aquestes deficiències metabòliques, el seu genoma conté un gran nombre de transportadors multiespecífics així com diversos gens relacionats amb l'adhesió i antígens variables de superfície. Aquests gens són molt importants, donat que permeten mantenir el parasitisme i evadir el sistema immune. El genoma de *M. genitalium* conserva els gens essencials necessaris per la replicació del ADN, transcripció i traducció, però existeix una important reducció en el nombre de gens de rARN, tARN i factors de transcripció o altres proteïnes reguladores. Una altra paradoxa que revela l'anàlisi dels genomes de *M. genitalium* i *M. pneumoniae* és l'aparent absència d'una seqüència canònica RBS o Shine-Dalgarno en molts dels seus gens així com l'absència d'una caixa -35 en els seus promotors (Pich *et al.*, 2006b; Weiner *et al.*, 2000). Per totes aquestes característiques, *M. genitalium* ha esdevingut per alguns científics un dels millors models per arribar a un coneixement aproximat de quins són

els termes moleculars que governen el funcionament d'una maquinària cel·lular (Razin, 1992). Mitjançant un assaig global de mutagènesi per transposó, el equip del Dr. Venter ha estimat entre 265 i 350, el nombre de gens mínims per sostenir la viabilitat de *M. genitalium* en condicions de creixement de laboratori (Hutchison *et al.*, 1999). No obstant, en el nostre laboratori hem aconseguit obtenir transposons inserits en gens considerats essencials segons el treball de Venter, suggerint que la llista de gens no essencials pot ser incompleta (Lluch-Senar *et al.*, 2007; Pich *et al.*, 2006a; Pich *et al.*, 2006b). A més, cal tenir present que el conjunt mínim de gens essencials no és el mateix que un genoma mínim, ja que gens que són individualment dispensables poden no ser simultàniament dispensables. També existeix la possibilitat, que molts d'aquests gens codifiquin per proteïnes “moonlighting”, capaces de cobrir varies funcions a la vegada. Una de les dades més sorprenents d'aquest treball és que dels 350 gens indispensables, 111 són gens amb funció desconeguda. És desconcertant que una tercera part dels gens indispensables d'un organisme tan simple com *M. genitalium* tinguin encara una funció desconeguda, suggerint que falta molt per descobrir dels mecanismes moleculars que governen la vida. En aquest sentit, l'associació d'aquests gens amb la seva funció seria un dels primers passos per poder arribar a aquest coneixement.

I.3. *Mycoplasma genitalium*: UN PATOGEN HUMÀ EMERGENT

I.3.1. Manifestacions clíniques

Més enllà del seu interès pel seu genoma mínim, *M. genitalium* ha esdevingut un important patogen emergent humà de transmissió sexual (Manhart *et al.*, 2007). *M. genitalium* es va aïllar per primera vegada l'any 1981 (Tully *et al.*, 1981) a partir de mostres clíniques de dos homes amb símptomes d'uretritis no causades per infeccions gonocòciques o clamidials, que són els agents etiològics més comuns d'aquesta malaltia. En les dècades posteriors, més de 20 estudis epidemiològics han mostrat una clara associació entre *M. genitalium* i uretritis en homes (Horner *et al.*, 1993; Jensen, 2004), així també com una clara correlació amb la presència de síndromes que afecten al tracte urinari i reproductor de dones com són cervicitis, endometritis, salpingitis i la malaltia inflamatòria pèlvica (Cohen *et al.*, 2002; Manhart *et al.*, 2003; Simms *et al.*, 2003). En general, aquests tipus de trastorns del tracte genitourinari estan associats amb

múltiples agents etiològics incloent *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Herpes simplex*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum* i *Escherichia coli*. No obstant, estudis epidemiològics realitzats en els últims anys mostren que la prevalença de *M. genitalium* en aquest tipus de trastorns és relativament alta, rivalitzant amb la de *N. gonorrhoeae* i *C. trachomatis* (Gaydos *et al.*, 2009).

Malgrat que *M. genitalium* sol presentar un estricte tropisme per teixits associats al sistema urinari i reproductor, també s'ha trobat associat amb malalties extra-genitourinàries, com són l'artritis, la pneumònia, la fatiga crònica, l'encefalitis i les malalties autoimmunes (Taylor-Robinson *et al.*, 1994). A més, estudis recents indiquen que *M. genitalium* podria facilitar la transmissió del virus HIV-1, ja que dones amb major carga bacteriana presenten també un augment en la carga vírica (Manhart *et al.*, 2008). No obstant, això podria ser un simple reflex de la capacitat oportunista de *M. genitalium* en pacients immuno-deficients.

I.3.2. Diagnòstic clínic

Les infeccions per *M. genitalium* tenen una mortalitat molt reduïda. No obstant, les afectacions del tracte reproductor poden tenir un enorme impacte en la salut de la dona, produint seqüeles importants com la infertilitat. Per aquest motiu, és molt important un bon diagnòstic clínic. Malauradament, la majoria d'infeccions són de caràcter asimptomàtic, circumstància que fa que els pacients ignorin que estan infectats i per tant no busquin tractament. Aquest fet, sumat a que les infeccions són de caràcter crònic, incrementa molt el risc de complicacions més serioses.

Les dificultats d'aïllar i cultivar *M. genitalium* a partir de mostres clíniques ha impedit durant anys relacionar l'organisme amb la malaltia, limitant la possibilitat de fer estudis de patogenicitat. Fins ara, s'han pogut aïllar i cultivar amb èxit menys de 20 soques clíniques (Hamasuna *et al.*, 2007; Jensen *et al.*, 1996), sent la soca G37 la primera d'elles (Tully *et al.*, 1981). El procés d'aïllar axènicament una soca de micoplasma a partir de mostres clíniques és molt laboriós. Primer cal un període de passes en cultius cel·lulars seguit d'un procés lent d'adaptació en medi lliure de cèl·lules. Tot i així, moltes soques no aconsegueixen adaptar-se. Tanmateix, l'inconvenient que té aquest

procediment és que la soca aïllada pot variar significativament de la soca original. Per totes aquestes raons, el desenvolupament d'eines moleculars de tipatge de soques per PCR ha estat un avenç imprescindible. Aquestes eines s'utilitzen avui en dia per al diagnòstic, però també s'apliquen en estudis epidemiològics que pretenen fer un seguiment de la distribució geogràfica i els patrons de transmissió d'aquest microorganisme. De fet, és mitjançant aquests tipus d'estudis que s'ha pogut catalogar *M. genitalium* com a patògen de transmissió sexual (Hjorth *et al.*, 2006). Fins ara, el mètode de tipatge amb un índex de discriminació més elevat és el desenvolupat per Jensen *et al.*, que es basa en polimorfismes en la zona conservada 5' del gen *mg191* (també anomenat *mgbB*) (Jensen *et al.*, 2004). Altres sistemes alternatius es basen en polimorfismes en l'operó d'rARN o bé en variacions en el nombre de repeticions en tàndem que es troben en el gen *mg309* que codifica per una lipoproteïna (Ma i Martin, 2004).

I.3.3. Tractament i naturalesa persistent de les infeccions

Degut a l'absència de paret cel·lular, *M. genitalium* és resistent a penicil·lina o altres antibiòtics beta-lactàmics. Tanmateix, considerant el gran nombre de possibles agents etiològics associats a trastorns genitourinaris, el tractament més efectiu per aquests trastorns és utilitzar antibiòtics d'ampli espectre. Els antibiòtics més eficaços són les tetraciclines, macròlids i quinolones (Jensen, 2004). A pesar del tractament, *M. genitalium* sol produir infeccions cròniques i perseverants, indicant la natura bacteriostàtica de la teràpia. Per exemple, *M. genitalium* ha estat associat a uretritis cròniques amb infeccions recurrents per períodes de dos anys en homes (Hjorth *et al.*, 2006) i de fins a 3 anys en dones (Cohen *et al.*, 2007).

I.4. FACTORS DE VIRULÈNCIA

Com s'ha comentat en l'apartat anterior, *M. genitalium* pot subsistir llargs períodes de temps en l'hoste, fet que reflecteix una gran adaptació per l'estil de vida parasitari. Aquest èxit ve donat per una sèrie de característiques que fan que *M. genitalium*, malgrat ser un microorganisme molt senzill a nivell metabòlic, a la vegada és també un patògen extremadament sofisticat. La seva eficiència com a patògen ve donada per la

presència de mecanismes que li permeten adherir-se i colonitzar les cèl·lules hostes. De la mateixa manera, també disposa de sistemes que li permeten eludir el sistema immunitari. A continuació es presenten els principals factors de virulència descrits en els micoplasmes.

I.4.1. Adhesió i motilitat

L'adhesió dels micoplasmes a cèl·lules hoste es considera un pas primordial per la infecció i posterior colonització dels teixits. *M. genitalium*, així com altres espècies de micoplasma, s'adhereix a les cèl·lules diana mitjançant una estructura coneguda com organela terminal o organela d'anclatge. Aquesta estructura consisteix en una extensió polar de la membrana on es troben agrupades les adhesines que intervenen directament en l'adhesió a la cèl·lula hoste. De moment, dos fets donen suport a la idea de que una proteïna de 140 kDa, coneguda com a P140 (també referida com a mgpB o MG191), és l'adhesina principal de *M. genitalium*. En primer lloc, la P140 presenta una alta reactivitat serològica creuada amb l'adhesina principal de *M. pneumoniae* P1 (Morrison-Plummer *et al.*, 1987). En segon lloc, tots els mutants espontanis deficients en adhesió aïllats fins al moment, no expressen la P140 (Mernaugh *et al.*, 1993). Es desconeix quin és el receptor o receptors cel·lulars d'aquestes adhesines. No obstant, hi ha estudis que indiquen que els residus d'àcid siàlic presents a la superfície cel·lular del hoste podrien actuar com a dianes de reconeixement (Baseman *et al.*, 1982a). L'organela terminal també es responsable del sistema de motilitat de les cèl·lules, contribuint a la colonització i disseminació de la infecció. Estudis recents han revelat que mutants deficients en motilitat de *M. pneumoniae* tenen problemes per colonitzar les cèl·lules NHBE (Jordan *et al.*, 2007). Les NHBE són cèl·lules diferenciades que en cultiu són capaces de produir cilis funcionals i excretar mucines emulant una mucosa (Krunkosky *et al.*, 2007). S'ha suggerit que la dificultat per colonitzar aquestes cèl·lules probablement reflecteixi la necessitat de motilitat activa per traspasar la mucosa i arribar als receptors cel·lulars. Totes aquestes evidències assenyalen per tant, un paper central de l'organela terminal en la patogènesi dels micoplasmes.

Encara que les mucoses representen una barrera física important que protegeix els teixits subjacents, el 90% de les infeccions en humans comencen en una mucosa, ja

sigui genitourinària, respiratòria o gastrointestinal (Alvarez *et al.*, 2003). Per aquest motiu, el sistema immunitari mucosal té una gran importància a l'hora d'evitar l'inici d'un procés infecciós. En el paràgraf anterior, ja hem comentat el paper important que té l'organela terminal per transgredir aquesta barrera. Tanmateix, en els últims anys s'han proposat sistemes complementaris que permeten als micoplasmes unir-se a diferents components d'aquesta mucosa. Per exemple, hi ha estudis que indiquen que *M. genitalium* podria utilitzar la mucosa com un substrat ideal per adherir-se i desplaçar-se (Alvarez *et al.*, 2003). Concretament, aquests estudis mostren que *M. genitalium* pot unir-se directament al principal component de les secrecions mucoses (mucina) via l'enzim gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa. Malgrat que aquesta proteïna té principalment una activitat bioquímica, una part de la mateixa està exposada a la superfície del micoplasma i pot actuar com a receptor de la mucina. De la mateixa manera, estudis realitzats en altres espècies de micoplasma han revelat mecanismes alternatius que permeten l'adhesió a diferents components de la matriu extracel·lular. Per exemple, el factor d'elongació Tu (EF-Tu) i la subunitat E1 β de la piruvat deshidrogenasa de *M. pneumoniae* poden unir fibronectina (Dallo *et al.*, 2002). En el cas de *Mycoplasma gallisepticum*, una proteïna homòloga a les proteïnes OsmC pot actuar com a receptor de l'heparina (Jenkins *et al.*, 2007). És evident, que aquestes habilitats poden contribuir de manera significant a l'èxit colonitzador d'aquests microorganismes. Aquests exemples també posen de manifest la diversitat funcional existent en algunes de les proteïnes dels micoplasmes, circumstància que per altra banda els pot permetre contrarestar la minimització dels seus genomes.

I.4.2. Efectes citopàtics i toxines

Com s'ha comentat, les infeccions provocades per *M. genitalium* són majoritàriament asimptomàtiques. Aquest fet posa de manifest l'adaptació d'aquest microorganisme, a l'hora de mantenir un equilibri entre el seu estil de vida parasitari i respectar al màxim l'hoste que el sosté. No obstant, malgrat aquesta adaptació, en alguns casos *M. genitalium* pot originar lesions en el teixit epitelial. Atès que els micoplasmes no disposen de factors de virulència típics com toxines, citolisines o invasines, es coneix poc sobre la manera com els micoplasmes poden produir aquestes lesions, especialment en les espècies més virulentes.

S'ha suggerit que la simptomatologia derivada de la infecció podria ser conseqüència principalment de la resposta inflamatòria del mateix hoste. No obstant, en els últims anys s'han trobat possibles factors de virulència que podrien donar lloc a efectes citopàtics. Un exemple és el gen *mpn372* de *M. pneumoniae* que codifica per una proteïna amb activitat ADP-ribosiltransferasa. S'ha observat que després d'afegir aquesta proteïna a un cultiu cel·lular es produeix una extensa vacuolització, la qual cosa suggereix que es podria tractar d'una toxina específica de micoplasma (Kannan i Baseman, 2006). Per altra banda, els micoplasmes no disposen d'enzims com la catalasa i la superòxid dismutasa per eliminar compostos procedents del seu metabolisme oxidatiu. Com a conseqüència, s'ha proposat que l'alliberament d'aquests compostos podria causar citotoxicitat en els teixits adjacents (Kannan i Baseman, 2000; Pilo *et al.*, 2005). Malgrat la deficiència d'aquests enzims, les cèl·lules de micoplasma disposen d'altres mecanismes per contrarestar l'estrès oxidatiu, ja sigui endogen o exogen, com seria una resposta inflamatòria per part de l'hoste. En aquest context, s'ha identificat a *M. genitalium* un enzim (MsrA) que redueix residus de metionina de proteïnes oxidades. Concretament, els mutants MsrA⁻ presenten una hipersensibilitat al peròxid d'hidrogen, així com una reducció en la citadherència i supervivència *in vivo*. Aquestes observacions fan pensar que l'enzim MsrA podria tenir també un paper important en la virulència de micoplasma (Dhandayuthapani *et al.*, 2001).

I.5. PERSISTÈNCIA I EVASIÓ IMMUNITÀRIA

Part de l'èxit de *M. genitalium* com a patògen humà deriva dels mecanismes que disposa per eludir les defenses de l'hoste, resistint alhora els tractaments a llarg termini amb antibiòtics. A continuació es descriuen alguns d'aquests mecanismes.

I.5.1. Invasió i persistència intracel·lular

Existeixen evidències que *M. genitalium* té la capacitat d'envair les cèl·lules hoste (Jensen *et al.*, 1994; Mernaugh *et al.*, 1993). Concretament, s'ha observat que quan un micoplasma entra en contacte directe amb una cèl·lula, es forma una depressió amb característiques similars a les invaginacions recobertes per clatrina (Mernaugh *et al.*, 1993). L'organela terminal del micoplasma està sempre en contacte amb la membrana

cel·lular. Per aquest motiu, s'ha suggerit que receptors situats en aquesta estructura podrien ser els desencadenants del procés invasiu (Figura 1). Amb el temps, els micoplasmes penetren a l'interior de la cèl·lula i es distribueixen pel citosol i la regió perinuclear (Baseman *et al.*, 1995). Estudis més recents han demostrat, que alguns micoplasmes poden situar-se fins i tot en la regió nuclear, una localització aparentment sense precedents en altres bacteris (Ueno *et al.*, 2008). Aquesta residència intracel·lular és un entorn ideal per eludir la resposta immune i evitar els tractaments amb antibiòtics. De fet, l'ús d'antibiòtics com la gentamicina pot eliminar temporalment la infecció per micoplasma en un cultiu cel·lular. No obstant, un cop retirat el tractament, la infecció sol reaparèixer (Dallo i Baseman, 2000). Més enllà de la protecció que aporta el nínxol intracel·lular, aquesta persistència també està associada a la capacitat que té el micoplasma de replicar i subsistir en aquest ambient intracel·lular (Dallo i Baseman, 2000). Així donç, totes aquestes observacions fan pensar que una localització intracel·lular pot tenir implicacions importants durant una infecció *in vivo*, contribuint així al caràcter crònic de les infeccions.

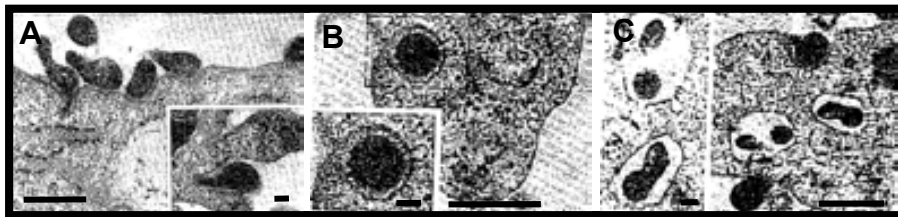


Figura 1. Interacció entre *M. genitalium* i fibroblasts de pulmó després de 2 hores (A) i 12 hores d'incubació (B i C). A partir de les 12 hores post-infecció es comencen a observar micoplasmes internalitzats en vesícules del tipus clatrina. Les barres d'augment grans corresponen a una longitud de 500 nm i les petites de 100 nm. Imatges extretes de Mernaugh *et al.*, 1993.

I.5.2. Variabilitat antigènica

Varies evidències posen de manifest la importància específica dels anticossos en la resposta en front una infecció per micoplasma. En primer lloc, es ben conegut que neutròfils i macròfags busquen constantment signes d'infecció, complementant la protecció que aporta la mucosa epitelial. No obstant, l'acció d'aquesta defensa depèn substancialment de la presència d'anticossos, ja que són els responsables d'opsonitzar els micoplasmes i promoure així la fagocitosis per part dels macròfags (Bredt *et al.*, 1981). En segon lloc, tot i que es desconeix el mecanisme, se sap que els anticossos inhibeixen per si sols el creixement de *M. pneumoniae in vitro* (Taylor-Robinson *et al.*,

1966). Per combatre aquest tipus de resposta, diverses espècies de micoplasma han desenvolupat sofisticats mecanismes de variabilitat antigènica.

En el cas de *M. genitalium*, les proteïnes P140 i P110 es consideren les més immunogèniques (Svenstrup *et al.*, 2006). Com s'ha dit anteriorment, la proteïna P140 sembla ser l'adhesina principal, mentre que la proteïna P110, malgrat ha estat menys estudiada, podria tenir un paper accessori o de suport de la P140. Ambdues són proteïnes integrals de membrana i es troben codificades en l'operó MgPa, que està

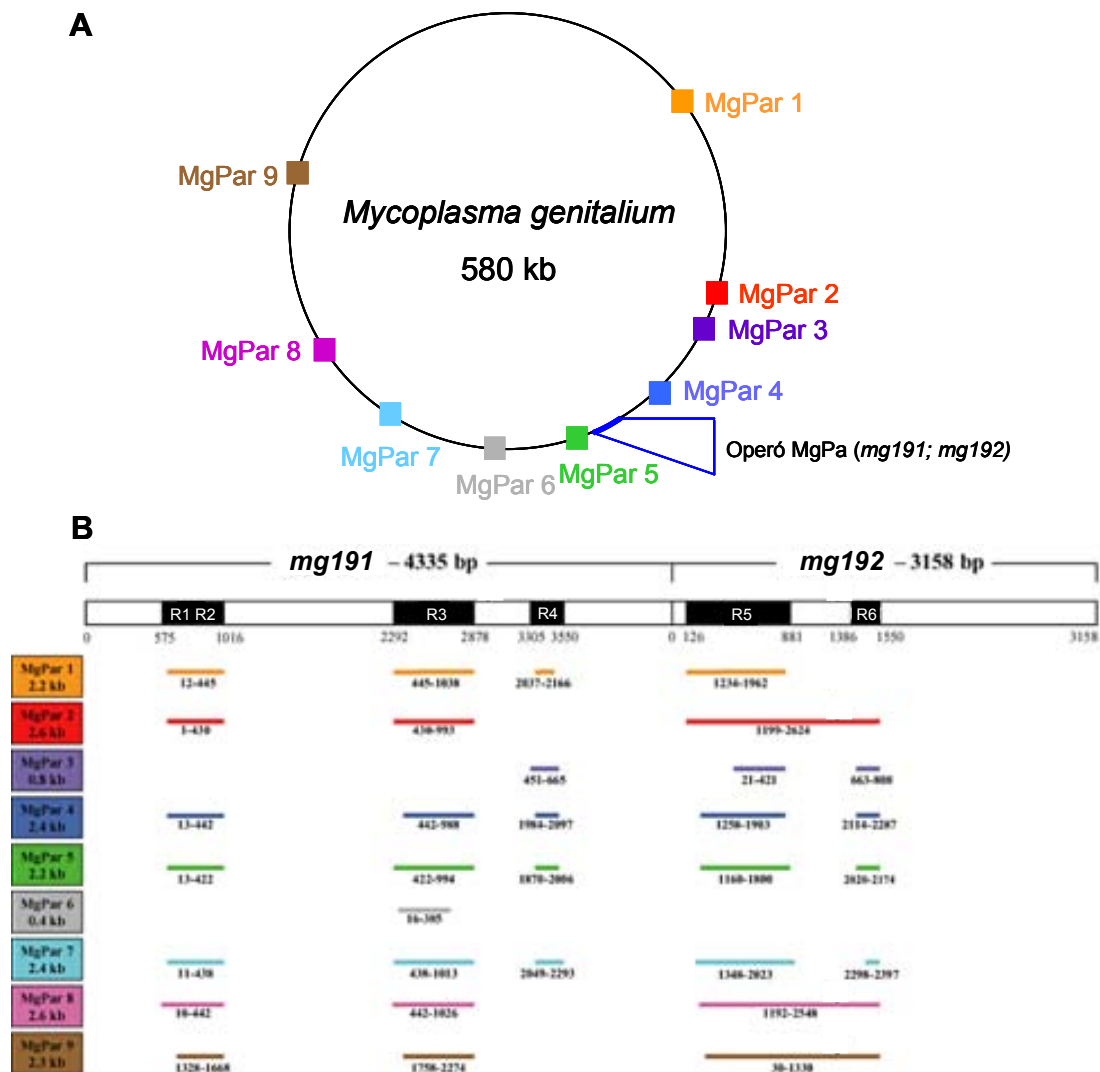


Figura 2. Mecanisme de variabilitat antigènica de *M. genitalium*.

(A). Diagrama il·lustrant la localització del operó MgPa en el genoma de *M. genitalium* i la distribució de les regions homòlogues MgPar.

(B). Esquema mostrant els segments de seqüència homòloga entre els gens *mg191* i *mg192* (caixes R1 a R5) i els diferents MgPar. Les línies colorejades indiquen les regions d'homologia amb l'operó MgPa per cada MgPar i la numeració inferior indica la posició del nucleòtid 5' i 3' on s'observa l'homologia. Notar que els MgPar tenen longituds diferents i tenen una arquitectura diferent respecte la posició de les caixes. Aquest diagrama ha estat extret i modificat d'Iverson-Cabral *et al.*, 2006 i Iverson-Cabral *et al.*, 2007.

constituït per un total de tres gens. En l'extrem 5' de l'operó trobem el gen *mg190* o *mgpA* del qual s'en desconeix la funció. A continuació trobem el gen *mg191* (o *mgpB*) i el gen *mg192* (o *mgpC*) que codifiquen respectivament per les proteïnes P140 i P110 (Musatovova *et al.*, 2003). De manera important, al llarg del genoma hi ha un total de 9 regions no codificants, que contenen fragments de seqüència homòloga als gens *mg191* i *mg192* i que s'arrangen en forma de blocs desordenats (Figura 2). Aquestes regions intergèniques, referides com a *MgPa repeats* o *MgPa islands* mantenen una identitat de seqüència entre el 78-90 % i representen un 4,7 % del total del genoma de *M. genitalium*. Malgrat que aquesta dada pot semblar contradictòria des de la perspectiva d'un genoma mínim, la presència d'aquestes seqüències tenen un paper fonamental. Quan aquestes regions es van detectar per primera vegada l'any 1995, ja es va suggerir que recombinacions entre aquests elements d'ADN repetitiu i l'operó MgPa podrien contribuir a la variació antigènica de les proteïnes P140 i P110 (Peterson *et al.*, 1995). En els últims anys, varis estudis avalen aquesta hipòtesis (Iverson-Cabral *et al.*, 2006; Iverson-Cabral *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2007). Per altra banda, s'ha demostrat que l'intercanvi de seqüències entre l'operó MgPa i els MgPar és en molts casos recíproc, fet que contrasta amb que molts dels mecanismes de variació antigènica descrits fins ara en procariotes són per conversió gènica i, per tant, unidireccionals (Iverson-Cabral *et al.*, 2007). Cal destacar que amb un mateix nombre de seqüències donants, aquest mode de transferència bidireccional pot aportar potencialment un ventall més ampli de variabilitat antigènica.

En altres espècies de micoplasma també s'han descrit mecanismes genètics de variació antigènica i que solen estar associats a lipoproteïnes exposades a la membrana (Taula 3). Entre aquests mecanismes es poden incloure els de "size variation" o "phase variation". El primer correspondria a la variació de la mida de proteïnes immunogèniques mitjançant recombinacions de dominis repetits. El segon mecanisme consisteix en variar l'estat transcripcional i/o traduccional mitjançant ruptures del marc de lectura (frameshifts) o reordenacions de seqüències més grans d'ADN ja siguin per deleccions, inversions, insercions, conversions o duplicacions. Per últim, destacar que el caràcter crònic de les infeccions per micoplasma permet a l'hoste disposar de més temps per adaptar-se i reaccionar d'una manera més efectiva. Per tant, aquest motiu accentua encara més si cap la importància que tenen aquests mecanismes de variació antigènica.

Taula 3. Característiques genètiques dels sistemes de variació d'antígens de superfície en Mollicutes.

Organisme	Sistema de variació	Gens involucrats	Elements involucrats en la variació	Nivell de regulació
<i>M. hyorhinitis</i>	Vlp	Família de gens	Extensió homopolímers, poly(A)	Control transcripcional
<i>M. bovis</i>	Vsp	Família de gens	Transposició ADN	Control transcripcional
<i>M. gallisepticum</i>	pMGA	Família de gens	Repeticions oligonucleòtids (GAA) _n	Control transcripcional
<i>M. pulmonis</i>	Vsa	Família de gens	Inversions ADN	Control transcripcional
<i>M. hominis</i>	Vaa	Còpia única	Extensió homopolímers, poly(A)	Frameshift traducciona
<i>M. fermentans</i>	P78	Part d'un operó	Extensió homopolímers, poly(A)	Frameshift traducciona

I.6. L'ORGANELA TERMINAL

I.6.1. Organela terminal i morfologia cel·lular

Els micoplasmes destaquen en el món bacterià pel fet de no disposar de paret cel·lular. Per una banda, aquesta característica els fa més sensibles als canvis osmòtics i per l'altre, els desproveeix d'un suport estructural afavorint el desenvolupament de morfologies esfèriques o pleomòrfiques. Malgrat l'absència de paret cel·lular, algunes espècies com *M. genitalium* adopten morfologies distintives i polaritzades, tret que els fa especialment interessants. Les imatges de microscòpia electrònica per rastreig (SEM) mostren que aquestes espècies presenten una extensió polar de la membrana que confereix a les cèl·lules una forma de pera (Figura 3). Com hem vist anteriorment, aquesta estructura polar anomenada organela terminal o organela d'anclatge està implicada en molts aspectes de la patogènia dels micoplasmes i és l'objecte principal d'estudi d'aquesta tesi.

L'organela terminal ha estat estudiada quasi exclusivament a *M. pneumoniae*, el principal agent causant de pneumònia atípica en humans (Krause i Balish, 2001). Aquesta espècie dona el nom al cluster filogenètic d'on pertany i on trobem set espècies més on s'inclouen *M. genitalium*, *M. gallisepticum*, *Mycoplasma imitans*, *Mycoplasma amphoriforme*, *Mycoplasma alvi*, *Mycoplasma testudinis* i *Mycoplasma pirum*. Totes 8 espècies, excepte *M. alvi* on no s'ha determinat, es caracteritzen per presentar organela terminal (Hatchel i Balish, 2008). Com s'il·lustra en la figura 3, l'organela terminal es pot dividir en una part proximal enganxada al cos cel·lular referit en aquest treball com a coll i una part més distal consistent en un petit engruiximent referit com a botó terminal. Malgrat l'organela terminal i la morfologia cel·lular és similar entre aquestes espècies, existeixen algunes diferències distintives (Hatchel i Balish, 2008). Un exemple

n'és *M. pneumoniae*, que presenta una morfologia molt més estirada originada per la presència d'un coll molt llarg i una cua filamentosa en la part posterior (Figura 3). Un altre tret diferencial remarcable, seria que l'organela terminal de *M. genitalium* i *M. testudini* està relativament corbada respecte al cos cel·lular (Hatchel i Balish, 2008; Figura 3). Per ara, es desconeix l'origen d'aquestes diferències així com les seves possibles implicacions funcionals.

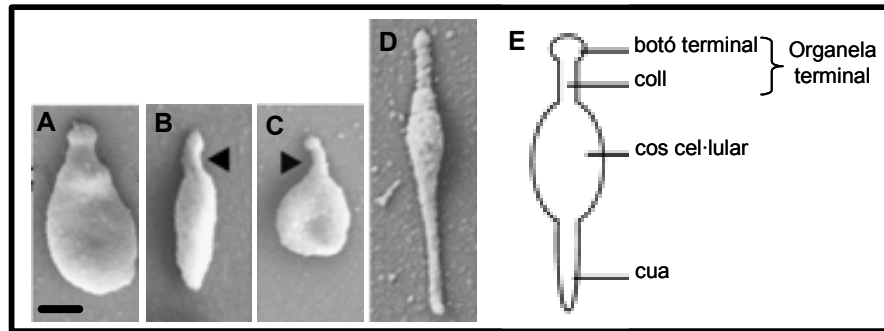


Figura 3. Imatges de microscòpia electrònica de rastreig il·lustrant la morfologia polaritzada d'algunes espècies de micoplasma. Imatges extretes i modificades de Hatchel i Balish, 2008.

(A). *M. gallisepticum* (B). *M. testudinis* (C). *M. genitalium* (D). *M. pneumoniae* (E). Esquema il·lustrant diferents parts distintives de la morfologia cel·lular. Els triangles en B i C mostren la curvatura típica que s'observa en l'organela terminal de *M. testudinis* i *M. genitalium*. La barra correspon a una longitud de 250 nm i totes les fotos tenen el mateix augment.

I.6.2. Citoesquelet dels micoplasmes i ultraestructura de l'organela terminal

Els estudis de *M. pneumoniae* mitjançant microscòpia electrònica de transmissió (TEM) corroboren varis aspectes observats per SEM. Tanmateix, aquestes imatges aporten informació nova, com és la presència al centre de l'organela terminal d'un eix electrodens envoltat d'una àrea electro-lúcida (Biberfeld i Biberfeld, 1970; Figura 4A). Així donç, sembla que l'habilitat per mantenir una morfologia cel·lular polaritzada tot i l'absència d'una estructura rígida com la paret cel·lular, es deu a la presència del què es podria considerar un citoesquelet bacterià. Aquest citoesquelet roman intacte després de tractar les cèl·lules amb el detergent Triton X-100, obtenint-se una estructura complexa de proteïnes coneguda com a fracció insoluble Triton X-100 o "Triton shell" (Meng i Pfister, 1980; Figura 4B). Aquesta fracció insoluble està composta com dèiem, d'un eix proteic d'uns 220 nm de llarg i 50 nm de gruix (tot i que depèn de l'espècie) que suportaria el coll de l'organela terminal (Hatchel i Balish, 2008). S'ha observat també que aquest eix està constituït per dues barres estriades separades per un petit espai i que semblen estar connectades per unes fibres radials a la perifèria de la membrana

(Hegermann *et al.*, 2002). A la part distal d'aquest eix existeix una estructura més gruixuda que constitueix el botó terminal. Per altra banda, la part proximal està unida a un complex format per dos anells de proteïnes en forma de roda que connecten amb unes fibres radials, també ancorades a la membrana. Més enllà de l'esquelet que suporta l'organela terminal, sembla que també existeixen fibres que s'endinsen al citosol, així també com una estructura proteica íntimament associada al voltant de la membrana cel·lular (Figura 4C).

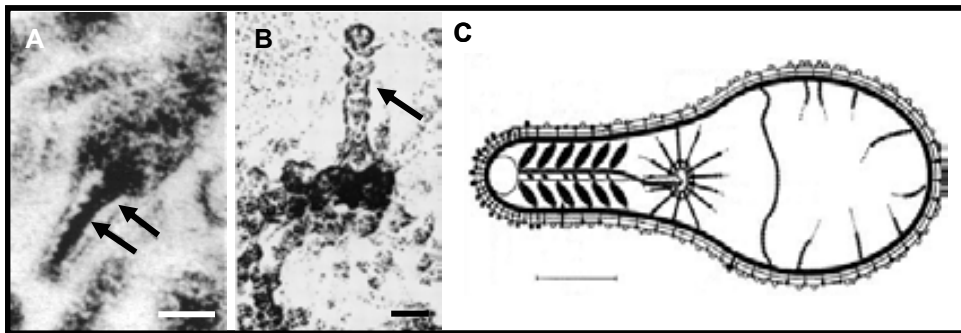


Figura 4. Ultraestructura i citoesquelet de *M. pneumoniae*. Les barres d'augment corresponen a una longitud de 100 nm.

(A). Imatge de microscòpia electrònica de transmissió. Les fletxes mostren el eix electro-dens que suporta l'organela terminal i l'àrea electro-lúcida que l'envolta (Biberfeld i Biberfeld, 1970).

(B). Ultraestructura de l'organela terminal després de l'extracció de la membrana amb Triton X-100 (Meng i Pfister, 1980).

(C). Diagrama d'una secció longitudinal de la cèl·lula representant l'arquitectura del citoesquelet (Hegermann *et al.*, 2002).

Per criotomografia electrònica s'ha pogut fer una reconstrucció tridimensional més detallada de la ultraestructura de l'organela terminal de *M. pneumoniae* (Henderson i Jensen, 2006; Seybert *et al.*, 2006). Sembla que l'esquelet principal està constituït per un mínim d'onze estructures proteiques diferents, la qual cosa dóna una idea de la seva gran complexitat (Figura 5). Actualment, un repte important dels micoplasmòlegs moleculars és identificar les proteïnes que constitueixen cadascun d'aquests elements així com entendre el paper d'aquest citoesquelet en processos tant importants com són la motilitat i la divisió cel·lular. En un primer esforç dirigit per identificar les proteïnes integrants d'aquest citoesquelet, Regula *et al.*, van analitzar la fracció insoluble Triton X-100 de *M. pneumoniae* mitjançant tècniques de proteòmica com l'electroforesis bi-dimensional i espectrometria de masses (MS) (Regula *et al.*, 2001). Arrel d'aquests anàlisis es van poder identificar un total de 100 spots dels quals només 41 van poder ser

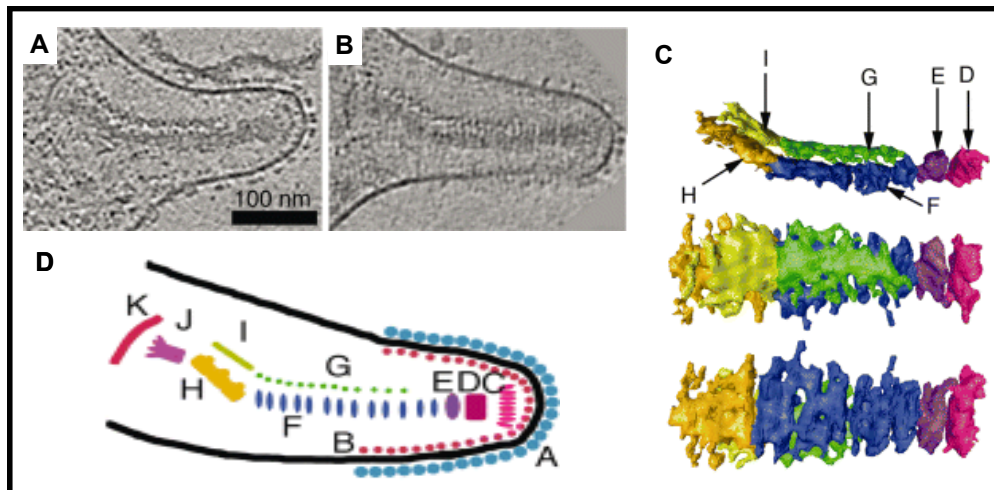


Figura 5. Arquitectura de l'organela terminal de *M. pneumoniae* (Henderson i Jensen, 2006).

(A i B). Imatges detallades de l'organela terminal de *M. pneumoniae* per criotomografia electrònica.

(C). Reconstrucció tridimensional de l'eix electro-dens de l'organela terminal des de diferents punts de vista (vista lateral, superior i inferior).

(D). Representació esquemàtica de les 11 estructures proteiques que componen l'organela terminal segons imatges de criotomografia electrònica.

identificats per MS. Es de destacar que moltes de les proteïnes identificades estan implicades en el metabolisme, com les subunitats α i β de la piruvat deshidrogenasa. També s'han identificat proteïnes relacionades amb transcripció i traducció, com el factor d'elongació Tu; en resposta a l'estrès com la DnaK; relacionades amb divisió cel·lular com el FtsZ i també proteïnes sense cap funció assignada. Entre aquestes ultimes destaquen les proteïnes HMW1, HMW2, HMW3, P65, P40, P90, P1 i P200, totes elles proteïnes exclusives de micoplasma i amb un paper fonamental en el desenvolupament de l'organela terminal com es veurà més endavant. És interessant destacar, que la DnaK és estructuralment homòloga a l'actina (Flaherty *et al.*, 1991) i que l'EF-Tu té la capacitat per formar filaments *in vitro* (Beck *et al.*, 1978). Per tant, més enllà de les seves funcions habituals, aquestes observacions suggereixen que ambdues proteïnes podrien també ser constituents del citoesquelet.

Recentment s'han publicat estudis que defineixen el citoesquelet d'altres espècies de micoplasma diferents a *M. pneumoniae*, com seria *M. gallisepticum* i *M. mobile* (Nakane i Miyata, 2007, 2009). *M. gallisepticum* és un patogen aviar que també presenta organela terminal, encara que en aquest micoplasma rep el nom de "bleb".

Malgrat que el citoesquelet que suporta aquesta estructura és similar al d'*M. pneumoniae*, es poden observar varies diferències morfològiques (Figura 6A-C). En el cas de *M. mobile*, un patògen de peixos, trobem una petita prolongació de la membrana referida com a “head-like structure” suportada per un citoesquelet amb una estructura completament diferent. Aquest citoesquelet està caracteritzat per una malla proteica en forma de medusa que s'estén per tot el cos (Figura 6D-G).

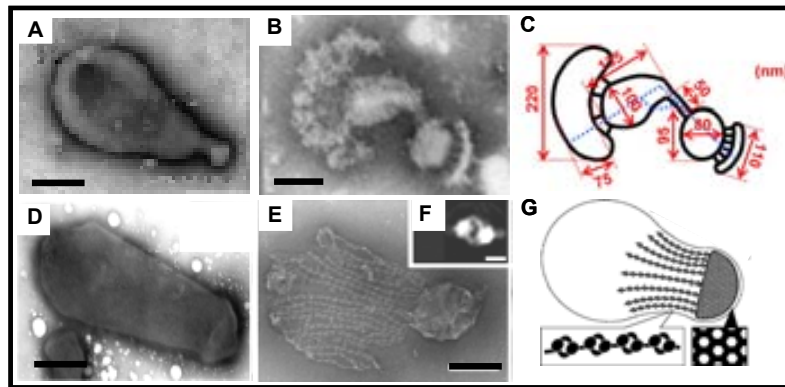


Figura 6. Morfologia i citoesquelet de *M. gallisepticum* (A, B i C) i *M. mobile* (D, E, F i G). Aquestes imatges han estat extretes i modificades de Nakane i Miyata, 2007, 2009.

(A i D). Imatges de microscòpia electrònica de transmissió amb tinció negativa de cèl·lules intactes. La barra d'augment correspon a 300 i 200 nm, respectivament.

(B i E). Imatges de microscòpia electrònica de transmissió amb tinció negativa de cèl·lules tractades amb Triton X-100, il·lustrant el citoesquelet subjacent. La barra d'augment correspon a 300 i 200 nm, respectivament.

(F). Imatge reconstruïda mostrant en detall l'arquitectura dels filaments en forma de tentacles. La barra d'augment correspon a 10 nm.

(C i G). Representació esquemàtica dels components que integren el citoesquelet de *M. gallisepticum* i *M. mobile*, respectivament.

I.6.3. Arquitectura de l'organela terminal i proteïnes integrants

L'aïllament i caracterització de mutants de *M. pneumoniae* deficients en adhesió ha permès la identificació d'algunes de les proteïnes que formen part de l'organela terminal (Baseman *et al.*, 1982b; Krause *et al.*, 1982; Reddy *et al.*, 1996). Entre les proteïnes identificades trobem adhesines específiques involucrades directament en l'adhesió cel·lular com són les proteïnes de membrana P1 i P30. Per altra banda s'han aïllat també una sèrie de mutants deficients en adhesió cel·lular caracteritzats per la pèrdua de proteïnes d'alt pes molecular. Tradicionalment, aquestes proteïnes s'han anomenat HMW1, HMW2 i HMW3 de l'acrònim en anglès de “high molecular weight” i són realment interessants per ser proteïnes úniques de micoplasma. Aquestes proteïnes no

guarden homologia amb cap tipus de proteïna present en les bases de dades i són components claus del citoesquelet de *M. pneumoniae* (Proft i Herrmann, 1994). Malgrat que no tenen un paper directe en l'adhesió, la seva presència és essencial per mantenir la integritat de l'esquelet que suporta l'òrganela terminal (Krause i Balish, 2004). De la mateixa manera, el complex format per les proteïnes P90 (B) i P40 (C) és essencial per mantenir la proteïna P1 associada a la fracció insoluble Triton X-100 (Layh-Schmitt i Harkenthal, 1999). Tradicionalment, aquestes proteïnes s'han anomenat en conjunt proteïnes accessòries d'adhesió cel·lular. Més recentment, l'aïllament de mutants deficients en motilitat també ha permès la identificació de noves proteïnes integrants de l'òrganela terminal, com serien la P24, P41, P200 i MPN119 (Cloward i Krause, 2009; Hasselbring i Krause, 2007a; Jordan *et al.*, 2007). Cal destacar que aquestes proteïnes estan majoritàriament conservades a *M. genitalium* (Figura 7A) i en menor grau a *M. gallisepticum*. Pel que fa a la resta d'espècies del cluster *pneumoniae*, es desconeix si presenten proteïnes ortòlogues als components de l'òrganela terminal de *M. pneumoniae* i *M. genitalium*.

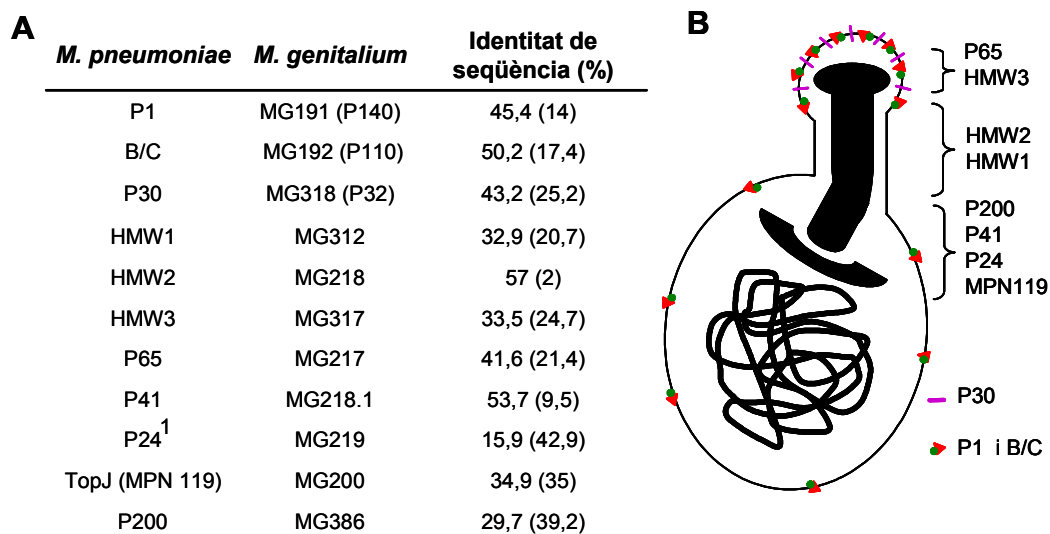


Figura 7. Proteïnes integrants de l'òrganela terminal de *M. pneumoniae* i *M. genitalium*.

(A). Conjunt de proteïnes identificades fins al moment que componen l'òrganela terminal de *M. pneumoniae* i les proteïnes homòlogues identificades a *M. genitalium*. La identitat de seqüència entre les proteïnes ortòlogues s'ha calculat en base alineaments realitzats amb el algorisme EMBOSS (EMBL-EBI). Entre parèntesi s'indica el % de gaps obtinguts en els alineaments. (1). Malgrat que en base alineaments, les proteïnes P24 i MG219 no es poden considerar homòlogues, es creu que podrien ser funcionalment similars donat que el gens codificants comparteixen la mateixa localització en l'operó P65.

(B). Localització aproximada de les diferents proteïnes en l'òrganela terminal en base estudis realitzats a *M. pneumoniae* (Cloward i Krause, 2009; Jordan *et al.*, 2007; Kenri *et al.*, 2004; Seto i Miyata, 2003).

Com dèiem, uns dels reptes de la biologia molecular dels micoplasmes és assignar quina proteïna constitueix cada un dels components de l'organela terminal (Figura 5). Mitjançant fusions a proteïnes fluorescentes i tècniques d'immunofluorescència s'ha confirmat que totes les proteïnes identificades co-localitzen a l'organela terminal (Figura 7B). Malauradament, el límit de resolució del microscopi òptic i la petita mida d'aquests microorganismes, impedeix una ubicació més concreta. No obstant, es creu que l'HMW1 i l'HMW2 formen part del coll de l'organela terminal i són probablement, els constituents principals del eix electro-dens (Balish *et al.*, 2003b; Kenri *et al.*, 2004; Seto i Miyata, 2003). Per altra banda, la proteïna HMW3 es troba en una posició més distal (Seto i Miyata, 2003; Stevens i Krause, 1992). Concretament, estudis realitzats pel nostre grup indiquen que la proteïna homòloga a *M. genitalium* (MG317) podria ser el constituent principal del botó terminal (Pich *et al.*, 2008). Pel que fa a les proteïnes P65 i P30, semblen colocalitzar en la zona més distal de l'organela terminal (Seto i Miyata, 2003) mentre que les proteïnes P24, P41, P200 i MPN119 localitzarien en la part més proximal (Cloward i Krause, 2009; Jordan *et al.*, 2007; Kenri *et al.*, 2004). Per últim, les proteïnes P1, P90 i P40 es localitzen al llarg de l'organela terminal, malgrat que una porció de la P1 també es troba distribuïda per tota la superfície cel·lular (Baseman *et al.*, 1982b). Cal destacar, que P1, P90, P40 i P30 són proteïnes exposades en la superfície cel·lular mentre que les proteïnes HMW1 i P65 s'han detectat tant en la superfície com en l'interior de *M. pneumoniae* (Krause i Balish, 2004).

Un fenomen interessant que reflecteix la gran complexitat d'interaccions existents en l'organela terminal, és el fet que la pèrdua d'algunes d'aquestes proteïnes afecta a l'estabilitat i localització d'altres components de l'organela terminal. L'exemple més clar és el paper central que té la proteïna HMW2 en l'estabilitat d'aquesta estructura. La seva absència comporta una reducció en els nivells d'HMW1, HMW3, P65 i P30 (Dallo *et al.*, 1996; Fisseha *et al.*, 1999; Krause *et al.*, 1982). Tanmateix, en alguns casos s'ha demostrat que aquesta reducció té un origen postraduccional (Popham *et al.*, 1997), suggerint que totes aquelles proteïnes que no es poden incorporar al citoesquelet són prematurament degradades. Globalment aquestes observacions indiquen una interdependència entre les proteïnes associades a l'organela terminal i suggereixen l'existència d'un encaix seqüencial i jeràrquic dels seus components (Krause i Balish, 2004). En aquest sentit, la comprensió del procés de desenvolupament d'aquesta

estructura passa per determinar l'ordre en el qual s'incorpora cada proteïna a nivell individual. Per acabar, afegir que les proteïnes identificades fins al moment es troben codificades majoritàriament en operons tal com s'il·lustra en la figura 8. Molts dels gens que trobem en aquests operons no han estat examinats en detall. Per tant l'aïllament i caracterització de mutants per aquestes gens, potser permetrà identificar nous components de l'organela terminal.

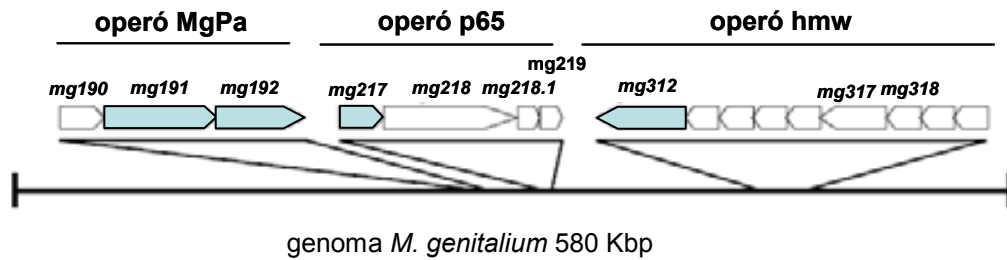


Figura 8. Representació esquemàtica de l'organització en operons de gens relacionats en adhesió i desenvolupament de l'organela terminal de *M. genitalium*. En blau estan marcats els gens que codifiquen per les proteïnes que s'han estudiat en aquesta tesi.

I.7. MUTIFUNCIONALITAT DE L'ORGANELA TERMINAL

Part de l'interès que desperta l'organela terminal ve donat per la seva elevada complexitat, que contrasta amb la limitació genòmica que caracteritza als micoplasmes. És evident que els micoplasmes han preferit preservar tot un seguit de gens especialitats, en detriment de gens relacionats per exemple en metabolisme o regulació. Només quan tenim present la vida parasitària que els caracteritza i les importants funcions que realitza l'organela terminal, entenem la raó per la qual varies espècies de micoplasma han optat per aquesta via. L'organela terminal té un paper essencial en l'adhesió i motilitat, i cada cop hi ha més evidències que relacionen aquesta estructura amb un paper fonamental en la divisió cel·lular. En aquest context, tot seguit es fa un repàs dels mecanismes de motilitat i divisió cel·lular dels micoplasmes.

I.7.1. Motilitat dels micoplasmes: “gliding motility”

En el món microbià trobem múltiples formes de moviment (Jarrell i McBride, 2008). Un exemple és el sistema flagel·lar, el qual està molt estès entre els procariotes i permet un desplaçament òptim en un medi líquid. Altres espècies han desenvolupat altres tipus

d'estratègies per desplaçar-se en ambients caracteritzats per la presència d'una interfase líquid/sòlid o aire/sòlid com podria ser un epitelí. Per exemple, hi ha espècies que utilitzen nombrosos flagels en un sistema anomenat "swarming motility" (Harshey, 1994), mentre que d'altres utilitzen estructures conegudes com a pilis, com és el cas de *N. gonorrhoeae* i *Pseudomonas aeruginosa* (Henrichsen, 1983). No obstant, el sistema de motilitat probablement més enigmàtic és aquell que es coneix com a "gliding motility" (motilitat per lliscament). Aquest tipus de moviment es troba en diversos grups bacterians, incloent algunes espècies de micoplasmes, i es caracteritza per un desplaçament suau sobre superfícies sòlides sense l'ajuda de flagels o estructures similars. Aquest sistema de moviment no és únic i s'han proposat diversos mecanismes per a diferents microorganismes (McBride, 2001). Per exemple, s'ha proposat que *Flavobacterium johnsoniae* es mou utilitzant un sistema que seria comparable a unes cintes transportadores acoblades a la membrana cel·lular (McBride, 2004). Alternativament, *Myxococcus xanthus* disposa de dos sistemes de motilitat, l'anomenat moviment social basat en un sistema dependent de pilis i el moviment aventurer (Spormann, 1999). El mecanisme concret d'aquest últim no es té clar, però s'ha proposat que es podria basar en un sistema d'excreció d'un polímer similar a les mucines (Wolgemuth *et al.*, 2002). Per altra banda, hi ha evidències que existeix un motor intern que es mouria de forma helicoidal originant el moviment (Mignot, 2007).

Pel que fa als micoplasmes, fins al moment s'han descrit 9 espècies capaces de fer gliding. Entre elles trobem *Mycoplasma pulmonis*, *M. mobile* i 7 espècies del cluster filogenètic de *M. pneumoniae* (Hatchel i Balish, 2008). Actualment coexisteixen dos models per explicar el moviment dels micoplasmes (Miyata, 2008; Figura 9). El primer és el model de centpeus o "centipede" que s'aplica a *M. mobile*. Aquesta espècie té l'habilitat de desplaçar-se fins a 4 µm/s, una velocitat que és molt superior a la resta de micoplasmes i realment ràpida si tenim en compte la mida tan reduïda d'aquest microorganisme. Aquest tret diferencial ha facilitat l'estudi de la seva motilitat i en aquest context, el mecanisme de motilitat de *M. mobile* clarament és el que està més ben documentat. Morfològicament *M. mobile* es pot dividir en 3 parts; el cap (que correspondria a una prolongació polar de membrana) el coll i el cos. S'ha observat que una sèrie d'estructures proteiques anomenades espines afluïren principalment de la part del coll (Miyata i Petersen, 2004) i s'ha determinat que estan constituïdes per una

proteïna d'alt pes molecular denominada Gli349. Aquesta proteïna és responsable de la unió del micoplasma a la superfície mentre es mou (Uenoyama *et al.*, 2004) i a més és una proteïna flexible capaç d'adoptar diferents estats conformacionals (Adan-Kubo *et al.*, 2006). En base aquestes observacions s'ha elaborat un model consistent en que molècules de Gli349 actuarien de manera coordinada com a veritables cames per propulsar el micoplasma. El motor molecular de la motilitat d'aquest microorganisme es completaria amb la presència de les proteïnes Gli123, Gli521 i P42 (Figura 9A). Aquestes proteïnes juntament amb Gli349 estan codificades en una mateixa unitat transcripcional i co-localitzen en el coll amb la Gli349. Pel que fa als rols d'aquestes proteïnes s'ha proposat que Gli123 seria responsable de segrestar i mantenir agrupades la resta de proteïnes de motilitat en el coll (Uenoyama i Miyata, 2005). La proteïna Gli521 tindria el paper de transmetre la força necessària per produir els canvis conformacionals de Gli349 (Seto *et al.*, 2005b) i la P42 aportaria l'energia requerida a partir de la hidròlisi d'ATP (Ohtani i Miyata, 2007). Per altra banda, s'ha suggerit que la presència d'un citoesquelet subjacent probablement aportí suport a la maquinària de motilitat, ja sigui en un sentit estructural o per coordinar el moviment. És interessant constatar, que el conjunt de proteïnes Gli i P42 només es troben conservades a *M. pulmonis* (Chambaud *et al.*, 2001). Per una banda, aquesta dada suggereix que *M. pulmonis* probablement utilitzi un sistema similar per desplaçar-se i per l'altre, indica que existeixen mecanismes de motilitat alternatius, fins i tot entre diferents espècies de micoplasmes.

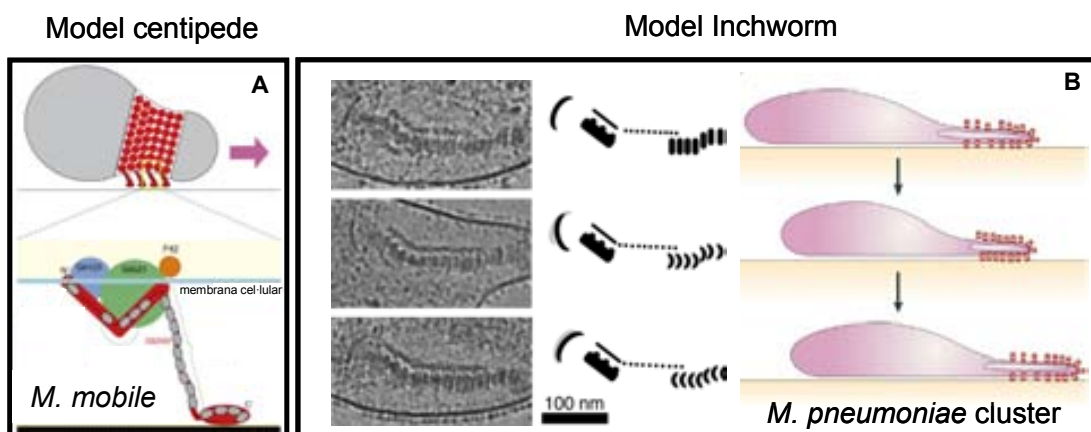


Figura 9. Models de motilitat proposats per explicar la motilitat en els micoplasmes.

