

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Departament de Microbiologia

Facultat de Biologia

**Regulació de l'expressió gènica a enterobactèries:
caracterització d'Ydgt, una nova proteïna de la
família Hha/Ymoa, i interaccions amb altres
proteïnes associades al nucleoide**

Sònia Paytubi Casabona

Tesi Doctoral

Barcelona, 2004

Els Drs. Antonio Juárez Giménez, Catedràtic de Microbiologia, i Cristina Madrid Xufre, Professora Associada, del Departament de Microbiologia de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona,

CERTIFIQUEN

Que el treball de recerca titulat "Regulació de l'expressió gènica a enterobactèries: caracterització d'YdgT, una nova proteïna de la família Hha/YmoA, i interaccions amb altres proteïnes associades al nucleoide" i presentat com a Tesi Doctoral per Sònia Paytubi Casabona, s'ha realitzat sota la nostra direcció al Departament de Microbiologia de la Facultat de Biologia, i que reuneix tots els requisits necessaris per optar al grau de Doctor en Biologia.

I per a que així consti, signem el present certificat amb data 6 de Febrer de 2004.

Dr. Antonio Juárez Giménez

Dra. Cristina Madrid Xufre

Programa de Doctorat: Microbiologia Ambiental i Biotecnologia.(Bieni 2000-2002)

AGRAÏMENTS

Ha arribat el moment dels agraïments...buuuuf!!!! Semblava la part més fàcil però crec que costarà... Han estat poc més de tres anys i mig de tesi, tot i que gairebé 8 anys des de que vaig arribar al Departament (tot i que intermitentment). En aquest temps he conegut a molta gent i he gaudit de la seva presència, però segur que m'oblidaré a algú. Demano perdó.

En primer lloc m'agradaria agrair al Dr. Antonio Juárez l'oportunitat que em va oferir per a realitzar aquesta tesi doctoral en el seu grup d'investigació. Igualment, voldria també agrair a la Dra. Cristina Madrid, tot l'esforç dipositat tant en el treball experimental, així com en la correcció d'aquesta memòria.

Tampoc hem vull oblidar de quines i quins heu estat els meus companys de treball durant tots aquests anys. Us vull agrair la paciència que heu tingut amb mi en certs moments (sobretot quan us esbroncava) i les "rises" que ens hem "pegat". En primer lloc la Cristina, la meva germana gran (tot i que jove, eh?) que sabia què dir-me en cada moment i animar-me quan més ho necessitava. Que dir de la meva Rosa, la bonica, sort n'he tingut de tu! La meva més gran confident del laboratori, la germana petita. Tampoc em puc oblidar de la Núria...que "las mata callando", la meva companya frontal de poiata de la que no puc dir més que bones paraules, espero que tingui molta sort amb tot, segur. També a la meva "tocaya", la Sònia (alias pica que picaràs colònies), tot i les nostres discrepàncies "futboleres" ha estat un plaer treballar amb tu. I l'Eva, el meu despertador "matutino", tot i els nostres piques, sempre disposada a ajudar. I els homes, és clar, que dir del nostre Parra? Quantes activitats hemolítiques junts, eh? Sempre amb idees brillants. És un plaer seguir compartint laboratori amb tu. I el pobre Nacho, el màrtir de les dones del laboratori... (tampoco te lo vayas a creer mucho, eh?). Ha estat genial treballar amb aquests "pedazo" d'amics! I com no, també voldria recordar a tots aquells amb els que en algun moment he coincidit en el laboratori i que heu estat de gran ajuda: la Sandra divertida com ningú, genial, l'Eli (alias ara no és el moment...) despistada però sempre riallera, el Toni, el Carles i la Mercedes.

M'agradaria agrair també a tots els professors del Departament de Microbiologia per ajudar-me sempre que ho he sol·licitat, especialment a la Josefina, al José María, al Patxi i a l'Albert Bosch. I als secretaris Manolo i Macu per la inestimable ajuda que sempre ofereixen, especialment també a l'Alberto. I la Rosario, que em feia més amenes les pesades a la "cuina" i la seva ajuda a trobar reactius i demés. També voldria agrair a el grup

del Dr. Joan Tomàs l'ajuda que ens m'heu ofert sempre que ho he necessitat. I en general a tot el Departament de Microbiologia, a qui hi ha estat i a qui encara hi és: Santi, el nostre home del dinars, gràcies per la teva generositat; Xavi i Jordi, los "veteranos", sempre ajudant a tothom; Marc, gràcies per les informacions atmosfèriques i politico-socials (deus tenir feina ara, eh?); Òscar, el nostre informàtic particular, que bona persona!; l'Olga, la viatgera incondicional; Teresa, Zaira, Susana, Cristina V., Glòria, Jorge, Quim, Marta, Cristian, Laura, Sílvia, Xavi V., Xavi B., Albert, Toni...

Agraeixo al grup del Dr. Abian de la Unitat d'Espectrometria de Masses Estructural i Biològica del CSIC l'oportunitat de realitzar els gels en dues dimensions. I als Dr. David Bellido i Dra. Eliandre de Oliveira de Servei de Proteòmica dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona l'ajuda amb l'anàlisi d'imatges dels 2D-PAGE i la seva ajuda en certs aspectes experimentals d'aquesta tesi.

Un agraïment mooooooolt i moooooolt gran va dirigit per als companys de calçotades, viatges, farres, gresca i xerinola. Quins rotllos ens hem aguantat els uns als altres, sort n'hem tingut de l'endogàmia de biòlegs... i pobres aquells que no ho eren... (oi Blanca?). El Parra, la Maria, la Blanca, l'Óscar el chulo, la Sara, el Pau, el Lorenzo, la Mar, la Patri Lanfri, el Gerlac, la Vero, el Jordi Pallàs, el Camilo, el Jordi Peig, l'Eva, l'Eulàlia, el Josep Maria, els futurs papa Rafa i mama Núria, l'Óscar Sanz, el Manzano i la Carol. MMMUUUUUAAAAA!!!!

I també un moltes gràcies pels meus amics de l'insti (i respectius), els de sempre, tot i no entendrem mai quan em preguntaven - i tu que dius que fas exactament amb les bacteries?- Pffffff. La Núria, el Gustave, el petit Ian, l'Anna, l'Adriana, la Marta, el Roger, el Joan i l'Aina. I a l'amiga de la infància, la Miriam. I com no, a la meva família de Dundee: José Ramon, Sònia, José, Ana, Elisa, Jérôme, Simon, Mercedes, Guada i Alfonso. Gràcies pel vostre suport.

A vosaltres papa i mama, perquè tot el que sóc i el que faig és fruit vostre, perquè m'ho heu donat tot. I especialment també al tete, iaies, avis i tiets tot el recolzament que m'heu ofert i la confiança que heu dipositat sempre en mi. Gràcies per tot. A la fi, gràcies a la Delia, al Mariano i al Carlos per la vostra ajuda.

I molt especialment a tu Luis, perquè m'has omplert d'energia i alegria sempre. Perquè has sigut un suport insubstituïble al llarg de tot aquest temps donant-me sempre tot l'ajut, l'estimació i la confiança que em calien. Perquè en moments baixos els teus missatges han sigut el teu regal diari i m'han fet recuperar el riure.

Als meus pares i al Luis.

Les cèl·lules bacterianes viuen una vida de respostes ràpides, de flexibilitat, d'ajust ràpid als canvis radicals del seu ambient, de manera semblant a la llei de la selva: cada bacteri tan sols mira per a sí mateix.

M. Hoagland

1. INTRODUCCIÓ 1

1.1 <u>REGULACIÓ AMBIENTAL DE L'EXPRESSION GÈNICA BACTERIANA I PROTEÏNES ASSOCIADAES AL NUCLEOIDE</u>	3
1.1.1. <u>FACTORS DE VIRULÈNCIA: REGULACIÓ EN RESPOSTA A ESTÍMULS AMBIENTALS</u>	3
1.1.1.1. <u>Ferro</u>	4
1.1.1.2. <u>Temperatura</u>	5
1.1.1.3. <u>Osmolaritat</u>	6
1.1.1.4. <u>Oxigen</u>	6
1.1.1.5. <u>pH</u>	7
1.1.2. <u>PROTEÏNES ASSOCIADAES AL NUCLEOIDE: IMPLICACIÓ EN LA REGULACIÓ DELS FACTORS DE VIRULÈNCIA</u>	7
1.2 <u>LA PROTEÏNA H-NS</u>	11
1.2.1. <u>CARACTERÍSTIQUES GENERALS</u>	11
1.2.1.1. <u>Domini N-terminal: oligomerització</u>	13
1.2.1.2. <u>Domini C-terminal: unió al DNA</u>	15
1.2.2. <u>LA PROTEÏNA H-NS ÉS UN MODULADOR DE L'EXPRESSION GÈNICA EN RESPOSTA A FACTORS AMBIENTALS</u>	17
1.2.3. <u>LA PROTEÏNA STPA, UN ANÀLEG A H-NS</u>	24
1.2.4. <u>INTERACCIONS DE LA PROTEÏNA H-NS AMB ALTRES PROTEÏNES</u>	26
1.3 <u>FAMÍLIA DE PROTEÏNES Hha/YmoA: ANÀLEGS DEL DOMINI AMINO-TERMINAL D'H-NS?</u>	28
1.3.1. <u>L'EXPRESSION DE LA TOXINA α-HEMOLISINA ESTÀ MODULADA PER LA PROTEÏNA HHA</u>	28
1.3.2. <u>HHA I YMOA FORMEN UNA FAMÍLIA DE MODULADORS GLOBAIS</u>	31

1.3.3.	<u>PROTEÏNES DE LA FAMÍLIA HHA/YMOA INTERACCIONEN AMB PROTEÏNES DE LA FAMÍLIA H·NS PER MODULAR L'EXPRESSIÓ GÈNICA</u>	33
1.3.4.	<u>ALTRES PROTEÏNES DE LA FAMÍLIA HHA/YMOA</u>	36
1.4.	<u>OBJECTIUS</u>	39
2. MATERIALS I MÈTODES		41
<hr/>		
2.1	<u>SOQUES BACTERIANES, BACTERIÒFAGS I PLÀSMIDS</u>	43
2.2	<u>MEDIS DE CULTIU I ANTIBIÒTICS</u>	46
2.2.1.	<u>MEDIS DE CULTIU</u>	46
2.2.2.	<u>ANTIBIÒTICS</u>	48
2.3	<u>MÈTODES MICROBIOLÒGICS</u>	50
2.3.1.	<u>ESTERILITZACIÓ</u>	50
2.3.2.	<u>MANTENIMENT DE MICROORGANISMES</u>	50
2.3.3.	<u>INOCULACIÓ I CULTIU DE MICROORGANISMES</u>	50
2.4	<u>MÈTODES DE TRANSFERÈNCIA GENÈTICA</u>	52
2.4.1.	<u>TRANSFORMACIÓ BACTERIANA</u>	52
2.4.1.1.	<u>Transformació de cèl·lules competents obtingudes mitjançant tractament amb CaCl₂</u>	52
2.4.1.2.	<u>Electroporació</u>	53
2.4.2.	<u>CURAT DE PLÀSMIDS</u>	54
2.4.3.	<u>CONJUGACIÓ</u>	54
2.4.3.1.	<u>Conjugació en medi sòlid</u>	54
2.4.3.2.	<u>Conjugació en medi líquid</u>	54
2.4.3.2.1.	Conjugació del plàsmid pOX38-Gen	54
2.4.3.2.2.	Conjugació del plàsmid R100-1	55
2.4.4.	<u>TRANSDUCCIÓ GENERALITZADA AMB EL BACTERIÒFAG P1vir</u>	56
2.4.4.1.	<u>Obtenció de lisats p1vir</u>	56
2.4.4.2.	<u>Titulació dels lisats p1vir</u>	56

2.4.4.3.	<u>Transducció amb p1vir</u>	57
2.5	<u>TÈCNiques DE MUTAGÈNESI</u>	58
2.5.1.	<u>INACTIVACIÓ DE GENS CROMOSÒMICS UTILITZANT FRAGMENTS DE PCR</u>	58
2.5.1.1.	<u>Generació del fragment de PCR</u>	58
2.5.1.2.	<u>Transformació a la soca d'<i>E. coli</i> pKD46</u>	58
2.5.1.3.	<u>Eliminació de la resistència a l'antibiòtic</u>	60
2.6	<u>TÈCNiques EXPERIMENTALS AMB DNA</u>	61
2.6.1.	<u>AÏLLAMENT DE DNA PLASMÍDIC</u>	61
2.6.1.1.	<u>Obtenció de preparacions de DNA plasmídic pel mètode de la lisi alcalina</u>	61
2.6.1.2.	<u>Tractament del DNA amb RNasa A</u>	62
2.6.1.3.	<u>Desproteïnització amb fenol:cloroform</u>	62
2.6.1.4.	<u>Aïllament de DNA plasmídic amb "kits"</u>	63
2.6.1.4.1.	Miniprep	63
2.6.1.4.2.	Midiprep	63
2.6.2.	<u>ÚS DÉNZIMS DE RESTRICCIÓ, LLIGACIÓ I MODIFICACIÓ</u>	63
2.6.3.	<u>AMPLIFICACIÓ DE FRAGMENTS DE DNA MITJANÇANT LA REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)</u>	64
2.6.4.	<u>SEQÜENCIACIÓ</u>	65
2.6.5.	<u>ELECTROFORESI DE DNA EN GELS D'AGAROSA</u>	66
2.6.5.1.	<u>Preparació del gel i tampons d'electroforesi</u>	66
2.6.5.2.	<u>Preparació de les mostres</u>	66
2.6.5.3.	<u>Marcadors de tamany molecular</u>	67
2.6.5.4.	<u>L'electroforesi</u>	67
2.6.5.5.	<u>Tinció de DNA amb Bromur d'etidi</u>	67
2.6.6.	<u>AÏLLAMENT DE BANDES DE DNA A PARTIR DE GELS D'AGAROSA: ELECTROELUCIÓ</u>	68
2.7	<u>TÈCNiques EXPERIMENTALS AMB RNA</u>	69
2.7.1.	<u>EXTRACCIÓ DEL RNA CEL·LULAR TOTAL</u>	69
2.7.1.1.	Extracció de RNA mitjançant fenol acídic calent	69

2.7.1.2.	Quantificació espectrofotomètrica del RNA	70
2.7.2.	<u>ELECTROFORESI DE RNA EN GELS D'AGAROSA I TINCIÓ AMB BROMUR D'ETIDI</u>	70
2.7.3.	<u>ASSAIG DE PROTECCIÓ EN FRONT LA RNasa ONE™</u>	71
2.7.3.1.	<u>Obtenció d'una sonda de cadena senzilla marcada amb ³²P</u>	71
2.7.3.1.1.	Preparació d'un motlle de DNA	71
2.7.3.1.2.	Síntesi <i>in vitro</i> de RNA dirigida per la RNA-polimerasa del bacteriòfag T7	71
2.7.3.2.	<u>Hibridació RNA-sonda radioactiva</u>	73
2.7.3.3.	<u>Assaig de protecció contra la RNasa ONE™</u>	73
2.7.3.4.	<u>Electroforesi de RNA en gels desnaturalitzants de poliacrilamida/urea i autoradiografia</u>	74
2.7.3.4.1.	Electroforesi	74
2.7.3.4.2.	Autoradiografia	75
2.7.4.	<u>ANÀLISI QUANTITATIU DEL RNA PER RT-PCR</u>	75
2.7.4.1.	<u>Digestió amb DNasa I</u>	75
2.7.4.2.	<u>RT-PCR</u>	76
2.8	<u>TÈCNiques EXPERIMENTALS AMB PROTEÏNES</u>	78
2.8.1.	<u>OBTENCIÓ D'EXTRACTES</u>	78
2.8.1.1.	<u>Obtenció d'extractes crus per French-Press</u>	78
2.8.1.2.	<u>Obtenció d'extractes per al rentat de sèrums immunes</u>	78
2.8.1.3.	<u>Fraccionament cel·lular</u>	79
2.8.1.3.1.	Fracció periplasmàtica	79
2.8.1.3.2.	Fracció citoplasmàtica	80
2.8.1.4.	<u>Obtenció d'extractes de la fracció externa per a la detecció d'α-hemolisina</u>	80
2.8.1.5.	<u>Obtenció d'extractes per a l'anàlisi electroforètica de 2D-PAGE</u>	81
2.8.1.6.	<u>Obtenció de proteïnes de membrana</u>	82
2.8.2.	<u>VALORACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNES PEL MÈTODE DE BRADFORD (MICROASSAIG)</u>	83
2.8.3.	<u>TÈCNiques D'ELECTROFORESI DE PROTEÏNES</u>	83

2.8.3.1.	<u>Gels de poliacrilamida</u>	83
2.8.3.1.1.	Gels de poliacrilamida en Tris-Glicina-SDS	84
2.8.3.1.2.	Gels de poliacrilamida en Tris-Tricina-SDS	85
2.8.3.1.3.	Gels de poliacrilamida en Tris-Glicina Gels nadius).....	87
2.8.3.2.	<u>Gels de 2D-PAGE</u>	87
2.8.3.2.1.	Primera dimensió.....	87
2.8.3.2.2.	Segona dimensió.....	88
2.8.3.2.2.1.	Preparació del gel	88
2.8.3.2.2.2.	Equilibrat de la tira	89
2.8.3.2.2.3.	Col·locació de la tira al gel	89
2.8.3.2.2.4.	Electroforesi	90
2.8.3.3.	<u>Marcadors de pes molecular</u>	90
2.8.3.4.	<u>Tinció de gels de proteïnes</u>	91
2.8.3.4.1.	Tinció de proteïnes amb Blau de Coomassie [®]	91
2.8.3.4.2.	Tinció de proteïnes amb Nitrat de Plata.....	91
2.8.3.4.3.	Tinció de proteïnes amb Nitrat de Plata (per a gels 2D-PAGE).....	92
2.8.4.	<u>VALORACIÓ D'ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES</u>	92
2.8.4.1.	Valoració de l'activitat hemolítica en la fracció externa	92
2.8.5.	<u>SOBRE-EXPRESSIONI DE PROTEÏNES</u>	93
2.8.5.1.	<u>Obtenció d'extractes</u>	93
2.8.5.2.	<u>Purificació per Ni-NTA agarosa (Qiagen)</u>	94
2.8.5.3.	<u>Dissociació de proteïnes unides</u>	95
2.8.6.	<u>SEQÜENCIACIÓ I IDENTIFICACIÓ DE PROTEÏNES</u>	95
2.8.6.1.	<u>Seqüenciació N-terminal per degradació d'Edman</u>	95
2.8.6.1.1.	Transferència de la proteïna a membrana PVDF	96
2.8.6.1.2.	Seqüenciació N-terminal	97
2.8.6.2.	<u>Identificació de proteïnes per Maldi-Tof</u>	97
2.8.6.2.1.	Digestió en gel	97
2.8.6.2.2.	Maldi-Tof.....	99
2.8.7.	<u>DETERMINACIÓ DE L'OLIGOMERITZACIÓ DE PROTEÏNES: ASSAIG DE CROSS-LINKING <i>in vivo</i></u>	99

2.8.8.	<u>AÏLLAMENT DE PROTEÏNES A PARTIR DE GEL DE POLIACRILAMIDA</u>	100
2.8.9.	<u>TÈCNiques D'IMMUNODETECCIÓ DE PROTEÏNES (WESTERN BLOTTING)</u>	101
2.8.9.1.	<u>Transferència de proteïnes a membrana per sistema semi-sec</u>	101
2.8.9.2.	<u>Immunodetecció i revelat colorimètric amb fosfatasa alcalina</u>	102
2.8.9.3.	<u>Immunodetecció i revelat quimioluminiscent pel sistema ECL™</u>	103
2.9	<u>OBTENCIÓ DE SÈRUMS IMMUNES</u>	105
2.9.1.	<u>OBTENCIÓ DE PROTEÏNA</u>	105
2.9.2.	<u>IMMUNITZACIÓ DEL CONILL</u>	105
2.9.3.	<u>OBTENCIÓ I RENTAT DEL SÈRUM</u>	105
2.10	<u>ANÀLISI DE LA FORMACIÓ DE BIOFILMS</u>	106

3. RESULTATS 107

3.1	<u>IDENTIFICACIÓ DE YDGT COM A ANÀLEG A LA PROTEÏNA HHA</u>	109
3.2	<u>CONSTRUCCIÓ DE SOQUES MUTANTS YDGT</u>	111
3.2.1.	<u>CONSTRUCCIÓ D'UN MUTANT 5K ydgT</u>	112
3.2.2.	<u>TRANSDUCCIÓ DE LA MUTACIÓ YDGT</u>	114
3.2.3.	<u>EFFECTE DE LES MUTACIONS SOBRE EL CREIXEMENT</u> ...	114
3.2.3.1.	Efecte de la temperatura en el creixement	114
3.2.3.2.	Efecte de l'osmolaritat en el creixement	116
3.3	<u>EFFECTE DE LA MUTACIÓ ydgT EN L'EXPRESSIÓ DE L'OPERÓ HEMOLÍTIC hly</u>	118
3.3.1.	<u>Valoració de l'activitat hemolítica</u>	120
3.3.2.	<u>Immunodetecció d'hemolisina</u>	121
3.3.3.	<u>Efecte de la temperatura i l'osmolaritat en la producció d'hemolisina en un fons genètic ydgT</u>	122

3.3.3.1.	Efecte de la temperatura en l'expressió de l'hemolisina.....	122
3.3.3.1.1.	Valoració de l'activitat hemolítica	123
3.3.3.1.2.	Immunodetecció de l'hemolisina externa total	124
3.3.3.2.	Efecte de l'osmolaritat	125
3.4	<u>ESTUDIS DE COMPLEMENTACIÓ DE LA MUTACIÓ <i>hha</i> PEL GEN <i>vdgT</i></u>	127
3.4.1.	<u>Construcció dels plàsmids pLG-<i>vdgT</i> i pUC-<i>vdgT</i></u>	127
3.4.2.	<u>Transformació dels plàsmids recombinants (pLG-<i>vdgT</i> i pUC-<i>vdgT</i>) a la soca Hha-3 (pANN202-312). Determinació de l'activitat hemolítica</u>	128
3.5	<u>EFFECTE DE LA MUTACIÓ <i>hha</i> SOBRE L'EXPRESSIÓ DEL GEN <i>vdgT</i></u>	130
3.6	<u>EFFECTE DE LES MUTACIONS <i>hha</i> I <i>vdgT</i> SOBRE L'EXPRESSIÓ DELS GENS <i>hns</i> I <i>stpA</i></u>	132
3.6.1.	<u>EFFECTE DE LES MUTACIONS <i>hha</i> I <i>vdgT</i> SOBRE L'EXPRESSIÓ DEL GEN <i>hns</i></u>	132
3.6.2.	<u>EFFECTE DE LES MUTACIONS <i>hha</i> I <i>vdgT</i> SOBRE L'EXPRESSIÓ DEL GEN <i>stpA</i></u>	135
3.7	<u>INTERACCIÓ DE LES PROTEÏNES YDGT I HHA AMB ALTRES PROTEÏNES</u>	138
3.7.1.	<u>CONSTRUCCIÓ DE LA PROTEÏNA RECOMBINANT HIS-YDGT</u>	138
3.7.2.	<u>SOBRE-EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ D'HIS-YDGT</u>	140
3.7.3.	<u>IDENTIFICACIÓ DE LA PROTEÏNA CO-PURIFICANT: H-NS</u>	141
3.7.4.	<u>EFFECTE DE LA FORÇA IÒNICA DEL MEDI SOBRE L'ESTABILITAT DEL COMPLEX HIS-YDGT-H-NS</u>	143
3.7.5.	<u>PURIFICACIÓ D'YDGT-HIS</u>	144
3.7.6.	<u>INTERACCIÓ D'HIS-YDGT AMB STPA</u>	145
3.7.6.1.	<u>Construcció de la soca BL21 (DE3) $\Delta hns::Tc^r$</u>	145
3.7.6.2.	<u>Unió d'un extracte cru sobre-expressat en His-YdgT amb un extracte cru sobre-expressat en StpA</u>	146

3.7.7.	<u>INTERACCIÓ D'HIS-YDGT AMB HHA</u>	148
3.7.8.	<u>INTERACCIÓ D'HIS-HHA AMB STPA</u>	149
3.8	<u>OBTENCIÓ D'UN SÈRUM PER A LA IMMUNODETECCIÓ DE LA PROTEÏNA YDGT</u>	151
3.8.1.	<u>PRODUCCIÓ I PURIFICACIÓ DE LA PROTEÏNA HIS-YDGT</u>	151
3.8.2.	<u>OBTENCIÓ D'ANTI-SÈRUM ANTI-YDGT</u>	151
3.9	<u>DETECCIÓ D'INTERACCIONS <i>in vivo</i> ENTRE LES PROTEÏNES YDGT, HHA I H-NS</u>	154
3.9.1.	<u>ANÀLISI D'OLIGÒMERS MITJANÇANT GELS NADIUS</u>	154
3.9.1.1.	<u>Anàlisi electroforètica en condicions nadiues de proteïnes purificades</u>	155
3.9.2.	<u>CROSS-LINKING <i>in vivo</i> I PURIFICACIÓ DELS OLIGÒMERS</u>	157
3.9.2.1.	<u>Anàlisi d'oligòmers His-YdgT-H-NS per immunodetecció</u>	157
3.9.2.2.	<u>Anàlisi d'oligòmers His-Hha-H-NS per immunodetecció</u>	158
3.10	<u>ESTUDI DE LA PLEIOTROPIA DE LES MUTACIONS <i>hha</i>, <i>ydgT</i> i <i>hha ydgT</i></u>	160
3.10.1.	<u>FRACCIONAMENT CEL·LULAR</u>	160
3.10.1.1.	<u>Efecte sobre proteïnes periplasmàtiques</u>	160
3.10.1.2.	<u>Efecte sobre proteïnes citoplasmàtiques</u>	161
3.10.1.3.	<u>Efecte sobre proteïnes de membrana externa</u>	162
3.10.2.	<u>IDENTIFICACIÓ DE LES PROTEÏNES PERIPLASMÀTIQUES I DE MEMBRANA EXTERNA</u>	163
3.10.2.1.	<u>Proteïnes periplasmàtiques</u>	163
3.10.2.2.	<u>Proteïnes de membrana externa</u>	164
3.10.3.	<u>ELECTROFORESI EN GELS DE DUES DIMENSIONS (2D-PAGE)</u>	164
3.10.4.	<u>ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE TRIPTOFANASA EN LES SOQUES BSN26, BSN26Y, BSN26H I BSN26HY</u>	171

3.10.5. <u>ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ D'OMPA EN LES SOQUES</u> <u>BSN26, BSN26Y, BSN26H, BSN26HY I BSN27</u>	174
4. DISCUSSIÓ	179
<hr/>	
4.1 <u>IDENTIFICACIÓ DE LA NOVA PROTEÏNA YDGT</u> <u>ANÀLOGA A LA PROTEÏNA HHA. EFECTE DE LA</u> <u>MUTACIÓ <i>vdgT</i> EN L'EXPRESSIÓ DE L'OPERÓ</u> <u>HEMOLÍTIC <i>hly</i></u>	181
4.2 <u>INTERACCIONS ENTRE LES PROTEÏNES YDGT,</u> <u>HHA, H-NS I STPA. FORMACIÓ D'HETERO-</u> <u>DIMERS</u>	185
4.3 <u>REGULACIÓ ENTRE LES PROTEÏNES HHA,</u> <u>YDGT, H-NS I STPA</u>	188
4.4 <u>PLEIOTROPIA DE LES MUTACIONS <i>hha, vdgT</i> I</u> <u><i>hha vdgT</i></u>	192
6. CONCLUSIONS	203
<hr/>	
7. BIBLIOGRAFIA	205
<hr/>	

1.1. REGULACIÓ AMBIENTAL DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA BACTERIANA I PROTEÏNES ASSOCIADES AL NUCLEOIDE

1.1.1. FACTORS DE VIRULÈNCIA: REGULACIÓ EN RESPOSTA A ESTÍMULS AMBIENTALS

Els microorganismes, especialment els patògens, no viuen i es reproduïen en un ambient constant, de manera que han desenvolupat estratègies que els permeten sobreviure i multiplicar-se en entorns canviants. Les bacteries han desenvolupat maneres d'adaptar-se als canvis ambientals i poder sobreviure en una gran varietat d'ambients. Una manera en que un microorganisme es pot adequar a un nou ambient és alterant el seu patró d'expressió gènica per tal que es sintetitzin els productes apropiats per a aquestes noves condicions, amb el resultat que l'organisme s'ajusta òptimament per a créixer i reproduir-se en aquest ambient. En els cas de les bacteries patògenes que presenten fases de vida lliure, són destacables les diferències en les condicions ambientals en que es troben entre les fases de vida lliure i les fases infectives associades a l'hoste. La patogenicitat bacteriana es defineix clàssicament com el conjunt de mecanismes bioquímics pels quals un microorganisme causa una malaltia (Smith, 1968; revisat a Wilson *et al.*, 2002). Els **factors de virulència** són elements de la cèl·lula bacteriana que formen part d'aquests mecanismes. Els factors de virulència clàssics no acostumen a ser components essencials de l'estructura o la funció cel·lular. Les toxines, factors d'adhesió, invasines o càpsules, responsables de fenotips complexos de virulència, són productes accessoris que generalment tenen poques funcions conegudes fora de la cèl·lula hoste. Rarament les bacteries patògenes els expressen constitutivament, ja que això representaria una despesa energètica important, i en canvi expressen únicament els gens apropiats a cada ambient determinat (revisat a Mahan *et al.*, 1996). En molts casos, els gens que codifiquen els factors de virulència estan regulats per factors ambientals. Molts dels paràmetres ambientals que afecten l'expressió dels factors de virulència ja han estat identificats: temperatura, osmolaritat, disponibilitat de ferro, pH, concentració iònica i nivells d'oxigen. Durant la patogènia, les bacteries estan contínuament monitoritzant el seu ambient i ajustant, en consonància, l'expressió dels gens de virulència..

No tots els factors de virulència confereixen a la bactèria un avantatge selectiu a la mateixa fase de la infecció o al mateix lloc anatòmic de l'hoste. És per això que l'expressió de certs factors de virulència ha d'estar modulada en resposta no només a senyals que els permetin detectar que han passat d'un estat lliure a un estat associat a l'hoste sinó també a senyals externs que es van trobant al llarg de la infecció. L'expressió de gens de virulència reflecteix la capacitat de la cèl·lula bacteriana de captar diferents estímuls, processar la informació i determinar una resposta que optimitzi l'adaptació de les cèl·lules a les noves condicions ambientals.