(A). Localització cel·lular de la maquinària de gliding de *M. mobile* i diagrama representant el motor molecular. Diagrama extret i modificat de Miyata, 2008.

(B). Model inchworm basat en canvis conformacionals del eix electro-dens de l'organela terminal. Imatges extretes de Henderson i Jensen, 2006 i Jarrell i McBride, 2008.

En el cas de *M. pneumoniae* i *M. genitalium*, cada cop hi ha més evidències que l'organela terminal és el motor molecular responsable del seu moviment. En suport d'aquesta idea, trobem que el pol on se situa l'organela terminal sempre marca el sentit de la marxa. Per altra banda, a *M. pneumoniae* s'ha observat que en mutants deficients per la proteïna P41, l'organela terminal sovint se separa del cos cel·lular i aquesta continua desplaçant-se durant un màxim de 30 minuts (Hasselbring i Krause, 2007b). Més enllà d'aquest fenotip espectacular que suggereix un paper de la P41 per mantenir unit el citoesquelet de l'organela al de la resta de la cèl·lula, aquesta observació evidencia que la totalitat de la maquinària de motilitat resideix a l'organela terminal. No obstant, la manera com l'organela terminal participa en el moviment és una incògnita i només existeixen conjectures. Per exemple, hi ha evidències que l'eix electro-dens pot ser flexible i variable conformacionalment (Henderson i Jensen, 2006). En base aquestes observacions s'ha proposat que el mecanisme de motilitat de *M. pneumoniae* podria basar-se en canvis conformacionals que afectarien a la longitud o curvatura de l'eix electro-dens, promovent d'aquesta manera petits moviments endavant (Figura 9B). Aquest model, denominat de cuc o "inchworm", es podria estendre a totes aquelles espècies mòbils amb organela terminal. Alternativament, s'ha observat que anticossos contra la P1 redueixen la velocitat de desplaçament en una primera instància, fins que acaben per desenganxar el micoplasma de la superfície (Seto *et al.*, 2005a). En base aquests resultats, els autors suggereixen la possibilitat que la P1 actuï de manera similar a la proteïna Gli349 de *M. mobile*.

Una incògnita encara per desvetllar és saber quins són els elements responsables d'aquesta maquinària. Com hem avançat, proteïnes originàriament relacionades amb adhesió com la P1 i P30 s'han relacionat també amb la maquinària de motilitat (Hasselbring *et al.*, 2005; Seto *et al.*, 2005a). No obstant, cal tenir present que l'adhesió és un prerequisite perquè les cèl·lules es puguin desplaçar. Per tant, és raonable pensar que tots aquells elements relacionats en adhesió també ho puguin estar en motilitat. En un esforç per identificar proteïnes no relacionades en adhesió però sí en motilitat, el nostre grup va desenvolupar un sistema que va permetre identificar les proteïnes MG200 i MG386 com a components bàsics de la maquinària de motilitat de *M. genitalium* (Pich *et al.*, 2006a). Treballs posteriors realitzats a *M. pneumoniae* han confirmat aquests resultats i han delimitat la localització d'ambdues proteïnes a la part

proximal de l'organela terminal (Figura 7B). Malauradament, encara no s'ha pogut determinar les seves funcions específiques. Paral·lelament, mitjançant altres assaigs globals de mutagènesi per transposó s'han pogut aïllar més mutants relacionats amb motilitat (Hasselbring *et al.*, 2006b; Pich *et al.*, 2008). Cal destacar, que molts d'aquest mutants són deficients per proteïnes integrants de l'organela terminal, reforçant la importància que té aquesta estructura en la motilitat dels micoplasmes. Per aquest motiu, estudiar els components estructurals de l'organela terminal és pot considerar una via alternativa per revelar el mecanisme molecular de motilitat. Malauradament, ja hem comentat anteriorment que la pèrdua d'alguns d'aquests components sovint compromet l'arquitectura de l'organela terminal, dificultant seriosament l'assignació de funcions.

I.7.2. Divisió cel·lular dels micoplasmes

S'han proposat varis models de divisió cel·lular entre els Mollicutes però la divisió per fissió binària sembla el model més estès (Miyata i Seto, 1999). Com s'ha comentat anteriorment, els micoplasmes es podrien classificar entre aquells que tenen morfologies esfèriques o pleomòrfiques i aquells que tenen morfologies polars, com el cas de *M. genitalium* i *M. pneumoniae*. En el cas d'aquests últims, malgrat que es desconeix el mecanisme exacte de divisió cel·lular, cada cop es tenen més evidències que l'organela terminal hi juga un paper fonamental. En base observacions fetes per microscòpia de contrast de fase, ja al 1968 es va suggerir que la divisió cel·lular de *M. pneumoniae* sembla començar amb la formació d'una organela terminal nova adjacent de la primera i que una d'aquestes migra posteriorment al pol oposat (Bredt, 1968). Aquestes observacions s'han anat corroborant amb el temps i actualment existeix un model que descriu el cicle cel·lular de *M. pneumoniae* (Hasselbring *et al.*, 2006a; Seto *et al.*, 2001) (Figura 10). En aquest model, la duplicació i migració de l'organela terminal semblen processos coordinats amb la replicació dels cromosomes. Concretament, s'ha observat que cèl·lules amb una sola organela terminal contenen menys ADN que aquelles cèl·lules amb dos organeles terminals (Seto *et al.*, 2001). De la mateixa manera, aquelles cèl·lules amb dues organeles terminals situades en pols oposats, són les que contenen la major quantitat d'ADN, probablement reflectint l'estatus diploid que ha d'existir just abans de la citocinesi. Els mecanismes però, que regulen i coordinen aquests processos són desconeguts fins el moment.

El fet que la formació de noves organelles terminals coincideixi amb la divisió cel·lular suggereix clarament un paper funcional d'aquesta estructura en aquest procés. En aquest context, l'aplicació de proteïnes de fusió fluorescents per marcar *in vivo* l'organela terminal, ha permès implicar l'organela en el procés de divisió cel·lular (Hasselbring *et al.*, 2006a). En aquest treball es va demostrar que les cèl·lules de *M. pneumoniae* paren de moure's just coincidint amb la formació d'una nova organela terminal, suggerint també una coordinació entre motilitat i divisió cel·lular. Al cap de 3 hores sembla que l'organela terminal preexistent restaura la capacitat de gliding, promovent la migració de l'organela nova al pol oposat. Com és lògic, els mutants deficients en motilitat presenten alteracions en aquest procés de migració. Cal matisar, que la nova organela terminal estrictament no migraria, sinó que aquesta romandria fixa i seria l'organela preexistent la que se separaria (Figura 10). Finalment, quan les dos organelles es troben en pols oposats, la nova organela adquireix capacitat de motilitat. En aquest moment, s'ha proposat que la força exercida per cada organela en direccions oposades podria facilitar la citocinesi. Tanmateix, aquest procés no és essencial ja que mutants no adherents i per tant no mòbils, poden finalitzar la divisió cel·lular. Un altre hipòtesi molt interessant és la possibilitat que components de l'organela terminal puguin unir d'alguna forma el cromosoma bacterià. D'aquesta forma, la separació de les organelles als pols oposats podria promoure a la vegada la segregació dels cromosomes, assegurant un repartiment equitatiu del material genètic a cada cèl·lula filla. No obstant, falten dades experimentals per suportar aquest rol de l'organela terminal en el cicle de divisió cel·lular.

Una de les altres incògnites actuals és explicar com es duplica l'organela terminal. Fins al moment s'han suggerit dos escenaris. El primer es basa en un procés de duplicació semiconservativa a partir d'una estructura preexistent. Aquesta possibilitat està suportada per imatges de microscòpia electrònica on s'observen cèl·lules amb un eix electro-dens bifurcat per la part distal (Hegermann *et al.*, 2002; Nakane i Miyata, 2009). En oposició, altres autors suggereixen que l'organela terminal també es pot formar de "*novo*", argumentant que mutants sense una estructura preexistent poden generar organelles terminals noves (Willby *et al.*, 2004). Alternativament, aquests mateixos autors han demostrat que en absència de proteïna P41, les noves organelles terminals es formen en posicions laterals allunyades de l'organela terminal preexistent (Hasselbring i

Krause, 2007a). Per una banda, aquesta observació descarta la necessitat espacial de la presència d'una organela terminal per formar-ne una de nova i per l'altre reflecteix un paper essencial de la P41 en el control de la localització de les organeles terminals noves. Pel que fa a la regulació temporal de la duplicació de l'organela terminal, estudis recents fets a *M. pneumoniae* indiquen que cèl·lules en divisió poden formar múltiples organeles terminals abans de completar la citocinesi (Hasselbring *et al.*, 2006a). Aquests resultats contrasten amb la noció inicial (Seto *et al.*, 2001) i suggereixen que a *M. pneumoniae* la duplicació de l'organela terminal no està coordinada amb la divisió cel·lular (Figura 10). En contraposició, estudis realitzats al nostre laboratori indiquen que a *M. genitalium* si existeix una regulació estricta, ja que en la població de la soca salvatge no existeixen cèl·lules amb més de dos organeles terminals. Més concretament, hem observat que l'aparició de tres o més organeles terminals només succeeix en dos situacions. O bé de manera moderada en mutants deficientes en motilitat, probablement originat per un enlentiment del procés de citocinesi. O bé en mutants amb nivells reduïts de P140 i P110, suggerint que els nivells d'aquestes dos proteïnes poden directe o indirectament regular temporalment la duplicació de l'organela terminal a *M. genitalium* (Pich *et al.*, manuscrit en preparació).

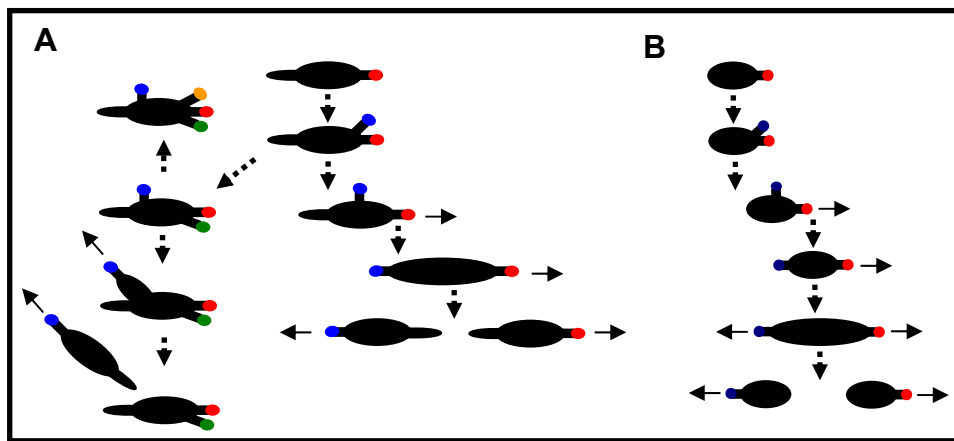


Figura 10. Duplicació i motilitat de l'organela terminal durant el procés de divisió cel·lular.

(A) Model actual de divisió per *M. pneumoniae* il·lustrant la formació de múltiples organeles terminals abans de la citocinesi (Hasselbring *et al.*, 2006a). Les fletxes marquen la direcció de moviment.

(B) Model de divisió per *M. genitalium*. L'organela terminal en aquest cas és duplica una única vegada abans de la citocinesi, indicant una coordinació entre la duplicació de l'organela terminal i divisió cel·lular (Pich *et al.*, manuscrit en preparació).

I.8. CULTIU I EINES DE MANIPULACIÓ GENÈTICA

Com a conseqüència de les reduïdes capacitats metabòliques, els micoplasmes són realment exigents en els seus requeriments nutricionals. És per això que per a la seva propagació *in vitro* es necessiten medis molts rics i, tot i així, el seu creixement és molt lent. De fet, aquest és un dels principals “handicaps” que presenten els micoplasmes en l'àmbit experimental. Concretament per al cultiu de *M. genitalium* s'utilitza el medi SP-4 que fou descrit per Tully al 1979 (Tully *et al.*, 1979). L'aïllament en placa de colònies de *M. genitalium* pot trigar entre 7 i 15 dies i les colònies que es desenvolupen es caracteritzen per una forma típica d'ou ferrat amb una mida d'entre 0,1-0,4 mm.

A més de les seves exigències respecte al cultiu, un altre factor limitant a l'hora de treballar amb aquests microorganismes és la manca d'eines per la seva manipulació genètica. L'ús de plasmidis replicatius en micoplasmes queda restringit a unes poques espècies. Fins al moment només s'han trobat dos plasmidis naturals al gènere micoplasma, pADP201 i pKMK1, i els dos provenen de *M. mycoides subsp. mycoides* (Bergemann *et al.*, 1989; King i Dybvig, 1992). Malgrat que inicialment es va creure que els dos plasmidis podrien ser vectors potencials a micoplasma, el seu baix nombre de còpies i la incapacitat de replicar en altres espècies diferents d'*M. mycoides* i *M. capricolum* ha fet necessària la recerca de nous vectors. En aquest sentit, s'han desenvolupat plasmidis artificials basats en l'origen de replicació del cromosoma bacterià (OriC) a *M. capricolum subsp. capricolum* (Janis *et al.*, 2005), *Mycoplasma agalactiae* (Chopra-Dewasthaly *et al.*, 2005), *Spiroplasma citri* (Renaudin *et al.*, 1995) i *M. pulmonis* (Cordova *et al.*, 2002). Donades aquestes limitacions, els transposons han esdevingut l'eina per excel·lència i la més utilitzada per a la manipulació genètica dels micoplasmes. No obstant, hi ha varies espècies de micoplasmes que encara romanen refractàries a la transformació per transposons. Actualment, els transposons disponibles en els micoplasmes són el Tn4001 i Tn916, que van ser originalment aïllats de les bacteries Gram-positives *Staphylococcus aureus* (Lyon *et al.*, 1984) i *Enterococcus faecalis* (Franke i Clewell, 1981), respectivament. La utilitat del transposó Tn4001 (4,7 kb) es va demostrar per primer cop a *M. pneumoniae* (Hedreyda *et al.*, 1993) i seguidament el seu ús es va estendre amb èxit a altres espècies incloent *M. gallisepticum* (Cao *et al.*, 1994) i *M. genitalium* (Reddy *et al.*, 1996). A diferència del transposó Tn916 (18 kb), el Tn4001 es prou petit per a ser utilitzat com a vector de

clonatge en un plasmidi suïcida. Un dels problemes dels transposons naturals és la seva inestabilitat i dinamisme un cop s'han transposat, la qual cosa dificulta la interpretació dels resultats. La construcció d'un minitransposó col·locant el gen de la transposasa a fora de la zona transponible ha solucionat aquest problema (Pich *et al.*, 2006b; Pour-El *et al.*, 2002) (Figura 11).

Per altra banda, els gens de resistència *tetM* i *aac(6')-aph(2'')* residents en el transposó Tn916 i Tn4001, respectivament, han estat utilitzats com a marcadors de selecció en diferents espècies de micoplasma (Voelker i Dybvig, 1996). El gen *tetM* confereix resistència a la tetraciclina en totes les espècies de micoplasmes assajades fins ara. No obstant, en estudis centrats a *M. genitalium*, el gen *aac(6')-aph(2'')* que dona resistència als aminoglicòsids gentamicina, kanamicina i tobramicina, era l'únic marcador de selecció disponible fins ara. Per estendre la disponibilitat de marcadors de selecció a *M. genitalium*, el nostre grup va construir un minitransposó (pMTnTetM438), basat en el Tn4001, portador del gen marcador modificat *tetM438* (Pich *et al.*, 2006b; Figura 11).

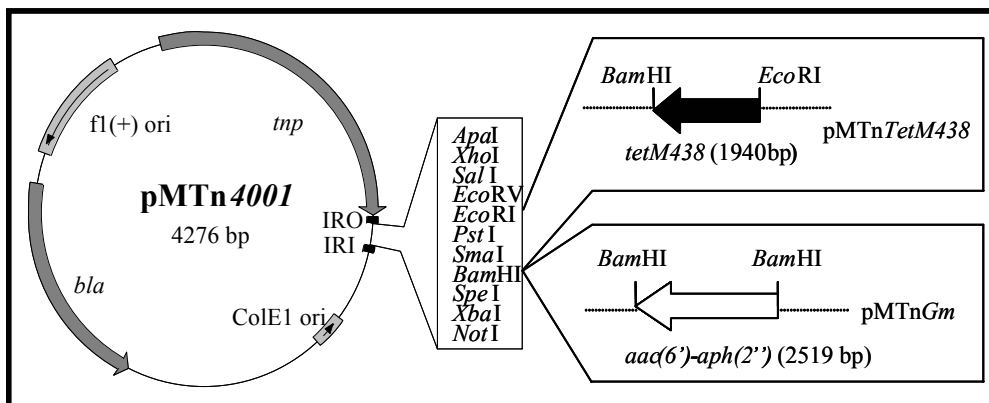


Figura 11. Representació esquemàtica del minitransposó pMTn4001, pMTnTetM438 i pMTnGm desenvolupat en el treball de Pich *et al.*, 2006b.

En el esquema s'il·lustra les dianes de clonatge disponibles i les dianes utilitzades per clonar els gens marcadors. Aquests vectors han estat àmpliament utilitzats durant aquesta tesi. ColE1 ori, origen de replicació d'*E. coli*. f1(+), ori, origen de replicació del bacteriòfag F1. *tnp*, gen de la transposasa. *bla*, gen de resistència a ampicilina. IRI, repetició invertida interna. IRO, repetició invertida externa.

Aquest marcador consisteix en la fusió d'una seqüència de 22 pb situada immediatament a l'extrem 5' del gen *mg438* (un gen d'expressió constitutiva) i la regió codificant del gen *tetM*. Aquesta regió de 22 pb, on només s'han identificat dues possibles caixes -10 i cap caixa -35 ni cap seqüència RBS, és capaç de promoure la transcripció del gen de resistència a tetraciclina a *M. genitalium*. Cal afegir que aquesta seqüència també s'ha mostrat útil per promoure transcripció d'altres regions codificants,

tal com es mostrarà en aquest treball. L'ús del marcador *tetM438* comporta diverses avantatges quan es compara amb el gen *aac(6')-aph(2'')*, com per exemple la millora de les eficiències de transformació per transposició i l'obtenció de colònies resistents en un menor temps d'incubació (Pich *et al.*, 2006b).

Malgrat els transposons han demostrat ser una eina valuosa per aïllar i estudiar mutants, és necessari el desenvolupament d'altres eines de manipulació genètica per avançar en el coneixement d'aquests microorganismes. En aquest sentit, la recombinació homòloga permet obtenir de manera directa mutants nuls per a un gen diana determinat, evitant així el factor aleatori que implica l'ús de transposons. Aquesta eina només ha estat assajada amb èxit en unes poques espècies de Mollicutes, incloent *Achoeleplasma laidlawii* (Dybvig i Woodard, 1992), *M. gallisepticum* (Cao *et al.*, 1994), *M. pulmonis* (Cordova *et al.*, 2002) i *M. genitalium* (Dhandayuthapani *et al.*, 1999). Per aquest motiu, la recombinació homòloga a *M. genitalium* promet ser una eina molt valuosa per determinar i estudiar la biologia d'aquest patògen humà.

II. OBJECTIUS

ANTECEDENTS I OBJECTIUS PRINCIPALS

M. genitalium disposa d'una estructura polar sorprenentment complexa anomenada organela terminal. Aquesta estructura és única en el món bacterià i té un paper fonamental en processos relacionats amb la patogènesi com són l'adhesió, motilitat i divisió cel·lular. L'organela terminal es troba en varies espècies de micoplasma però ha estat quasi exclusivament estudiada a *M. pneumoniae*. En aquest sentit, la informació disponible en aquestes altres espècies, queda actualment restringida a l'extrapolació que es pugui fer en base a la possible homologia exhibida amb *M. pneumoniae*. En el cas de *M. genitalium*, la major part de recerca ha estat centrada més aviat en la vessant clínica. En conseqüència, trobem pocs estudis que abordin aspectes de la seva biologia bàsica, relacionats amb el metabolisme o la patogenicitat. El projecte en el qual s'emmarca aquesta tesi, pretén aprofundir en la biologia bàsica de *M. genitalium* i en l'estudi de l'organela terminal a nivell funcional i estructural. Dins d'aquest marc de treball, aquesta tesi pretén profunditzar en el coneixement de les proteïnes integrants de l'organela terminal de *M. genitalium* i establir el seu paper específic en l'adhesió, motilitat i divisió cel·lular.

La tesi consta de tres capítols, independents, però connectats entre si per un mateix fil conductor: l'estructura i funció de l'organela terminal de *M. genitalium*. Els objectius principals són:

Capítol 1.

1. Obtenció i caracterització de soques defectives pels gens *mg191* (P140) i *mg192* (P110).
2. Determinar la base genètica de dos tipus de mutants espontanis en adhesió cel·lular de *M. genitalium* (Mernaugh *et al.*, 1993), en els quals existeix una pèrdua o inestabilitat de P140 i P110.
3. Relacionar la causa genètica del fenotip d'aquests mutants amb la seva elevada freqüència d'aparició.

Capítol 2.

1. Obtenció i caracterització d'una soca defectiva pel gen *mg312* (MG312).
2. Anàlisi funcional de diferents dominis de la proteïna MG312.
3. Expressió recombinant i caracterització de la proteïna MG312.

Capítol 3.

1. Aïllar i caracteritzar mutants de *M. genitalium* amb un comportament de motilitat alterada.
2. Identificar gens reguladors de la motilitat de *M. genitalium*.

III. RESULTATS I DISCUSSIÓ:

CAPÍTOL 1

PART 1

Les proteïnes P140 i P110 s'estabilitzen mútuament i són necessàries per l'adhesió cel·lular i formació de l'organela terminal

PART 2

Proposta d'un mecanisme regulador de “switch ON↔OFF” de l'adhesió cel·lular de *M. genitalium*.

Aquest treball ha estat parcialment publicat. Veure Burgos *et al.*, 2006.

INTRODUCCIÓ

M. genitalium i *M. pneumoniae* (principal causant de pneumònia atípica) són patògens relacionats morfològicament i serològicament. De fet, les dues espècies s'han aïllat conjuntament de manera ocasional en frotis de gola de pacients amb malalties respiratòries (Baseman *et al.*, 1988) i en fluids sinovials de pacients amb artritis (Tully *et al.*, 1995). La comparació dels dos genomes indica que són dues espècies molt properes filogenèticament. En aquest sentit, ambdues espècies comparteixen proteïnes homòlogues de citadherència així com una organització cromosòmica similar (Dallo *et al.*, 1989; Reddy *et al.*, 1995).

Els mecanismes d'adhesió i motilitat de ambdues espècies recauen en una estructura polar i complexa anomenada organela terminal. En el decurs dels anys, *M. pneumoniae* ha esdevingut per tradició el model per estudiar aquesta estructura i no hi ha masses estudis realitzats a *M. genitalium*. Entre aquests pocs estudis, trobem evidències que *M. genitalium* podria unir-se a les cèl·lules hostes mitjançant la proteïna P140 (Mernaugh *et al.*, 1993), homòloga de l'adhesina P1 de *M. pneumoniae* (Hu *et al.*, 1987). En el primer d'aquests treballs els autors van aïllar un conjunt de mutants deficients en adhesió cel·lular, caracteritzats per nivells inestables de P140 (designats com a mutants de classe I) o bé per l'absència total de P140 (designats com a mutants de classe II; Mernaugh *et al.*, 1993). Cal destacar, que aquests mutants apareixen espontàniament amb una elevada freqüència, dificultant i compromentent la identificació de nous mutants en adhesió cel·lular a *M. genitalium*. La base genètica subjacent aquest fenomen encara no ha estat determinada.

Fins al moment, tots els mutants deficients en adhesió que s'han aïllat a *M. genitalium*, exhibeixen alteracions en les proteïnes codificades pels gens *mg191* (P140) i *mg192* (P110) (Dhandayuthapani *et al.*, 1999; Mernaugh *et al.*, 1993). Per aquest motiu, en la primera part d'aquest estudi ens hem proposat desvetllar la relació existent entre ambdues proteïnes i determinar els seus rols en l'adhesió cel·lular de *M. genitalium*. Per dur a terme aquesta tasca, hem aprofitat la possibilitat d'obtenir mutants nuls de *M. genitalium* mitjançant recombinació homòloga. En la segona part d'aquest estudi hem

volgut determinar la base genètica responsable de l'elevada freqüència d'aparició de mutants espontanis amb alteracions en la proteïna P140.

RESULTATS PART 1

III.1. OBTENCIÓ I CARACTERITZACIÓ DE SOQUES DEFECTIVES PEL GEN *mg191* I *mg192* A *M. genitalium*

III.1.1. Construcció dels plasmidis pΔ*mg191* i pΔ*mg192* i assaig de transformació

Amb el propòsit d'obtenir mutants per recombinació homòloga amb delecions als gens *mg191* o *mg192* de *M. genitalium*, es van dissenyar els plasmidis pΔ*mg191* i pΔ*mg192*, respectivament (veure secció VI.4.11). Aquests plasmidis estan constituïts per l'esquelet base del vector pBluescript II SK⁺ i contenen el marcador de selecció *tetM438* (Pich *et al.*, 2006b) envoltat per les regions flanquejants del gen *mg191* o *mg192*, respectivament. Aquestes regions flanquejants tenen una longitud aproximada d'una kb i és per on s'espera que tinguin lloc els successos de recombinació homòloga. A més, han estat dissenyades perquè un cop es produeixi una doble recombinació entre aquestes seqüències i el cromosoma bacterià, es preservin aproximadament 100 bases de cada extrem del gens diana a deleccionar. Amb aquesta estratègia es pretén minimitzar possibles efectes no desitjats en el estat transcripcional i/o traduccional del gens flanquejants al gen diana. En aquest sentit, un succés de doble recombinació entre el plasmidi pΔ*mg191* i el genoma de *M. genitalium* s'espera que origini una delecio de les bases 105 a les 4093 del gen *mg191*, que representa una delecio del 92% de la seqüència codificant. De manera similar, una doble recombinació entre el plasmidi pΔ*mg192* i el genoma de *M. genitalium* s'espera que promogui una delecio de les bases 98 a les 3029 del gen *mg192*, que representa una pèrdua del 92,8% de la seqüència codificant. Les seqüències deleccionades seran reemplaçades pel marcador de selecció *tetM438*, que confereix resistència a tetraciclina a les cèl·lules transformades. Un aspecte a tenir en compte, és que els plasmidis pΔ*mg191* i pΔ*mg192* es poden considerar vectors suïcides, ja que només disposen de l'origen de replicació ColE1 d'*E. coli*. Per aquesta motiu, les cèl·lules de *M. genitalium* que siguin resistents a tetraciclina, només es podran originar per la integració del plasmidi sencer en el cromosoma bacterià si es produeix recombinació per un sol punt, o bé per la integració només del gen marcador en el cas que es produeixi una doble recombinació.

Com a resultat de la transformació per electroporació de la soca salvatge G37 de *M. genitalium* amb els plasmidis pΔmg191 i pΔmg192, es van obtenir unes eficiències de transformació per cèl·lula viable de $5,5 \times 10^{-7}$ i $2,4 \times 10^{-7}$, respectivament. Aquests valors representen un increment de 20 vegades a les eficiències obtingudes fins ara per recombinació homòloga a *M. genitalium* (Dhandayuthapani *et al.*, 1999). El notable increment en el número de transformants obtinguts, es podria explicar pels avantatges de l'ús del gen marcador *tetM438* respecte l'ús del gen marcador *aac(6')-aph(2'')* (Pich *et al.*, 2006b).

III.1.2. Anàlisi genòmic dels transformants obtinguts amb els plasmidis pΔmg191 i pΔmg192

Del conjunt de colònies obtingudes després de la transformació amb els plasmidis pΔmg191 i pΔmg192, es van picar sis i set colònies respectivament que van ser propagades en medi SP-4 amb presència de tetraciclina. Tots set transformants obtinguts amb el plasmidi pΔmg192 i la meitat dels transformants obtinguts amb el plasmidi pΔmg191 (clons 3, 4 i 6), mostraven un fenotip no adherent en plàstic i creixien agregats formant làmines en suspensió. Per altra banda, la resta de transformants obtinguts amb el plasmidi pΔmg191 (clons 1, 2 i 5) presentaven un fenotip normal pel fa a les seves propietats d'adhesió a plàstic.

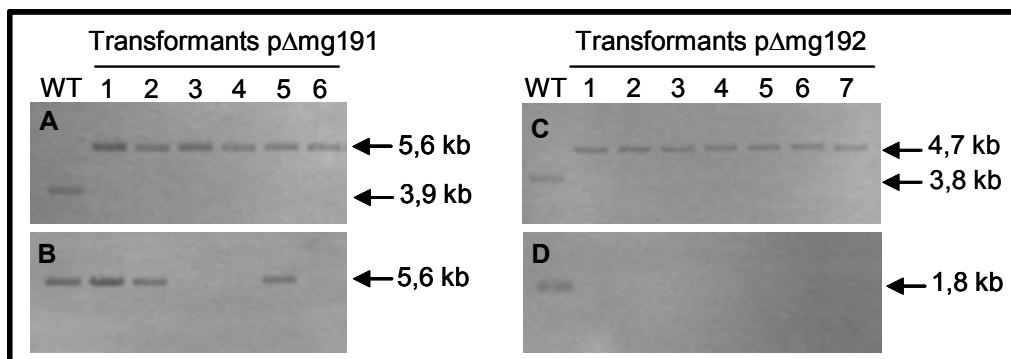


Figura 12. Anàlisi per Southern blot dels ADNs genòmic extrets de la soca salvatge G37 (WT) i dels transformants obtinguts amb els plasmidis pΔmg191 i pΔmg192.

(A, B). Els diferents carrils corresponen als ADNs genòmics extrets per cada transformant obtingut amb el plasmidi pΔmg191, digerits amb *Hind*III i hibridats amb la sonda C (panell A) i A (panell B).

(C, D). Els diferents carrils corresponen als ADNs genòmics extrets per cada transformant obtingut amb el plasmidi pΔmg192, digerits amb *Bgl*II i hibridat amb la sonda B (panell C) i C (panell D). Les sondes utilitzades estan indicades en la figura 13.

Per confirmar la presència de les delecions desitjades, els ADNs genòmics dels diferents transformants es van analitzar per Southern blot (Figura 12). En primer lloc, els ADNs genòmics de la soca salvatge (WT) i dels transformants obtinguts amb el plasmidi pΔmg191 es van digerir amb *Hind*III. Posteriorment, els fragments d'ADN resultants es van separar electroforèticament i es van transferir a una membrana de niló que finalment es va hibridar amb una sonda corresponent a un fragment intern i específic del gen *mg192* (sonda C, Figura 13). Cal destacar que la presència en el cromosoma de seqüències homòlogues als gens *mg191* i *mg192*, va exigir el disseny de sondes específiques per evitar la hibridació creuada amb múltiples parts del genoma (per detalls veure secció VI.4.9). Com calia esperar, es va detectar una única banda de 3,9 kb per l'ADN WT. En canvi, per l'ADN dels transformants es va detectar en tots una banda de 5,6 kb (Figura 12A). La presència d'aquesta banda pot resultar tant d'un succés de doble recombinació en el gen *mg191*, com d'un succés de recombinació simple en la regió flanquejant 3' del gen *mg191* (Figura 13A-C). Per distingir entre aquestes dues possibilitats, es va realitzar un segon Southern blot, però utilitzant com a sonda un fragment intern i específic del gen *mg191* (sonda A, Figura 13). En aquest cas es va detectar una única banda de 5,6 kb en l'ADN WT i en els clons 1, 2 i 5, indicant que en aquests transformants s'havia produït una recombinació simple no disruptiva del gen *mg191*, integrant-se tot el plasmidi. Respecte els clons 3, 4 i 6 no es va detectar senyal, indicant la presència de la delecio esperada en el gen *mg191* (Figura 12B). Aquests clons deficientes pel gen *mg191* s'anomenaran a partir d'ara mutants Δmg191 i seran els que s'utilitzaran en aquest treball per anàlisis posteriors.

Per altra banda, els ADNs genòmics de WT i dels transformants obtinguts amb el plasmidi pΔmg192 es van digerir amb *Bgl*II i posteriorment es van analitzar per Southern blot utilitzant com a sonda un fragment específic corresponent a l'extrem 3' del gen *mg191* (sonda B, Figura 13). Com calia esperar, es va detectar una única banda de 3,8 kb per l'ADN WT, mentre que per l'ADN dels transformants es va detectar en tots els casos una banda de 4,7 kb (Figura 12C). De la mateixa manera, aquesta banda de 4,7 kb es compatible tant amb un succés de doble recombinació en el gen *mg192*, com amb un succés de recombinació simple en la regió flanquejant 5' del gen *mg192* (Figura 13D, E). Finalment, per distingir quins dels transformants contenia la delecio esperada en el gen *mg192*, es va realitzar un segon Southern blot utilitzant com a sonda

un fragment intern i específic del gen *mg192* (sonda C). En aquest cas es va detectar una banda de 1,8 kb per l'ADN WT mentre que no es va detectar cap senyal en cap dels set transformants obtinguts amb el plasmidi pΔ*mg192*, indicant que tots presentaven la delecció esperada en el gen *mg192* (Figura 12D). Aquests clons s'anomenaran a partir d'ara mutants Δ*mg192* i seran els que s'utilitzaran en aquest treball per anàlisis posteriors.

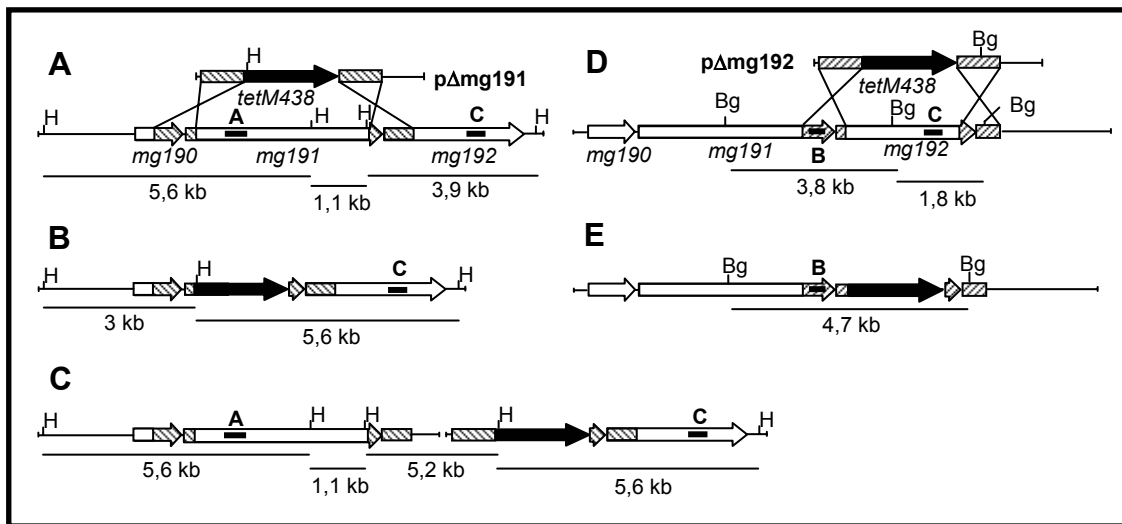


Figura 13. Recombinació homòloga en l'operó MgPa de *M. genitalium*.

(A, D). Representació esquemàtica dels dos dels possibles successos de recombinació homòloga que es poden donar entre els plasmidis pΔ*mg191*/pΔ*mg192* i l'operó MgPa de *M. genitalium*.

(B, E). Delecció mitjançant un succés de doble recombinació homòloga dels gens *mg191* i *mg192*, respectivament.

(C). Succés de recombinació simple en la regió flanquejant 3' del gen *mg191*.

Les caixes ratllades representen les regions flanquejants del gen *mg191* i *mg192*. El gen marcador *tetM438* està representat per una fletxa negra, mentre que les fletxes blanques mostren els gens *mg190*, *mg191* i *mg192*. Les línies en les fletxes representen les sondes A, B i C. A sota estan representats els diferents fragments de restricció obtinguts, després de digerir amb *Hind*III (H) o *Bgl*II (Bg), els ADNs genòmic extrets del WT i de cada transformant.

III.1.3. Anàlisi transcripcional del gen *mg192* en els mutants Δ*mg191*

Els gens *mg191* i *mg192* formen part d'una mateixa unitat transcripcional (Musatovova *et al.*, 2003). Per tant, com a conseqüència de la delecció, existeix la possibilitat que els mutants Δ*mg191* manifestin defectes a nivell transcripcional en el gen *mg192*. Per descartar aquesta possibilitat, es van extreure mostres d'ARN de dos clons representants (clons 3 i 4) i es va avaluar l'expressió del gen *mg192* mitjançant RT-PCR. Com es pot comprovar en la figura 14, en els dos clons es va amplificar un producte d'una mida

esperada de 668 pb, corresponent a una regió interna del gen *mg192*, demostrant la integritat transcripcional del gen *mg192* en els mutants Δ mg191.

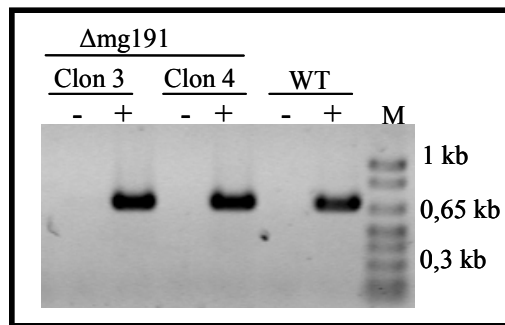


Figura 14. Anàlisi per RT-PCR de l'expressió del gen *mg192* a partir del ARN extret de la soca salvatge G37 (WT) i de dos mutants Δ mg191 independents. Els productes amplificats per RT-PCR han estat analitzats en un gel d'agarosa al 1%. El símbol (+) indica la presència de transcriptasa inversa en la reacció mentre que el símbol (-) correspon al control negatiu en el qual es va ometre aquest enzim. M, representa el marcador d'ADN 1 kb plus DNA ladder.

III.1.4. Capacitat d'adhesió dels mutants Δ mg191 i Δ mg192

Un cop descartats possibles efectes polars en els mutants obtinguts es va procedir a la seva caracterització. Com s'ha pogut observar en la secció III.1.2, els mutants que exhibeixen deficiències d'adhesió en el plàstic són aquells que precisament presenten les delecions en els gens *mg191* o *mg192*. Malgrat que la capacitat d'adhesió al plàstic ja sol ser un bon indicador de la capacitat d'adhesió cel·lular, un assaig més acceptat en el camp de la micoplasmologia és el d'hemadsorció (HA; veure secció VI.9). Per aquest motiu es va assajar qualitativament la capacitat d'adhesió dels mutants Δ mg191 i Δ mg192 a eritròcits. Com es mostra en la figura 15, a diferència de la soca salvatge, colònies dels mutants Δ mg191 i Δ mg192 estan completament lliures d'eritròcits (fenotip HA⁻), reforçant el paper principal de la P140 i P110 en l'adhesió cel·lular.

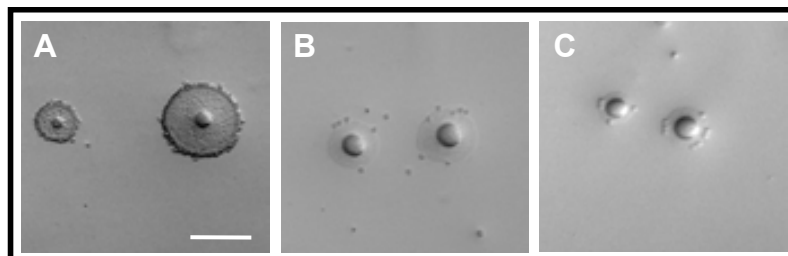


Figura 15. Assaig d'hemadsorció qualitatiu sobre colònies de micoplasma usant eritròcits humans. (A) Soca salvatge G37. (B) Δ mg192. (C) Δ mg191. La barra representa 100 μ m.

III.1.5. Anàlisi del perfil proteic dels mutants Δ mg191 i Δ mg192

Un dels avantatges de treballar amb un microorganisme que presenta un genoma tan reduït és que una tècnica tan senzilla com l'electroforesi monodimensional (SDS-PAGE) pot aportar una gran quantitat d'informació. Per aquest motiu, es va recórrer a l'ús d'aquesta tècnica per examinar possibles canvis en el perfil proteic dels mutants Δ mg191 i Δ mg192. Com es mostra en la figura 16, a diferència de la soca salvatge, el mutant Δ mg191 no expressa la proteïna de 140 kDa (corresponent al producte del gen *mg191*). Sorprenentment, també es perd la proteïna P110 (que correspon al producte del gen *mg192*) i apareix en el seu lloc una nova banda amb un pes molecular aproximat de 115 kDa. Per determinar la seva identitat, aquesta nova banda es va retallar del gel, es va digerir amb tripsina i es va analitzar per espectrometria de masses (MS). La massa calculada per MS dels diferents pèptids obtinguts després de la digestió, s'associa mitjançant la base de dades del MASCOT amb la seva seqüència peptídica teòrica. D'aquesta manera, la identificació de la seqüència dels diferents pèptids obtinguts va permetre identificar aquesta nova banda com una mescla de les proteïnes MG140 i MG218. Posteriorment, aquesta banda es va poder resoldre amb més nitidesa corroborant que es tractava en realitat d'una banda doble (Figura 16). La banda superior es va identificar com a MG218 (amb una puntuació de 83 i una cobertura de seqüència del 10%), mentre que la banda inferior es va identificar com a MG140 (amb una puntuació de 218 i una cobertura de seqüència del 27%). L'anàlisi del perfil proteic dels mutants Δ mg191 també va revelar altres canvis. Per exemple, s'aprecia una reducció en els nivells d'una proteïna corresponent a una banda d'alt pes molecular, recentment identificada per MS en el nostre laboratori com el producte del gen *mg386* (Pich *et al.*, 2006a). Per últim, malgrat que s'aprecia variacions en la intensitat de varies bandes, en els mutants Δ mg191 hi ha un increment molt reproducible en la intensitat d'una banda a l'alçada de 68 kDa. L'anàlisi per MS va indicar que aquesta banda corresponia al producte del gen *mg305*, que codifica per la DnaK. Quan es va analitzar per SDS-PAGE el perfil proteic dels mutants Δ mg192, vam observar la desaparició d'una banda a l'alçada de 110 kDa, corresponent a la proteïna P110, i una dràstica reducció en els nivells de la proteïna P140. Per altra banda, també es va observar l'aparició de la nova banda de 115 kDa, així com les mateixes variacions observades en els mutants Δ mg191 en relació als nivells de MG386 i DnaK (Figura 16).

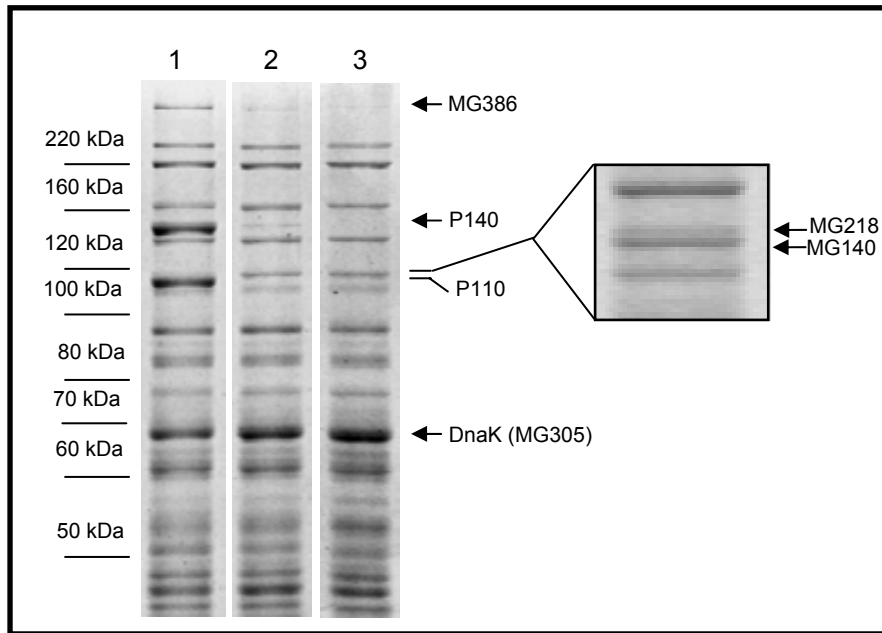


Figura 16. SDS-PAGE al 8% d'acrilamida mostrant el perfil proteic de la soca salvatge G37 (carril 1) i els mutants $\Delta mg192$ (carril 2) i $\Delta mg191$ (carril 3).

A l'esquerre queden representats els pesos moleculars mentre que a la dreta, s'identifiquen les proteïnes P140 i P110 i els principals canvis observats.

Per confirmar l'absència de P140 i P110 en els mutants $\Delta mg191$ i $\Delta mg192$ es va realitzar un Western blot utilitzant anticossos contra aquestes proteïnes (Figura 17). Com era d'esperar, no es va obtenir cap reacció positiva contra la P140 en els mutants $\Delta mg191$. En el cas dels mutants $\Delta mg192$ es va detectar una banda molt lleugera en forma de doblet, corresponent a la banda discreta prèviament observada per SDS-PAGE (Figura 17, panell superior). Cal destacar que els perfils proteics dels mutants $\Delta mg191$ i $\Delta mg192$, són comparables respectivament als descrits per uns mutants espontanis designats com a mutants de classe II i classe I (Mernaugh *et al.*, 1993). Aquests mutants apareixen amb una elevada freqüència i la seva base genètica encara no ha estat determinada. Donada la similitud existent entre els mutants, el Dr. J. Baseman (UTHSCSA) ens va facilitar amablement aquestes soques per poder-les analitzar més a fons (veure: part 2 capítol 1). En aquest punt, cal destacar que malgrat vam confirmar per Western blot la coincidència fenotípica, també vam observar una petita diferència en el perfil proteic del mutant classe II, no detectada en aquells treballs previs (Mernaugh *et al.*, 1993). Concretament i usant anticossos contra la P140, es va confirmar l'absència de la proteïna de 140 kDa però en el seu lloc es va detectar una lleugera banda a l'alçada de 85 kDa (Figura 17 panell superior).

Finalment, per Western blot també es va confirmar l'absència de P110 en els mutants Δ mg192, així també com en els mutants classe I i II (Figura 17, panell inferior). En el cas dels mutants Δ mg191 es van detectar traces de P110 en forma d'una banda molt dèbil en la regió de 110 kDa. En conjunt, aquests resultats semblen indicar que existeix una estabilització mútua post-traducciona entre les proteïnes P140 i P110.

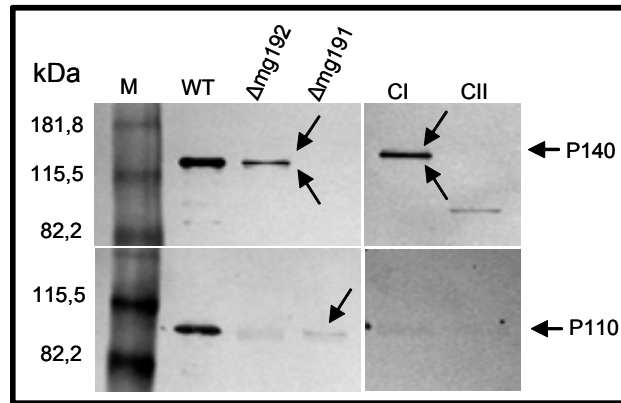


Figura 17. Western blot utilitzant anticossos monoclonals contra la P140 (panells superiors) i anticossos policlonals contra la P110 (panells inferiors).

En el panell superior, les fletxes indiquen la presència de doblet de P140, mentre que en el panell inferior es mostra la presència de quantitats molt reduïdes de P110.

III.1.6. Morfologia cel·lular dels mutants Δ mg191 i Δ mg192

Per determinar si la pèrdua de P140 i P110 repercuteix en la morfologia cel·lular, els mutants Δ mg191 i Δ mg192 es van analitzar per microscòpia electrònica de rastreig (SEM). Com a conseqüència de la pèrdua de la capacitat d'adhesió d'aquests mutants, es van haver d'utilitzar cubreobjectes de vidre tractats amb poly-L-lisina, per promoure l'adhesió de les cèl·lules a la superfície de la preparació. Per excloure cap efecte de la poly-L-lisina sobre la morfologia cel·lular, la soca salvatge es va examinar en les mateixes condicions. Com es mostra en la figura 18A, les cèl·lules de la soca salvatge exhibeixen la forma de "pera" descrita amb anterioritat (Luo *et al.*, 1999), amb una organela terminal ben definida i caracteritzada per un engrossiment a l'extrem. No obstant, una petita part de la població WT també exhibia morfologies atípiques, indicant la variabilitat existent en la població ja descrita en altres espècies de micoplasmes (Romero-Arroyo *et al.*, 1999). De manera important, quan comparen la morfologia dels mutants Δ mg191 i Δ mg192 amb la de la soca salvatge, observem canvis morfològics dràstics, sent la pèrdua de l'organela terminal la característica més remarcable.

Concretament, trobem que un 76,9% de les cèl·lules del mutant Δ mg191 mostren formes arrodonides, mentre que el 23,1% restant exhibeixen formes pleomòrfiques o multilobulades (Figura 18B). De la mateixa manera, en les preparacions amb cèl·lules del mutant Δ mg192, també trobem formes arrodonides i multilobulades (74,8% i 25,2%, respectivament). També cal destacar la presència de filaments llargs o extensions de la membrana que, o bé connecten cèl·lules o bé surten de cèl·lules individuals (Figura 18B, C). En alguns casos, també s'han pogut observar petites extensions de la membrana o gemes, que es podrien considerar com un pas preliminar en el desenvolupament dels filaments llargs o intents fallits de desenvolupament d'organeles terminals (Figura 18C). Per altra banda, també es va apreciar una certa variabilitat en la mida de les formes arrodonides (Figura 18B, C).

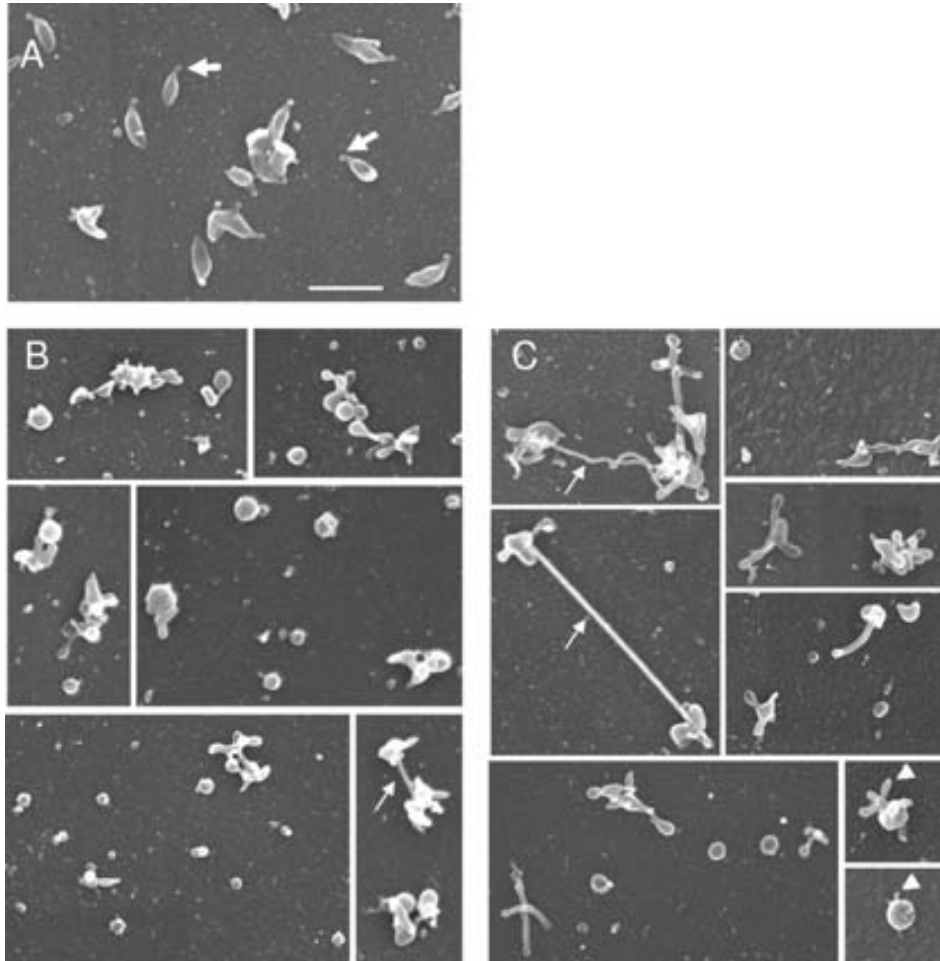


Figura 18. Anàlisi de la morfologia cel·lular per microscòpia electrònica de rastreig.

(A). Soca salvatge G37. (B) Mutants Δ mg191. (C). mutants Δ mg192. Totes les imatges han estat capturades al mateix augment. La barra representa una longitud de $1\mu\text{m}$. Les fletxes indiquen la presència de filaments llargs o extensions de membrana mentre que els triangles mostren petites protuberàncies o gemes.

La ultraestructura cel·lular dels mutants Δ mg191 i Δ mg192 també va ser analitzada mitjançant microscòpia electrònica de transmissió. Com es mostra en la figura 19A, l'organela terminal de *M. genitalium* està suportada per un eix electro-dens molt similar al descrit a *M. pneumoniae*. En el cas dels mutants Δ mg191 i Δ mg192, la morfologia cel·lular està dominada principalment per formes arrodonides i de grans dimensions en comparació amb la de la soca salvatge. Per altra banda, es remarcable l'absència d'un eix electro-dens típic en la majoria de cèl·lules. En el seu lloc, trobem un material electro-dens circular i ancorat a la membrana. En molts casos, es poden observar múltiples estructures d'aquest tipus per cèl·lula (fletxes vermelles, figura 19B). Encara que de forma molt minoritària, també s'han pogut observar cèl·lules amb un eix electro-dens i una morfologia cel·lular aparentment normal (fletxa negra, figura 19B).

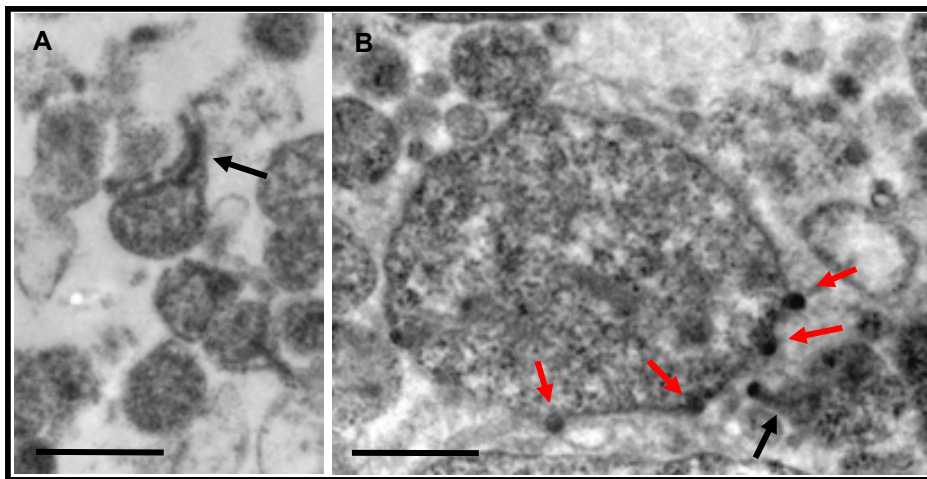


Figura 19. Anàlisi de la morfologia cel·lular per microscòpia electrònica de transmissió.

(A). Soca salvatge G37. (B) Mutant Δ mg192. El mutant Δ mg191 presenta la mateixa morfologia. Les fletxes negres indiquen la presència de l'organela terminal suportada per l'eix electro-dens. Les fletxes vermelles mostren les estructures electro-denses que romanen majoritàriament en els mutants Δ mg191 i Δ mg192. La barra representa una longitud de 0,5 μ m.

DISCUSSIÓ PART 1

LES PROTEÏNES P140 I P110 S'ESTABILITZEN MÚTUAMENT I SÓN NECESSÀRIES PER L'ADHESIÓ CEL·LULAR I FORMACIÓ DE L'ORGANELA TERMINAL

L'adhesió dels micoplasmes a la cèl·lula hoste es considera un pas primordial per poder colonitzar els teixits i desenvolupar una infecció. Com s'ha esmentat en la introducció general, en molts micoplasmes l'adhesió té lloc per una estructura coneguda com organela terminal. La funcionalitat d'aquesta estructura depèn tant de proteïnes estructurals que integren el citoesquelet subjacent, com de proteïnes de membrana que són responsables directes de l'adhesió a la cèl·lula hoste (Krause i Balish, 2004). A *M. genitalium*, les proteïnes P140 i P110 semblen les principals responsables de l'adhesió cel·lular (Mernaugh *et al.*, 1993), però no hi ha dades sobre els seus papers específics en l'arquitectura i organització de l'organela terminal. L'obtenció i la caracterització de mutants deficients per la P140 o P110 duta a terme en aquest treball ha permès aportar noves dades al respecte.

L'anàlisi dels mutants Δ mg191 i Δ mg192 ha confirmat el paper essencial de la P140 i P110 en l'adhesió cel·lular de *M. genitalium*. A més, l'absència d'aquestes dues proteïnes també produeix alteracions morfològiques importants. Concretament, les imatges de microscòpia electrònica suggereixen que aquests mutants tenen problemes en el desenvolupament de la prolongació de la membrana, potser com a conseqüència de reordenacions del citoesquelet. En aquest sentit, l'examen de seccions de cèl·lules dels mutants Δ mg191 i Δ mg192 mostren l'absència d'un eix electro-dens típic. En el seu lloc, s'observen estructures circulars electro-denses ancorades a la membrana que recorden al botó terminal, però que no tenen la continuïtat amb la resta de l'eix electro-dens. En alguns casos, dóna la impressió que aquestes estructures es localitzen en llocs on sembla que s'inicia una prolongació de la membrana, però que a *posteriori* queda en un intent fallit. De forma molt minoritària, també s'han observat cèl·lules amb un eix electro-dens i una morfologia aparentment normal, indicant que malgrat que l'absència de P140 i P110 dificulta d'alguna manera la formació del eix electro-dens, aquestes proteïnes no són estrictament necessàries pel seu desenvolupament. Cal destacar, que a

M. pneumoniae l'absència de les proteïnes homòlogues a la P140 i P110 no sembla tenir conseqüències en la formació del eix electro-dens (Seto i Miyata, 2003), potser indicant certes diferències entre les dues espècies respecte l'organització dels components de l'organela terminal.

Estudis molt recents realitzats en el nostre laboratori han manifestat que els nivells de P140 i P110 podrien, regular temporalment la duplicació de l'organela terminal a *M. genitalium* (Pich *et al.*, manuscrit en preparació). Per tant, l'observació en una mateixa cèl·lula de múltiples estructures circulars electro-denses, es podria interpretar com a intents fallits de formar múltiples organelles terminals com a conseqüència de la pèrdua de control de la duplicació de l'organela terminal. Queda per determinar, com nivells més elevats de P140 i P110 poden mantenir una morfologia aparentment normal. Per últim, afegir que a part de les alteracions morfològiques, l'absència total de P140 i P110 també origina un increment important del volum cel·lular, indicant probablement certs problemes de divisió cel·lular. Donat que l'organela terminal sembla estar involucrada en el procés de divisió cel·lular dels micoplasmes, l'absència d'aquesta estructura en aquests mutants podria ser l'origen d'aquest fenotip.

L'anàlisi del perfil proteic dels mutants Δ mg191 i Δ mg192 indica que els nivells de P110 esdevenen dràsticament disminuïts en absència de P140, mentre que en absència de P110, disminueixen els nivells de P140, a més de produir-se un processament anòmal d'aquesta mateixa adhesina. En conjunt, aquests resultats suggereixen que les dues proteïnes mantenen una estabilització recíproca i a més proporcionen una explicació a la inestabilitat de la P140 en els mutants de classe I (Merbaugh *et al.*, 1993). A *M. pneumoniae* s'han descrit resultats similars. Per exemple, l'estabilitat de les proteïnes B (P90) i C (P40), que són components homòlegs a la P110, depenen de la presència de l'adhesina P1, que és la proteïna homòloga a la P140 (Waldo i Krause, 2006). No obstant, en aquests treballs la reciprocitat no existeix, ja que malgrat les proteïnes B i C són necessàries per al manteniment de la P1 a la membrana (Layh-Schmitt i Harkenthal, 1999), no ho són per la seva estabilitat (Waldo i Krause, 2006). Aquestes diferències entre B/C i P110 podrien ser conseqüència de la diferent naturalesa dels productes funcionals del gen *mpn142* de *M. pneumoniae* i del seu homòleg a *M. genitalium*. Concretament, a *M. pneumoniae* el gen *mpn142* codifica per una proteïna de 130 kDa que es processada per obtenir els dos productes proteics independents B i C (Layh-

Schmitt i Herrmann, 1992). En canvi, a *M. genitalium*, no succeeix aquesta modificació post-traducciona.

A part dels efectes sobre la P140 i P110, una troballa interessant d'aquest treball és l'observació d'increments i disminucions en els nivells de certes proteïnes en els mutants Δ mg191 i Δ mg192. Per exemple, la pèrdua de P140 i P110 també ve acompanyada d'una disminució en els nivells de la proteïna MG386, suggerint l'existència d'algun tipus d'interacció entre les tres proteïnes. La MG386 és la proteïna homòloga a la P200 de *M. pneumoniae*, una proteïna que es troba en el "Triton X-100 shell" (Regula *et al.*, 2001) i comparteix característiques similars amb altres proteïnes accessòries d'adhesió cel·lular (Proft *et al.*, 1996). Es de destacar que aquesta proteïna és localitzada a l'organela terminal i és un component clau en el mecanisme de motilitat de *M. genitalium* (Pich *et al.*, 2006a), reforçant la idea que les maquinàries de motilitat i adhesió estan íntimament connectades en els micoplasmes mòbils (Seto *et al.*, 2005a). Els nostres resultats també mostren nivells incrementats de la proteïna MG305 (DnaK) en absència de P140 i P110. La proteïna DnaK està considerada una xaperona i s'ha descrit que els seus nivells augmenten en situacions d'estrès, com podria ser un xoc tèrmic (Weiner *et al.*, 2003). Per tant, una possible explicació d'aquest increment de DnaK podria ser que la pèrdua de P140/P110 i/o absència d'organela terminal produeixi algun tipus d'estrès en la cèl·lula. No obstant, també s'ha descrit que la DnaK és un component del citoesquelet dels micoplasmes (Regula *et al.*, 2001) i que pot formar complexos amb la proteïna P1 de *M. pneumoniae* (Layh-Schmitt *et al.*, 2000). A més, la DnaK forma part de la superfamília d'actines, els membres dels quals tenen capacitat per polimeritzar. En base aquestes observacions, alguns autors han suggerit papers addicionals per la DnaK relacionats amb funcions del citoesquelet (Pich *et al.*, 2006a; Regula *et al.*, 2001). Per tant, no es pot excloure la possibilitat que els nivells incrementats de DnaK siguin una conseqüència de possibles reordenacions en el citoesquelet originades per la pèrdua de l'organela terminal.

Per últim, també hem detectat l'aparició d'una nova banda de 115 kDa que ha estat assignada com una mescla de les proteïnes MG218 i MG140. L'MG218 és la proteïna homòloga a l'HMW2 de *M. pneumoniae* i té un paper estructural en el manteniment de l'organela terminal, sent el principal component del eix electro-dens (Balish *et al.*,

2003b; Pich *et al.*, 2008). Atès que l'MG218 migra a l'alçada de 216 kDa (Dhandayuthapani *et al.*, 1999), caldria esperar que aquesta nova banda de 115 kDa fos el producte d'un procés proteolític. No obstant, no s'observa una reducció significativa en la intensitat de la banda corresponent a la proteïna MG218. Recentment també s'ha pogut detectar aquesta banda en la soca salvatge a través de l'ús d'anticossos contra el C-terminal del MG218 (Pich *et al.*, 2008). Per tant, aquest fet posa en dubte que l'aparició d'aquesta nova banda sigui un fenomen estricte dels mutants Δ mg191 i Δ mg192. De fet, aquest fenomen s'ha observat en altres mutants d'adhesió cel·lular on existeixen també nivells reduïts de P140 i P110 (veure capítol 2). Donat que la P110 és una de les proteïnes majoritàries i gairebé co-migra amb aquesta banda de 115 kDa, podria ser que l'absència de P110 en aquests mutants simplement faciliti la seva visualització. Per altra banda, actualment s'està investigant si existeix realment una sobreexpressió de la proteïna MG140 en aquest mutants. El gen que codifica per aquesta proteïna no té actualment cap funció assignada, però presenta un domini conservat amb membres d'una família de les helicases, suggerint que podria actuar com a ADN helicasa. Actualment, amb col·laboració amb el grup de la Dra. Totten (Seattle, USA), s'està examinant la possible implicació d'aquest gen en recombinació i la seva possible relació amb els mecanismes de variació antigènica de *M. genitalium*. Creiem que aquests experiments poden aportar noves pistes que ajudin a crear connexions entre la P140 i P110 i altres components involucrats en la variabilitat antigènica i el desenvolupament de l'organela terminal.

RESULTATS PART 2

III.2. DETERMINACIÓ DE LA BASE GENÈTICA DELS MUTANTS

ESPONTANIS CLASSE I I CLASSE II DE *M. genitalium*

III.2.1. Assaig de complementació dels mutants de classe I-II

Com s'ha comentat en la secció III.1.5, el fenotip exhibit pels mutants $\Delta mg191$ i $\Delta mg192$ és similar a l'observat en els mutants de classe II i classe I, respectivament (Mernaugh *et al.*, 1993). Aquesta observació suggereix que els gens *mg191* i *mg192* podrien estar afectats d'alguna manera en aquests mutants. Per confirmar aquesta possibilitat, es va preparar un assaig de complementació construint els plasmidis *pMTnTetMG191*, *pMTnTetMG192* i *pMTnTetMG191-192* (veure secció VI.4.11). Aquests plasmidis incorporen de forma separada o simultània còpies dels gens *mg191* i *mg192* de la soca WT i permeten via transposó, reintroduir-los en el genoma de *M. genitalium*.

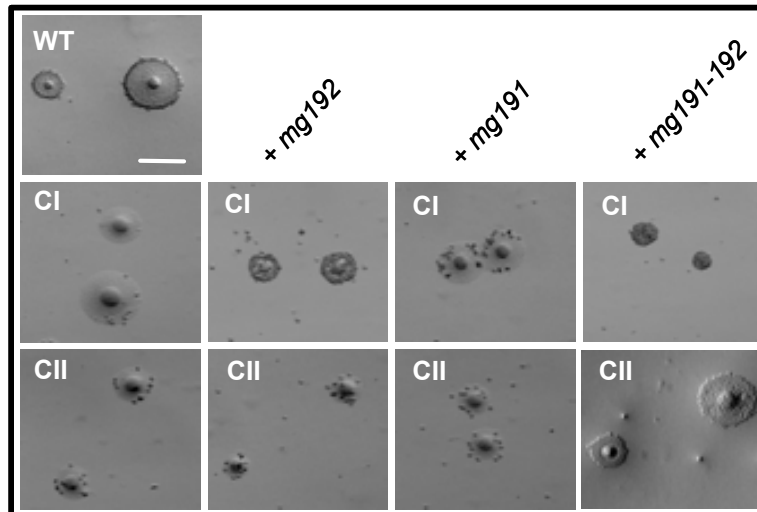


Figura 20. Assaig d'hemadsorció qualitatiu usant eritròcits humans.

Assaig realitzat sobre colònies de la soca salvatge G37 (WT), del mutant en adhesió cel·lular classe I (CI) i classe II (CII) i els diferents transformants obtinguts a partir d'aquests mutants després de la reintroducció dels plasmidis *pMTnTetMG191*, *pMTnTetMG192* i *pMTnTetMG191-192*. La barra representa 100 μm .

Després de transformar el mutant de classe I amb els plasmidis pMTnTetMG192 i pMTnTetMG191-192 es va poder restaurar l'activitat HA⁺ (Figura 20) així com el perfil proteic, tal com es demostra per SDS-PAGE (Figura 21A) i per Western blot (Figura 21B, C). En canvi, ni l'activitat HA⁺ ni el perfil proteic es va restaurar després de transformar amb el plasmidi pMTnTetMG191, que únicament contenia el gen *mg191* (Figures 20 i 21). Cal destacar que malgrat no es restaura el fenotip HA⁺ en aquests transformants, si que s'observa un augment en la intensitat del doblet en la regió de 140 kDa (Figura 21A carril 3; Figura 21B indicat per dos fletxes) indicant que la còpia externa introduïda de *mg191* s'està expressant. Per tant, el conjunt d'aquests resultats suggereixen que els mutants de classe I s'originen com a conseqüència de mutacions en el gen *mg192*.

En els mutants de classe II, el restabliment del perfil proteic i el fenotip HA⁺ només va ser possible després de transformar amb el plasmidi pMTnTetMG191-192 (Figures 20 i 21), suggerint que l'origen d'aquests mutants és conseqüència probablement de mutacions que afecten els dos gens de l'operó MgPa. Consistentment, quan aquest mutant es va transformar amb els plasmidis pMTnTetMG192 o pMTnTetMG191, només es van poder detectar per Western blot unes bandes lleugeres corresponents a la P110 i

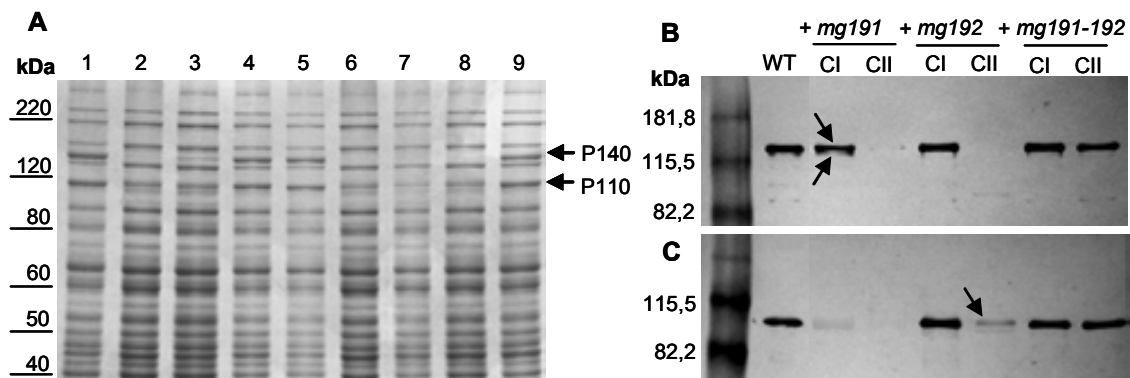


Figura 21. Anàlisi per SDS-PAGE i Western blot dels perfils proteics dels mutants de classe I i classe II després de la complementació.

(A). SDS-PAGE al 8% d'acrilamida de la soca salvatge G37 (carril 1), del mutant de classe I (carril 2), del mutant classe I + pMTnTetMG191 (carril 3), del mutant classe I + pMTnTetMG192 (carril 4), del mutant classe I + pMTnTetMG191-192 (carril 5), del mutant classe II (carril 6), del mutant classe II + pMTnTetMG191 (carril 7), del mutant classe II + pMTnTetMG192 (carril 8) i del mutant classe II + pMTnTetMG191-192 (carril 9).

(B, C). Western blot utilitzant anticossos monoclonals anti-P140 (B) o anticossos policlonals anti-P110 (C), dels transformants obtinguts després de la reintroducció dels plasmidis pMTnTetMG191, pMTnTetMG192 i pMTnTetMG191-192 en els mutants classe I (CI) i classe II (CII). En el panell (B) les fletxes indiquen un augment en la intensitat del doblet de P140. En el panell (C) la fletxa indica l'expressió de P110.

al doblet de la P140, respectivament (Figura 21B, i C indicat per una fletxa). En conjunt, aquests resultats indiquen que els gens introduïts per a la complementació s'expressen i aporten dades addicionals que reforcen l'existència d'una estabilització recíproca entre la P140 i P110.

Per acabar, cal destacar que els mutants de classe I i II mostren un augment d'un ordre de magnitud en la freqüència de transformació per transposició respecte la soca WT. Com es veurà més endavant, aquest fenomen succeeix en altres mutants que també exhibeixen problemes d'adhesió (veure secció IV.1.1).

III.2.2. Base genètica dels mutants de classe I i classe II

Partint de la hipòtesi que els gens *mg191* i *mg191-mg192* presenten algun tipus d'alteració genètica en els mutants de classe I i II, vam amplificar per PCR aquests gens per procedir a la seva seqüenciació. No obstant, fins i tot utilitzant diferents oligonucleòtids, vam ser incapaços d'obtenir cap producte de PCR, la qual cosa suggeria la presència de delecions en aquests gens. Amb l'objectiu de cartografiar aquestes possibles delecions, es van digerir els ADNs dels mutants de classe I i II amb diferents enzims de restricció i els fragments resultants es van analitzar per Southern blot utilitzant les sondes A i B (Figura 13). Els resultats de la hibridació van posar de manifest la presència d'una deleció d'aproximadament 4 kb a prop de la diana *AvaI* del gen *mg191* en el mutant de classe I i una deleció d'unes 6 kb a prop de la diana *ScaI* a l'extrem 5' del gen *mg192* (Figura 23).

Posteriorment, en base al mapa de restricció obtingut amb els Southern blots, es van dissenyar uns encebadors específics per amplificar selectivament per PCR els punts de sutura de les delecions de cada mutant (Figura 22). De forma consistent amb els resultats de les hibridacions, es van obtenir uns productes de PCR de 1,5 i 1,9 kb a partir d'ADN dels mutants de classe I i classe II, respectivament. Cal destacar que també es van poder amplificar unes bandes dèbils i de les mateixes mides a partir del ADN WT, suggerint que una petita part de població WT és també portadora d'aquestes delecions. Aquest fet, reforça la idea que aquestes mutacions tenen una freqüència d'aparició molt elevada.

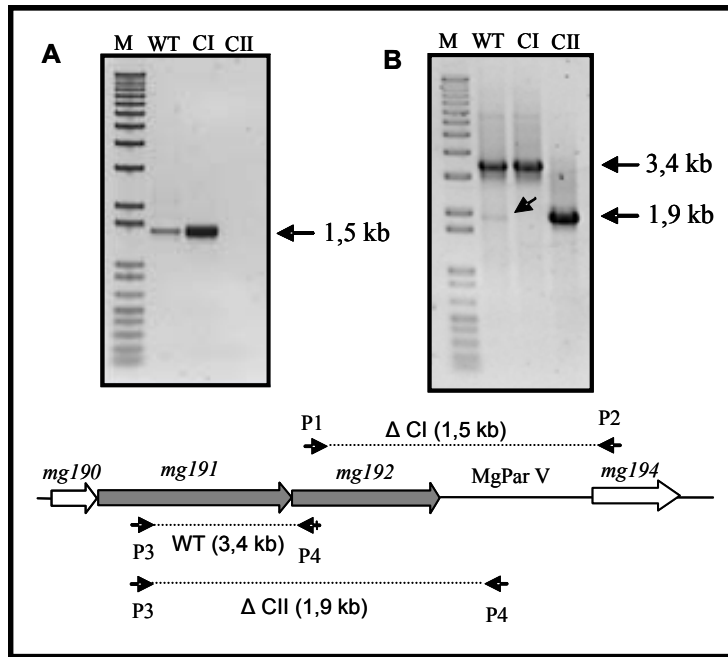


Figura 22. Amplificació del punt de sutura de la deleció en els mutants de classe I (CI) i classe II (CII).

(A). Producte de PCR obtingut amb la parella d'encebadors P1 (5' mg192N-t) i P2 (3' MG194N-t) per amplificar el punt de sutura de la deleció del mutant de CI

(B). Productes de PCR obtingut amb la parella d'encebadors P3 (5' SP140) i P4 (3' downmg192) per amplificar el punt de sutura de la deleció del mutant de CII. La banda de 1,9 kb correspon al producte que inclou el punt de sutura del mutant de classe II mentre que la banda de 3,4 kb, correspon a un producte obtingut per una hibridació no específica a la base 226247 del genoma de *M. genitalium*, del encebador P4. Les coordenades es refereixen al número d'accés NC.000908 de la base de dades del NCBI. M, representa el marcador de ADN 1 kb plus DNA ladder marker.

La seqüenciació del producte de PCR obtingut a partir del ADN del mutant de classe I va revelar una deleció en el gen *mg192* que anava de les bases 226524 a 230986 del genoma de *M. genitalium* (Figura 23). Per altra banda, en el mutant de classe II vam detectar una deleció de les bases 224176 a 230169 afectant tant el gen *mg191* com el gen *mg192* (Figura 23). Cal destacar que aquesta deleció introdueix un codó de stop prematur en la regió codificant de la P140, i que probablement explica l'origen de la banda de 85 kDa que es va detectar prèviament per Western blot en el mutant de classe II (veure secció III.1.5, Figura 17). Per altra banda, l'anàlisi de les regions flanquejants al punt de sutura indica que aquestes deleccions s'han originat per un succés de recombinació simple entre seqüències del operó MgPa i seqüències del MgPa island V, situat al extrem 3' d'aquest operó. Concretament, en el mutant de classe I les seqüències involucrades en la reorganització són les caixes R5 i R5', mentre que en el mutant de classe II són les caixes R3 i R3' (Figura 23).

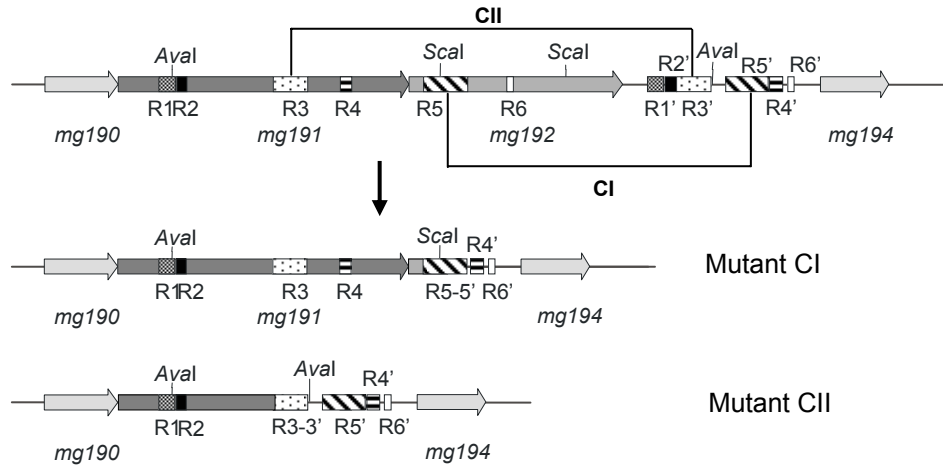


Figura 23. Representació esquemàtica de les regions de ADN repetitiu que es troben en l'operó MgPa de *M. genitalium* de la base 220000 a la base 234000, identificant les regions per on s'han produït els successos de recombinació homòloga que han generat els mutants de classe I i classe II. Les coordenades es refereixen al número d'accés NC.000908 de la base de dades del NCBI. Les caixes designades com a R1 a R6 es refereixen a les regions d'ADN repetitiu de l'operó MgPa, que també es troben en el MgPa island V (R1'-R6') situat immediatament després de l'operó MgPa. CI, mutant de classe I; CII, mutant de classe II.

La pèrdua permanent de la seqüència entre les dues caixes implicades en cada succés de recombinació es va confirmar en els dos mutants a través d'un Southern blot utilitzant la sonda C que inclou part de la seqüència delecionada (Figura 24).

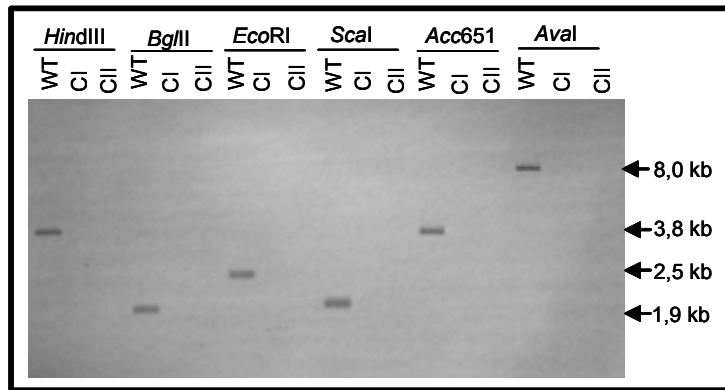


Figura 24. Southern blot utilitzant la sonda C, dels ADNs genòmics extrets de la soca salvatge G37 (WT) i els mutants de classe I (CI) i classe II (CII) digerits amb varis enzims de restricció.

III.2.3. Proposta d'un mecanisme regulador de "switch ON↔OFF" de l'adhesió cel·lular de *M. genitalium*

L'origen recombinatiu d'aquestes delecions irreversibles, ens va fer pensar si l'origen dels mutants de classe I i II es podria emmarcar dins d'un mecanisme més general per regular la presència de les proteïnes P140 i P110. La nostra hipòtesis consisteix, en que a través d'un succés de doble recombinació involucrant seqüències de dos caixes diferents dins d'un mateix MgPa island qualsevol i les corresponents seqüències homòlogues de l'operó MgPa, es podrien originar delecions reversibles afectant els gens codificants per la P140 i P110 (Figura 25A). En aquest cas, el succés de recombinació produiria una translocació de seqüències entre les regions participants, causant una delecio reversible d'una part de l'operó MgPa. Per comprovar l'existència d'aquestes reorganitzacions, es van dissenyar uns encebadors específics i per PCR es va testar la presència de cèl·lules portadores d'aquestes delecions reversibles dins la població WT. En aquest sentit, es va dissenyar un primer encebador (3'P140XbaI) situat entre les caixes R3 i R4 de l'operó MgPa i un segon encebador (5'mg260C-t) derivat de seqüència única situada al extrem 3' del gen *mg260*, el qual està situat en el extrem 5' del MgPa island VII (escollit al atzar entre els 9 existents) (Figura 25A). Atès que els dos encebadors estan separats per 90 kb en el genoma, l'amplificació per PCR només es possible si un succés de doble recombinació transloca la seqüència corresponent del encebador 3'P140XbaI de l'operó MgPa al MgPa island VII. Aquest fet, es pot dur a terme per varies combinacions de successos de doble recombinació entre caixes de l'operó MgPa i les corresponents del MgPa island VII.

Com es mostra en la figura 25B, va ser possible amplificar un producte de PCR de 1,5 kb a partir d'ADN genòmic de la soca WT. La mida d'aquest producte és compatible amb un succés de doble recombinació entre la caixa R3 i les caixes R4, R5 o R6 de l'operó MgPa i les caixes corresponents del MgPa island VII. No obstant, donada la mida major de la caixa R5, caldria esperar que la doble recombinació es donés en major freqüència entre les caixes R3 i R5. Per descartar que aquest producte de PCR sigui origen d'una inespecificitat, es va utilitzar com a control negatiu ADN genòmic d'un mutant $\Delta mg191$ on s'ha deleccionat el gen *mg191* i per tant les seqüències per on s'espera la recombinació. En aquest cas, com calia esperar no va ser possible amplificar cap producte de PCR (Figura 25B). Posteriorment, la seqüenciació del producte de PCR

de 1,5 kb va confirmar el seu origen específic i que el succés de recombinació s'havia produït efectivament per la caixa R3. Per tant, aquest resultat demostra la translocació de seqüències de l'operó MgPa a un MgPa island particular i suggereix la presència en la població WT, de cèl·lules amb un fenotip reversible pel que fa a la seva capacitat d'adhesió cel·lular. Aquesta heterogenicitat poblacional podria ser fruit de l'existència d'un mecanisme general regulador de "switch ON↔OFF" de l'expressió de les adhesines P140 i P110 de *M. genitalium*.

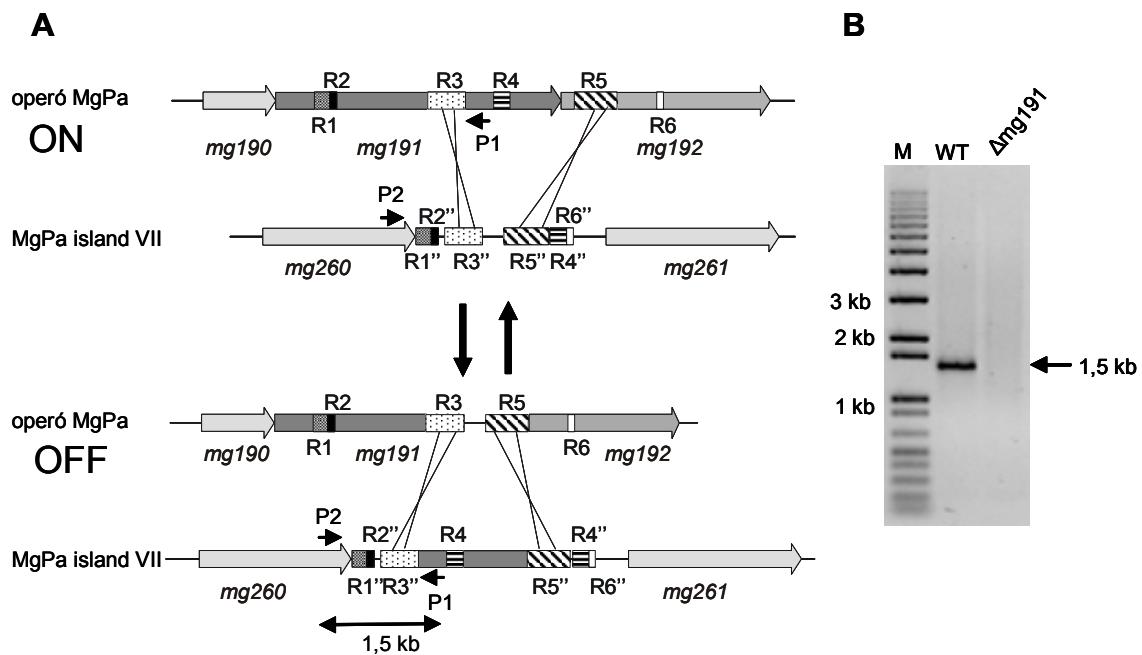


Figura 25. Translocació de seqüències de l'operó MgPa als MgPa islands de *M. genitalium*.

(A). Representació esquemàtica il·lustrant com un succés de doble recombinació homòloga entre les caixes R3-R3'' i R5-R5'' pot translocar, de manera reversible, seqüències de l'operó MgPa (de la base 220000 a la 230000) a l'operó MgPa VII (de la base 310000 a la 319000) situat a 90 kb de l'extrem 3' de l'operó MgPa. Les coordenades es refereixen al número d'accés NC.000908 de la base de dades del NCBI. Les caixes designades com a R1 a R6 es refereixen a les regions d'ADN repetitiu de l'operó MgPa que també es troben en el MgPa island VII (R1''-R6''). P1 i P2 indiquen la posició dels encebadors 3'P140XbaI i 5'mg260C-t, respectivament. També són possibles altres successos de doble recombinació, però no s'han inclòs en la figura per a una major claredat.

(B). Amplificació per PCR dels ADNs genòmics de la soca salvatge G37 (WT) i el mutant Δmg191 utilitzant els encebadors P1 i P2. El producte obtingut de 1,5 kb prové d'un succés de doble recombinació entre la caixa R3 i les caixes situades en posició 3' R4, R5 o R6 de l'operó MgPa i les caixes corresponents del MgPa island VII. M, representa el marcador de ADN 1 kb plus DNA ladder marker.

DISCUSSIÓ PART 2

PROPOSTA D'UN MECANISME REGULADOR DE “SWITCH ON↔OFF” DE L'ADHESIÓ CEL·LULAR DE *M. genitalium*

El segon objectiu del capítol 1 consistia en determinar la base genètica de dos tipus de mutants espontanis, designats com a classe II i classe I, tots dos deficientes en adhesió cel·lular (Mernaugh *et al.*, 1993). L'interès d'estudiar aquests mutants, radica en el fet que presenten un fenotip molt similar a l'exhibit pels mutants $\Delta mg191$ i $\Delta mg192$ respectivament, per la qual cosa era raonable pensar que els gens *mg191* i *mg192* podrien estar afectats d'alguna manera en aquests mutants. L'anàlisi genètic de l'operó MgPa d'un representant de cada tipus de mutant, ha revelat la presència de grans delecions. Aquestes delecions afecten el gen *mg192* en el mutant designat com a classe I, i els gens *mg191* i *mg192* en el mutant designat com a classe II. Mitjançant la reintroducció de còpies salvatges dels gens *mg192* o *mg191-mg192* hem estat capaços de restaurar tant el fenotip d'adhesió com el perfil proteic dels dos mutants, descartant així la presència de mutacions addicionals en altres proteïnes relacionades amb l'adhesió cel·lular. L'anàlisi genètic sembla indicar que aquestes delecions s'han originat per un succés de recombinació simple entre seqüències dels gens *mg191* o *mg192* i l'MgPa island situat immediatament després de l'operó MgPa. Com que les seqüències involucrades en la recombinació tenen una disposició directe una respecte l'altra, probablement es requereixi d'una configuració en forma de “loop” de la regió participant. De manera important, l'origen recombinatiu d'aquestes delecions proporciona una explicació raonable a l'elevada freqüència amb la que apareixen aquests mutants. Aquesta alta freqüència de mutació també s'ha descrit entre mutants espontanis en adhesió cel·lular aïllats a *M. pneumoniae* (Krause *et al.*, 1982; Su *et al.*, 1989). No obstant, l'origen d'aquests mutants no rau en delecions, sinó sempre en mutacions puntuals que produeixen desplaçament en el marc de lectura. Per altra banda, hem pogut detectar la presència en la població salvatge de cèl·lules portadores d'aquestes delecions (Figura 22), evidenciant la heterogeneïtat existent en una població dinàmica de micoplasma.

Com s'ha comentat en la introducció general, els MgPa islands són regions que contenen seqüències d'ADN repetitiu de l'operó MgPa. Aquestes regions, es troben disperses per tot el genoma de *M. genitalium* i semblen contribuir mitjançant recombinació a la variació antigènica de les proteïnes P140 i P110. Reforçant aquesta idea, l'anàlisi per RFLP de soques de *M. genitalium* obtingudes a partir d'aïllats clínics, ha revelat divergències en la seqüència d'ADN de la regió proximal del gen *mg192* (Musatovova *et al.*, 2003). De la mateixa manera, també hi ha estudis que evidencien variabilitat de seqüències en el gen *mg191* (Iverson-Cabral *et al.*, 2006). En aquest treball però, hem demostrat que més enllà de crear variabilitat de seqüència, l'element d'ADN repetitiu situat al extrem 3' de l'operó MgPa també pot generar delecions de tipus irreversible afectant l'expressió de P140 i P110. Aquest tipus de reordenacions probablement també es puguin donar entre els diferents elements repetitius, però en aquests casos la mida de les regions delecionades serien massa grans per permetre la viabilitat cel·lular. Com s'ha comentat prèviament, l'organela terminal i per tant la P140 i P110 tenen un paper fonamental en el parasitisme. Partint d'aquesta premissa, es raonable pensar que la pèrdua d'aquestes proteïnes comporti més aviat un desavantatge selectiu *in vivo* i per tant, que aquestes delecions només siguin viables en condicions de propagació *in vitro*. No obstant, sembla contradictori que un microorganisme amb un genoma tan minimitzat, mantingui redundàncies genòmiques en llocs del cromosoma que poden ser potencialment adversos per la integritat de l'operó MgPa. Per aquesta raó, creiem que el sistema de recombinació descrit en aquest treball en el qual es perden la P140 i/o P110, es podria entendre com un mecanisme irreversible de variació de fase que podria aportar avantatges importants a la població de *M. genitalium* (Henderson *et al.*, 1999; van der Woude i Baumler, 2004). Per exemple, la P140 i P110 estan considerades les proteïnes més immunogèniques de *M. genitalium* (Baseman *et al.*, 2004; Svenstrup *et al.*, 2006), per la qual cosa la seva pèrdua podria contribuir a l'evasió dels mecanismes de defensa del hoste i augmentar la persistència de la infecció. Aquestes pèrdues permanents de material genètic no són infreqüents en els micoplasmes. Per exemple, s'ha descrit que una de les conseqüències de la formació de gens *vsp* quimèrics a *Mycoplasma bovis* és la pèrdua irreversible de regions codificants (Lysnyansky *et al.*, 2001). Alternativament, també s'han descrit mecanismes reversibles de variació de fase en el gen *gapA* (homòleg al gen *mg191*) de *M. gallisepticum*, proporcionant en aquest patogen aviar capacitats adhesives variables que faciliten la

colonització consecutiva a varis hostes o a llocs secundaris dintre d'un mateix hoste (Winner *et al.*, 2003). D'una manera similar, en aquest treball hem demostrat l'existència d'un mecanisme reversible de "switch ON \leftrightarrow OFF" de l'expressió de les adhesines P140 i P110 de *M. genitalium*. Concretament, aquest mecanisme es podria basar en successos de doble recombinació entre seqüències de dos caixes diferents dins d'un mateix MgPa island i les corresponents seqüències homòlogues de l'operó MgPa. Reforçant aquesta hipòtesi, estudis posteriors han demostrat que efectivament, a *M. genitalium* les seqüències involucrades en la recombinació es transloquen recíprocament (Iverson-Cabral *et al.*, 2007), permetent en aquest cas la reversió. Aquest tipus de recombinació es rar en el món microbià, on normalment es produeix una translocació unidireccional de seqüències sempre en direcció al lloc d'expressió. Per tant, malgrat que queda per determinar si aquest fenomen de variació de fase succeeix *in vivo* a *M. genitalium*, proposem que aquestes reordenacions podrien aportar grans avantatges a nivell poblacional en la colonització, disseminació i perseverança d'aquest patògen humà.

IV. RESULTATS I DISCUSSIÓ:

CAPÍTOL 2

Estudi funcional de la proteïna MG312 de *M. genitalium* en motilitat, divisió cel·lular i desenvolupament de l'organela terminal

Aquest treball ha estat parcialment publicat. Veure Burgos *et al.*, 2007.

INTRODUCCIÓ

M. genitalium té l'habilitat de desplaçar-se per superfícies sòlides a través d'un mecanisme poc caracteritzat conegut com a "gliding motility". Aquest moviment sempre segueix la direcció de l'organela terminal i es creu que té implicacions directes en processos de colonització i posterior disseminació del microorganisme. Tanmateix, l'organela terminal sembla constituir el motor molecular responsable d'aquest moviment (Hasselbring i Krause, 2007b), reforçant la importància d'aquesta estructura en la patogènesi d'aquests micoplasmes.

La major part de proteïnes relacionades amb motilitat que s'han identificat fins al moment estan també implicades en l'adhesió del microorganisme, indicant que les maquinàries de motilitat i adhesió comparteixen elements comuns. No obstant, també s'han aconseguit identificar elements propis de la maquinària de motilitat, com són les proteïnes MG200 i MG386 (Pich *et al.*, 2006a). És interessant destacar, que aquestes proteïnes presenten unes seqüències riques en glicina i aminoàcids aromàtics conegudes com a motius EAGR (del acrònim en anglès Enriched in Aromatic and Glycine Residues). La presència d'aquests motius és exclusiva d'aquestes proteïnes i només es troben també en la proteïna MG312. En base aquestes observacions, s'ha suggerit que el motiu EAGR podria tenir un paper específic en motilitat i per tant que la proteïna MG312 també podria estar involucrada en el mecanisme de motilitat. Actualment es desconeix la funció específica de la proteïna MG312 a *M. genitalium*. No obstant, aquesta proteïna presenta un 32,9 % de similitud amb la proteïna HMW1 de *M. pneumoniae*, suggerint que ambdues proteïnes podrien tenir funcions similars. En estudis dirigits a identificar proteïnes de *M. pneumoniae* implicades en citadherència, es va aïllar un mutant (designat M6) caracteritzat per mutacions en el gens codificants de la proteïna HMW1 i P30 (Layh-Schmitt *et al.*, 1995). La caracterització d'aquest mutant ha confirmat que l'HMW1 contribueix a la citadherència i ha revelat que té un paper estructural en el manteniment de l'organela terminal (Hahn *et al.*, 1998). Per altra banda, altres treballs han aportat evidències que l'HMW1 és una proteïna perifèrica de membrana (Balish *et al.*, 2001) i que es localitza a l'organela terminal (Seto *et al.*, 2001; Stevens i Krause, 1991).

Les prediccions d'estructura indiquen que la proteïna HMW1 podria adoptar una disposició modular caracteritzada per dos dominis globulars separats per un domini central (Dirksen *et al.*, 1996). Els dominis N i C-terminal estan ben conservats en la proteïna MG312 de *M. genitalium* mentre que el domini central, caracteritzat per seqüències repetides riques en prolines i residus àcids, divergeix considerablement. Una anàlisi més detallada ha determinat que el domini C-terminal de l'HMW1 de *M. pneumoniae* és necessari per estabilitzar la proteïna HMW2, mantenir una morfologia normal i assistir el transport de l'adhesina P1 a l'organela terminal (Willby *et al.*, 2004). Sembla que algunes seqüències d'aquest C-terminal també promouen la pròpia degradació de l'HMW1 en absència de HMW2 (Popham *et al.*, 1997). Per tant, aquest domini té una implicació central en totes les funcions descrites fins ara per l'HMW1. Fins aquest moment, encara no ha estat determinada la implicació funcional del domini N-terminal que inclou el motiu EAGR.

En aquest estudi hem utilitzat la possibilitat de delecionar gens diana mitjançant recombinació homòloga, per tal de confirmar la funció estructural d'aquesta proteïna en el desenvolupament de l'organela terminal de *M. genitalium* i aportar nous coneixements sobre el seu possible paper en processos com la motilitat i divisió cel·lular. La construcció d'una sèrie de mutants amb delecions en diferents dominis del gen *mg312* ha fet possible determinar la contribució específica d'aquests dominis en aquestes funcions, posant de manifest la importància de les proteïnes integrants de l'organela terminal en la biologia dels micoplasmes.

RESULTATS

IV.1. OBTENCIÓ I CARACTERITZACIÓ D'UNA SOCA DEFECTIVA PEL GEN *mg312* A *M. genitalium*

IV.1.1. Obtenció d'una soca defectiva pel gen *mg312*

Per tal de delectonar el gen *mg312* de *M. genitalium* mitjançant recombinació homòloga, es va construir el plasmidi p Δ mg312. De manera similar al disseny comentat en la secció III.1.1, aquesta construcció consisteix en un plasmidi suïcida on s'ha clonat el marcador de selecció *tetM438*, en aquest cas envoltat de les regions flanquejants del gen *mg312*. Un succés de doble recombinació entre el plasmidi p Δ mg312 i el genoma de *M. genitalium* s'espera que origini una delectió de les bases 111 a les 3281 del gen *mg312*, que representa una delectió del 92,6% de la seva seqüència codificant. La seqüència delectonada serà reemplaçada pel marcador de selecció *tetM438*, que confereix resistència a tetraciclina a les cèl·lules transformades (Figura 26A).

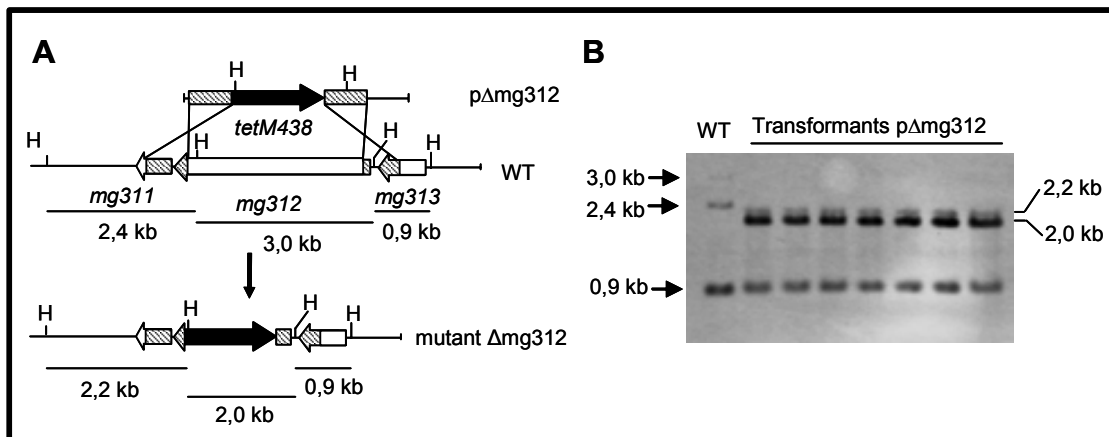


Figura 26. Recombinació homòloga al gen *mg312*.

(A). Delectió del gen *mg312* mitjançant un succés de doble recombinació entre els plasmidi p Δ mg312 i el genoma de *M. genitalium*. Les caixes ratllades representen les regions flanquejants del gen *mg312* involucrades en la recombinació. El gen marcador *tetM438* està representat per una fletxa negra. A sota estan representats els diferents fragments de restricció esperats després de digerir amb *Hind*III (H).

(B). Anàlisi per Southern blot dels ADN genòmics extrets de la soca salvatge G37 (WT) i dels transformants obtinguts amb el plasmidi p Δ mg312. Com a sonda s'han utilitzat les regions flanquejants del gen *mg312*.

Com a resultat de la transformació per electroporació de la soca salvatge G37 de *M. genitalium* amb el plasmidi p Δ mg312, es van obtenir 125 colònies resistents, cosa que representa una eficiència de transformació per cèl·lula viable de $2,75 \times 10^{-7}$. Aquesta eficiència de transformació és comparable a les obtingudes en el capítol 1 pels mutants Δ mg191 i Δ mg192. Posteriorment, es van picar varies colònies i es van propagar en medi SP-4 suplementant amb tetraciclina. Tots els transformants obtinguts mostraven un fenotip parcialment no adherent sobre el plàstic i s'observava una gran quantitat d'agregats en suspensió. Per confirmar l'absència del gen *mg312* en aquests transformants, es van analitzar els seus genomes per Southern blot. Concretament, l'ADN de la soca salvatge i dels diferents transformants es van digerir amb *Hind*III i els fragments resultants, prèviament separats electroforèticament i transferits a una membrana de niló, es van hibridar amb una sonda corresponent a les regions flanquejants del gen *mg312*. Com es mostra en la figura 26B, tots els transformants analitzats presentaven un patró d'hibridació compatible amb un succés de doble recombinació, demostrant la presència de la deleció desitjada. Aquests transformants es van designar mutants Δ mg312.

IV.1.2. Capacitat d'adhesió i perfil proteic dels mutants Δ mg312

Com s'ha comentat en l'apartat anterior, els mutants Δ mg312 exhibeixen defectes severs en la seva capacitat d'adhesió al plàstic de cultius cel·lulars. Aquesta deficiència es va mesurar quantitativament i es va determinar que només el 29,2 % de la població respecte la soca salvatge s'enganxa en algun moment al plàstic (Taula 3). Per altra banda, també es va analitzar qualitativament la capacitat d'adhesió cel·lular dels mutants Δ mg312 mitjançant l'assaig d'hemadsorció. Com es mostra en la figura 27, a diferència dels mutants Δ mg191 i Δ mg192, les colònies derivades del mutant Δ mg312 encara retenen certa capacitat d'unió als eritròcits a la perifèria però no al centre de la colònia.

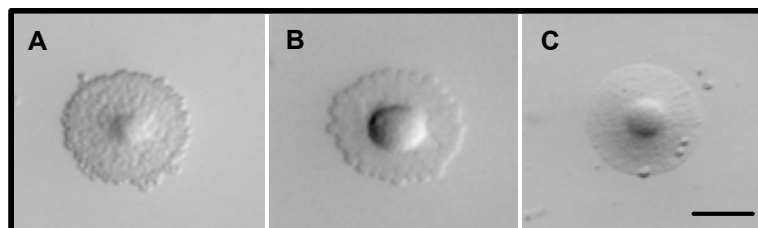


Figura 27. Assaig d'hemadsorció qualitatiu sobre colònies de micoplasma usant eritròcits humans.

(A) Soca salvatge G37. (B) Δ mg312. (C) Δ mg191. La barra representa 50 μ m.

El perfil proteic dels mutants $\Delta mg312$ es va analitzar mitjançant SDS-PAGE i Western blot. Per SDS-PAGE és va observar la pèrdua d'una banda aproximada de 220 kDa, que posteriorment es va identificar per MS i Western blot com la proteïna MG312 (Figura 28). Malgrat que la MG312 és una proteïna gran, el seu pes molecular teòric és de 130 kDa i no pas de 220 kDa. No obstant, aquesta migració anòmala en un gel d'acrilamida és bastant habitual entre les proteïnes del citoesquelet de micoplasma. Com s'ha descrit en altres casos, la riquesa en prolina en la composició d'aquestes proteïnes podria ser la causa de la reducció en la migració electroforètica (Proft *et al.*, 1995). Per altra banda, la pèrdua de la proteïna MG312 també està acompanyada per una reducció significativa en els nivells de P140 i P110, així com per una reducció més discreta en els nivells de MG386 i MG218 (Figura 28A). L'ús d'anticossos, també ens ha permès detectar una certa inestabilitat en les proteïnes MG217 i MG317, que són homòlogues a les proteïnes de citadherència P65 i HMW3 de *M. pneumoniae*, respectivament (Figura 28B).

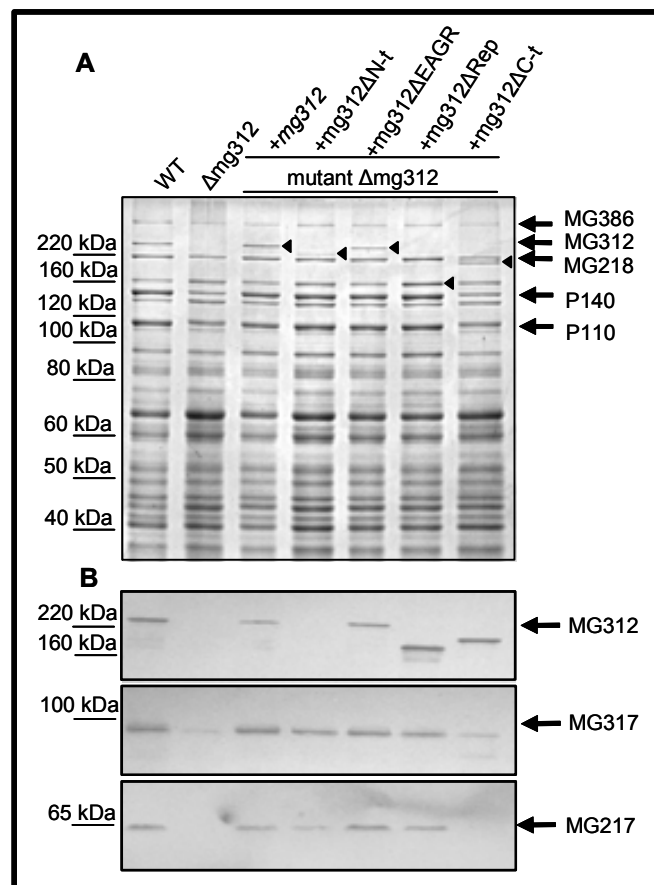


Figura 28. Perfil proteic de la soca salvatge G37 (WT), del mutant $\Delta mg312$ i de diferents transformants que expressen les construccions derivades del gen *mg312*.

(A). SDS-PAGE al 8% d'acrilamida. A la dreta s'identifiquen les proteïnes afectades per l'absència de MG312. Els triangles mostren l'expressió dels diferents constructes derivatius del gen *mg312*.

(B). Western blot utilitzant anticossos anti-HMW1 (MG312), anti-HMW3 (MG317) i anti-MG217.

IV.1.3. Morfologia cel·lular dels mutants Δ mg312

La morfologia cel·lular dels mutants Δ mg312 es va analitzar per SEM. Atès que els mutants Δ mg312 s'adhereixen amb dificultat al plàstic, la preparació de mostres per SEM va requerir l'ús de cubreobjectes tractats amb poly-L-lisina per promoure l'adhesió. Com s'observa en la figura 29A, els mutants Δ mg312 exhibeixen morfologies arrodonides i pleomòrfiques sense una organela terminal aparent, similar a la morfologia observada en els mutants Δ mg191 i Δ mg192 (veure secció III.1.6). Paral·lelament, també es va examinar la ultraestructura dels mutants Δ mg312 per TEM (Figura 29B). D'aquest estudi cal destacar que els mutants Δ mg312 presenten cossos cel·lulars de mida gran en comparació amb la soca salvatge. Per altra banda, malgrat que es van examinar múltiples talls, en cap moment es va poder apreciar la presència de l'eix electro-dens que sosté l'organela terminal.

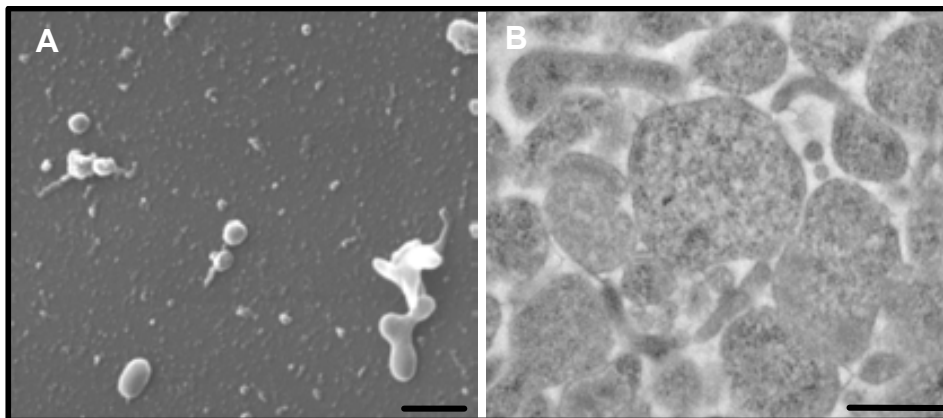


Figura 29. Anàlisi dels mutants Δ mg312 per SEM (A) i TEM (B). La barra d'augment correspon a una longitud de 0,5 μ m.

IV.1.4. Anàlisi de la motilitat dels mutants Δ mg312

En treballs anteriors, el nostre grup va desenvolupar un mètode que permet posar de manifest la capacitat mòbil de *M. genitalium* (Pich *et al.*, 2006a). Aquest mètode consisteix en adsorbir cèl·lules de micoplasma en plaques de cultiu cel·lular i cobrir-les posteriorment amb medi semisòlid (veure seccions VI.3.1 i VI.10). En aquestes condicions, la soca salvatge desenvolupa colònies amb nombrosos microsàtèl·lits, propietat que caracteritza les soques mòbils (Figura 30). Quan es va utilitzar aquest mètode per analitzar la capacitat mòbil del mutant Δ mg312, vàrem observar que les

colònies desenvolupades eren petites i amb una morfologia compacte, característiques típiques d'un mutant immòbil (Figura 30). Per altra banda, també es van observar nombroses colònies incloses en el agar, probablement derivades de cèl·lules desenganxades. Posteriorment, la capacitat mòbil del mutant $\Delta mg312$ es va examinar amb més detall per microcinematografia (Taula 3). Cal destacar que degut a la deficiència en adhesió d'aquest mutant, vàrem tenir dificultats a l'hora de trobar camps amb cèl·lules enganxades. A més, entre les cèl·lules adherides, la major part formaven agregats i sovint es desenganxaven del plàstic durant l'observació per acabar movent-se vigorosament degut al moviment brownià. No obstant, les cèl·lules individuals que romanien enganxades van restar completament immòbils durant el període d'observació, demostrant la implicació del gen *mg312* en la motilitat de *M. genitalium*.

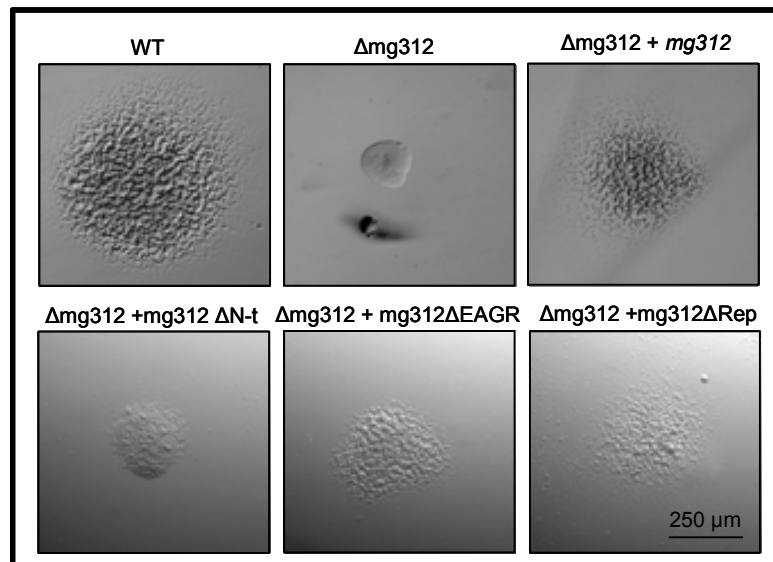


Figura 30. Morfologia de les colònies desenvolupades per la soca salvatge G37 (WT), mutant $\Delta mg312$ i de diferents transformants expressant diverses construccions derivades del gen *mg312* en medi SP-4 semisòlid.

IV.2. ANÀLISI FUNCIONAL DE DIFERENTS DOMINIS DE LA PROTEÏNA MG312

IV.2.1. Disseny i obtenció de constructes derivatius del gen *mg312*

La implicació de la proteïna MG312 en el mecanisme de motilitat sembla evident segons s'ha demostrat en el paràgraf anterior. No obstant, queda per determinar si la contribució d'aquesta proteïna en motilitat ve derivada per la pèrdua d'òrganel·la terminal o bé, alternativament, també hi juga un paper específic i independent. Com

s'ha comentat en la introducció d'aquest capítol, el domini C-terminal de l'HMW1 de *M. pneumoniae* ha estat implicat en totes les funcions atribuïdes a l'HMW1 com són l'adherència i morfologia cel·lular. En aquest treball hem volgut determinar si aquestes funcions i el nou paper en motilitat per part de la proteïna MG312, podrien localitzar-se en dominis separats de la proteïna, tal com suggereix l'estructura modular i la presència del motiu EAGR en el N-terminal (Figura 31A).