1.1.1.1 **Ferro**

El ferro és un element essencial per al creixement de totes les espècies bacterianes. Tot i ser un dels elements més abundants de l'escorça terrestre, degut a la seva baixa solubilitat no sol estar disponible per als éssers vius. En condicions aeròbiques i a pH neutre l'ió ferrós (Fe^{2+}) s'oxida i passa a l'estat fèrric (Fe^{3+}) que és insoluble. La quantitat de ferro lliure disponible per a la bactèria dins de l'hoste és extremadament baixa per al creixement normal de la bactèria, donat que aquest element es troba unit a diverses proteïnes intracel·lulars com l'hemoglobina, la ferritina, l'hemosiderina i la mioglobina, i a proteïnes extracel·lulars d'unió al ferro d'elevada afinitat com la lactoferrina i la transferrina. Molts bacteris tracten d'assegurar el seu subministrament de ferro en l'hoste secretant quelants del ferro d'elevada afinitat i de baix pes molecular, els sideròfors (enterobactina i aerobactina), capaços d'extreure el ferro unit a les proteïnes de l'hoste. Sembla ser que l'elevada afinitat de l'enterobactina permet a la bactèria obtenir ferro de la transferrina, mentre que la font de ferro de l'aerobactina són les cèl·lules de l'hoste. La capacitat per part dels bacteris de captar el ferro *in vivo* contribueix de manera important a la seva virulència ja que així es facilita el seu creixement en l'organisme hoste (revisat a Wooldridge i Williams, 1993).

Quan la bactèria detecta un nivell baix de ferro en l'ambient respon induint determinats factors de virulència. Per exemple, a *E. coli*, la toxina Shiga-like s'indueix en resposta a baixa disponibilitat de ferro (Weinstein *et al.*, 1988).

A *E. coli* i *Salmonella*, la regulació per ferro està mitjançada per la proteïna Fur (Ferric Uptake Regulator). L'apoproteïna Fur uneix Fe^{2+} com a cofactor, i aquest complex s'uneix a les "Fur-box" per regular negativament molts dels gens implicats en la captació

del ferro, així com també gens que codifiquen per a toxines com l'hemolisina, etc. La proteïna Fur, per tant, és un regulador important de la virulència (Stojiljkovic *et al.*, 1994).

1.1.1.2 Temperatura

La temperatura té un gran efecte en molts processos cel·lulars, per això els bacteris posseeixen diversos termo-sensors moleculars per tal d'ajustar-se a canvis en la temperatura. Els mecanismes de termo-sensibilitat encara no són prou clars però hi hauria tres factors indispensables: estat de superenrotllament del DNA, canvis en la conformació del mRNA i canvis en la conformació proteica (revisat a Hurme i Rhen, 1998).

El **superenrotllament** del DNA és un procés regulat pel balanç en l'activitat de dos enzims, la topoisomerasa I i la DNA girasa (o topoisomerasa II). En bacteris, canvis en el balanç d'ATP/ADP, osmolaritat ambiental, temperatura i anaerobiosi són, entre d'altres, factors que afecten el superenrotllament del DNA i consegüentment l'expressió gènica. La regulació de l'activitat d'alguns promotors bacterians en resposta a canvis en la temperatura té una clara correlació amb el grau de superenrotllament del DNA (Pruss i Drilica, 1989; Steck *et al.*, 1993). L'estructura del DNA és sensible a la temperatura, de manera que canvis en l'estat topològic del DNA poden permetre de manera més o menys efectiva la unió de proteïnes reguladores (Falconi *et al.*, 1998). D'altra banda, alteracions de la temperatura poden causar canvis en la conformació o propietats de determinades proteïnes reguladores alterant les seves habilitats per unir-se al DNA. És possible que les dues alternatives es produeixin simultàniament (revisat a Hurme i Rhen, 1998).

Pel que fa a la **maquinària traduccional**, han estat descrits diferents efectes sobre la traducció depenent de temperatura. Un d'ells és el canvi en la conformació de la seqüència de Shine-Dalgarno (Hoe i Goguen, 1993). Un possible mecanisme pel qual la temperatura regula la maquinària traduccional inclou canvis de conformació en el RNA o proteïnes ribosòmiques o simplement un canvi en la cinètica de traducció provocat per la temperatura (revisat a Hurme i Rhen, 1998).

La **conformació de proteïnes** també juga un paper indispensable en la termo-sensibilitat. S'han descrit els motius "coiled-coil" com a estructures versàtils usades en un gran nombre de proteïnes. Els "coiled-coil" poden ser descrits com els responsables de mantenir un equilibri entre monòmers desagrupats i oligòmers agrupats. Aquest equilibri és depenent tant de temperatura com de concentració. Així doncs, aquest motiu pot ser

utilitzat com a sensor de temperatura fins i tot quan la proteïna no és un regulador gènic (Hurme *et al.*, 1997; revisat a Hurme i Rhen, 1998).

La transició des d'ambients amb una temperatura sovint més baixa que la temperatura que es troba a l'interior de l'hoste fins a la d'aquest s'ha relacionat amb canvis en l'expressió de factors de virulència en diversos microorganismes patògens. La majoria de gens de virulència s'expressen de forma òptima a elevada temperatura, però existeixen alguns exemples en els que, contràriament, l'expressió es dona a baixa temperatura com és el cas dels gens de virulència que pertanyen al reguló ToxR de *Vibrio cholerae* (Gardel i Mekalanos, 1994).

1.1.1.3 Osmolaritat

L'osmolaritat és un altre dels factors ambientals que controlen l'expressió dels gens implicats en la virulència de diversos microorganismes patògens. Així com en el cas de la temperatura, en la regulació de l'expressió gènica davant alteracions en l'osmolaritat del medi que rodeja a la cèl·lula també està implicat el superenrotllament del DNA (Higgins *et al.*, 1988; Bhriain *et al.*, 1989; Graeme-Cook *et al.*, 1989; McClellan *et al.*, 1990; Hsieh *et al.*, 1991).

A *E. coli* han estat descrits alguns exemples de regulació per osmolaritat de l'expressió de gens implicats en les propietats adhesives. L'expressió de l'operó *sfa* que codifica l'adhesina fimbrial S, a més d'estar termoregulada, també varia en resposta a l'osmolaritat del medi de cultiu (Schmoll *et al.*, 1990; Morschhauser *et al.*, 1993). El mateix passa amb la producció de les fimbries I d'adherència agregativa de les *E. coli* enteroagregatives (AAF/I) (Nataro *et al.*, 1994), o l'expressió dels curlis que s'indueix a baixa osmolaritat (Olsén *et al.*, 1993). L'expressió de l'hemolisina d'*E. coli* també és dependent de l'osmolaritat (Mouriño *et al.*, 1994).

1.1.1.4 Oxigen

La tensió d'oxigen reduïda en l'hoste, així com els elevats nivells de CO₂, són importants senyals informatius per al patogen. Aquests senyals provoquen alteracions en l'expressió gènica essencials per a la patogènesi (Ernst *et al.*, 1990; Shimamura *et al.*, 1985).

En diversos patògens bacterians, la inducció *in vitro* de gens d'invasió a baixa concentració d'oxigen reflecteix la situació *in vivo* en la que els gens d'invasió s'han d'expressar, és a dir, l'ambient pobre en oxigen de la llum intestinal. Per exemple, a *Salmonella typhimurium*, les baixes concentracions d'oxigen indueixen l'habilitat de les bactèries a invair les cèl·lules de mamífer. Un dels gens implicats en la invasivitat sota condicions de baixa presió d'oxigen és el gen *orgA* (Oxigen-regulated gene). S'ha demostrat que mutants pel gen *orgA* són atenuats per a la virulència en el procés d'entrada a les cèl·lules intestinals (revisat a Mahan *et al.*, 1996).

1.1.1.5 pH

Sobreviure en ambients àcids pot tenir una rellevància clínica ja que els patògens entèrics han de passar a través de l'estómac a pH inferiors a 3 durant unes dues hores abans de la colonització de l'intestí. És per això que les bactèries també responen a canvis en el pH intern i extern ajustant l'activitat i síntesi de proteïnes associades a molts processos diferents, incloent la virulència. Segurament, en la majoria de casos, el patogen utilitza el pH característic d'un microambient de l'hoste com a un dels senyals que indueixen un repertori complet de gens apropiats.

L'antigen anomenat pH 6 de *Yersinia pestis*, codificat pel gen *psaA* i regulat pel gen *psaE*, es troba implicat en la patogènesi de la pesta bubònica. El gen *psaA*, que participa en l'expressió de fimbries, tant sols s'expressa si el pH del medi és inferior a 6,7 i la temperatura és superior a 37°C (Lindler *et al.*, 1990; Lindler i Tall, 1993).

1.1.2. PROTEÏNES ASSOCIADES AL NUCLEOIDE: IMPLICACIÓ EN LA REGULACIÓ DELS FACTORS DE VIRULÈNCIA

El DNA cromosòmic d'*Escherichia coli* és unes 1000 vegades més llarg que la cèl·lula bacteriana, per tant, és necessari l'empaquetament i la condensació d'aquest en una estructura tipus cromatina, és a dir, en el nucleoide bacterià. El nucleoide d'*Escherichia coli* és una estructura complexa que ha de reconciliar la necessitat d'empaquetar la gran quantitat de DNA amb el requeriment de la cèl·lula per replicar-se i regular l'expressió gènica en resposta a canvis ràpids de les condicions nutricionals i ambientals.

El nucleoide d'*E. coli* està organitzat en uns 50 dominis superenrotllats negativament i independents. El concepte de la subestructura de domini del nucleoide té un gran

significat biològic, ja que d'aquesta manera possibles canvis topològics en un domini no afecten la totalitat del cromosoma. Així, esdevé possible reparar, replicar o recombinar el DNA en un domini sense influenciar l'organització del DNA en d'altres dominis del mateix cromosoma (revisat a Pettijohn, 1996). El nivell de superenrotllament del DNA bacterià es manté principalment per l'acció coordinada de dues activitats: activitat DNA girasa (o topoisomerasa II) que introdueix superenrotllaments negatius i l'activitat DNA topoisomerasa I que elimina els superenrotllaments.

A més a més, la condensació del DNA implica la unió de diferents proteïnes. La composició proteica del nucleòide està dominada per les HLP (Histone-like Proteins) o proteïnes associades al nucleòide, un grup de petites però sovint abundants proteïnes d'unió al DNA. A diferència de les histones eucariotes, les proteïnes associades al nucleòide bacterià formen complexos inestables amb el DNA. Aquestes proteïnes poden alterar profundament l'estructura local o global del cromosoma.

Han estat descrites 12 proteïnes associades al nucleòide a *Escherichia coli* (revisat a Ali Azam i Ishihama, 1999). Les principals són HU (Heat-Unstable Nucleoid Protein), IHF (Integration Host Factor), H-NS (Histone-like Nucleoid-Structuring protein), StpA (Supressor of *td*-mutant phenotype A), i FIS (Factor for Inversion Stimulation). Cap d'aquestes proteïnes és essencial per a la viabilitat de la bactèria, tot i que certes combinacions de mutants poden ser molt perjudicials per a la cèl·lula i en alguns casos resulten letals (McLeod i Johnson, 2001).

L'associació d'aquestes proteïnes al nucleòide no només té funció estructural empaquetant el DNA i organitzant la cromatina bacteriana (Spassky *et al.*, 1984), sinó que també influeix en la replicació, recombinació, reparació, transposició i transcripció.

La composició d'aquestes proteïnes en el nucleòide varia depenent de les condicions de creixement cel·lular i de la fase de creixement, és per això que l'activitat del genoma varia depenent de les condicions de creixement (Almiron *et al.*, 1992).

Aquestes proteïnes actuen directa o indirectament, i sovint en combinació, per tal de controlar l'expressió d'una gran varietat de gens que són fonamentals per la viabilitat de la cèl·lula, com són els implicats en la síntesi proteica i el metabolisme. Les proteïnes HLPs també regulen altres gens importants, els quals varien la seva expressió en resposta a estímuls ambientals, com per exemple els que responen a canvis en la osmolaritat o la temperatura, així com també gens que afecten a la virulència (McLeod i Johnson, 2001).

Totes les proteïnes associades al nucleòide d'*Escherichia coli* mostren una unió al DNA no específica però amb una afinitat que manté un significat fisiològic (McLeod i

Johnson, 2001). Algunes però, mostren preferència per una particular seqüència o estructura del DNA, com H-NS o StpA, que s'uneixen preferencialment al DNA corbat.

La proteïna **HU** és una proteïna molt abundant (15.000-30.000 dímers per cèl·lula en fase exponencial), molt conservada entre les eubactèries i que sempre ha estat considerada com l'homòleg procariota de les histones eucariotes (Drlica i Rouvière-Yaniv, 1987). És un heterodímer format per dues subunitats intercanviables, HU- α i HU- β de 9,2 kDa i 9,5 kDa respectivament, molt similars entre elles (70%) a *E. coli*, *S. typhimurium*, *E. chrysanthemi*, *S. flexneri*. En d'altres espècies es tracta d'un homodímer (Oberto i Rouvière-Yaniv, 1996). *E. coli* té l'habilitat de variar la composició d'HU (α_2 o $\alpha\beta$ o β_2) al llarg de la fase de creixement. Aquests canvis en la composició d'HU semblen tenir conseqüències per la seva habilitat d'organitzar la cromatina bacteriana i influir l'expressió gènica (revisat a Dorman *et al.*, 1999). La proteïna HU està implicada per exemple en la regulació de l'operó *gal* (Lewis *et al.*, 1999). Fins al dia d'avui, no s'ha descrit cap gen implicat en la virulència que estigui regulat per HU.

FIS és una proteïna bàsica formada per dues subunitats iguals codificades pel gen *fis* (Thompson *et al.*, 1987) i es troba altament conservada en bacteries entèriques. Es tracta de la proteïna associada al nucleòide més abundant en cèl·lules d'*E. coli* en fase de creixement exponencial (20.000-40.000 còpies per cèl·lula). FIS regula l'expressió d'un elevat nombre de gens, tant per control directe a nivell de l'inici de la transcripció, com per efecte indirecte (Schneider *et al.*, 1999; Finkel i Johnson, 1992; Xu i Johnson 1995; González-Gil *et al.*, 1996). Actualment FIS està emergent com a regulador important de gens de virulència en patògens bacterians: promou la transcripció dels gens d'invasió de *Shigella flexnerii* (Falconi *et al.*, 2001), contribueix a la regulació dels gens de virulència a *Salmonella typhimurium* (Wilson *et al.*, 2001) i a *E. coli* enteropatogèniques (Goldberg *et al.*, 2001), i també està implicada en la formació de biofilms a *E. coli* enteroagregatives (Sheikh *et al.*, 2001).

La proteïna **IHF** està implicada en la integració i escissió de la proteïna integrasa λ tant *in vivo* com *in vitro*. És una proteïna bàsica, formada per heterodímers de les subunitats IHF α i IHF β codificades pels gens *himA* i *himD* respectivament, i abundant en fase estacionària primerenca (25.000-30.000 dímers per cèl·lula) (Ali Azam *et al.*, 1999). IHF afecta directa o indirectament, la transcripció d'uns 100 gens d'una àmplia gamma de funcions (Freundlich *et al.*, 1992; Goosen i van de Putte, 1995; revisat a McLeod i Johnson, 2001). D'entre aquests, hi ha exemples de gens relacionats amb la virulència

bacteriana. IHF regula positivament l'expressió de gens de virulència de *Shigella flexnerii* (Porter i Dorman, 1997), i també intervé en el control de l'expressió dels gens *spv* del plàsmid de virulència de *Salmonella typhimurium* (Marshall *et al.*, 1999)

Pel que fa a **H-NS**, intervé en el control d'un elevat nombre de gens a bacteries Gram-negatives. A *E.coli*, fins a un 5 % dels gens presenten una expressió depenent de la presència o absència d'H-NS (Schröder i Wagner, 2002, Hommais *et al.*, 2001). Donada la temàtica d'aquest treball, s'ha dedicat un capítol d'aquesta introducció a H-NS, així com també a StpA.

1.2. LA PROTEÏNA H-NS

1.2.1. CARACTERÍSTIQUES GENERALS

La proteïna H-NS o “Histone-like Nucleoid-Structuring protein” (també anomenada H1, *osmZ*, *bglY*, *drdX*, *pilG* i *virR*) fou descrita per primera vegada com el major component del nucleoide bacterià per Varhavsky *et al.* (1977) (per una revisió veure Schröder i Wagner, 2002). És una de les proteïnes associades al nucleoide d'Enterobacteriàcies més abundant (no ha estat descrita en bacteris Gram-positius). H-NS està implicada en la regulació de la virulència a soques d'*E. coli* uropatogèniques (Göransson *et al.*, 1990; White-Ziegler *et al.*, 1998; Madrid *et al.*, 2002a), soques d'*E. coli* enterotoxigèniques (Trachman i Maas, 1998), *Shigella flexneri* (Maurelli i Sansonetti, 1988; Dorman *et al.*, 1990; Dorman i Porter, 1998; Hromockyj *et al.*, 1992; Tobe *et al.*, 1993), *Salmonella typhimurium* (Harrison *et al.*, 1994), *Vibrio cholerae* (Nye *et al.*, 2000; Tendeng *et al.*, 2000) i a *Yersinia enterocolitica* (Nieto *et al.*, 2002). Fins ara, han estat descrites més de 20 proteïnes homòlogues a diferents organismes, altament conservades, íntimament relacionades i amb funcions reguladores molt similars.

Es tracta d'una proteïna termo-estable i petita (15,4 kDa i 136 aminoàcids) però abundant, ja que es troben aproximadament 20.000 còpies per cèl·lula, el que equivaldria a un dímer per cada 400 parells de bases de DNA (Spassky *et al.*, 1984; Higgins *et al.* 1990; Ussery *et al.*, 1994; Sondén i Uhlin, 1996). Cal remarcar que els nivells d' H-NS cel·lulars són crucials per a la seva funció. S'ha comprovat que en fase estacionària els nivells d'H-NS augmenten de 1,7 a 10 vegades segons l'autor (Spassky *et al.*, 1984; Dersch *et al.*, 1993 i Ueguchi *et al.*, 1993), tot i que altres treballs apunten la màxima expressió en fase exponencial (Hinton *et al.*, 1992; La Teana *et al.*, 1989; Free i Dorman, 1995; Ali Azam *et al.*, 1999). Pel que fa a la temperatura, H-NS s'expressa igual a 37°C que a 26°C (Göransson *et al.*, 1990). La proteïna d'H-NS es troba localitzada en tota l'àrea del nucleoide (Ali Azam *et al.*, 2000).

El gen que codifica per a H-NS és de còpia única, es localitza al minut 27,8 del cromosoma d'*E. coli*, es transcriu independentment dels gens que el flanquegen i autoregula la seva pròpia expressió per “feed-back” negatiu a nivell de la transcripció (Hulton *et al.*, 1990; Dersch *et al.*, 1993; Ueguchi *et al.*, 1993; Falconi *et al.*, 1993). Aquest

efecte és antagonitzat per FIS i CspA, altres proteïnes associades al nucleòide, tan per competició amb els mateixos llocs d'unió com per activació de la transcripció del gen *hns* (La Teana *et al.*, 1991; Falconi *et al.*, 1996). Alhora, H-NS i la seva proteïna homòloga StpA activen la transcripció de la proteïna FIS (Johansson *et al.*, 2000).

Tot i ser una proteïna associada al nucleòide, és una proteïna de caràcter neutre en contraposició a les histones eucariotes. Cal assenyalar però, que la proteïna H-NS existeix en tres isoformes amb punts isoelèctrics de 5,1, 6,5, i 7,5 (Spassky *et al.*, 1984) segurament degut a modificacions post-traduccionals (Atlung i Ingmer, 1997). Les quantitats relatives de les diferents isoformes presents depenen de la fase de creixement, però totes s'uneixen fortament al DNA (Spassky *et al.*, 1984). En canvi, la concentració relativa de cadascuna d'elles no depèn de factors ambientals com l'osmolaritat o la temperatura (Ussery *et al.*, 1994)

Aquesta proteïna exerceix un paper molt important en la regulació de l'expressió gènica i en l'estabilitat de la cromatina. La proteïna H-NS té la facultat d'unir-se a àcids nucleics, tant a DNA com a RNA (Friedrich *et al.*, 1988). Pel que fa al DNA, s'uneix preferentment a DNA de doble cadena corbat (Friedrich *et al.*, 1988; Bracco *et al.*, 1989, Yamada *et al.*, 1990; Yamada *et al.*, 1991; Owen-Hughes *et al.*, 1992) ja sigui DNA lineal o circular (Spassky *et al.*, 1984; Tupper *et al.*, 1994) i causa curvatures en el DNA no corbat (Lutch *et al.*, 1994; Spurio *et al.*, 1997). En cas que s'uneixi a DNA corbat, la proteïna actua com a factor de transcripció específic tot i que la unió no requereix l'existència de motius d'unió clàssics tan a nivell de la mateixa proteïna com del DNA al que s'uneix. Val la pena esmentar que la regió -35 anterior a molts promotors d'*E. coli*, sovint mostra curvatures intrínseques (Plaskon i Wartell, 1987). A vegades, però, aquesta regió es troba després del promotor i s'anomena DRE (Downstream Regulatory Element) com és el cas del gen *proU* regulat també per H-NS (Owen-Hughes *et al.*, 1992).

La proteïna consta de dos dominis estructurals independents, connectats per una regió d'unió petita però molt flexible (Smyth *et al.*, 2000). Aquests dos dominis corresponen al seu torn als dos dominis funcionals de la proteïna (Figura 1.2.1).

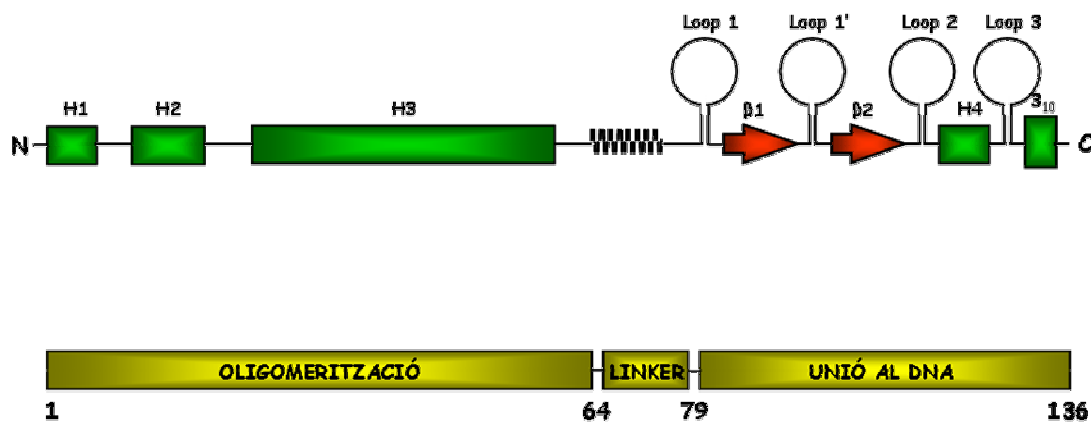


Figura 1.2.1. Elements estructurals d'H-NS. Representació esquemàtica dels elements estructurals identificats a H-NS. El domini d'oligomerització comprès entre els residus 1-64 conté tres regions α -hèlix (H1, H2 i H3). La regió d'unió (o "linker") entre els residus 69-79 està seguida del domini d'unió al DNA, comprès entre els residus 79 a l'extrem C-terminal de la proteïna. Les fletxes indiquen làmines- β i els rectangles estructures α -hèlix o α_{10} . Extret de Schröder i Wagner, 2002.

1.2.1.1. Domini N-terminal: oligomerització

El domini d'oligomerització de la proteïna H-NS es localitza a l'extrem N-terminal i inclou gairebé dos terços de la proteïna (64 aminoàcids) (Ueguchi *et al.*, 1996). Existeix una elevada conservació en la seqüència d'H-NS entre diferents espècies bacterianes, particularment pel que fa a la regió N-terminal.

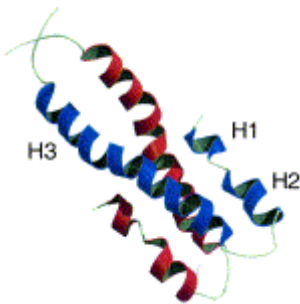


Fig. 1.2.2. Estructura tridimensional del domini N-terminal d'un dímer d'H-NS. Els dos protòmers es mostren en vermell i en blau respectivament. Les hèlix H1, H2 i H3 es mostren per a un protòmer en l'homodímer. Extret d'Esposito *et al.*, 2002.

Les formes oligomèriques de la proteïna contribueixen a la seva activitat biològica *in vivo*, és a dir, H-NS necessita formar oligòmers per a realitzar les seves funcions (Ueguchi *et al.*, 1997; Spurio *et al.*, 1997; Esposito *et al.*, 2002).

Aquest domini d'oligomerització mostra entre un 22 i un 29% d'identitat amb proteïnes estructurals com la miosina, queratina i distrofina, que formen una α -hèlix anfipàtica d'estructura "coiled-coil" (figura 2), fet que afavoriria l'oligomerització (Ussery *et al.*, 1994; Ussery *et al.*, 2001; Smyth *et al.*, 2000). L'estructura "coiled-coil" ha estat freqüentment identificada com a l'element d'oligomerització de molts factors de transcripció (Lupas, 1996). S'ha proposat que

aquesta estructura pot funcionar com a sensor de la temperatura. En aquests termes, s'ha descrit alguna proteïna que presenta dímers a baixa temperatura però no a 37°C (revisat a Hurme i Rhen, 1998). En aquesta estructura, la tercera α -hèlix (H3) en formaria el nucli i els residus de les hèlix H1 i H2 establirien interaccions amb el "coiled-coil" per tal d'estabilitzar-lo (Renzoni *et al.*, 2001; Bloch *et al.*, 2003). Per a cada monòmer, les hèlix 2 i 3 i el seu "linker" formarien una estructura en forma de U, amb l'hèlix 1 perpendicular al pla definit per les hèlix H2 i H3 (Bloch *et al.*, 2003). Els residus compresos entre els dominis d'oligomerització i d'unió al DNA o "linker" (aminoàcids compresos del 65 al 89) contribuirien a la formació d'estructures amb més grau d'oligomerització, des del trímer fins al 20àmer, sempre dependent de la concentració, temperatura i del tipus de cations del medi (Ceschini *et al.*, 2000, Smyth *et al.*, 2000). Per tant, hi hauria dos passos, un primer pas on es forma la unitat estructural (dímer o trímer segons l'autor) dependent de temperatura i concentració, i una posterior formació d'oligòmers en la que el número d'unitats augmenta amb la concentració. Les elevades concentracions d'H-NS a la cèl·lula doncs, es traduirien en la prevalença d'oligòmers d'elevat grau que facilitarien la compactació del DNA (Smyth *et al.*, 2000; Renzoni *et al.*, 2001; Badaut *et al.*, 2002).

La interacció de la proteïna amb el DNA té lloc en estat oligomèric després que monòmers d'H-NS s'associïn amb ells mateixos per formar dímers mitjançant interaccions hidrofòbiques (Falconi *et al.*, 1988). L'oligomerització i el domini d'oligomerització influeix positivament en la interacció específica d'H-NS amb el DNA i en la seva habilitat d'induir el doblegament del DNA (Spurio *et al.*, 1997).

L'estat oligomèric d'H-NS és incert, ja que existeix molta controvèrsia entre els diferents autors. Un dels models proposats suggereix que H-NS es troba predominantment formant dímers fins i tot a concentracions baixes ($\leq 10^{-9}$ M) tot i que a elevades concentracions ($\sim 10^{-4}$ M) presumiblement equivalents a les que es troben dins la cèl·lula, pot formar altres oligòmers, però sempre parells (Falconi *et al.*, 1988; Ueguchi *et al.*, 1996).

Recentment, Esposito *et al.* (2002), han proposat un model en el que la proteïna formaria homodímers com a primera unitat estructural i que a continuació formaria estructures de més alt grau oligomèric via estructura de cap-a-cua ("head-to-tail") on la regió C-terminal del domini d'oligomerització (hèlix H3) interacciona amb la regió N-terminal del domini d'oligomerització (hèlix H2) d'un altre homodímer (Esposito *et al.*, 2002) (Figura 1.2.4). Aquesta hipòtesi ha estat corroborada per Bloch *et al.* (2003), que a més afegixen altres dades: i) els 20 primers aminoàcids de l'extrem N-terminal serien els

responsables de la repressió/silenciament gènic. Aquest fet és atribuït a que mutacions en aquests aminoàcids provoquen una manca de capacitat de prosperar a estructures de més elevat grau d'oligomerització, modificar l'empaquetament del DNA i conseqüentment provocar repressió gènica. També s'ha observat que aquesta zona és de gran importància per la repressió gènica d'H-NS degut a la seva interacció directa amb el DNA. Aquesta regió doncs, contribuiria al reconeixement del DNA i més precisament, al reconeixement de seqüències corbades en el DNA, juntament amb el domini C-terminal d'unió al DNA; ii) els residus del 22 al 64 són necessaris en el procés de dimerització de la proteïna.

1.2.1.2. Domini C-terminal: unió al DNA

Shindo *et al.* (1999) van proposar com a domini d'unió al DNA la seqüència C-terminal, que comprèn des de l'aminoàcid 80 al 136.

Tot i que H-NS no té una seqüència específica d'unió, s'uneix preferentment a regions de curvatura del DNA. S'ha descrit que aquestes zones són riques en AT i generalment es troben properes o dins dels promotors (Yoshida *et al.*, 1993; Owen-Hughes *et al.*, 1992; Ueguchi i Mizuno, 1993; Ueguchi *et al.*, 1993). Però també són de vital importància per a la unió la flexibilitat del DNA i la distribució espacial dels llocs d'unió de la proteïna. Entre d'altres exemples ben caracteritzats, trobem el model de regulació de l'operó hemolític *hlyCABD* proposat per Madrid *et al.* (2002a), en el que H-NS s'uneix preferentment a dues regions separades per una zona que presenta curvatura intrínseca, i amb la participació de la proteïna Hha es forma un complex nucleoproteic que provoca l'oclusió de l'operó i conseqüentment la seva repressió.

El domini C-terminal existeix com a domini independent en el context de la proteïna intacte, no té cap contribució en l'oligomerització de la proteïna i pot rotar lliurement segurament degut al braç d'unió flexible entre ambdós dominis. Això permetria que el domini C-terminal adoptés les orientacions necessàries dins les diferents estructures oligomèriques per tal de poder interaccionar amb el DNA correctament (Smyth *et al.*, 2000).

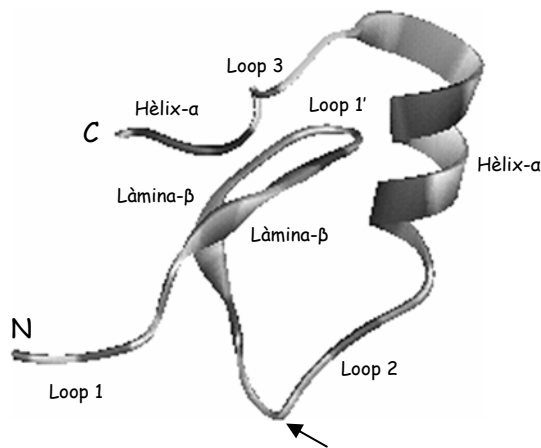


Figura 1.2.3. Estructura tridimensional de l'extrem C-terminal d'H-NS (del residu 91 al 136) obtingut per RMN. La fletxa indica la regió que comprèn els residus T107-P115. Extret de Shindo *et al.*, 1995.

El fet que el domini C-terminal per si tingui poca afinitat pel DNA (Shindo *et al.*, 1995), suggereix que molt probablement existeix un efecte cooperatiu d'unió de formes oligomèriques que portaria a una millora en l'afinitat. A més, degut a que la superfície que s'exposa en l'estructura "coiled-coil" del domini d'oligomerització conté predominantment càrregues negatives, tendiria a oposar-se al DNA, permetent així que l'extrem C-terminal hi interaccionés més fàcilment (Esposito *et al.*, 2002).