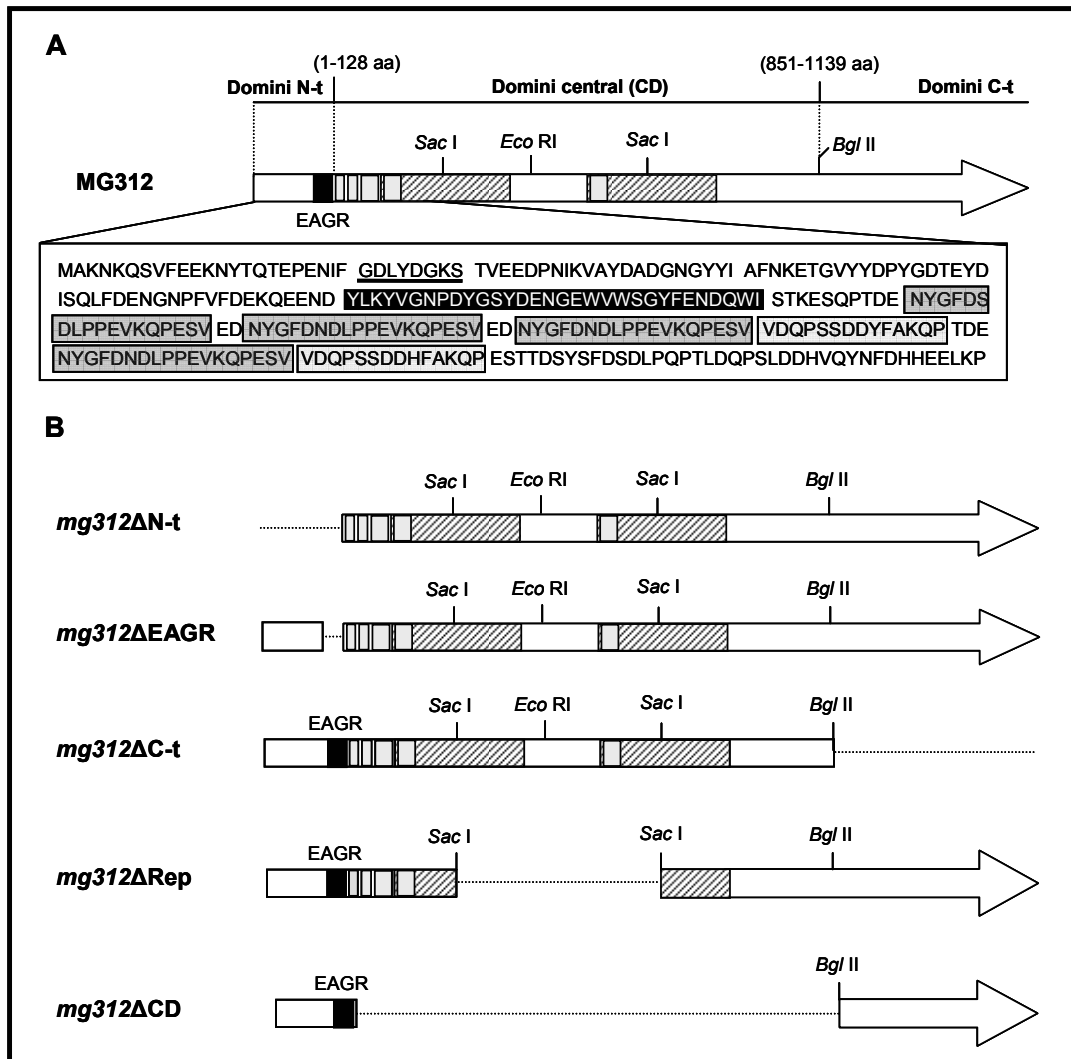


Figura 31. Representació esquemàtica de l'estructura modular de la proteïna MG312 (A) i disseny de les construccions derivades del gen *mg312* (B).

La caixa EAGR està indicada en negre. El motiu Walker A està subratllat. Les caixes ratllades indiquen les dos grans regions repetides dintre el domini central de la proteïna MG312. Les caixes grises indiquen les seqüències repetides més petites trobades a l'inici del domini central. També s'indiquen la seqüència d'aminoàcids del domini N-terminal i les repeticions petites de l'inici del domini central. Les regions delecionades en les diferents construccions estan representades per línies discontinues.

Per respondre aquestes qüestions es van construir diversos derivatius del gen *mg312*, cadascun incorporant diferents delecions (Figura 31B). Aquestes construccions s'han

dissenyat basant-nos en l'estructura modular descrita per l'HMW1 (Dirksen *et al.*, 1996), la qual es conserva perfectament en la proteïna MG312. En base a la seqüència d'aminoàcids, ambdues proteïnes es podrien separar en tres dominis; un domini N-terminal que conté el motiu EAGR, un domini central i un domini C-terminal (Figura 31A). Els dominis N i C- terminals estan especialment ben conservats en les dues espècies, però no és el cas del domini central. Concretament, en aquest treball hem definit el N-terminal del MG312 dels aminoàcids Met1 al Glu128 i el domini C-terminal del aminoàcid Leu851 a la Tyr1139. El domini central del MG312 està caracteritzat per dos grans repeticions no consecutives de 196 aminoàcids cadascuna. Aquestes repeticions són pràcticament perfectes tant a nivell de seqüència de nucleòtids com d'aminoàcids i només es distingeixen en que l'adenina 934 en la primera repetició és una guanina en la segona, originant un canvi d'aminoàcid de Lys a Glu. Per altra banda, en la primera secció del domini central també trobem diversos motius repetits de 18 o 32 aminoàcids (Figura 31A). Com es mostra en la figura 31B, es va optar per construir cinc derivatius diferents del gen *mg312*. Concretament, les construccions, *mg312* Δ N-t i *mg312* Δ C-t presenten delecions del N i C-terminal respectivament, mentre que la construcció *mg312* Δ CD incorpora una deleció de tot el domini central. Respecte aquest domini central, es va dissenyar una segona construcció delecionant només una de les grans repeticions i la regió que les separa (*mg312* Δ Rep). Per últim, es va dissenyar una construcció amb una deleció específica del motiu EAGR (*mg312* Δ EAGR) per determinar així la seva implicació específica.

En el decurs de la construcció dels diferents derivatius es va produir un fet destacable. Quan es va amplificar per PCR la totalitat de la regió codificant del gen *mg312*, a més de la banda esperada de 3,4 kb també es va obtenir de manera reproducible una banda minoritària d'uns 2,5 kb (Figura 32). No obstant, aquesta banda no apareixia quan s'utilitzava ADN del mutant Δ *mg312*, demostrant l'especificat de la reacció i suggerint que l'origen d'aquesta banda podria estar relacionat amb el gen *mg312*. De fet, la mida d'aquesta banda és compatible amb l'existència de delecions en el gen *mg312*, originades a través de successos de recombinació homòloga involucrant les grans regions repetides del domini central. Aquesta possibilitat es va confirmar seqüenciant el fragment d'ADN corresponent en aquesta banda de 2,5 kb, demostrant així la presència

de mutants exhibint delecions que són anàlogues a la introduïda en el derivatiu *mg312* Δ Rep, en la població de *M. genitalium*.

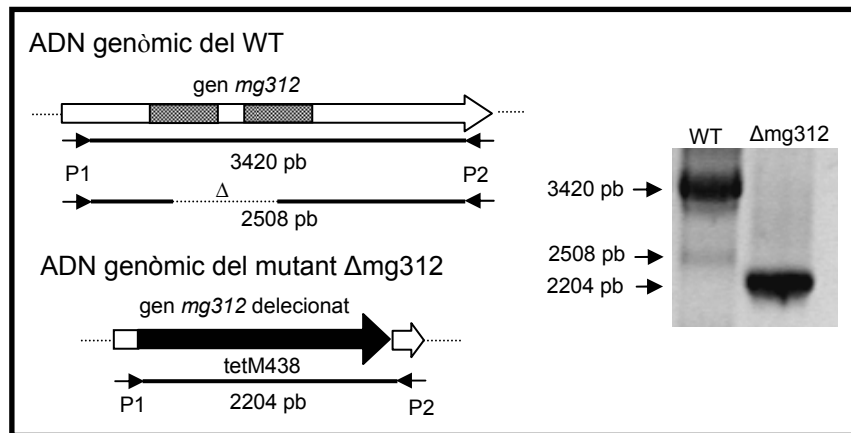


Figura 32. Presència en la població salvatge de mutants amb delecions en el gen *mg312*.

A l'esquerre es mostra una representació esquemàtica de les bandes esperades del PCR amb els encebadors P1 (5' *mg312*) i P2 (3' *mg312*) a partir del ADN genòmic de la soca salvatge G37 (WT) i del mutant Δ *mg312*. A la dreta es mostren els productes amplificats.

IV.2.2. Anàlisi funcional dels diferents constructes derivatius del gen *mg312*

Per determinar la contribució dels diferents dominis en la funcionalitat de la proteïna MG312, es van introduir via transposó els diferents derivatius del gen *mg312* en el mutant Δ *mg312* (veure secció VI.3.3). D'aquests experiments, cal destacar l'increment en un ordre de magnitud respecte la soca salvatge en les freqüències de transformació obtingudes. Cal recordar, que en experiments previs ja es van obtenir freqüències amb increments similars (veure secció III.1.1). Malgrat encara no s'ha determinat la causa, aquests resultats suggereixen un origen comú. En aquest sentit, suggerim que els canvis morfològics associats en aquests mutants podrien alterar d'alguna forma l'estat de la membrana, i això podria facilitar l'accés i la incorporació d'ADN exogen.

Tornant a l'anàlisi dels diferents constructes, cal advertir que es van analitzar varis transformants per controlar possibles variacions associades a la posició de la inserció del transposó en el genoma dels transformants. Com era d'esperar, la introducció de la còpia salvatge del gen *mg312* en el mutant Δ *mg312* va restaurar el perfil proteic (Figura 28). Concretament, els nivells d'expressió de la proteïna recombinant són similars a la proteïna resident de la soca salvatge, mentre que els nivells de les altres proteïnes afectades també queden restablerts. De manera important, també es va restaurar la

capacitat d'adhesió al plàstic dels flascons de cultiu cel·lulars, així com la formació de l'organela terminal (Figura 33). El mateix va passar amb els derivatius *mg312ΔEAGR* i *mg312ΔRep* (Figures 28 i 33). En aquest cas, l'anàlisi del perfil proteic va mostrar que les proteïnes recombinants lògicament migren amb una major mobilitat electroforètica (Figura 28). En conjunt, aquests resultats indiquen que el motiu EAGR no és necessari per restaurar les propietats d'adhesió i morfologia cel·lular; i que aquestes funcions no es veuen particularment afectades per l'eliminació d'una de les seqüències repetides del domini central.

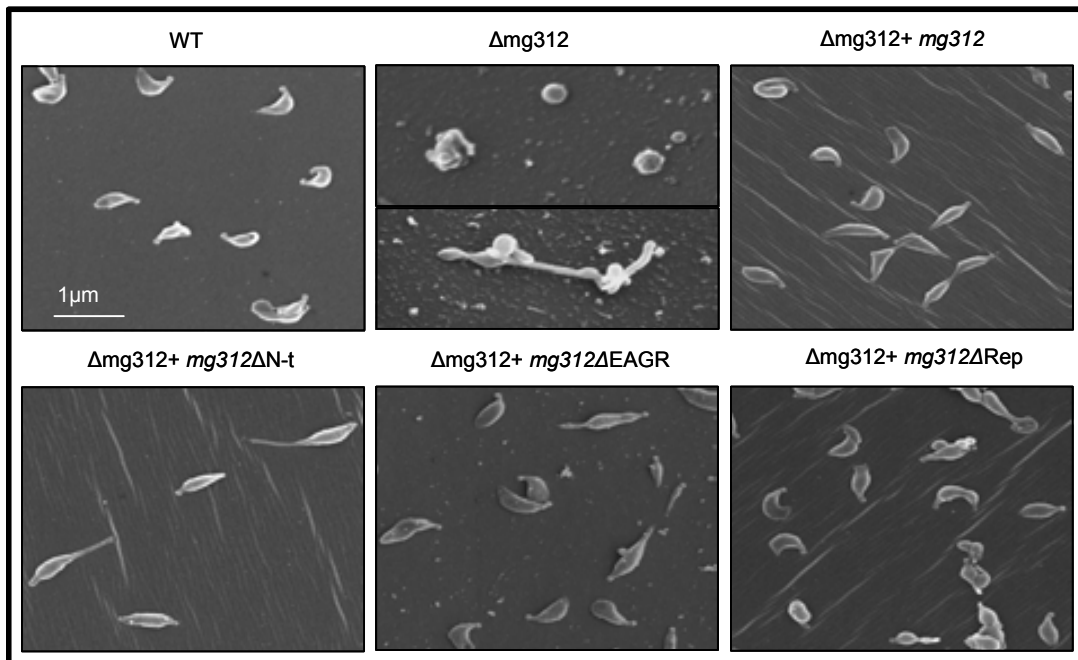


Figura 33. Anàlisi per SEM de la soca salvatge G37 (WT), mutant $\Delta mg312$ i de diferents transformants expressant diverses construccions derivades del gen *mg312*.

En el cas del derivatiu amb la deleció en el N-terminal vam observar per SDS-PAGE una certa inestabilitat de la proteïna recombinant en tots els transformants analitzats (Figura 28 A). A més, vam ser incapaços de detectar aquesta banda per Western blot (Figura 28 B), indicant que els anticossos utilitzats probablement reaccionen específicament contra el domini N-terminal. Per altra banda, la inestabilitat del derivatiu *mg312ΔN-t* podria indicar que l'absència del domini N-terminal afecta parcialment la estabilitat global de la proteïna. Malgrat aquesta inestabilitat, el derivatiu *mg312ΔN-t* és capaç de restaurar pràcticament a nivells normals la totalitat del perfil proteic, capacitat d'adhesió i la formació d'organela terminal, indicant que els primers 128 aminoàcids de la proteïna MG312 no són especialment importants per aquestes funcions (Figures 28 i

33). No obstant, cal destacar algunes diferències respecte la morfologia cel·lular d'aquests transformants. Encara que les cèl·lules restauren el desenvolupament de l'organela terminal, es va apreciar un increment significatiu en el nombre de cèl·lules formant parelles o exhibint filaments llargs en la part posterior (Figura 33).

Per últim, malgrat que es van examinar múltiples transformants, les construccions *mg312ΔC-t* i *mg312ΔCD* van fallar en la restauració del fenotip del mutant $\Delta mg312$, tant a nivell d'adhesió com en el restabliment del perfil proteic (Figura 28). En el cas del gen derivatiu *mg312ΔC-t*, cal destacar que s'expressa de manera estable (Figura 28), descartant per tant defectes en la transcripció o traducció del constructe. Aquests resultats posen de manifest la importància del domini C-terminal de l'MG312 en la citadherència així com en el manteniment estructural de l'organela terminal i les seves proteïnes integrants. Per altra banda, no es va apreciar nivells detectables del derivatiu *mg312ΔCD* ni per Western blot ni per SDS-PAGE, indicant probablement que tot el domini central és essencial per mantenir l'estabilitat de la proteïna MG312.

IV.2.3. Contribució de diferents dominis de la proteïna MG312 en la motilitat

Com s'ha descrit en l'apartat anterior, ni els primers 128 aminoàcids, ni les repeticions llargues del domini central de la proteïna MG312 semblen tenir un paper essencial en la formació de l'organela terminal o en l'adhesió. En aquest sentit, posteriorment vam examinar la possibilitat que algun d'aquests dominis si tingués una implicació funcional en motilitat. Amb aquest objectiu, via microcinematografia es va analitzar la motilitat dels transformants que expressen els derivatius *mg312ΔN-t*, *mg312ΔRep* i *mg312ΔEAGR*. Com a control es van analitzar també transformants que expressaven la còpia salvatge. En particular, aquests transformants es movien a una velocitat del 98,4% en relació la soca WT i exhibien una proporció de cèl·lules mòbils del 84,9% també respecte la soca WT. De la mateixa manera, els transformants que expressaven el derivatiu *mg312ΔRep* es movien a velocitats aproximades del 85,7% respecte la soca WT i amb una freqüència de cèl·lules mòbils relativa del 73,1%. Les diferències més notables es van observar en els transformants que expressen els derivatius *mg312ΔN-t* i *mg312ΔEAGR*. En aquest cas es va detectar una disminució significativa en les velocitats de gliding, sent respectivament només del 40,1% i 59% en relació a la soca salvatge. Per altra banda, la freqüència mòbil relativa observada en els transformants

*mg312*ΔEAGR és del 72,7% mentre que es redueix gairebé a la meitat en els transformants que incorporen la deleció en el N-terminal (Taula 3). Cal destacar, que aquests resultats estan en concordança amb la morfologia de les colònies exhibides pels diferents transformants quan aquests es creixen adherits a plàstic i recoberts amb medi semisòlid (Figura 30). En aquestes condicions, la còpia WT del gen *mg312* i el derivatiu *mg312*ΔRep van restaurar la formació de microsatèl·lits. En els transformants que expressen el derivatiu *mg312*ΔEAGR, malgrat que es va observar la formació de microsatèl·lits en la zona perifèrica, encara existia una certa disposició compacte en el centre de la colònia. Finalment, els transformants que expressen el derivatiu *mg312*ΔN-t són els que van mostrar un menor grau de motilitat, exhibint colònies amb una textura granulada i amb morfologies compactes sense microsatèl·lits.

Taula 3. Caracterització de la motilitat cel·lular i la capacitat d'adhesió al plàstic.

Soca	Velocitat de desplaçament (%)	Cèl·lules mòbils (%)	Capacitat d'adhesió al plàstic (%)
WT	100 ± 13,1	100	100 ± 3,9
Δ <i>mg312</i>	0	0	29,2 ± 5,0
Δ <i>mg312</i> + <i>mg312</i>	98,4 ± 18,2	84,8	84,7 ± 7,9
Δ <i>mg312</i> + <i>mg312</i> ΔRep	85,7 ± 18,9	73,1	109,9 ± 6,9
Δ <i>mg312</i> + <i>mg312</i> ΔEAGR	59,0 ± 21,8	72,7	90,3 ± 2,5
Δ <i>mg312</i> + <i>mg312</i> ΔN-t	40,1 ± 17,5	55,4	82,5 ± 6,9

Tots els valors estan normalitzats respecte a la soca salvatge G37 (WT). (± desviació estàndard)

L'adhesió és un requisit necessari perquè els micoplasmes puguin exhibir motilitat. Per tal de descartar que, la possibilitat d'una manca d'adhesió, no detectada microscòpicament, pogués ser l'origen real de les deficiències observades en motilitat, vàrem examinar de manera quantitativa la capacitat d'adhesió al plàstic de cadascun d'aquests transformants. Com s'indica en la taula 3, els diferents transformants exhibien una capacitat d'adhesió al plàstic relativa a la soca salvatge al voltant d'un 82,5% i 90,3%. L'excepció la trobem en els transformants portadors del derivatiu *mg312*ΔRep, on es va observar un increment relatiu en la capacitat d'adhesió del 109,9%. Una altra dada a destacar és que la introducció de la còpia WT del gen *mg312* no restaurava completament l'adhesió al plàstic (84,7% respecte el WT). Aquest fet podria explicar-se per les diferències entre la seqüència promotora utilitzada en aquest treball per expressar els diferents gens recombinants i la seqüència promotora original que promou de forma natural l'expressió del gen *mg312*. Alternativament i d'acord amb resultats previs,

l'expressió del gen de resistència *aac(6')-aph(2'')* pot causar certa toxicitat (Pich *et al.*, 2006b), potser afectant lleument la capacitat d'adhesió d'aquests transformants. Malgrat aquest inconvenient, cal destacar que la capacitat d'adhesió dels transformants expressant el gens recombinants *mg312ΔN-t* i *mg312ΔEAGR* es comparable a la dels transformants expressant la còpia salvatge. Per tant, les deficiències observades en aquests transformants no poden ser només conseqüència de defectes en l'adhesió al plàstic. En aquest sentit, aquest resultat suggereixen més aviat, que el domini N-terminal i en particular el motiu EAGR de la proteïna MG312 estan implicats d'alguna forma en la motilitat de *M. genitalium*.

IV.2.4. Presència d'un motiu Walker A en el domini N-terminal de la proteïna MG312: implicacions funcionals

Un examen més detallat dels primers 128 aminoàcids de la proteïna MG312 va revelar també l'existència d'un possible motiu d'unió a nucleòtid (G24DLYDGKS31) conegut com a P-loop o Walker A box (Figura 31A). Aquest motiu té una seqüència consens GXXXXGKT/S on X és qualsevol aminoàcid (Walker *et al.*, 1982). Atès que aquest motiu està present en la majoria de proteïnes que uneixen i hidrolitzen ATP, vam voler analitzar la possible contribució d'aquest motiu en el fenotip exhibit pels transformants que expressen el derivatiu *mg312ΔN-t*. Per aquesta finalitat, es van dissenyar dos construccions més, designades com a *mg312ΔWA* i *mg312WA(GxS)*. En la primera construcció es va deletar completament tot el motiu Walker A del gen *mg312* i en la segona, més conservadora, es va introduir només una mutació puntual canviant el residu Gly29 per una Ser. S'ha descrit que mutacions no conservatives en aquest residu afecten a la funcionalitat del motiu Walker A (Turner *et al.*, 1993). Posteriorment, aquestes construccions es van introduir separatament via transposó en el mutant $\Delta mg312$ i es van analitzar els transformants resultants.

Com calia esperar, la introducció dels dos derivatius nous va restablir el perfil proteic (Figura 34A) i la capacitat d'adhesió al plàstic. De la mateixa manera, l'expressió d'aquests gens també va restaurar la formació de l'organela terminal tal com es demostra per SEM (Figura 34B). Cal matisar però, que es van observar cèl·lules amb morfologies alterades similars a les detectades en els transformants que expressaven el derivatiu *mg312ΔN-t*. Concretament, es va observar una proporció significativa de

cèl·lules formant parelles unides per un filament, i altres amb morfologies allargades i amb dos organeles terminals. En aquest cas, no va ser tant evident la presència de cèl·lules amb filaments llargs en la part posterior com en el cas dels transformants *mg312ΔN-t* (Figura 33).

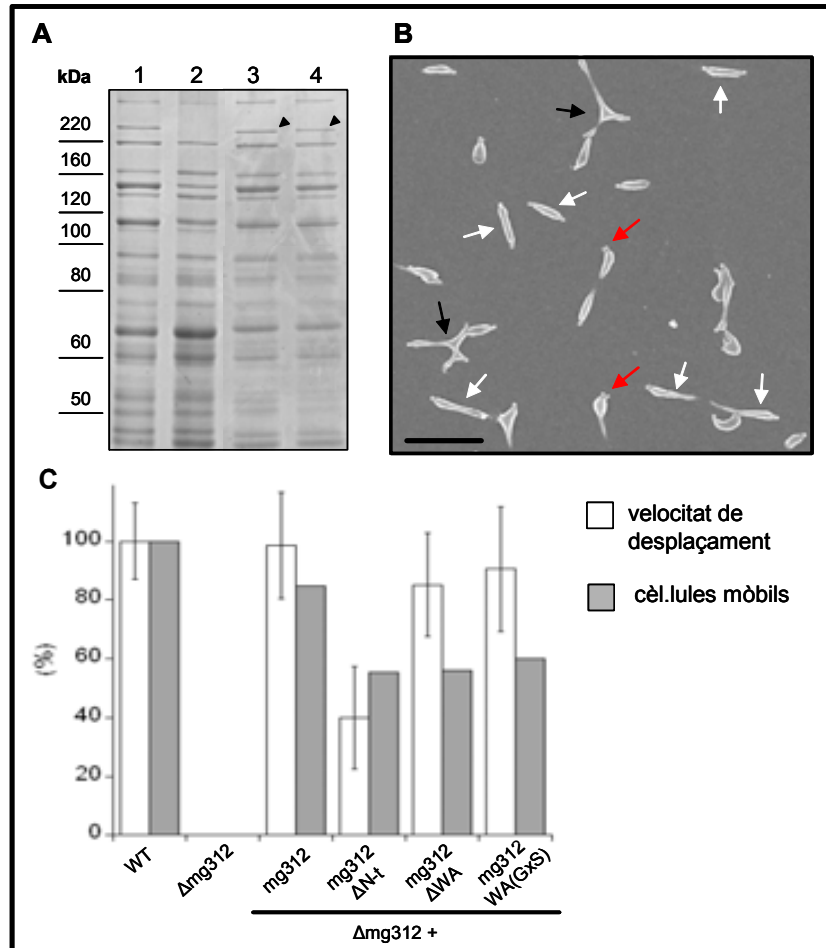


Figura 34. Caracterització de mutants del motiu Walker A.

(A). SDS-PAGE al 8% d'acrilamida mostrant el perfil proteic de la soca salvatge G37 (carril 1), del mutant $\Delta mg312$ (carril 2) i dels transformants *mg312ΔWA* (carril 3) i *mg312WA(GxS)* (carril 4). Els triangles mostren l'expressió dels derivatius introduïts.

(B). Imatge representativa de SEM mostrant la morfologia dels transformants *mg312ΔWA* i *mg312WA(GxS)*. Les fletxes blanques mostren cèl·lules en fase de citocinesi o just acabades de dividir, les vermelles indiquen la presència de dos organeles terminals en un mateix pol mentre que les fletxes negres mostren cèl·lules amb problemes per acabar la divisió cel·lular. La barra correspon a una longitud de 2 μm .

(C). Implicació del motiu Walker A en la motilitat cel·lular. Els valors estan normalitzats respecte la soca salvatge.

Per altra banda, també es va analitzar per microcinematografia la motilitat dels transformants *mg312ΔWA* i *mg312WA(GxS)*. Com s'il·lustra en la figura 34C, els transformants exhibeixen velocitats de desplaçament comparables a les de la soca

salvatge. No obstant, en els dos casos es va observar un increment significatiu en la proporció de cèl·lules immòbils en relació a la soca salvatge i comparable a la freqüència observada d'aquestes cèl·lules en els transformants *mg312ΔN-t*.

IV.3. ACCESSIBILITAT DE LA PROTEÏNA MG312 A LA SUPERFÍCIE

Per investigar amb més detall el rol de la proteïna MG312, vam examinar la possible accessibilitat d'aquesta proteïna a la superfície cel·lular. Es va optar per un assaig de proteòlisi limitada amb proteïnasa K de cèl·lules intactes de *M. genitalium*. Com a control intern del tractament, primer es va analitzar per Western blot l'accessibilitat de l'adhesina P140. Aquesta proteïna disposa de varis dominis transmembrana i prèviament ja s'ha demostrat la seva exposició extracel·lular (Hu *et al.*, 1987). Com s'observa en la figura 35A, la proteïna P140 és digereix completament en només 30 minuts de tractament. En contraposició, la proteïna MG312 roman resistent al tall fins i tot després d'una hora de tractament, suggerint per tant una localització intracel·lular (Figura 35B). No obstant, no es pot excloure la possibilitat que una petita proporció de molècules de MG312 sigui accessible a la proteïnasa K, però no en quantitat suficients per ser detectades per Western blot. Alternativament, la proteïna MG312 podria també estar associada fortament amb altres proteïnes a la superfície cel·lular, quedant protegida d'aquesta forma del tall proteolític de la proteïnasa K.

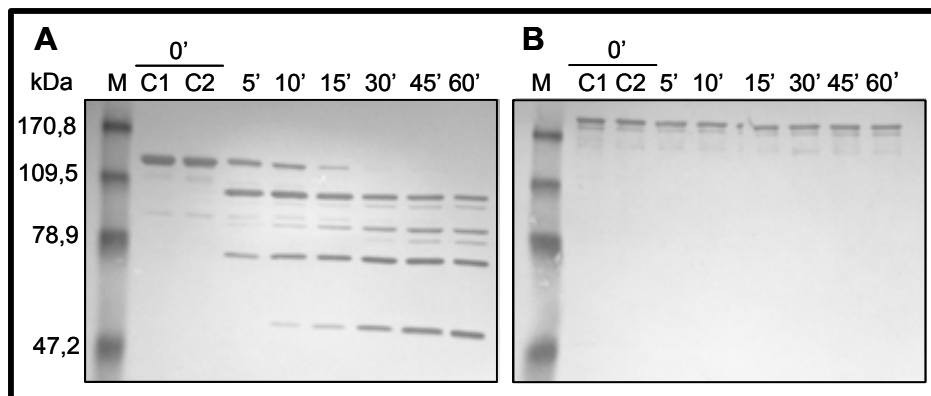


Figura 35. Assaig de proteòlisi limitada amb proteïnasa K de cèl·lules intactes de *M. genitalium*.

Es van incubar cèl·lules intactes de *M. genitalium* durant els temps indicats amb proteïnasa K. Les reaccions es van aturar amb 1mM PMSF. Posteriorment, el perfil proteic de les cèl·lules tractades es va analitzar per Western blot utilitzant anticossos anti-P140 (A) o anti-HMW1 (ortòleg MG312) (B). C1 i C2 corresponen a controls. C1 és el perfil proteic de cèl·lules sense tractar, mentre que C2 correspon al perfil proteic de cèl·lules tractades però on prèviament s'ha afegit 1mM PMSF. M correspon al marcador de proteïnes "pre-stained" d'invitrogen.

IV.4. EXPRESSIÓ RECOMBINANT I CARACTERITZACIÓ DE LA PROTEÏNA MG312

IV.4.1. Expressió recombinant de la proteïna MG312

Per realitzar futurs estudis de tipus estructural i bioquímic sobre la proteïna MG312, ens vam plantejar expressar i purificar la proteïna MG312 de manera recombinant. Cal advertir que fins ara cap component de l'organela terminal s'ha aconseguit expressar i purificar amb èxit. Aquesta limitació ve determinada principalment pel caràcter insoluble de les proteïnes que componen aquesta estructura. A més, cal tenir present que en condicions normals, la majoria d'aquestes proteïnes mantenen interaccions que faciliten la seva integració en estructures d'ordre superior com és el cas de l'eix electrodens.

Com s'ha comentat en la introducció, el codi genètic dels micoplasmes té la particularitat que el codó UGA que sol actuar com a senyal d'aturada de la traducció, codifica per l'aminoàcid triptòfan. Per aquest motiu, els codons UGA de la proteïna MG312 es van haver de substituir pel codó UGG mitjançant mutagènesi dirigida. Malgrat tractar-se d'una proteïna de 130 kDa, la seqüència d'aminoàcids de la proteïna MG312 conté afortunadament només un codó UGA situat en la regió N-terminal (per detalls, veure secció VI.4.11). Com a sistema d'expressió, es va triar el vector pET21 (Novagen). Per motius relacionats amb les dianes de clonatge es va triar el pET21d que incorpora una cua d'histidines al C-terminal de la proteïna i que permetrà la seva posterior purificació a través d'una cromatografia d'afinitat pel níquel. Un cop clonada la seqüència codificant de la proteïna MG312 en el pET21d (per detalls, veure secció VI.4.11), es va procedir a seqüenciar-la per descartar la presència de mutacions no desitjades en la seqüència codificant. Es va utilitzar la soca d'*E.coli* BL21(DE3) com a hoste i unes condicions estàndards d'expressió (per detalls, veure secció VI.6.6). En aquest punt, comentar que el rendiment de producció de la proteïna recombinant no millorava després de la primera hora post-inducció amb 1mM IPTG. De fet, es va detectar que el creixement del cultiu s'aturava entre la primera i segona hora després de la inducció, probablement com a conseqüència d'una certa toxicitat de la proteïna. Per aquest motiu, es va decidir no perllongar el període d'expressió més enllà de les dues hores.

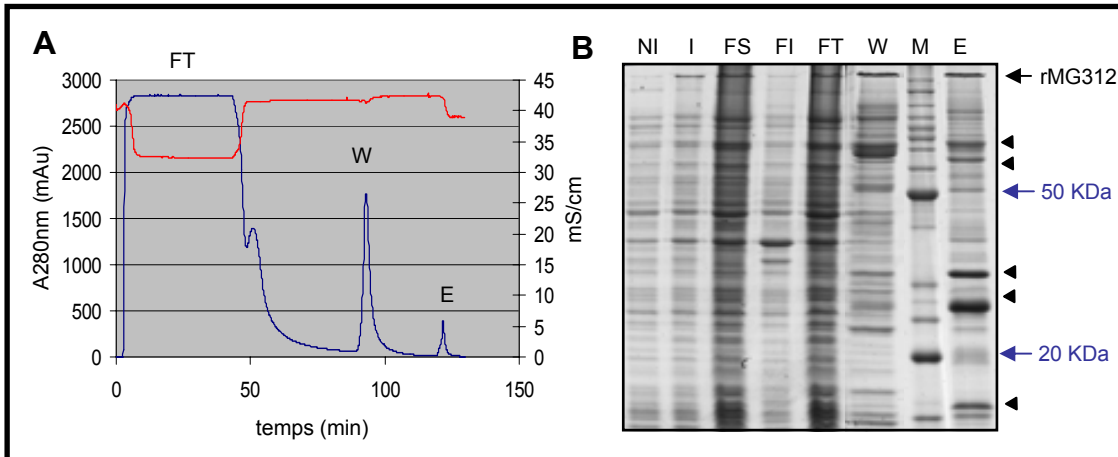


Figura 36. Expressió i purificació de la proteïna MG312 a partir de 4L de cultiu a 37°C.

(A). Perfil de la cromatografia d'afinitat en columna de níquel de la proteïna MG312. En vermell està representada la conductivitat i en blau l'absorbància.

(B). SDS-PAGE al 12% mostrant diferents fraccions recollides durant l'expressió i purificació. NI: cultiu no induït, I: cultiu induït, FS: fracció soluble, FI: fracció insoluble, FT: fracció eluïda durant la càrrega de la columna, W: fracció eluïda després d'un rentat amb 120 mM imidazol, M: marcador de pes molecular, E: fracció d'elució amb 1M imidazol. Els triangles indiquen les bandes majoritàries de contaminació.

En la figura 36A es mostra el cromatograma obtingut després de passar per una columna d'afinitat pel níquel l'extracte total de 4 litres de cultiu prèviament induït i sonicat. En la figura 36B es mostra les diferents fraccions recollides durant aquest procés. Com es pot observar, malgrat el gran volum de cultiu utilitzat, la quantitat de proteïna recombinant que es va obtenir era molt baixa. Aquest fet és pot atribuir a varis factors. Per una banda existeix un nivell molt baix d'expressió, motiu pel qual es va decidir per treballar amb volums grans de cultiu. Per altra banda, malgrat que la major part de la proteïna recombinant és soluble, existeix una part que és insoluble. L'expressió a 16°C durant 22 hores permetia millorar els nivells d'expressió i solubilitzar completament la proteïna. No obstant, la proteïna apareixia sorprenentment en dos formes, probablement com a conseqüència d'una degradació parcial. Per aquest motiu, es va descartar aquesta possibilitat i es va decidir expressar-la a 37°C. Tanmateix, el motiu més important pel baix rendiment en la purificació sembla que és la dificultat que té la proteïna recombinant per unir-se a la columna. Com s'observa en la figura 36B, la major part de la proteïna és perd en el moment en que es carrega i es renta la columna. Aquestes observacions suggereixen que la cua d'histidina situada al C-terminal de la proteïna es podria estar degradant, o alternativament podria estar poc exposada com a conseqüència de la conformació particular adoptada per la proteïna. Aquest motiu probablement és el responsable principal d'obtenir una mostra tant heterogènia, tal com s'observa en la

figura 36B. Cal afegir, que la proporció de les bandes contaminants co-purificades juntament amb la proteïna recombinant va ser variable en els diferents experiments. Els intents per minimitzar aquest problema, com ara ajustar els volums de reïna d'acord amb els nivells de proteïna recombinant, van ser ineficaços. A més, per MS i Western blot es va confirmar que les bandes contaminants no eren productes de degradació, sinó proteïnes d'*E. coli*. Per altra banda, és possible que la proteïna MG312 tingui tendència a agregar amb ella mateixa o bé amb les proteïnes contaminants d'*E. coli*, dificultant així la seva purificació. La utilització d'agents desnaturalitzants com la urea 0,5M i agents reductors com el β -mercaptoetanol (2mM) en el moment de la sonicació i durant el procés de purificació, permetien reduir el fons de proteïnes contaminants. No obstant, aquest tractament no aconseguia eliminar-les completament, sobretot les bandes contaminants de 70 kDa.

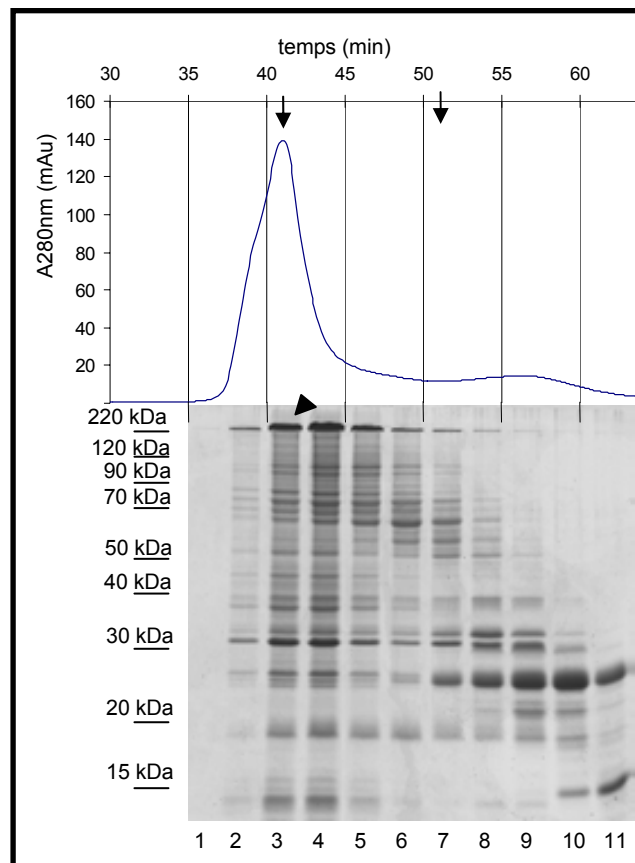


Figura 37. Cromatografia per gel filtració. Es va utilitzar una columna empaquetada amb reïna Sephacryl S-200 equilibrada amb tampó 150mM NaCl, 20 mM Tris pH7,5. El temps d'elució dels patrons blau de dextrà, BSA (68 kDa) i lisozim (14,6kDa) van ser de 41, 51 i 105 minuts, respectivament. El blau de dextrà posiciona el volum d'exclusió de la columna. En el panell inferior es mostra el perfil proteic de les diferents fraccions recollides i resoltes en un SDS-PAGE al 12% d'acrilamida. Les fletxes en el panell superior mostren el temps d'elució del blau de dextrà i el BSA, mentre que els triangles en el panell inferior mostren la proteïna recombinant MG312.

Amb l'objectiu d'eliminar part de les impureses i aprofitant que la proteïna MG312 té un alt pes molecular es va realitzar una cromatografia de gel filtració. Com s'observa en la figura 37, la proteïna MG312 apareix en el volum d'exclusió juntament amb varies impureses. Malgrat no s'obté una elució homogènia, aquest procés permet enriquir la proteïna recombinant respecte les proteïnes contaminants.

Com a últim pas per eliminar les impureses, es va aprofitar una propietat bastant insòlita de la proteïna MG312. Concretament, les fraccions més enriquides procedents de la cromatografia de gel filtració (ex, 2, 3, 4 i 5) es van repurificar un altre vegada a través d'una columna d'afinitat pel níquel. Es va observar que part de la proteïna MG312 que aconseguix unir-se a la columna pot eluir-se lentament a una concentració de 40 mM de imidazol, probablement com a conseqüència dels seus problemes d'afinitat a la columna (Figura 38). Malgrat sembli sorprenent, a aquesta concentració d'imidazol, les proteïnes contaminants exhibeixen una major afinitat pel níquel, per la qual cosa queden majoritàriament retingudes. Concretament, les proteïnes contaminants no es comencen a eluir fins a una concentració de 60 mM de imidazol. Malgrat es perd gran quantitat de proteïna, recollint múltiples fraccions de 5ml de rentats amb 40 mM imidazol, vam aconseguir obtenir proteïna MG312 amb una puresa del 90% i a una concentració de 0,15 mg/ml un cop concentrada en un volum final de 100 µl (Figura 38).

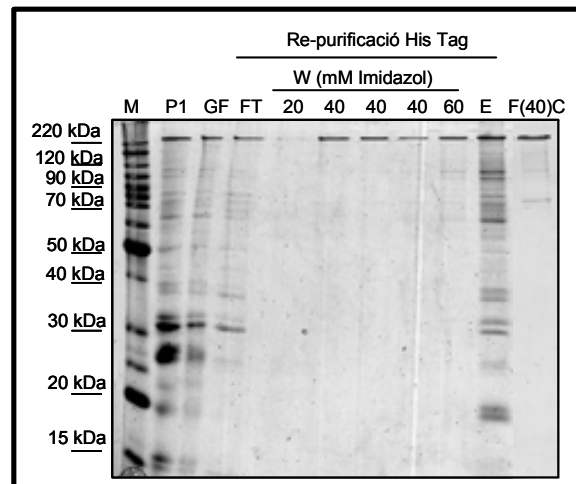


Figura 38. SDS-PAGE al 12% d'acrilamida mostrant diferents fraccions recollides durant el procés de purificació de la proteïna MG312. (M), marcador de pes molecular, (P1), fracció corresponent a la primera cromatografia d'afinitat pel níquel. (GF), suma de fraccions enriquides obtinguda per la cromatografia de gel filtració. (FT). FT: fracció eluïda durant la càrrega de la columna en la segona cromatografia d'afinitat al níquel. (W): fraccions de 5ml eluïdes consecutivament després de rentats amb 20, 40 i 60 mM imidazol en la segona cromatografia d'afinitat al níquel. E: fracció d'elució amb 1M imidazol en la segona cromatografia d'afinitat al níquel. (F40C). Fracció concentrada provenint de les fraccions eluïdes amb 40 mM imidazol.

Malgrat el sistema descrit ha permès l'obtenció d'una petita quantitat de proteïna força pura, és evident que el rendiment és molt baix i no és òptim per segons quines aplicacions posteriors. En aquest sentit i donat els problemes observats, sembla recomanable adoptar altres estratègies de purificació. Per exemple, es podria substituir la cua d'histidina al N-terminal o utilitzar altres sistemes d'afinitat més específics com el Strep Tag (Novagen). Tanmateix, la combinació d'aquestes estratègies amb una cromatografia d'intercanvi aniònic (MG312 presenta un pI de 4,07) o una cromatografia per gel filtració més resolutive potser podrien millorar el rendiment. Actualment, s'està posant en pràctica el conjunt d'aquestes modificacions.

IV.4.2. Estudis estructurals per microscòpia electrònica de transmissió

Malgrat el baix rendiment de la purificació, aquesta estratègia ens ha permès obtenir prou proteïna recombinant i amb suficient puresa per realitzar estudis estructurals mitjançant microscòpia electrònica de transmissió. Cal matisar, que l'alt pes molecular de la proteïna MG312 fa factible aquest tipus d'estudi, sent un dels principals motius per expressar-la de manera recombinant.

La proteïna MG312 es va dialitzar en front un tampó 10 mM HEPES pH.7,2, es va dipositar sobre reixetes de microscòpia amb pel·lícula de carbó i es va fer una tinció negativa amb acetat d'uranil (per detalls veure secció VI.12.3). També es van preparar mostres en tampó 10 mM TEA pH.8 i mostres en els dos tampons i fixades amb glutaraldehid al 0,1% durant 10 minuts. No obstant, no es van observar diferències entre les diferents preparacions. En la figura 39, es mostren imatges representatives de les estructures observades amb TEM. Es van poder observar de manera repetida dos tipus de conformacions. L'estructura més comuna es caracteritza per una regió estesa que separa dos dominis globulars. És interessant destacar, que aquesta regió central sembla tenir propietats flexibles. Per una banda hem pogut observar estructures amb forma de V on els dos dominis globulars poden quedar a prop, però també conformacions totalment esteses. Malgrat que aquesta regió central adopta una estructura filamentosa, també presenta petites discontinuïtats en l'orientació de la mateixa. En alguns casos, també dóna la impressió que els dos braços que suporten els dominis globulars s'entrelliguin entre ells mateixos.

En una menor proporció també hem pogut observar unes estructures regulars i circulars amb un marcat solc interior.

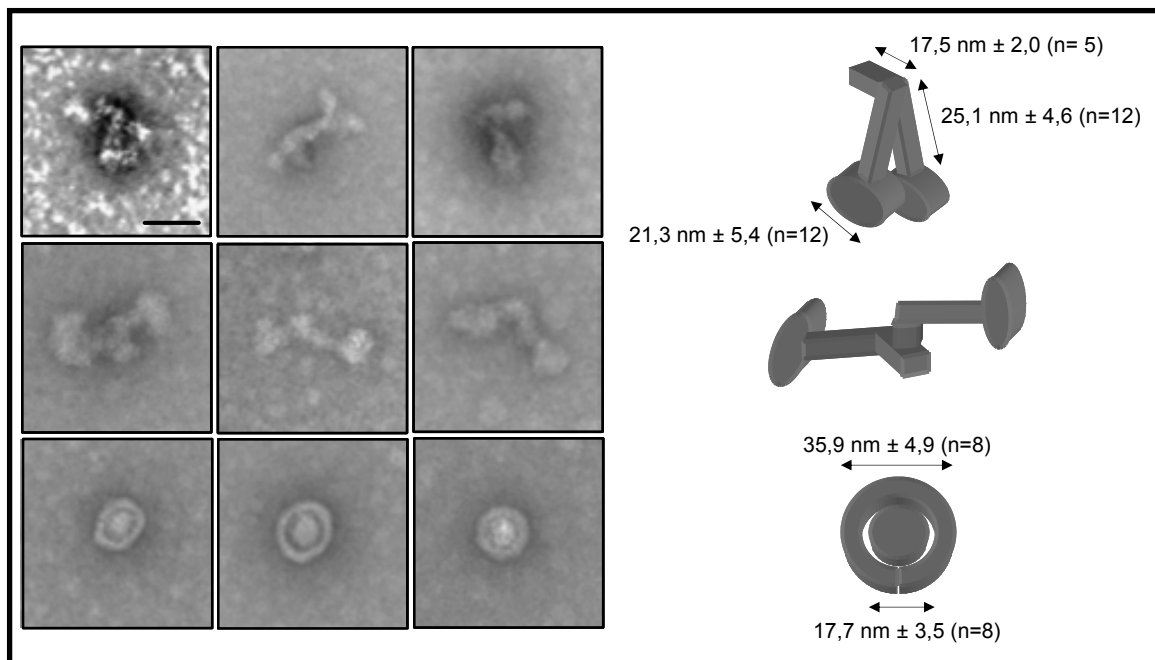


Figura 39. Microscòpia electrònica de transmissió en tinció negativa de la proteïna MG312.

A l'esquerre es mostren diferents perspectives de les estructures observades. La barra d'augment correspon a 50 nm. A la dreta hi ha representat un model aproximat per a cada conformació. També s'indiquen les dimensions que s'han mesurat per a cada tipus d'estructura.

DISCUSSIÓ

LA PROTEÏNA MG312 ÉS UN COMPONENT ESTRUCTURAL BÀSIC DE L'ORGANELA TERMINAL INVOLUCRAT EN MOTILITAT I DIVISIÓ CEL·LULAR

Els micoplasmes estan considerats entre els microorganismes auto-replicatius amb els genomes més petits descrits fins al moment, propietat que ha atret l'interès de molts científics. No obstant, si examinem amb detall els genomes de *M. genitalium* i altres micoplasmes relacionats, ens adonem que malgrat els seus genomes mínims, un conjunt important de gens codifiquen per proteïnes amb propietats noves i exclusives. Moltes d'aquestes proteïnes són components de l'organela terminal, reflectint d'aquesta manera la excepcionalitat d'aquesta estructura en la comunitat biològica.

En aquest treball, hem examinat la implicació funcional d'un d'aquest components, la proteïna MG312. Per una banda, tal com s'havia suggerit prèviament per la proteïna homòloga de *M. pneumoniae* (Hahn *et al.*, 1998), hem confirmat la implicació d'aquesta proteïna en la citadherència de *M. genitalium*. No obstant, cal matisar que en absència d'aquesta proteïna, el fenotip no és exactament igual en les dues espècies. Mentre que l'absència d'aquesta proteïna en el mutant M6 de *M. pneumoniae* origina una pèrdua total de la capacitat d'adhesió (Hahn *et al.*, 1998), a *M. genitalium* només es produeix una pèrdua parcial, encara que aquesta és força important. Aquest fet posa de manifest l'existència de petites diferències del paper de les proteïnes MG312 i HMW1 en el manteniment de la citadherència. Alternativament, aquestes diferències es podrien explicar per l'existència de mutacions addicionals en el mutant M6 de *M. pneumoniae*, ja que mai s'ha complementat a la vegada les dues mutacions que s'hi han detectat (Hahn *et al.*, 1998). En qualsevol cas, la pèrdua parcial d'adhesió als mutants Δ mg312 justifica el fracàs en l'obtenció d'aquest tipus de mutants en experiments dirigits per seleccionar mutants no adherents de *M. genitalium* (Mernaugh *et al.*, 1993; Reddy *et al.*, 1996) experiments que, per altra banda han permès l'aïllament de diversos mutants a *M. pneumoniae* (Layh-Schmitt *et al.*, 1995).

L'absència de la proteïna MG312 també comporta una disminució en els nivells de les proteïnes MG218, MG317 i MG217, a més de la pèrdua de l'organela terminal. La presència d'aquestes alteracions concorden amb les observacions prèviament descrites en el mutant M6 de *M. pneumoniae* (Hahn *et al.*, 1998; Willby *et al.*, 2004). Per altra banda, els nostres resultats també mostren nivells reduïts en les proteïnes P140, P110 i MG386. Totes aquestes proteïnes són components de l'organela terminal, indicant que el MG312 actua principalment com a un component que manté la integritat d'aquesta estructura. A més, els mutants Δ mg312 no exhibeixen eix electro-dens, obrint la possibilitat que l'MG312 sigui de fet un dels components integrants d'aquesta estructura.

En el capítol 1 hem descrit el paper essencial que tenen les proteïnes P140 i P110 en citadherència i en el manteniment de l'estabilitat de la proteïna MG386. Aquestes observacions suggereixen que tant la reducció en els nivells de MG386, com el fenotip parcialment deficient en adhesió observat als mutants Δ mg312, és probablement conseqüència de la inestabilitat del complex P140 i P110 i no pas una causa directa de la pèrdua de la proteïna MG312. Per altra banda, la pèrdua a *M. pneumoniae* de la proteïna homòloga del MG312 (HMW1) no origina inestabilitat en les respectives homologues P140 i P110 (P1 i B/C, respectivament) però sí afecta a la seva correcta localització (Hahn *et al.*, 1998). A *M. genitalium* podria existir una situació similar, on la localització del complex P140 i P110 podria dependre de la proteïna MG312. En aquest cas, la manca d'incorporació d'aquestes proteïnes a l'organela terminal, podria desencadenar la seva proteòlisis, explicant la inestabilitat observada. Cal destacar que aquesta regulació post-traducciona és comuna entre els components de l'organela terminal (Krause i Balish, 2001).

En aquest treball també hem demostrat que els mutants Δ mg312 són immòbils, revelant la implicació de la proteïna MG312 en motilitat. No obstant, aquest resultat no es pot considerar sorprenent, donades les alteracions morfològiques observades en aquest mutant, com ara la pèrdua de l'organela terminal. En aquest context, els mutants deficientes en altres components estructurals de l'organela com les proteïnes MG218 i MG317 també presenten morfologies alterades i problemes de motilitat similars (Pich *et al.*, 2008). Per altra banda, cal recordar que l'organela terminal sembla constituir el

motor molecular que fa possible el moviment (Hasselbring i Krause, 2007b). Per tant, és raonable pensar que qualsevol component necessari per estructurar correctament l'organela terminal, també pugui estar implicat d'alguna manera en la motilitat. No obstant, l'observació de la presència d'un motiu EAGR en el domini N-terminal del MG312 suggereix que aquesta proteïna podria tenir una implicació més específica en motilitat, no derivada de les seves funcions estructurals. Per explorar aquesta possibilitat i determinar la contribució específica dels diferents dominis en la funcionalitat de la proteïna, es van introduir en el mutant $\Delta mg312$ diferents derivatius del gen *mg312*. Aquesta anàlisi ens ha permès identificar dos importants dominis funcionals en la proteïna MG312. Per una banda, hem confirmat que el domini C-terminal és essencial per conservar la capacitat de citadherència i mantenir la integritat estructural de l'organela terminal (Willby *et al.*, 2004). Per l'altra, hem trobat que el domini N-terminal no està implicat en aquestes funcions, però sí sembla contribuir en la motilitat. Cal matisar, que la proteïna recombinant que incorpora la deleció en el N-terminal pateix una certa inestabilitat. Aquest fet podria explicar els defectes de motilitat observats en els mutants que expressen aquest derivatiu, però hi ha evidències que desfavoreixen aquesta possibilitat. Per exemple, els mateixos nivells de proteïna recombinant són suficients per restaurar altres funcions, com són la citadherència o el desenvolupament de l'organela terminal. Per altra banda, quan examinem la implicació específica del motiu EAGR, també observem una contribució a la motilitat (certament més moderada) i en aquest cas els nivells expressats de proteïna recombinant són normals. Per tant, atès que el motiu EAGR es troba justament en el domini N-terminal, aquests arguments afavoreixen tant una implicació activa del domini N-terminal així com una contribució específica del motiu EAGR en el mecanisme de desplaçament. Com dèiem en la introducció, el motiu EAGR només es troba en proteïnes associades a motilitat (Pich *et al.*, 2006a). Concretament, la proteïna MG200 disposa d'un únic motiu, igual que l'MG312, mentre que l'MG386 en presenta cinc al llarg de la proteïna. S'ha descrit que els residus aromàtics solen participar en les interaccions proteïna-proteïna (Jones i Thornton, 1997). Per tant, potser els motius EAGR contribueixen a possibles interaccions entre les proteïnes integrants de la maquinària de motilitat. No obstant, la comprensió del paper exacte d'aquest motiu requerirà investigacions posteriors.

Els mutants que expressen el derivatiu *mg312ΔN-t* exhibeixen més deficiències de motilitat que els que expressen el derivatiu *mg312ΔEAGR*. Per tant, la presència del motiu EAGR no pot explicar plenament les alteracions observades quan es delecta la totalitat del domini N-terminal. Un examen més detallat d'aquest domini va revelar la presència d'un possible motiu d'unió a nucleòtid conegut com a P-loop o Walker A. Aquest motiu està present en la majoria de proteïnes que uneixen i hidrolitzen ATP, com ara quinases o bé proteïnes motores com la miosina (Walker *et al.*, 1982). Malgrat queda per determinar si aquest motiu pot realment unir i/o hidrolitzar ATP, la seva presència és consistent amb la idea de que l'MG312, a part del seu paper com a proteïna estructural, també pot participar d'una manera més activa i directe en el mecanisme de motilitat. Per aprofundir amb el paper específic del motiu Walker A, vam construir i analitzar mutants per aquest motiu. Concretament, les mutacions en aquest motiu no afecten especialment a la velocitat de desplaçament, però sí a la freqüència de motilitat. De fet, la proporció de cèl·lules mòbils en aquests mutants són comparables a les observades en els mutants que incorporen la delectió completa del domini N-terminal. Per tant, aquests resultats confirmen la implicació funcional del motiu Walker A i la seva contribució en els defectes observats en els mutants *mg312ΔN-t*. No obstant, aquests resultats no expliquen la reducció en la velocitat tan dràstica en els mutants *mg312ΔN-t*, indicant que la resta del 128 aminoàcids també hi participen d'alguna forma. Com dèiem a l'inici de la discussió, la proteïna MG312 podria constituir juntament amb la proteïna MG218 l'eix electro-dens que suporta l'organela terminal. Un dels models actuals per explicar la motilitat dels micoplasmes es basa en canvis conformacionals de l'eix electro-dens, que originaria petits moviments de l'organela terminal endavant (Henderson i Jensen, 2006). En aquest context, malgrat que l'absència del domini N-terminal no sembla afectar al desenvolupament de l'organela terminal, sí que podria afectar a la transmissió d'aquests canvis conformacionals al llarg del eix electro-dens. Aquestes alteracions podrien explicar d'alguna forma les deficiències observades en la velocitat de desplaçament o fins i tot l'absència de moviment en alguns casos.

Per altra banda, el fenotip dels mutants pel motiu Walker A obre la possibilitat de noves interpretacions. El fet que les velocitats de desplaçament no es vegin afectades, suggereix que la maquinària de motilitat probablement estigui intacte en aquests

mutants. Aleshores, que origina o regula que una cèl·lula inici o aturi la motilitat a *M. genitalium*? Els nostres resultats suggereixen que el domini Walker A podria tenir una implicació directe en aquest procés, potser coordinant els diferents events necessaris per iniciar el moviment. Per altra banda, no hem d'oblidar que processos com la motilitat i la divisió cel·lular estan coordinats (Hasselbring *et al.*, 2006a). De fet, hi ha evidències que durant el procés de duplicació de l'organela terminal, estadi que coincideix amb l'inici de la divisió cel·lular, les cèl·lules s'aturen. Aquest moviment només es reactiva en el moment en que es fa possible la migració de la nova organela terminal al pol oposat. Tenint present aquest escenari, es possible que la disminució de la proporció de cèl·lules mòbils observades en els mutants Walker A i *mg312ΔN-t* sigui un simple reflex d'un increment de cèl·lules en estat de divisió cel·lular. Aquesta interpretació es consistent amb les morfologies exhibides per aquests mutants, en els quals s'observa un increment en la freqüència de cèl·lules formant parelles unides per un filament, reflectint probablement un estadi de citocinesi. Alternativament, també trobem un increment de cèl·lules amb la presència de dos organeles terminals i morfologies alterades, típiques d'un estadi més incipient de divisió cel·lular. Per tant, tots aquests resultats suggereixen que la proteïna MG312 podria participar també en la divisió cel·lular, posant de manifest la importància de les proteïnes integrants de l'organela terminal en molts aspectes bàsics de la biologia dels micoplasmes.