Es creu que les regions que formen el "loop" 2, entre les estructures

secundàries rígides (hèlix- α i làmina- β) estarien directament implicades en la unió al DNA (Shindo *et al.*, 1995). Tippner i Wagner (1995) van proposar el residu Trp109 (contingut en el "loop" 2) com a aminoàcid íntimament relacionat amb la interacció amb el DNA. L'estructura tridimensional (figura 1.2.3) de l'extrem carboxi-terminal d'H-NS va permetre visualitzar en el "loop" 2 una superfície protuberant (de l'aminoàcid 107 al 115) compatible amb la idea que aquesta regió està implicada amb la interacció amb el DNA (Ueguchi *et al.*, 1996). Aquesta regió correspondria al motiu TWTG-GR-P (revisat a Dorman *et al.*, 1999). Per altra banda, la regió que comprèn els aminoàcids del 80 al 96 és rica en aminoàcids bàsics (Lys i Arg). Aquesta regió, freqüentment trobada en proteïnes d'unió al DNA, ajuda en la interacció per contacte amb fosfats de la cadena de DNA, i a més es tracta d'una regió molt flexible. S'ha observat també, que després de la formació del complex amb el DNA s'indueixen estructures secundàries en el "loop" 1 (Shindo *et al.*, 1999). Spurio *et al.* (1997) van demostrar que existeix un residu de l'extrem C-terminal d'H-NS (Pro115) que està implicat en el reconeixement del DNA corbat i en produir curvatures en el DNA, fortament depenent de l'estat d'oligomerització d'H-NS.

El model d'interacció proposat per Esposito *et al.* (2002) permetria la formació d'un filament tipus bastó en el que els llocs d'unió al DNA podrien sobresortir gràcies a l'existència dels braços d'unió flexibles facilitant l'accés al DNA. H-NS seria així capaç de servir de pont entre dos dúplex de DNA i disposar-se paral·lelament amb el filament proteic actuant com una cremallera (Figura 1.2.4) (Schneider *et al.*, 2001; Dame *et al.*,

2002). D'aquesta manera formaria una estructura corbada en el DNA en forma de forqueta (Dame *et al.*, 2001).

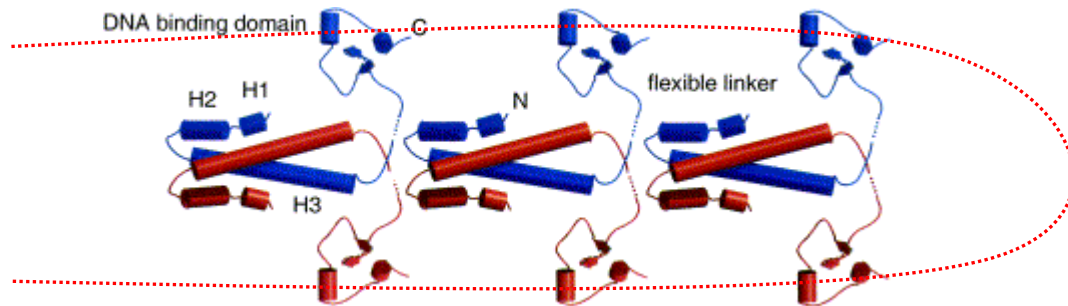


Figura 1.2.4. Model esquemàtic basat en la interacció cap-i-cua que té lloc per l'autoassociació dels dímers d'H-NS. Residus de l'extrem C-terminal del domini d'oligomerització interaccionen amb els residus de l'extrem N-terminal del domini d'oligomerització de l'altre homodímer formant així un filament proteic. El domini d'unió al DNA (C-terminal), s'extén des del filament sobre una regió flexible que permet la seva interacció amb el DNA (línia de punts). Extret d'Esposito *et al.*, 2002.

La unió al DNA però, no és suficient per a la repressió/silenciament transcripcional ja que com hem esmentat en l'apartat anterior, la seqüència N-terminal també és crucial per a aquesta funció (Ueguchi *et al.*, 1996; Esposito *et al.*, 2002; Bloch *et al.*, 2003).

1.2.2. LA PROTEÏNA H-NS ÉS UN MODULADOR DE L'EXPRESSION GÈNICA EN RESPOSTA A FACTORS AMBIENTALS

Han estat proposats dos mecanismes moleculars per a explicar la regulació de la transcripció per la proteïna H-NS. Aquests mecanismes, que no tenen perquè ser excloents, s'han descrit com silenciament transcripcional (Göransson *et al.*, 1990), i repressió via topologia del DNA (Hulton *et al.*, 1990, Tupper *et al.*, 1994; Jordi *et al.*, 1997).

En ambdós casos es produeix una **unió d'H-NS a llocs específics**, habitualment seqüències corbades relacionades amb algun promotor, produint-se una nucleació i polimerització de molècules d'H-NS al llarg de la seqüència de DNA (Williams i Rimsky, 1997). Aquest procés condueix al cobriment de 200-500 pb (Amit *et al.*, 2003), i és el responsable de la inhibició de l'activitat del promotor en qüestió (Figura 1.2.5).

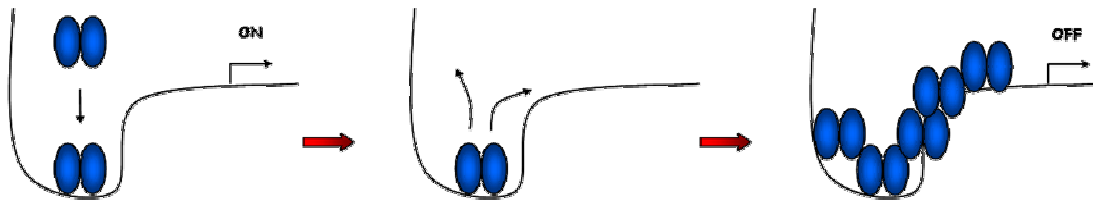


Figura 1.2.5. Diagrama que mostra el possible mecanisme de regulació de la transcripció per H-NS. Les molècules d'H-NS (en blau) es mostren interaccionant amb una regió promotora que conté DNA corbat. Es mostren les etapes de nucleació a una seqüència corbada relacionada amb algun promotor, reclutament d'altres molècules d'H-NS i la polimerització o propagació per tot el llarg de la cadena de DNA. Extret de Williams i Rinsky, 1997.

El model anomenat de silenciament transcripcional proposa que la formació del complex nucleoproteic impedeix la correcta unió de la RNA polimerasa, bé per captura o bé per oclusió del lloc d'unió (Lucht *et al.*, 1994, Falconi *et al.*, 1993). La figura 1.2.6 mostra un possible model de repressió transcripcional per H-NS. En aquest cas, la repressió causada pel complex nucleoproteic podria respondre a senyals de tipus ambiental, o a altres factors de transcripció (Dorman i Deighan, 2003). Aquest seria el model proposat per a la regulació del gen *virF* de *Shigella flexnerii* (Falconi *et al.*, 1998), o l'operó *hly* d'*E.coli* (Madrid *et al.*, 2002a).

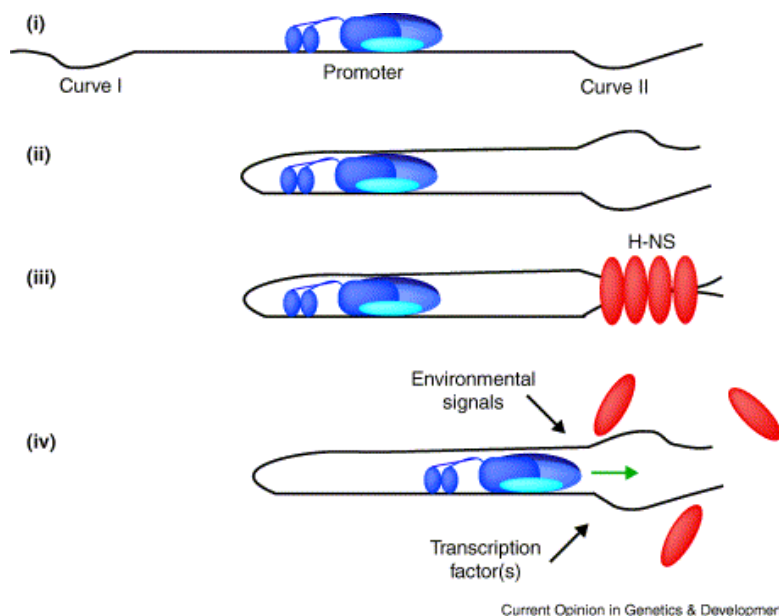


Figura 1.2.6. Repressió de la transcripció per H-NS. i) la seqüència d'unió de la RNA-polimerasa està flanquejada per regions de curvatures intrínseques, ii) el DNA embolcalla la RNA-polimerasa, proporcionant proximitat a les regions corbades, iii) H-NS s'uneix a les regions corbades donant com a resultat un complex nucleo-proteic que atrapa la RNA-polimerasa a l'estadi inicial de la transcripció, reprimint el promotor, iv) la formació del complex de repressió es desfà degut a senyals ambientals (com elevada temperatura) o per la intervenció de factors de transcripció activadors. Extret de Dorman i Deighan, 2003.

Per altra banda es proposa el model de repressió via topologia del DNA en el que els complexos H-NS-DNA produïrien un canvi conformacional a nivell local en el DNA, causant curvatures i impedit així la unió correcta al promotor d'altres proteïnes, factors de transcripció o la pròpia RNA-polimerasa (Hulton *et al.*, 1990). Està descrit que un augment en la flexibilitat del DNA pot promoure l'activitat d'un promotor (Collis *et al.*, 1989; Werel *et al.*, 1991). La unió d'H-NS podria provocar una disminució de la flexibilitat del DNA, fet que fa que el promotor es mantingui en una conformació relativament rígida de manera que no es pot dur a terme la transcripció del gen en qüestió. Per altra banda, sembla ser que H-NS pot constituir complexos específics en el DNA que invaeixen el promotor i eviten la formació d'un complex actiu eficient entre la RNA-polimerasa i la seqüència de DNA (Spassky *et al.*, 1984; Schröder i Wagner, 2000; Rimsky *et al.*, 2001; Caramel i Schnetz, 2000).

En qualsevol dels casos, els dos models no són excloents.

A més a més, cal tenir en compte que H-NS mostra una **unió no específica** al DNA, produint-se també un fenomen d'oligomerització cooperativa al llarg del DNA i jugant un paper important en la compactació del DNA (Figura 1.2.7). H-NS afecta al nivell de condensació del DNA *in vivo* i *in vitro* (Spurio *et al.*, 1992; Spassky *et al.*, 1984; Tupper *et al.*, 1994) i de fet, a cèl.lules que sobreexpressen H-NS es poden observar cromosomes extremadament compactats formant un nucli esfèric i cossos d'inclusió principalment en els pols de la cèl.lula (Spurio *et al.*, 1992). A més a més, H-NS mostra dues conformacions diferents, depenent de si s'uneix a seqüències específiques o inespecífiques, formant-se així diferents complexos H-NS/DNA (Tippner i Wagner, 1995). En aquest cas calen de 3 a 6 vegades més proteïna que en els models anteriors (Tupper *et al.*, 1994). Indirectament, doncs, H-NS pot regular la transcripció de promotors sensibles al superenrotllament a nivell de la topologia local del DNA. Degut que diferents promotors mostren diferents sensibilitats a canvis en el superenrotllament, l'efecte de la proteïna H-NS varia de gen a gen (Higgins *et al.*, 1990; Mojica i Higgins, 1997).

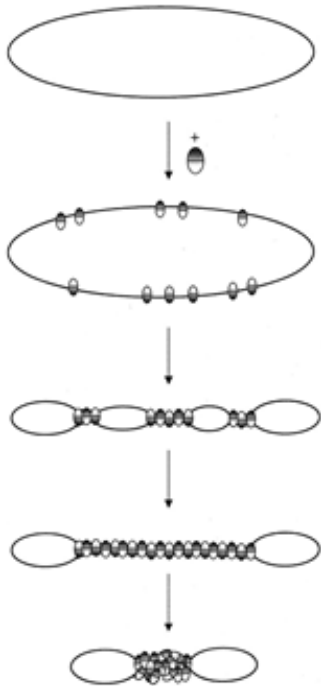


Figura 1.2.7. Model per a la condensació del DNA induïda per H-NS. Quan dos cadenes de DNA són suficientment properes, la proteïna unida a aquesta cadena forma un pont intramolecular. La formació dels primers punts provoca que més interaccions es puguin formar en les “bombolles” lliures cada cop més corbades. Conseqüentment, es produeix l'oligomerització per cooperativitat de molècules d'H-NS provocant un segon nivell de condensació. Les figures ovalades representen les unitats estructurals d'H-NS que exposen com a mínim 2 dominis d'unió al DNA. Extret de Dame *et al.*, 2000.

Canvis ambientals com l'osmolaritat, temperatura i anaerobiosi també poden alterar el superenrotllament del DNA *in vivo* i aquests canvis semblen ser els responsables, al menys en part, de la regulació de l'expressió gènica de determinats gens. Els canvis en el superenrotllament del DNA en resposta a canvis ambientals són ràpids i no semblen requerir de la síntesi proteica (Park *et al.*, 1989; McClelland *et al.*, 1990). Degut a que els nivells d'H-NS no varien sota diferents factors ambientals (Hulton *et al.*, 1990), possiblement es donen modificacions de la proteïna en resposta a estímuls externs (recordem les tres isoformes de la proteïna) que influïrien en la seva interacció amb el DNA o amb altres components de la cromatina i aquest fet provocaria canvis topològics i conseqüentment canvis en l'expressió gènica. Aquest fet també ha estat observat en les histones eucariotes en les que es donen fosforilacions reversibles i acetilacions que afecten la interacció entre elles i amb el DNA (Hill *et al.*, 1990; Norton *et al.*, 1989). A més, els motius “coiled-coil” indueixen la dissociació d'oligòmers en resposta a augments de temperatura o osmolaritat, el que suggereix que aquesta regió participa en la resposta d'H-NS a l'elevada temperatura i osmolaritat. És per aquesta raó que s'ha proposat que els canvis en l'estructura d'H-NS sota aquestes condicions eviten la polimerització d'H-NS al llarg del DNA (Amit *et al.*, 2003).

L'estudi del proteoma i del transcriptoma d'una soca salvatge i d'un mutant *hns* ha permès demostrar que l'expressió d'un 5% dels gens analitzats està directa o indirectament alterada en un mutant *hns* (Hommais *et al.*, 2001). D'aquests, un 35% està regulat per osmolaritat, temperatura, pH o la disponibilitat d'oxigen. Aproximadament un 20% dels gens H-NS-dependents estan implicats en la fase o en la taxa de creixement i codifiquen per proteïnes que constitueixen l'aparell transcripcional o traduccional. Per altra banda, un terç dels gens formen part de l'embolcall cel·lular o es creu que estan involucrats en l'adaptació de la bactèria a canvis en les condicions de l'ambient, és a dir, a gens associats a la resposta a l'estrès o a canvis ambientals com la temperatura, l'osmolaritat, canvis en el pH i en la disponibilitat d'oxigen. Aquests resultats reforcen la idea de la relació entre el reguló H-NS i el manteniment de l'homeòstasi intracel·lular (Laurent-Winter *et al.*, 1997; Hommais *et al.*, 2001).

En un mutant *hns* es dona una desrepressió de l'expressió d'aquests gens de 2 a 20 vegades (Atlung i Ingmer, 1997). És per això que a H-NS se l'anomena generalment repressor o silenciador, tot i que també es pot donar l'efecte contrari en d'altres gens, actuant com a activador, encara que en menys proporció (20%). A més de participar en la regulació ambiental, H-NS també juga un paper important en altres processos cel·lulars ("house-keeping"): mutants *hns* mostren unes freqüències de transposició alterades, delecions cromosòmiques i esdeveniments de recombinació il·legítims (Lejeune i Danchin, 1990; Falconi *et al.*, 1991). També està implicada en processos de replicació del cromosoma i en el cicle cel·lular d'*E. coli*, ja que mutants *hns* mostren ploïdia, és a dir, un nombre reduït d'origens de replicació per cèl·lula i un temps de replicació també disminuït. Aquest efecte és més sever a baixes temperatures. Segurament el mecanisme pel qual això es dona és degut a que H-NS d'alguna manera incrementaria indirectament l'activitat de la proteïna associada al nucleòide DnaA (Atlung i Hansen, 2002) que al seu torn està implicada en la replicació del DNA cromosòmic tant *in vivo* com *in vitro*.

El nivell d'actuació d'H-NS no solament és transcripcional sinó que també pot actuar a nivell post-transcripcional on juga un paper important en l'estabilitat del mRNA, en l'eficiència de la traducció i en la regulació del factor RpoS (Yamashino *et al.*, 1995; Deighan *et al.*, 2000; Barth *et al.*, 1995).

Una propietat remarcable d'H-NS, és l'habilitat de regular l'expressió de gens en resposta a diferents temperatures (Dersch *et al.*, 1994). Les funcions de virulència bacteriana sovint són regulades per factors ambientals acoblant així l'expressió gènica als canvis que es trobaran en el cos de l'hoste mamífer.

A continuació es citen alguns exemples clàssics de gens regulats per H-NS.

- **El gen *virF*:** Com ja hem esmentat anteriorment, H-NS és capaç de reprimir la transcripció de determinats gens en resposta a factors ambientals. Un exemple interessant és el promotor *virF* de *Shigella sp.* que s'activa a 37°C però és inactiu a baixes temperatures. El gen *virF* del plàsmid pINV de *Shigella* codifica per a un regulador transcripcional de la família AraC, i la seva expressió és necessària per a iniciar tota una cadena d'esdeveniments que resultaran en primer lloc en l'activació del gen *virB*, que posteriorment activarà diversos operons que codifiquen per a funcions invasores. Per tant, els nivells cel·lulars de VirF són crucials per a l'expressió del fenotip invasiu de *Shigella* i *E. coli* enteroinvasives (EIEC).

Falconi *et al.* al 1998, van demostrar que H-NS reprimeix la transcripció d'aquest gen per unió cooperativa a dues regions del DNA a una temperatura de 28°C però no a 37°C. Una d'aquestes regions es solapa amb el lloc d'unió de la RNA-polimerasa, mentre que l'altre es localitza 160 pb abans. Assajos de mobilitat electroforètica realitzats a diferents temperatures, juntament amb modelatge per ordinador, van permetre determinar l'existència d'una curvatura intrínseca entre els dos llocs d'unió d'H-NS situats en el promotor de *virF*, i segurament algun tipus de transició estructural que tindria lloc a 32°C antagonitza la unió de H-NS a ambdós llocs. Un mecanisme similar és el que es dona en altres promotors regulats per H-NS i per temperatura com és el cas de l'operó hemolític *hly* (Madrid *et al.*, 2002a), o *fimE* i *fimB* (Olsén *et al.*, 1998).

La influència negativa d'H-NS sobre el promotor *virF* és antagonitzada també per FIS, una altra proteïna associada al nucleòide.

- **L'operó *proU*:** La majoria de cèl·lules, tant procariotes com eucariotes, responen a l'estrès osmòtic de manera similar: acumulen elevades concentracions intracel·lulars d'un solut compatible per a contrarestar l'osmolaritat externa i per a restaurar la turgència. Un dels soluts compatibles més habitualment utilitzat és la glicina-betaïna (N,N,N-trimetil glicina), que juga un paper osmoprotector important en plantes, animals i bacteris. La glicina-betaïna acumulada no només serveix per a contrarestar l'osmolaritat externa sinó que també serveix per a protegir les proteïnes intracel·lulars de la desnaturalització per l'elevada força iònica. A *E. coli* i *S. typhimurium*, la glicina-betaïna només s'acumula en condicions d'estrès osmòtic. L'acumulació de glicina-betaïna és el resultat d'un augment de la captació des del medi extracel·lular. Les vies de captació en aquestes dues espècies d'enterobactèries són essencialment idèntiques. El gen *proU* codifica per a un sistema de

transport d'elevada afinitat de glicina-betaïna. L'expressió de *proU* està regulada molt finament per l'osmolaritat del medi, així doncs, a baixa osmolaritat no es dona pràcticament expressió i en canvi a elevada osmolaritat (500 mM) l'expressió d'aquest augmenta fins a 100 vegades. El senyal intracel·lular per a la inducció de *proU* són els ions K^+ que actuarien influint en la transcripció mitjançant alteracions en la conformació del DNA.

Mutacions en el gen *hns* permeten la desrepressió del gen *proU* a baixa osmolaritat (Higgins *et al.*, 1988). Aquest fet és degut a que a baixa osmolaritat (i per tant baixos nivells de K^+ intracel·lulars), H-NS funciona com a repressor transcripcional selectiu de *proU* inhibint les primeres fases de la transcripció (Ueguchi i Mizuno, 1993). La repressió de *proU* exercida per H-NS requereix d'una curvatura intrínseca del DNA localitzada a 200 pb en direcció a l'extrem 3' del lloc d'inici de la transcripció i dins del primer gen estructural de l'operó (DRE o “Downstream Regulatory Element”). Segurament aquesta regió DRE actua també com a sensor ambiental, és a dir, canvis en l'osmolaritat del medi indueixen canvis topològics en aquesta regió i així H-NS es pot unir per exercir la seva funció alterant la configuració del promotor i conseqüentment la transcripció (Jordi *et al.*, 1997).

• **L'operó *bgl*:** L'operó críptic *bgl* és un dels 4 sistemes d'utilització de β -glucòsids aromàtics present a *E. coli*. Concretament està implicat en la captació i el metabolisme de la salicina i l'arbutina (Prasad i Schaeffer, 1974.). L'operó *bgl* està silenciada en soques salvatges, almenys en condicions de laboratori, el que fa que les soques mostrin un fenotip β -glucòsid negatiu. L'expressió dels gens *bgl* està silenciada per diferents elements estructurals del DNA o pel repressor global H-NS, entre d'altres (Mukerjii i Mahadevan, 1997). Diverses mutacions espontànies desreprimeixen el silenciament del promotor *bgl*, entre elles mutacions en el gen *hns*. Una vegada activat, l'operó és induïble per salicina i arbutirina, i la transcripció està regulada per anti-terminació, amb la participació d'una proteïna d'unió a mRNA modulada per fosforilació (Houman *et al.*, 1990). És probable que totes aquestes mutacions activin l'expressió de l'operó impedit la formació del complex nucleoproteic, en el que H-NS és un component essencial, que reprimeix l'inici de la transcripció al promotor *bgl* sota condicions normals (Caramel i Schnetz, 2000).

1.2.3. LA PROTEÏNA StpA, UN ANÀLEG A H-NS

Al 1992, Zhang i Belfort van identificar un nou gen, *stpA* (supressor of *td* mutant phenotype A) que codifica la proteïna StpA amb capacitat de suprimir el fenotip Td⁻ dels fags T4 mutants defectius en el processament dels introns *td* (Zhang i Belfort, 1992). Posteriorment es va caracteritzar per la seva capacitat de complementar mutants *hns* (Shi i Bennett, 1994)

Aquesta proteïna comparteix un 58% d'identitat i un 67% de similitud a nivell de la seqüència proteica amb H-NS i s'ha descrit com el seu homòleg. El gen *stpA* es localitza al minut 60,24 del mapa genètic d'*E. coli* (Berlyn *et al.*, 1996) i codifica per a una proteïna termo-estable de 133 aminoàcids i 15,3 kDa de pes molecular (Zhang *et al.*, 1995). StpA és una proteïna molt més bàsica que H-NS, ja que front el pI teòric d'H-NS situat en 5,25, el pI teòric de StpA és de 9,08. De la mateixa manera que H-NS, StpA es localitza per tot el nucleoide (Ali Azam *et al.*, 2000) s'uneix al DNA corbat, influeix en la transcripció i té capacitat de compactar el DNA (Zhang *et al.*, 1996).

En un primer moment es va descriure la proteïna StpA com a proteïna amb activitat RNA xaperona *in vitro*, ja que facilita (per unió no específica al RNA) el correcte plegament de les molècules de RNA, promovent la seva associació i resolent les estructures del RNA mal plegades (Zhang *et al.*, 1995). Aquesta activitat resideix a l'extrem C-terminal de StpA (Cusick i Belfort, 1998). H-NS té una activitat xaperona de RNA *in vitro* clarament inferior a StpA (Zhang *et al.*, 1996).

L'expressió de la proteïna StpA està regulada per la fase de creixement. Els nivells de la proteïna a la cèl·lula es mantenen baixos a l'inici de la fase exponencial del creixement però augmenten un 50% en fases més tardanes de la fase exponencial, moment en el que assoleix els màxims nivells (Free i Dorman, 1997; Sonnenfield *et al.*, 2001).

El gen *stpA* està regulat negativament per H-NS i dèbilment expressat en condicions estàndard de laboratori. Quan la proteïna StpA és sobre-expressada, hi ha una decadència en la transcripció d'*hns*. Aquests fets indiquen que els dos gens exerceixen un control paral·lel i una regulació creuada simultània així com auto-regulació per tal de mantenir les concentracions apropiades d'ambdues proteïnes (Zhang *et al.*, 1996; Free i Dorman, 1997). A diferència de la proteïna H-NS, la transcripció del seu homòleg intraespècie (paràleg) StpA, està fortament condicionada a canvis ambientals. Això és degut a que el promotor de *stpA* és sensible als canvis en la topologia del DNA provocats per aquests canvis ambientals: s'indueix per xoc osmòtic i per canvis en la temperatura i es veu reprimida per

la manca de carboni en medi mínim. A més, la proteïna StpA està directament estimulada per la proteïna Lrp i inhibida en presència de leucina al medi de cultiu, indicant que la repressió per leucina es produeix via Lrp (Sondén i Uhlin, 1996). En el cas de StpA, no existeix una estimulació directa a través de la proteïna FIS, sinó més aviat indirecta causada via H-NS que al seu torn és regulada per FIS. A més d'aquests mecanismes de regulació, la bactèria té d'altres mecanismes per assegurar les correctes proporcions d'H-NS i StpA. StpA és un substrat de la proteasa Lon en mutants H-NS, és a dir, la proteasa Lon té l'habilitat de degradar StpA quan no està unida a H-NS (Johansson i Uhlin, 1999) ja que la protecció és mitjançada per la interacció directa entre StpA i H-NS (Johansson *et al.*, 2001). És per això que es conclou que la proteïna StpA existeix de forma predominant unida a H-NS formant heterodímers.

La proteïna StpA, de la mateixa manera que H-NS, també es comporta com un repressor transcripcional, tot i que StpA té una habilitat per competir amb la RNA-polimerasa durant la formació del complex transcripcional inferior a la que té H-NS (Rimsky *et al.*, 2001). La proteïna StpA pot actuar directa o indirectament sobre l'expressió de diversos gens reprimint, o fins i tot activant gens sempre regulats també per H-NS (p.ex. els operons *pap*, *hns*, *proU*, *bgl* i *malT*) (Sondén i Uhlin, 1996; Johansson *et al.*, 1998). Aquest fet indica que la funció de StpA és anàloga a H-NS, i tot i que sigui expressada a baixos nivells en condicions normals (200 còpies per cèl·lula). En un mutant *hns* la seva sobreexpressió (un 10% més de proteïna) proporciona suficient activitat com per substituir i complementar parcialment les funcions d'H-NS i controlar un gran nombre de gens, tot i que els nivells de la proteïna StpA en un fons *hns* no assoleixen mai els que té H-NS en una soca salvatge (Sonnenfield *et al.*, 2001). A més, l'expressió de *stpA* és reforçada sota condicions de creixement en medi mínim i sota canvis ambientals com temperatura i xoc osmòtic (Sondén i Uhlin, 1996; Free i Dorman, 1997). Però no només això, sinó que en d'altres casos la regulació és duta a terme exclusivament per la combinació d'ambdues proteïnes. Cal remarcar però, que no totes les proteïnes regulades per H-NS també ho són per StpA (Zhang *et al.*, 1996).

StpA, de la mateixa manera que H-NS però més activament, pot constrènyer superenrotllaments negatius *in vitro*. A més, ambdues proteïnes reconeixen les mateixes seqüències corbades del DNA amb la mateixa especificitat tot i que StpA s'uneix de 4 a 6 vegades amb més afinitat (Zhang *et al.*, 1996; Sonnenfield *et al.*, 2001). Ambdós fets indiquen que StpA és, com a mínim, tan potent com H-NS. Això suggereix que el paper

dominant d'H-NS és degut més al seu nivell d'expressió que a la seva activitat intrínseca (Zhang *et al.*, 1996).

1.2.4. INTERACCIONS DE LA PROTEÏNA H-NS AMB ALTRES PROTEÏNES

Es coneix que H-NS forma complexes amb diferents proteïnes, incloent Hfq, el producte gènic 5.5 del fag T7, la RNA-polimerasa, FIS, StpA i Hha.

La interacció entre Hfq i H-NS té una gran importància ja que Hfq ha estat descrita com a regulador post-transcripcional general. Ambdues proteïnes, juntament amb DsrA, juguen un paper important en la regulació de *rpoS* (Muffler *et al.*, 1996; Nogueira i Springer, 2000).

Liu i Richardson (1993) van descriure la interacció entre el producte gènic 5.5 del fag T7 i H-NS. Aquesta interacció suprimeix l'activitat inhibidora d'H-NS en la transcripció *in vitro* i *in vivo*.

La proteïna H-NS pot interaccionar específicament amb altres proteïnes de la cèl·lula, permanentment o de forma transitòria. La proteïna StpA, sota determinades circumstàncies, pot formar heterodímers amb H-NS i/o compensar parcialment la manca d'algunes funcions d' H-NS en mutants *hns* (Shi i Bennett, 1994) com en el cas de l'operó *bgl*, on StpA funcionaria com a restablidor de la funció d'unió al DNA en mutants derivats d'*hns* (Free *et al.*, 1998). La interacció entre ambdues proteïnes es produeix pel domini N-terminal d'H-NS (Williams *et al.*, 1996; Free *et al.*, 1998; Free *et al.*, 2001) tot i que d'altres autors proposen com a dominis d'interacció d'ambdues proteïnes la zona compresa entre els aminoàcids 39 i 60 i la porció de proteïna que es correspon des de l'aminoàcid 80 fins a l'extrem C-terminal (Johansson *et al.*, 2001). En aquest últim cas cabria la possibilitat que existissin diferències entre l'homodimerització d'H-NS i l'heterodimerització d'H-NS i StpA. Així, la possible interacció C-terminal entre H-NS i StpA alteraria l'habilitat d'aquestes proteïnes per unir-se al DNA, fet que provocaria un canvi en el motiu de DNA reconegut (Johansson *et al.*, 2001).

Com ja veurem en el següent capítol, el complexe Hha-H-NS-DNA està implicat en la termo i osmoregulació de l'expressió de l'operó *hly* d'*E.coli* (Nieto *et al.*, 2000).

A part d'aquests rols com a regulador de l'expressió gènica, també s'ha demostrat que H-NS interacciona directament amb la proteïna motora flagelar FliG. Aquesta interacció té una gran importància funcional per a l'activitat d'aquesta proteïna motora. La

unió entre ambdues proteïnes provoca un augment d'un 50% en la velocitat de rotació del flagel i l'hipermotilitat (Marykwas *et al.*, 1996; Donato i Kawula, 1998).

L'excel·lent capacitat d'H-NS no només a unir-se a àcid nucleic de diferents maneres sinó també a interaccionar amb una gran varietat de proteïnes reguladores li confereix una característica fonamental per a la versatilitat en les seves propietats reguladores.

1.3. LA FAMÍLIA DE PROTEÏNES Hha/YmoA: ANÀLEGS DEL DOMINI AMINO-TERMINAL D'H-NS?

1.3.1. L'EXPRESSIÓ DE LA TOXINA α -HEMOLISINA ESTÀ MODULADA PER LA PROTEÏNA HHA

L' α -hemolisina és una citotoxina extracel·lular considerada com a factor de virulència a *E. coli* ja que té la capacitat d'induir la disfunció cel·lular provocant la lisi de cèl·lules de mamífer (Suttorp *et al.*, 1990). Es tracta d'un dels pocs exemples coneguts de proteïnes secretades al medi extern per aquest microorganisme (Holland *et al.*, 1986). L' α -hemolisina no posseeix un pèptid senyal N-terminal (Gray *et al.*, 1989) i segueix un mecanisme de secreció independent de la seqüència senyal.

L'hemolisina d'*E. coli* pertany a una àmplia i estesa família de toxines citolítiques que es troben en bacteries Gram-negatives anomenada família RTX (Repeats in Toxin) (Welch *et al.*, 1981; Menestrina *et al.*, 1994). Dins d'aquesta família hi podem trobar entre d'altres, la leucotoxina (LktA) de *Pasteurella haemolytica* (Strathdee i Lo, 1987) i l'adenilat ciclase (CyaA) de *Bordetella pertussis* (Glaser *et al.*, 1988). Les toxines pertanyents a aquesta família comparteixen una sèrie de característiques com l'habilitat de formar porus, activitat leucotòxica, organització gènica comú i la presència d'una seqüència consens de 8 repeticions d'aminoàcids (repeticions RTX a la toxina).

Les soques d'*E. coli* hemolítiques contenen l'operó *hlyCABD* que es localitza tant a nivell cromosòmic com plasmídic (Müller *et al.*, 1993; Goebel *et al.*, 1974). Un exemple ben caracteritzat és el plàsmid pHly152 que pertany al grup d'incompatibilitat IncJ2 (Noegel *et al.*, 1981).

L'operó hemolític (o operó *hly*) té una mesura d'aproximadament 7 kpb (figura 1.3.1) i està format per 4 gens anomenats *hlyC*, *hlyA*, *hlyB* i *hlyD*. El gen *hlyC* codifica una proteïna de 170 aminoàcids (Juárez *et al.*, 1984). Aquesta proteïna, de localització citoplasmàtica, és la responsable de l'activació de la proteïna HlyA (Nicaud *et al.*, 1985). Aquesta activació és mitjançada per una acilació (Hardie *et al.*, 1991; Issartel *et al.*, 1991). A *hlyC* s'hi troba una seqüència d'uns 200 pb, *hlyM*, que participa en la modulació de l'expressió de l'hemolisina. La deleció d'aquesta seqüència augmenta l'expressió de l'operó hemolític, i s'ha postulat que aquest podria ser un lloc de regulació (Jubete *et al.*,

1995). El gen *hlyA* determina una proteïna precursora (pre-hemolisina) de 110 kDa. Immediatament després de la seva síntesi i activació, l'hemolisina s'exporta al medi extracel·lular mitjançant un senyal de secreció localitzat a l'extrem C-terminal d'HlyA (Koronakis *et al.*, 1989). El pèptid actiu es pot recuperar del sobrenedant del cultiu d'una soca productora d'hemolisina. Els productes dels gens *hlyB* i *hlyD* formarien un canal transmembrana per on passaria la proteïna HlyA activa (Felmlee *et al.*, 1985).

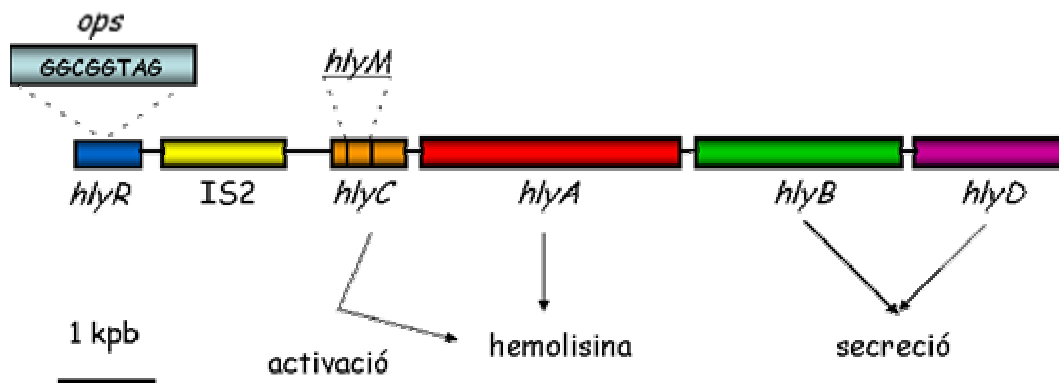


Figura 1.3.1. Estructura del determinant hemolític *hlyCABD* del plàsmid pHly152, on es pot veure representada tant la regió reguladora com la regió codificant de l'operó.

L'expressió de la toxina α -hemolisina d'*E. coli* està regulada per diferents condicions ambientals. La síntesi de la toxina es veu reprimida tant en condicions d'alta osmolaritat com de baixa temperatura i en anaerobiosi (Mouriño *et al.*, 1994). Les seqüències reguladores de l'operó *hly* no estan només restringides a la regió promotora. L'operó *hly* del plàsmid pHly152 inclou la seqüència *hlyR* (Vogel *et al.*, 1988). Es tracta d'una seqüència de 669 pb localitzada a uns 1,5 kpb abans del gen *hlyC*. Aquesta seqüència és essencial per a la correcta modulació de l'expressió de l'operó i tan sols pot actuar en *cis*. Deleccions d'aquesta seqüència causen una regulació artefactual provocant una repressió de l'expressió (Vogel *et al.*, 1988; Carmona *et al.*, 1993). Dins d'aquesta seqüència hi podem trobar l'element *ops* (Operon Polarity Suppressor) de 8 pb (Nieto *et al.*, 1996). L'element *ops* es troba amb freqüència en molts operons llargs d'espècies Gram-negatives, com és el cas d'aquells que codifiquen per al LPS, la síntesi de la càpsula i la fertilitat (Nieto *et al.*, 1996). És un element anti-terminador que es localitza a la seqüència no codificant anterior als operons. S'ha postulat que la seqüència *ops* podria actuar eliminant la polaritat de la transcripció dins els operons.

Entre les seqüències *hlyR* i *hlyC*, concretament a 467 pb de l'inici del gen *hlyC*, existeix la regió IS2 (Ghosal *et al.*, 1979). Aquesta seqüència no és necessària per a la correcta expressió de l'hemolisina, però segurament proporciona una distància adient entre la regió estimuladora i el lloc d'inici de la transcripció de l'operó *hly* (Vogel *et al.*, 1988).

La transcripció de l'operó *hlyCABD* produeix dos trànscrips diferents: un majoritari de 4,0 kpb (*hlyCA*) i un minoritari (*hlyCABD*). Tots dos s'inicien en el mateix promotor situat 400 pb davant del gen *hlyC*, però la transcripció és fortament polar, fenòmen accentuat per la formació d'una estructura corbada del DNA ("steam-loop") entre els gens *hlyA* i *hlyB* (Felmlee *et al.*, 1985; Welch i Pellett, 1988; Koronakis *et al.*, 1988). Segurament el trànscrip policistrònic *hlyACBD* s'origina en evitar-se la terminació de la transcripció que sovint té lloc en aquest terminador rho-independent, on *hlyR* hi juga un paper important (Hess *et al.*, 1986; Welch i Pellett, 1988; Koronakis *et al.*, 1988). A més, s'ha vist que existeixen diferències d'estabilitat entre els trànscrips, sent *hlyCA* més estable (Welch i Pellett, 1988; Koronakis *et al.*, 1988).

L'expressió de l'hemolisina és sensible al grau de superenrotllament del DNA. Així, la regulació dels gens *hly* en el plàsmid recombinant pANN202-312 és sensible a condicions que es coneix que causen relaxació del DNA o reducció del superenrotllament negatiu com la mutació *gyr*, la novobiocina i l'osmolaritat del medi (Carmona *et al.*, 1993).

S'han caracteritzat altres gens no pertanyents a l'operó *hly* que estan directa o indirectament relacionats amb la síntesi i secreció de l'hemolisina. El gen *tolC* intervé en la secreció de la toxina al medi extern (Wandersman i Delepelaire, 1990) i el producte del gen *rfaH* (també descrit com *hlyT* o *srfB*) ha estat caracteritzat com a activador transcripcional de la síntesi i secreció de la toxina (Bailey *et al.*, 1992).

El plàsmid pANN202-312 és el resultat del clonatge del determinant hemolític del plàsmid pHly152 al vector pACYC184, però sense la seqüència *hlyR* (Goebel i Hedgpeth, 1982). Malgrat l'augment en el número de còpies de l'operó, les cèl·lules portadores d'aquest plàsmid presenten una escassa producció d'hemolisina. Per tal de comprendre el mecanisme que fa que l'expressió d'*hly* es trobi reduïda en plàsmids que no contenen la regió reguladora, es va realitzar una mutagènesi a *Escherichia coli* a fi i efecte de cercar una mutació que compensés la manca de la seqüència *hlyR*. Així, el gen *hha* (High Hemolytic Activity) fou identificat en l'anàlisi de l'expressió de l'hemolisina en soques mutants d'*E. coli* portadores del plàsmid pANN202-312. La mutació del gen *hha* provoca la restauració dels nivells de producció d'hemolisina, tant a nivell extern com intern, que

s'esperaria degut a l'augment en la dosi gènica tot i l'absència de la regió reguladora. El fenotip dels mutants *hha* obtinguts per mutagènesi amb transposons, és similar al de les soques parentals portadores del plàsmid pANN202-312R (es tracta del plàsmid pANN202-312 més la regió *hlyR*). Aquests resultats indicaven que la mutació *hha* compensava l'absència de la seqüència *hlyR* al plàsmid pANN202-312. El gen *hha* es va mapar al minut 10,5 del cromosoma d'*Escherichia coli* (Godessart *et al.*, 1988; Nieto *et al.*, 1991).

Les soques d'*E. coli* mutants pel gen *hha* mostren un augment en la concentració d'hemolisina, tant citoplasmàtica com extracel·lular, degut a que aquesta mutació fa que augmenti la síntesi de la proteïna HlyA per un augment en els nivells del transcrit *hlyCA* mitjançant l'augment de la taxa de transcripció (Carmona *et al.*, 1993, Nieto *et al.*, 1991).

1.3.2. HHA I YMOA FORMEN UNA FAMÍLIA DE MODULADORS GLOBAIS

Hha és una proteïna de 72 aminoàcids i 8629 Da de pes molecular de. Té una elevada quantitat d'aminoàcids amb càrrega, fet que li confereix propietats hidrofíliques. A la proteïna li manquen seqüències consens específiques d'unió al DNA (Nieto *et al.*, 1991) tot i que a nivell estructural es tracta d'una proteïna amb motius hèlix-volta-hèlix típics d'altres proteïnes d'unió al DNA en bacteris (Figura 1.3.2) (Yee *et al.*, 2002).

La transcripció i expressió del gen *hha* mostra els nivells més elevats en fase exponencial i decreix quan les cèl·lules entren a la fase estacionària. És en la fase exponencial, quan les cèl·lules creixen activament, que l'osmolaritat del medi de creixement influeix en els nivells intracel·lulars d'Hha (Mouriño *et al.*, 1998).

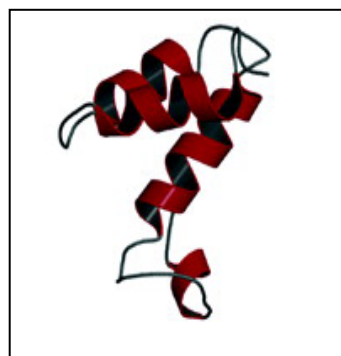


Figura 1.3.2. Estructura tridimensional de la proteïna Hha. En vermell s'indiquen les estructures α -hèlix. Extret de Yee *et al.*, 2002.

La proteïna Hha expressada en un vector de mitjà número de còpies estimula la transposició de les seqüències d'inserció (IS) a *E. coli* (Mikulskis i Cornelis, 1994).

Pel que fa als canvis en la topologia del DNA plasmídic, la mutació *hha* provoca l'aparició de topoisòmers més relaxats o una disminució en el superenrotllament negatiu (sobretot en plàsmids que contenen seqüències de l'operó *hly*). Al seu torn, la regulació dels gens *hly* és sensible a les condicions conegudes com a causants de la relaxació del DNA (p. ex. mutacions *gyr*, novobiocina o l'osmolaritat del medi). Aquests dos fets, evidencien que l'efecte de la mutació *hha* podria ser degut a alteracions en el grau del superenrotllament del DNA plasmídic (Carmona *et al.*, 1993, Mouriño *et al.*, 1996).

S'han descrit diversos gens que es veuen afectats per la mutació *hha*, i que es mostren a la taula 1.3.1.

Gen i/o Proteïna	Efecte	Referència
Operó <i>hlyCABD</i>	Increment en la síntesi d'hemolisina (HlyA)	Godessart <i>et al.</i> , 1988
Aerolisina d' <i>Aeromonas hydrophila</i>	Increment de la síntesi de la proteïna heteròloga a <i>E. coli</i>	Nieto <i>et al.</i> , 1987
Endoglucanasa de <i>Clostridium cellulolyticum</i>	Increment moderat de la síntesi de la proteïna heteròloga a <i>E. coli</i>	Blanco <i>et al.</i> , 1991
Toxina CNF2 (plàsmid Vir)	Increment de l'expressió depenent de temperatura	Mouriño <i>et al.</i> , 1996
Antígen de superfície (plàsmid Vir)	Increment de l'expressió depenent de temperatura	Mouriño <i>et al.</i> , 1996
<i>ompA</i> / OmpA	Repressió de l'expressió depenent d'osmolaritat	Balsalobre <i>et al.</i> , 1999
<i>crr</i> / IIA ^{Glc} del sistema PTS	Repressió de l'expressió depenent d'osmolaritat	Balsalobre <i>et al.</i> , 1999
<i>ahpC</i> / Alquil superòxid reductasa	Repressió de l'expressió depenent d'osmolaritat	Balsalobre <i>et al.</i> , 1999
<i>hila</i> de <i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium	Increment de la transcripció depenent d'osmolaritat i disponibilitat d'oxigen	Fahlen <i>et al.</i> , 2001

Taula 1.3.1. Gens o proteïnes afectats per la mutació *hha*.

La proteïna Hha mostra una elevada homologia (82%) amb la proteïna YmoA de *Yersinia enterocolitica* (De la Cruz *et al.*, 1992). La proteïna YmoA, de 8 kDa, es va

identificar com un modulador de l'expressió dependent de temperatura de diversos factors de virulència a *Y. enterocolitica*: les proteïnes Yop (Yersinia Outer Proteins) codificades pel reguló *yop*, i l'adhesina YadA (Yersinia Adhesin A) (Cornelis *et al.*, 1991). YadA és la principal adhesina de *Y. enterocolitica* implicada en la unió a cèl·lules eucariotes, i per tant en la colonització de l'intestí. L'adhesina YadA té també una funció protectora front l'acció bactericida del sèrum humà. A través de l'adhesió a la cèl·lula hoste mitjançada per YadA, la bactèria podrà alliberar les proteïnes Yop.

Tant el reguló *yop* com *yadA* es localitzen al plàsmid pYV, i en ambdós casos hi ha una regulació de l'expressió per temperatura (Cornelis *et al.* 1987; Cornelis *et al.*, 1989; Yother *et al.*, 1986). És a dir, la síntesi de les proteïnes Yop i de l'adhesina YadA es produeix a 37°C, però està reprimida a baixa temperatura. A mutants *ymoA*, la transcripció dels gens *yadA* i *yop* està desreprimida a baixa temperatura. A elevada temperatura, el nivell d'expressió d'aquests gens també està incrementat en mutants *ymoA* respecte a la soca salvatge (Cornelis *et al.*, 1991).

Tant mutants *hha* com mutants *ymoA* mostren un fenotip pleiotròpic: alteracions en el grau de superenrotllament de plàsmids, alteracions en la regulació de gens en funció de factors ambientals i un increment en la freqüència de transposició d'elements d'inserció (Cornelis *et al.*, 1991; Carmona *et al.*, 1993; Mouriño *et al.*, 1996; Mikulskis i Cornelis 1994; Balsalobre *et al.*, 1996). Aquest fenotip és similar al que presenten les cèl·lules amb nivells anormals de proteïna H-NS, de manera que es va suggerir que Hha i YmoA podrien ser representatives d'una nova família de proteïnes associades al nucleòide, que modulen l'expressió gènica per alteració de la topologia del DNA en resposta a estímuls ambientals (De la Cruz *et al.*, 1992). També s'ha demostrat que ambdues proteïnes són funcionalment intercanviables (Mikulskis i Cornelis, 1994; Balsalobre *et al.*, 1996), fet que confirma que les dues proteïnes són membres d'una nova família de reguladors de l'expressió gènica bacteriana.

1.3.3. PROTEÏNES DE LA FAMÍLIA HHA/YMOA INTERACCIONEN AMB PROTEÏNES DE LA FAMÍLIA H-NS PER MODULAR L'EXPRESSIÓ GÈNICA

La purificació de la proteïna Hha va permetre analitzar la seva capacitat d'unir-se al DNA. Es va poder demostrar que Hha s'uneix al DNA, utilitzant fragments de la regió reguladora de l'operó *hly*, però aquesta unió es produeix en molt baixa afinitat i calen grans quantitats de proteïna per a la formació dels complexos nucleoproteics (Nieto *et al.*, 2000).

El plantejament de que potser per a la regulació de l'operó *hly* era necessària la intervenció d'algun altre factor proteic a més d'Hha, o es requeria certa topologia de l'operó *hly in vivo*, va conduir a la realització d'estudis de la possible interacció d'Hha amb d'altres proteïnes. Es va demostrar que Hha interacciona fortament amb la proteïna H-NS. Així mateix, H-NS s'uneix al DNA de la regió reguladora de l'operó *hly*, i es va comprovar que els complexos formats amb el DNA en presència d'ambdues proteïnes eren diferents dels formats per cadascuna d'elles per separat. A més a més calen quantitats molt menors de proteïna H-NS que d'Hha per a la detecció dels complexos nucleoproteics (Nieto *et al.*, 2000).

El complex Hha-H-NS-DNA està implicat en la termo i osmoregulació de l'expressió de l'operó *hly*, ja que tant la mutació *hha* com la mutació *hns* causen una desrepressió parcial de l'expressió de l'hemolisina en condicions en que aquesta estaria reprimida (elevada osmolaritat i baixa temperatura), i aquesta desrepressió és màxima en el cas dels dobles mutants (Nieto *et al.*, 2000).

Recentment s'han determinat els llocs d'unió de la proteïna H-NS en la regió reguladora de l'operó *hly*. Un dels llocs (site I) es situa a la seqüència *hlyR*, mentre que l'altre (site II) cobreix parcialment la regió promotora de l'operó. Existeix una zona de curvatura intrínseca a la regió que separa els dos llocs d'unió de la proteïna H-NS (Madrid *et al.*, 2002a) (Figura 1.3.3).

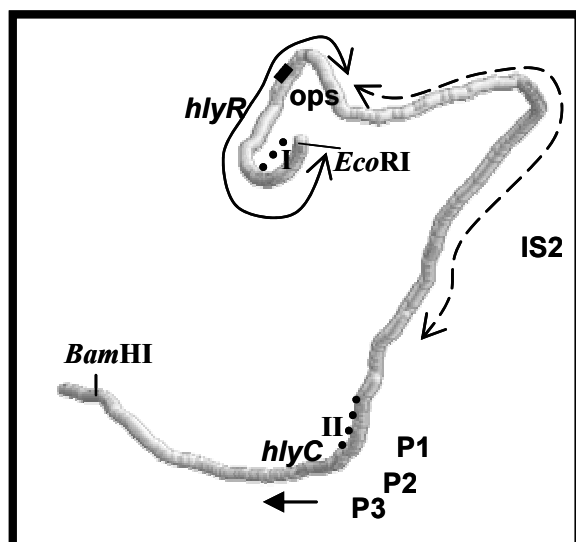


Figura 1.3.1. Predicció *in silico* de la curvatura de la regió reguladora de l'operó *hly*. I i II indiquen els llocs d'unió d'H-NS. Extret de Madrid *et al.*, 2002.

Aquest fet ja ha estat descrit a la regió anterior de gens sotmesos a repressió per H-NS, de manera dependent (*virF*) o independent (*cspA*) de la temperatura (Brandí *et al.*, 1999; Falconi *et al.*, 1998). A diferència del cas de *virF*, la distància entre els dos llocs

d'unió d'H-NS a la regió reguladora de l'operó *hly* és més gran, degut a la presència de la seqüència IS2. Encara no s'ha clarificat el paper de l'element IS2 en la regulació de l'expressió de l'operó *hly*.

La temperatura influeix en l'afinitat d'H-NS per les seves dianes (I i II) a la regió reguladora de l'operó de l'hemolisina (Madrid *et al.*, 2002a). L'afinitat que presenta la proteïna pel DNA és més elevada a baixa temperatura, fet que es correlaciona bé amb la més eficient repressió de la transcripció que causa H-NS a baixa temperatura i el fenotip mostrat per mutants *hns*.

Pel que fa a la proteïna Hha, sembla que en aquest model actuaria més com a proteïna d'unió a proteïna, que no pas com a proteïna d'unió al DNA.

Prenent totes les dades disponibles, el model proposat (Madrid *et al.*, 2002a) és que a baixa temperatura existeix una elevada afinitat d'H-NS per els seus llocs d'unió a la regió reguladora d'*hly*, provocant la formació de complexos nucleoproteïcs en els que també hi intervindria la proteïna Hha. A més, degut a un augment en la flexibilitat del DNA a baixa temperatura (com a conseqüència d'un augment en el grau de superenrotllament del DNA), les molècules d'H-NS localitzades a ambdós extrems del DNA farien contacte, juntament amb interaccions amb Hha, permetent la generació d'un complex nucleoproteïc major. Aquest complex provocaria l'oclusió tant de la seqüència *ops* com de la regió promotora, reprimint així la transcripció i abolint l'efecte anti-terminador provocat per l'element *ops*. A elevada temperatura l'efecte seria el contrari tot i que no es dona mai una aliviació total de l'expressió ja que existeix un balanç entre l'afinitat moderada d'H-NS pels seus llocs d'unió i l'efecte que provoca la temperatura en l'estructura i flexibilitat del DNA, és a dir, no es tracta d'un procés d'encès o apagat sinó d'una modulació. Aquest model és molt similar al proposat per la termoregulació de *virF* de *Shigella* (Falconi *et al.*, 1998).

La proteïna YmoA de *Y. enterocolitica* també interacciona amb H-NS d'*E.coli*, i mitjançant experiments de detecció d'interacció de proteïnes, s'ha identificat la proteïna H-NS de *Y. enterocolitica*, precisament per la seva unió a YmoA (Nieto *et al.*, 2002).

Per tant, possiblement el mecanisme de regulació de l'expressió gènica mitjançant complexos nucleoproteïcs entre membres de les famílies Hha/YmoA i H-NS es pot fer extensiu a altres gèneres de bacteris Gram-negatius.

Un estudi de diverses mutacions puntuals o delecions de la proteïna Hha ha demostrat que la totalitat de la proteïna és necessària per a la unió a H-NS (Nieto *et al.*, 2002). Per una altra banda, l'anàlisi de l'homologia entre seqüències d'aminoàcids de proteïnes de la família Hha/YmoA, amb el domini d'oligomerització d'H-NS, han permès

constatar que existeix un cert grau de similitud a nivell d'aminoàcids, a més de presentar una gran semblança en la mida. Aquest fet ha permès hipotetitzar que proteïnes de la família Hha/YmoA podrien ser considerades com a dominis d'oligomerització independents d'H-NS (Nieto *et al.*, 2002).

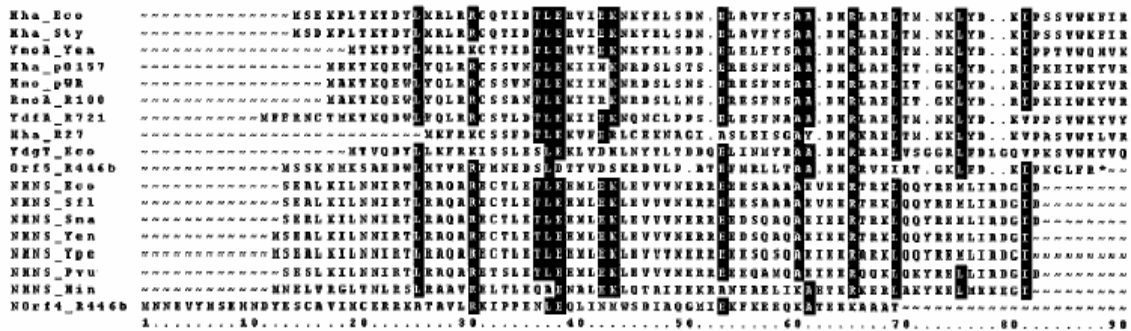


Figura 1.3.4. Comparació entre membres coneguts de la família de proteïnes Hha/YmoA i el domini d'oligomerització de membres de la família de proteïnes H-NS. Extret de Nieto *et al.*, 2002.

1.3.4 ALTRES PROTEÏNES DE LA FAMÍLIA HHA/YMOA

Recentment, han estat descrits altres membres de la família Hha/YmoA, codificats tant a nivell cromosòmic com plasmídic (revisat a Madrid *et al.*, 2002b).

Mitjançant la cerca d'homologies amb Hha/YmoA, es va trobar una regió propera a la regió distal del promotor de l'operó *tra* en el plàsmid R100 de *E. coli*, que contenia una ORF putativa amb elevada homologia a Hha i YmoA (Nieto i Juárez, 1996). La proteïna resultant d'aquest gen es va anomenar **RmoA**. La mutació *rmoA* causa un augment en la freqüència de conjugació del plàsmid R100 en condicions de baixa osmolaritat (Nieto *et al.*, 1998). Aquest fet suggeria que la proteïna RmoA podia actuar com a modulador de la transferència plasmídica en resposta a determinats factors ambientals així com l'osmolaritat. En realitzar estudis de complementació però, es va poder determinar que ni Hha ni RmoA tenen la capacitat de complementar recíprocament les funcions entre elles (Nieto *et al.*, 1998). També ha estat identificada la proteïna **RmoA** al plàsmid pCTX-M3 de *Citrobacter freundii*.

La publicació de la seqüència completa del genoma d'*E. coli* (Blattner *et al.*, 1997) ha permès identificar una hipotètica proteïna de 8,4 kDa, **YdgT**, que mostra un 38 % d'identitat i un 66 % de similitud a nivell d'aminoàcids amb la proteïna Hha, i que és objecte d'estudi en aquest treball. La posterior seqüenciació del genoma d'altres

microorganismes com *S. tify* (Parkhill *et al.*, 2001), *S. typhimurium* (McClelland *et al.*, 2001) i *S. flexneri* (Jin *et al.*, 2002) va permetre la identificació de la proteïna YdgT en altres enterobacteris.

La proteïna **Hha** també ha estat identificada al genoma de *Salmonella typhimurium*, i s'ha relacionat amb la seva virulència (Fahlen *et al.*, 2001; McClelland *et al.*, 2001). El fenotip invasiu de soques de *Salmonella* està regulat per condicions ambientals. El gen *hilA* es troba a l'illa de patogenicitat 1 (SPI-1) i codifica per un activador transcripcional que es requereix per a la invasió que està regulada ambientalment. Ha estat descrit que la proteïna Hha de *Salmonella* està implicada en la repressió del fenotip invasiu a través de la modulació en l'expressió d'*hilA* en resposta a senyals ambientals (Fahlen *et al.*, 2001). De nou, la seqüenciació del genoma complert de *S. tify* (Parkhill *et al.*, 2001) i *S. flexneri* (Jin *et al.*, 2002) també ha permès identificar Hha en aquests microorganismes.

El plàsmid R446 d'*E.coli* conté l'**Orf5**, implicada en l'expressió dependent de temperatura d'un pili conjugatiu (Tietze i Tschäpe, 1994). La seqüència de la proteïna codificada per *orf5* presenta homologia amb la proteïna Hha (Nieto i Juárez, 1996). Aquesta seqüència està situada just abans i lleugerament superposada a l'*orf4*, que presenta homologia amb la família de proteïnes H-NS. Ambdues proteïnes es transcriuen en la mateixa direcció (Nieto i Juárez, 1999).

A l'illa de patogenicitat SRL de *S.flexneri* s'ha identificat una pauta oberta de lectura corresponent a un homòleg de la família de proteïnes Hha/YmoA, es tracta de l'**Orf40** (Luck *et al.*, 2001).

La disponibilitat de la seqüència complerta de DNA del plàsmid de virulència **pO157** d'*E.coli* O157:H7 ha permès la identificació de l'homòleg de la proteïna Hha en aquest plàsmid (Burland *et al.*, 1998). Altres homòlegs s'han identificat a diferents plàsmids, com és el cas de la proteïna **YdfA** del plàsmid R721 d'*E.coli* (Kim i Komano, 1992), l'homòleg codificat en el plàsmid **pCHM1** de *S. tify* (Parkhill *et al.*, 2001) i l'**orf21** del plàsmid pACM1 de *K. oxytoca* (Preston *et al.*, 2000).

Recentment, ha estat identificat en el plàsmid de virulència pWR501 de *Shigella flexnerii* un altre membre de la família de proteïnes Hha/YmoA, la proteïna codificada pel gen **hmo**, descrita com a regulador putatiu (Venkatesan *et al.*, 2001).

En el plàsmid **R27** de resistència a antibiòtic de *Salmonella typhi* també s'ha descrit un altre membre de la família Hha/YmoA, així com també un homòleg d'H-NS (Sheburne *et al.*, 2000).

A la figura 1.3.5 es comparen les seqüències d'aminoàcids entre els diferents membres de proteïnes de l'extensiva família de proteïnes Hha/YmoA.