Una de les dades més sorprenents d'aquest treball, és que l'eliminació d'una de les regions repetides de 196 aminoàcids i la part que les separa no té un efecte massa significatiu en el fenotip. Els mutants amb aquesta deleció són capaços de desenvolupar organeles terminals i no presenten problemes greus de motilitat. Una situació similar s'ha descrit per la proteïna estructural HMW2 (MG218) de *M. pneumoniae*. En aquest cas, una deleció del 80% de la regió central es capaç de complementar les funcions de la proteïna sencera (Balish *et al.*, 2003a). Per altra banda, i de forma sorprenent, hem observat un increment en la capacitat d'adhesió al plàstic en aquests mutants. Malgrat que desconeixem la raó d'aquest increment, potser variacions en la regió central siguin importants per modificar les capacitats adhesives. Cal recordar, que hem demostrat que aquest tipus de delecions poden succeir d'una manera natural per recombinació homòloga. De fet, les seqüències repetides més petites que es troben en la regió més proximal del domini central (Figura 31A), també podrien generar reordenacions

similars. No obstant, queda per determinar si aquestes reorganitzacions tenen lloc durant el procés d'una infecció natural i si tenen una implicació real en aquest procés.

Els estudis per TEM de la proteïna MG312 han revelat informació molt valuosa respecte la seva estructura. Com s'ha esmentat en la secció IV.4.2 de resultats, en les preparacions de proteïna MG312 hem trobat dos tipus de conformacions, una en forma circular i un altre consistent en dos dominis globulars separats per una regió central. Aquesta estructura modular representa la forma majoritària en les preparacions i és consistent amb la predicció estructural que s'havia fet prèviament per la proteïna homòloga de *M. pneumoniae* (Dirksen *et al.*, 1996). En aquest sentit, és molt probable que les formes circulars corresponguin alguna proteïna contaminant. Alternativament, podríem considerar que aquestes formes circulars podrien correspondre a fragments de la proteïna MG312, o inclús una vista particular de les regions globulars. No obstant, aquesta possibilitat sembla descartable tenint en compte les diferències en les seves dimensions. Per últim, podria ser que la proteïna MG312 pogués adoptar dos conformacions diferents, la qual cosa sembla improbable. Nous estudis a partir d'una mostra més homogènia podrien resoldre aquesta qüestió.

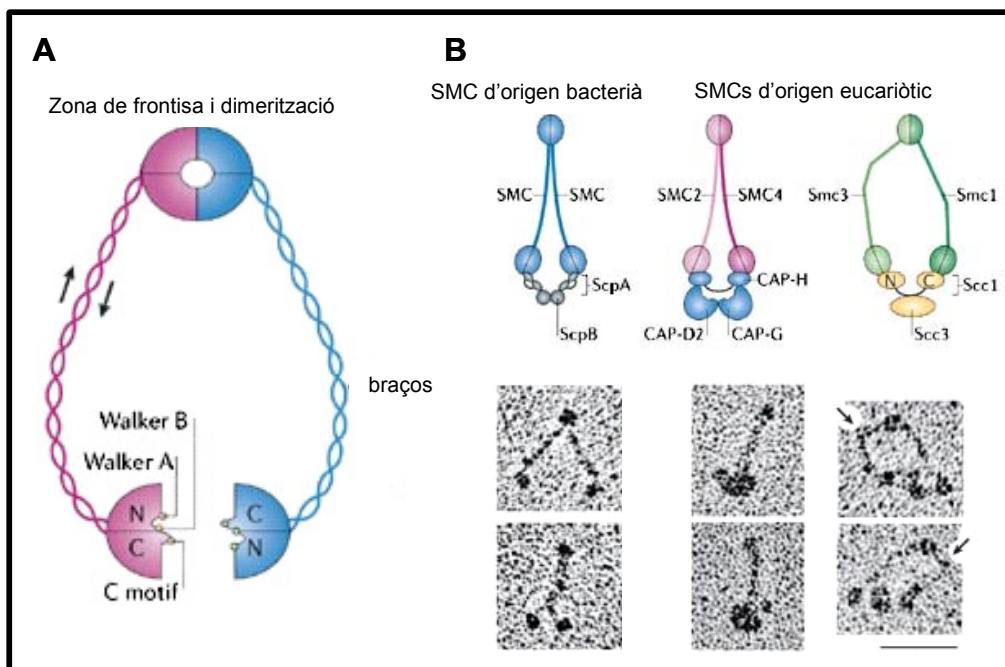


Figura 40. Arquitectura de les proteïnes SMC. (Imatge modificada de Hirano, 2006).

(A). Arquitectura bàsica de dos proteïnes SMC formant un dímer.

(B). Arquitectura de homodímers i heterodímers d'origen bacterià i eucariòtic, respectivament, formant complexos amb proteïnes no SMC. En el panell inferior es mostren imatges de microscòpia electrònica per ombrejat rotatori de proteïnes dimèriques SMC de *B. subtilis*, condensina I i cohesina purificades de cultius cel·lulars, respectivament. La barra d'augment correspon a 50 nm.

En relació a l'estructura modular, hem observat que els dos dominis globulars poden quedar a prop gràcies a una regió flexible en el domini central de la proteïna, que actuaria com una frontissa donant propietats dinàmiques a la molècula. És interessant destacar, que aquest tipus d'estructura és molt similar a l'observada prèviament per la proteïna MukB d'*E. coli* (Niki *et al.*, 1992) i en proteïnes de la família SMCs (Structural maintenance of chromosomes) (Melby *et al.*, 1998) (Figura 40). Malgrat MukB, SMCs i MG312 no guarden homologia a nivell de seqüència d'aminoàcids, si semblen adoptar conformacions similars, suggerint potser una relació funcional. En aquest sentit, mutacions en gens *smc* de *Bacillus subtilis* i *Caulobacter crescentus* causen múltiples fenotips, incloent l'acumulació de cèl·lules anucleades o alteracions en l'estructura del nucleoid (Britton *et al.*, 1998; Jensen i Shapiro, 1999). L'anàlisi de mutants MukB en *E. coli* ha revelat funcions similars (Niki *et al.*, 1991). Totes aquestes evidències indiquen un paper fonamental d'aquestes proteïnes en la divisió cel·lular i en particular en la segregació dels cromosomes. Malgrat es desconeix el mecanisme exacte d'actuació, es creu que aquestes proteïnes podrien intervenir en la condensació i remodelació dels cromosomes. Aquests processos, entre d'altres coses, asseguren una correcta segregació cromosòmica, facilitant la resolució dels cromosomes recent replicats i prevenint una segregació prematura durant els primers estadis de la citocinesi (Strunnikov, 2006). Si analitzem el genoma de *M. genitalium*, trobem que el gen *mg298* exhibeix una gran similitud amb els gens *smc*. De fet, la proteïna MG298 conserva tots els dominis funcionals descrits per aquestes proteïnes, per la qual cosa es raonable pensar que es tracta del component ortòleg a *M. genitalium*. Cal afegir, que la funció de les proteïnes SMC depèn de la formació de complexos amb la proteïnes ScpA i ScpB (Soppa *et al.*, 2002), i a *M. genitalium* també trobem els respectius components ortòlegs, codificats respectivament pels gens *mg213* i *mg214*. Davant aquest escenari, és desconcertant la similitud estructural observada entre la proteïna MG312 i les proteïnes SMC, sobretot si tenim present que la proteïna MG312 sembla tenir més aviat un paper estructural molt particular. És possible que aquesta semblança estructural només indiqui una similitud a nivell mecanístic de la molècula, que ha divergit amb una finalitat funcional diferent. No obstant, tampoc no podem descartar que la proteïna MG312 tingui una funció alternativa relacionada amb la dinàmica dels cromosomes. Si aquest fos el cas, com una proteïna estructural situada a l'organela terminal, pot actuar a la vegada en la dinàmica dels cromosomes? En resposta en aquesta pregunta, potser cal assumir que en algun

moment la proteïna MG312 adopta dos localitzacions diferents. Cal destacar, que fins al moment ha estat impossible cristal·litzar o fins i tot expressar de manera soluble les proteïnes integrants de l'organela terminal. El fet que la proteïna MG312 s'expressi de manera soluble obre la possibilitat d'una localització no associada a la fracció insoluble del citoesquelet. En aquest sentit, estudis realitzats a *M. pneumoniae* han demostrat que la proteïna homòloga al MG312 està present en equilibri en dos fraccions cel·lulars. Una part soluble i una part majoritària que s'integra en la fracció insoluble del citoesquelet (Balish *et al.*, 2001). Actualment, desconeixem si l'estructura que adopta en aquestes diferents fraccions és similar. Potser la interacció amb la resta de components de l'organela terminal distorsiona dràsticament la conformació en forma de V observada en aquest treball. Alternativament, la proteïna MG312 podria ser funcionalment activa des d'una localització única associada a la fracció del citoesquelet de l'organela terminal. En aquest context, hi ha la idea que la migració de l'organela terminal al pol oposat podria facilitar la segregació dels nucleoids. D'aquesta forma, una cèl·lula en estat de divisió podria assegurar de manera coordinada la transferència equitativa d'una organela terminal i un nucleoid a les cèl·lules filles. En suport en aquesta hipòtesis, s'ha observat que en fraccions subcel·lulars de *M. gallisepticum* que contenen ADN recent replicat, també hi ha organelles terminals (Quinlan i Maniloff, 1972), suggerint per tant una associació entre aquesta estructura i el nucleoid. No obstant, fins al moment no s'ha descrit cap component de l'organela terminal que pugui dur a terme aquesta associació. Malgrat la proteïna MG312 podria ser a priori un d'aquests components, estudis preliminars indiquen que no exhibeix afinitat pel ADN, al menys *in vitro* i d'una manera no dependent de seqüència. No obstant, creiem interessant la continuació d'una línia d'investigació oberta en aquesta direcció.

La similitud estructural observada amb les proteïnes SMCs pot aportar un coneixement més concret de l'arquitectura de la proteïna MG312. S'ha descrit que la proteïna MukB, que es troba principalment en membres de la família dels γ -proteobacteris, forma homodímers (Melby *et al.*, 1998). Per la seva banda, les proteïnes SMC es troben tant en cèl·lules eucariotes com en diverses espècies bacterianes. La diferència radica en la presència de múltiples gens *smc* en eucariotes, mentre que en els genomes bacterians solem trobar una única còpia. Aquesta particularitat comporta que les proteïnes SMC dels eucariotes formin generalment heterodímers en combinacions específiques, mentre

que en bactèries es formin homodímers (Figura 40). Malgrat les imatges de TEM no són suficientment resolutives, es possible que la proteïna MG312 pugui també formar dímers, tal com suggereix per altra banda la simetria de la seva estructura. Tanmateix, la proteïna MG312 i les MukB i SMC de *B. subtilis* presenten un pes molecular molt similar i de fet les dimensions de les molècules observades per TEM són també molt similars (Melby *et al.*, 1998). Una anàlisi del pes molecular de la proteïna recombinant MG312 per gel filtració i a través d'una columna més resolutiva que la utilitzada en aquest treball podria aportar una resposta al respecte. Per altra banda, estudis centrats en la proteïna SMC de *B. subtilis* han establert que un monomer adopta una estructura completament plegada per la meitat i que aquesta es manté amb l'ajuda d'interaccions coiled-coil. Aquesta conformació antiparal·lela deixa dos braços simètrics des del punt de flexió i manté a prop els dominis N i C-terminal de la proteïna (Hirano i Hirano, 2002; Melby *et al.*, 1998). Justament, és pel punt de flexió per on sembla que es produeix la dimerització (Figura 40) i on es modulen els estats oberts i tancats de la molècula dimèrica en forma de V (Hirano *et al.*, 2001). Si assumim que aquest model podria ser similar en la proteïna MG312, les regions repetides de 196 aminoàcids del domini central podrien formar les regions dels braços, mentre que el conjunt dels dominis N i C-terminal correspondrien a un dels dominis globular dels extrems. Un argument en contra d'aquesta possibilitat, es que l'anàlisi *in silico* de les repeticions de 196 aminoàcids no indica cap tendència a la formació de coiled-coils. En aquest context, l'expressió recombinant i la caracterització de formes truncades podrien ajudar a delimitar quins dominis de la proteïna MG312 corresponen a cadascuna d'aquestes regions.

Les proteïnes SMC i MukB es caracteritzen també per disposar d'un motiu Walker A en el domini N-terminal i un motiu Walker B en el domini C-terminal. Mentre que el motiu Walker A participa principalment en la captació del nucleòtid, el motiu Walker B contribueix específicament en la hidròlisi (Walker *et al.*, 1982). La conformació antiparal·lela descrita per la proteïna SMC de *B. subtilis* permet que dels dominis N i C-terminal entrin en contacte possibilitat la hidròlisi d'ATP. Malgrat que es desconeix el mecanisme molecular exacte, aquest procés sembla essencial en la funcionalitat de la proteïna (Hirano *et al.*, 2001; Woo *et al.*, 2009). Els nostres estudis han posat en evidència la importància funcional del motiu Walker A en la proteïna MG312.

Tanmateix, el MG312 no disposa de cap motiu Walker B en el domini C-terminal. No obstant, hem trobat un possible motiu Walker B (hhhhDE on h és un aminoàcid hidrofòbic) amb la seqüència P82FVFDE87 en el domini N-terminal. Potser, la pròpia conformació del domini N-terminal o l'apropament de dos dominis N-terminals en la forma dimèrica faci possible la formació d'un domini catalític actiu.

Per acabar la discussió, comentar que els nostres estudis indiquen una localització intracel·lular de la proteïna MG312. No obstant, hi ha evidències que una fracció de molècules de la proteïna homòloga de *M. pneumoniae* sembla estar exposada a la membrana (Balish *et al.*, 2001; Dirksen *et al.*, 1996). Aquest resultat és sorprenent, donat que la seqüència d'aminoàcids d'aquesta proteïna no preveu la presència de cap domini transmembrana. Actualment, es desconeix l'origen d'aquestes diferències entre les dues espècies. No obstant, una localització intracel·lular és consistent amb qualsevol de les funcions suggerides per la proteïna MG312, ja sigui estructural i/o involucrada amb la dinàmica del nucleoid.

V. RESULTATS I DISCUSSIÓ:

CAPÍTOL 3

La pèrdua de la proteïna MG217 de *M. genitalium* modifica el comportament de motilitat, alterant la curvatura de l'organela terminal

Aquest treball ha estat publicat. Veure Burgos *et al.*, 2008.

INTRODUCCIÓ

Un dels camps menys explorats en la biologia dels micoplasmes són els sistemes de regulació i en particular els mecanismes que regulen el comportament mòbil. Estudis previs realitzats en el nostre laboratori indiquen que *M. genitalium* podria tenir sistemes de comunicació social, donat que concentracions elevades de cèl·lules semblen estimular l'activitat motora (Pich *et al.*, 2006a). Per altra banda, el comportament mòbil de *M. genitalium* és molt curiós. La major part de cèl·lules es mouen descrivint cercles estrets, un moviment que es podria considerar fútil des d'una perspectiva de canvi o guany de posició. De manera interessant, algunes cèl·lules poden escapar d'aquest moviment circular i s'aventuren en trajectòries rectilínies amb canvis sobtats en la direcció del moviment. Aquest tipus de moviment ha estat denominat erràtic (Pich *et al.*, 2006a). Totes aquestes observacions suggereixen l'existència d'un mecanisme de control del moviment. Però fins ara, no existeix cap dada sobre els possibles elements d'aquest control.

La majoria de bacteries mòbils disposen de sistemes de quimiotaxis que controlen la direcció del moviment en resposta a estímuls de tipus químic (Bourret i Stock, 2002). Diverses espècies de micoplasma també exhibeixen aquest tipus de resposta. Per exemple, a *M. mobile* s'ha detectat la presència de respostes quimiotàctiques enfront diferents sucres, aminoàcids i mucus (Kirchhoff *et al.*, 1987). Per altra banda, també s'han detectat respostes enfront altres estímuls de tipus físic. Concretament, s'ha descrit que *M. mobile* incrementa la seva activitat mòbil quan es veu sotmès a un flux constant de corrent i a més s'orienta per desplaçar-se en direcció contrària en aquest flux (Rosengarten *et al.*, 1988). Malgrat aquestes evidències, els genomes dels micoplasmes mòbils no disposen de gens homòlegs a altres gens coneguts implicats en quimiotaxis o sistemes de transducció de senyals de dos components. Per aquest motiu, els components implicats tant en la recepció i transducció de senyals, com en el control del moviment són actualment desconeguts en els micoplasmes. Amb la intenció d'aportar dades al respecte, en aquest treball s'ha realitzat un assaig global de mutagènesi per transposó, dirigit a la cerca de mutants de *M. genitalium* amb alteracions en el comportament de motilitat. Aquesta anàlisi ha permès la identificació del gen *mg217* com un dels components implicats.

RESULTATS

V.1. Aïllament de mutants de *M. genitalium* amb alteracions en el comportament de motilitat

En el capítol 2 ja hem introduït un mètode de cultiu que permet posar de manifest la capacitat mòbil de *M. genitalium* (veure secció IV.1.4). Aquest mètode es va utilitzar prèviament per aïllar mutants deficients en motilitat, que en aquestes condicions desenvolupen colònies amb morfologies compactes i sense microsatèl·lits (Pich *et al.*, 2006a). En aquest estudi hem utilitzat una variació d'aquest mètode per aïllar mutants amb alteracions en el comportament. En una primera aproximació, vam predir que sota aquestes condicions, els mutants amb un increment en la motilitat, probablement generarien colònies grans i amb més microsatèl·lits. Amb la idea d'augmentar la sensibilitat de l'assaig i fer més evident aquest fenotip entre la població WT, es va incrementar la consistència del medi semisòlid (veure secció VI.10). En aquestes condicions es dificulta la capacitat de moviment i les colònies derivades de la soca salvatge es desenvolupen més petites i amb menys microsatèl·lits (Figura 41).

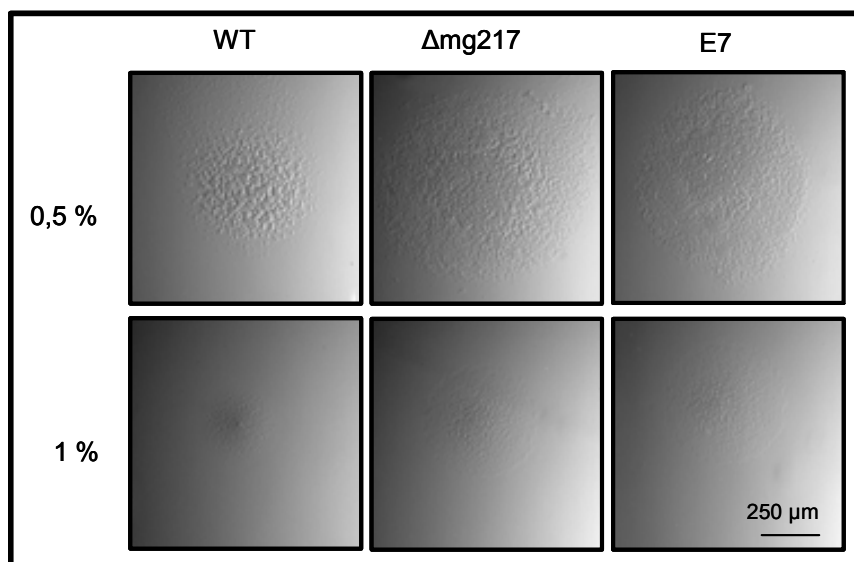


Figura 41. Morfologia de les colònies desenvolupades per la soca salvatge G37 (WT) i els mutants MG217 en medi SP-4 semisòlid al 0,5% i 1% d'agarosa de baix punt de fusió .

Utilitzant aquestes condicions de cultiu es va analitzar una col·lecció de mutants generada per transposició. En aquest cas es va utilitzar el minitransposó MTn*TetM438*, que genera insercions estables i confereix resistència a tetraciclina (Pich *et al.*, 2006b). La major part de les 15000 colònies examinades exhibien una morfologia normal, mentre que una minoria exhibien colònies amb morfologies extremadament compactes, indicant la presència de defectes de motilitat. Una única colònia va exhibir el fenotip predit per un mutant hiper mòbil. Aquesta colònia era gran i amb una textura plana especialment fina a la perifèria (Figura 41). Aquesta colònia es va recuperar i va ser propagada en medi líquid amb presència de tetraciclina. Finalment, aquest mutant designat E7, es va filtrar per porus de 0,22 µm i es va recultivar confirmant la puresa i estabilitat genètica del mutant. El punt d'inserció del transposó en el genoma es va determinar mitjançant la seqüenciació de les regions flanquejants al transposó. Per dur a terme la reacció de seqüenciació es van utilitzar els encebadors Tc upstream i Tc downstream presents en el minitransposó MTn*TetM438*. El punt d'inserció del transposó es va localitzar en la base 259028 del genoma de *M. genitalium* (referit al número d'accés NC_000908 de la base de dades del NCBI), corresponent a la regió 3' del gen *mg217*.

V.2. Obtenció d'una soca defectiva pel gen *mg217*

El punt d'inserció del transposó mapat en el mutant E7 obre la possibilitat de la presència d'un fragment truncat, corresponent al 88,4% de la seqüència completa de la proteïna MG217. Per aquest motiu i donat que es va recuperar un únic mutant durant el experiment de transposició, ens vam proposar obtenir mutants nuls del gen *mg217* mitjançant recombinació homòloga. En aquest cas, es va construir el plasmidi pΔ*mg217*, consistent en el marcador de selecció *tetM438* envoltat de les regions flanquejants del gen *mg217* (Figura 42A). Un succés de doble recombinació entre el plasmidi pΔ*mg217* i el genoma de *M. genitalium* s'espera que origini una deleció de les bases 60 a les 980 del gen *mg217*, que representa una deleció del 82,2% de la seqüència codificant (Figura 42B). Després de la transformació per electroporació de la soca salvatge amb el plasmidi pΔ*mg217*, es van obtenir 201 colònies resistents, la qual cosa representa una eficiència de transformació per cèl·lula viable de $2,3 \times 10^{-7}$. Aquesta eficiència de transformació és comparable a les obtingudes pels mutants Δ*mg191*,

Δ mg192 i Δ mg312. Posteriorment, es van recuperar varies colònies i es van propagar en medi SP-4 suplementat amb tetraciclina. Per confirmar l'absència del gen *mg217* en aquests transformants, es van analitzar els seus genomes per Southern blot. Concretament, l'ADN de la soca salvatge i dels diferents transformants es van digerir amb *Hind*III i els fragments resultats, prèviament separats electroforèticament i transferits a una membrana de niló, es van hibridar amb una sonda corresponent a la regió flanquejant 5' del gen *mg217*. Com calia esperar, es va detectar una única banda de 2,3 kb per l'ADN de la soca salvatge. En canvi, per l'ADN dels transformants es va detectar una única banda de 1,7 kb en tots els transformants, excepte en el clon 2 on es va detectar una banda addicional de 7,4 kb (Figura 42D). El patró d'hibridació del clon 2 és compatible amb un succés de recombinació simple en la regió flanquejant 5' del gen *mg217* (Figura 42C). En canvi, el patró d'hibridació de la resta de transformants és compatible amb un succés de doble recombinació, demostrant la presència de la deleció desitjada en aquests transformants (designats mutants Δ mg217).

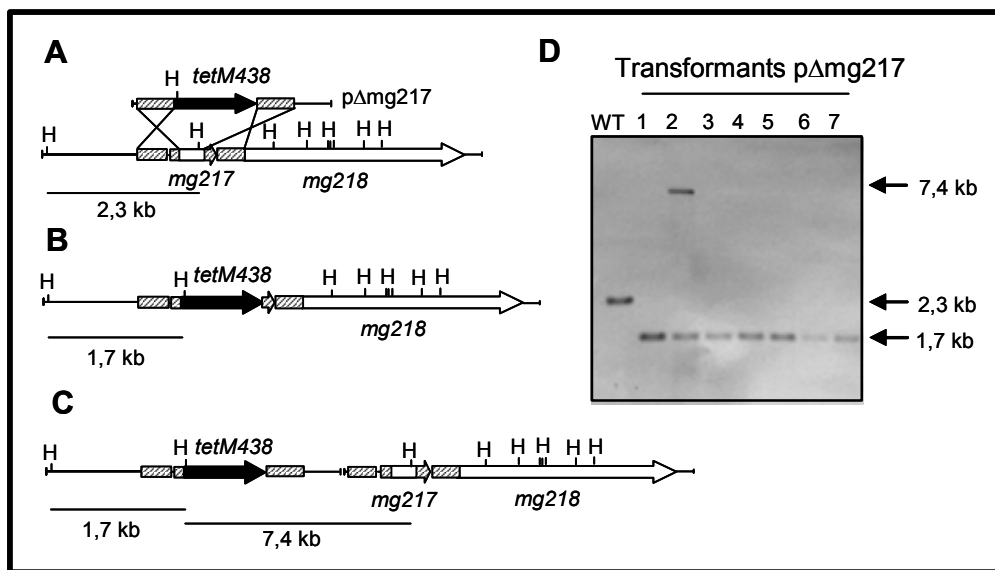


Figura 42. Recombinació homòloga al gen *mg217*.

(A). Representació esquemàtica dels possibles successos de recombinació homòloga que es poden donar entre el plasmidi p Δ mg217 i el gen *mg217*. Les caixes ratllades representen les regions flanquejants del gen *mg217* involucrades en la recombinació. El gen marcador *tetM438* està representat per una fletxa negra. A sota queden representats els diferents fragments de restricció esperats després de digerir amb *Hind*III (H).

(B). Deleció del gen *mg217* mitjançant un succés de doble recombinació homòloga.

(C). Succés de recombinació simple en la regió flanquejant 5' del gen *mg217*.

(D). Anàlisi per Southern blot dels ADNs genòmics extrets de la soca salvatge G37 (WT) i els transformants obtinguts amb el plasmidi p Δ mg217. Com a sonda s'ha utilitzat la regió flanquejant 5' del gen *mg217*.

V.3. Caracterització del perfil proteic dels mutants Δ mg217

L'absència de la proteïna MG217 en els mutants E7 i Δ mg217 es va confirmar per Western blot utilitzant un anticòs monoclonal anti-MG217 (Figura 43C). Cal matissar, que quan aquest anticòs reacciona amb un extracte proteic de la soca salvatge, es detecta una banda amb una massa molecular aproximada de 65 kDa. No obstant, la massa molecular teòrica per aquesta proteïna és de 44,6 kDa. Aquesta discrepància en la migració electroforètica també s'ha observat per la proteïna homòloga P65 de *M. pneumoniae* (Proft *et al.*, 1995) i es creu que està originada per la riquesa en prolina en la seva composició d'aminoàcids. Cal recordar, que aquest fenomen també succeeix amb la proteïna MG312 (veure secció IV.1.2) i és un fet comú entre les proteïnes de l'organela terminal. L'absència de la possible forma truncada de la proteïna MG217 en el mutant E7 es va confirmar utilitzant anticossos policlonals, suggerint que els últims 45 aminoàcids de la proteïna són probablement necessaris per la seva estabilitat.

El gen *mg217* és el primer gen d'un operó prèviament vinculat a funcions de citadherència i es co-transcriu amb els gens *mg218*, *mg218.1* (*mg491* en la darrera versió de la seqüència completa del genoma de *M. genitalium*) i *mg219* (Musatovova *et al.*, 2003; Figura 43A). Aquests gens codifiquen respectivament per les proteïnes homòlogues HMW2, P41 i P24 de *M. pneumoniae*, totes elles proteïnes amb funcions vinculades a l'organela terminal (Balish *et al.*, 2003a; Hasselbring i Krause, 2007a). Donada la posició del gen *mg217* en l'operó, la inserció del transposó o deleció del gen *mg217* podria originar efectes polar als gens posteriors en els mutants E7 i Δ mg217. No obstant, aquesta possibilitat va ser descartada per Western blot, on es va detectar nivells normals de MG218 i MG218.1 (MG491 en la nova anotació; Figura 43C). Si examinem amb detall l'operó, trobem que no existeixen ni promotors ni seqüències RBS entre els gens, suggerint que la traducció d'aquests gens probablement estigui acoblada. Per aquest motiu, l'absència d'efectes polars és encara més sorprenent, indicant alternativament l'existència de promotors o seqüències RBS críptiques. Per altra banda, mitjançant SDS-PAGE vam descartar possibles alteracions en l'estabilitat d'altres proteïnes de l'organela terminal, incloent les proteïnes MG386, MG312, P140 i P110 (Figura 43B). Finalment, vam analitzar per Western blot l'estabilitat de la proteïna MG217 en mutants deficients per diferents proteïnes de l'organela terminal. Vam

observar que la proteïna MG217 es inestable en absència de MG312, MG317 i MG218 però no en absència de P140 (MG191) i P110 (MG192) (Figura 43D).

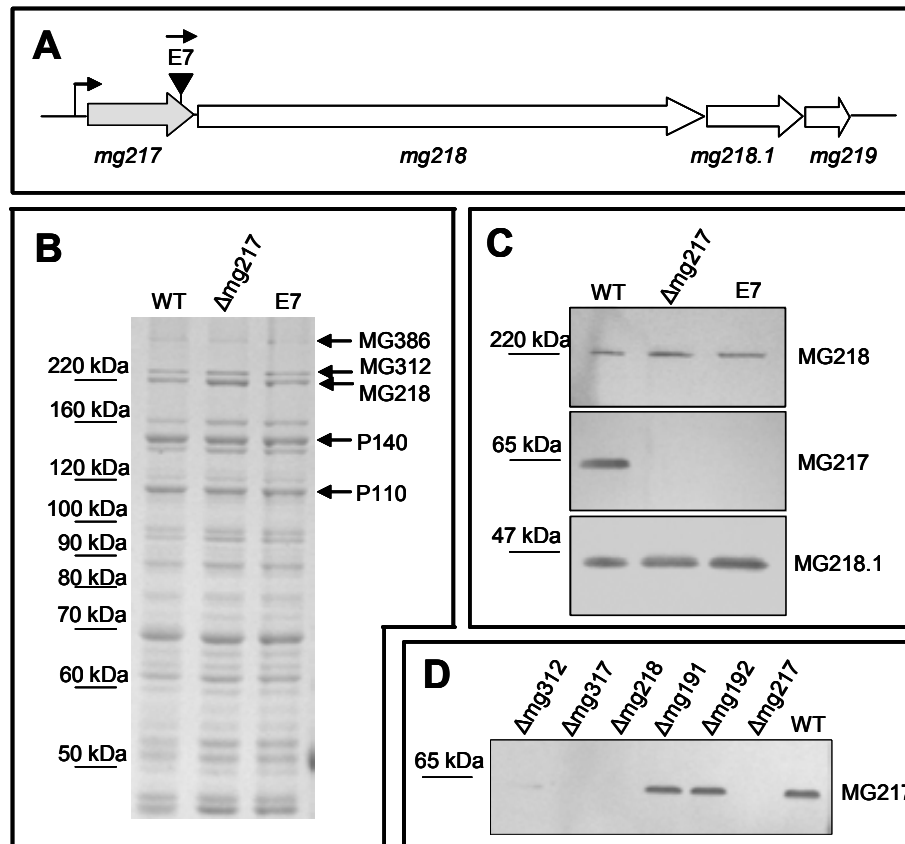


Figura 43. Perfil proteic de la soca salvatge G37 (WT) i els mutants MG217.

(A). Organització de l'operó MG217 de *M. genitalium*. El triangle indica la posició de la inserció del transposó en el mutant E7. La fletxa indica que la inserció s'ha produït en el sentit de la transcripció.

(B). SDS-PAGE al 8% d'acrilamida mostrant el perfil proteic del WT i els mutants MG217.

(C). Anàlisi per Western blot del WT i els mutants MG217 utilitzant anticossos anti-MG218, anti-MG217 i anti-P41 (MG218.1).

(D). Anàlisi per Western blot dels nivells d'MG217 en mutants deficients en proteïnes integrants de l'organela terminal. Els mutants $\Delta mg218$ i $\Delta mg317$ provenen del treball de Pich *et al.*, 2008.

V.4. Anàlisi de les capacitats d'adhesió cel·lular dels mutants $\Delta mg217$

Donat que la proteïna MG217 podria ser un component de l'organela terminal, es va examinar la seva contribució a la capacitat d'adhesió de *M. genitalium*. Per una banda, es va constatar que els mutants $\Delta mg217$ s'adhereixen sense dificultat al plàstic mentre creixen en flascons de cultiu cel·lular. Per l'altra, com s'observa en la figura 44, les colònies derivades d'aquest mutant estan completament recobertes d'eritròcits, indicant que la proteïna MG217 es dispensable per les funcions de citadherència.

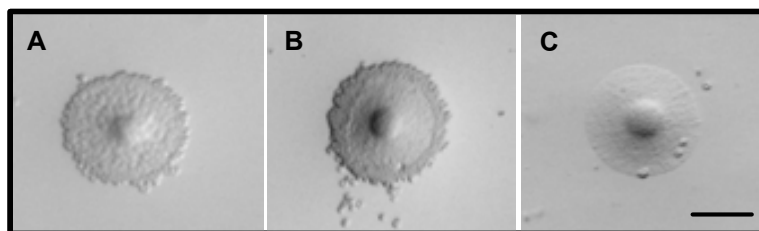


Figura 44. Assaig d'hemadsorció qualitatiu sobre colònies de micoplasma usant eritròcits humans. (A) Soca salvatge G37. (B) Δ mg217. (C) Δ mg191. La barra representa 50 μ m.

V.5. Caracterització del comportament mòbil dels mutants Δ mg217

Quan es van créixer els mutants Δ mg217 adherits al plàstic i coberts en medi semisòlid, vam observar exactament la mateixa morfologia de colònia que la descrita pel mutant E7 (Figura 41). Per tant, aquesta observació confirma que la morfologia estesa del mutant E7 és conseqüència directe de la pèrdua de la proteïna MG217. Per examinar en detall la implicació directe d'aquesta proteïna en aquest fenotip, vam analitzar el comportament mòbil dels mutants Δ mg217 per microcinematografia. Donat que un increment en la velocitat de desplaçament podria explicar la morfologia de colònia observada, primer vam examinar aquest paràmetre. No obstant, com es pot observar en la figura 45 no vam detectar cap diferència significativa respecte la soca salvatge. De la mateixa manera, tampoc vam observar cap diferència significativa respecte la proporció de cèl·lules mòbils (Taula 4).

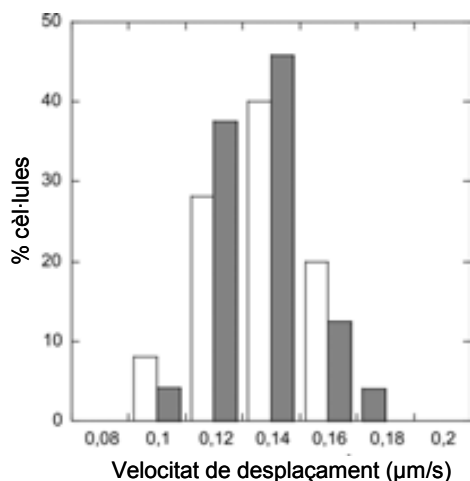


Figura 45. Distribució de les velocitats de desplaçament de la soca salvatge G37 (barres grises) i el mutant Δ mg217 (barres blanques).

L'examen dels patrons de moviment van mostrar diferències clares tal com queda il·lustrat en la figura 46A i taula 4. Com havíem descrit prèviament (Pich *et al.*, 2006a), la soca salvatge es desplaça majoritàriament descrivint cercles (74,8%) mentre que una petita proporció (14,1%) ho fa descrivint moviments erràtics (trajectòries sense orientació definida). En contraposició, vam observar que els mutants Δ mg217 es desplacen majoritàriament descrivint moviments erràtics (54,2% respecte un 31,8% de moviments circulars). Cal afegir, que quan vam examinar específicament les trajectòries circulars, també vam detectar un increment significatiu en la mida dels seus diàmetres (Figura 46B). En conjunt, els moviments erràtics o trajectòries circulars amples, afavoreixen el guany de distància així com l'allunyament respecte la posició original. Per tant, aquests resultats aporten una explicació raonable de l'origen de la morfologia expandida de les colònies derivades dels mutants deficientes per la proteïna MG217.

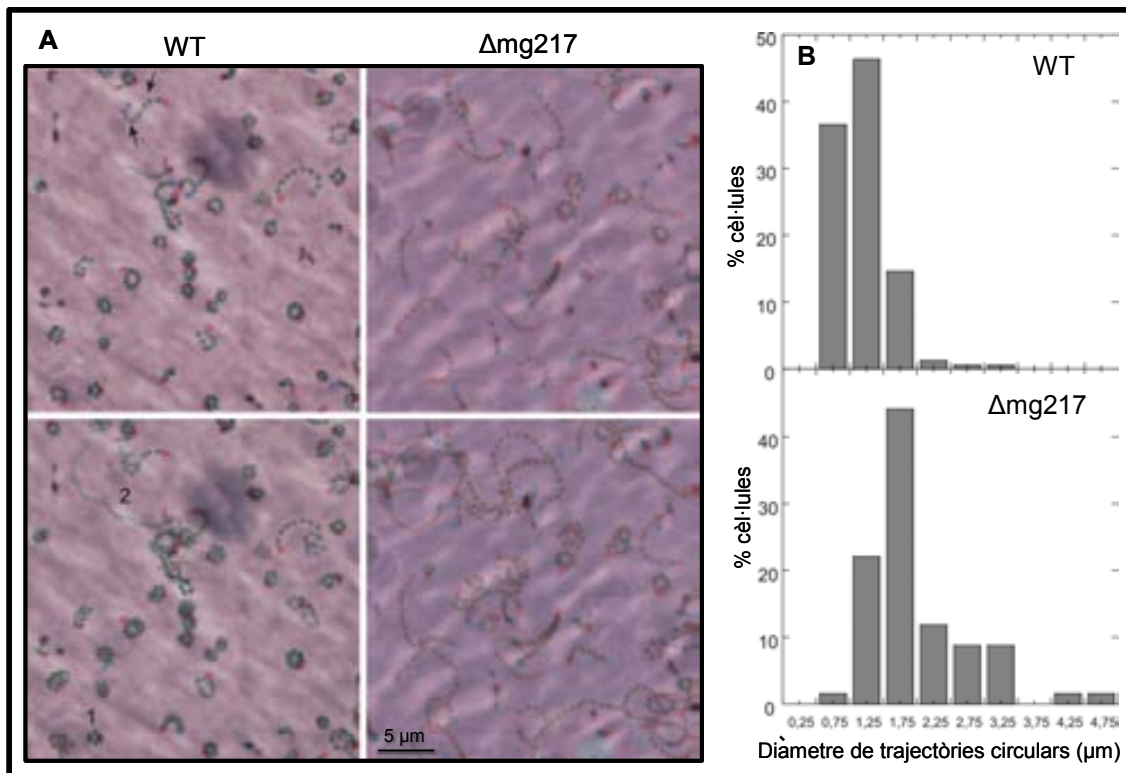


Figura 46. Anàlisi del comportament mòbil de la soca salvatge i el mutant MG217.

(A). Trajectòries descrites per la soca salvatge G37 (WT) i el mutant Δ mg217. Les imatges de dalt mostren el recorregut descrit durant 1 min i s'han obtingut sobreposant 10 fotogrames consecutius separats per 6 s cadascun. Les imatges de baix corresponen a la sobreposició de 20 fotogrames mostrant el recorregut descrit durant 2 min. Per visualitzar la direcció del moviment, la imatge inicial i final s'han sobreposant en canals de color diferents. La marca vermella indica la posició de la cèl·lula al 0 s i la marca blava indica la posició als 60s i 120s. Els números 1 i 2 indiquen moviments circulars i erràtics, respectivament. Les fletxes indiquen canvis en la direcció de moviment, alternant girs de esquerre a dreta.

(B). Distribució dels diàmetres de les trajectòries circulars descrites per el WT i el mutant Δ mg217.

V.6. Caracterització morfològica dels mutants Δ mg217

Per determinar si el canvi en el patró de moviment podria estar relacionat amb canvis morfològics, vam analitzar la morfologia cel·lular de la soca salvatge i els mutants Δ mg217 per SEM. En el cas de la soca salvatge, cal destacar l'existència d'una certa inclinació de l'eix de l'organela terminal respecte l'eix longitudinal del cos cel·lular. Aquest tret diferencial contribueix a que l'organela terminal tingui una aparença corbada (Figura 47A,C i D). Malgrat que els mutants Δ mg217 exhibeixen organeles terminals normals, la inclinació d'aquesta estructura respecte el cos cel·lular està clarament reduïda (Figura 47B,E i F). Per tal d'aprofundir en aquesta troballa, es va mesurar l'angle existent entre l'eix de l'organela terminal i l'eix longitudinal del cos cel·lular. En la soca salvatge aquest angle segueix una distribució normal amb un valor mig de 120° , mentre que en el mutant Δ mg217 la distribució d'aquest angle està clarament esbiaixat cap a un angle pla (Figura 47G). Per tant, aquests resultats suggereixen una implicació directe de la proteïna MG217 en la curvatura de l'organela terminal respecte el cos cel·lular.

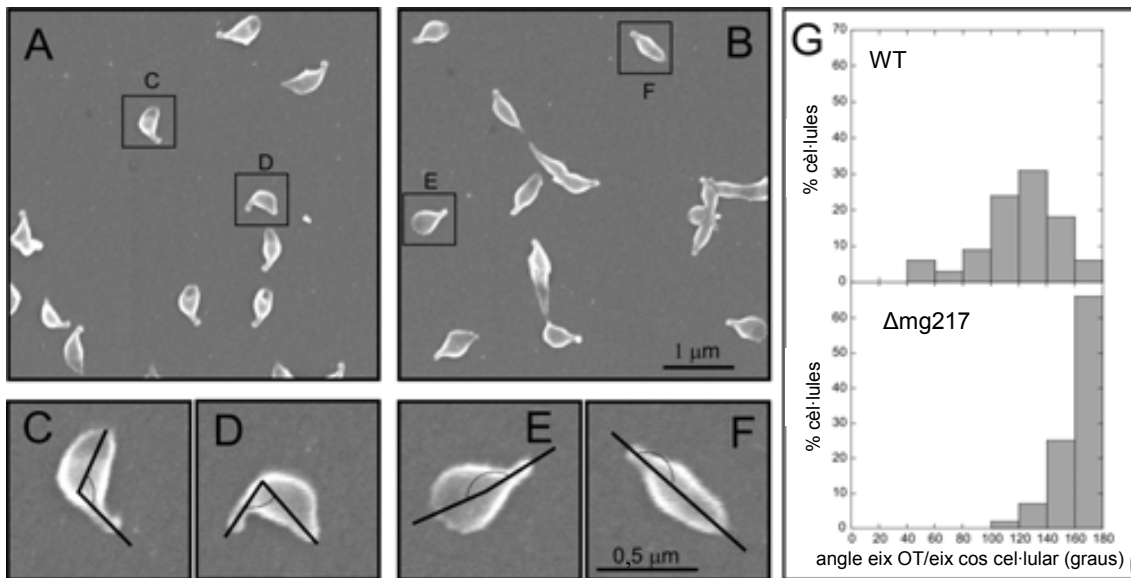


Figura 47. Anàlisi de l'angle d'inclinació que existeix entre els eixos longitudinals de l'organela terminal i el cos cel·lular.

(A-F). Imatges de SEM il·lustrant la curvatura de l'organela terminal de la soca salvatge (A,C i D) i el mutant Δ mg217 (B, E i F). Els eixos longitudinals de l'organela terminal i el cos cel·lular estan marcats amb línies rectes. L'angle que s'ha mesurat entre els dos eixos està indicat per arcs puntejats.

(G). Distribució de l'angle d'inclinació existent entre els eixos longitudinals de l'organela terminal (OT) i el cos cel·lular de la soca salvatge G37 (WT) i el mutant Δ mg217. L'angle s'ha mesurat a partir de 100 cèl·lules aïllades per a cada soca.

Donat que l'aparença corbada de l'organela terminal podria contribuir a les trajectòries circulars, també es va examinar la direcció d'aquesta curvatura (esquerre o dreta) i el sentit del moviment circular. Com s'il·lustra en la taula 4, existeix una clara correlació entre aquests paràmetres, suggerint que la inclinació de l'organela terminal determina l'orientació del moviment.

Taula 4. Caracterització del patró de moviment de la soca salvatge G37 (WT) i el mutant Δ mg217.

Soca	Tipus de moviment			Sentit del moviment circular		Direcció de la curvatura de l'organela terminal	
	Circular	Erràtic	Immòbil	Sentit horari	Sentit anti-horari	Dreta	Esquerre
WT	74,8 %	14,1%	11,1 %	36 %	64 %	39,2 %	60,8 %
Δ mg217	31,8 %	54,2 %	14,0 %	37 %	63 %	37,1 %	62,9 %

V.7. Localització cel·lular de la proteïna MG217

Per determinar si la proteïna MG217 té una localització intracel·lular o bé esta exposada a la superfície, es va realitzar un assaig de proteòlisi limitada amb proteinasa K de cèl·lules intactes de *M. genitalium* (Figura 48).

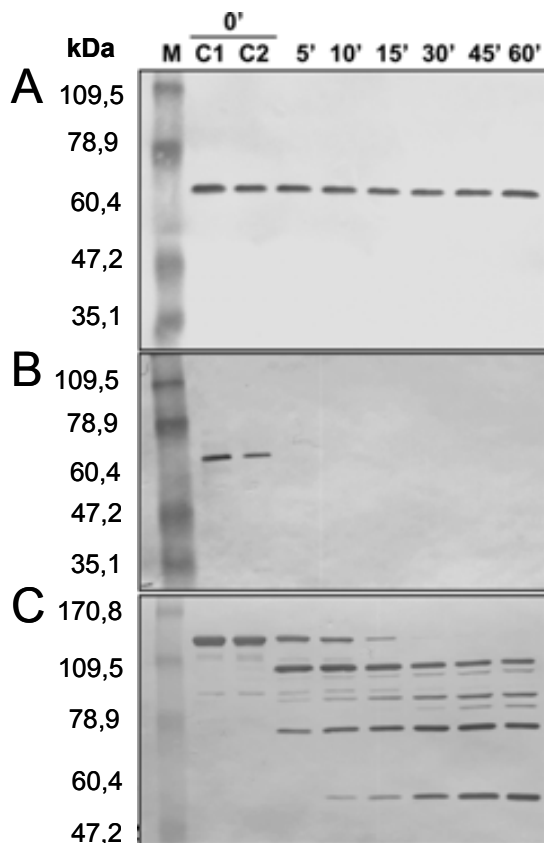


Figura 48. Assaig de proteòlisi limitada amb proteinasa K de cèl·lules intactes de *M. genitalium*.

(A i C) Cèl·lules intactes. (B) Cèl·lules tractades prèviament amb 0.1% Triton X-114. Les incubacions amb proteinasa K van durar els temps indicats. Les reaccions es van aturar amb 1mM PMSF. El perfil proteic de les cèl·lules tractades es va analitzar per Western blot utilitzant anticossos anti-MG217 (A i B) o anti-P140 (C). C1 i C2 corresponen a controls. C1 és el perfil proteic de cèl·lules sense tractar, mentre que C2 correspon al perfil proteic de cèl·lules tractades però on prèviament s'ha afegit 1mM PMSF. M correspon al marcador de proteïnes "pre-stained" d'invitrogen.

La detecció dels fragments digerits es va realitzar mitjançant Western blot. Com en el capítol 2 (veure secció IV.3), es va utilitzar l'adhesina P140 com a control intern del tractament. En aquest sentit, mentre la proteïna P140 és digereix completament en només 30 minuts, la proteïna MG217 roman resistent al tall fins i tot després d'una hora de tractament (Figura 48A i C). En contraposició, cèl·lules tractades prèviament amb 0,1% del detergent Triton X-114, la proteïna MG217 es degrada completament en només 5 minuts (Figura 48B). Per tant, aquests resultats indiquen que al menys la major part de proteïna MG217 està protegida per la membrana cel·lular i té una localització intracel·lular.

Posteriorment, es va determinar la localització cel·lular específica de la proteïna MG217 per crio-immunomicroscòpia electrònica (Figura 49).

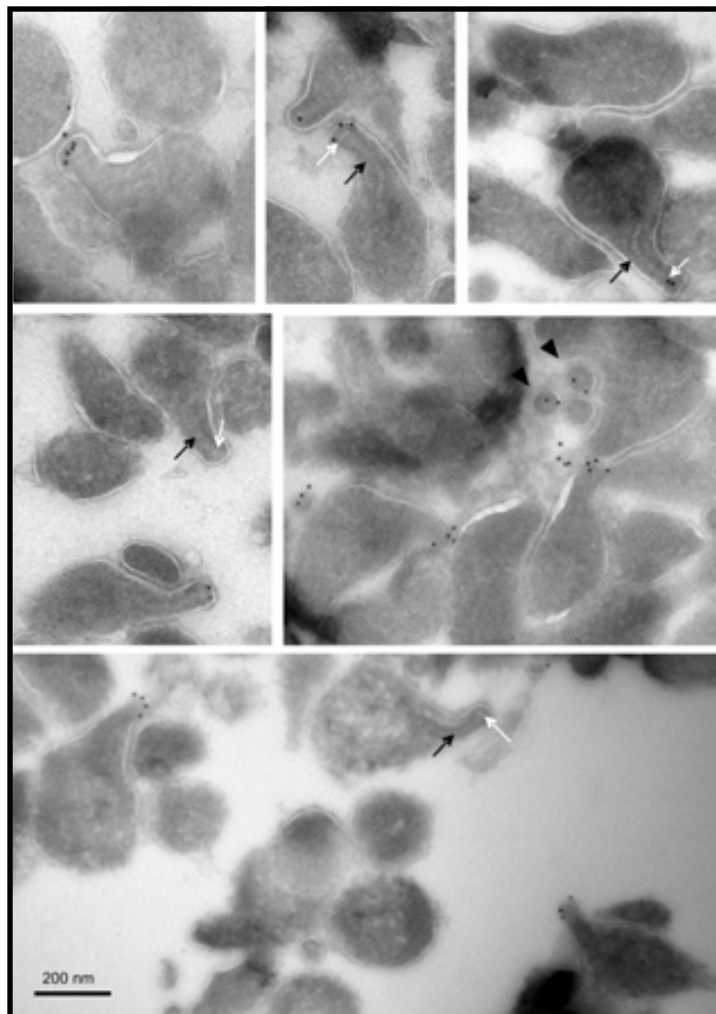


Figura 49. Immunolocalització de la proteïna MG217 en crio-talls ultrafins de la soca salvatge G37.

Les fletxes negres i blanques indiquen l'eix electro-dens i el botó terminal, respectivament. Els triangles mostren seccions que poden correspondre a talls transversals de l'organela terminal.

En les imatges per TEM es pot apreciar la morfologia típica en forma de pera de la soca salvatge en diferents plans de tall. En aquest cas el particular tractament de les mostres produeix que les membranes quedin ressaltades en blanc. El mateix succeeix amb el eix electro-dens i el botó terminal, que apareixen molt ben definits. Després de la detecció immunològica amb un anticòs monoclonal anti-MG217, vam observar marca predominantment en l'organela terminal, sota la membrana cel·lular i a prop del botó terminal (Figura 49). Per altra banda, algunes partícules d'or també s'observen en estructures circulars petites, probablement representant seccions transversals de l'organela terminal. No es va detectar marca ni en els talls del mutant $\Delta mg217$ ni en talls de la soca salvatge quan es va utilitzar només el anticòs secundari, indicant l'especificitat de la marca.

DISCUSSIÓ

LA PROTEÏNA MG217 DE *M. genitalium* PODRIA ESTAR IMPLICADA EN EL CONTROL DE LA DIRECCIÓ DEL MOVIMENT

Molts microorganismes han de controlar constantment la informació del seu entorn natural. L'anàlisi d'aquesta informació seguida d'una resposta apropiada pot determinar moltes vegades la capacitat de supervivència d'una espècie. Entre els diferents tipus de resposta que pot adoptar un microorganisme, probablement la resposta motora sigui la més útil per fer front a determinats canvis ambientals. Com s'ha comentat en la introducció del capítol, existeixen evidències que els micoplasmes també poden modular la seva capacitat motora. Però de quina forma?

Amb l'objectiu d'aportar respostes al respecte, en aquest treball s'ha realitzat un assaig global de mutagènesi per transposó, dirigit a la cerca de mutants amb alteracions en el comportament de motilitat. Aquesta anàlisi ha permès la identificació d'un únic mutant exhibint aquestes característiques, que presentava una inserció per transposó en el gen *mg217*. Interessantment, el gen *mg217* es troba en un operó vinculat amb citadherència i codifica per la proteïna homòloga P65 de *M. pneumoniae* (Jordan *et al.*, 2001). Estudis realitzats en aquesta espècie han revelat que la proteïna P65 es localitza a l'organela terminal (Seto *et al.*, 2001) i que és inestable en absència de HMW1, HMW2 i HMW3 (Jordan *et al.*, 2001). En base aquestes observacions s'ha suggerit que la proteïna P65 és una proteïna accessòria de citadherència. No obstant, la manca d'un mutant per aquesta proteïna i l'absència de dominis conservats en la seva seqüència d'aminoàcids, han dificultat fins al moment el poder determinar la seva funció.

En aquest estudi hem demostrat que la proteïna MG217 és dispensable per funcions vinculades a citadherència, donant una explicació al fracàs en l'obtenció d'aquest tipus de mutants (tant a *M. pneumoniae* com a *M. genitalium*) en experiments dirigits a seleccionar mutants no adherents (Mernaugh *et al.*, 1993; Reddy *et al.*, 1996). Per altra banda, hem confirmat la inestabilitat del MG217 en absència dels components estructurals MG312, MG218 i MG317, però no en absència del complex P140/P110. Al contrari, la caracterització del mutant MG217 ha revelat l'absència de defectes en

components coneguts de l'organela terminal, suggerint que de ser un component integrant d'aquesta estructura és un dels darrers a incorporar-s'hi. En estudis previs, s'ha demostrat que en absència de MG218, a part de la proteïna MG217 també es veuen afectades les proteïnes MG312 i MG317 (Pich *et al.*, 2008). En canvi, en absència de MG317 només es veu afectada la proteïna MG217. En base aquestes observacions és raonable pensar que l'estabilitat del MG217 depèn bàsicament de la proteïna MG317. Aquest vincle entre ambdues proteïnes és consistent amb les seves localitzacions respectives. Recentment, estudis realitzats en el nostre laboratori indiquen que la proteïna MG317 és el component majoritari del botó terminal. Per altra banda, en aquest estudi hem delimitat específicament la localització del MG217 entre la membrana cel·lular de la part distal de l'organela terminal i el botó terminal. Aquesta localització obre la possibilitat que la proteïna MG217 pugui ser al menys un dels constituents del component C descrit prèviament per Henderson i Jensen (2006), connectant el botó terminal amb la capa interna de proteïnes perifèriques de membrana (Figura 5). Per altra banda, aquesta localització justifica la possible interacció entre les proteïnes MG317 i MG217. En el cas de *M. pneumoniae* i *M. gallisepticum*, les proteïnes homòlogues del MG217 semblen estar parcialment exposades a la membrana (May *et al.*, 2006; Proft *et al.*, 1995). Malgrat no podem descartar que una petita part de MG217 no detectada per Western blot estigui exposada a la membrana, els nostres estudis de proteòlisi limitada indiquen més aviat el contrari i són consistents amb la localització observada per immunogold. El motiu d'aquesta discrepància es desconeguda fins al moment.

En aquest estudi, també hem demostrat la implicació de la proteïna MG217 en la maquinària de motilitat i en particular en la modulació del comportament mòbil. En primer lloc, hem trobat que l'absència d'aquesta proteïna altera el angle existent entre els eixos longitudinals de l'organela terminal i el cos cel·lular. D'acord amb la localització específica del MG217, aquests resultats posen de manifest una funció estructural d'aquesta proteïna en promoure la curvatura de l'organela terminal a *M. genitalium*. En segon lloc, hem demostrat que aquestes alteracions en la curvatura s'acompanyen de canvis en el patró de moviment. Concretament, hem posat de manifest que una reducció en la curvatura de l'organela terminal respecte el cos cel·lular afavoreix les trajectòries circulars amples o rectilínies. En base aquests resultats, proposem que l'organela terminal actua de manera anàloga a un timó, possibilitant el control de la direcció del moviment dels micoplasmes (Figura 50). En suport d'aquesta

perspectiva, hem observat una correlació excel·lent entre la direcció de la curvatura de l'organela terminal i el sentit dels moviments circulars. Malauradament, la petita mida de l'organela terminal que està sota el poder de resolució del microscopi òptic, impedeix demostrar de forma directa que els canvis en la curvatura causen realment un canvi en la direcció de moviment.

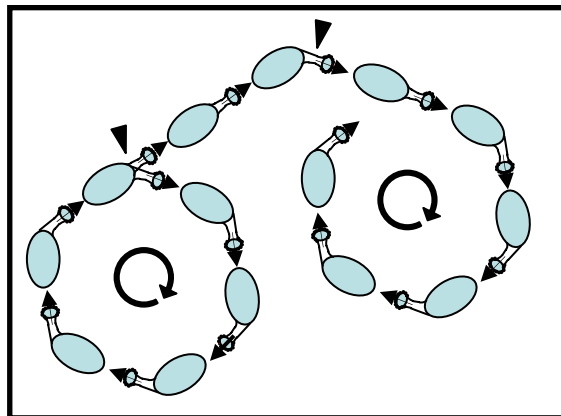


Figura 50. Representació esquemàtica il·lustrant com l'organela terminal pot dirigir la direcció de moviment de *M. genitalium*.

Les fletxes indiquen com un canvi en la inclinació de l'organela terminal resulta en un canvi en el patró de moviment (pas de moviment circular a moviment erràtic).