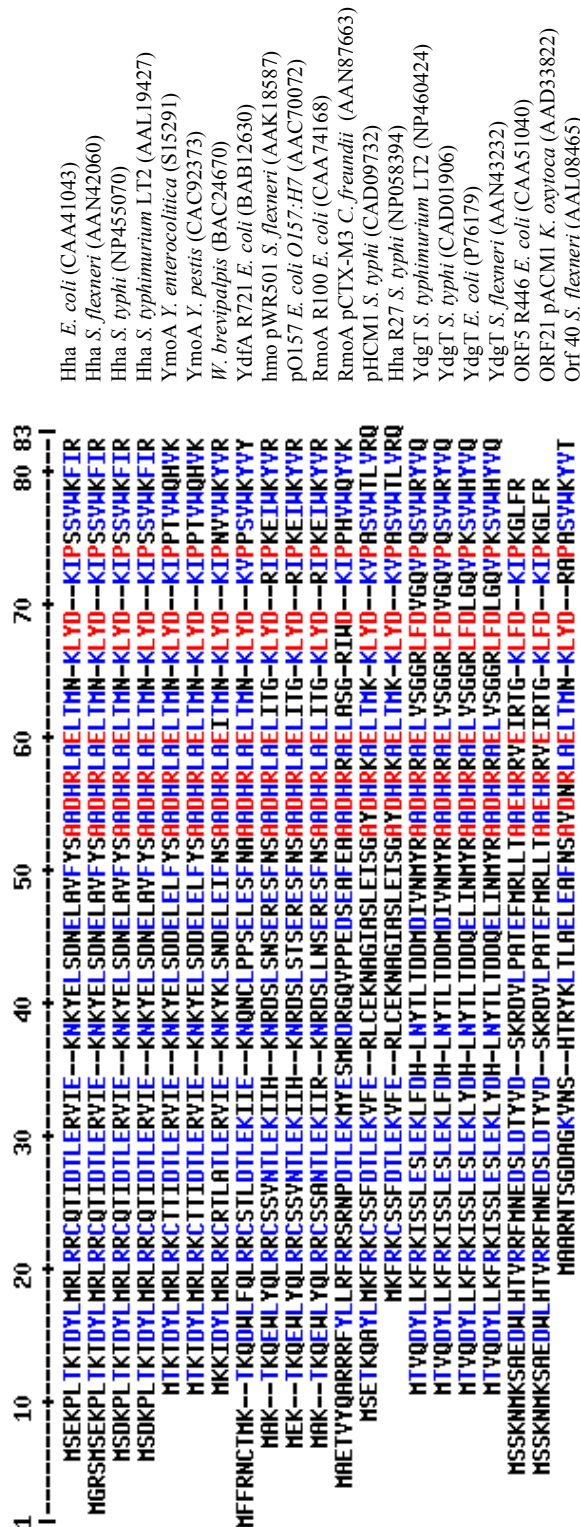


Figura 1.3.5. Comparació de les seqüències d'aminoàcids de les proteïnes de la família Hha/YmoA, utilitzant el programa Multalin (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>)

1.4. OBJECTIUS

En el marc del projecte global de caracterització del sistema Hha-H-NS, i tenint present que la proteïna H-NS té com a anàleg la proteïna StpA, va semblar important determinar si la proteïna Hha presenta també un anàleg i, en cas afirmatiu, quin és el paper d'aquest. Aquesta memòria recull la identificació i caracterització de l'anàleg d'Hha, la proteïna YdgT.

Es va plantejar en aquest treball caracteritzar el paper de la proteïna YdgT en la regulació de l'expressió gènica, i mitjançant l'obtenció de mutants *ydgT*, i de dobles mutants *ydgT hha*, avaluar els efectes reals de la mutació *hha* sobre aquesta.

Partint dels treballs previs en que es planteja un model de regulació per complexos proteics que inclouen les proteïnes Hha i H-NS, i una vegada identificada YdgT com a anàleg d'Hha, un dels objectius d'aquest treball ha estat l'anàlisi de les possibles interaccions entre les proteïnes YdgT, Hha, H-NS i StpA.

Finalment, es va plantejar l'estudi de la pleiotropia d'aquestes mutacions. Per tal d'identificar els operons regulats pel sistema *hha-ydgT*, es va realitzar un estudi proteòmic utilitzant mutants *hha*, *ydgT* i *hha ydgT*.

2.1 SOQUES BACTERIANES, BACTERIÒFAGS I PLÀSMIDS

Totes les soques utilitzades en aquest treball, pertanyen a l'espècie d'*Escherichia coli* de la família de les *Enterobacteriaceae*, bacils Gram-negatius i anaerobis facultatius. Les característiques genotípiques es detallen a la taula 2.1.1.

A la taula 2.1.2 es detallen les característiques del bacteriòfag utilitzat en aquest treball com a eina per a la transducció generalitzada.

Taula 2.1.1. Soques d'*Escherichia coli* utilitzades en aquest treball

Soca	Genotip rellevant	Referència
5K	F ⁻ , <i>hsdR</i> , <i>hsdM</i> , <i>thr</i> , <i>thi</i> , <i>rpsL</i> , <i>leu</i> , <i>lacZ</i>	Juárez <i>et al.</i> , 1984
5K Rif	5K, Rif ^r	Nieto <i>et al.</i> , 1998
K-12	F ⁻ , λ , <i>ilvG</i> , <i>rfb50</i> , <i>rph-1</i>	Lederberg, 1951
YdgT [Cm]	5K <i>ydgT</i> ::Cm ^r	Aquest treball
YdgT	5K Δ <i>ydgT</i>	Aquest treball
Hha-3	5K <i>hha</i> ::Tn5 <i>phoA</i>	Godessart <i>et al.</i> , 1988
YdgT Hha-3	5K <i>ydgT</i> , <i>hha</i>	Aquest treball
BSN26	MC4100 <i>trp</i> ::Tn10	Johansson <i>et al.</i> 1998
BSN26Y	BSN26 Δ <i>ydgT</i>	Aquest treball
BSN26H	BSN26 Δ <i>hha</i>	Nieto <i>et al.</i> , 2000
BSN26HY	BSN26 Δ <i>ydgT</i> , Δ <i>hha</i>	Aquest treball
BSN27	MC4100 <i>trp</i> ::Tn10 Δ <i>hns</i>	Johanson <i>et al.</i> , 1998
BSN27Y	BSN27 Δ <i>ydgT</i>	Aquest treball
BSN27H	BSN27 Δ <i>hha</i>	Nieto <i>et al.</i> , 2000
BSN28	MC4100 <i>trp</i> ::Tn10 <i>stpA60</i> ::Km ^r	Johanson <i>et al.</i> , 1998
BSN29	MC4100 <i>trp</i> ::Tn10 Δ <i>hns</i> <i>stpA60</i> ::Km ^r	Johanson <i>et al.</i> , 1998
XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)</i>]	Bullock <i>et al.</i> , 1987
BL21 (DE3)	<i>hsdS</i> , <i>gal</i> , (λ cIts857, <i>ind1</i> , <i>Sam7</i> , <i>nin5</i> , <i>lacUV5-T7 gene1</i>)	Studier i Moffatt, 1986

Soca	Genotip rellevant	Referència
BL21 (DE3)-Tc	BL21 (DE3) <i>trp::Tn10 Δhns</i>	Aquest treball
BL21 (DE3)-Km	BL21 (DE3) <i>Δhns::Km^r</i>	Zhang <i>et al.</i> , 1996

Taula 2.1.2. Bacteriòfag utilitzat en experiments de transducció generalitzada

Bacteriòfag	Genotip i fenotip rellevant	Referència
P1 ^{vir}	Fag lític	Miller, 1992

A la següent taula es mostren els plàsmids utilitzats i se'n detallen les característiques i referència d'aquests.

Taula 2.1.3. Plàsmids utilitzats en aquest treball

Plàsmid	Descripció	Referència
pBR322	<i>ori</i> _{pMB1} ; Ap ^r , Tc ^r	Bolívar <i>et al.</i> 1977
pLG338-30	<i>ori</i> _{pSC101} ; Ap ^r	Cunningham <i>et al.</i> 1993
pUC19	<i>ori</i> _{ColE1} ; Ap ^r	Yanisch-Perron <i>et al.</i> 1985
pHly152	<i>hlyR</i> , <i>hlyC</i> , <i>hlyA</i> , <i>hlyB</i> , <i>hlyD</i>	Noegel <i>et al.</i> 1981
pANN202-312	pACYC184 + <i>hlyC</i> , <i>hlyA</i> , <i>hlyB</i> , <i>hlyD</i> ; Cm ^r	Godessart <i>et al.</i> 1988
pKD46	<i>oriR101</i> , <i>repA101</i> (ts), <i>araBp-gam-bet-exo</i> (Red helper plasmid, Ts; Ap ^r)	Datsenko i Wanner, 2000
pKD3	<i>oriRγ</i> , Cm ^r , Ap ^r	Datsenko i Wanner, 2000
pCP20	<i>λcI857</i> (ts), <i>ts-rep</i> (Recombinasa FLP, Ts)	Cheperanov i Wackernagel, 1995
pNQ4	pUC19 + <i>ydgJ</i> , <i>ydgT</i> , <i>ydgK</i> , <i>ydgL</i> , <i>ydgM</i> ; Ap ^r	Y. Nishimura (comunicació personal)
pLG-ydgT	pLG338-30 + <i>ydgT</i> ; Ap ^r	Aquest treball
pUC-ydgT	pUC19 + <i>ydgT</i> ; Ap ^r	Aquest treball

Plàsmid	Descripció	Referència
pCB1H	pLG338-30 + <i>hha</i> ; Ap ^r , Km ^r	Balsalobre <i>et al.</i> , 1996.
pUBM22	pBR322 + <i>hha</i> ; Ap ^r	Nieto <i>et al.</i> , 1991.
pET3b	Promotor de T7, Ap ^r	Studier <i>et al.</i> 1990
pETHHA	pET3b + <i>hha</i> ; Ap ^r	Nieto <i>et al.</i> , 2000
pET-HISHHA	pET3b + 6xHis- <i>hha</i> ; Ap ^r	Nieto <i>et al.</i> , 2000
pET-ydgT	pET3b + <i>ydgT</i> ; Ap ^r	Aquest treball
pET-HisYdgT	pET3b + 6xHis- <i>ydgT</i> ; Ap ^r	Aquest treball
pET-ydgT_r	pET3b + cadena complementària al RNA missatger de <i>ydgT</i> ; Ap ^r	Aquest treball
pET-HNShis	pET3b + <i>hns</i> -6xHis; Ap ^r	Nieto <i>et al.</i> , 2002
pT7-StpA	pET3b + <i>stpA</i> ; Ap ^r	Zhang <i>et al.</i> , 1995
pLysS	Lisozim de T7; Cm ^r	Studier <i>et al.</i> , 1990
pLysE	Lisozim de T7; Cm ^r	Studier <i>et al.</i> , 1990
pLGHlyR0	pLG338-30 + <i>hlyR</i> , <i>hlyCABD</i>	Madrid <i>et al.</i> , 2002a
pOX38-Gm	pOX38 Gm ^r	Johnson i Reznikoff, 1984
R100-1	<i>finO</i> ⁺ IncII	Yoshioka <i>et al.</i> , 1987

2.2 MEDIS DE CULTIU I ANTIBIÒTICS

2.2.1 MEDIS DE CULTIU

Es van utilitzar diferents medis de cultiu per a bacteris, tan líquids com sòlids:

- **LB** (Luria-Bertani; Sambrook *et al.*, 1989): medi de cultiu líquid utilitzat de manera rutinària per al creixement bacterià.

LB	
Composició	g/l
Peptona trípsica de caseïna (Schärlau Microbiology)	10
Extracte de llevat (Schärlau Microbiology)	5
NaCl (Panreac)	10

La composició d'aquest medi podia variar segons les condicions en que es volgués fer créixer els bacteris. Si en condicions normals la molaritat de NaCl era de 170 mM, en d'altres casos s'augmentava l'osmolaritat del medi portant la concentració de NaCl a 0,5M o en cas contrari es disminuïa utilitzant LB sense NaCl.

- **LB agar:** Medi de cultiu sòlid compost de LB suplementat amb 15 g/l d'agar per a bacteriologia (Schärlau Microbiology). Aquest medi s'utilitza habitualment pel creixement bacterià en placa.

- **Agar-sang:** Medi de cultiu sòlid format per LB agar al que se li afegeix un 5% (v/v) de sang desfibrinada estèril de xai (Oxoid) quan aquest ja ha estat previament esterilitzat amb l'autoclau i s'ha atemperat aproximadament a uns 50°C. Aquest medi s'utilitza per a la detecció en placa d'activitat hemolítica externa de les soques estudiades.

- **Agar-β-glucòsid** (Schnetzer *et al.*, 1987): Medi sòlid suplementat amb salicina i indicador de pH. Aquest medi s'ha utilitzat per a la selecció de mutants *hns* ja que en

aquests hi ha una desrepressió de l'operó *bgl*, detectable pel canvi de color de l'indicador de pH.

Agar- β -glucòsid	
Composició	g/l
Extracte de llevat (Schärlau Microbiology)	3
Triptona (Schärlau Microbiology)	6
Agar per a bacteriologia (Schärlau Microbiology)	15

* Autoclavar el medi i un cop refredat, afegir salicina al 0,5% i blau de bromotimol al 0,02% a partir de les solucions mare.

Solució de salicina: Es va preparar una solució mare de salicina al 5 % (p/v) en aigua, es va escalfar per facilitar-ne la dissolució i es va esterilitzar per filtració.

Solució de blau de bromotimol: Es va preparar una solució al 2 % (p/v) en etanol 50 % (v/v) i NaOH 0,2N.

● **LB agar-tou:** Medi utilitzat en l'obtenció i titulació de lisats fàgics. La composició és la del medi LB suplementat amb 6 g/l d'agar per a bacteriologia.

● **SOB** (Hanahan *et al.*, 1991): Medi de cultiu líquid utilitzat per al creixement bacterià en els experiments d'inactivació de gens cromosòmics (veure apartat 2.5.1).

SOB	
Composició	g/l
Peptona tríptica de caseïna (Schärlau Microbiology)	20
Extracte de llevat (Schärlau Microbiology)	5
NaCl (Panreac)	0,58
KCl (Merck)	0,19
MgCl ₂ + MgSO ₄ *	20 mM

*A partir d'una solució mare Mg²⁺ 2M (MgCl₂ 1 M MgSO₄ 1 M).

● **SOC** (Hanahan *et al.*, 1991): Medi de cultiu líquid utilitzat en l'inactivació de gens cromosòmics per fragments de PCR. S'utilitza com a medi de recuperació de les cèl·lules després de l'electroporació. Es tracta de medi SOB suplementat amb glucosa 20 mM.

- **TSA** (Schärlau Microbiology): Medi de cultiu sòlid utilitzat per al creixement bacterià en els experiments d'inactivació de gens cromosòmics.

TSA	
Composició	g/l
Peptona de caseïna	17
Peptona de soja	3
NaCl	5
Fosfat dipotàssic	2,5
Dextrosa	2,5
Agar per a bacteriologia	15

Tots els medis citats es van esterilitzar en l'autoclau, durant 15 minuts a una temperatura de 121°C.

- **Indol**: medi utilitzat per a la detecció de la presència de triptofanasa.

Indol	
Composició	g/l
Triptòfan	1
Peptona tríptica de caseïna (Schärlau Microbiology)	10
NaCl (Panreac)	5

2.2.2 ANTIBIÒTICS

Quan va ser necessari, els diferents medis de cultiu esmentats es van suplementar amb antibiòtics. Aquests antibiòtics s'afegien al medi a partir d'una solució concentrada preparada seguint les instruccions de la bibliografia (Sambrook *et al.*, 1989).

• **Ampicil·lina (Ap):** (Sal sòdica, Roche). Es va preparar una solució concentrada de 100 mg/ml en aigua destil·lada, es va esterilitzar per filtració i es va guardar a -20°C. Les concentracions finals que es varen utilitzar eren de 50 o 100 µg/ml, segons el número de còpies dels plàsmids que codificaven per la resistència a l'antibiòtic.

• **Cloramfenicol (Cm):** (Fluka). A partir d'una solució concentrada de 100 mg/ml en etanol absolut (Prolabo) i guardada a -20°C, es va utilitzar a concentracions finals de 25 µg/ml per a resistències cromosòmiques i de 34 o 50 µg/ml segons el plàsmid que codificava per la resistència.

• **Kanamicina (Km):** (Sulfat àcid, Sigma). Es va preparar una solució mare de 50 mg/ml en aigua destil·lada, es va esterilitzar per filtració i es va guardar a -20°C. La concentració final en el medi ha estat de 25 µg/ml, ja que s'ha utilitzat per a resistències codificades a nivell cromosòmic.

• **Tetraciclina (Tc):** (Hidroclorur, Fluka). Es va preparar una solució a una concentració final de 12,5 mg/ml en etanol al 50% (v/v), es va esterilitzar per filtració i es va guardar a -20°C protegida de la llum. La concentració final en el medi va ser de 15 µg/ml.

• **Gentamicina (Gm):** (Sulfat, Fluka). Es va preparar una solució mare de 5 mg/ml en aigua destil·lada, es va esterilitzar per filtració i es va guardar a -20°C. La concentració final en el medi ha estat de 5 µg/ml, ja que s'ha utilitzat per a resistències codificades a nivell plasmídic.

• **Rifampicina (Rif):** (Fluka). Es va preparar una solució mare de 50 mg/ml en aigua destil·lada i es va anar afegint gota a gota NaOH 2N fins a la completa dissolució. Es va esterilitzar per filtració i es va guardar a -20°C. La concentració final en el medi ha estat de 50 µg/µl.

2.3 MÈTODES MICROBIOLÒGICS

2.3.1 ESTERILITZACIÓ

Els medis de cultiu, material de vidre i plàstic i les solucions utilitzades en aquest treball, es van esterilitzar per calor humit i pressió en l'autoclau durant 15 minuts a 121°C i 2 atmosferes.

Per contra, les solucions que no permetien ser esterilitzades per aquest mètode, es van esterilitzar per filtració a través de filtres estèrils de 0,22 µm de diàmetre de porus (Millipore).

Per l'eliminació de RNases, quan fou necessari, es va procedir de la mateixa manera que en el cas dels medis de cultiu pels tampons, o bé netejant amb SDS 0,1% (p/v) o NaOH 1M en el cas del material no apte per a ser esterilitzat en l'autoclau.

2.3.2 MANTENIMENT DE MICROORGANISMES

Totes les soques d'aquest treball es van mantenir de dues maneres. En primer lloc, es tenien cultius en placa de cada una d'elles i s'anaven resembrent en els seus corresponents medis sòlids cada 6-7 setmanes. Per altra banda, també es mantenien per congelació a -70°C, en glicerol al 20% (v/v).

Els bacteriòfags es mantenien a 4°C en forma de lisat fàgic en el mateix sobrenedant del cultiu del qual es van obtenir i amb unes gotes de cloroform per tal d'evitar contaminació bacteriana.

2.3.3 INOCULACIÓ I CULTIU DE MICROORGANISMES

La inoculació de microorganismes en medi líquid es va realitzar a partir de cultius líquids prèviament crescuts durant 18 hores, de cultius en medi sòlid o bé de cultius congelats (directament o després d'haver-los resembrat a placa).

En general però, la inoculació es realitzava a partir d'una dilució 1:50 o 1:100 d'un cultiu crescut durant 18 hores en un Erlenmeyer amb medi líquid fresc fins a un volum màxim d'1/3 de la capacitat del recipient i atemperat a la temperatura a la que el **feiem**

créixer. Posteriorment, aquest medi inoculat s'incubava a la temperatura desitjada i a una agitació de 200 rpm (incubador-agitador orbital, Braun).

En tots els casos en que teníem creixement en medi líquid, la mesura d'aquest es realitzava segons dos procediments:

- Seguiment espectrofotomètric de la densitat òptica dels cultius a una longitud d'ona de 600 nm (DO_{600}) (Espectrofotòmetre model DU[®] 640, Beckman Coulter[™]).
- Recompte de viables en placa (o unitats formadores de colònies, ufc) mitjançant la sembra en placa de diferents dilucions del cultiu.

2.4 MÈTODES DE TRANSFERÈNCIA GENÈTICA

2.4.1 TRANSFORMACIÓ BACTERIANA

Per tal de dur a terme la transformació de cèl·lules bacterianes es van utilitzar dues estratègies diferents. Normalment, es va utilitzar el mètode del CaCl_2 fred, però en els casos en que l'eficiència de transformació era molt baixa, o en la tècnica d'inactivació de gens cromosòmics utilitzant fragments de PCR, el mètode seguit va ser l'electroporació.

2.4.1.1 Transformació de cèl·lules competents obtingudes mitjançant tractament amb CaCl_2

(Cohen *et al.*, 1972)

A partir d'un inòcul crescut tota la nit es realitzava una dilució 1:50 en medi fresc i s'incubava fins a assolir la meitat de la fase exponencial (2 o 3 hores després d'inocular, a 37°C i 200 rpm). En aquest punt del creixement, el cultiu es centrifugava (3000 x g, 10 minuts, 4°C) i es ressuspenia en la meitat de volum de CaCl_2 50 mM estèril i fred (4°C). Es repetia la centrifugació però aquest cop menys temps (3000 x g, 5 minuts, 4°C) i les cèl·lules es ressuspenien ara en 1/20 del volum inicial de CaCl_2 50 mM fred. Les cèl·lules competents obtingudes per aquest procés s'incubaven en gel un mínim d'1 hora i un màxim de 24 hores abans de ser transformades.

Alíquotes de 100 µl de cèl·lules competents es van posar en contacte amb un volum d'1 a 10 µl de DNA plasmídic. La barreja es va incubar durant 30 minuts en gel i posteriorment es va sotmetre a un xoc tèrmic de 45 segons a 42°C en un bany termoestàtic. A continuació s'afegia a les cèl·lules 900 µl de LB sense suplementar amb cap antibiòtic i s'incubaven a 37°C durant 1 hora a 200 rpm per tal de permetre l'expressió dels marcadors fenotípics transmesos (expressió de les resistències a antibiòtics). La transformació va ser sembrada en medi sòlid suplementat amb els marcadors selectius del plàsmid.

2.4.1.2 Electroporació

(Dower *et al.*, 1988)

Quan la transformació pel mètode del CaCl₂ fred descrit en l'apartat anterior no permetia la transferència de DNA, el mètode utilitzat era l'electroporació. Aquesta tècnica permet la captació de DNA mitjançant la permeabilització de les membranes provocada per una descàrrega elèctrica. Per aquesta tècnica l'eficàcia de transformació augmenta considerablement, obtenint entre 10⁹-10¹⁰ transformants per µg de DNA.

A partir d'un inòcul crescut tota la nit es realitzava una dilució 1:50 en medi fresc i s'incubava fins a assolir una DO₆₀₀ de 0,5 aproximadament. Després de refredar en gel el cultiu (generalment 10 ml), aquest es va centrifugar repetides vegades a 3000 x g, 10 minuts a 4°C i ressuspendre successivament en 1; 0,5; 0,1 i finalment en 0,005 volums d'aigua bidestil·lada estèril i freda (4°C). D'aquesta manera es va aconseguir disminuir la força iònica de la suspensió cel·lular. 50 µl de cèl·lules obtingudes per aquest procés es barrejaven amb 1-5 µl d'una suspensió de DNA, es mantenia la barreja uns minuts en gel i a continuació es transferia a cubetes de 2 mm de separació entre elèctrodes (BTX).

L'electroporador utilitzat era el model Electro Cell Manipulator 600 (BTX Electroporation System). Les condicions d'electroporació van ser les que es mostren a la seqüent taula:

Condicions d'electroporació d'<i>E. coli</i>	
Temperatura	4°C
Mode	2,5 kV / Resistència d'alt voltatge
Capacitància	No utilitzar en mode d'alt voltatge
Resistència	R5 (129 Ω)
Voltatge de la descàrrega	2 kV
Força del camp elèctric aplicat	10 kV / cm (màxim)
Duració del pols	5 ms

Un cop realitzada la descàrrega elèctrica, se li afegia 1 ml de LB sense suplementar amb cap antibiòtic, i es passava a un tub eppendorf. La suspensió s'incubava a 37°C durant 1 hora a 200 rpm per tal de permetre l'expressió dels marcadors fenotípics

transmesos (expressió de les resistències a antibiòtics). Les cèl·lules transformades es van seleccionar en medi sòlid suplementat amb els marcadors corresponents.

2.4.2 CURAT DE PLÀSMIDS

El curat de plàsmids es va obtenir en la majoria dels casos per successius subcultius de la soca portadora del plàsmid en medi LB sense els marcadors de resistència codificats pel plàsmid. Després del subcultiu es van sembrar dilucions adequades en plaques de medi LB sense antibiòtics. Les colònies obtingudes es van ressemar per duplicat en plaques del mateix medi de cultiu amb i sense antibiòtics. Les colònies que creixien a la placa sense antibiòtic però que no ho feien a la placa amb antibiòtic corresponien a curats del DNA plasmídic.

2.4.3 CONJUGACIÓ

2.4.3.1 Conjugació en medi sòlid

Aquest procediment de conjugació va ser utilitzat per la transferència del plàsmid pHly152.

Es van posar en contacte alíquotes de cultius en fase exponencial de la soca donadora K12 pHly152 (10 µl) i la soca receptora (100 µl). La barreja es va sembrar en plaques de LB i es van incubar a 37°C durant 16-18 hores per a permetre el contacte entre cèl·lules. Un cop crescut, el cultiu confluent es recollia en 3 ml de medi LB amb l'ajuda d'una nansa de vidre. Amb la suspensió cel·lular obtinguda es va fer un banc de dilucions i es va sembrar en medi agar sang suplementat amb els antibiòtics adequats per a la selecció dels transconjugants.

2.4.3.2 Conjugació en medi líquid

2.4.3.2.1 Conjugació del plàsmid pOX38-Gen

(Klimke i Frost, 1998)

A partir d'un cultiu crescut tota la nit de la soca receptora i la soca donadora, es van fer inòculs 1:100 en LB fresc amb els corresponents antibiòtics. Es va deixar el cultiu a

37°C en agitació fins a arribar a fase exponencial (aproximadament DO_{600} de 0,6). En aquest moment es van centrifugar 5 ml de cada cultiu i es van ressuspèndre en el mateix volum de LB fresc per tal d'eliminar totalment els antibiòtics. Es van posar en contacte alíquotes de la soca donadora (100 μ l) i la soca receptora (100 μ l) i es va portar a 1 ml amb medi LB. Les barreges de conjugació i els corresponents controls es van incubar durant 30 minuts a 37°C en estàtic per tal de permetre la conjugació. Un cop transcorregut aquest temps, les barreges es van agitar vigorosament i es van deixar en gel. Es van preparar les dilucions adients per sembrar en les plaques selectives tant per a la selecció de les colònies transconjugants com per a la selecció de les colònies donadores.

La freqüència de conjugació es va calcular a partir de la relació entre el recompte de cfu/ml transconjugants respecte el recompte de cfu/ml de donadores.

2.4.3.2.2 Conjugació del plàsmid R100-1

(Nieto *et al.*, 1998)

A partir d'un cultiu crescut tota la nit de la soca receptora i la soca donadora, es van fer inòculs 1:100 en LB fresc amb els corresponents antibiòtics. Es va deixar el cultiu a 37°C en agitació en el cas de les cèl·lules receptores o estàtic en el cas de les cèl·lules donadores fins a arribar a mitja fase exponencial (aproximadament DO_{600} de 0,3). En aquest moment es van centrifugar 5 ml de cada cultiu i es van ressuspèndre en el mateix volum de LB fresc per tal d'eliminar els antibiòtics. Es van posar en contacte alíquotes de la soca donadora (100 μ l) i la soca receptora (900 μ l). Les barreges de conjugació i els corresponents controls es van incubar durant 1 hora a 37°C en estàtic per tal de permetre la conjugació. Un cop transcorregut aquest temps, les barreges es van agitar vigorosament i es van deixar en gel. Es van preparar les dilucions adients per sembrar en les plaques selectives tant per a la selecció de les colònies transconjugants com per a la selecció de les colònies donadores.

La freqüència de conjugació es va calcular a partir de la relació entre el recompte de cfu/ml transconjugants respecte el recompte de cfu/ml de donadores.

2.4.4 TRANSDUCCIÓ GENERALITZADA AMB EL BACTERIÒFAG p1vir

(Miller, 1992)

El bacteriòfag P1vir és un derivat virulent del bacteriòfag P1 al que li manca la capacitat de lisogenitzar les cèl·lules que infecta. Aquest bacteriòfag va ser utilitzat en aquest treball per a la construcció de soques *ΔydgT* mitjançant la transducció de mutacions quan aquestes portaven associat el gen de la resistència al cloramfenicol com a marcador i també per a la construcció del la soca BL21 (DE3) *Δhns::Tc^r*.

2.4.4.1 Obtenció de lisats de P1vir

Es van barrejar 10^7 partícules fàgiques de P1vir d'un lisat pre-existent amb 1 ml d'un cultiu en fase exponencial en medi LB suplementat amb CaCl₂ 5 mM de la soca donadora. Es va seguir amb una incubació de 20 minuts a 37°C sense agitació per permetre la unió cèl·lula-fag. Passat aquest temps, s'hi van afegir 2,5 ml de LB agar-tou (suplementat amb CaCl₂ 2 mM i glucosa 0,1%), es va estendre la barreja sobre una placa de LB agar (CaCl₂ 2 mM i glucosa 0,1%), es va deixar solidificar i la placa s'incubà a 37°C sense invertir. Passades 18-24 hores, es van afegir 2 ml de LB a la capa de LB agar-tou, es va recollir amb la nansa de vidre i es va introduir en un tub de centrifuga juntament amb unes gotes de cloroform. Es va agitar vigorosament i les restes cel·lulars i d'agar es van separar per centrifugació (12.000 x g, 10 minuts). El sobrenedant obtingut, corresponent al lisat fàgic, es va conservar a 4°C amb unes gotes de cloroform.

2.4.4.2 Titulació dels lisats de P1vir

Alíquotes de 100 µl d'un cultiu crescut durant tota la nit de la soca *E. coli* 5K en LB suplementat amb CaCl₂ 5 mM es van barrejar amb 100 µl de diferents dilucions del lisat de P1vir. Després d'incubar la barreja a 37°C durant 10 minuts sense agitació, s'hi van afegir 2,5 ml de LB agar-tou suplementat amb CaCl₂ 2 mM i glucosa 0,1%, i es decantà sobre una placa d'agar LB (amb CaCl₂ 2 mM i glucosa 0,1%). Es varen incubar les plaques a 37°C durant 18-24 h. La titulació del lisat es va fer a partir del recompte del número de calbes de lisi.

2.4.4.3 Transducció amb P1vir

Les cèl·lules d'un cultiu de tota la nit de la soca receptora per a ser transduïda es **van** centrifugar i resuspendre en el mateix volum de tampó MC. Es varen barrejar 100 µl de la suspensió de cèl·lules amb 100 µl de diferents dilucions del lisat fàgic, per tal de tenir varies multiplicitats d'infecció (generalment 1:0,1; 1:1; 0,1:1). Després d'incubar la barreja durant 20 minuts a 37°C sense agitació, s'hi van afegir 0,2 ml de tampó citrat 0,1 M per inhibir la readsorció del bacteriòfag. Es va sembrar la barreja de transducció en plaques de LB agar, suplementades amb els marcadors necessaris per a la selecció de les cèl·lules transductants, i s'incubaren a 37°C .

Tampó MC	
Composició	Concentració
MgSO ₄	0,1 M
CaCl ₂	5 mM

Tampó citrat	
Composició	Concentració
C ₆ H ₈ O ₇	0,1 M

Ajustar el pH a 5,5 amb NaOH i autoclavar

2.5 TÈCNIQUES DE MUTAGÈNESI

2.5.1 INACTIVACIÓ DE GENS CROMOSÒMICS UTILITZANT FRAGMENTES DE PCR

(Datsenko i Wanner, 2000)

Amb aquesta metodologia és possible reemplaçar una seqüència cromosòmica amb un gen de resistència per a un antibiòtic, generat per PCR, utilitzant oligonucleòtids amb extensions homòlogues corresponents al gen a disrupcionar. Aquestes extensions permetran la recombinació mitjançada per la recombinasa Red en les regions flanquejants del gen. Després de la selecció de mutants, la resistència pot ser eliminada utilitzant un plàsmid auxiliar que expressa la recombinasa FLP, que actua en la repetició directe FRT adjacent al gen de la resistència.

2.5.1.1 Generació del fragment de PCR

La resistència a antibiòtic (Cm) del plàsmid pKD3 es va amplificar utilitzant oligonucleòtids que en l'extrem 5' continguessin seqüències homòlogues (d'entre 35 i 50 nucleòtids) al gen a disrupcionar (H1 i H2) més la seqüència corresponent a P1 i P2 del plàsmid pKD3 (veure figura 1). En total els oligonucleòtids medien entre 56 i 70 nucleòtids. D'aquesta manera, en amplificar la resistència a cloramfenicol per PCR (veure apartat 2.6.3) utilitzant el plàsmid com a motlle, es genera un fragment que conté la resistència a cloramfenicol flanquejada pels llocs FRT, les seqüències corresponents a P1 i P2 i seqüències homòlogues al gen que es vol disrupcionar. Després de l'amplificació es va purificar el fragment per electroelució (apartat 2.6.6) i posteriorment es va digerir amb l'enzim de restricció *DpnI* per tal d'eliminar el DNA motlle utilitzat en la PCR, ja que aquest enzim digereix el DNA metilat. Posteriorment es repurificava el fragment.

2.5.1.2 Transformació a la soca d'*E. coli* pKD46

El plàsmid pKD46 codifica la recombinasa Red de λ , sota el control d'un promotor induïble per L-arabinosa, i és fàcilment curable per creixement a 37°C ja que té un origen

de replicació termosensible. La recombinasa Red, a més d'afavorir la recombinació, inhibeix l'exonucleasa V, permetent així l'entrada a la cèl·lula d'un fragment de PCR sense que aquest sigui digerit. El plàsmid portador de la recombinasa presenta resistència a ampicil·lina (100 µg/ml).

Es va fer créixer la soca que es volia mutagenitzar transformada amb el plàsmid pKD46 a 30°C en medi SOB suplementat amb ampicil·lina i L-arabinosa 10 mM (Sigma) fins a una $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,6. Quan la soca va arribar a aquest punt del creixement, es van obtenir cèl·lules electrocompetents per centrifugació i rentats (x3) amb glicerol al 10% (v/v) fred concentrant les cèl·lules x 100.

Aliquotes de 25 µl d'electrocompetents es van electroporar amb 10-100 ng de producte de PCR (condicions de l'electroporació a l'apartat 2.4.1.2). Un cop realitzat el xoc elèctric, se'ls va afegir 1 ml de medi SOC i es van mantenir durant 1 hora a 37°C per tal d'afavorir la recombinació i l'expressió del marcador.

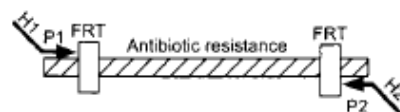
La selecció es va fer sembrant la meitat de les cèl·lules en plaques de medi sòlid TSA suplementades amb cloramfenicol (marcador de la mutació). La resta de transformants es van deixar entre 18-24 hores a temperatura ambient i es van sembrar passat aquest temps en el mateix medi. Les plaques es van deixar a 37°C entre 2 i 3 dies.

Un cop obtinguda alguna possible colònia es va curar el plàsmid pKD46, mitjançant diverses sèries en plaques de TSA sense antibiòtic i a 43°C.

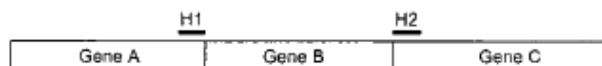
Per a comprovar que la inserció era correcta, es van fer amplificacions de fragments per PCR utilitzant diferents parells d'oligonucleòtids.

En la figura 2.5.1 es mostra un esquema del procés.

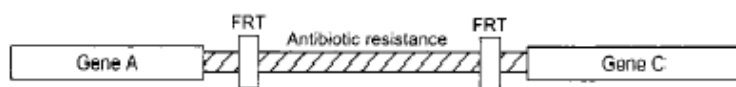
Pas 1: Amplificació per PCR de la resistència flanquejada per FRT



Pas 2: Transformació de la soca d'*E. coli* pKD46



Pas 3: Selecció dels transformants resistents a l'antibiòtic



Pas 4: Eliminació de la resistència a antibiòtic

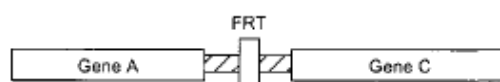


Figura 2.5.1. Estratègia de disrupció gènica. H1 i H2 referits a les regions d'homologia del gen. P1 i P2 referits a les regions d'homologia del pKD46.

2.5.1.3 Eliminació de la resistència a l'antibiòtic

El mutant obtingut i comprovat es va transformar amb el plàsmid pCP20, plàsmid que codifica per la recombinasa FLP induïble per temperatura (43°C), resistent a ampil·lina i cloramfenicol, i amb replicó termosensible. La transformació es va sembrar en plaques de TSA amb ampil·lina i es van incubar a 30°C durant 16 hores. Els transformants obtinguts, es van sembrar en medi no selectiu i incubar a 43°C per tal d'afavorir la pèrdua del plàsmid. Es va comprovar que les colònies crescudes en aquestes condicions ja no contenien el plàsmid, ja que normalment, la majoria de pèrdues de la resistència flanquejada per seqüències FRT és simultània a la pèrdua del plàsmid pCP20. Si tot i així el plàsmid no es perdia, es curava tal i com s'indica en l'apartat 2.4.2.

Es van fer amplificacions per PCR utilitzant diferents oligonucleòtids, per a comprovar que el gen de resistència al cloramfenicol s'havia perdut i que el gen original estava deletat.

2.6 TÈCNIQUES EXPERIMENTALS AMB DNA

2.6.1 AÏLLAMENT DE DNA PLASMÍDIC

2.6.1.1 Obtenció de preparacions de DNA plasmídic pel mètode de la lisi alcalina

(Birnboim, 1983)

Les cèl·lules obtingudes al centrifugar 3 ml de cultiu de tota una nit (3000 x g, 10 minuts) es van ressuspèndre en 100 µl de solució I. Es varen afegir 200 µl de solució II i 150 µl de solució III, agitant la suspensió per inversió i incubant durant 5 minuts després d'haver afegit cada solució. Després de centrifugar (16.000 x g, 5 minuts) es va recollir el sobrenedant, se li va afegir 2 volums d'etanol absolut (Prolabo) pre-refredat a -20°C, i es va mantenir 1 hora a -20°C per tal de precipitar el DNA. El DNA plasmídic es va recuperar centrifugant 15 minuts a 16.000 x g a 4°C, rentant el sediment de DNA amb etanol 70% fred i assecant-lo en una centrífuga de buit (Speed-Vac, model 100, Savant Instruments Inc.). El precipitat final es ressuspènia en el volum desitjat d'aigua bidestil·lada estèril, normalment entre 40 i 100 µl si s'havia d'utilitzar per transformar (veure apartat 2.4.1) o bé en 500 µl si s'havia de fenolitzar.

El mateix protocol es va adaptar per a l'extracció de DNA plasmídic a partir de volums més grans de cultiu, augmentant les quantitats de les solucions I, II i III utilitzades i mantenint les proporcions entre elles (1:2:1,5).

Solució I	
Composició	Concentració
Glucosa (Panreac)	55 mM
EDTA (Merck)	10 mM
Tris (Roche)	25 mM

Ajustar a pH 8,0

Solució II	
Composició	Concentració
NaOH (Panreac)	0,2 M
SDS (Merck)	1%

Solució III	
Composició	Concentració
Acetat sòdic (Merck)	3 M

Ajustar a pH 4,8 amb àcid acètic glacial (Panreac)

2.6.1.2 Tractament del DNA amb RNasa A

El DNA obtingut pel mètode de la lisi alcalina va ser tractat amb RNasa A de pàncreas boví (Boehringer Mannheim) a una concentració de 50 µg/ml durant 30 minuts a 37°C, abans de la seva extracció amb fenol:cloroform.

Solució RNasa A (Sambrook *et al.*, 1989): Es va preparar una solució de 5 mg de RNasa A/ml en Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 15 mM. Es van eliminar les DNases incubant la solució durant 5 minuts a 100°C. La preparació es va mantenir a 4°C.

2.6.1.3 Desproteïnització amb fenol:cloroform

Per a la desproteïnització del DNA, es va fer una extracció fenòlica amb una solució de fenol equilibrat a pH 7,9 (Sigma) i cloroform:alcohol isoamílic (24:1). Pel tractament amb fenol:cloroform, es va utilitzar ½ volum de fenol, posteriorment ¼ volum de fenol amb ¼ volum de cloroform:alcohol isoamílic, i finalment ½ volum de cloroform:alcohol isoamílic. En cada un dels passos es barrejava la fase aquosa i l'orgànica fins aconseguir una emulsió, a continuació es centrifugava a 16.000 x g durant 2 minuts per tal de separar les dues fases i es recollia la fase aquosa.

Un cop desproteïnit, el DNA es va precipitar afegint 1/10 del volum de solució III (apartat 2.6.1.1) i 2 volums d'etanol absolut pre-refredat a -20°C. Després de mantenir la

barreja un mínim de 60 minuts a -20°C , les preparacions es varen centrifugar ($16.000 \times g$, 15 minuts, 4°C). El precipitat de DNA es rentava amb etanol 70 % pre-refredat a -20°C i s'assecava en una centrífuga de buit. Finalment el DNA es ressuspensia en el volum desitjat d'aigua bidestil·lada estèril.

2.6.1.4 Aïllament de DNA plasmídic amb “kits”

2.6.1.4.1 Miniprep

Com a mètode ràpid de purificació de DNA plasmídic, a partir de cultius bacterians de tota la nit de 5 ml, es va seguir el protocol del “kit” Plasmix[®] de la casa comercial Talent, el fonament del qual es basa en la lisi alcalina seguida d'una adsorció del DNA plasmídic a una matriu de sílica. Les preparacions obtingudes per aquest mètode eren utilitzades generalment per a restriccions del DNA (veure apartat 2.6.2)

2.6.1.4.2 Midiprep

Per l'obtenció de DNA plasmídic a partir de 100 ml de cultius de tota la nit es va seguir el protocol del “kit” Wizard[®] Plus SV Midipreps de la casa comercial Promega, el fonament del qual està basat en la lisi alcalina (veure apartat 2.6.1.1). Les preparacions obtingudes per aquest mètode eren utilitzades generalment per a la restricció i purificació de banda (veure apartat 2.6.2 i 2.6.6 respectivament).

2.6.2 ÚS D'ENZIMS DE RESTRICCIÓ, LLIGACIÓ I MODIFICACIÓ

Pel tractament del DNA amb enzims de restricció (Gibco, Promega, Boehringer Mannheim), es va utilitzar els tampons (x10) subministrats amb els enzims i es van seguir les indicacions proporcionades pel proveïdor. La quantitat d'enzim per reacció no superava mai el 10% del volum total ja que l'activitat enzimàtica podria resultar-ne inhibida a causa del glicerol que contenen les preparacions d'enzims.

Pel tractament del DNA amb d'altres enzims com la fosfatasa alcalina (Roche) o la lligasa de T4 (USB) es van utilitzar els tampons subministrats amb l'enzim (x10) i es van seguir les instruccions proporcionades per les cases comercials.

Després del tractament amb cada un dels enzims anteriors, el DNA es purificava mitjançant el “kit” comercial Wizard[®] DNA Clean-up System de Promega.

2.6.3 AMPLIFICACIÓ DE FRAGMENTES DE DNA MITJANCANT LA REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Per a les reaccions d'amplificació de DNA per PCR es va utilitzar la polimerasa termoestable DynaZyme[™] i el tampó d'amplificació (x10) subministrat amb l'enzim (Fynnzymes Oy). Es tracta d'una DNA polimerasa nadiua i es van seguir les instruccions generals de la bibliografia i dels subministradors de l'enzim. Generalment l'amplificació s'ha fet des de colònia. El volum de les reaccions era generalment de 25 µl menys en els casos en que es pretenia fer un anàlisi massiu de clons en que aleshores s'utilitzaven 10 µl extrapolant les quantitats.

Les barreges de la reacció contenien:

Barreja de reacció (per 25 µl)	
Producte	Quantitat (µl)
H ₂ O bidestil·lada estèril	17
Tampó x 10	2,5
dNTP 10 mM (Amersham Pharmacia Biotech)	1
Oligonucleòtids 30 ng/µl	1,5 µl cadascun
DNA polimerasa DynaZyme [™] 2U/µl	0,5
Mostra*	1

* Es ressuspensia 1 colònia en 50 µl d'aigua bidestil·lada estèril i s'incubava 5-10 minuts a 100°C.

Els programes d'amplificació (temperatures, temps i número de cicles) variaven segons el gen a amplificar i els oligonucleòtids utilitzats. En cada PCR concreta s'especificarà el programa.

El termociclador utilitzat en tots els casos era un GeneAmp PCR System 2400 de Perkin Elmer.

Els productes d'amplificació resultants de la PCR s'analitzaven per electroforesi en gels d'agarosa (veure apartat 2.6.5). En els casos que el DNA amplificat s'hagués de

tractar amb enzims de restricció es procedia a la purificació d'aquest mitjançant el "kit" comercial Wizard[®] DNA Clean-up System de Promega.

2.6.4 SEQÜENCIACIÓ

El DNA es va seqüenciar pel mètode de Sanger, basat en la síntesi i terminació amb dideoxinucleòtids, mitjançant cicles de PCR. Es va utilitzar el "kit" ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit version 2.0 (Biosystems).

Barreja de reacció (per 10 µl)	
Producte	Quantitat
MiX de seqüenciació	4 µl
Oligonucleòtid	1,6 pmol
Mostra	2,5 µl (200-500 ng)
H ₂ O	Fins a 10 µl

El programa de PCR utilitzat va ser el següent:

Desnaturalització inicial: 96°C, 1'	} ⇒ x 25 cicles
Desnaturalització: 96°C, 10''	
Hibridació: 50°C, 35''	
Elongació: 60°C, 4'	

Un cop finalitzada la reacció, als 10 µl se li afegien 64 µl d'etanol 95% i 26 µl d'aigua bidestil·lada estèril. La barreja es deixava precipitar durant 15 minuts a temperatura ambient i a continuació es centrifugava durant 20 minuts a 16.000 x g, s'extreia l'etanol i se li tornava a afegir 200 µl d'etanol ara al 70% i es centrifugava de nou durant 5 minuts a 16.000 x g. Es treia l'etanol amb cura i s'assecava en una centrífuga de buit. La mostra es va analitzar en el seqüenciador ABI PRISM[®] 3700 DNA Analyzer als Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

2.6.5 ELECTROFORESI DE DNA EN GELS D'AGAROSA

(Sambroock *et al.*, 1989)

El DNA plasmídic es va analitzar mitjançant electroforesi en gels horitzontals d'agarosa.

2.6.5.1 Preparació del gel i tampons d'electroforesi

Es varen preparar els gels horitzontals d'agarosa (Pronadisa) a concentracions del 0,8 al 2 % depenent del tamany del DNA a analitzar. El tampó utilitzat tant en els gels com a la cubeta d'electroforesi era TBE x 0,5, que es preparava a partir d'una solució mare de TBE x 5.

TBE x 5	
Composició	Cocentració
Tris (Roche)	45mM
Àcid Bòric (Bio-Rad)	45 mM
EDTA (Merck)	1 mM

2.6.5.2 Preparació de les mostres

A les mostres a analitzar se'ls va afegir 1/5 volum de tampó de mostres:

Tampó de mostres x 5	
Composició	%
Bromofenol Blue (Bio-Rad)	0,25
Xilen Cianol (Bio-Rad)	0,25
Glicerol (Panreac)	60

Guardar a 4°C protegit de la llum

2.6.5.3 Marcadors de tamany molecular

Tant per a determinar el tamany com per a quantificar la quantitat de DNA present en una mostra, es carregaven en els gels 0,1 µg de marcadors de DNA de tamany molecular conegut.

Marcadors de tamany molecular	
Tipus	Tamany dels fragments (parells de bases)
Fag λ / HindIII (Promega)	23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 564, 125
Fag ΦX174 / HaeIII (Promega)	1.353, 1.078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72
100 bp ladder (Biotools)	1.031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80

Per gels de baix percentatge d'agarosa es va utilitzar el primer marcador, en canvi, pels gels d'elevat percentatge d'agarosa es van utilitzar el segon i tercer marcador.

2.6.5.4 L'electroforesi

Totes les electroforesis de DNA realitzades en aquest treball es van dur a terme en cubetes horitzontals MUPID-2 de Cosmo Bio. Després de carregar les mostres en els corresponents pouets, se'ls aplicava un voltatge de 50 a 100V.

2.6.5.5 Tinció del DNA amb Bromur d'etidi

Per tal de visualitzar el DNA en gels d'agarosa, es realitzava una tinció post-electroforètica amb bromur d'etidi (Merck). El gel es submergia durant un temps comprès entre 15-30 minuts en una solució de bromur d'etidi preservat de la llum a una concentració de 0,5 µg/ml en tampó TBE x 0,5 (apartat 2.6.5.1). Aquesta solució es preparava a partir d'una solució mare concentrada de 10 mg/ml, que es guaradava a 4°C preservada també de la llum.

Un cop tenyits els gels, es van observar amb llum ultraviolada i es van fotografiar (ImageMaster[®] VDS de Pharmacia).

2.6.6 AÏLLAMENT DE BANDES DE DNA A PARTIR DE GELS D'AGAROSA: ELECTROELUCIÓ

Quan es van necessitar fragments específics de DNA després d'una digestió o d'una amplificació per PCR, es va haver de recórrer al mètode de l'electroelució.

Després de la realització de l'electroforesi del DNA en agarosa i posterior tinció amb bromur d'etidi (veure apartat 2.6.5), es varen retallar les bandes d'interès visualitzades amb l'ajut d'un transil·luminador de longitud d'ona llarga i baixa intensitat per tal de no malmetre el DNA (UVL-56, BLACK-RAY[®] LAMP). Un cop teníem el bloc d'agarosa amb el DNA d'interès, es van col·locar dins una membrana de diàlisi (Sigma) prèviament tractada tal i com es descriu a la bibliografia (Sambrook *et al.*, 1989). Després d'introduir el bloc al tub, es va omplir totalment de TBE x 0,5 i es va tancar pels extrems amb pinces procurant que no hi quedés cap bombolla d'aire.

Es van introduir les membranes dins una cubeta d'electroforesi horitzontal plena de TBE x 0,5 (veure apartat 2.6.5) i es va procedir a l'electroelució del DNA de l'agarosa durant 60-90 minuts a 100 V. Transcorregut aquest temps, es va connectar la cubeta durant 10 segons amb polaritat inversa per desprendre el DNA de la membrana. Es va recuperar tot el tampó del sac de diàlisi i es va purificar el DNA bé per fenolització i precipitació amb etanol (apartat 2.6.1.3) o bé amb el "kit" comercial Wizard[®] DNA Clean-up System de Promega.

2.7 TÈCNIQUES EXPERIMENTALS AMB RNA

2.7.1 EXTRACCIÓ DE RNA CEL·LULAR TOTAL

2.7.1.1 Extracció de RNA mitjançant fenol acídic calent

El mètode d'extracció de RNA cel·lular total emprat fou el del fenol acídic calent (Koronakis *et al.*, 1988).

Cultius en medi LB de la soca a estudiar varen ser incubats a 37°C fins a arribar una DO₆₀₀ de 0,5 o 1. A continuació, es van centrifugar 50 ml de cultiu (11.000 x g, 10 minuts, 4°C) i el sediment cel·lular es va ressuspèndre en 600 µl de fenol acídic (pH 5,2) pre-escalfat a 60°C per a posteriorment afegir-li 600 µl de solució AES, agitar la barreja i deixar-la en incubació a 60°C durant 15 minuts. Acte seguit, es va posar la barreja en gel durant 10 minuts i es va agitar freqüentment de la mateixa manera que en l'anterior incubació. Després de centrifugar la barreja (16.000 x g, 3 minuts) es va prendre la fase aquosa i es va repetir l'extracció dues vegades més ara només amb fenol acídic. La fase aquosa recollida després de la tercera centrifugació es va extraure amb un volum de cloroform:alcohol isoamílic (24:1) per tal d'eliminar possibles restes de fenol de la mostra. El RNA obtingut es va precipitar amb 2-3 volums d'etanol absolut fred durant un mínim de 2 hores a -70°C, centrifugar (16.000 x g, 5 minuts), rentar amb etanol 70 % i es va ressuspèndre en 200 µl de solució d'hibridació o H₂O, en funció de la seva utilització (assaig de protecció front la Rnasa ONE™ o RT-PCR respectivament).

Solució d'hibridació**	
Composició	Concentració
PIPES (Sigma)	40 mM
Acetat sòdic (Merck)	200 mM
EDTA (Merck)	1 mM
Formamida desionitzada* (Merck)	80 %

* Formamida desionitzada amb reïna d'intercanvi iònic AG 501-X8(D) (Bio-Rad) al 10 % (p/v). Després d'agitar la barreja durant 1 hora, es va filtrar amb paper de cel·lulosa i es va guardar a -20°C.

** Es va preparar la solució concentrada x 5 sense formamida i es va ajustar el pH a 6,4 amb NaOH, es va esterilitzar i es va guardar a 4°C. La solució d'hibridació es va preparar barrejant la solució concentrada i la formamida desionitzada en una proporció 1:4.

Solució AES	
Composició	Concentració
Acetat Sòdic	50 mM
EDTA (Merck)	1mM
SDS (Merck)	0,5 %

Es va equilibrar el pH a 5,2 amb àcid acètic glacial

Preparació del fenol acídic: A partir 20 ml de fenol (Sigma) es van fer de 3 a 4 rentats amb Acetat sòdic 0,2 M pH 5,2 (ajustat amb àcid acètic glacial i posteriorment esterilitzat per autoclau). El fenol acídic es va guardar a 4°C.

2.7.1.2 Quantificació espectrofotomètrica del RNA

Es varen realitzar mesures d'absorbància a 260 i 280 nm. La relació entre els valors resultants de la lectura a ambdues longituds d'ona ens donarà una idea de la puresa del RNA:

- Si la relació $DO_{260} / DO_{280} < 2$, ens indica que hi ha contaminació amb proteïnes o fenol i no es pot realitzar una quantificació precisa.
- Si la relació $DO_{260} / DO_{280} = 2$, ens proporciona una estima de la puresa del RNA i ens permet calcular la concentració del RNA present a la mostra tenint en compte que:

$$1 \text{ Unitat de } DO_{260} = 40 \mu\text{g RNA} / \text{ml}$$

2.7.2 ELECTROFORESI DE RNA EN GELS D'AGAROSA I TINCIÓ AMB BROMUR D'ETIDI

Per a la realització d'electroforesis de RNA i posterior tinció dels gels, es va seguir exactament el mateix procediment que el descrit pel DNA (apartat 2.6.5) amb algunes precaucions per tal d'evitar la degradació del RNA: la cubeta d'electroforesi es va rentar amb SDS al 0,1 % per inhibir les possibles RNases existents en aquesta i el TBE x 0,5 es va esterilitzar per autoclau.

El tant per cent d'agarosa dels gels variava entre 0,8 i 1,5 %.

2.7.3 ASSAIG DE PROTECCIÓ EN FRONT LA RNasa ONE™

Un dels mètodes utilitzat per a analitzar el nivell de transcripció d'un gen determinat va ser l'assaig de protecció contra la RNasa ONE™. El RNA procedent de la transcripció del gen objecte d'estudi va ser protegit de la digestió per part de la RNasa ONE™ per hibridació amb una sonda de RNA anti-sentit marcada amb ³²P. La quantitat de sonda marcada i hibridada fou posteriorment quantificada per autoradiografia.

2.7.3.1 Obtenció d'una sonda de cadena senzilla marcada amb ³²P

Es va obtenir una sonda de RNA *in vitro* de cadena senzilla contra el gen a analitzar per transcripció a partir de la seqüència corresponent al gen sencer que havia estat clonada en un vector pET3 bque conté un promotor per a la RNA polimerasa del bacteriòfag T7 d'*E. coli*. La seqüència del DNA que va actuar de motlle es trobava clonada darrera del promotor de T7 en l'orientació que permetés la producció del RNA anti-sentit (complementari al mRNA).

2.7.3.1.1 Preparació d'un motlle de DNA

El plàsmid pET-ydgT_r conté la seqüència que va servir de motlle per a la síntesi de la sonda anti-sentit utilitzada en aquest treball. El fragment del gen *ydgT* que va actuar de DNA motlle en la transcripció es troba en un lloc de clonatge múltiple situat darrera del promotor del bacteriòfag T7. Per a permetre la transcripció a partir del promotor de només la seqüència clonada, el DNA aïllat es va tallar amb l'enzim de restricció *Bam*HI situat just darrera del fragment clonat. Per a determinar la quantitat de DNA motlle de que es disposava i comprovar que el plàsmid estava completament linearitzat, es va realitzar una electroforesi de la restricció en un gel d'agarosa 0,8 % i posteriorment es va tenyir amb bromur d'etidi.

2.7.3.1.2 Síntesi *in vitro* de RNA dirigida per la RNA polimerasa del bacteriòfag T7

Les condicions utilitzades en la transcripció *in vitro* de DNA plasmídic linearitzat que conté un promotor del bacteriòfag T7 d' *E. coli* varen ser les que s'indiquen a la taula.

La barreja es va deixar incubar 2 hores i 30 minuts a 37°C. A continuació se li van afegir 5 µl de tRNA de *Saccharomyces cerevisiae* (10 µg/µl) i 1,5 µl de DNasa I lliure de RNases 10 U / µl (Amersham Biosciences). Aquesta segona barreja es va incubar durant 1 hora a 37°C.

Barreja de reacció	
Producte	Quantitat
Tampó x 10 RNA polimerasa de T7 (Roche)	10 µl
Barreja de NTPs (ATP, CTP i GTP 25 mM, UTP 5 mM) (Roche)	2 µl
DNA plasmidic linearitzat	500 ng
RNasin (30 U / µl) (Promega)	1 µl
[α-32p] UTP (3.000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) (Amersham Biosciences)	3 µl
RNA-polimerasa de T7 (20 U / µl) (Roche)	1,5 µl
Portar a un volum final de 100 µl amb aigua bidestil·lada	

Per a l'extracció i rentat del RNA es va afegir 100 µl d'una barreja de fenol acídic (pH 5,2):cloroform:alcohol isoamílic (25:24:1), es va barrejar amb la pipeta i es va centrifugar (16.000 x g, 5 minuts). La fase aquosa resultant es va barrejar amb 200 µl d'Acetat d'amoni 2,5 M i 1 ml d'etanol absolut i es va deixar 1 hora a -70°C. Passat aquest temps es va centrifugar (16.000 x g, 10 minuts) i el precipitat es va rentar amb 100 µl d'etanol al 70 % i centrifugar de nou. El precipitat obtingut en aquest pas es va ressuspendre en 100 µl de solució d'hibridació (apartat 2.7.1.1).

La sonda obtinguda d'aquesta manera es troba en una proporció marcada / no marcada radioactivament d'1/1.000, en una quantitat global de 10 µg, assumint una incorporació total. Es va mantenir a -20°C i es va utilitzar abans d'un màxim de 3 dies ja que en períodes de temps superiors la degradació per radiòlisi és molt important. Es va comprovar el marcatge per electroforesi en condicions desnaturalitzants i posterior autoradiografia tal i com es descriu a l'apartat 2.7.3.4.

2.7.3.2 Hibridació RNA-sonda radioactiva

Un excés de sonda de RNA de cadena senzilla marcada amb ^{32}P es va barrejar en solució amb el RNA a analitzar, permetent d'aquesta manera la formació d'híbrids de seqüències complementàries RNA- ^{32}P :RNA.

Abans de realitzar la barreja d'hibridació, es van incubar les mostres de RNA durant 10 minuts a 85°C per tal de desfer totes les estructures secundàries que es poguessin haver format. Transcorregut aquest temps, es varen barrejar 25 μg de RNA amb un excés de sonda radioactiva (barreja no superior a 50 μl) que es van deixar incubant durant tota la nit a temperatura ambient per a permetre la hibridació entre les cadenes complementàries.

2.7.3.3 Assaig de protecció contra la RNasa ONE™

Per a la realització de l'assaig es varen seguir les indicacions de la bibliografia (Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1992) i dels proveïdors dels enzims.

A la barreja d'hibridació obtinguda tal i com s'explica a l'apartat anterior se li va afegir tampó de digestió, de tal manera que es diluís la barreja entre 8 i 10 vegades, i 0,5 unitats de RNasa ONE™ (Boehringer Mannheim). La barreja es va incubar durant 1 hora a temperatura ambient i es va precipitar amb 2-3 volums d'etanol absolut fred durant 1 hora a -70°C . Després es va centrifugar (16.000 x g, 10 minuts), es va descartar el sobrenedant i es va deixar assecar la mostra a l'aire. Quan la mostra ja va ser seca, es va ressuspendre en 50 μl de tampó de càrrega i es va guardar a -20°C fins a l'hora de ser analitzat per electroforesi.

Tampó de digestió de la RNasa ONE™	
Composició	Concentració
Tris (Roche)	10 mM
EDTA (Merck)	5 mM
Acetat de Sodi (Merck)	200 mM

Ajustar a pH 7,5, esterilitzar per autoclau i guardar a 4°C .

Tampó de càrrega	
Composició	Concentració
Tris (Roche)	10 mM
EDTA (Merck)	1 mM
SDS (Merck)	0,1 %
Formamida desionitzada (Merck)	80 %
Blau de bromofenol (Millipore)	0,1 %

Ajustar a pH 8,0

2.7.3.4 Electroforesi de RNA en gels desnaturalitzants de poliacrilamida/urea i autoradiografia

2.7.3.4.1 Electroforesi

Tant la sonda marcada com els fragments protegits front la RNasa ONE™ varen ser analitzats per electroforesi en minigels de 1,5 mm de gruix de poliacrilamida al 7,2 %/urea 6 M en tampó TBE x 0,5 (veure apartat 2.6.5.1).

L'equip utilitzat per a la preparació dels minigels i l'electroforesi fou el Mini-PROTEAN II (Bio-Rad).

Per preparar els gels, es van polimeritzar 10 ml de TBE-Urea-PAGE amb 100 µl d'APS (Bio-Rad) al 10% i 10 µl de TEMED (Bio-Rad)

Solució TBE-Urea-PAGE	
Composició	Quantitat
Urea (Bio-Rad)	21 g
Acrilamida / Bis 20%T, 5%C	6 ml
TBE x 5	5 ml
Portar fins a 50 ml amb aigua destil·lada	

%T: Percentatge d'acrilamida + bisacrilamida

%C: Percentatge de bisacrilamida respecte a T ("cross-linking")

Acrilamida/Bis 20%T 5%C: Es van barrejar 19 g d'acrilamida (Bio-Rad) i 1 g de bisacrilamida (Bio-Rad) en un volum final de 100 ml. Un cop dissolta, la solució es va filtrar amb paper de cel·lulosa, desionitzar amb reïna AG 501-X8(D) (Bio-Rad) durant 2 hores i filtrar de nou. Es va guardar a 4°C preservada de la llum.