L'ús d'una estructura especialitzada com l'organela terminal per dirigir el moviment, representa un mecanisme completament nou entre la comunitat bacteriana. Per exemple, *E. coli* pot reorientar el seu moviment modificant el sentit de rotació dels seus flagels (Webre *et al.*, 2003). Alternativament, *M. xanthus* es desplaça en línia recta revertint constantment la direcció de desplaçament, sent la freqüència en que es produeixen aquestes reversions el que determina finalment la orientació preferent (Zusman *et al.*, 2007). Tant la rotació flagel·lar en *E. coli*, com la freqüència de reversió en *M. xanthus*, es regula mitjançant un complex sistema de transducció de senyals, que està representat principalment pels gens *che*. En el cas dels micoplasmes, no trobem gens homòlegs als gens *che*. Per aquest motiu, la manera com els micoplasmes integren senyals ambientals en una resposta motora és desconegut a dia d'avui. A nivell especulatiu, suggerim que la proteïna MG217 podria ser al menys un dels elements funcionals que podria fer aquesta transició; per exemple, modificant la curvatura de l'organela terminal per reorientar el micoplasma en resposta a un estímul ambiental. De manera interessant, s'ha descrit que el MG217 és una proteïna fosforilada (Su *et al.*, 2007), la qual cosa obre la possibilitat que la funcionalitat de la proteïna pogués estar regulada per fosforilació. Malgrat que es desconeix la manera com la proteïna MG217 pot induir

canvis en la curvatura de l'organela terminal, podria ser possible que el estat de fosforilació del MG217 promogués certs canvis conformacionals a la mateixa, que un cop propagats al eix electro-dens, acabarien per corbar el conjunt de l'estructura. Aquesta possibilitat ve suportada per alguns trets estructurals que s'han observat en l'organela terminal de *M. genitalium*. Concretament, Hatchel i Balish (2008) han descrit que l'eix electro-dens de *M. genitalium* també està corbat i que el botó terminal està

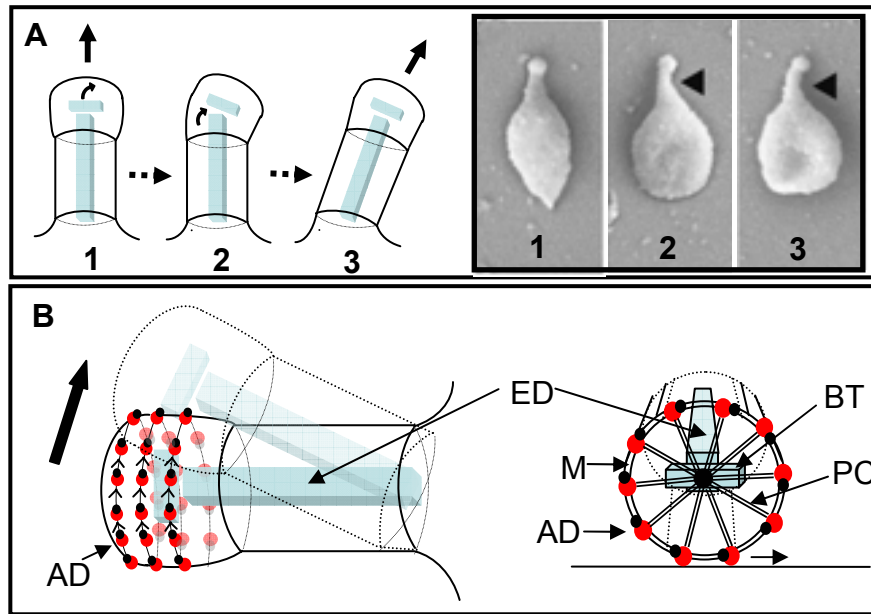


Figura 51. Models per explicar els canvis observats en la curvatura de l'organela terminal.

(A). Model basat en canvis conformacionals induïts al eix electro-dens. Les imatges de SEM (panell a la dreta) s'han extret i modificat de (Hatchel i Balish, 2008).

(B). Model d'extrem rodant o rolling-tip. Representació esquemàtica d'una vista lateral (esquerra) i frontal (dreta) de l'organela terminal. El model de rolling tip estaria basat en un motor propulsor localitzat a la part distal de l'organela terminal. Aquest motor podria consistir en un moviment circular del complex d'adhesines P140/P110 (AD) que estarien ancorades a la membrana (M). El moviment circular de les adhesines estaria assistit per proteïnes específiques del citoesquelet subjacent (PC; ex. component C descrit per (Henderson i Jensen, 2006)) que connectarien el botó terminal (BT) amb proteïnes perifèriques de membrana situades a la part distal del eix electro-dens (ED). Aquest moviment circular hauria d'estar limitat a la part més distal de l'organela terminal "tip", forçant així el desplaçament lateral de l'organela terminal respecte el cos cel·lular (indicat per fletxes). És interessant destacar, que el moviment continu d'aquest "rolling tip" permetria explicar les trajectòries circulars observades en les cinematografies. Per altra banda, si el moviment circular del rolling tip s'atura, caldria esperar que les cèl·lules adoptessin trajectòries rectilínies. Un aspecte atractiu del model, és que les cèl·lules podrien controlar el diàmetre de les trajectòries circulars simplement alternant estats ON-OFF del motor que impulsa el moviment del rolling tip. A més, un canvi en la direcció de la rotació del rolling tip permetria també variar la direcció de la curvatura de l'organela terminal (a dreta o a esquerra), variant així la direcció de moviment. En aquest model, la proteïna MG217 podria estar involucrada en la generació o transmissió d'aquest moviment al complex P140/P110. En suport d'aquesta possibilitat, les proteïnes ortòlogues de MG217 i P140 a *M. pneumoniae* s'han trobat formant complexos després de tractar amb formaldehid, suggerint l'existència d'interaccions entre ambdues proteïnes (Layh-Schmitt *et al.*, 2000). Per altra banda, la proteïna MG217 conté dominis rics en prolina i presenta cremalleres de leucina, característiques que afavoreixen les interaccions proteïna-proteïna.

desplaçat lateralment en la direcció d'aquesta curvatura. Tenint en compte la localització de la proteïna MG217, podria ser possible que el MG217 transmeti un primer canvi conformacional al botó terminal i que posteriorment es transferís a la bastida principal del eix electro-dens (Figura 51A). En la figura 51B, especulem amb un model alternatiu més complex però que tanmateix permet explicar certs detalls.

Alternativament, podríem considerar que la curvatura de l'organela terminal és la simple conseqüència d'una força fixa exercida per la presència de la proteïna MG217 i que per tant, no existeix cap mecanisme al darrera capaç de modular la curvatura d'aquesta estructura. No obstant, l'ampli rang d'angles (entre 40° i 180°) existent entre l'organela i el cos cel·lular, o el fet que les cèl·lules puguin alternar girs a esquerre i a dreta (Figura 46A), suggereixen més aviat el contrari. Probablement, altres proteïnes addicionals al MG217 també estan implicades en la curvatura de l'organela terminal, com per exemple altres elements del citoesquelet que integren aquesta estructura. És cert que en aquesta situació esperariem haver trobat més gens implicats en el nostre experiment de mutagènesi global per transposó. Potser, el fet que mutacions en aquests components puguin afectar al conjunt de l'estructura de l'organela terminal, podrien dificultar la seva identificació. Alternativament, aquests components podrien ser essencials per la viabilitat cel·lular o bé que els gens que els codifiquen són molt petits, fent molt improbable aïllar un possible mutant. En qualsevol cas, es necessari desenvolupar nous mètodes per identificar altres fenotips relacionats amb el comportament de motilitat. Si realment existeix un mecanisme per controlar el

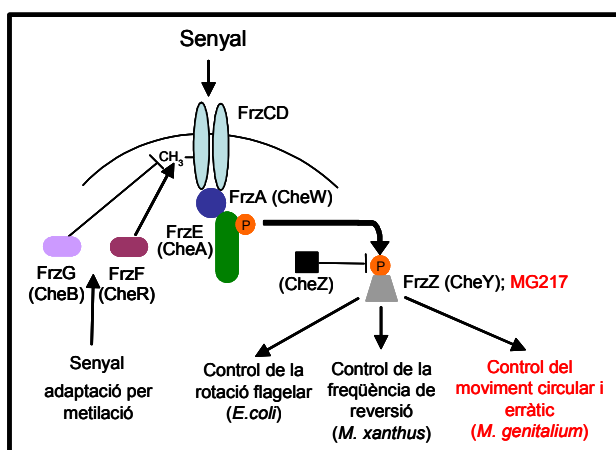


Figura 52. Models de regulació del control de moviment.

Model quimiosensor d' *E. coli* (gens *che*) i *M. xanthus* (gens *frz*). Per més detalls veure referències (Webre *et al.*, 2003; Zusman *et al.*, 2007). La proteïna MG217 de *M. genitalium* podria actuar d'efector final d'una manera similar a les proteïnes FrzZ i CheY.

moviment, forçosament ha d'existir una cascada de senyals (més o menys complexa) que estimuli l'efector final, que en aquest cas podria ser el MG217. Malgrat no s'han trobat homòlegs als gens *che*, potser altres receptors de membrana, proteïnes amb activitat quinasa o metilasa, podrien completar aquest escenari (Figura 52). En aquest sentit, aquest treball obre una nova línia de recerca molt estimulants dirigida a la identificació d'aquests components.

Ens agradaria finalitzar la discussió, comentant les implicacions que podria tenir per aquest patògen humà el fet de disposar d'un sistema de control de moviment. En primer lloc, ja hem comentat que l'activitat motora és un important factor de virulència que pot contribuir de manera determinant en el procés de colonització. Concretament, estudis centrats a *M. pneumoniae* han posat de manifest la importància de la motilitat per travessar les mucoses que revesteixen els epitelis del hoste (Jordan *et al.*, 2007). En aquest context, una idea interessant és la possibilitat que components de la mucosa poguessin actuar com a substàncies quimioattractants o estimulants de l'activitat motora durant el procés de colonització. En suport aquesta suposició, s'ha descrit que *M. mobile* exhibeix atracció positiva pels components del mucus (Kirchhoff *et al.*, 1987). Malgrat que es desconeix si aquesta taxis existeix a *M. genitalium*, s'ha descrit que l'enzim gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa de *M. genitalium* pot actuar com a receptor de la mucina (un dels components més predominants de la mucosa) (Alvarez *et al.*, 2003), potser representant en aquest sentit un possible quimiorceptor. En segon lloc i tenint present el comportament peculiar de moviment de *M. genitalium*, també podríem interpretar la capacitat de control de moviment des d'un punt de vista més social, per exemple a l'hora de formar comunitats organitzades. Per exemple, *M. xanthus* controla el seu moviment en base al seu curiós cicle cel·lular que es caracteritza per la formació de cossos fructífers (Zusman *et al.*, 2007). Per desenvolupar aquests cossos necessita agrupar cèl·lules individuals i per això disposa d'un complex sistema de comunicació social. Mitjançant el control de la freqüència de reversió de direcció del seu moviment, es capaç de mantenir aquest estat d'agrupació. En general, *M. xanthus* es mou en línia recte i reverteix la direcció de desplaçament aproximadament cada 7 o 8 minuts (Blackhart i Zusman, 1985). Per tant, el guany net de moviment només succeeix quan els intervals de reversió augmenten en el temps. En aquest sentit, un augment en la freqüència de reversió promou un estat d'agrupació mentre que una disminució afavoreix la dissipació de la colònia (Blackhart i Zusman, 1985). De manera anàloga, el

moviment circular de *M. genitalium* no permet un guany net en el moviment, afavorint potser d'aquesta manera que un conjunt de cèl·lules es mantinguin agrupades. Al contrari, un moviment erràtic permetria escapar d'aquesta agrupació. Per tant, en aquest punt no es descarta que *M. genitalium* pugui regular la transició de moviments circulars a moviments erràtics per controlar l'estat d'agregació de la població. Aquestes formacions cooperatives, com en el cas de formacions de biofilms, poden aportar protecció i avantatges a nivell de patogènesi. En el cas de *M. pulmonis* s'ha descrit la formació de biofilms (Simmons *et al.*, 2007), i malgrat que es desconeix si aquest procés té lloc a *M. genitalium in vivo*, aquest microorganisme mostra una tendència constatada a formar agrupacions *in vitro*. Per tant, estudis dirigits en aquest sentit potser ajudin a comprendre el paper del moviment en la biologia i patogènesi de *M. genitalium*.

VI. MATERIAL I MÈTODES

VI.1. EQUIP GENERAL UTILITZAT

- Agitador vòrtex Heidolph Top-mix 94323
- Agitadors magnètics Variomag i Metrohm
- Agitador orbital P-selecta, model Totabit
- Agitador de balanceig SBS, model AB-2
- Äkta prime (Amersham Pharmacia Biotech)
- Autoclau Matachana models 140L2 i 140LE1
- Balances Sartorius R200D, PT1200 I B1205
- Banys termostàtics d'aigua Huber (Polystat), LKB2219 Multitemp II i Grant (W6)
- Cabina de flux laminar Telsar, model AV-100
- Cabina de flux laminar de seguretat biològica Telsar, model BIO-II-A
- Centrífugues Sorvall RC5C, Beckman model J2-21 i Heraeus Megafuge 2.0R
- Cubetes d'electroforesi per a gels d'agarosa de BioRad
- Desionitzador d'aigua Milli-Qplus
- Dessecador per punt crític K850 d'Emitech (Ashfort. UK)
- Electroporador BTX[®] Electroporation System, model Electro Cell Manipulator[®] 600
- Equip de fotografia BioRad, model Gel Doc 1000 amb Software Molecular Analyst 1.5
- Espectrofotòmetre Varian, model Cary 400 Bio UV-Visible
- Estufa de cultiu Memmert
- Estufes de cultiu Jouan, models EG 110 IR i 160-150
- Fonts d'alimentació BioRad, MODEL Power Pac 300 i ISCO model 453
- Forn d'hibridació Amersham Pharmacia Biotech
- Incubador d'aire amb agitació orbital Braun model Centromat H
- Kit Mini-Protean i Mini Trans-Blot[®] electrophoretic transfer cell de BioRad
- Lupa estereoscòpica Wild Heerbrugg Leitz Plan
- Lupa estereoscòpica LeicaMZFLIII acoplada a una càmera model LeicaDC500
- MALDI-TOF Ultraflex (Bruker Daltonics)
- Mesurador de pH Cyberscan model ph1100
- Metal·litzador d'or E5000 Polaron equipment limited. (Watford. UK)
- Microcentrífugues Hettich model Mickro20 i Eppendorf model 5415
- Microscopi electrònic de rastreig Hitachi S-570 (Tokyo, Japan)
- Microscopi electrònic de transmissió Hitachi H-7000 (Tokyo, Japan) i JOEL JEM-2011 (Tokyo, Japan).
- Microscopi òptic Axioplan (Zeiss)
- PCR Minicycler-MJ Research
- Transluminador Ultra-Violet Products TC-365-A
- Victor³V 1420 multilabel counter (PerkinElmer).

VI.2. VECTORS I SOQUES BACTERIANES

VI.2.1. Vectors utilitzats en aquest treball

-pBluescript II SK⁺ (pBSKII+): Fagèmid comercial utilitzat com a vector general de clonatge. Aquest vector conté el origen de replicació ColE1 d'*E. coli* i el del bacteriòfag F1 així com els promotors T3 i T7. També conté el gen de resistència a ampicilina i una regió de clonatge múltiple que interromp el gen *lacZ'*. Origen: Stratagene.

-pBE: Vector derivat del pBluescript II SK⁺ on s'ha substituït la regió de clonatge múltiple per una sola diana *EcoRV*. Aquest vector s'ha utilitzat per clonar en rom els productes amplificats per PCR. Els productes clonats poden ser posteriorment alliberats si s'han introduït dianes de restricció als extrems. Origen: (Pich *et al.*, 2006b).

- pMTnGm: Vector derivat del vector pBluescript II SK⁺ que conté un minitransposó modificat basat en el transposó Tn4001 que prové de *Staphylococcus aureus*. Aquest transposó és funcional a *M. genitalium* i permet obtenir insercions estables al genoma. El transposó Tn4001 original incorpora el gen de resistència *aac(6')-aph(2'')* que confereix resistència a gentamicina a *M. genitalium*. Origen: (Pich *et al.*, 2006b). Veure Figura 11.

- pMTnTetM438: Vector similar al pMTnGm. En aquest cas s'ha substituït el gen de resistència *aac(6')-aph(2'')* pel gen marcador de selecció modificat *tetM438* que confereix resistència a tetraciclina. Origen: (Pich *et al.*, 2006b). Veure Figura 11.

-pET21d: Vector comercial utilitzat per l'expressió de proteïnes recombinants a *E. coli*. Afegeix una cua d'histidines a l'extrem C-terminal de la proteïna. Origen: Novagen.

-pΔmg191, pΔmg192, pΔmg312, pΔmg217: Vectors construïts per dur a terme la delecció dels gens *mg191*, *mg192*, *mg312* i *mg217* respectivament, al genoma de *M. genitalium*. Origen: Aquest estudi. Per detalls veure secció VI.4.11.

-pMTnTetMG191, pMTnTetMG192 i pMTnTetMG191-192: Vectors construïts per dur a terme la complementació dels mutants classe I i classe II de *M. genitalium*. Origen: Aquest estudi. Per detalls veure secció VI.4.11.

- pMTnGmMG312, pMTnGmMG312ΔN-t, pMTnGmMG312ΔC-t, pMTnGmMG312ΔEAGR, pMTnGmMG312ΔRep, pMTnGmMG312ΔCD, pMTnGmMG312WA i pMTnGmMG312ΔWA(GxS): Vectors construïts per dur a terme estudis de complementació del mutant Δmg312 de *M. genitalium*. Origen: Aquest estudi. Per detalls veure secció VI.4.11.

-pET21d(MG312): Vector construït per dur a terme l'expressió de la proteïna MG312 de *M. genitalium* a *E. coli*. Origen: Aquest estudi. Per detalls veure secció VI.4.11.

Els plasmidis s'han conservat en dissolució en tampó TE (10 mM Tris pH 8, 1mM EDTA) a -20°C o en glicerinat en les soques portadores.

VI.2.2. Soques utilitzades en aquest treball

Soques d'*E. coli*:

-XL-1Blue: Soca d'*E. coli* utilitzada pels passos de clonatge.

Genotip: *recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac*, [F', *proAB, lacI^qΔM15 Tn10(tet^r)*].

-BL21(DE3): Soca d'*E. coli* utilitzada per l'expressió de proteïnes recombinants.

Genotip: F', *ompT, hsdS (r_Bm_B), dcm, gal, λ(DE3)*.

Soques de *M. genitalium*:

-*Mycoplasma genitalium* G37: Soca de referència de *M. genitalium* aïllada a partir de la uretra d'un pacient amb uretritis no gonocòcica. Origen: ATCC Number: 33530. Dipositari: J.G Tully.

-Mutants classe I i classe II: Mutants espontanis de *M. genitalium* en adhesió cel·lular cedits pel Dr. JB. Baseman. Origen: (Mernaugh *et al.*, 1993).

-Δmg218: Soca de *M. genitalium* G37 en la qual s'ha deletat el gen *mg218* per recombinació homòloga. Origen: (Pich *et al.*, 2008).

-Δmg317: Soca de *M. genitalium* G37 en la qual s'ha deletat el gen *mg317* per recombinació homòloga. Origen: (Pich *et al.*, 2008).

-Δmg191, Δmg192, Δmg312, Δmg217: Soques de *M. genitalium* G37 amb deletacions als gens *mg191, mg192, mg312* i *mg217*, respectivament. Origen: Aquest estudi.

-Mutant E7: Soca de *M. genitalium* G37 amb una inserció de transposó en el gen *mg217*. Origen: Aquest estudi.

Les soques d'*E. coli* es poden conservar durant anys a -80°C, en medi de cultiu amb un 15% de glicerol estèril (preparar stocks de 1 ml). Els cultius líquids o en placa es poden conservar a 4°C fins a un màxim de 7 i 20, respectivament. Les soques de *M. genitalium* es poden conservar durant anys a -80°C en medi de cultiu (SP-4) sense necessitat d'afegir crioprotectors com el glicerol.

VI.3. MÈTODES MICROBIOLÒGICS

VI.3.1. Composició i preparació dels medis de cultius utilitzats en aquest treball

-Medi LB (Luria-Bertani):

Medi ric que pot usar-se tan en forma líquida, com en forma sòlida per al cultiu d'*E. coli*.

Composició per 1 L:

10g	Bactrotriptona (Scharlau microbiology)
5g	Extracte de llevat (Scharlau microbiology)
10g	NaCl (Fluka)
15g (1.5%)	Agar (Scharlau microbiology) (Només en cas de medi sòlid)
H ₂ O destil·lada fins a 1 L i esterilitzar 20 min 121°C	

-Medi 2xYT:

Medi més ric que el LB que s'utilitza principalment pels cultius líquids d'*E. coli*.

Composició per 1 L:

16g	Bactrotriptona (Scharlau microbiology)
10g	Extracte de llevat (Scharlau microbiology)
5g	NaCl (Fluka)
H ₂ O destil·lada fins a 1 L i esterilitzar 20 min 121°C	

-Medi SP-4 (Spiroplasma medium):

Medi molt ric utilitzat per al creixement d'algunes espècies de micoplasma. En aquest estudi s'ha utilitzat aquest medi pel creixement de *M. genitalium* tant en forma líquida com en forma sòlida per aïllar colònies en placa.

Composició per 500ml:

- Dissoldre en 310 ml H₂O MilliQ la base que consisteix en:

1,75g	PLO Mycoplasma broth base (Difco)
5g	Triptona Peptona (Difco)
2,65 g	Bacto™Peptona (Difco)
2,50g	Glucosa (Sigma)
- Ajustar el pH a 7,8 amb NaOH 2M
- Autoclavar a 121 durant 15 min

4. Afegir els següents complements un cop refredat:

50 ml	Yeastolate 2% autoclavat (Difco)
7 ml	Roig de fenol 0,1% pH 7,0 autoclavat (Difco)
17,5 ml	Extracte de llevat 25% ^(a)
25 ml	CMRL 10X (Invitrogen)
85 ml	Sèrum boví fetal (Invitrogen) ^(b)
1,71 ml	L-Glutamina 200 mM (Sigma)
0,250 ml	Ampicilina 200 mg/ml ^(c)

5. Ajustar el pH final entre 7,6-7,8 amb NaOH 2M

(a) Encara que l'extracte de llevat està disponible comercialment, molts laboratoris prefereixen preparar-se'ls ells mateixos. El procediment és el següent. Es resuspèn 250 g d'extracte de llevat fresc en 1 L de H₂O MilliQ i s'autoclava a 115°C durant 10 min. Un cop refredat, es centrifuga a 380 x g durant 10 min a 4°C. S'autoclava un altre cop i s'aliquota. Es pot emmagatzemar a -20°C.

(b) Existeix prou variabilitat entre els lots de sèrum boví fetal, per la qual cosa és adient fer una reserva del lot. Abans d'utilitzar-lo cal inactivar el sistema de complement escalfant a 56°C durant 30-60 min.

(c) Per evitar contaminacions es suplementa el medi amb ampicilina, donat que els micoplasmes no tenen paret cel·lular i en són resistents.

Per preparar medi SP-4 sòlid, s'afegeix a la base agar Noble (Difco) a una concentració final del 0,8%. Després, la base s'autoclava i s'atempera a 56°C durant 1h. Paral·lelament, també s'atemperen els complements durant 30 min, exceptuant la glutamina i els antibiòtics. Un cop atemperada la base i els complements, es barregen i s'afegeix la glutamina i antibiòtics, ajustant el pH entre 7,6-7,8. El medi es pot mantenir a 56°C mentre es dipositen uns 6 ml en plaques de Petri de 60 mm. Les plaques es poden conservar a 4°C però es convenient utilitzar-les el més aviat possible.

Per preparar medi SP-4 semisòlid per l'assaig de motilitat, s'afegeix a la base agarosa de baix punt de fusió SeaPlaque GTG (Iberlabo) a una concentració final del 0.5%. La quantitat d'agarosa es pot variar depenent de la consistència que desitgem en l'assaig de motilitat. En aquest punt, el procediment és igual al de la preparació del medi sòlid amb l'excepció que la base i els components s'atemperen a 42°C.

- Suplements:

Per seleccionar i propagar transformants d'*E. coli* i *M. genitalium*, els medis s'han suplementat amb els següents antibiòtics:

-Ampicilina (Roche): Es preparen stocks de 200 mg/ml en H₂O MilliQ que s'emmagatzemen a -20°C. La solució s'esterilitza per filtració usant filtres de 0,22µm (Millipore). En aquest treball s'ha utilitzat una concentració final de 100 µg/ml.

-Tetraciclina (Roche): Es preparen stocks de 5 mg/ml en etanol 100% i s'emmagatzemen a -20°C a la foscor (fotosensible). En aquest treball s'ha utilitzat una concentració final de 10 µg/ml durant l'elaboració de competents de XL-1Blue. Per la selecció i propagació de transformants de *M. genitalium* portadors del gen de resistència *tetM438* s'ha utilitzat una concentració final de 2 µg/ml.

-Gentamicina (Sigma): S'ha utilitzat un preparat comercial ja en estat líquid a 10 mg/ml. En aquest treball s'ha utilitzat una concentració final de 100 µg/ml durant la selecció i propagació de transformants de *M. genitalium* portadors del gen de resistència *aac(6')-aph(2'')*.

Durant algunes parts del clonatge s'ha utilitzat la selecció blau/blanc per facilitar la selecció de colònies transformades amb els plasmidis pBE i pBluescript II SK⁺. Per aquesta fi, hem suplementat plaques de LB amb ampicilina, 24 µg/ml de IPTG i 40 µg/ml de X-Gal. L'IPTG indueix l'expressió de lacZ (β-galactosidasa) quan interacciona amb el repressor lacI mentre que el X-Gal és un substrat cromogènic del enzim lacZ. Les colònies portadores de plasmidis com el pBE i pBluescript II SK⁺ seran de color blau, producte de l'activitat β-galactosidasa i l'alfa complementació. Per altra banda, aquelles colònies portadores de plasmidis amb fragment clonats, seran blanques producte de l'interrupció del gen lacZ'.

-IPTG (Roche): Es preparen stocks a 1M en H₂O MilliQ que s'emmagatzemen a -20°C. La solució s'esterilitza per filtració usant filtres de 0,22µm (Millipore).

-X-Gal (Roche): Es preparen stocks a 20 mg/ml en dimetilformamida. No és necessari esterilitzar.

VI.3.2. Condicions de cultiu utilitzats en aquest treball

Condicions de cultiu d'*E. coli*

-Cultius en medi líquid: Per propagar colònies aïllades o per obtenir ADN plasmídic a petita escala s'han fet cultius de 3 ml. Per preparar pre-inòculs o per obtenir ADN plasmídic a mitjana escala s'han fet cultius de 10 ml. Per l'elaboració de cèl·lules competents s'han realitzat cultius de 200 ml. Per la producció de proteïna recombinant s'han utilitzat cultius múltiples de 800 ml. L'inòcul utilitzat pels cultius de 3 i 10 ml ha estat de 2-10 µl a partir d'un glicerinat de treball. En el cas de cultius superiors a 100 ml s'ha utilitzat un inòcul 1:100 a partir d'un pre-inòcul crescut fins a una A₆₀₀ ~1. Les incubacions s'han dut a terme a 37°C en agitació (250 r.p.m) durant la nit (o/n) fins a un màxim de 16 hores. En el cas de la preparació de cèl·lules competents o expressió de proteïna recombinant fins arribar a la densitat òptica desitjada.

-Cultius en medi sòlid: Aquest tipus de cultius s'han dut a terme per l'aïllament de colònies a partir d'una transformació o una estria d'un glicerinat. Inòculs entre 100 i 200 µl s'estenen per l'agar gràcies a una nansa de Digrafsky. Les incubacions es realitzen amb la placa invertida i en una estufa a 37°C o/n.

Per evitar l'aparició de colònies satèl·lits degut a la degradació de l'antibiòtic, es recomanable no fer incubacions superiors a 16 hores.

Condicions de cultiu de *M. genitalium*

-Cultius en medi líquid: El cultiu de *M. genitalium* en medi líquid s'ha dut a terme a 37°C en una estufa sense agitació i en una atmosfera amb 5% de CO₂. Per a la propagació de *M. genitalium* i promoure la seva capacitat d'adhesió en el plàstic s'han utilitzat flascons de cultiu (TPP) de diferents mides, depenent del volum de cultiu. Per cultius de 5 ml s'han utilitzat flascons de 25 cm², per 20 ml de 75 cm² i per 40 ml de 150 cm². Els inòculs a partir d'stocks varien entre 25-100 µl segons la mida del cultiu i l'estat de l'stock. En aquest treball, els cultius s'han processat quan aquests han arribat a fase exponencial, indicat per el viratge del medi a un color taronja. Els temps de durada del cultiu depèn de si prové d'stock (3-5 dies) o de colònia única (10-14 dies).

-Cultius en medi sòlid: El cultiu de *M. genitalium* en medi sòlid s'ha dut a terme en una estufa a 37°C i en una atmosfera amb 5% de CO₂. S'han utilitzat plaques de Petri de 60 mm de diàmetre amb un inòcul no superior als 200 µl per assegurar una bona i ràpida absorció. Aquest volum s'estén per la superfície d'agar mitjançant un moviment rotatori sense l'ajuda d'una nansa de Digralsky. En el cas de voler titular la concentració de cèl·lules, es plaquejen 4 gotes de 10 µl per placa de la dilució corresponent i s'espera a que s'adsorbeixin. Les primeres colònies visibles apareixen al cap de 6-7 dies de cultiu. Les colònies transformants poden trigar en aparèixer uns 10-15 dies depenent del gen de resistència utilitzat per la selecció (Pich *et al.*, 2006b). És necessari la utilització d'una lupa esteroscòpica per visualitzar les colònies, ja que aquestes solen obtenir una mida de tan sols 0,1-0,4 mm.

-Preparació de stocks de treball: Es parteix d'un cultiu de 5ml en medi SP-4. Un cop crescut (es pot monitoritzar pel viratge del medi a un color taronja o per observació microscòpica amb una lupa), es retira el medi i s'afegeix 5 ml de medi fresc. Posteriorment es recuperen les cèl·lules i es fan aliquotes de 100 µl i s'emmagatzemen a -80°C. Si són soques adherents s'ha d'utilitzar un rascador cel·lular (Becton and Dickinson) per recuperar-les. En cas de voler stocks més concentrats i d'ús no gaire freqüent, es pot fer un únic stock d' 1 ml a partir d'un cultiu de 5 ml. No és recomanable congelar i descongelar múltiples vegades un mateix stock.

Cal afegir, que la manipulació d'aquest patogen humà s'ha dut a terme en cabines de flux laminar de seguretat biològica de nivell 2.

VI.3.3. Protocols de transformació bacteriana utilitzats en aquest treball

Protocol de transformació d'*E. coli*

S'ha utilitzat el protocol de transformació mitjançant xoc tèrmic de cèl·lules competents d'acord amb el protocol descrit per (Sambrook i Russell, 2001). La preparació de cèl·lules competents s'ha dut a terme per tractament amb CaCl_2 també d'acord amb el protocol descrit per Sambrook and Russell, (2001).

Protocol de transformació per electroporació de *M. genitalium*

El protocol d'electroporació utilitzat en aquest treball està basat en el descrit per Reddy *et al.*, (1996) amb algunes petites modificacions. Aquest protocol de transformació es podria separar en dues parts: preparació de cèl·lules i electroporació. Donat que la preparació de cèl·lules pot ser diferent segons la capacitat d'adhesió que exhibeixi cada soca, a continuació resumim breument un protocol per a cada cas.

Preparació de cèl·lules que tenen capacitat d'adhesió en plàstic

1. Es creix un cultiu de 20ml de *M. genitalium* fins a fase exponencial (3 dies).
2. Es retiren 10 ml de medi i les cèl·lules adherides a la superfície es recuperen mitjançant un rascador cel·lular.
3. Es passa la suspensió cel·lular per un filtre de baixa afinitat per a proteïnes i de 0,45 μm de porus (Millipore) per disgregar e individualitzar les cèl·lules.
4. Es recultiva la suspensió obtinguda en 30 ml de medi SP-4 fresc en un flascó de 150 cm^2 durant 24h.
5. Al dia següent, es retira el medi i es fan 3 rentats amb molt de compte per no despendre les cèl·lules adherides, amb tampó d'electroporació estèril (EB) (8 mM HEPES pH 7,4; 272 mM sucrosa).
6. Es recuperen les cèl·lules rasant la superfície amb un rascador i es resupenen en un volum de EB que varia segons la cura del procés (0,5-1,5 ml). Cal aconseguir un títol aproximat de 10^9 cfu/ml.

Preparació de cèl·lules deficients en adhesió

1. Es creix un cultiu de 20 ml de mutants deficients en adhesió fins a fase exponencial (3-4 dies).
2. Com el cultiu creix en suspensió, per recuperar les cèl·lules es centrifuga els 20 ml de cultiu durant 15 min a 12000 r.p.m. En el cas de mutants parcialment adherents (com el cas dels mutants $\Delta\text{mg}312$), es recuperen les cèl·lules adherides amb un rascador en el medi de cultiu abans del pas de centrifugació.
3. Per rentar el pellet, es retira el medi, es resuspèn en 1 ml de EB i es torna a centrifugar 15 min a 12000 r.p.m. (X2)
4. Es resuspèn el pellet en un volum d'EB d'entre 1-1,5 ml obtenint-se un títol aproximat de 10^9 cfu/ml
5. Es passa la suspensió per una xeringa d'insulina per desfer bé els agregats (X5).

Transformació per electroporació

1. Es mesclen 90 µl de la suspensió de cèl·lules amb 5-30 µg de plasmidi dissol en 20 µl de EB. En aquest treball s'ha utilitzat 5 µg d'ADN pels assaigs per transposició i 30 µg per l'obtenció de mutants nuls per doble recombinació.
2. La mescla es transfereix a una cubeta d'electroporació BTX de 2 mm de separació entre elèctrodes, prèviament refredada i es manté en gel durant 15 min.
3. La cubeta s'introdueix al electroporador i la mescla és electroporada a les condicions següents: 129 Ω de resistència, 2,5 kV de voltatge i 25 µF de capacítància.
4. Immediatament, es posa la cubeta en gel durant 15 min més.
5. Passat aquest temps, s'afegeixen 900 µl de medi SP-4 a la cubeta, es resupèn la mescla suaument i es transfereix a un eppendorf.
6. Les cèl·lules s'incuben a 37°C durant 2 h per permetre l'expressió del gen de resistència.
7. Finalment, es dispensa la suspensió cel·lular sobre les plaques en volums màxims de 200 µl i s'espera que s'absorbeixin abans de posar-les a l'incubador.

VI.3.4. Aïllament i recuperació de colònies pures

-Obtenir un cultiu pur a partir de colònies aïllades de *E. coli*: Mitjançant escuradents autoclavats es recupera de la placa la colònia desitjada, es posa en contacte l'escuradents amb 3 ml de 2xYT i s'incuba o/n.

-Obtenir un cultiu pur a partir de colònies aïllades de *M. genitalium*: Donat que les cèl·lules de *M. genitalium* solen agregar, per recuperar clons purs a partir d'una població heterogènia, és necessari passar el cultiu per un filtre de 0,22 µm de porus abans de plaquejar-lo en medi sòlid. En el cas que vingui d'una transformació, aquest pas no és necessari. Un altre inconvenient, és la reduïda mida de les colònies que s'obtenen, que obliga la utilització d'una lupa estereoscòpica. En aquest sentit, per aïllar colònies d'una placa s'ha de senyalar primer al plàstic la posició de la colònia desitjada. Seguidament, en condicions estèrils endinsem al agar i en la regió marcada una punta de pipeta de 200 µl prèviament retallada per l'extrem. Amb l'èmbol pressionat i fent pressió negativa, recuperem el retall d'agarosa amb la colònia i la inoculem en cultius de 5 ml. Per assegurar que hem recuperat una colònia única, es visualitza el retall mitjançant la lupa.

En el cas de recuperar colònies crescudes sota l'agar (aquest és el cas quan s'utilitza un medi semisòlid), les colònies es recuperen mitjançant un escuradents. El procés ha d'estar monitoritzat a través de la lupa i hem de vigilar de no trencar l'agar quan endinsem el escuradents. Un cop recuperada la colònia, l'escuradents es posa en contacte amb 200 µl de medi SP-4, prèviament dipositats en plaques de 96 pous per cultius cel·lulars. En aquest cas, el risc d'obtenció de clons heterogenis és alt. Per aquest motiu, s'ha de procurar picar colònies molt aïllades i és recomanable subclonar posteriorment el cultiu a través de filtració per 0,22 µm i re-aïllament en medi sòlid.

VI.4. MÈTODES D'ADN RECOMBINANT I MANIPULACIÓ DEL ADN

VI.4.1. Extracció d'ADN plasmídic

-Preparacions d'ADN plasmídic a petita escala (Miniprep): S'han dut a terme a partir d'1,5 ml de cultiu d'*E. coli* utilitzant el protocol de lisi alcalina descrit per Sambrook and Russell, (2001). Alternativament, també s'ha utilitzant el Kit comercial "Fast plasmid Miniprep Kit" (Eppendorf), seguint les instruccions del fabricant.

- Preparacions d'ADN plasmídic a mitjana escala (Midiprep): S'han dut a terme a partir de 10 ml de cultiu d'*E. coli* amb l'objectiu d'obtenir suficient quantitat d'ADN plasmídic per transformar *M. genitalium*. S'ha utilitzat un protocol adaptat consistent en una lisi alcalina escalada a la quantitat de cultiu. A més, en aquest cas l'extracció amb fenol-clorform i la precipitació amb etanol s'ha substituït per l'ús d'una columneta del Kit comercial "EZNA gel extraction" (Omega Bio-tek). Aquestes columnetes consisteixen en una matriu de borosilicat que reté l'ADN i permet obtenir-lo amb més puresa. Abans de passar el llistat per la columneta i seguir les instruccions del fabricant, s'afegeix 1,2 ml de tiocinat de guanidi 4M. Després d'un parell de rentats l'ADN s'elueix en un volum de 30 µl de EB. A partir de 10 ml de cultiu d'*E. coli* i per a plasmidis d'alt número de còpies s'ha aconseguit un rendiment que oscil·la entre 0,7-1,2 µg/µl.

VI.4.2. Extracció d'ADN genòmic de *M. genitalium*

Per obtenir ADN genòmic de *M. genitalium* s'ha utilitzat el següent protocol:

1. S'inicia un cultiu de 20 ml en un flascó de 75 cm² i es manté fins que hagi virat.
2. Es renten les cèl·lules amb PBS dues vegades i es recuperen en un volum final de 2 ml de solució I (0,1 M Tris-HCl pH 8; 0,5 M NaCl; 10 mM EDTA).
3. S'afegeix 50 µl de SDS 20 % per llisar les cèl·lules. Agitar suaument i incubar 5 min a RT.
4. S'afegeix proteïnasa K a una concentració final de 50 µg/ml i s'incuba 1 hora a 55°C. En aquest punt es pot congelar la mostra a -20°C i continuar un altre dia.
5. S'afegeix 1 volum de fenol-cloroform, es mescla sense vortexar, es centrifuga durant 10 min a 13000 r.p.m i es recull la fase superior amb una punta de pipeta retallada. (X3)
6. Un cop realitzada l'extracció amb fenol-cloroform, es precipita l'ADN amb 2 volums d'etanol absolut. Ha d'aparèixer un cotonet de color blanc, que es traspasa a un eppendorf i es centrifuga 5 min a 14000 r.p.m.
7. Es renta el pellet dues vegades amb etanol 70 % centrifugant la mostra 5 min a 14000 r.p.m. després de cada rentat.
8. S'asseca el pellet a la campana de buit durant 10 min.
9. Per últim, el pellet es redissol en 200 µl de TE amb RNasa i es guarda a 4°C.
10. Quan l'ADN estigui completament resuspès es pot conservar a -20°C.

VI.4.3. Quantificació d'ADN en dissolució

La determinació de la concentració d'ADN present en una solució s'ha dut a terme mitjançant mètodes espectrofotomètrics. És un mètode ràpid que consisteix en mesurar l'absorbància a 260 nm de la solució o una dilució de la mateixa. Una densitat òptica a 260 nm equival aproximadament a 50 µg/ml d'ADN doble cadena, a 40 µg/ml d'ADN de cadena senzilla i a 20 µg/ml per un oligonucleòtid. L'absència de contaminació d'ARN i proteïnes en les mostres d'ADN plasmídic es un punt important per la transformació de *M. genitalium*. Aquest mètode permet saber la puresa de la mostra. Una relació A_{260}/A_{280} superior a 1,8-2 per una mostra d'ADN de doble cadena es considera pura.

En els cas de les mostres d'ADN genòmic de *M. genitalium*, la quantificació s'ha realitzat visualment en un gel d'electroforesi.

VI.4.4. Tractaments enzimàtics

Restriccions: Els enzims de restricció i tampons utilitzats en aquest treball han estat subministrats per Roche i New England Biolabs. Les digestions s'han realitzat seguint les instruccions del fabricant.

Fosforilacions: S'ha utilitzat per fosforilar extrems de productes de PCR. S'ha utilitzat la polinucleotid quinasa (PNK) de Roche i el seu corresponen també seguint les instruccions del fabricant.

Desfosforil·lació: S'ha utilitzat en alguns casos per impedir la recircularització de plasmidis digerits amb un sol enzim. S'ha utilitzat la fosfatasa alcalina shrimp (SAP) de Roche i el seu corresponen també seguint les instruccions del fabricant.

Reacció de lligació: Per lligar fragments d'ADN s'ha utilitzat la lligasa del bacteriògaf T4 de Roche amb seu també corresponent segons indica el fabricant. Normalment les lligacions s'han realitzat sobre un volum final de 10 µl a 16°C o/n, amb quantitats adequades de vector i insert/s (normalment relació 1:3)

VI.4.5. Electroforesis d'ADN en gels d'agarosa

L'electroforesi d'ADN en gels d'agarosa és una tècnica de gran utilitat, imprescindible durant un procés de clonatge. Amb l'ajut d'un potencial elèctric, aquesta tècnica permet la separació de diferents fragments d'ADN en funció de la seva mida. Per altra banda, també permet quantificar i determinar la puresa del ADN. El procediment que s'ha seguit és el següent:

1. L'agarosa es dissol en tampó TAE (40 mM Tris-Acetate, 1 mM EDTA, pH 8) escalfant-la al microones.
2. Es diposita l'agarosa fosa en un suport tancat preparat amb una pinta per marcar els pouets on després es carregaran les mostres d'ADN.

3. Un cop solidificada l'agarosa, dipositem el gel en una cubeta d'electroforesis amb tampó TAE.
4. Es carreguen les mostres amb tampó de càrrega (x5: 150 µl de solució bromofenol saturada de H₂O, 400 µl glicerol 87 % i 280 µl H₂O i 20 µl TAE_{x5}).
5. S'aplica un voltatge de 40-90 V.
6. Per visualitzar l'ADN en el gel s'ha utilitzat una tinció amb bromur d'etidi a una concentració de 0,5 µg/ml en el mateix tampó d'electroforesis durant 20-30 min. El stock de bromur d'etidi es prepara a una concentració de 10 mg/ml en aigua.
7. Després l'ADN es pot visualitzar amb l'ajut d'un transluminador UV.

En aquest treball s'ha utilitzat agarosa SeaKem[®] a una concentració entre el 0,8-1,5 % segons la mida del fragment a resoldre. Els marcadors de pes molecular que s'han utilitzat han estat el 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) per ús rutinari i el Lambda *Bst* EII Digest (New England BioLabs) per fer estimacions visuals de quantitat d'ADN.

VI.4.6. Recuperació de fragments d'ADN a partir de gels d'agarosa

Per recuperar fragments d'ADN prèviament separats per electroforesis s'ha retallat del gel la banda desitjada amb l'ajut d'una fulla de bisturí. Posteriorment, la banda d'ADN s'ha purificat utilitzant el kit comercial "EZNA gel extraction" (Omega Bio-tek), seguint les instruccions del fabricant.

VI.4.7. Reacció de PCR (Polimerase chain reaction)

La reacció de PCR és una tècnica molt utilitzada per amplificar *in vitro* fragments d'ADN. En aquest treball s'ha utilitzat aquesta tècnica per amplificar principalment fragments a partir d'ADN genòmic de *M. genitalium*, però també per incorporar mutacions mitjançant mutagènesi dirigida. Cal afegir, que un bon disseny dels encebadors permet introduir modificacions i incorporar seqüències addicionals als extrems del producte a amplificar. En la taula 6 es mostren els diferents encebadors que s'han dissenyat en aquest treball. Per minimitzar l'aparició de mutacions durant la reacció d'amplificació s'ha utilitzat la ADN polimerasa Phusion[™] (Finnzymes) que té activitat correctora de proves. A continuació es mostra la barreja de reacció estàndard i el programa de termociclador utilitzat:

Barreja de reacció per un volum final de 50 µl

- x µl DNA motlle ^(a)
- 10 µl tampó reacció x5
- 2µl encebadors 5' (5 µM)
- 2µl encebadors 3' (5 µM)
- 1 µl dNTPs (10 mM)
- x µl MgCl₂ (0-3mM) segons si la reacció ho requereix
- fins a 50 µl de H₂O MilliQ estèril.

La quantitat de motlle que s'ha utilitzat ha estat aproximadament 1pg-10ng d'ADN. En general s'ha posat a la reacció els següents volums depenent del origen del motlle i l'aplicació:

- ADN genòmic de *M. genitalium*: 10 µl dilució 1:10 de l'extracció.
- ADN plasmidic : 10 µl dilució 1:100 de l'extracció.
- Mutagènesi dirigida a partir de diferents motlles d'ADN lineal extrets d'un gel d'agarosa: 0,5-1 µl dilució 1:10 de cadascun dels motlles.

Programa de termociclador

1. S'inicia el programa Hot Start (3 min a 98°C) i després la mostra es posa en gel picat.
2. Immediatament s'afegeix 0,5-1 µl PhusionTM i s'inicia el programa:
 1. Desnaturalització: 98°C, 30 s
 2. Desnaturalització: 98°C, 10 s
 3. Hibridació: x°C, 30s (T° hibridació varia segons el parell d'encebadors utilitzats)
 4. Extensió: 72°C, 15-30s/kb
 5. Repetir 35 vegades els passos de 2 a 4
 7. Extensió final: 72°C, 7 min

VI.4.8. Seqüenciació d'ADN

Les reaccions de seqüenciació que s'han realitzat en aquest treball s'han fet al servei de seqüenciació de la UAB. Les reaccions s'han dut a terme amb dideoxinucleòtids fluorescents i el kit comercial Big Dye 3.0 Terminator Kit (Applied Biosystems), seguint les recomanacions del fabricant. L'anàlisi s'ha fet en un ABI 3100 Genetic Analyser de Applied Biosystems.

VI.4.9. Marcatge no radioactiu de sondes d'ADN

En aquest treball s'han dissenyat varies sondes per detectar mitjançant Southern blot, la presència o absència de determinades regions d'ADN en el genoma de *M. genitalium*. Els fragments que s'han utilitzat com a sonda s'han obtingut mitjançant PCR a partir del genoma de *M. genitalium* (Taula 5).

Taula 5. Encebadors utilitzats per la producció de les sondes utilitzades.

Sonda	Encebadors utilitzats per amplificar les sondes	Zona d'hibridació amb el genoma	Longitud
A	5'SP140 3'SP140	Regió interna del gen <i>mg191</i>	667 pb
B	5'SP140C-t 3'P140	Regió C-terminal del gen <i>mg191</i>	415 pb
C	5'SP110 3'SP110	Regió interna del gen <i>mg192</i>	590 pb
BEMG312	5'BEKOMG312 3'BEKOMG312	Regió flanquejant 5' del gen <i>mg312</i> .	973 pb
BDMG312	5'BDKOMG312 3'BDKOMG312	Regió flanquejant 3' del gen <i>mg312</i> .	977 pb
BEMG217	5'BEKOMG217 3'BEKOMG217	Regió flanquejant 5' del gen <i>mg217</i> .	924 pb

Per obtenir la sonda es va marcar per random primer (encebadors a l'atzar), amb l'anàleg de nucleòtids dioxigenina 11-dUTP, entre 10 ng i 3 µg d'ADN linearitzat. Per aquesta reacció s'ha utilitzat el kit

comercial “Dig DNA Labelling and Detection Kit” (Roche), seguint les instruccions del fabricant. Un cop realitzada la reacció de marcatge, les sondes es van precipitar en etanol absolut i es van rentar en etanol 70%. Finalment, els pellets es van assecar al buit i es van redissoldre en 50 µl de TE. Les sondes es van conservar a -20°C fins a la seva utilització.

VI.4.10. Transferència de tipus Southern (Southern blot)

La transferència de tipus Southern és una tècnica que hem utilitzat per conèixer en quin context o en quina localització en el genoma es troba una regió determinada d'ADN. De manera breu, la tècnica consisteix en digerir l'ADN genòmic amb un o més enzims de restricció. Posteriorment, els diferents fragments resultants es separen per mitjà d'un gel d'electroforesi, es desnatura l'ADN *in situ* i es transfereix a un filtre de niló. Per mitjà de la hibridació del filtre amb una sonda i la seva posterior detecció, sabem la mida que té el fragment d'ADN complementari a la sonda utilitzada. Coneixent la mida i el número de fragments que han de resultar de la digestió, podem situar el fragment d'ADN problema dins el genoma. En aquest treball, degut a la petita mida del genoma de *M. genitalium*, s'ha utilitzat un protocol de desnaturització alcalina seguit d'una transferència ràpida en sentit descendent. El protocol utilitzat és el següent:

Electroforesi i tractament del gel i membrana

1. Es digereix 10 µl d'ADN genòmic de *M. genitalium* en un volum final de 30 µl.
2. Es carreguen entre 4-8 µl de mostra digerida en un gel d'agarosa al 0,8 % i s'inicia la cursa electroforètica durant 3-4 h a 35-40V.
3. Un cop realitzada l'electroforesi d'ADN es tenyeix el gel 15 min en bromur d'etidi i en un transluminador UV es fa la foto al gel al costat d'un regle. Això ens permetrà estimar el pes molecular de les bandes que es detectin.
4. Incubem el gel durant 15 min a RT en agitació suau amb tampó de transferència alcalina (TTA: 0,4M NaOH; 1M NaCl) (desnatura l'ADN i elimina el Bromur d'etidi). X2
5. Es talla la membrana de niló (Roche) de la mida del gel o una mica més gran i s'hidrata primer en aigua destil·lada durant 10 min i després amb TTA durant 10 min (molt important utilitzar guants).

Muntatge de la transferència

1. Es tallen 8 fulls de paper Whatman 3MM de mida igual a la membrana de niló i 4 s'humitegen en TTA.
2. Es posen en una superfície plana varis tovallons absorbents de manera que hi hagi contacte entre ells lo màxim possible perquè la força d'absorbència sigui màxima.
3. A sobre es col·loquen 4 papers Whatman secs i després dos d'humits i seguidament es col·loca la membrana de niló tractada de manera que no quedin bombolles amb el paper Whatman.

4. Ara ja es pot col·locar el gel tractat amb molt de compte de manera que els pouets quedin mirant cap amunt i no quedin bombolles entre gel i membrana.
5. Es col·loquen 2 papers Whatman humits més a sobre el gel sense que quedin bombolles.
6. Per últim, es passa una tira de paper Whatman prèviament humitejada en TTA, de manera que hi hagi contacte amb el muntatge i que els extrems de la tira xuclin TTA de dos cubetes col·locades més altes que el gel per afavorir la capil·laritat.
7. Després de 1-1,5 h de transferència es marquen els pouets del gel amb un punxó en la membrana de niló i es talla una cantonada per reconèixer en quina cara es troba l'ADN.
8. Es neutralitza la membrana de niló durant 15 min a RT amb agitació suau en tampó neutralitzant (0,5M TrisHCl pH 7,2; 1M NaCl) X2, i s'asseca el filtre amb paper Whatman.

Hibridació amb la sonda

1. Es posa la membrana de niló en un tub d'hibridació de manera que la cara amb l'ADN quedi cap en dintre.
2. Es pre-hibrida els filtres durant 1h com a mínim a 42°C en el forn d'hibridació amb 20 ml de solució de pre-hibridació (5xSSC, 50% formamida, 0,1% N-lauroylsarcosine, 0,02% SDS i 5% reactiu de bloqueig (Roche)).
3. S'hibrida el filtre a 42°C o/n amb 15 µl de sonda marcada i desnaturalitzada a 98°C durant 10 min, dissolta en 8 ml de solució de pre-hibridació.

Detecció immunològica de la sonda amb anticòs conjugat amb fosfatasa alcalina

1. Es renta el filtre amb tampó de rentat de baixa restrictivitat (2xSSC; 0,1% SDS) a RT durant 5 min en el forn d'hibridació.(X2)
2. Es renta el filtre amb tampó de rentat de alta restrictivitat (0,1xSSC; 0,1% SDS) durant 15 min a 68°C al forn d'hibridació.(X2). Es recomana atemperar el tampó prèviament.
3. Es renta el filtre amb tampó de rentat (0,1 M àcid maleic; 0,15 M NaCl, pH 7,5; 0,3% Tween 20) durant 1-5 min a RT al forn d'hibridació.
4. S'incuba el filtre durant 30 min a RT al forn d'hibridació amb solució de bloqueig (0,1 M àcid maleic; 0,15 M NaCl; pH 7,5 i 1% reactiu de bloqueig).
5. Es fa una dilució 1:10000 en solució de bloqueig d'anticòs anti-DIG conjugat amb fosfatasa alcalina (Roche) i s'incuba el filtre amb aquesta solució durant 20 min a RT al forn d'hibridació.
6. Es renta el filtre amb tampó de rentat durant 5 min a RT al forn d'hibridació.(X2)
7. S'equilibra el filtre durant 2 min amb tampó de revelat (100 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂; pH 9,5).
8. Finalment, s'incuba el filtre amb solució de revelat (75mg/ml NBT en dimetilformamida 70% en H₂O i 50 mg/ml BCIP dissol en tampó de revelat) fins que apareixen les bandes amb un precipitat marró.

VI.4.11. Disseny i construcció dels diferents vectors utilitzats en aquest treball

Construcció dels vectors pΔmg191, pΔmg192, pΔmg312, pΔmg217

El disseny bàsic d'aquests plasmidis es similar entre ells, variant només les dianes de restricció utilitzades en el clonatge. Els encebadors utilitzats es mostren en la taula 6.

-pΔmg191: Per a la construcció del plasmidi pΔmg191 es va amplificar per PCR aproximadament 1 kb de les zones flanquejants del gen *mg191* a partir d'ADN de *M. genitalium*. Cal matisar que les regions flanquejants amplificades també contenien ~100 pb del extrem 5' i 3' del gen. Per a amplificar la regió flanquejant 5' (BEP140) es van utilitzar els encebadors 5'BEKOP140 i 3'BEKOP140, que van ser dissenyats per incorporar als extrems les dianes *Acc65I* i *EcoRI*, respectivament. Per altra banda, la regió flanquejant 3' (BDP140) es va amplificar utilitzant els encebadors 5'BDKOP140 i 3' BDKOP140, que incorporen als extrems les dianes de restricció *BamHI* i *XbaI*, respectivament. Els fragments de PCR van ser clonats en rom en un pBE, per alliberar-los posteriorment utilitzant les dianes de restricció incorporades als extrems. Paral·lelament es va digerir el vector pMTnTetM438 amb *EcoRI* i *BamHI* per a escindir el fragment de 2 kb corresponent al gen de resistència *tetM438*. Finalment, mitjançant un clonatge direccional es van clonar simultàniament els 3 fragments (regions flanquejants i gen de resistència) en el vector pBSKII+ que s'havia digerit prèviament amb *Acc65I* i *XbaI*.

-pΔmg192: Per a la construcció del plasmidi pΔmg192 es va amplificar per PCR aproximadament 1 kb de les zones flanquejants del gen *mg192*. En aquest cas les regions flanquejants amplificades també contenien ~100 pb del extrem 5' i 3' del gen. Per a amplificar la regió flanquejant 5' (BEP110) es van utilitzar els encebadors 5'BEKOP110 i 3'BEKOP110, que incorporen als extrems les dianes de restricció *Acc65I* i *SalI*, respectivament. Per altra banda, la regió flanquejant 3' (BDP110) es va amplificar utilitzant els encebadors 5'BDKOP110 i 3' BDKOP110, que incorporen als extrems les dianes de restricció *BamHI* i *XbaI*, respectivament. A partir d'aquest punt es va seguir el mateix procediment descrit pel plasmidi pΔmg191, però utilitzant el fragment del gen de resistència *tetM438* alliberat en aquest cas amb *SalI* i *BamHI*.

-pΔmg312: Per a la construcció del plasmidi pΔmg312 es va amplificar per PCR aproximadament 1 kb de les zones flanquejants del gen *mg312*. En aquest cas les regions flanquejants amplificades també contenien ~100 pb del extrem 5' i 3' del gen. Per a amplificar la regió flanquejant 5' (BEMG312) es van utilitzar els encebadors 5'BEKOMG312 i 3'BEKOMG312, que incorporen als extrems les dianes de restricció *Acc65I* i *EcoRI*, respectivament. Per altra banda, la regió flanquejant 3' (BDMG312) es va amplificar utilitzant els encebadors 5'BDKOMG312 i 3' BDKOMG312, que incorporen als extrems les dianes de restricció *BamHI* i *XbaI*, respectivament. A partir d'aquest punt es va seguir el mateix procediment descrit pel plasmidi pΔmg191.

-pΔmg217: Per a la construcció del plasmidi pΔmg217 es va amplificar per PCR aproximadament 1 kb de les zones flanquejants del gen *mg217*. En aquest cas les regions flanquejants amplificades també contenien 60 pb del extrem 5' i 139 pb del extrem 3' del gen. Per a amplificar la regió flanquejant 5' (BEMG217) es van utilitzar els encebadors 5'BEKOMG217 i 3'BEKOMG217, que incorporen als extrems les dianes de restricció *SalI* i *EcoRI*, respectivament. Per altra banda, la regió flanquejant 3' (BDMG217) es va amplificar utilitzant els encebadors 5'BDKOMG217 i 3' BDKOMG217, que incorporen als extrems les dianes de restricció *BamHI* i *XbaI*, respectivament. A partir d'aquest punt es va seguir el mateix procediment descrit pel plasmidi pΔmg191, però en aquest cas utilitzant un vector pBSKII+ digerit prèviament amb *SalI* i *XbaI*.

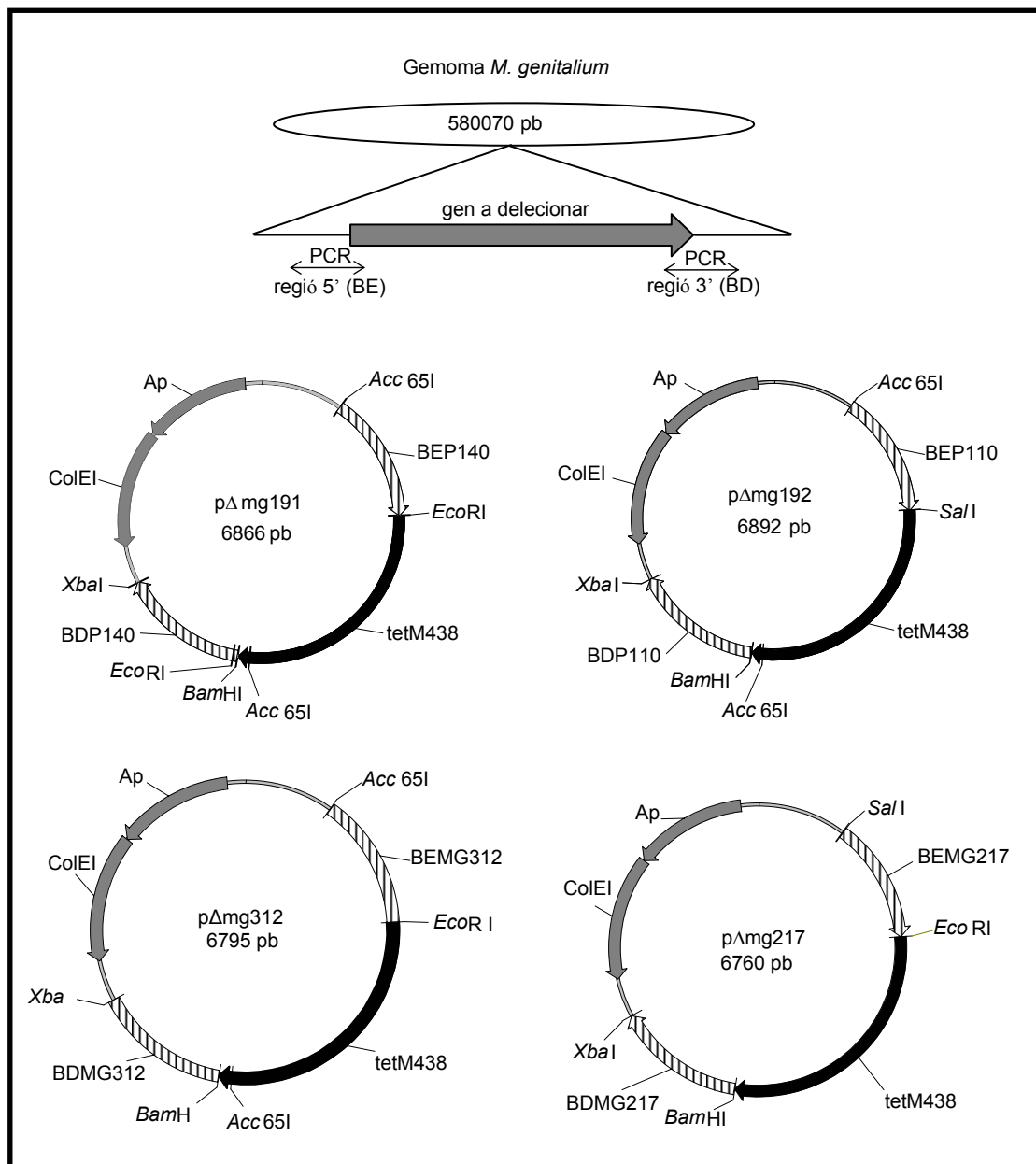


Figura 53. Esquema del disseny dels plasmidis pΔmg191, pΔmg192, pΔmg312 i pΔmg217.

ColEI, origen de replicació d'*E. coli*. Ap, gen de resistència ampicilina. *tetM438*, gen modificat de resistència a tetraciclina.

Construcció dels vectors pMTnTetMG191, pMTnTetMG192 i pMTnTetMG191-MG192.

En primer lloc es va amplificar el gen *mg191* del genoma de *M. genitalium* amb els encebadors 5'2PrP140 i 3'P140, que incorporen dianes *SalI* als extrems. Per mantenir el context transcripcional, aquest fragment també conté el gen *mg190* i els dos inicis de transcripció prèviament descrits per el gen *mg191* (Musatovova *et al.*, 2003). Per altra banda es va amplificar el gen *mg192* amb els encebadors 5'P110Pr i 3'P110. Aquests encebadors també incorporen dianes *SalI* als extrems. A més, l'encebador 5'P110Pr incorpora després de la diana *SalI* la seqüència promotora de 22 pb (Pich *et al.*, 2006b) descrita en la introducció. Posteriorment, els dos fragments de PCR es van clonar en rom en el pBE, per ser després alliberats amb *SalI*. Paral·lelament, vam digerir el vector pMTnTetM438 amb l'enzim de restricció *SalI* i després es van desfosforilar els extrems per evitar la relligació del propi plasmidi. Finalment, per obtenir els plasmidis pMTnTetMG191 i pMTnTetMG192 es van clonar separatament i en la diana *SalI* del vector pMTnTetM438 els fragments contenint els gens *mg191* i *mg192*.

Per altra banda, vam amplificar el operó MgPa sencer en dos passos utilitzant una diana *XbaI* interna. En aquest sentit, es va amplificar un primer fragment de 4,3 kb amb els encebadors 5'2PrP140 i 3'P140XbaI i un segon fragment de 4,2 kb amb els encebadors 5'P140XbaI i 3'P110ApaI (que incorpora una diana *ApaI* al extrem). Els diferents fragments de PCR es van clonar en un pBE i es van alliberar amb els enzims corresponents. Finalment, per obtenir el plasmidi pTnTetMG191-MG192 els dos fragments es van clonar direccionalment en el vector pMTnTetM438, el qual s'havia digerit prèviament amb *SalI* i *ApaI*.

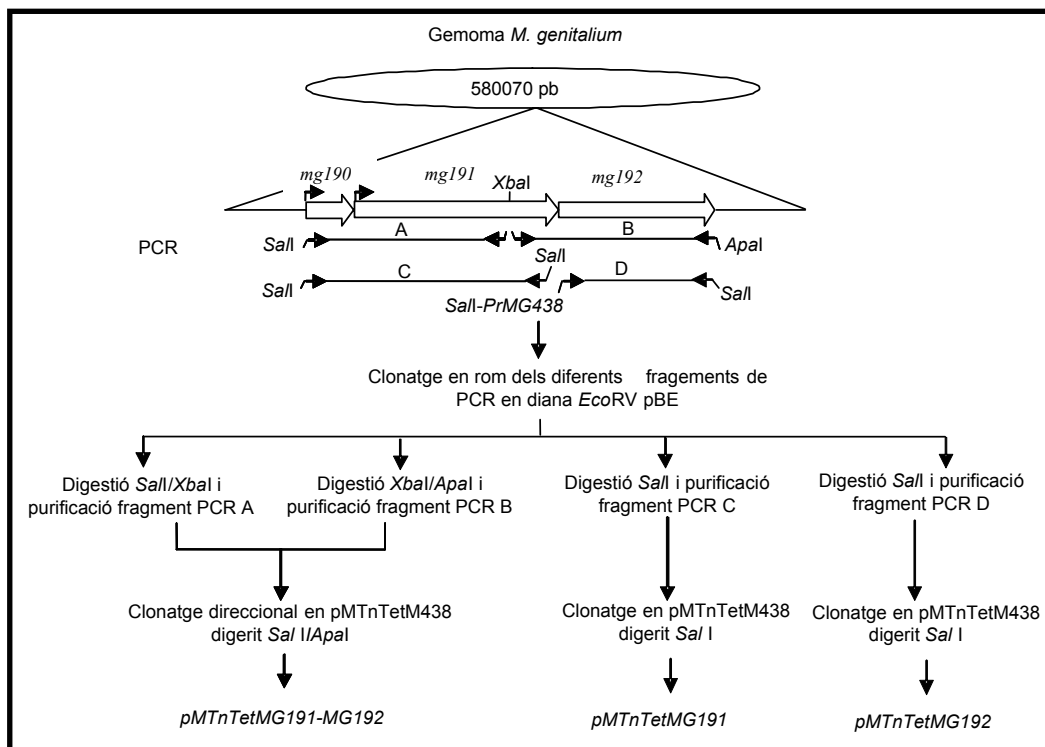


Figura 54. Esquema del disseny de construcció dels vectors pMTnTetMG191, pMTnTetMG192 i pMTnTetMG191-MG192.

Construcció dels vectors per introduir derivats del gen *mg312* en els mutants Δ mg312

El disseny de les construccions següents està esquematitzat en la figura 31.

-pMTnGmMG312: Es va amplificar del genoma de *M. genitalium* la regió codificant del gen *mg312* (3420 pb). Per dur a terme aquesta reacció es van utilitzar els encebadors 5'MG312 i 3'MG312 que incorporen les dianes *SalI* i *PstI*, respectivament. Cal afegir que l'encebador 5'MG312 incorpora després de la diana la seqüència promotora de 22 pb (Pich *et al.*, 2006b) descrita en la introducció. Posteriorment, el fragment de PCR es va clonar al pBE, es va alliberar amb els enzims corresponents i es va clonar en el vector pMTnGm que havia estat prèviament digerit amb els enzims *SalI* i *PstI*.

-pMTnGmMG312 Δ N-t: Es van utilitzar els encebadors 5'MG312 Δ N-t i 3'MG312 per amplificar del genoma la regió codificant del gen *mg312* corresponent des del nucleòtid 382 fins al nucleòtid 3420 (3038 pb). En aquest cas, l'encebador 5'MG312 Δ N-t incorpora a l'extrem una diana *SalI*, seguit de la seqüència promotora de 22 pb i un codó d'inici de traducció. Un cop obtingut el fragment de PCR es va clonar al pBE i es va alliberar digerint amb *SalI* i *PstI*. Finalment, aquest fragment es va clonar en el vector pMTnGm que havia estat prèviament digerit amb els enzims *SalI* i *PstI*.

-pMTnGmMG312 Δ C-t: Es va utilitzar els encebadors 5'MG312 i 3'MG312 Δ C-t per amplificar del genoma la regió codificant del gen *mg312* corresponent des del nucleòtid 1 fins al nucleòtid 2553 (2553 pb). En aquest cas, l'encebador 3'MG312 Δ C-t incorpora al extrem una diana *PstI*, seguit d'un codó d'aturada de traducció. Un cop obtingut el fragment de PCR es va clonar al pBE i es va alliberar digerint amb *SalI* i *PstI*. Finalment, aquest fragment es va clonar en el vector pMTnGm que havia estat prèviament digerit amb els enzims *SalI* i *PstI*.

- pMTnGmMG312 Δ Rep: Aquest vector es va obtenir digerint el plasmidi pMTnGmMG312 amb l'enzim *SacI*, provocant l'alliberament de la seqüència entre les dianes *SacI* (912 pb) que es troben en el domini central de la regió codificant del gen *mg312*. Posteriorment, la relligació del plasmidi tallat va permetre obtenir la construcció final.

-pMTnGmMG312 Δ CD: Per aquesta construcció es va utilitzar els encebadors 5'MG312 i 3'MG312 Δ CD per amplificar del genoma la regió codificant del gen *mg312* corresponent des del nucleòtid 1 fins al nucleòtid 381 (381 pb). En aquest cas, l'encebador 3'MG312 Δ CD incorpora l'extrem una diana *BglII* seguit de les bases GA. Posteriorment, el fragment de 381 pb es va clonar en el pBE i es va recuperar per digestió amb els enzims *SalI* i *BglII*. Paral·lelament es va digerir el vector pMTnGmMG312 amb els enzims *SalI* i *BglII* (diana natural situada l'extrem 3' del gen *mg312*), alliberant un fragment corresponent des del nucleòtid 1 fins al nucleòtid 2550 del gen *mg312*. Finalment, per obtenir la construcció final es va recuperar el vector tallat i es va lligar amb el fragment de 381 pb. Cal destacar, que la introducció de les bases GA en l'encebador 3'MG312 Δ CD permet guardar el marc de lectura un cop es fusionen les seqüències codificants dels dominis N i C-terminals de la proteïna MG312.

-pMTnGmMG312ΔEAGR: Per deletar la seqüència codificant del motiu EAGR es van dissenyar varies PCRs recombinants. El disseny que es va seguir és el següent. A partir del genoma de *M. genitalium* es va obtenir un primer fragment de 326 pb utilitzant els encebadors 5'MG312 i 3'MG312ΔEAGR i un segon fragment de 887 pb utilitzant els encebadors 5'MG312ΔEAGR i 3'MG312EcoRI. Cal destacar, que aquests dos productes de PCR presenten una seqüència complementària de 37 pb, gràcies al disseny dels encebadors 5'MG312ΔEAGR i 3'MG312ΔEAGR. Concretament, aquests encebadors hibriden amb les regions flanquejants al motiu EAGR i presenten unes cues a l'extrem 5' que corresponen a la seqüència complementària a la zona d'hibridació del altre encebador (Figura 55). En aquest sentit, els dos encebadors són perfectament complementaris i contenen només la seqüència flanquejant al motiu EAGR. Quan els dos productes de PCR s'utilitzen com a motlle per una tercera reacció utilitzant els encebadors 5'MG312 i 3'MG312EcoRI, s'obté un producte de 1148 pb. Es preveu que aquest producte contingui la seqüència codificant des del nucleòtid 1 fins al nucleòtid 1240 del gen *mg312* però amb una deleció del motiu EAGR (nucleòtids 280 a 372 del gen *mg312*). Per comprovar que la mutagènesi dirigida va funcionar, es va clonar el fragment de 1148 pb en un pBE i es va seqüenciar. Un cop comprovada la mutagènesi, el fragment es va alliberar per digestió amb els enzims *SalI* i *EcoRI*. Finalment, es va digerir el vector pMTnGmMG312 amb els enzims *SalI* i *EcoRI* (diana natural situada a la regió central del gen *mg312*) i es va substituir la seqüència salvatge pel fragment modificat de 1148 pb.

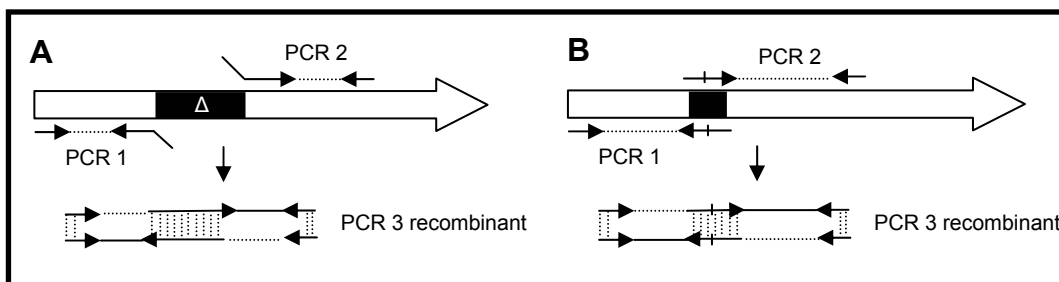


Figura 55. Disseny de la mutagènesi dirigida utilitzada per deletar (A) o fer mutacions puntuals (B).

-pMTnGmMG312WA: La deleció del motiu Walker A (nucleòtids 70 a 93 del gen *mg312*) en aquesta construcció també s'ha dut a terme per mutagènesi dirigida. En aquest cas s'ha amplificat a partir del genoma de *M. genitalium* un primer fragment de 936 pb utilitzant els encebadors 3'BDKOMG312 i 3'MutWAB i un segon fragment de 1152 pb utilitzant els encebadors 5'MutWAB i 3'MG312EcoRI. Posteriorment, els dos productes de PCR s'han utilitzat com a motlles per una tercera reacció utilitzant els encebadors 5'MG312 i 3'MG312EcoRI, obtenint un producte de 1216 pb. Per comprovar la mutagènesi dirigida, es va clonar el fragment de 1216 pb en un pBE i es va seqüenciar. Un cop comprovada la mutagènesi, el fragment es va alliberar per digestió amb els enzims *SalI* i *EcoRI*. Finalment, es va digerir el vector pMTnGmMG312 amb els enzims *SalI* i *EcoRI* (diana natural situada a la regió central del gen *mg312*) i es va substituir la seqüència salvatge pel fragment mutagenitzat de 1216 pb.

-pMTnGmMG312ΔWA(GxS): Per substituir l'aminoàcid Gly29 del motiu Walker A per Ser es va utilitzar una estratègia de mutagènesi dirigida diferent a la presentada en la figura 55. En aquest cas es va

realitzar una única reacció de PCR utilitzant com a motlle el plasmidi pBE(mg312) (construït durant el desenvolupament del pMTnGmMG312) i els encebadors 5'MG312GxS i 3'MG312GxS. Els encebadors hibriden en seqüències contigües del gen *mg312* però no solapades, de manera que poden emprendre l'amplificació de tot el plasmidi. Tanmateix, l'encebador 5'MG312GxS és qui incorpora el canvi del nucleòtid corresponent (G85 per una A), canvi que per altra banda és suficient per substituir l'aminoàcid Gly29 per una Ser (Figura 56). Amb aquests encebadors i unes condicions específiques es va obtenir un producte de PCR corresponent a la longitud total del plasmid (6278 pb). Posteriorment els extrems d'aquest producte de PCR es van fosforilar i es van relligar per regenerar la seqüència del gen *mg312* i obtenir el plasmidi circular. En aquest punt, es va confirmar la mutació introduïda per seqüenciació. Un cop feta la comprovació, el gen *mg312* mutagenitzat es va alliberar amb els enzims *Sall* i *PstI* i es va clonar en el vector pMTnGm que havia estat prèviament digerit amb els enzims *Sall* i *PstI*.

```
-- Gly Asp Leu Tyr Asp Gly Lys Ser --
-- GGT GAT CTT TAT GAT GGT AAA TCC --
-- CCA CTA GAA ATA CTA CCA TTT AGG --
```

Figura 56. Seqüència codificant del motiu Walker A. En vermell es mostra el nucleòtid G85.

-pET21d(MG312): Per a l'expressió de manera recombinant de la proteïna MG312, primer es va amplificar la regió codificant del gen *mg312* amb els encebadors 5'ExpMG312 i 3'ExpMG312. Aquests encebadors incorporen als seus extrems les dianes *NcoI* i *XhoI* respectivament, per tal de poder clonar el fragment posteriorment al pET21d. Cal afegir que la diana *NcoI* amb seqüència CCATGG ja incorpora el codó d'inici de traducció ATG. De fet, l'inici de la regió codificant del gen *mg312* és també ATGG, raó per la qual no s'introdueix cap alteració en la seqüència. Donat el codi particular dels micoplasmes que reconeixen el codó TGA com a l'aminoàcid triptòfan, en segon lloc es va haver de modificar el codó TGA341 per TGG, per tal de no obtenir un producte truncat durant l'expressió en *E. coli* (Figura 57). Per dur a terme aquesta modificació es va utilitzar l'estratègia de mutagènesi dirigida il·lustrada en la figura 55. En aquest sentit, es va amplificar un primer fragment de 357 pb amb els encebadors 5'ExpMG312 i 3'TGAMG312 i un segon fragment de 913 pb amb els encebadors 5'TGAMG312 i 3'MG312EcoRI. Els encebadors 5'TGAMG312 i 3'TGAMG312 són exactament complementaris entre ells i incorporen la substitució del TGA per TGG en la part central del encebador, per tal d'evitar l'acció correctora de proves de la polimerasa. Una tercera reacció de PCR, utilitzant com a motlle els dos fragments de PCR obtinguts i els encebadors 5'ExpMG312 i 3'MG312EcoRI va permetre obtenir un fragment de 1240 pb. Aquest fragment es va clonar en un pBE i la mutagènesi es va confirmar per seqüenciació. Finalment, es va digerir el vector pET21d on s'havia clonat prèviament la regió codificant del gen *mg312* amb els enzims *NcoI* i *EcoRI* (diana natural situada a la regió central del gen *mg312*) i es va substituir la seqüència salvatge pel fragment mutagenitzat de 1240 pb.

```
--Tyr Leu Lys Tyr Val Gly Asn Pro Asp Tyr Gly Ser Tyr Asp Glu Asn Gly Glu Trp Val Trp Ser Gly Tyr Phe Glu Asn Asp Gln Trp Ile --
-- TAT TTA AAG TAT GTT GGT AAC CCT GAC TAT GGT TCT TAT GAT GAA AAT GGT GAG TGG GTT TGA TCT GGT TAC TTT GAA AAT GAC CAG TGG ATC --
-- ATA AAT TTC ATA CAA CCA TTG GGA CTG ATA CCA AGA ATA CTA CTT TTA CCA CTC ACC CAA ACT AGA CCA ATG AAA CTT TTA CTG GTC ACC TAG --
Stop
```

Figura 57. Seqüència codificant del motiu EAGR. En vermell es mostra el nucleòtid A341.

Taula 6. Encebadors utilitzats en aquest treball.

CAPÍTOL 1	
Nom encebador	Seqüència 5'-3'
5'BEKOP140	GGTACCTCTTTACCATGTGCGCCC
3'BEKOP140	GAATTCGGTTAAAGAGAAAATAACCACC
5'BDKOP140	GGATCCTTATCCTTAGTGTTACTTTGGG
3'BDKOP140	TCTAGACTCCAGAAACACTGGGCGC
5'BEKOP110	GGTACCAAGCGAAAATTGGGGAAGGG
3'BEKOP110	GTCGACATCCTCTTTGACAAGGAAGG
5'BDKOP110	GGATCCTGCATTGAAAGCTGCTAATCC
3'BDKOP110	TCTAGAAATTGATGTTAGAAAAAGTGGGG
5' 2PrP140	GTCGACCTTTTATAATCTTTGTTATGAAAA
3'P140	GTCGACTTATTGTTTTACTGGAGGTTTT
5'P110Pr	GTCGACTAGTATTTAGAATTAATAAAGTATGAAAACAATGAGAAAACAG
3'P110	GTCGACCTAACTTTTGGTTTCTTCTG
3'P140XbaI	TCTAGATAACTGCCTTTGAAAC
5'P140XbaI	TCTAGACAGTGATGGTACCC
3'P110ApaI	GGGCCCCAACTTTTGGTTTCTTCTGAC
5'SP140	GATGAAGGACAAGCTAAGGC
3'SP140	CATTGTCCTGGATATCAGGG
5'SP140C-t	CTCAGTAGAAAACCAAACCTTAGG
5'SP110	GCAGATGGATTTAAGCGTCC
3'SP110	CTGAATTCCTCACTAAGTGGG
5'mg192N-t	AGAATGTACTGCTTACCCC
3'mg194N-t	GTAATTAACCTGTTTTGATCAATC
3'down mg192	AATTCGACCACATAGGAGGG
5'mg260C-t	GATCCAAGTGACTTTAGGAAC
CAPÍTOL 2	
Nom encebador	Seqüència 5'-3'
5'BEKOMG312	GGTACCCCTGCTTTGTGAATCCATGG
3'BEKOMG312	GAATTCAGTAATGGATTCAATGAGTGC
5'BDKOMG312	GGATCCAGGGTCTTCTTCAACAGTGG
3'BDKOMG312	TCTAGATAGTGTTTTATTAGCACTAACC
5'MG312	GTCGACTAGTATTTAGAATTAATAAAGTATGGCTAAAAACAAGCAATCG
3'MG312	CTGCAGTTAATAATCAAGGCTAAAATCAC
5'MG312ΔN-t	GTCGACTAGTATTTAGAATTAATAAAGTATGGGAATCTCAACCAACTGATG
3'MG312ΔC-t	CTGCAGTTAAGATCTGATTTTTATTGAAATTATC
3'MG312ΔCD	AGATCTGATTTAGTGGAGATCCACTGGTC
5'MG312ΔEAGR	AAGCAAGAAGAGAATGATCCACTAAAGAATCTCAAC
3'MG312ΔEAGR	GTTGAGATCTTTAGTGGGAATCATTCTCTTCTTGCTT
3'MG312EcoRI	GAATTCAGAATTTAATGAATCATTG
5'MG312GxS	GGTGATCTTTATGATAGTAAATCCA
3'MG312GxS	AAAAATGTTTTTCAGGTTTCGGTTTG
5'MutWAB	CGAACCTGAAAACATTTTACTGTTGAAGAAGACCCCT
3'MutWAB	AGGGTCTTCTTCAACAGTAAAAATGTTTTTCAGGTTTCG
5'ExpMG312	CCATGGCTAAAAACAAGCAATCG
3'ExpMG312	CTCGAGATAATCAAGGCTAAAATCACCAC
5'TGAMG312	GGTGAGTGGGTTTGGTCTGGTTAC
3'TGAMG312	GTAACCAGACCAAACCCACTCAC
CAPÍTOL 3	
Nom encebador	Seqüència 5'-3'
5'BEKOMG217	GTCGACGGCCTGGAGCTGCAACC
3'BEKOMG217	GAATTCGTTAAAAGGTTGGTTTGATGC
5'BDKOMG217	GGATCCTTTATTGAGAACTACATTACCC
3'BDKOMG217	TCTAGATTATCAACTAACTCTGTTTGG
Tc-upstram	GGTAGTTTTTCTGCATCAACATG
Tc-downstream	CGTCGTCCAAATAGTCGGATAG

Les dianes de restricció incorporades als extrems dels encebadors es mostren subratllades. La incorporació de la seqüència promotora de transcripció de 22 pb funcional a *M. genitalium* (Pich et al., 2006b) s'indica en cursiva. En negreta s'indiquen els codons d'inici i d'aturada de traducció introduïts en alguns encebadors.

VI.5. MÈTODES D'ANÀLISI I MANIPULACIÓ DEL ARN

VI.5.1. Extracció d'ARN

Per obtenir ARN de *M. genitalium* es va iniciar un cultiu de 20 ml en un flascó de 75 cm². Quan va arribar a fase exponencial es van rentar les cèl·lules amb PBS dues vegades i es va processar el cultiu utilitzant el kit comercial “RNAaqueous” d'Ambion, seguint les instruccions del fabricant.

VI.5.2. RT-PCR (Reverse transcriptase PCR)

Aquesta tècnica permet detectar el transcrit d'un determinat gen, amplificant per PCR el mARN corresponent després d'obtenir prèviament el cADN mitjançant la transcriptasa inversa. En aquest treball s'han realitzat RT-PCRs per analitzar l'expressió del gen *mg192* en mutants Δ *mg191*. Abans de la reacció de RT-PCR s'ha realitzat un tractament amb DNasaI lliure de RNases per eliminar l'ADN genòmic que hagi pogut quedar en l'extracció d'ARN i evitar així falsos positius. En aquest sentit, en totes les reaccions de RT-PCR hem incorporat un control negatiu consistent en fer el mateix procediment però ometent la transcriptasa inversa. En cas d'amplificació positiva d'aquest control és indicatiu que la mostra conté ADN genòmic. El procediment que s'ha seguit és el següent:

1. Per el tractament amb DNasaI (New England Biolabs) s'ha seguit les indicacions del fabricant.
2. Per la síntesis de la primera cadena de cADN, s'ha utilitzat el kit comercial d'Invitrogen SuperScript First-Strand Synthesis system, seguint les instruccions del fabricant. No obstant, en lloc d'utilitzar decàmers a l'atzar com a encebadors per a la síntesi de cADN, s'ha utilitzat un encebador específic. Concretament hem utilitzat l'encebador 3'BDKOP140 mostrat en la taula 6, que hibrida a 771 bases dins el gen *mg192*.
3. Un cop realitzada la reacció de síntesi de cADN, aquest va ser amplificat per PCR utilitzant 5 μ l de cADN motlle i el parell d'encebadors 5'*mg192N-t* i 3'BDKOP140 (Taula 6).

VI.6. MÈTODES D'ANÀLISI I MANIPULACIÓ DE PROTEÏNES

VI.6.1. Obtenció d'extractes de proteïnes de *M. genitalium*

Per l'obtenció d'extractes totals de proteïna de *M. genitalium* s'ha seguit el següent protocol:

1. S'inicia un cultiu de 20 ml en un flascó de 75 cm² i es manté fins que arriba a fase exponencial. En aquest cas, és important que el cultiu no arribi a fase estacionària per evitar l'activació de processos de proteòlisi.

2. Es renten les cèl·lules amb PBS tres vegades per eliminar proteïnes sèriques del medi del cultiu.
3. Es recuperen les cèl·lules adherides al plàstic amb PBS amb l'ajut d'un rascador cel·lular i es centrifuguen 15 min a 12000 r.p.m. En cas de soques deficientes en adhesió es centrifuguen les cèl·lules i es renta el pellet tres vegades amb PBS .
4. En el cas que els extractes es vulguin analitzar mitjançant SDS-PAGE, els pellets es resuspenen en 180 µl PBS i les cèl·lules es llisen afegint 20 µl de tampó de càrrega de proteïnes x10.

VI.6.2. Electroforesi de proteïnes en gels de poliacrilamida amb SDS (SDS-PAGE)

L'electroforesi discontinua en gels de poliacrilamida amb SDS és una metodologia que permet l'anàlisi de mesclades complexes de proteïna. El mètode es basa en un suport físic constituït per fibres de monomers d'acrilamida entrecruades amb bisacrilamida que polimeritzen en dissolució en presència de radicals lliures. Aquests radicals lliures són aportats pel persulfat amònic (PSA) en una reacció catalitzada per el TEMED. La densitat final de la malla d'acrilamida pot ser variable i depèn de la concentració de monomers d'acrilamida i la relació acrilamida/bisacrilamida. En el cas d'una electroforesi discontinua es polimeritzen dos tipus de gel, un gel superior o apilador i un gel inferior separador. El gel superior té la funció de concentrar la mostra en un petit front sobre el gel separador augmentant la resolució d'aquest, fent que tota la mostra entri a la fase separadora al mateix temps. En canvi, el gel inferior és el que permet la separació diferencial de les proteïnes segons el seu pes molecular. Això es deu en part a que el SDS, que és un detergent, desfà el plegament de les proteïnes i s'uneix a elles amb una relació constant igual a 1,4 g SDS/g proteïna, apantallant així la càrrega pròpia i aconseguint que les proteïnes migrin de manera proporcional al seu pes molecular. Per altra banda, els ponts disulfur podrien fer variar la mobilitat de les proteïnes i per això alguns tampons de mostra porten agents reductors com el β-mercaptoetanol.

En aquest treball s'ha utilitzat el sistema d'electroforesi de Mini-Protean (BioRad), que es descriu a continuació:

1. Muntar els vidres utilitzant els espaiadors de 1,5 o 0,8 mm, segons la quantitat de mostra a carregar (60 i 30 µl màxim respectivament).
2. Preparar el gel segons la següent recepta :

Gel *	Concentració d'acrilamida							
	8 %		10 %		12 %		15 %	
	inferior	superior	inferior	superior	inferior	superior	inferior	superior
Aigua	2,18 ml	972 µl	1,98 ml	972 µl	1,78	972 µl	1,48 ml	972 µl
Tampó inferior x4	1 ml	-----	1 ml	-----	1 ml	-----	1 ml	-----
Tampó superior x4	-----	375 µl	-----	375 µl	-----	375 µl	-----	375 µl
Acrilamida 40 %	0,8 ml	150 µl	1 ml	150 µl	1,2 ml	150 µl	1,5 ml	150 µl
PSA 10 %	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
TEMED	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl

* Recepta per un gel amb espaiador de 0,8 mm. Per un gel amb un espaiador de 1,5 mm, cal multiplicar els volums per dos.

3. Es diposita entre els dos vidres la solució pel gel inferior i es deixa polimeritzar cobert d'una capa fina de isopropanol.

4. Un cop polimeritzat, es retira el isopropanol, es renta amb aigua, s'asseca i s'afegeix la solució del gel superior i es col·loca la pinta. Un cop polimeritzat, el gel es submergeix en tampó d'elèctrodes dintre una cubeta i es treu la pinta.
5. Es carreguen les mostres (amb tampó de carrega i prèviament bullides) amb un marcador de pes molecular (BenchMark d'Invitrogen en el nostre cas) i es corre el gel a 20 mA o a 40 mA si són dos gels, fins que el blau arribi al final.

Tampons d'electroforesi de proteïnes:

- Tampó d'elèctrodes (10x): 25 mM Tris; 0,102 M glicina; 0,1 % SDS pH 8,3
- Tampó de gel inferior (4x): 0,4 % SDS; 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
- Tampó de gel superior (x4): 0,4 % SDS; 0,5 M Tris-HCl; pH 6,8
- La solució al 40 % d'acrilamida/bisacrilamida (37.5:1) utilitzada va ser subministrada per BioRad.
- Tampó de càrrega (x10): Per 10 ml: 0,75 ml Tris-HCl 1 M; 3 ml SDS 10 %; 0,75 g Ficoll 400; 0,21 ml β -mercaptoetanol (opcional) i H₂O MilliQ fins 10 ml.

VI.6.3. Tinció amb blau de Coomassie

Aquest mètode de tinció és quantitatiu i específic per proteïnes i el seu límit inferior de detecció és de 0,3-1 μ g per banda. Consisteix en tenyir el gel fins a obtenir un gel totalment blau (15-30 min) amb una solució al 0,1 % de Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma) dissol en àcetic:metanol:aigua (1:2.5:2.5). Per observar les bandes cal destenyir el gel amb acid acètic 10 %.

VI.6.4. Transferència de tipus Western (Western blot)

El Western blot és una tècnica molt sensible per l'anàlisi i la caracterització de proteïnes. Consisteix en separar les proteïnes per SDS-PAGE, transferir-les electroforèticament a un filtre de nitrocel·lulosa i detectar la proteïna d'interès amb l'ajut d'un primer anticòs específic i d'un segon anticòs conjugat a un sistema de detecció apropiat. En el nostre cas s'ha utilitzat un segon anticòs anti-mouse o anti-rabbit segons l'origen del primer anticòs, conjugat amb fosfatasa alcalina. Per la transferència s'ha utilitzat el kit Mini Trans-Blot[®] electrophoretic transfer cell de BioRad i el procediment que s'ha seguit és el següent:

SDS-PAGE i muntatge de transferència

1. Es separen les mostres de proteïnes que vulguem analitzar per SDS-PAGE. Es recomanable afegir un marcador de pes molecular pretenyit (BenchMark Pre-stained d'Invitrogen) perquè ens faciliti identificar la cara del filtre on s'han transferit les proteïnes i saber si la transferència ha anat correctament.
2. El gel s'equilibra amb tampó de transferència fred (25 mM Tris, 192 mM glicina pH 8,3-8,4; metanol 20 %) durant 30 min a RT en agitació suau.

VI. Material i mètodes

3. Es talla paper de nitrocel·lulosa (BA85, Scheicher&Schuell) a una mida una mica superior al gel (és important utilitzar guants) i s'hidrata amb H₂O destil·lada 10 min i a continuació 10 min més amb tampó de transferència.
4. Es tallen 4 fulls de paper Whatman 3MM de mida igual al paper de nitrocel·lulosa i s'humitegen en tampó de transferència.
5. Submergit en una cubeta que contingui tampó de transferència i evitant que quedin bombolles atrapades entre qualsevol dels seus components, es munta el "sandwitch" en l'ordre següent: càtode (pol-), esponja, 2 papers Whatman, gel, filtre nitrocel·lulosa, 2 papers Whatman, esponja, ànode (pol+).
6. S'instal·la el sandwitch a la cubeta de transferència amb tampó de transferència i es posa un bioice (bloc congelat) congelat a -80°C i una vareta magnètica.
7. Es realitza l'electrotransferència a 100V(0,25 A) durant 1h.

Un cop realitzada la transferència es procedeix a l'assaig immunològic (si la transferència ha anat bé el marcador pretenyit ha de quedar nitidament transferit a la nitrocel·lulosa).

Assaig immunològic

1. Es renta el paper de nitrocel·lulosa en tampó PBS + 0,05% Tween-20 durant 15 min a RT i agitació suau.
2. S'incuba la membrana de nitrocel·lulosa amb PBS + 0,05% Tween-20 i 1% reactiu de bloqueig (Roche) a 4°C o/n.
3. S'incuba la membrana amb el 1er anticòs a la dilució corresponent en PBS + 0,05% Tween-20 i 1% reactiu de bloqueig durant 1 h a RT en agitació suau. Els anticòssos i dilucions utilitzades en aquest treball es descriuen en la taula 7.
4. Es renta la membrana de nitrocel·lulosa 3 cops durant 10 min en PBS + 0,05% Tween-20 a RT en agitació suau.
5. S'incuba la membrana amb el 2n anticòs (anti-IgG conjugat a fosfatasa alcalina) a la dilució corresponent en PBS Tween-20 i 1% reactiu de bloqueig durant 1 h RT en agitació suau. En el nostre cas s'ha utilitzat anti-mouse (BioRad) a una dilució 1:3000 o anti-rabbit (BioRad) a una dilució 1:5000, tots dos conjugats amb fosfatasa alcalina.
6. Es renta la membrana de nitrocel·lulosa 3 cops durant 10 min en PBS + 0.05% Tween-20 a RT en agitació suau.

Un cop fetes les incubacions amb els anticòssos, es revela el Western blot per reacció enzimàtica colorimètrica amb fosfatasa alcalina tal com es descriu en els punts 7 i 8 del secció VI.4.10 corresponent a la detecció immunològica.

Taula 7. Llistat d'anticossos utilitzats en aquest treball.

Anticòs	Descripció, origen i dilució de treball
Anti-P140	Anticòs monoclonal contra la proteïna P140 de <i>M. genitalium</i> obtingut en ratolí. Origen: subministrat per Dr. Baseman (UTHSCSA) (Morrison-Plummer <i>et al.</i> , 1987) Dilució: 1:1000
Anti-P110	Anticòs policlonal contra la proteïna P110 de <i>M. genitalium</i> obtingut en conill. Origen: subministrat per Dr. Baseman (UTHSCSA) (Dhandayuthapani <i>et al.</i> , 1999) Dilució: 1:1000
Anti-HMW1*	Anticòs policlonal contra la proteïna HMW1 de <i>M. pneumoniae</i> obtingut en conill. Origen: subministrat per Dr. Krause (UGA) (Stevens i Krause, 1991) Dilució: 1:8000
Anti-HMW3*	Anticòs policlonal contra la proteïna HMW3 de <i>M. pneumoniae</i> obtingut en conill. Origen: subministrat per Dr. Krause (UGA) (Stevens i Krause, 1992) Dilució: 1:5000
Anti-P41*	Anticòs policlonal contra la proteïna P41 de <i>M. pneumoniae</i> obtingut en conill. Origen: subministrat per Dr. Krause (UGA) (Fisseha <i>et al.</i> , 1999) Dilució: 1:1000
Anti-MG217	Anticòs monoclonal contra la proteïna MG217 de <i>M. genitalium</i> obtingut en ratolí. Origen: aquest estudi (veure secció VI.7) Dilució: 1:500
Anti.MG218	Anticòs monoclonal contra la proteïna MG218 de <i>M. genitalium</i> obtingut en ratolí. Origen: aquest estudi (veure secció VI.7) Dilució: 1:500

*Malgrat aquests anticossos s'han produït contra proteïnes de *M. pneumoniae* s'ha demostrat que són útils per la detecció de les proteïnes homòlogues de *M. genitalium*.

VI.6.5. Identificació per espectrometria de masses de proteïnes aïllades a partir d'un gel d'acrilamida.

Digestió trípica in situ de proteïnes separades mitjançant SDS-PAGE i preparació de la mostra per l'obtenció de l'empremta peptídica

1. A partir d'un gel SDS-PAGE tenyit amb Comassie es retallen les bandes d'interès que es volen identificar i es trossegen el més petit possible.
2. Mitjançant el kit In-Gel Digest_{ZP} (Millipore) i seguint les instruccions del fabricant, es processen les bandes de proteïna per extreure el Comassie, es digereixen amb tripsina i s'elueixen els pèptids resultants.
3. Després de la digestió trípica es mescla 1 µl de mostra amb el mateix volum d'una dissolució de matriu HCCA (0,3 mg/ml en Etanol:Acetona, 2:1) i s'aplica la mescla sobre una placa d'anàlisi AnchorChipTM de 600 µm per MALDI (Bruker, Bremen, Germany).
4. Finalment es deixa que la mostra cristal·litzi a temperatura ambient abans d'analitzar-la per MALDI.

Anàlisi per MALDI-TOF

El espectròmetre de masses és un instrument que permet ionitzar una mostra i mesurar la relació massa/càrrega dels ions resultants. Per realitzar les identificacions per empremta peptídica es va utilitzar un espectròmetre de masses MALDI-TOF Ultraflex de Bruker Daltonics. La ionització de les mostres es va aconseguir amb un làser de nitrogen a 337 nm i els espectres van ser obtinguts en el mode reflectiu d'ions positius, usant 25 kV d'acceleració. Per la identificació de proteïnes mitjançant la tècnica d'empremta peptídica és necessària una calibració externa de l'espectròmetre de masses. Amb aquest objectiu, les mostres es preparen alternant una mostra amb un marcador de pes molecular. Aquest marcador està compost per varis pèptids amb la seva massa molecular coneguda: angiotensina II (1046,54180), angiotensina I (1296,68480), substància P (1347,73540), bombesina (1619,82230), substrat renina (1758,93261), hormona adrenocorticotropina 1-17 (2093,08620), hormona adrenocorticotropina 18-39 (2465,19830) i somatostatina 28 (3147,47100). El espectre també va ser equilibrat internament utilitzant productes de autòlisis de tripsina a 842,50 i 2211,10 m/z. Per a l'anàlisi dels pèptids identificats, es va utilitzar el software MASCOT (Matrix Science, London, UK) seguint els següents paràmetres: es permet la pèrdua de tres talls i una tolerància de mesura de 50 ppm. Les identificacions positives van ser acceptades amb una puntuació superior a 54, utilitzant la base de dades NCBI nr 20090324 i restringint la cerca al taxó *Mycoplasma*. En les cerques la metionina modificada i la metionina sulfoxidada estaven permeses. El valor de puntuació es defineix com a $-10 \cdot \log(P)$, on P és la probabilitat que l'assignació s'hagi fet a l'atzar. Puntuacions de 54 es consideren significatives amb una $p < 0,05$.

VI.6.6. Expressió i purificació de la proteïna MG312 a *E. coli*.

Per dur a terme l'expressió de la proteïna MG312 es van obtenir colònies aïllades de cèl·lules de BL21(DE3) portadores del vector pET21d(MG312). Posteriorment, es va preparar un pre-cultiu a partir d'aquestes cèl·lules aïllades i es va utilitzar com a inòcul per a 4L de cultiu LB (relació del inòcul 1:100. Els 4L de cultiu es van separar en 5 erlenmeyers de 2L amb 800 ml cadascun). Les condicions de cultiu van ser a 37°C a 250 r.p.m. Un cop els cultius van arribar a una A_{600} de 0,7-0,8 unitats es van induir amb 1mM IPTG. El motiu per induir a altes densitats es deu a que el creixement del cultiu s'alenteix molt un cop induït, arribant com a màxim a una A_{600} de 1,7 unitats. Al cap de 2 hores post-inducció les cèl·lules es van centrifugar a 5000 g 15 min a 4°C. En aquest punt, el pellet de cèl·lules es va resuspendre amb 40 ml de tampó d'unió (5mM imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,9), es va afegir l'inhibidor de proteases PMSF a una concentració final de 1mM i la suspensió cel·lular es va lliar per sonicació amb control de temperatura per no superar els 20°C. Les condicions de sonicació van consistir en un pols cada 2 segons en cicles de 5 min durant 25-30 minuts. La potència aplicada va ser de 30W i 40W en el últim cicle. Un cop lliades les cèl·lules, el lliat es va centrifugar a 39000 g durant 15 min a 4°C. En aquest punt, la proteïna recombinant es va purificar mitjançant una columna d'afinitat al níquel de 4 ml utilitzant el cromatògraf Äkta prime (GE Healthcare) i seguint les instruccions del manual del pET de Novagen. Un cop recuperat el pic d'elució, aquest es va concentrar i dialitzar (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,5) amb un Amicon Ultra de 4ml amb un cut-off de 100 kDa. Donat l'alt pes molecular de la proteïna

MG312, aquest procés permet eliminar part de les proteïnes contaminants. Un cop concentrada la mostra, es va realitzar una cromatografia per gel filtració amb un flux de 0.3 ml/min i amb una columna empaquetada amb reïna Sephacryl S-200 HR (GE Healthcare) equilibrada amb 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,5. La cromatografia es va monitoritzar en el cromatògraf Äkta prime. Paral·lelament es va aplicar una mostra patró consistent en una mescla de 5mg/ml de blau de dextrà, 30 mg/ml BSA (68 kDa) i 15mg/ml lisozim (14.6 kDa). Posteriorment, les fraccions més pures es van concentrar i dialitzar amb tampó d'unió i es va realitzar una segona cromatografia d'afinitat al níquel amb una columna d'1 ml. Després de passar la mostra per la columna, es va fer un rentat amb 5 ml de tampó d'unió seguit d'un rentat amb tampó d'unió amb 20 mM imidazol. Posteriorment, es va eluir la proteïna agafant 4 fraccions de 5 ml d'un rentat amb tampó d'unió amb 40 mM imidazol. En aquesta concentració d'imidazol, sorprenentment la proteïna MG312 és quan s'elueix de manera més homogènia. Finalment, les diferents fraccions es van concentrar amb un Amicon Ultra de 15 ml i la mostra es va analitzar per SDS-PAGE. Per altra banda, es va determinar la concentració de la proteïna mitjançant el mètode Bradford (Bradford, 1976).

VI.7. OBTENCIÓ D'ANTICOSSOS MONOCLONALS CONTRA PROTEÏNES DE *M. genitalium*

Per obtenir una bateria d'anticossos contra *M. genitalium* es va solubilitzar aproximadament 10^9 cèl·lules de *M. genitalium* amb 3 ml d'una solució de PBS estèril contenint 0,1 % de Triton X-100. Posteriorment, es van preparar aliquotes de 150 µl i es van emmagatzemar a -80°C. Per confirmar l'absència de cèl·lules viables en la mostra, es van plaquejar varies aliquotes en medi SP-4 sòlid. Després d'aquest control, es va immunitzar un ratolí BALB/c amb 4 punxades (de 150 µl de mostra lliure d'adjuvant cadascuna) intraperitoneals, seguint procediments estàndard. Durant el procés, es van recollir varies mostres de sèrum per monitoritzar la immunització mitjançant la tècnica d'ELISA. Finalitzada la immunització, es va sacrificar l'animal i es va realitzar una esplenectomia. En aquest punt, la fusió d'esplanòcits, anàlisi dels hibridomes i producció d'anticossos monoclonals es va dur a terme segons el protocol descrit a "Antibodies: a Laboratory Manual" (Harlow i Lane, 1998). Entre els diferents hibridomes obtinguts, es van detectar dos que eren productors d'anticossos monoclonals contra la proteïna MG218 i MG217.

VI.8. ASSAIG DE PROTEÒLISI LIMITADA DE PROTEÏNES EXPOSADES A MEMBRANA

Aquest assaig s'ha dut a terme per detectar possibles proteïnes de *M. genitalium* que tenen regions exposades fora la membrana. El procediment que s'ha utilitzat és el següent:

1. S'inicia dos cultius de la soca salvatge G37 de *M. genitalium* en flascons de 75 cm² amb 20 ml de medi i es manté fins que arriba a fase exponencial.
2. Es renten les cèl·lules amb PBS tres vegades i es resuspenen en 4 ml del mateix tampó.

3. Es divideix la suspensió cel·lular en 8 aliquotes de 500 µl.
4. S'afegeix proteinasa K (Roche) a una concentració final 80 µg/ml en sis de les aliquotes i s'incuben a RT durant 5, 10, 15, 30, 45 o 60 min. Les reaccions s'aturen afegint 1mM PMSF concentració final.
5. Com a controls negatius, una aliquota es deixa sense tractar i en l'altre s'afegeix 1mM PMSF abans d'afegir la proteinasa K.
6. Es centrifugen les cèl·lules tractades, es renten amb PBS+1mM PMSF i es llisten amb tampó de càrrega de proteïnes.
7. La detecció de l'acció de la proteinasa K sobre alguna proteïna concreta s'analitza per Western blot utilitzant l'anticòs corresponent.

Concretament, en aquest treball hem analitzat la possible exposició de les proteïnes MG312 i MG217 i hem utilitzat l'adhesina P140 com a control de proteïna exposada. Com a control que les proteïnes analitzades poden ser subjecte a proteòlisi per la proteinasa K quan estan exposades, paral·lelament es va realitzar el mateix procediment però amb cèl·lules llistades prèviament amb 0,1% Triton X-100.

VI.9. ANÀLISI DE LA CAPACITAT D'ADHESIÓ DE *M. genitalium*

A continuació es detalla els dos tipus d'experiments que s'han realitzat en aquest estudi per determinar les propietats adherents de diferents soques de *M. genitalium*:

VI.9.1. Assaig d'hemadsorció

L'assaig d'hemadsorció (HA) consisteix en determinar qualitativament o quantitativament la capacitat que tenen algunes espècies de micoplasmes per unir-se als eritròcits, i per tant és una mesura de la capacitat d'adhesió cel·lular dels micoplasmes. De fet, l'assaig HA és la tècnica alternativa al cultius cel·lulars més acceptada. En aquest treball s'ha testat la capacitat d'adhesió d'alguns mutants i de manera qualitativa tal com s'exposa a continuació:

1. Es passen diferents dilucions dels mutants a testar a través d'un filtre de baixa retenció de proteïnes amb porus de 0,45 µm.
2. Es plaquegen 200 µl de cada dilució en plaques de medi sòlid SP-4 i s'incuben a 37°C durant 6-9 dies. En aquest moment, la mida de les colònies és òptima per realitzar l'assaig d'HA.
3. S'afegeix 2 ml d'una suspensió d'eritròcits humans (veure més avall) sobre les colònies, de manera que quedin submergides en la solució.
4. Després d'una hora d'incubació a 37°C, es fan 3 rentats amb PBS amb molta suavitat per eliminar els eritròcits no units.

5. Immediatament es poden observar les colònies amb una lupa estereoscòpica. En el nostre cas es va utilitzar una lupa LeicaMZFLIII connectada a una camera model LeicaDC500 per capturar fotografies.

Preparació de la suspensió d'eritròcits

1. Es centrifuga la mostra de sang a 300 g durant 2 min, es retira el sèrum i es renten els eritròcits tres vegades amb PBS estèril.
2. Es resuspén el pellet d'eritròcits amb PBS estèril en el mateix volum que l'inicial de sang processada.
3. Finalment, els eritròcits es dilueixen 50 vegades amb PBS estèril. Aquesta suspensió es pot conservar a 4°C fins a una setmana. No obstant, es recomanable preparar-la el mateix dia.

VI.9.2. Assaig quantitatiu de la capacitat d'adhesió al plàstic

L'assaig d'hemadsorció també es pot realitzar de manera quantitativa mitjançant radioactivitat (Fisseha *et al.*, 1999). No obstant, hem desenvolupat un assaig alternatiu que mesura quantitativament la capacitat d'adhesió al plàstic d'una soca determinada. En aquest cas, l'adhesió al plàstic també es considera un bon indicador de la capacitat d'adhesió cel·lular dels micoplasmes. El protocol utilitzat ha estat el següent:

Les soques a ser testades es van diluir en 1 ml de medi SP-4 per obtenir una concentració cel·lular final aproximada de 10^7 cèl·lules/ml. Després, es va dispensar 800 µl de cèl·lules diluïdes en plaques de cultiu cel·lular de 35mm de diàmetre (Corning) i es van incubar durant 3 h a 37°C. Els 200 µl restants es van guardar per mesurar exactament la biomassa total utilitzada en cada assaig. Passat el temps d'incubació, les plaques es van sacsejar suaument i es van recollir les cèl·lules no adherides recuperant 200 µl del medi. La determinació de l'ATP està considerat un mètode adient per estimar la biomassa cel·lular dels micoplasmes (Stemke, 1995). En aquest sentit, la biomassa de micoplasmes existent en la fracció total (cèl·lules inicials diluïdes) i la fracció no adherent (cèl·lules no adherides recuperades al cap de 3 h d'incubació) es va extrapolar mesurant el contingut d'ATP. Per dur a terme aquesta mesura, es va dispensar per triplicat aliquotes de 25 µl de cada fracció en una placa de 96 pous (B&W Isoplate; Wallac) i les mostres es van processar en el mateix pou utilitzant el kit comercial "ATP bioluminescence assay Kit HS II" (Roche), tal com indica el fabricant. Per fer les mesures de bioluminescència es va utilitzar el luminòmetre Victor³V 1420 multilabel counter (PerkinElmer). Finalment, per estimar el nombre de micoplasmes adherits es va restar en cada experiment, la mesura de la fracció no adherent a la mesura de la fracció total. L'experiment es va repetir tres vegades per soca analitzada.

VI.10. AÏLLAMENT DE MUTANTS AMB ALTERACIONS EN EL COMPORTAMENT DE MOTILITAT

Per obtenir una col·lecció de mutants de *M. genitalium* es va transformar la soca salvatge amb el vector pMTnTetM438, tal com es descriu en la secció VI.3.3. Aquest plasmidi és portador del transposó MTnTetM438, el qual s'insereix en el genoma de manera estable conferint a la cèl·lula resistència a tetraciclina (Pich *et al.*, 2006b). Per seleccionar directament els mutants amb insercions que puguin afectar el comportament de motilitat (com per exemple un increment en l'activitat motora), es va utilitzar el següent sistema. Un cop electroporades les cèl·lules, aquestes es van diluir en 45 ml de medi SP-4 i es van dispensar en volums de 750 µl en 60 plaques de cultiu cel·lular de 60 mm de diàmetre (Corning). Posteriorment, es va incubar les cèl·lules a 37°C i 5% CO₂ per permetre l'adhesió de les cèl·lules al plàstic i l'expressió del gen de resistència. Després de 2 h d'incubació es va retirar el medi de la placa amb una pipeta Pasteur i les cèl·lules adherides es van rentar amb PBS. Immediatament, es van cobrir les cèl·lules amb medi semisòlid SP-4 suplementat amb 1% d'agarosa de baix punt de fusió i tetraciclina. Després de 12 dies d'incubació, es van examinar les plaques sota una lupa esteroscòpica en busca de transformants amb una morfologia de colònia alterada i compatible amb un increment en l'activitat de motilitat.

VI.11. ESTUDIS MICROKINEMATOGRAFICS

Aquests estudis han estat molt útils per analitzar detalladament les característiques de motilitat d'una soca determinada. Per dur a terme aquesta anàlisi, primer es va inocular amb la soca d'interès plaques de cultiu cel·lular de 30 mm de diàmetre contenint 2 ml de medi SP-4 fresc (prèviament filtrat per un porus de 0,22µm). Els inòculs provenien d'stocks de treball congelats i oscil·laven entre 5 i 20 µl. Després de 16 h d'incubació a 37°C, es va retirar el medi, es va afegir una gota de medi SP-4 atemperat a 37°C i finalment es va col·locar un cubreobjecte. Les cèl·lules adherides es van examinar a 37°C amb un microscopi Axioplan (Zeiss) amb l'objectiu de 100x i el moviment es va monitoritzar capturant imatges a intervals de 2 s durant 2-5 min mitjançant una camera digital Hamamatsu ORCA-ER CCD controlada pel programa Aquacosmos. Les dades de motilitat presentades en aquest treball es van obtenir de la següent manera:

- La **proporció de cèl·lules mòbils** o freqüència de motilitat es va obtenir monitoritzant la capacitat de moviment de 400-800 cèl·lules per soca estudiada. Per altra banda, es van combinar les dades de dos clons diferents del mateix tipus de mutant.
- la **velocitat de desplaçament** es va calcular mesurant la distància recorreguda de 25-50 cèl·lules durant 2 min utilitzant el programa Aquacosmos. Per fer les dades comparables, es van mesurar camps amb un nombre de cèl·lules similars. Les dades obtingudes provenen de mesurar cèl·lules de 8 camps diferents. Les dades presentades en aquest treball corresponen a la mitjana de velocitats obtingudes d'aquesta anàlisi de dos clons diferents del mateix tipus de mutant.
- **Anàlisi dels patrons de moviment.** Es va classificar el tipus de moviment (circular, erràtic, no mòbil) d'aproximadament 220 cèl·lules de cada soca. Per mesurar el diàmetre de les trajectòries circulars, es va

sobreimposar utilitzant el Adobe Photoshop CS versió 8.0.1, 20 fotogrames consecutius separats per 6 s cadascun per mostrar el recorregut descrit durant 2 min. A partir d'aquestes imatges es van mesurar els diferents diàmetres utilitzant el programa Scion Image. En aquest cas, es va mesurar el diàmetre de 164 i 68 trajectòries circulars de la soca salvatge i el mutant $\Delta mg217$, respectivament. El sentit del moviment circular es va obtenir analitzant aproximadament 100 cèl·lules per cada soca.