Un cop polimeritzat el gel, es van rentar els pous i es va fer un pre-escalfament d'una hora a 120 V. Tot seguit es van carregar 25 µl de les mostres després de desnaturalitzar-les a 85°C durant 10 minuts. Es va córrer el gel durant 1 hora i 15 minuts a 100 V.

2.7.3.4.2 Autoradiografia

Després de l'electroforesi, el gel es va col·locar sobre un paper de filtre Whatman 3 MM del mateix tamany, cobert amb film de plàstic i es va assecar al buit amb un assecador de gels a 80°C.

Una pel·lícula (Hyperfilm MP, Amersham Biosciences) va ser exposada al gel sec a -70°C durant períodes variables de temps (de 30 minuts a 1 dia) en un cassette d'autoradiografia Gevomatic 18 x 24 amb pantalles amplificadores Curix C-2 (Agfa) i es va revelar automàticament (RG II, Fuji X-Ray, Film Processor).

2.7.4 ANÀLISI QUANTITATIU DEL RNA PER RT-PCR

Com ja s'ha esmentat anteriorment, l'anàlisi del nivell de transcripció d'un gen es va realitzar per altres mètodes diferents a l'assaig front la RNasa, com ara la RT-PCR. El RNA procedent de la transcripció del gen objecte d'estudi va ser retro-transcrit amb la transcriptasa inversa de M-MuLV a DNA còpia i posteriorment aquest DNA va ser amplificat per PCR.

2.7.4.1 Digestió amb DNasa I

El RNA obtingut segons el procediment descrit en l'apartat 2.7.1, va ser tractat amb DNasa I lliure de RNasa 10 unitats/µl (Amersham Biosciences). Es van afegir 20 unitats de DNasa en 50 µl de mostra i es van portar a un volum final amb aigua de 600 µl. La barreja es va incubar durant 1 hora a 37°C. Transcorregut aquest temps es va eliminar l'enzim amb un rentat 1:1 amb fenol acídic (apartat 2.7.1.1), 1 rentat amb ½ fenol acídic: ½ cloroform i

2 rentats 1:1 amb cloroform i es va precipitar el RNA a -70°C amb 2 volums d'etanol absolut i 1/10 de volum d'Acetat d'amoni 2,5 M. Passades 2 hores es va centrifugar la mostra durant 10 minuts a 4°C i es va rentar amb $100\ \mu\text{l}$ d'etanol 70%. Es va deixar secar el pellet a temperatura ambient i es va ressuspèndre en $50\ \mu\text{l}$ d'aigua Milli-Q.

La mostra obtinguda es va quantificar mitjançant la lectura espectrofotomètrica a les longituds d'ona de 260 i 280 nm (apartat 2.7.1.2).

2.7.4.2 RT-PCR

Totes les mostres de RNA es van diluir a la concentració de $300\ \text{ng}/\mu\text{l}$.

Per tal d'eliminar possibles estructures secundàries del RNA, totes les mostres ja diluïdes es van incubar durant 5 minuts a 80°C en el termociclador. A continuació es van mantenir en gel fins a ser utilitzades.

Les quantitats utilitzades per a cada reacció es descriuen a la següent taula:

RT-PCR	
Composició	Quantitat
Ready-to-Go RT-PCR Beads (Amersham Biosciences)	1 bola
Oligonucleòtid RT $10\ \text{pmols}/\mu\text{l}$	$2\ \mu\text{l}$
Oligonucleòtid PCR $10\ \text{pmols}/\mu\text{l}$	$2\ \mu\text{l}$
RNA ($300\ \text{ng}/\mu\text{l}$)	$2\ \mu\text{l}$
H_2O Milli-Q*	Fins a $50\ \mu\text{l}$

* Afegir l' H_2O en primer lloc fins que la bola deshidratada es dissolgui i a continuació afegir la resta de components.

El programa de RT-PCR utilitzat va ser el següent:

Retro-transcripció: 42°C , 1h	
Inactivació Transcriptasa inversa: 95°C , 5'	
Desnaturalització: 95°C , 30''	} \Rightarrow x 40 cicles
Hibridació: 54°C , 30''	
Elongació: 72°C , 30''	
Finalització: 72°C , 10'	

Per tal d'assegurar-nos que la mostra no contenia cap traça de DNA, es van realitzar els corresponents controls amb cada una de les mostres. Per fer-ho, en primer lloc es va afegir l'aigua corresponent a la bola deshidratada i un cop dissolta es va mantenir durant 10 minuts a 95°C per tal d'inactivar la transcriptasa inversa. A continuació se li van afegir la resta de components de la reacció i es va procedir igual que amb les mostres problema.

Un cop finalitzada la reacció, es va analitzar 10 µl de cada una de les mostres per electroforesi en gel d'agarosa al 2% i tinció en bromur d'etidi (apartat 2.6.5).

2.8 TÈCNiques EXPERIMENTALS AMB PROTEÏNES

2.8.1 OBTENCIÓ D'EXTRACTES

2.8.1.1 Obtenció d'extractes crus per French-Press

Cultius crescuts en 500 ml de medi LB fins a DO_{600} entre 0,5 i 1, es van centrifugar (11.000 x g, 10 minuts, 4°C) i el precipitat cel·lular es va ressuspèndre en 10 ml del tampó adient segons l'experiment a realitzar. Aquesta nova suspensió cel·lular es podia congelar i descongelar per tal d'afavorir el trencament de les cèl·lules o bé passar directament a trencar-les per pressió mitjançant la French Press (French Pressure Cell Press, SLM AMINCO). Les cèl·lules van ser lisades després de passar-les 3 cops consecutius a 1.000 PSIG de pressió. En el cas que es requerís un extracte clarificat, l'extracte es va centrifugar (16.000 x g, 30 minuts, 4°C) i es va recollir el sobrenedant.

2.8.1.2 Obtenció d'extractes per al rentat de sèrums immunes

La soca d'*E. coli* que fou utilitzada amb la finalitat de rentar els anti-sèrums obtinguts contra YdgT va ser la soca 5K *ydgT*. Aquesta soca té una deleció en el gen *ydgT* que comprèn entre altres zones la zona dels promotors putatius, impeding així la seva expressió.

Per a obtenir els extractes, es van recollir per centrifugació (3000 x g, 10 minuts, 4°C) les cèl·lules de 60 ml d'un cultiu de la soca 5K *ydgT* a una DO_{600} de 1 aproximadament. El precipitat cel·lular es va rentar amb 20 ml de PBS i es va centrifugar de nou en les mateixes condicions. Les cèl·lules varen ser ressuspèses en 6 ml de tampó RIPA amb PMSF 1 mM. La lisi del cultiu es va realitzar per ultrasons en sotmetre les cèl·lules a quatre intervals de 30 segons a 90 W (Homogenitzador ultrasònic, Labsonic 1510. B. Braun). A continuació l'extracte es centrifugà (12.000 x g, 20 minuts, 4°C), recollint tot seguit el sobrenedant que fou emmagatzemat a -20°C fins al moment del seu ús.

PBS	
Composició	Concentració
NaCl (Panreac)	136 mM
KCl (Merck)	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ (Merck)	10 mM
KH ₂ PO ₄ (Merck)	1,7 mM

Ajustar a pH 7,4 i esterilitzar a l'autocalu

Tampó RIPA	
Composició	Concentració
NaCl (Panreac)	5 mM
Nonidet P-40 (Sigma)	1 %
Deoxicolat sòdic (Sigma)	0,5 %
SDS (Merck)	0,1 %
Tris	50 mM

Ajustar a pH 8,0 i esterilitzar a l'autoclaui

PMSF: es prepara una solució de PMSF (Merck) 100 mM en isopropanol (Panreac), i s'afegeix al tampó RIPA abans de la seva utilització.

2.8.1.3 Fraccionament cel·lular

Es van obtenir les fraccions periplasmàtiques i citoplasmàtiques de cultius de diferents soques per analitzar el contingut de proteïnes a cada compartiment cel·lular. Les fraccions obtingudes es van quantificar pel mètode de Bradford (apartat 2.8.2) i analitzar posteriorment mitjançant electroforesi en gels de poliacrilamida al 12,5% (apartat 2.8.3.1.1).

2.8.1.3.1. Fracció periplasmàtica

Es van centrifugar (3.000 x g, 10 minuts) 10 ml d'un cultiu en fase exponencial i el precipitat cel·lular es va ressuspènere en 1 ml de tampó de xoc fred, més 100 µl d'una solució fresca de liozím (1 mg/ml). La barreja es va deixar 3 minuts en gel i posteriorment es va centrifugar durant 30 segons a 16.000 x g. Es va recollir el sobrenedant, corresponent a la fracció periplasmàtica.

Tampó de xoc	
Composició	Concentració
Tris (Roche)	33 mM
EDTA (Merck)	1 mM
Sacarosa (BDH)	20%
PMSF *	1 mM

Ajustar a pH 8,0, autoclavar i conservar a 4°C.
* A partir d'una solució 10 mM en isopropanol.
Afegir just abans del seu ús.

2.8.1.3.2 Fracció citoplasmàtica

El sediment obtingut en l'apartat anterior, es va ressuspèndre en 1 ml de tampó de xoc fred, més 100 µl d'una solució de lizozim (5 mg/ml). La barreja es va deixar 20 minuts en gel i després es va congelar i descongelar. Es va centrifugar (16.000 x g, 1 minut) i es va recollir el sobrenedant, corresponent a la fracció citoplasmàtica.

2.8.1.4 Obtenció d'extractes de la fracció externa per a la detecció d'α-hemolisina

L'hemolisina és la proteïna majoritària secretada per soques d'*Escherichia coli* portadores de plàsmids hemolítics. Per determinar l'efecte de diferents mutacions o condicions de creixement sobre la producció d'hemolisina, es van obtenir les proteïnes dels sobrenedants dels cultius i es van analitzar per western blotting.

Es centrifugaven 10 ml de cultiu a DO₆₀₀ de 0,8 durant 10 minuts a 3.000 x g. Les proteïnes del sobrenedant es van concentrar 200 vegades per precipitació amb acetona. Per fer-ho, es van afegir 3 volums d'acetona freda als 10 ml de sobrenedant i es va agitar. La barreja es va mantenir tota la nit a 4°C en posició vertical per a permetre la precipitació de les proteïnes. A continuació es va centrifugar la barreja (27.000 x g, 30 minuts a 4°C) i es va treure el sobrenedant amb cura. El precipitat que s'observava es va assecar a una centrifuga de buit (Speed-Vac, model 100, Savant Instruments Inc.) i es va ressuspèndre en 0,5 ml d'aigua bidestil·lada estèril. Es va realitzar una segona precipitació amb 3 volums d'acetona a 4°C un mínim de 2 hores i a continuació es va repetir el procediment anterior. Finalment, el precipitat es va ressuspèndre en 50 µl d'aigua bidestil·lada estèril. Les mostres es van guardar a -20°C fins al moment de la seva utilització.

Per a l'anàlisi d' α -hemolisina es va realitzar una immunodetecció per western blotting (apartat 2.8.9). Per tal de carregar quantitats comparatives de cada mostra, es van igualar els volums en funció del número de cèl·lules viables en el moment de la presa de la mostra, quantificat mitjançant un banc de dilucions del cultiu i sembra en placa.

2.8.1.5 Obtenció d'extractes per a l'anàlisi electroforètic de 2D-PAGE

Cultius crescuts en 250 ml de medi LB fins a DO_{600} de 0,7 es van centrifugar (11.000 x g, 30 minuts, 4°C) i el precipitat cel·lular es va ressuspendre en 5 ml de tampó de rentat. Es va repetir el rentat fins un total de 4 vegades. A continuació es van realitzar 2 rentats més amb 5 ml de tampó TS. Finalment, el precipitat cel·lular obtingut es va congelar a -80°C durant 1 hora. Un cop descongelat, es va ressuspendre en 900 μ l de tampó de rehidratació i es va procedir a sonicar la mostra durant 1'30" a 90 W (3 polsos de 30"). Després de sonicar la mostra es va ultra-centrifugar (147.000 x g, 30 minuts, 4°C). Del sobrenedant obtingut se'n va fer una valoració de la concentració de proteïnes pel mètode de Bradford (apartat 2.8.2) i la resta es va al·liquotar i es va guardar a -80°C fins al seu ús.

A l'hora de carregar la mostra en l'electroforesi 2D-PAGE (apartat 2.8.3.2) es van utilitzar 100 μ g de cada una de les mostres. Per fer-ho, es va diluir la mostra necessària en tampó de rehidratació fins a 350 μ l.

Tampó TS	
Composició	Concentració
Tris (Roche)	10 mM
Sorbitol (Panreac)	1 mM

Tampó de rentat	
Composició	Concentració
KCl (Merck)	30 mM
KH ₂ PO ₄ (Merck)	1,5 mM
NaCl (Panreac)	68 mM
NaH ₂ PO ₄ (Merck)	9 mM

Preparat a partir d'una solució concentrada x 10.

Tampó de rehidratació	
Composició	Concentració
Urea (Sigma)	7 M
Tiourea (Sigma)	2 M
CHAPS (Sigma)	2 % (p/v)
Blau de bromofenol	Traces
IGP buffer (pI:4-7) (Amersham Pharmacia)	0,5 % (per IPGphor)

Fer aliquotes de 2 ml i guardar a -20°C. Just abans d'utilitzar afegir 5,6 mg de DTT / 2 ml de tampó i PMSF 10 mM.

2.8.1.6 Obtenció de proteïnes de membrana

Es van obtenir les proteïnes de membrana externa de cultius de diferents soques per comparar les proteïnes localitzades a la membrana. Es van analitzar mitjançant electroforesi en gels de poliacrilamida al 15% 20 µl de cada mostra (apartat 2.8.3.1.1).

A partir d'un cultiu crescut tota la nit, es van centrifugar 10 ml durant 10 minuts a 3000 x g i a 4°C. El precipitat cel·lular es va ressuspènere en 1 ml de tampó de ressuspensió i es va centrifugar de nou durant 5 minuts. Les cèl·lules es van ressuspènere amb 1 ml de tampó de ressuspensió i es van lisar per sonicació a 50 W en dos polsos de 30 segons. L'extracte resultant es va centrifugar durant 1 minut per eliminar les restes cel·lulars i a continuació el sobrenedant es va centrifugar a 16.000 x g a 4°C durant 1 hora. Passat aquest temps, es va ressuspènere en 350 µl de tampó de ressuspensió, se li van afegir 350 µl més de Laurosil Sarcosinat Sòdic al 1,2 % (p/v) i es va incubar la barreja durant 20 minuts a temperatura ambient. Transcorreguts els 20 minuts es va tornar a centrifugar (16.000 x g, 30 minuts, temperatura ambient) i es va retirar el sobrenedant (proteïnes de membrana interna), el precipitat es va ressuspènere en 100 µl d'H₂O Milli-Q i se li van afegir 3 volums d'acetona prèviament freda i es va deixar a 4°C. Al cap de 2 hores es va centrifugar (16.000 x g, 4°C, 15 minuts) i es va ressuspènere el precipitat en 100 µl d'H₂O Milli-Q (proteïnes de membrana externa).

2.8.2 VALORACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNES PEL MÈTODE DE BRADFORD (Microassaig)

(Bradford, 1976)

Per a la determinació de quantitat de proteïna present en una mostra es va utilitzar el reactiu “Protein Assay Dye Reagent Concentrates” de Bio-Rad. Es va seguir el procediment indicat per la casa comercial basat en el mètode descrit per Bradford al 1976 segons el qual les proteïnes presenten afinitat pel Blau de Coomassie.

Es va preparar una solució concentrada de BSA (Boehringer Mannheim) de 25 mg/ml. A partir d'aquesta solució de BSA es prepararen les dilucions 25, 12,5, 6,25, 3,125 i 1,56 ($\mu\text{g/ml}$). La recta patró es va construir per duplicat a partir de 0,8 ml de cada una d'aquestes dilucions més 0,2 ml de reactiu de Bradford. Així, les quantitats de proteïna de les diferents dilucions que formarien la recta patró serien de 20, 10, 5, 2,5 i 1,25 (μg). Per la determinació de la concentració de proteïna de les mostres assajades, es varen afegir entre 5 i 25 μl de cada mostra problema a barreges de 0,2 ml de reactiu de Bradford més la quantitat corresponent d'aigua fins a arribar a 1 ml de volum total.

A continuació es passava a realitzar la lectura de l'absorbància a DO_{595} de totes les mostres. La concentració de proteïna de les mostres es va calcular extrapolant a partir de la recta patró els valors de l'absorbància de les mostres problema i fent la correcció segons el volum de mostra assajat.

2.8.3 TÈCNiques D'ELECTROFORÈSI DE PROTEÏNES

2.8.3.1 Gels de poliacrilamida

La separació en funció del tamany molecular de les proteïnes d'una determinada mostra es va realitzar mitjançant electroforesi en gels de poliacrilamida desnaturalitzants utilitzant en la majoria dels casos l'equip MINI-PROTEAN II™ de Bio-Rad, que permet obtenir gels verticals de 7,3 cm d'alçada, 8 cm d'amplada i 0,75 o 1,5 mm de gruix.

2.8.3.1.1 Gels de poliacrilamida en Tris-Glicina-SDS

(Laemmli, 1970)

Aquests tipus de gels estan formats per dues fases: la fase de compactació i la fase de resolució. La primera correspon a la $\frac{1}{4}$ part superior del gel i conté un 5% de poliacrilamida en tots els casos. La segona fase ocupa la resta del gel i els percentatges més utilitzats de poliacrilamida van ser de 10%, 12,5% i 15% segons els tamanys de les proteïnes que es volguessin separar en cada cas.

La composició de cada fase es mostra a la següent taula:

	Fase de Resolució			Fase de Compactació
	10%	12,5%	15%	5%
Acrilamida/Bis 30,8%T, 2,6%C	2 ml	2,5 ml	3 ml	0,8 ml
Tampó de resolució x 4	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	-
Tampó de compactació x 4	-	-	-	1,25 ml
Aigua bidestil·lada	2,5 ml	2 ml	1,5 ml	2,92 ml
APS 10%	30 μ l	30 μ l	30 μ l	35 μ l
TEMED (Bio-Rad)	5 μ l	5 μ l	5 μ l	10 μ l

% T: Percentatge d'acrilamida + bisacrilamida

% C: Percentatge de bisacrilamida respecte el total (T)

Un cop introduïda la fase de resolució entre els vidres, s'afegia aigua bidestil·lada per afavorir la polimerització del gel i per tal que la fase quedés formant una superfície superior horitzontal.

En afegir posteriorment la fase de compactació, s'introduïa en el gel encara no polimeritzat la tinta per formar els pous.

Les mostres es varen carregar després d'afegir-hi tampó de mostres x 4 i de incubar-les durant 5-10 minuts a 100°C.

Després de carregar les mostres s'aplicava un voltatge de 50 V fins que les mostres s'havien compactat. A continuació, s'augmentava el voltatge a 120 V fins al final de l'electroforesi.

Tot seguit es detalla la composició de les solucions utilitzades:

Tampó de Resolució x 4	
Composició	Concentració
Tris (Roche)	1,5 M
SDS (Merck)	0,4 %

Ajustar a pH 8,8

Tampó de Compactació x 4	
Composició	Concentració
Tris (Roche)	0,5 M
SDS (Merck)	0,4 %

Ajustar a pH 6,8

Tampó de Recorregut x 10	
Composició	Concentració
Tris (Roche)	0,25 M
SDS (Merck)	1 %
Glicina (Fluka)	1,92 M

pH 8,3 (no ajustat)

Tampó de Mostres x 4	
Composició	Concentració
Glicerol (Panreac)	20 %
β -mercaptoetanol (Bio-Rad)	10 %
SDS (Merck)	4,6 %
Tris (Roche)	0,125 M
Blau Bromofenol (Millipore)	0,2 %

Ajustar a pH 6,8

Acrilamida/Bis-acrilamida 30,8%T, 2,6% C: Es van dissoldre 30 gr d'acrilamida (Bio-Rad) més 0,8 gr de Bis-acrilamida (Bio-Rad) en d'aigua bidestil·lada. Un cop dissolt es va enrasar a 100 ml, es va filtrar amb paper de cel·lulosa i es va guardar a 4°C preservant la solució de la llum.

Solució d'APS al 10%: Es va preparar una solució d'APS (Bio-Rad) en aigua destil·lada a una concentració de 100 mg/ml.

2.8.3.1.2 Gels de poliacrilamida en Tris-Tricina-SDS

(Schägger i von Jagow, 1987)

Les electroforesis en gels desnaturalitzants de poliacrilamida en Tris-Tricina-SDS es van utilitzar per a separar amb més resolució proteïnes de pes molecular comprès entre 5 i 50 kDa. Aquest tipus de gels consten de tres fases: fase de compactació, fase espaiadora i fase de resolució. La primera i segona fase ocupen $\frac{1}{4}$ part del gel cada una i l'última fase ocupa la segona meitat del gel.

Per a la preparació del gel i les mostres, es va seguir el mateix protocol descrit en l'apartat 2.8.3.1.1 però en aquest cas varia la composició dels tampons utilitzats.

La composició d'aquest tipus de gels era sempre la mateixa i es mostra a continuació:

	Fase de resolució 16,5%T 3%C	Fase espaiadora 10%T 3%C	Fase de compactació 4%T 3%C
Acrilamida/Bis 49,5%T 3%C	1 ml	0,3 ml	0,15 ml
Tampó del gel	1 ml	0,5 ml	0,45 ml
Glicerol 50 %	0,8 ml	-	-
Aigua bidestil·lada	0,2 ml	0,7 ml	1,26 ml
APS 10 %	20 µl	10 µl	15 µl
TEMED	4 µl	2 µl	3 µl

% T: Percentatge d'acrilamida + bisacrilamida total

% C: Percentatge de bisacrilamida respecte T

Tot seguit es detalla la composició de les solucions utilitzades:

Acrilamida/Bis-acrilamida 49,5% T, 3% C: Es dissolien 48 gr d'acrilamida (Bio-Rad) més 1,5 gr de bis-acrilamida (Bio-Rad) en aigua bidestil·lada. Un cop dissolt s'enasava a 100 ml, es filtrava amb paper de cel·lulosa i es guardava a 4°C preservat de la llum.

Tampó de recorregut:

Tampó de l'ànode	
Composició	Concentració
Tris (Roche)	0,2 M

Ajustar a pH 8,9

Tampó del càtode	
Composició	Concentració
Tris (Roche)	0,1 M
Tricina (Bio-Rad)	0,1 M
SDS (Merck)	0,4 %

pH 8,25 no ajustat

Tampó del Gel x 3	
Composició	Concentració
Tris (Roche)	3 M
SDS (Merck)	0,3 %

Ajustar a pH 8,45

2.8.3.1.3 Gels de poliacrilamida en Tris-Glicina (Gels nadius)

L'electroforesi en gels d'acrilamida no desnaturalitzants es va realitzar per a la separació de proteïnes i posterior detecció en aquells estudis que calia mantenir la forma nadiua de la proteïna o oligòmers formats en condicions naturals dins de la cèl·lula.

Per a la preparació dels gels nadius i de les mostres es va seguir el mateix protocol que el descrit per a gels de poliacrilamida en Tris-Glicina-SDS (apartat 2.8.3.1.1), però en aquest cas tots els tampons es van preparar sense SDS. En el cas del tampó de mostres tampoc se li va afegir β -mercaptoetanol i les mostres no es van bullir abans de ser carregades.

Com que les mostres en un gel nadiu migren segons la càrrega intrínseca (depenent del seu punt isoelèctric i del pH del tampó), es van realitzar dos gels per a cada conjunt de mostres. Cada un d'aquests gels es feia córrer cap a una polaritat, un cap el pol negatiu i l'altre gel cap el pol positiu.

2.8.3.2 Gels de 2D-PAGE

2.8.3.2.1 Primera dimensió

Tant la primera com la segona dimensió es van realitzar al laboratori d'Espectrometria de Masses Estructural i Biològica de l'IIBB (CSIC).

Per a la primera dimensió es va utilitzar l'equip IPGphor (Amersham Biosciences). Es van aplicar els 350 μ l de mostra (obtinguda tal i com es descriu en l'apartat 2.8.1.5) al centre de la cubeta de la tira i es va introduir la tira amb la cara del gel cap a baix (Amersham Biosciences) amb molta cura de no fer bombolles dins la cubeta i movent-la cap endavant per tal d'impregnar el gel amb tota la mostra. Un cop acabat aquest procé, es van aplicar unes gotes de IPG Cover Fluid (Amersham Pharmacia) fins que quedés tota la

tira coberta per tal d'evitar l'evaporació i la cristallització de la urea. A continuació es va tapar la cubeta i es va dipositar sobre el sistema IPGphor.

El programa d'isoelectroenfoc per la tira de 18 cm i rang de pI:4-7 fou el següent:

{	6 h a 0 V (rehidratació de la tira)
	6 h 30 min. A 30 V
	1 h a 500 V
	1 h a 1000 V
	6 h 30 min a 8000 V

En tot moment es va mantenir la temperatura a 20°C.

Si no s'havia de procedir a la realització de la segona dimensió d'immediat es guardava la tira a -80°C dins d'una pipeta de plàstic d'un sol ús.

2.8.3.2.2 Segona dimensió

2.8.3.2.2.1 Preparació del gel

Es van preparar 450 ml d'una solució d'acrilamida/bisacrilamida al 12 %, per prepara els gels d'1 mm de gruix utilitzats a la segona dimensió. Els volums necessaris s'indiquen a continuació:

Solució acrilamida/bis 12 %	
Composició	Volum
H ₂ O Milli-Q	153 ml
30 % / 0,8 % acril / bis (Duracryl, Oxford Glycosystems)	180 ml
Tampó de resolució (apartat 2.8.3.1.1)	112,5 ml
SDS 10 %	4,5 ml
APS 10 %	2,25 ml
TEMED	380 µl

Es van preparar tots els gels alhora, carregant l'acrilamida en el sistema de muntatge dels gels Ettan Dalt VI d'Amersham Biosciences. Es va omplir d'acrilamida fins a uns 0,5 cm per sota del vidre petit. Aleshores es van afegir 2 ml de n-butanol (50 ml de n-butanol en 10 ml d'H₂O Milli-Q) sobre cada gel i es va deixar polimeritzar. Transcorreguda 1 hora es va descartar el n-butanol i es va rentar varies vegades amb aigua.

2.8.3.2.2.2 Equilibrat de la tira

Els rentats de les tires es van realitzar dins de la pròpia pipeta on havia estat emmagatzemada amb els extrems tapats amb paper de plata i parafilm.

Es van afegir 5 ml de tampó d'equilibrat-SDS(1) a cada pipeta i es va deixar agitar suaument durant 15 minuts. A continuació es va descartar el tampó i es va repetir el procés una altra vegada però ara amb tampó d'equilibrat-SDS(2).

Tampó d'equilibrat-SDS	
Composició	Concentració
Tris (Roche)	50 mM
Urea (Sigma)	6 M
Glicerol 87 %	30 %
SDS (Merck)	2 %
Blau de bromofenol	2-3 g

Ajustar a pH 8,8

(1): Afegir 100 mg de DTT / 10 ml de tampó

(2): Afegir 250 mg de iodoacetamida (IAA) / 10 ml de tampó

2.8.3.2.2.3 Col·locació de la tira en el gel

Un cop equilibrada la tira es va introduir la tira en el pou que havíem format en el gel d'acrilamida, de tal manera que la cara que contenia el gel quedés contra el vidre petit. Cal recordar també on es posa l'ànode (+). Per a la introducció correcta de la tira ens vam ajudar d'una superfície de plàstic i vam anar apretant suaument la tira contra el gel fins que entrés plenament en contacte amb aquest. A continuació es va col·locar a la dreta del gel un retall de 0,5 cm x 0,5 cm impregnat amb 5 µl de marcador de pes molecular de precisió (Bio-Rad) (apartat 2.8.3.3). Per tal de segellar la tira i el gel es van afegir entre 1 i 2 ml

d'agarosa 0,5 % (en tampó de recorregut). Amb l'ajuda d'una agulla es van extreure les bombolles que quedaven entre la tira i el gel. Es va repetir aquesta operació per a cada tira.

2.8.3.2.2.4 Electroforesi

Es va insertar el caset d'electroforesi a la cubeta de l'equip Etan Dalt VI i es va omplir amb uns 2,5 litres de tampó de recorregut x 1 (apartat 2.8.3.1.1) i aleshores es van anar introduint tots els gels, es va acabar d'omplir la cubeta per fora del suport blanc fins a l'indicador. Per l'interior del suport blau es va afegir tampó de recorregut x 2 també fins al mateix a l'indicador. A continuació es va encendre la refrigeració i la recircularització per tal de mantenir la temperatura del sistema constant (25°C, suficient per evitar la precipitació de la urea i el desdoblament dels *spots*).

Les condicions d'electroforesi varen ser de:

Pas 1: 2,5 W / gel durant 30 min

Pas 2: 100 W durant aproximadament 4-5 hores.

Els gels es van aturar quan el brau del front estava a 1 mm del final del gel. En aquest cas es va realitzar tinció per nitrat de plata (apartat 2.8.3.3.3).

2.8.3.3 **Marcadors de pes molecular**

Es van utilitzar dos tipus de marcadors de pes molecular:

- SDS-PAGE Standard, Low-Range de Bio-Rad: Barreja de proteïnes de 14,5 a 97,4 kDa.
- Pre-stained SDS-PAGE Standard, Broad Range de Bio-Rad: barreja de proteïnes pre-tenyides de 6,4 a 198 kDa aproximadament. Aquest marcador es solia utilitzar quan les proteïnes eren transferides a membrana ja que a més de servir de marcador de pes molecular també serveix com a control de la transferència. Cal tenir present però, que aquest marcador ens dóna pesos orientatius ja que el tamany molecular pot variar de lot a lot degut a la reacció de tinció portada a terme pel fabricant.
- Precision Protein Standards de Bio-Rad: es tracta d'una barreja de proteïnes recombinants que abarquen pesos moleculars entre 10 i 250 kDa.

La següent taula mostra el tamany de les proteïnes de cada marcador:

Marcadors de tamany molecular	
Tipus	Tamany de les proteïnes (kDa)
Low Range	97,4; 66,2; 45; 31; 21,5; 14,4
Pre-stained, Broad Range	206; 117; 79; 48; 34,7; 28,6; 21,3; 7,6
Precision Protein Standard	250; 150; 100; 75; 50; 37; 25; 15; 10

2.8.3.4 Tinció de gels de proteïnes

2.8.3.4.1 Tinció de proteïnes amb Blau de Coomassie®

La tinció es va realitzar incubant els gels en solució de tinció durant 30 minuts. Un cop passat aquest temps es va destenyir mitjançant varis rentats amb àcid acètic glacial (Panreac) al 10 % (v/v).

Solució de Tinció	
Composició	Concentració
Blau brillant de Coomassie® R-250 (Fluka)	0,5 ‰
Àcid acètic glacial (Panreac)	10 %
Isopropanol (Merck)	25 %

Un cop dissolt el colorant, la solució es filtra amb paper de cel·lulosa

2.8.3.4.2 Tinció de proteïnes amb Nitrat de Plata

Aquesta tinció es va emprar en els casos en que calia augmentar la sensibilitat de la tinció.

La tinció es va realitzar amb el “kit” de Bio-Rad Silver Stain Plus. Es va seguir el protocol tal i com indica el subministrador.