VI.12. MÈTODES D'ANÀLISI PER MICRSOCÒPIA ELECTRÒNICA

VI.12.1. Microscòpia electrònica de rastreig (SEM)

Per a dur a terme l'anàlisi morfològic de diferents mutants per SEM es va seguir el següent procediment. Es van inocular entre 5 i 20 μ l de l'stock amb la soca d'interès a cambres de cultiu cel·lular de permanox (Nunc) contenint 2 ml de medi SP-4 i es van incubar a 37°C durant 16 h aproximadament. En el cas de les soques completament deficientes en adhesió (mutants $\Delta mg191$ i $\Delta mg192$), va ser necessària la utilització de cubreobjectes tractats amb poly-L-lisina (Becton Dickinson) per promoure la seva adhesió a una superfície. En aquest sentit, la preparació de la mostra es va haver de modificar de la següent manera.

1. Es centrifuga a 12000 r.p.m durant 15 min un cultiu en fase exponencial de 40 ml.
2. El pellet resultant es resuspén en 1 ml de medi SP-4.
3. Es disgrega el pellet amb l'ajuda d'una pipeta i es passa la suspensió cel·lular 3 vegades per una xeringa d'insulina i a través d'un filtre de 0,45 μ m de porus per individualitzar les cèl·lules.
4. Per altra banda, es marca una de les cares dels cubreobjectes tractats amb poly-L-lisina i es dispositen amb la cara marcada cap avall en pous individuals de plaques de cultiu de 24 pous.
5. Seguidament, s'omplen aquest pous amb la suspensió de cèl·lules obtinguda i s'incuba 2 hores a 37°C per permetre que les cèl·lules s'adhereixin a la superfície del cubreobjecte.

En aquest punt, el tractament en els dos casos segueix igual:

1. Passat el temps d'incubació, es retira el medi i es renten les cèl·lules tres vegades amb PBS.
2. Es fixen les cèl·lules amb glutaraldehid 1% durant 1 hora.
3. Després de la fixació, es fan tres rentats més amb PBS.
4. Es deshidraten les cèl·lules seqüencialment en etanol 30 %, 50 %, 70 %, 90 % i dos cops al 100 % durant períodes de 10 min.
5. Immediatament després de l'últim rentat, les mostres es dessequen per punt crític.
6. Finalment, es metal·litzza la superfície que conté les cèl·lules fixades amb 20 nm de gruix d'or i s'examinen les mostres amb un microscopi electrònic de rastreig (Hitachi S-570).

La dessecació de les mostres per punt crític, la metal·lització i l'anàlisi posterior es va realitzar en el servei de microscòpia electrònica de la UAB. Les dades quantitatives presentades en aquest treball es van obtenir de la següent manera:

- Per obtenir les proporcions de formes cel·lulars rodones i pleomòrfiques exhibides pels mutants Δ mg191 i Δ mg192, es van examinar 700 cèl·lules individuals per mutant a partir de fotos digitals.
- La mesura de l'angle existent entre els eixos longitudinals de l'organela terminal i el cos cel·lular es va obtenir amb l'ajut del programa Scion Image a partir de 100 cèl·lules individuals (per soca) a partir d'imatges digitals.
- La direcció de la curvatura de l'organela terminal es va determinar a partir de 100 cèl·lules individuals per soca estudiada.

VI.12.2. Microscòpia electrònica de transmissió (TEM)

Per a dur a terme l'anàlisi d'ultraestructura de diferents soques de micoplasmes per TEM, es va seguir el següent protocol:

1. Es centrifuga a 12000 r.p.m durant 15 min un cultiu en fase exponencial de 20 ml.
2. El pellet resultant es renta 3 vegades amb PBS i es fixa amb una solució de glutaraldehid al 2.5% (v/v) i paraformaldehid 2% (v/v) en PBS (pH 7,4) durant 2 h. Es recomanable disgregar el pellet per tal que el fixador arribi homogèniament a tota la mostra.
3. Es renta el pellet amb PBS i s'incuba en una solució 1% OsO₄ (p/v) i 0,8% K₃Fe(CN)₆ (p/v).
4. Es renten de nou el pellet i es deshidrata amb etanol absolut.
5. Seguidament, s'infiltra el pellet amb reïna Spurr i es deixa polimeritzar a 60°C durant 48 h.
6. Un cop el pellet ha adquirit consistència, es fan talls semifins i es munten en reixetes de coure.
7. Finalment, les mostres es contrasten amb acetat d'uranil i citrat de plom.
8. Les mostres es van visualitzar en un microscopi electrònic de transmissió Hitachi H-7000, treballant amb una acceleració de 70 kV Hitachi H-7000.

Cal mencionar, que un cop fixat el pellet el processament de les mostres i l'anàlisi posterior es va realitzar en el servei de microscòpia electrònica de la UAB.

Per dur a terme anàlisis estructurals de la proteïna MG312 per TEM es va seguir el següent protocol:

1. Es van irradiar reixetes de microscòpia electrònica (400 mesh) amb pel·lícula de carbó amb llum UVC (254 nm 6W), durant 10 min i a 10 cm de distància
2. Seguidament, es va dipositar sobre la reixeta una gota de 2µl de proteïna a 50 µg/ml en tampó 10 mM HEPES pH.7,2.
3. Després d'un minut, es va treure amb compte el líquid sobrant amb paper absorbent.
4. A continuació es va realitzar la tinció negativa de les mostres amb acetat d'uranil al 1% durant 30 s.
5. Finalment, es va retirar el líquid sobrant amb paper absorbent sense fer malbé la pel·lícula de carbó i es van deixar assecar les reixetes a RT.

6. Les mostres es van visualitzar el mateix dia amb un microscopi electrònic de transmissió Hitachi H-7000, treballant amb una acceleració de 70 kV.

Les mesures realitzades sobre les estructures observades es van fer amb l'ajut del programa Scion Image.

VI.12.3. Localització cel·lular de proteïnes per crio-immunomicroscòpia electrònica

En aquest estudi hem utilitzat aquesta tècnica per localitzar específicament la proteïna MG217. El procediment que es va seguir va ser el següent:

Es va iniciar un cultiu de 20 ml de la soca salvatge i el mutant Δ mg217. Un cop el cultiu va arribar a fase exponencial, es va retirar el medi i les cèl·lules es van rentar 2 vegades amb tampó fosfat pH 7,4 (PB). A continuació, les cèl·lules es van recuperar amb un rascador i es van resuspendre en una solució de 4% (v/v) formaldehid en PB. Després de 2 h de fixació, les cèl·lules es van centrifugar i els pellets es van rentar 4 vegades amb PB, 50 mM glicina. En aquest punt, els pellets es van infiltrar amb gelatina al 12% (w/v) i sucrosa 2,1M en PBS i es van congelar amb nitrogen líquid. A continuació, es van realitzar criotalls ultrafins amb un ultracryomicrotòtom (Leica Ultracut UCT, Viena) i a una temperatura de -120°C. Les crio-seccions es van dipositar sobre reixetes de Formvar Cu/Pd i es va iniciar la detecció immunològica, seguint procediments estàndards. Breument, les reixetes es van incubar a 37°C durant 30 min amb PBS 2% gelatina. A continuació, les reixetes es van rentar 5 vegades amb PBS, 50 mM NH_4Cl i 2 vegades amb PBS 1% BSA. Després, les reixetes es van incubar durant 1h i a RT amb l'anticòs monoclonal anti-MG217 diluït 5 vegades amb PBS 1% BSA. Després de 3 rentats amb PBS 0,1% BSA, es va afegir el anticòs secundari anti-mouse IgG conjugat amb partícules d'or de 10 nm (British Bio Cell International, Cardiff), diluït 25 vegades en PBS 1% BSA. Passat 30 min d'incubació a RT, les reixetes es van rentar amb PBS i es van fixar durant 5 min amb una solució 1% glutaraldhid en PBS. Finalment, les mostres es van rentar i contrastar amb una mescla 1:9 (v/v) de 3% acetat d'uranil i 2% de metil-cel·lulosa. Un cop es van assecar les reixetes, les mostres es van examinar en un microscopi electrònic de transmissió JEOL JEM-2011.

Cal mencionar, que un cop fixat el pellet el processament de les mostres i l'anàlisi posterior es va realitzar en el servei de microscòpia electrònica de la UAB.

VII. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. Les proteïnes P140 i P110 estan estabilitzades de forma recíproca, són els principals determinants de citadherència de *M. genitalium* i la seva presència és necessària per al desenvolupament de l'organela terminal.
2. L'absència de P140 i P110 promou la inestabilitat de la proteïna MG386 i un increment en els nivells de la proteïna DnaK, posant de manifest el lligam existent entre la P140/P110 i alguns components del citoesquelet de *M. genitalium*.
3. Els mutants espontanis d'adhesió cel·lular classe I i II s'originen com a conseqüència de grans delecions afectant el gen *mg191* i els gens *mg191- mg192*, respectivament. Aquestes delecions són producte d'una recombinació simple entre l'operó MgPa i l'MgPa island situat a l'extrem 3' del mateix operó. Aquest origen recombinatiu explica l'alta freqüència d'aparició d'aquests mutants.
4. La translocació de seqüències de l'operó MgPa a un dels MgPa islands a través d'events de doble recombinació proporciona un mecanisme reversible per generar delecions. En base a aquestes observacions, proposem que els MgPa islands, a part de ser una font de variació antigènica, també poden estar implicats en un mecanisme general de variació de fase de l'expressió de les proteïnes P140 i P110.
5. La proteïna MG312 és un component estructural de l'organela terminal de *M. genitalium*. La seva absència promou la inestabilitat de les proteïnes MG217, MG218, MG317, MG386 i P140/P110, totes elles components de l'organela terminal. Com a conseqüència, mutants deficients per la proteïna MG312 perden parcialment la capacitat d'adhesió, no desenvolupen organeles terminals i són immòbils.
6. S'han identificat dos dominis funcionals importants en la proteïna MG312. El domini N-terminal (Met1-Glu128) té una implicació específica en motilitat i/o divisió cel·lular, mentre que el domini C-terminal (Leu851-Tyr1139) manté la integritat estructural de l'organela terminal. Per altra banda, la delecio de la regió central des del aminoàcid Leu278 al aminoàcid Lys583 no altera significativament el fenotip WT. En canvi, la proteïna s'inestabilitza en absència de tot el domini central (Lys127-Ser849).

VII. Conclusions

7. Els motius EAGR i Walker A box presents en el domini N-terminal de la proteïna MG312 contribueixen de manera important en les funcions de motilitat. El domini Walker A box podria estar també relacionat amb funcions de divisió cel·lular o en el control de l'inici del moviment.
8. Segons un assaig de proteòlisi limitada amb proteinasa K, la proteïna MG312 és intracel·lular i no disposa de regions exposades a la membrana.
9. La proteïna MG312 expressada de forma recombinant és purificada de manera soluble. Mitjançant microscòpia electrònica s'ha observat que aquesta proteïna presenta dos dominis globulars separats per una regió central, que pot adoptar una conformació estesa o bé plegada pel centre. Aquesta arquitectura és similar a la que presenten les proteïnes SMC, implicades en el manteniment estructural dels cromosomes.
10. La proteïna MG217 és un component de la part distal de l'organela terminal, situat entre la membrana cel·lular i el botó terminal. Un assaig de proteòlisi limitada amb proteinasa K indica que no té regions exposades a la membrana.
11. L'absència de proteïna MG217 no afecta a la citadherència, ni a la velocitat o freqüència de la motilitat del micoplasma. De la mateixa manera, no existeixen efectes secundaris sobre altres components coneguts de l'organela terminal, suggerint que és un dels últims components a incorporar-s'hi. Per altra banda, la seva estabilitat en l'organela terminal depèn principalment de la proteïna MG317.
12. L'absència de la proteïna MG217 produeix canvis en el grau d'inclinació de l'organela terminal respecte el cos cel·lular i en els patrons de moviment dels micoplasmes.
13. L'organela terminal actua com un timó i determina la direcció de desplaçament dels micoplasmes.

VIII. SUMARI

SUMARI

Capítol 1

En el primer capítol 1 hem explotat la possibilitat de delecionar gens d'interès per recombinació homòloga a *M. genitalium*, per obtenir mutants nuls per el gen *mg191* (P140) i *mg192* (P110). L'obtenció d'aquests mutants han permès demostrar que en absència de P140 o P110, les cèl·lules de *M. genitalium* perden l'organela terminal així com la capacitat d'adhesió. A més, aquests estudis han revelat l'existència d'una estabilització recíproca i post-traduccional entre la P140 i P110. Per altra banda, el conjunt d'aquest canvis afecten a l'estabilitat de la proteïna MG386 i produeixen un increment en els nivells de DnaK. Interessantment, els mutants deficients per la proteïna P140 i P110, mimetitzen el perfil proteic de mutants en adhesió cel·lular (classe II i classe I, respectivament), que s'originen espontàniament amb una elevada freqüència. Donada la similitud existent, en la segona part d'aquest capítol ens vam plantejar determinar l'origen genètic d'aquests mutants. Aquests estudis van determinar que el fenotip no adherent dels mutants classe I-II és conseqüència de grans delecions irreversibles que afecten el gen *mg192* i els gens *mg191* i *mg192*, respectivament. Aquestes grans delecions són producte d'una recombinació simple entre l'operó MgPa i el MgPa island situat al extrem 3' del mateix operó. Aquest origen recombinatiu explicaria l'origen de l'alta freqüència d'aparició d'aquests mutants. Per altra banda, hem demostrat l'existència en la població salvatge de successos de doble recombinació que involucrarien seqüències de l'operó MgPa i els MgPa islands, obrint la possibilitat de l'existència d'un sistema reversible de variació de fase de l'expressió de les adhesines P140 i P110. Aquest mecanisme podria tenir implicacions importants, com ara regular la capacitat d'adhesió cel·lular d'aquest patogen humà, proporcionant grans avantatges dins un context d'infecció *in vivo*.

Capítol 2

La presència en la proteïna MG312 d'un motiu conegut com a EAGR (motiu exclusiu de proteïnes relacionades en motilitat), suggeria que aquesta proteïna podria estar relacionada en el mecanisme de motilitat de *M. genitalium*. En aquest capítol hem estudiat la contribució funcional de la proteïna MG312 en les funcions associades a l'organela terminal i en especial atenció a la motilitat. Amb aquest objectiu, es va

obtenir per recombinació homòloga un mutant nul per la proteïna MG312. L'anàlisi d'aquest mutant ha revelat que la proteïna MG312 és un dels principals components estructurals de l'organela terminal de *M. genitalium*. Concretament, la seva presència es necessària per mantenir estables les proteïnes MG218, MG317, MG217, P140, P110 i MG386, tots ells components de l'organela terminal. Com a conseqüència, aquests mutants són parcialment deficients en adhesió i no desenvolupen organeles terminals. El fet que aquests mutants retinguin una certa adherència sembla ser conseqüència de la presència d'uns certs nivells de P140 i P110. Així doncs, aquestes observacions semblarien indicar que el complex format per P140 i P110 és el responsable directe de la citadherència de *M. genitalium* i que la capacitat adhesiva és probablement independent de la presència d'organela terminal. A més, en aquest treball hem demostrat que les cèl·lules del mutant MG312 que són capaces d'adherir-se han perdut la capacitat motora, suggerint que l'organela terminal i els seus components juguen un paper fonamental en la motilitat. En aquest escenari, podríem definir l'organela terminal com un conjunt de proteïnes que s'organitzen i actuen de manera coordinada amb l'objectiu de proporcionar un sistema de motilitat a la cèl·lula. Malauradament, la cascada d'efectes secundaris que es produeix per la pèrdua de la proteïna MG312, dificulta determinar quin paper específic li correspon al MG312 en aquest escenari. No obstant, els nostres estudis han revelat que la proteïna MG312 disposa de dos dominis funcionals importants. Per una banda, el domini C-terminal sembla contribuir a les funcions estructurals de la proteïna, mantenint estables la resta de components de l'organela terminal. D'altra banda, el domini N-terminal sembla tenir un paper més específic en motilitat i/o divisió cel·lular. Per últim, l'expressió recombinant i caracterització estructural de la proteïna MG312 ha revelat una sorprenent similitud arquitectònica amb les proteïnes SMC.

Capítol 3

En el capítol 3 hem abordat la identificació de gens involucrats en el control del moviment, un camp inexplorat fins al moment. En una primera aproximació, en aquest treball s'ha desenvolupat un sistema per detectar mutants amb un increment en l'activitat motora, i a través d'aquest mètode, hem identificat un únic mutant amb una inserció en el gen *mg217*. L'anàlisi de mutants deficients per aquesta proteïna ha revelat que la MG217 està implicada en promoure la inclinació de l'organela terminal respecte

el cos cel·lular. A més, aquest canvi morfològic promou un canvi en el patró de moviment, que consisteix en passar de moviments circulars a trajectòries circulars més àmplies o bé rectilínies. De manera important, el conjunt d'aquestes observacions suggereixen que l'organela terminal actua com un timó i determina la direcció de desplaçament dels micoplasmes. Per altra banda, hem localitzat la proteïna MG217 a la part distal de l'organela terminal, entre la membrana cel·lular i el botó terminal. Aquesta localització seria consistent amb la idea de que la proteïna MG217 pogués actuar com a modulador de la curvatura de l'organela terminal, permetent d'aquesta manera que les cèl·lules es desplaressin en direccions preferents. En conclusió, aquest treball ha permès la identificació del primer gen implicat en el comportament mòbil dels micoplasmes i obra una nova línia d'investigació, dirigida a la cerca de nous components implicats.

IX. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Adan-Kubo, J., Uenoyama, A., Arata, T., and Miyata, M. (2006) Morphology of isolated Gli349, a leg protein responsible for *Mycoplasma mobile* gliding via glass binding, revealed by rotary shadowing electron microscopy. *J Bacteriol* **188**: 2821-2828.
- Alvarez, R.A., Blaylock, M.W., and Baseman, J.B. (2003) Surface localized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Mycoplasma genitalium* binds mucin. *Mol Microbiol* **48**: 1417-1425.
- Balish, M.F., Hahn, T.W., Popham, P.L., and Krause, D.C. (2001) Stability of *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence-accessory protein HMW1 correlates with its association with the triton shell. *J Bacteriol* **183**: 3680-3688.
- Balish, M.F., Ross, S.M., Fisseha, M., and Krause, D.C. (2003a) Deletion analysis identifies key functional domains of the cytoadherence-associated protein HMW2 of *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol* **50**: 1507-1516.
- Balish, M.F., Santurri, R.T., Ricci, A.M., Lee, K.K., and Krause, D.C. (2003b) Localization of *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence-associated protein HMW2 by fusion with green fluorescent protein: implications for attachment organelle structure. *Mol Microbiol* **47**: 49-60.
- Baseman, J.B., Banai, M., and Kahane, I. (1982a) Sialic acid residues mediate *Mycoplasma pneumoniae* attachment to human and sheep erythrocytes. *Infect Immun* **38**: 389-391.
- Baseman, J.B., Cole, R.M., Krause, D.C., and Leith, D.K. (1982b) Molecular basis for cytoadsorption of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* **151**: 1514-1522.
- Baseman, J.B., Dallo, S.F., Tully, J.G., and Rose, D.L. (1988) Isolation and characterization of *Mycoplasma genitalium* strains from the human respiratory tract. *J Clin Microbiol* **26**: 2266-2269.
- Baseman, J.B., Lange, M., Criscimagna, N.L., Giron, J.A., and Thomas, C.A. (1995) Interplay between mycoplasmas and host target cells. *Microb Pathog* **19**: 105-116.
- Baseman, J.B., and Tully, J.G. (1997) Mycoplasmas: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. *Emerg Infect Dis* **3**: 21-32.
- Baseman, J.B., Cagle, M., Korte, J.E., Herrera, C., Rasmussen, W.G., Baseman, J.G., Shain, R., and Piper, J.M. (2004) Diagnostic assessment of *Mycoplasma genitalium* in culture-positive women. *J Clin Microbiol* **42**: 203-211.
- Beck, B.D., Arscott, P.G., and Jacobson, A. (1978) Novel properties of bacterial elongation factor Tu. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 1250-1254.
- Bergemann, A.D., Whitley, J.C., and Finch, L.R. (1989) Homology of mycoplasma plasmid pADB201 and staphylococcal plasmid pE194. *J Bacteriol* **171**: 593-595.
- Biberfeld, G., and Biberfeld, P. (1970) Ultrastructural features of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* **102**: 855-861.
- Blackhart, B.D., and Zusman, D.R. (1985) "Frizzy" genes of *Myxococcus xanthus* are involved in control of frequency of reversal of gliding motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 8767-8770.
- Bourret, R.B., and Stock, A.M. (2002) Molecular information processing: lessons from bacterial chemotaxis. *J Biol Chem* **277**: 9625-9628.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

IX. Bibliografia

- Bredt, W. (1968) Motility and multiplication of *Mycoplasma pneumoniae*. A phase contrast study. *Pathol Microbiol (Basel)* **32**: 321-326.
- Bredt, W., Kist, M., and Jacobs, E. (1981) Phagocytosis and complement action. *Isr J Med Sci* **17**: 637-640.
- Britton, R.A., Lin, D.C., and Grossman, A.D. (1998) Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning. *Genes Dev* **12**: 1254-1259.
- Burgos, R., Pich, O.Q., Ferrer-Navarro, M., Baseman, J.B., Querol, E., and Pinol, J. (2006) *Mycoplasma genitalium* P140 and P110 cytoadhesins are reciprocally stabilized and required for cell adhesion and terminal-organelle development. *J Bacteriol* **188**: 8627-8637.
- Burgos, R., Pich, O.Q., Querol, E., and Pinol, J. (2007) Functional analysis of the *Mycoplasma genitalium* MG312 protein reveals a specific requirement of the MG312 N-terminal domain for gliding motility. *J Bacteriol* **189**: 7014-7023.
- Burgos, R., Pich, O.Q., Querol, E., and Pinol, J. (2008) Deletion of the *Mycoplasma genitalium* MG_217 gene modifies cell gliding behaviour by altering terminal organelle curvature. *Mol Microbiol* **69**: 1029-1040.
- Cao, J., Kapke, P.A., and Minion, F.C. (1994) Transformation of *Mycoplasma gallisepticum* with Tn916, Tn4001, and integrative plasmid vectors. *J Bacteriol* **176**: 4459-4462.
- Chambaud, I., Heilig, R., Ferris, S., Barbe, V., Samson, D., Galisson, F., Moszer, I., Dybvig, K., Wroblewski, H., Viari, A., Rocha, E.P., and Blanchard, A. (2001) The complete genome sequence of the murine respiratory pathogen *Mycoplasma pulmonis*. *Nucleic Acids Res* **29**: 2145-2153.
- Cho, M.K., Magnus, D., Caplan, A.L., and McGee, D. (1999) Policy forum: genetics. Ethical considerations in synthesizing a minimal genome. *Science* **286**: 2087, 2089-2090.
- Chopra-Dewasthaly, R., Marendra, M., Rosengarten, R., Jechlinger, W., and Citti, C. (2005) Construction of the first shuttle vectors for gene cloning and homologous recombination in *Mycoplasma agalactiae*. *FEMS Microbiol Lett* **253**: 89-94.
- Cloward, J.M., and Krause, D.C. (2009) *Mycoplasma pneumoniae* J-domain protein required for terminal organelle function. *Mol Microbiol* **71**: 1296-1307.
- Cohen, C.R., Manhart, L.E., Bukusi, E.A., Astete, S., Brunham, R.C., Holmes, K.K., Sinei, S.K., Bwayo, J.J., and Totten, P.A. (2002) Association between *Mycoplasma genitalium* and acute endometritis. *Lancet* **359**: 765-766.
- Cohen, C.R., Nosek, M., Meier, A., Astete, S.G., Iverson-Cabral, S., Mugo, N.R., and Totten, P.A. (2007) *Mycoplasma genitalium* infection and persistence in a cohort of female sex workers in Nairobi, Kenya. *Sex Transm Dis* **34**: 274-279.
- Cordova, C.M., Lartigue, C., Sirand-Pugnet, P., Renaudin, J., Cunha, R.A., and Blanchard, A. (2002) Identification of the origin of replication of the *Mycoplasma pulmonis* chromosome and its use in oriC replicative plasmids. *J Bacteriol* **184**: 5426-5435.
- Dallo, S.F., Chavoya, A., Su, C.J., and Baseman, J.B. (1989) DNA and protein sequence homologies between the adhesins of *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Immun* **57**: 1059-1065.
- Dallo, S.F., Lazzell, A.L., Chavoya, A., Reddy, S.P., and Baseman, J.B. (1996) Biofunctional domains of the *Mycoplasma pneumoniae* P30 adhesin. *Infect Immun* **64**: 2595-2601.
- Dallo, S.F., and Baseman, J.B. (2000) Intracellular DNA replication and long-term survival of pathogenic mycoplasmas. *Microb Pathog* **29**: 301-309.

- Dallo, S.F., Kannan, T.R., Blaylock, M.W., and Baseman, J.B. (2002) Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol* **46**: 1041-1051.
- Dhandayuthapani, S., Rasmussen, W.G., and Baseman, J.B. (1999) Disruption of gene mg218 of *Mycoplasma genitalium* through homologous recombination leads to an adherence-deficient phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 5227-5232.
- Dhandayuthapani, S., Blaylock, M.W., Bebear, C.M., Rasmussen, W.G., and Baseman, J.B. (2001) Peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a virulence determinant in *Mycoplasma genitalium*. *J Bacteriol* **183**: 5645-5650.
- Dirksen, L.B., Proft, T., Hilbert, H., Plagens, H., Herrmann, R., and Krause, D.C. (1996) Sequence analysis and characterization of the hmw gene cluster of *Mycoplasma pneumoniae*. *Gene* **171**: 19-25.
- Dybvig, K., and Woodard, A. (1992) Construction of recA mutants of *Acholeplasma laidlawii* by insertional inactivation with a homologous DNA fragment. *Plasmid* **28**: 262-266.
- Fisseha, M., Gohlmann, H.W., Herrmann, R., and Krause, D.C. (1999) Identification and complementation of frameshift mutations associated with loss of cytoadherence in *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* **181**: 4404-4410.
- Flaherty, K.M., McKay, D.B., Kabsch, W., and Holmes, K.C. (1991) Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 5041-5045.
- Franke, A.E., and Clewell, D.B. (1981) Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of "conjugal" transfer in the absence of a conjugative plasmid. *J Bacteriol* **145**: 494-502.
- Fraser, C.M., Gocayne, J.D., White, O., Adams, M.D., Clayton, R.A., Fleischmann, R.D., Bult, C.J., Kerlavage, A.R., Sutton, G., Kelley, J.M., Fritchman, R.D., Weidman, J.F., Small, K.V., Sandusky, M., Fuhrmann, J., Nguyen, D., Utterback, T.R., Saudek, D.M., Phillips, C.A., Merrick, J.M., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Bott, K.F., Hu, P.C., Lucier, T.S., Peterson, S.N., Smith, H.O., Hutchison, C.A., 3rd, and Venter, J.C. (1995) The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**: 397-403.
- Gaydos, C.A., Maldeis, N., Hardick, A., Hardick, J., and Quinn, T.C. (2009) *Mycoplasma genitalium* Compared to Chlamydia, Gonorrhea, and Trichomonas as an Etiologic Agent of Urethritis in Men Attending STD Clinics. *Sex Transm Infect.*
- Gibson, D.G., Benders, G.A., Andrews-Pfannkoch, C., Denisova, E.A., Baden-Tillson, H., Zaveri, J., Stockwell, T.B., Brownley, A., Thomas, D.W., Algire, M.A., Merryman, C., Young, L., Noskov, V.N., Glass, J.I., Venter, J.C., Hutchison, C.A., 3rd, and Smith, H.O. (2008) Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science* **319**: 1215-1220.
- Glass, J.I., Assad-Garcia, N., Alperovich, N., Yooseph, S., Lewis, M.R., Maruf, M., Hutchison, C.A., 3rd, Smith, H.O., and Venter, J.C. (2006) Essential genes of a minimal bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 425-430.
- Hahn, T.W., Willby, M.J., and Krause, D.C. (1998) HMW1 is required for cytoadhesin P1 trafficking to the attachment organelle in *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* **180**: 1270-1276.
- Hamasuna, R., Osada, Y., and Jensen, J.S. (2007) Isolation of *Mycoplasma genitalium* from first-void urine specimens by coculture with Vero cells. *J Clin Microbiol* **45**: 847-850.
- Harlow, E., and Lane, D. (1998) *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

IX. Bibliografia

- Harshey, R.M. (1994) Bees aren't the only ones: swarming in gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* **13**: 389-394.
- Hasselbring, B.M., Jordan, J.L., and Krause, D.C. (2005) Mutant analysis reveals a specific requirement for protein P30 in *Mycoplasma pneumoniae* gliding motility. *J Bacteriol* **187**: 6281-6289.
- Hasselbring, B.M., Jordan, J.L., Krause, R.W., and Krause, D.C. (2006a) Terminal organelle development in the cell wall-less bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 16478-16483.
- Hasselbring, B.M., Page, C.A., Sheppard, E.S., and Krause, D.C. (2006b) Transposon mutagenesis identifies genes associated with *Mycoplasma pneumoniae* gliding motility. *J Bacteriol* **188**: 6335-6345.
- Hasselbring, B.M., and Krause, D.C. (2007a) Proteins P24 and P41 function in the regulation of terminal-organelle development and gliding motility in *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* **189**: 7442-7449.
- Hasselbring, B.M., and Krause, D.C. (2007b) Cytoskeletal protein P41 is required to anchor the terminal organelle of the wall-less prokaryote *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol* **63**: 44-53.
- Hatchel, J.M., and Balish, M.F. (2008) Attachment organelle ultrastructure correlates with phylogeny, not gliding motility properties, in *Mycoplasma pneumoniae* relatives. *Microbiology* **154**: 286-295.
- Hedreya, C.T., Lee, K.K., and Krause, D.C. (1993) Transformation of *Mycoplasma pneumoniae* with Tn4001 by electroporation. *Plasmid* **30**: 170-175.
- Hegermann, J., Herrmann, R., and Mayer, F. (2002) Cytoskeletal elements in the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Naturwissenschaften* **89**: 453-458.
- Henderson, G.P., and Jensen, G.J. (2006) Three-dimensional structure of *Mycoplasma pneumoniae*'s attachment organelle and a model for its role in gliding motility. *Mol Microbiol* **60**: 376-385.
- Henderson, I.R., Owen, P., and Nataro, J.P. (1999) Molecular switches--the ON and OFF of bacterial phase variation. *Mol Microbiol* **33**: 919-932.
- Henrichsen, J. (1983) Twitching motility. *Annu Rev Microbiol* **37**: 81-93.
- Himmelreich, R., Hilbert, H., Plagens, H., Pirkel, E., Li, B.C., and Herrmann, R. (1996) Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* **24**: 4420-4449.
- Hirano, M., Anderson, D.E., Erickson, H.P., and Hirano, T. (2001) Bimodal activation of SMC ATPase by intra- and inter-molecular interactions. *Embo J* **20**: 3238-3250.
- Hirano, M., and Hirano, T. (2002) Hinge-mediated dimerization of SMC protein is essential for its dynamic interaction with DNA. *Embo J* **21**: 5733-5744.
- Hirano, T. (2006) At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 311-322.
- Hjorth, S.V., Bjornelius, E., Lidbrink, P., Falk, L., Dohn, B., Berthelsen, L., Ma, L., Martin, D.H., and Jensen, J.S. (2006) Sequence-based typing of *Mycoplasma genitalium* reveals sexual transmission. *J Clin Microbiol* **44**: 2078-2083.
- Horner, P.J., Gilroy, C.B., Thomas, B.J., Naidoo, R.O., and Taylor-Robinson, D. (1993) Association of *Mycoplasma genitalium* with acute non-gonococcal urethritis. *Lancet* **342**: 582-585.

- Hu, P.C., Schaper, U., Collier, A.M., Clyde, W.A., Jr., Horikawa, M., Huang, Y.S., and Barile, M.F. (1987) A *Mycoplasma genitalium* protein resembling the *Mycoplasma pneumoniae* attachment protein. *Infect Immun* **55**: 1126-1131.
- Hutchison, C.A., Peterson, S.N., Gill, S.R., Cline, R.T., White, O., Fraser, C.M., Smith, H.O., and Venter, J.C. (1999) Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome. *Science* **286**: 2165-2169.
- Iverson-Cabral, S.L., Astete, S.G., Cohen, C.R., Rocha, E.P., and Totten, P.A. (2006) Intrastrain heterogeneity of the *mgpB* gene in *Mycoplasma genitalium* is extensive in vitro and in vivo and suggests that variation is generated via recombination with repetitive chromosomal sequences. *Infect Immun* **74**: 3715-3726.
- Iverson-Cabral, S.L., Astete, S.G., Cohen, C.R., and Totten, P.A. (2007) *mgpB* and *mgpC* sequence diversity in *Mycoplasma genitalium* is generated by segmental reciprocal recombination with repetitive chromosomal sequences. *Mol Microbiol* **66**: 55-73.
- Janis, C., Lartigue, C., Frey, J., Wroblewski, H., Thiaucourt, F., Blanchard, A., and Sirand-Pugnet, P. (2005) Versatile use of *oriC* plasmids for functional genomics of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 2888-2893.
- Jarrell, K.F., and McBride, M.J. (2008) The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat Rev Microbiol* **6**: 466-476.
- Jenkins, C., Geary, S.J., Gladd, M., and Djordjevic, S.P. (2007) The *Mycoplasma gallisepticum* OsmC-like protein MG1142 resides on the cell surface and binds heparin. *Microbiology* **153**: 1455-1463.
- Jensen, J.S., Blom, J., and Lind, K. (1994) Intracellular location of *Mycoplasma genitalium* in cultured Vero cells as demonstrated by electron microscopy. *Int J Exp Pathol* **75**: 91-98.
- Jensen, J.S., Hansen, H.T., and Lind, K. (1996) Isolation of *Mycoplasma genitalium* strains from the male urethra. *J Clin Microbiol* **34**: 286-291.
- Jensen, J.S. (2004) *Mycoplasma genitalium*: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **18**: 1-11.
- Jensen, J.S., Bjornelius, E., Dohn, B., and Lidbrink, P. (2004) Use of TaqMan 5' nuclease real-time PCR for quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* DNA in males with and without urethritis who were attendees at a sexually transmitted disease clinic. *J Clin Microbiol* **42**: 683-692.
- Jensen, R.B., and Shapiro, L. (1999) The *Caulobacter crescentus* *smc* gene is required for cell cycle progression and chromosome segregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 10661-10666.
- Jones, S., and Thornton, J.M. (1997) Analysis of protein-protein interaction sites using surface patches. *J Mol Biol* **272**: 121-132.
- Jordan, J.L., Berry, K.M., Balish, M.F., and Krause, D.C. (2001) Stability and subcellular localization of cytoadherence-associated protein P65 in *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* **183**: 7387-7391.
- Jordan, J.L., Chang, H.Y., Balish, M.F., Holt, L.S., Bose, S.R., Hasselbring, B.M., Waldo, R.H., 3rd, Krunkosky, T.M., and Krause, D.C. (2007) Protein P200 is dispensable for *Mycoplasma pneumoniae* hemadsorption but not gliding motility or colonization of differentiated bronchial epithelium. *Infect Immun* **75**: 518-522.
- Kannan, T.R., and Baseman, J.B. (2000) Hemolytic and hemoxidative activities in *Mycoplasma penetrans*. *Infect Immun* **68**: 6419-6422.

IX. Bibliografia

- Kannan, T.R., and Baseman, J.B. (2006) ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin of *Mycoplasma pneumoniae* represents unique virulence determinant among bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 6724-6729.
- Kenri, T., Seto, S., Horino, A., Sasaki, Y., Sasaki, T., and Miyata, M. (2004) Use of fluorescent-protein tagging to determine the subcellular localization of *mycoplasma pneumoniae* proteins encoded by the cytdherence regulatory locus. *J Bacteriol* **186**: 6944-6955.
- King, K.W., and Dybvig, K. (1992) Nucleotide sequence of *Mycoplasma mycoides* subspecies *Mycoides* plasmid pKMK1. *Plasmid* **28**: 86-91.
- Kirchhoff, H., Boldt, U., Rosengarten, R., and Klein-Struckmeier, A. (1987) Chemotactic response of a gliding *Mycoplasma*. *Curr Microbiology* **15**: 57-60.
- Krause, D.C., Leith, D.K., Wilson, R.M., and Baseman, J.B. (1982) Identification of *Mycoplasma pneumoniae* proteins associated with hemadsorption and virulence. *Infect Immun* **35**: 809-817.
- Krause, D.C., and Balish, M.F. (2001) Structure, function, and assembly of the terminal organelle of *Mycoplasma pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **198**: 1-7.
- Krause, D.C., and Balish, M.F. (2004) Cellular engineering in a minimal microbe: structure and assembly of the terminal organelle of *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol* **51**: 917-924.
- Krunkosky, T.M., Jordan, J.L., Chambers, E., and Krause, D.C. (2007) *Mycoplasma pneumoniae* host-pathogen studies in an air-liquid culture of differentiated human airway epithelial cells. *Microb Pathog* **42**: 98-103.
- Lartigue, C., Glass, J.I., Alperovich, N., Pieper, R., Parmar, P.P., Hutchison, C.A., 3rd, Smith, H.O., and Venter, J.C. (2007) Genome transplantation in bacteria: changing one species to another. *Science* **317**: 632-638.
- Layh-Schmitt, G., and Herrmann, R. (1992) Localization and biochemical characterization of the ORF6 gene product of the *Mycoplasma pneumoniae* P1 operon. *Infect Immun* **60**: 2906-2913.
- Layh-Schmitt, G., Hilbert, H., and Pirkl, E. (1995) A spontaneous hemadsorption-negative mutant of *Mycoplasma pneumoniae* exhibits a truncated adhesin-related 30-kilodalton protein and lacks the cytdherence-accessory protein HMW1. *J Bacteriol* **177**: 843-846.
- Layh-Schmitt, G., and Harkenthal, M. (1999) The 40- and 90-kDa membrane proteins (ORF6 gene product) of *Mycoplasma pneumoniae* are responsible for the tip structure formation and P1 (adhesin) association with the Triton shell. *FEMS Microbiol Lett* **174**: 143-149.
- Layh-Schmitt, G., Podtelejnikov, A., and Mann, M. (2000) Proteins complexed to the P1 adhesin of *Mycoplasma pneumoniae*. *Microbiology* **146 (Pt 3)**: 741-747.
- Lluch-Senar, M., Vallmitjana, M., Querol, E., and Pinol, J. (2007) A new promoterless reporter vector reveals antisense transcription in *Mycoplasma genitalium*. *Microbiology* **153**: 2743-2752.
- Luo, D., Xu, W., Liang, G., Wang, S., Wang, Z., Bi, Z., and Zhu, W. (1999) Isolation and identification of *Mycoplasma genitalium* from high risk populations of sexually transmitted diseases in China. *Chin Med J (Engl)* **112**: 489-492.
- Lyon, B.R., May, J.W., and Skurray, R.A. (1984) Tn4001: a gentamicin and kanamycin resistance transposon in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet* **193**: 554-556.
- Lysnyansky, I., Ron, Y., Sachse, K., and Yogev, D. (2001) Intrachromosomal recombination within the *vsp* locus of *Mycoplasma bovis* generates a chimeric variable surface lipoprotein antigen. *Infect Immun* **69**: 3703-3712.

- Ma, L., and Martin, D.H. (2004) Single-nucleotide polymorphisms in the rRNA operon and variable numbers of tandem repeats in the lipoprotein gene among *Mycoplasma genitalium* strains from clinical specimens. *J Clin Microbiol* **42**: 4876-4878.
- Ma, L., Jensen, J.S., Myers, L., Burnett, J., Welch, M., Jia, Q., and Martin, D.H. (2007) *Mycoplasma genitalium*: an efficient strategy to generate genetic variation from a minimal genome. *Mol Microbiol* **66**: 220-236.
- Manhart, L.E., Critchlow, C.W., Holmes, K.K., Dutro, S.M., Eschenbach, D.A., Stevens, C.E., and Totten, P.A. (2003) Mucopurulent cervicitis and *Mycoplasma genitalium*. *J Infect Dis* **187**: 650-657.
- Manhart, L.E., Holmes, K.K., Hughes, J.P., Houston, L.S., and Totten, P.A. (2007) *Mycoplasma genitalium* among young adults in the United States: an emerging sexually transmitted infection. *Am J Public Health* **97**: 1118-1125.
- Manhart, L.E., Mostad, S.B., Baeten, J.M., Astete, S.G., Mandaliya, K., and Totten, P.A. (2008) High *Mycoplasma genitalium* organism burden is associated with shedding of HIV-1 DNA from the cervix. *J Infect Dis* **197**: 733-736.
- May, M., Papazisi, L., Gorton, T.S., and Geary, S.J. (2006) Identification of fibronectin-binding proteins in *Mycoplasma gallisepticum* strain R. *Infect Immun* **74**: 1777-1785.
- McBride, M.J. (2001) Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annu Rev Microbiol* **55**: 49-75.
- McBride, M.J. (2004) Cytophaga-flavobacterium gliding motility. *J Mol Microbiol Biotechnol* **7**: 63-71.
- Melby, T.E., Ciampaglio, C.N., Briscoe, G., and Erickson, H.P. (1998) The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes (SMC) and MukB proteins: long, antiparallel coiled coils, folded at a flexible hinge. *J Cell Biol* **142**: 1595-1604.
- Meng, K.E., and Pfister, R.M. (1980) Intracellular structures of *Mycoplasma pneumoniae* revealed after membrane removal. *J Bacteriol* **144**: 390-399.
- Mernaugh, G.R., Dallo, S.F., Holt, S.C., and Baseman, J.B. (1993) Properties of adhering and nonadhering populations of *Mycoplasma genitalium*. *Clin Infect Dis* **17 Suppl 1**: S69-78.
- Mignot, T. (2007) The elusive engine in *Myxococcus xanthus* gliding motility. *Cell Mol Life Sci* **64**: 2733-2745.
- Miyata, M., and Seto, S. (1999) Cell reproduction cycle of mycoplasma. *Biochimie* **81**: 873-878.
- Miyata, M., and Petersen, J.D. (2004) Spike structure at the interface between gliding *Mycoplasma* mobile cells and glass surfaces visualized by rapid-freeze-and-fracture electron microscopy. *J Bacteriol* **186**: 4382-4386.
- Miyata, M. (2008) Centipede and inchworm models to explain *Mycoplasma* gliding. *Trends Microbiol* **16**: 6-12.
- Morrison-Plummer, J., Lazzell, A., and Baseman, J.B. (1987) Shared epitopes between *Mycoplasma pneumoniae* major adhesin protein P1 and a 140-kilodalton protein of *Mycoplasma genitalium*. *Infect Immun* **55**: 49-56.
- Musatovova, O., Dhandayuthapani, S., and Baseman, J.B. (2003) Transcriptional starts for cytodherence-related operons of *Mycoplasma genitalium*. *FEMS Microbiol Lett* **229**: 73-81.
- Nakane, D., and Miyata, M. (2007) Cytoskeletal "jellyfish" structure of *Mycoplasma* mobile. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 19518-19523.

IX. Bibliografia

- Nakane, D., and Miyata, M. (2009) Cytoskeletal asymmetrical dumbbell structure of a gliding mycoplasma, *Mycoplasma gallisepticum*, revealed by negative-staining electron microscopy. *J Bacteriol* **191**: 3256-3264.
- Niki, H., Jaffe, A., Imamura, R., Ogura, T., and Hiraga, S. (1991) The new gene mukB codes for a 177 kd protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning of *E. coli*. *Embo J* **10**: 183-193.
- Niki, H., Imamura, R., Kitaoka, M., Yamanaka, K., Ogura, T., and Hiraga, S. (1992) *E. coli* MukB protein involved in chromosome partition forms a homodimer with a rod-and-hinge structure having DNA binding and ATP/GTP binding activities. *Embo J* **11**: 5101-5109.
- Noireaux, V., and Libchaber, A. (2004) A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 17669-17674.
- Noireaux, V., Bar-Ziv, R., Godefroy, J., Salman, H., and Libchaber, A. (2005) Toward an artificial cell based on gene expression in vesicles. *Phys Biol* **2**: P1-8.
- Ohtani, N., and Miyata, M. (2007) Identification of a novel nucleoside triphosphatase from *Mycoplasma mobile*: a prime candidate motor for gliding motility. *Biochem J* **403**: 71-77.
- Peterson, S.N., Bailey, C.C., Jensen, J.S., Borre, M.B., King, E.S., Bott, K.F., and Hutchison, C.A., 3rd (1995) Characterization of repetitive DNA in the *Mycoplasma genitalium* genome: possible role in the generation of antigenic variation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 11829-11833.
- Pich, O.Q., Burgos, R., Ferrer-Navarro, M., Querol, E., and Pinol, J. (2006a) *Mycoplasma genitalium* mg200 and mg386 genes are involved in gliding motility but not in cytoadherence. *Mol Microbiol* **60**: 1509-1519.
- Pich, O.Q., Burgos, R., Planell, R., Querol, E., and Pinol, J. (2006b) Comparative analysis of antibiotic resistance gene markers in *Mycoplasma genitalium*: application to studies of the minimal gene complement. *Microbiology* **152**: 519-527.
- Pich, O.Q., Burgos, R., Ferrer-Navarro, M., Querol, E., and Pinol, J. (2008) Role of *Mycoplasma genitalium* MG218 and MG317 cytoskeletal proteins in terminal organelle organization, gliding motility and cytoadherence. *Microbiology* **154**: 3188-3198.
- Pilo, P., Vilei, E.M., Peterhans, E., Bonvin-Klotz, L., Stoffel, M.H., Dobbelaere, D., and Frey, J. (2005) A metabolic enzyme as a primary virulence factor of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony. *J Bacteriol* **187**: 6824-6831.
- Pollack, J.D., Williams, M.V., and McElhaney, R.N. (1997) The comparative metabolism of the mollicutes (*Mycoplasmas*): the utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function in the smallest free-living cells. *Crit Rev Microbiol* **23**: 269-354.
- Popham, P.L., Hahn, T.W., Krebes, K.A., and Krause, D.C. (1997) Loss of HMW1 and HMW3 in noncytoadhering mutants of *Mycoplasma pneumoniae* occurs post-translationally. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 13979-13984.
- Pour-El, I., Adams, C., and Minion, F.C. (2002) Construction of mini-Tn4001tet and its use in *Mycoplasma gallisepticum*. *Plasmid* **47**: 129-137.
- Proft, T., and Herrmann, R. (1994) Identification and characterization of hitherto unknown *Mycoplasma pneumoniae* proteins. *Mol Microbiol* **13**: 337-348.
- Proft, T., Hilbert, H., Layh-Schmitt, G., and Herrmann, R. (1995) The proline-rich P65 protein of *Mycoplasma pneumoniae* is a component of the Triton X-100-insoluble fraction and exhibits size polymorphism in the strains M129 and FH. *J Bacteriol* **177**: 3370-3378.

- Proft, T., Hilbert, H., Plagens, H., and Herrmann, R. (1996) The P200 protein of *Mycoplasma pneumoniae* shows common features with the cytoadherence-associated proteins HMW1 and HMW3. *Gene* **171**: 79-82.
- Quinlan, D.C., and Maniloff, J. (1972) Membrane association of the deoxyribonucleic acid growing-point region in *Mycoplasma gallisepticum*. *J Bacteriol* **112**: 1375-1379.
- Razin, S. (1992) Peculiar properties of mycoplasmas: the smallest self-replicating prokaryotes. *FEMS Microbiol Lett* **79**: 423-431.
- Reddy, S.P., Rasmussen, W.G., and Baseman, J.B. (1995) Molecular cloning and characterization of an adherence-related operon of *Mycoplasma genitalium*. *J Bacteriol* **177**: 5943-5951.
- Reddy, S.P., Rasmussen, W.G., and Baseman, J.B. (1996) Isolation and characterization of transposon Tn4001-generated, cytoadherence-deficient transformants of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **15**: 199-211.
- Regula, J.T., Boguth, G., Gorg, A., Hegermann, J., Mayer, F., Frank, R., and Herrmann, R. (2001) Defining the mycoplasma 'cytoskeleton': the protein composition of the Triton X-100 insoluble fraction of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae* determined by 2-D gel electrophoresis and mass spectrometry. *Microbiology* **147**: 1045-1057.
- Renaudin, J., Marais, A., Verdin, E., Duret, S., Foissac, X., Laigret, F., and Bove, J.M. (1995) Integrative and free *Spiroplasma citri* oriC plasmids: expression of the *Spiroplasma phoeniceum* spiralin in *Spiroplasma citri*. *J Bacteriol* **177**: 2870-2877.
- Romero-Arroyo, C.E., Jordan, J., Peacock, S.J., Willby, M.J., Farmer, M.A., and Krause, D.C. (1999) *Mycoplasma pneumoniae* protein P30 is required for cytoadherence and associated with proper cell development. *J Bacteriol* **181**: 1079-1087.
- Rosengarten, R., Klein-Struckmeier, A., and Kirchhoff, H. (1988) Rheotactic behavior of a gliding mycoplasma. *J Bacteriol* **170**: 989-990.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Seto, S., Layh-Schmitt, G., Kenri, T., and Miyata, M. (2001) Visualization of the attachment organelle and cytoadherence proteins of *Mycoplasma pneumoniae* by immunofluorescence microscopy. *J Bacteriol* **183**: 1621-1630.
- Seto, S., and Miyata, M. (2003) Attachment organelle formation represented by localization of cytoadherence proteins and formation of the electron-dense core in wild-type and mutant strains of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* **185**: 1082-1091.
- Seto, S., Kenri, T., Tomiyama, T., and Miyata, M. (2005a) Involvement of P1 adhesin in gliding motility of *Mycoplasma pneumoniae* as revealed by the inhibitory effects of antibody under optimized gliding conditions. *J Bacteriol* **187**: 1875-1877.
- Seto, S., Uenoyama, A., and Miyata, M. (2005b) Identification of a 521-kilodalton protein (Gli521) involved in force generation or force transmission for *Mycoplasma mobile* gliding. *J Bacteriol* **187**: 3502-3510.
- Seybert, A., Herrmann, R., and Frangakis, A.S. (2006) Structural analysis of *Mycoplasma pneumoniae* by cryo-electron tomography. *J Struct Biol* **156**: 342-354.
- Simmons, W.L., Bolland, J.R., Daubenspeck, J.M., and Dybvig, K. (2007) A stochastic mechanism for biofilm formation by *Mycoplasma pulmonis*. *J Bacteriol* **189**: 1905-1913.

IX. Bibliografia

- Simms, I., Eastick, K., Mallinson, H., Thomas, K., Gokhale, R., Hay, P., Herring, A., and Rogers, P.A. (2003) Associations between *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis*, and pelvic inflammatory disease. *Sex Transm Infect* **79**: 154-156.
- Soppa, J., Kobayashi, K., Noirot-Gros, M.F., Oesterhelt, D., Ehrlich, S.D., Dervyn, E., Ogasawara, N., and Moriya, S. (2002) Discovery of two novel families of proteins that are proposed to interact with prokaryotic SMC proteins, and characterization of the *Bacillus subtilis* family members ScpA and ScpB. *Mol Microbiol* **45**: 59-71.
- Spormann, A.M. (1999) Gliding motility in bacteria: insights from studies of *Myxococcus xanthus*. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 621-641.
- Stemke, J.A.R.a.G.W. (1995) Measurement of Mollicute Growth by ATP-Dependent Luminometry. In *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*. Razin, S. and Tully, J.G. (eds). San Diego, California: Academic press, INC., pp. 65-71.
- Stevens, M.K., and Krause, D.C. (1991) Localization of the *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence-accessory proteins HMW1 and HMW4 in the cytoskeletonlike Triton shell. *J Bacteriol* **173**: 1041-1050.
- Stevens, M.K., and Krause, D.C. (1992) *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence phase-variable protein HMW3 is a component of the attachment organelle. *J Bacteriol* **174**: 4265-4274.
- Strunnikov, A.V. (2006) SMC complexes in bacterial chromosome condensation and segregation. *Plasmid* **55**: 135-144.
- Su, C.J., Chavoya, A., and Baseman, J.B. (1989) Spontaneous mutation results in loss of the cytoadhesin (P1) of *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Immun* **57**: 3237-3239.
- Su, H.C., Hutchison, C.A., 3rd, and Giddings, M.C. (2007) Mapping phosphoproteins in *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. *BMC Microbiol* **7**: 63.
- Svenstrup, H.F., Jensen, J.S., Gevaert, K., Birkelund, S., and Christiansen, G. (2006) Identification and characterization of immunogenic proteins of *Mycoplasma genitalium*. *Clin Vaccine Immunol* **13**: 913-922.
- Taylor-Robinson, D., Sobeslavsky, O., Jensen, K.E., Senterfit, L.B., and Chanock, R.M. (1966) Serologic response to *Mycoplasma pneumoniae* infection. I. Evaluation of immunofluorescence, complement fixation, indirect hemagglutination, and tetrazolium reduction inhibition tests for the diagnosis of infection. *Am J Epidemiol* **83**: 287-298.
- Taylor-Robinson, D., Gilroy, C.B., Horowitz, S., and Horowitz, J. (1994) *Mycoplasma genitalium* in the joints of two patients with arthritis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **13**: 1066-1069.
- Tully, J.G., Rose, D.L., Whitcomb, R.F., and Wenzel, R.P. (1979) Enhanced isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from throat washings with a newly-modified culture medium. *J Infect Dis* **139**: 478-482.
- Tully, J.G., Taylor-Robinson, D., Cole, R.M., and Rose, D.L. (1981) A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. *Lancet* **1**: 1288-1291.
- Tully, J.G., Rose, D.L., Baseman, J.B., Dallo, S.F., Lazzell, A.L., and Davis, C.P. (1995) *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium* mixture in synovial fluid isolate. *J Clin Microbiol* **33**: 1851-1855.
- Turner, L.R., Lara, J.C., Nunn, D.N., and Lory, S. (1993) Mutations in the consensus ATP-binding sites of XcpR and PilB eliminate extracellular protein secretion and pilus biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **175**: 4962-4969.

- Ueno, P.M., Timenetsky, J., Centonze, V.E., Wewer, J.J., Cagle, M., Stein, M.A., Krishnan, M., and Baseman, J.B. (2008) Interaction of *Mycoplasma genitalium* with host cells: evidence for nuclear localization. *Microbiology* **154**: 3033-3041.
- Uenoyama, A., Kusumoto, A., and Miyata, M. (2004) Identification of a 349-kilodalton protein (Gli349) responsible for cytoadherence and glass binding during gliding of *Mycoplasma mobile*. *J Bacteriol* **186**: 1537-1545.
- Uenoyama, A., and Miyata, M. (2005) Identification of a 123-kilodalton protein (Gli123) involved in machinery for gliding motility of *Mycoplasma mobile*. *J Bacteriol* **187**: 5578-5584.
- van der Woude, M.W., and Baumler, A.J. (2004) Phase and antigenic variation in bacteria. *Clin Microbiol Rev* **17**: 581-611, table of contents.
- Voelker, L.L., and Dybvig, K. (1996) Gene transfer in *Mycoplasma arthritidis*: transformation, conjugal transfer of Tn916, and evidence for a restriction system recognizing AGCT. *J Bacteriol* **178**: 6078-6081.
- Waldo, R.H., 3rd, and Krause, D.C. (2006) Synthesis, stability, and function of cytoadhesin P1 and accessory protein B/C complex of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* **188**: 569-575.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* **1**: 945-951.
- Webre, D.J., Wolanin, P.M., and Stock, J.B. (2003) Bacterial chemotaxis. *Curr Biol* **13**: R47-49.
- Weiner, J., 3rd, Herrmann, R., and Browning, G.F. (2000) Transcription in *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* **28**: 4488-4496.
- Weiner, J., 3rd, Zimmerman, C.U., Gohlmann, H.W., and Herrmann, R. (2003) Transcription profiles of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae* grown at different temperatures. *Nucleic Acids Res* **31**: 6306-6320.
- Willby, M.J., Balish, M.F., Ross, S.M., Lee, K.K., Jordan, J.L., and Krause, D.C. (2004) HMW1 is required for stability and localization of HMW2 to the attachment organelle of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* **186**: 8221-8228.
- Winner, F., Markova, I., Much, P., Lugmair, A., Siebert-Gulle, K., Vogl, G., Rosengarten, R., and Citti, C. (2003) Phenotypic switching in *Mycoplasma gallisepticum* hemadsorption is governed by a high-frequency, reversible point mutation. *Infect Immun* **71**: 1265-1273.
- Wolgemuth, C., Hoiczky, E., Kaiser, D., and Oster, G. (2002) How myxobacteria glide. *Curr Biol* **12**: 369-377.
- Woo, J.S., Lim, J.H., Shin, H.C., Suh, M.K., Ku, B., Lee, K.H., Joo, K., Robinson, H., Lee, J., Park, S.Y., Ha, N.C., and Oh, B.H. (2009) Structural studies of a bacterial condensin complex reveal ATP-dependent disruption of intersubunit interactions. *Cell* **136**: 85-96.
- Zusman, D.R., Scott, A.E., Yang, Z., and Kirby, J.R. (2007) Chemosensory pathways, motility and development in *Myxococcus xanthus*. *Nat Rev Microbiol* **5**: 862-872.