2.8.3.4.3 Tinció de proteïnes amb Nitrat de Plata (per a gels 2D-PAGE)

La tinció es va realitzar meticulosament segons el següent protocol:

- 1) Fixació: 40 % Etanol, 10 % Àcid Acètic
30 minuts
- 2) Sensibilització: 30 % Etanol
Na₂S₂O₃ 0,2 % (p/v)
Acetat sòdic 6,8 % (p/v)
30 minuts
- 3) Rentat: Aigua Milli-Q
3 cops x 5 minuts
- 4) Tinció: AgNO₃ 2,5 g / l
20 minuts
- 5) Rentat: Aigua Milli-Q
2 cops x 1 minut
- 6) Revel·lat: Na₂CO₃ 2,5 % (p/v)
Formaldehid (400 µl / litre de solució)
Deixar fins que es visualitzin els *spots*
- 7) Aturada: EDTA-Na₂ * 2 H₂O 1,46 % (p/v)
10 minuts
- 8) Rentat: Aigua Milli-Q
3 cops x 5 minuts

2.8.4 VALORACIÓ D'ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES

2.8.4.1. Valoració d'activitat hemolítica en la fracció externa

A partir d'un cultiu de tota la nit d'una soca hemolítica es va fer una dilució 1/100 en 100 ml de medi (LB o LB 0,5 M de NaCl) i es va incubar en les condicions desitjades, 25°C o 37°C. Quan el cultiu va arribar a DO₆₀₀ de 0,4 i 0,8 es va recollir 1 ml de cultiu i es va centrifugar a 3.000 x g, durant 5 minuts. Alíquotes de 10, 50 i 200 µl es van ajustar a 200 µl amb LB o LB 0,5 M de NaCl i es van barrejar amb 1200 µl d'una suspensió

d'eritròcits. La barreja es va incubar durant 1 hora a 37°C sense agitació. A continuació es van centrifugar les barreges durant 30 segons a 16.000 x g. Es va procedir a llegir la DO₅₄₃ de cada sobrenedant com a reflex de l'hemoglobina alliberada al medi.

L'assaig no es pot dur a terme amb cultius en LB 0 M de NaCl, ja que la manca de NaCl causa una osmolisi directa dels eritròcits.

Les unitats d'hemolisina es van calcular segons la següent fórmula:

$$\text{Unitats d'hemòlisi} = \frac{(\text{DO}_{543\text{nm}} - \text{DO}_{543\text{nm control}}) \times 1000}{\text{DO}_{600} \times t \times v}$$

On t indica temps expressat en minuts i v indica volum en ml de mostra

Preparació suspensió d'eritròcits: Es partia de 3 ml de sang desfibrinada de xai (Oxoid) que es centrifugaven durant 30 segons a 16.000 x g. Els eritròcits es van resuspendre en el mateix volum de NaCl 0,9% fred. Aquest rentat es va repetir 3 o 4 vegades fins que el sobrenedant després de centrifugar quedava transparent. Als 3 ml d'eritròcits rentats se'ls afegia després 60 ml més de NaCl 0,9% i 10 ml de CaCl₂ 200 mM, freds. Aquesta suspensió es mantenia en gel.

2.8.5 SOBREEXPRESSIÓ DE PROTEÏNES

2.8.5.1 Obtenció d'extractes

Per tal de sobreproduir les proteïnes d'interès, es van construir plàsmids recombinants que contenien el gen d'interès clonat sota la influència del promotor de la RNA polimerasa del fag T7. En aquest treball es va utilitzar el vector d'expressió pET3b. Com a soca hoste s'utilitzaven soques capaces de sintetitzar la polimerasa del fag T7 sota un promotor induïble per IPTG.

El DNA recombinant es transformava a la soca BL21 (DE3) pLysS o pLysE o a les soques derivades BL21 (DE3) Δhns Trp::Tn10 i BL21 (DE3) Δhns Km^r portadores dels plàsmids pLysS o pLysE.

Les colònies obtingudes de la transformació es recollien amb LB i s'utilitzaven per inocular 250 ml, 500 ml o 1 litre de medi.

El cultiu s'incubava en agitació a 37°C o a 30°C segons la proteïna a expressar fins que assolía una DO_{600} de 0,4. En aquest moment s'afegia IPTG (Promega) a una concentració final de 0,5 mM.

Passades 2 hores a partir del moment de la inducció, es va centrifugar el cultiu (11.000 x g, 10 minuts, 4°C) i les cèl·lules es van ressuspèndre en 10 ml (per a cultius de 250 o 500 ml) o 20 ml (per a cultius d'1 litre) de tampó A (apartat 2.8.5.2). Amb aquesta suspensió cel·lular es va obtenir un extracte cru mitjançant French Press tal i com es descriu en l'apartat 2.8.1.1. Aquest extracte es va centrifugar de nou (16.000 x g, 30 minuts, 4°C) per tal d'obtenir un extracte clarificat..

2.8.5.2 Purificació per Ni^{2+} -NTA agarosa (Qiagen)

(Hochuli, 1988)

Per a la purificació de les proteïnes a les que se'ls havia afegit una cua de 6 histidines, després de l'obtenció de l'extracte es va utilitzar el mètode d'immobilització per cromatografia d'afinitat a metalls.

Es van barrejar els 10 o 20 ml d'extracte cru obtingut tal i com s'explica en l'anterior apartat amb 500 µl o 1 ml de reïna de Ni^{2+} -NTA agarosa (Qiagen) respectivament i es va deixar en agitació suau durant 2 hores a 4°C.

Transcorregut aquest temps, es va centrifugar i ressuspèndre la reïna varies vegades fins a quedar en un volum final de 1 ml. A partir d'aquest punt, es van fer 5 rentats amb 500 µl o 1 ml de tampó A (segons el volum del cultiu inicial) i 3 rentats amb tampó A més imidazol 200 mM, per tal d'eluir les proteïnes unides a la matriu. Les fraccions es van guardar i analitzar posteriorment per electroforesi en gel de poliacrilamida en Tris-Tricina-SDS (veure apartat 2.8.3.1.2).

Tampó A		
Producte	Tampó A	Tampó A'
	50 mM Imidazol	200 mM Imidazol
Hepes pH 7,9*	20 mM	20 mM
KCl	100 mM	100 mM
MgCl ₂	5 mM	5 mM
Glicerol	10 %	10 %
Imidazol	50 mM	200 mM

* pH ajustat amb KOH

2.8.5.3 Dissociació entre proteïnes unides

Per tal de dissociar proteïnes que co-purifiquen pel mètode descrit en els anteriors apartats, previs al rentat d'elució es van fer rentats amb concentracions creixents de KCl 0,5 M; 1 M i 2 M en el tampó A i en absència d'imidazol. Cada una de les fraccions es va guardar i analitzar posteriorment per electroforesi en gel de poliacrilamida en Tris-Tricina-SDS (veure apartat 2.8.3.1.2).

2.8.6 SEQÜENCIACIÓ I IDENTIFICACIÓ DE PROTEÏNES

2.8.6.1 Seqüenciació N-terminal per degradació d'Edman

(Edman, 1970)

La degradació d'Edman és un procediment tradicionalment utilitzat per a analitzar la seqüència d'aminoàcids en proteïnes. Aquest mètode permet digerir un a un els aminoàcids de l'extrem amino-terminal de la proteïna d'interès mitjançant una reacció química, de manera que permet determinar els aminoàcids d'aquest extrem i l'ordre.

La degradació d'Edman permet seqüenciar amb facilitat fins a uns 20 aminoàcids.

2.8.6.1.1 Transferència de la proteïna a membrana PVDF

(Packman, 1993)

Per tal d'obtenir la proteïna en les condicions adients per a la seva seqüenciació per degradació d'Edman es va aïllar des de membrana de PVDF. En primer lloc es va córrer la mostra en un gel de poliacrilamida desnaturalitzant (veure apartat 2.8.3.1.1) utilitzant acrilamida desionitzada i afegint àcid tioglicòlic o mercaptoacètic (Panreac) al tampó de recorregut a una concentració final de 2 mM.

Abans de carregar les mostres al gel, es va fer un pre-escalfament a 120 V durant 10-20 minuts. Tot seguit es va carregar la mostra i es va desenvolupar l'electroforesi.

Un cop acabada l'electroforesi, es van transferir les proteïnes del gel a una membrana de PVDF (Sequi-blot PVDF Membrana per a seqüenciació de proteïnes, 0,2 µm, Bio-Rad). La preparació i transferència a la membrana es van realitzar tal i com es descriu a l'apartat 2.8.10.1.

Després de la transferència, es van realitzar 3 rentats de la membrana amb aigua bidestil·lada. Després dels rentats es va passar a tenyir la membrana durant 5 minuts amb Coomassie[®] en una solució no fixativa:

Tinció de Coomassie[®]	
Composició	Concentració
Blau brillant de Coomassie [®] R-250 (Fluka)	0,1 %
Metanol (Merck)	50 %

Per destenyir la membrana parcialment es va fer un rentat amb solució de destinció fins que es podia observar la/les banda/es a retallar però sense que es destenyís del tot.

Solució de destinció	
Composició	Concentració
Metanol (Merck)	50 %
Àcid acètic glacial (Panreac)	10 %

Es va deixar assecar la membrana a l'aire i després es va retallar la banda d'interès amb una fulla de bisturí. Aquest fragment podia ser emmagatzemat a -20°C fins al moment de la seqüenciació.

Desionització de l'acrilamida: A partir d'una solució d'acrilamida fresca preparada com es descriu en l'apartat 2.8.3.1.1, se li va afegir un 5 % de reïna d'intercanvi iònic AG 501-X8(D) (Bio-Rad). Es va deixar 2 hores en agitació a temperatura ambient. Un cop passades les 2 hores es va filtrar amb paper de cel·lulosa.

2.8.6.1.2 Seqüenciació N-terminal

La seqüenciació N-terminal per degradació d'Edman la va realitzar el Dr. Francesc Canals al Servei de Proteòmica i de Bioinformàtica de l'Institut de Biotecnologia i de Biomedicina "Vicent Villar i Palasí" de la UAB.

Un cop seqüenciats de l'ordre de 8-10 aminoàcids de l'extrem N-terminal es va utilitzar la seqüència obtinguda per la identificació de la proteïna mitjançant una cerca d'homologies en bancs de dades.

2.8.6.2 Identificació de proteïnes per Maldi-Tof

(Henzel *et al.*, 1993)

Amb aquesta tècnica s'obté l'espectre total de la barreja dels pèptids obtinguts de la digestió específica de seqüència de la proteïna, el que dona lloc a una "empremta digital" de la massa dels pèptids de la proteïna que està sent estudiada. Aquest espectre total és obtingut per un mètode que utilitza una font de ionització i la desorció de mostres assistida per un làser. Ja que cada proteïna té la seva pròpia "empremta digital", en obtenir els fragments d'una proteïna problema es poden comparar amb la base de dades de proteïnes del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) i conèixer quina és la proteïna en qüestió.

2.8.6.2.1 Digestió en gel

En primer lloc es va córrer un gel de poliacrilamida en Tris-Glicina-SDS del % desitjat (apartat 2.8.3.1.1) carregant el màxim volum de mostra possible a cada carril i es

va tenyir el gel amb Coomassie[®] durant 30 minuts i després es va destenyir amb solució de destinció.

Tinció de Coomassie[®]	
Composició	Concentració
Blau brillant de Coomassie [®] R-250 (Fluka)	0,2 %
Metanol (Merck)	50 %
Àcid acètic glacial (Panreac)	10 %

Solució de destinció	
Composició	Concentració
Metanol (Merck)	50 %
Àcid acètic glacial (Panreac)	10 %

Quan les bandes ja es podien visualitzar es van tallar amb un bisturí i es varen posar en un microtub.

Es van realitzar dos rentats de les porcions de gel amb aigua bidestil·lada i a continuació se li van afegir 200 µl d'acetonitril (Panreac) al 50 % (en bicarbonat amònic 25 mM pH 8,5, Sigma) i es va deixar en agitació durant 20 minuts a temperatura ambient. Es va repetir aquest pas fins a un total de 3 vegades. En el primer rentat, però, enlloc d'utilitzar una solució acetonitril:bicarbonat amònic, s'afegeix primer 100 µl de bicarbonat 25 mM pH 8,5 i després 100 µl d'acetonitril. Després d'eliminar la solució d'acetonitril:bicarbonat amònic, es van afegir 100 µl d'acetonitril i es va deixar en agitació durant 5 minuts. Després dels rentats es pot observar com el gel es deshidrata i es torna blanc. El següent pas era assecar el gel a una centrífuga de buit (Speed-Vac, model 100, Savant Instruments Inc.) durant 30 minuts. Un cop sec, es va afegir prou volum de bicarbonat amònic 25 mM pH 8,5 per recobrir el gel totalment i permetre la seva mobilitat. A més, també se li afegien 4 µl de tripsina (250 ng/µl, Promega). En aquest pas tenia lloc la proteòlisi de la proteïna incubant a 37°C en agitació.

Al cap de 12-18 hores, es van afegir 50 µl d'acetonitril 50 % i TFA (Merck) 5 % i es va deixar 1 hora en agitació a temperatura ambient per tal d'eluir els fragments tripsinitzats del gel. Es tornà a repetir un altre cop l'eleució, ara durant 30 minuts en agitació. Les 2 fraccions obtingudes es van assecar a una centrífuga de buit i es van ressuspèndre en 7 µl d'acetonitril 50 % i TFA 5 %.

2.8.6.2.2 Maldi-Tof

La seqüenciació per Maldi-Tof la va dur a terme la Dra. Irene Fernández del Departament de Química Orgànica, Facultat de Química, Universitat de Barcelona.

2.8.7 DETERMINACIÓ DE L'OLIGOMERITZACIÓ DE PROTEÏNES: ASSAIG DE CROSS-LINKING *IN VIVO*

Basant-nos en la metodologia de l'assaig de "Cross-linking" proposada per Ueguchi *et al.*, 1997 i Johansson *et al.*, 2001 i en la tècnica de sobreexpressió i purificació de proteïnes unides a una cua d'histidines descrita a l'apartat 2.8.5, es va dissenyar un protocol combinant les dues tècniques que ens permetia purificar la proteïna d'interès per la presència de la cua d'histidines, i unida de manera covalent a les proteïnes amb les que interacciona *in vivo*.

Com ja hem dit doncs, es va sobreexpressar la proteïna d'interès a partir de 250 ml de cultiu tot seguint el protocol habitual però en aquest cas ressuspèndre les cèl·lules en 10 ml tampó de "Cross-linking". Després d'obtenir l'extracte clarificat es va afegir a una alíquota DMS (Sigma) a una concentració final d'1 mg/ml en tampó de "Cross-linking". En el cas del control negatiu no es va afegir aquest producte. Per a permetre la unió covalent entre proteïnes es va incubar durant 1 hora a temperatura ambient.

Transcorregut el temps d'unió, es van afegir 10 ml de tampó A (apartat 2.8.5) x 2 sense KCl i 500 µl de Ni-NTA-agarosa (Qiagen). D'aquesta manera, la barreja constaria bàsicament de tampó A (ara ja x 1) afavorint les condicions d'unió de la cua d'histidines de la proteïna a la matriu de Ni-NTA-agarosa. La barreja es va incubar durant dues hores en agitació suau a 4°C i es va procedir a purificar la/les proteïna/es segons el protocol habitual (apartat 2.8.5.2).

Les fraccions obtingudes es van analitzar en un gel de poliacrilamida de Tris-Glicina-SDS (apartat 2.8.3.1.1) al 12,5% i es van detectar les proteïnes d'interès per immunodetecció (apartat 2.8.9).

Tampó de “Cross-linking”	
Composició	Concentració
Trietanolamina HCl (Sigma)	1 M
NaCl (Panreac)	0,25 M
DTT (Millipore)*	5 mM

Equilibrar el pH amb NaOH fins a 8,5 i autoclavar
*Afegir just abans d'utilitzar el tampó

2.8.8 AÏLLAMENT DE PROTEÏNES A PARTIR DE GELS DE POLIACRILAMIDA

Per determinades aplicacions va ser necessari eluir proteïnes a partir de gels de poliacrilamida. Per això, es van carregar amb el màxim volum possible tots els carrils d'un o més d'un gel de poliacrilamida Tris-Tricina-SDS (veure apartat 2.8.3.1.2) d'1,5 mm de gruix. Com a mínim en un dels gels es va carregar a ambdós extrems marcador de tamany molecular sempre pre-tenyit (apartat 2.8.3.2). Es va realitzar l'electroforesi tal i com es descriu en l'apartat 2.8.3.1.2 i un cop finalitzada es va retallar tot el fragment de gel corresponent als carrils del marcador de tamany molecular i un carril amb mostra. Amb aquesta porció de gel es va fer o bé tinció amb Coomassie (apartat 2.8.3.3.1) o bé immunodetecció per “western blotting” (apartat 2.8.9). D'aquesta manera es podia localitzar exactament la proteïna en el gel i prenent-ho com a referència tallar la porció de gel corresponent a la banda d'interès en la resta de gels que s'havien guardat a 4°C.

Els fragments d'acrilamida tallats es varen introduir en un microtubs amb suficient volum de tampó de l'ànode (apartat 2.8.3.1.2) com per cobrir el gel totalment i es va deixar en agitació orbital tota la nit a 4°C.

El dia següent, s'extreia el tampó de cada un dels tubs i es concentrava en una centrífuga de buit. Per tal de comprovar l'eficàcia del procediment es feia una anàlisi electroforètica.

2.8.9 TÈCNIQUES D'IMMUNODETECCIÓ DE PROTEÏNES (WESTERN BLOTTING)

(Towbin *et al.*, 1979; Burnette, 1981)

Les proteïnes separades per electroforesi en gels de poliacrilamida (apartat 2.8.3.1) eren transferides a un suport sòlid per a ser posteriorment detectades mitjançant anti-sèrums específics o per a retallar les proteïnes d'interès per a seva seqüenciació amino-terminal.

2.8.9.1 Transferència de proteïnes a membrana per sistema semi-sec

Les proteïnes separades per electroforèsi van ser electrotransferides del gel de poliacrilamida a una membrana bé de nitrocel·lulosa (Trans-blot[®] Transfer medium, 0,45 µm, Bio-Rad) o bé de PVDF (Sequi-blot PVDF Membrana per seqüenciació de proteïnes, 0,2 µm, Bio-Rad).

Tant el gel com la membrana s'equilibraven en tampó de transferència. En el cas de les membranes de PVDF, però, previ al tampó de transferència, la membrana s'ha de mullar completament amb metanol i no s'ha de permetre que s'assequi mai.

El gel de poliacrilamida es dipositava sobre la membrana, i el conjunt es col·locava entre papers de filtre (Whatman 3 MM) mullats amb el mateix tampó (tres per cada costat). Aquest bloc es dipositava entre el càtode i l'ànode de l'aparell i es procedia a la transferència de les proteïnes amb l'equip Trans-Blot[®] SD-Semy-Dry Transfer Cell de Bio-Rad, tot aplicant un voltatge de 15 V durant generalment 30 minuts. Si el gel era més gruixut o la proteïna molt gran, aleshores s'augmentava el temps de transferència a 45-60 minuts.

Tampó de transferència	
Composició	Concentració
Tris (Roche)	48 mM
Glicina (Fluka)	39 mM
Metanol (Merck)	20 %
SDS (Merck)	1,3 mM

pH 9,2 no ajustat

2.8.9.2 Immunodetecció i revelat colorimètric amb fosfatasa alcalina

Tots els rentats i incubacions de la membrana es varen fer a temperatura ambient i en agitació suau i constant.

Després de la transferència la membrana de nitrocel·lulosa es bloquejava durant 45 minuts en tampó de bloqueig i després s'incubava durant 1 hora amb l'anticòs primari contra la proteïna que es volia detectar diluït en 10 ml de tampó de bloqueig. L'excés d'anticòs unit inespecíficament s'eliminava rentant la membrana 3 vegades amb tampó de bloqueig (10 minuts cada rentat). La membrana s'incubava altra vegada durant 30 minuts amb l'anticòs secundari conjugat amb fosfatasa alcalina diluït en 10 ml de tampó de bloqueig. L'excés d'anticòs secundari s'eliminava amb 3 rentats de 10 minuts amb tampó de revelat, al mateix temps que la membrana s'equilibrava amb aquest tampó per a procedir posteriorment a la reacció colorimètrica. Aquesta reacció es va desenvolupar incubant la membrana a temperatura ambient amb 10 ml de tampó de revelat als quals se'ls havia afegit 200 µl de solució NBT/BCIP (Roche). La incubació es va seguir en estàtic i protegida de la llum fins a detectar-se les bandes amb la intensitat desitjada. La reacció s'aturava rentant la membrana amb aigua destil·lada.

Tampó de bloqueig	
Composició	Concentració
Tris (Roche)	10 mM
NaCl (Panreac)	500 mM
Tween-20 (Merck)	0,5 %
Azida sòdica (Merck)	0,02 %

Ajustar el pH a 8,2

Tampó de revelat	
Composició	Concentració
Tris (Roche)	100 mM
NaCl (Panreac)	100 mM
MgCl ₂ (Merck)	50 mM

Ajustar el pH a 9,5.

2.8.9.3 Immunodetecció i revelat quimioluminiscent pel sistema ECL™

Després de la transferència, la membrana de nitrocel·lulosa es bloquejava durant 1 hora en tampó TBS-Tween més l'agent de bloqueig, llet descremada en pols al 5% (p/v). A continuació es van realitzar 3 rentats de 10 minuts cada un en tampó TBS-Tween i després es va incubar 1 hora amb l'anticòs primari contra la proteïna que es volia detectar diluït en 10 ml de tampó TBS-Tween. L'excés d'anticòs unit inespecíficament s'eliminava rentant la membrana 3 vegades amb tampó TBS-Tween (10 minuts cada rentat). La membrana s'incubava altra vegada durant 1 hora amb l'anticòs secundari conjugat amb peroxidasa diluït en 10 ml de tampó TBS-Tween. L'excés d'anticòs secundari s'eliminava amb 3 rentats de 10 minuts amb tampó TBS-Tween. Per iniciar la reacció quimioluminiscent de revelat, la membrana es va incubar durant 5 minuts en estàtic amb el reactiu que conté el substrat per la peroxidasa de l'anticòs secundari, seguint les indicacions de la casa comercial (ECL™ Western blotting, Amersham Biosciences). Posteriorment la membrana es va embolicar amb film de plàstic i es va col·locar dins un cassette d'autoradiografia Gevomatic 18 x 24 amb pantalles amplificadores Curix C-2 (Agfa) per exposar-hi una pel·lícula (Hyperfilm MP, Amersham Biosciences). Després d'un temps determinat que podia variar entre 5 i 45 minuts d'exposició, es va revelar el film automàticament (RG II, Fuji X-Ray, Film Processor).

Tampó TBS-Tween	
Composició	Concentració
Tris (Roche)	20 mM
NaCl (Panreac)	136 mM
Tween-20 (Merck)	0,1 %

Ajustar el pH a 7,6

A continuació es mostra una taula amb els anticossos primaris policlonals i secundaris utilitzats en aquest treball:

Anticossos primaris				
Anticòs	Antígen	Dilució de treball	Orígen	Referència
Anti-Hha # 1	Hha	1:1.000	Conill	Balsalobre <i>et al.</i> , 1996
Anti-H-NS	H-NS	1:10.000	Conill	Cedit pel Dr. B. Eric Uhlin (Umea Univerity, Suècia)
Anti-StpA	StpA	1:2.000	Conill	Cedit pel Dr. B. Eric Uhlin (Umea Univerity, Suècia)
Anti-YdgT	YdgT	1:100.000	Conill	Aquest treball
Anti-Hly	HlyA	1:100	Conill	Nieto <i>et al.</i> , 1991

Anticossos secundaris					
Anticòs	Enzim conjugat	Antígen	Dilució de treball	Orígen	Referència
Anti-Rabbit IgG	Fosfatasa alcalina	IgG de conill	1:10.000	Cabra	Chemicon
Anti-Rabbit IgG	Peroxidasa	IgG de conill	1:10.000	Ase	Amersham Biosciences

2.9 OBTENCIÓ DE SÈRUMS IMMUNES

2.9.1 OBTENCIÓ DE PROTEÏNA

Per a l'obtenció d'anti-sèrums es van utilitzar proteïnes purificades eluïdes a partir de gels de poliacrilamida (apartat 2.8.8).

2.9.2 IMMUNITZACIÓ DEL CONILL

L'obtenció d'anti-sèrums es va realitzar a l'Estabulari de Farmàcia de la Universitat de Barcelona (Dr. Xavier Cañes). L'animal utilitzat per a l'obtenció de sèrums fou el conill.

La immunització es realitzà subministrant 3 dosis d'antigen separades en el temps per 15 dies. En cada una de les dosis es varen injectar a l'animal entre 75 i 100 µg d'antigen mitjançant injeccions subcutànies multifocals (200 µl per punt). En cada dosi, la mostra es va diluir en el mateix volum (entre 500 i 650 µl de mostra com a màxim) de coadjuvant de Freund (Sigma) complet en la primera dosi (emulsió d'aigua i olis no metabolitzables que conté cèl·lules mortes de *Mycobacterium tuberculosis*) i incomplet en la segona i tercera dosi (en aquest cas no inclou les cèl·lules de *M. tuberculosis*).

2.9.3 OBTENCIÓ I RENTAT DEL SÈRUM

Passats 15 dies des de l'aplicació de l'última dosi, es van extraure 4 ml de sang amb la finalitat de valorar la qualitat i la quantitat dels anticossos creats. La sang extreta es va mantenir aproximadament 2 hores a 4°C i a continuació es va centrifugar (12.000 x g, 3 minuts, 4°C) i es va recollir el sobrenedant. Aquest fou rentat amb el mateix volum d'un extracte adequat (apartat 2.8.1.2) tot incubant-lo durant 30 minuts a temperatura ambient. A continuació es va centrifugar (12.000 x g, 10 minuts, temperatura ambient). El sobrenedant resultant, que correspondria al sèrum rentat es va emmagatzemar a -20°C. Una vegada comprovada la qualitat de l'anti-sèrum, i si aquesta era l'adequada, es procedia al sagnat de l'animal i a l'obtenció del total de l'anti-sèrum.

2.10 ANÀLISI DE LA FORMACIÓ DE BIOFILMS

A partir d'un cultiu crescut tota la nit a 30°C de la soca a estudiar, es va realitzar un inòcul 1:100 en LB. D'aquest inòcul es van inocular 2 ml/pou a plaques de poliestirè (Nunc), per quadruplicat. La placa es va deixar incubant durant 24 hores a 30°C i en estàtic. Al dia següent es va realitzar l'assaig seguint dues metodologies diferents per a cada duplicat.

- (Pratt i Kolter, 1998). Els 2 ml de cultiu crescut es van guardar en un tub i es van realitzar 2 rentats amb LB de cada pou que es van barrejar juntament amb els 2 ml de cultiu. Aquesta barreja són les cèl·lules que anomenem "Swimming". El biofilm format es va ressuspèndre amb 1 ml de LB amb ajuda de la pipeta i es va guardar. Aquesta barreja són les cèl·lules que anomenem "Biofilm". Es va mesurar la DO₆₀₀ d'ambdues barreges i es va calcular la taxa de formació de biofilms amb la següent fórmula:

$$\text{Formació de biofilms} = \frac{(\text{DO}_{600} \text{ cèl·lules "Biofilm"} / 2)}{(\text{DO}_{600} \text{ cèl·lules "Swimming"} \times 2) + (\text{DO}_{600} \text{ cèl·lules "Biofilm"} / 2)} \times 100$$

- (Di Martino *et al.*, 2002). Es va extreure el cultiu líquid i es va procedir a realitzar 3 rentats del pou amb 1 ml d'aigua destil·lada cadascun. A continuació es va deixar assecar la placa durant 1 hora a 80°C. Passat aquest temps es van afegir 200 µl de cristall violeta a l'1 % i es va deixar incubar durant 15 minuts. Es van realitzar novament tres rentats amb aigua destil·lada i es va ressuspèndre la tinció obtinguda mitjançant la solubilització del cristall violeta amb 200 µl de SDS 1 %. Als 200 µl se'ls va afegir 800 µl d'aigua destil·lada i es va llegir la DO₅₉₅. Els valors obtinguts en aquesta mesura corresponen als valors de la capacitat de formació de biofilms.

3.1 IDENTIFICACIÓ D' YDGT COM A ANÀLEG DE LA PROTEÏNA HHA

Prenent com a punt de partida el model H-NS/StpA, i coneixent la seqüència completa del genoma d'*Escherichia coli* (Blattner *et al.*, 1997) vam decidir fer una recerca per determinar si existia alguna proteïna que pogués tenir un paper semblant a StpA en el cas de la família de proteïnes Hha/YmoA. Utilitzant la xarxa BLAST del NCBI (Altschul *et al.*, 1997; www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) vam comparar la seqüència d'aminoàcids de la proteïna Hha amb la base de dades de seqüències peptídiques no-redundants. El resultat d'aquesta cerca mostrava elevada homologia de la proteïna Hha amb una hipotètica proteïna d'*E. coli* de 71 aminoàcids i 8,41 KDa de pes molecular, YdgT (número d'accés P76179). Ambdues proteïnes mostren un 38 % d'identitat i un 66 % de similaritat a nivell d'aminoàcids tal i com es mostra a la figura 3.1.1. De la mateixa manera, la proteïna YdgT, també mostra homologia amb la proteïna YmoA de *Yersinia enterocolitica*, en aquest cas un 42 % d'identitat i un 67 % de similaritat a nivell d'aminoàcids (figura 3.1.1).

```

Hha  MSEKHLTKTDYLMRLRRCQTIDTLERVIEKKNKYELSDN-ELAVFYSAADHRLAELTMN-K 58
YmoA  ----MTKTDYLMRLRKCTTIDTLERVIEKKNKYELSDD-ELEIFYSAADHRLAELTMN-K 53
YdgT  ----MTVQDYLLKFRKISSLESLEKLVMDHINVTLTDDQELINMYRAADHRRRAELVSGGR 55

Hha  IYD--KIPSSVWKFIR 72
YmoA  IYD--KIPPTVWQHVK 67
YdgT  IEDLGQVPKSVWHEMVC 71

```

Figura 3.1.1. Comparació de les seqüències d'aminoàcids de les proteïnes Hha d'*E.coli* (P23870), YmoA de *Y. enterocolitica* (P27720) i YdgT d'*E. coli* (P76179), utilitzant el programa ClustalW 1.81 de la European Bioinformatics Institute.

El gen que codifica aquesta proteïna, de funció fins aleshores desconeguda, es localitza al minut 36,71 del cromosoma d'*Escherichia coli* i té orientació segons les agulles del rellotge.

La posterior cerca en les seqüències completes de genomes d'altres enterobacteriàcies, ha permès la identificació d' YdgT en d'altres soques d'*E. coli* i també

en d'altres espècies d'enterobactèries. A la següent taula es mostren les diferents soques en les que s'ha identificat una proteïna similar a YdgT. En aquests casos, la mateixa soca presenta el doblet Hha/YdgT (veure introducció).

Hha/YdgT a la família <i>Enterobacteriaceae</i>			
Espècie	Hha	YdgT	Referències
<i>E. coli</i> K-12	CAA41043	P76179	Blattner <i>et al.</i> , 1997
<i>E. coli</i> O157:H7	BAB33936	NP288061	Perna <i>et al.</i> , 2001; Hayashi <i>et al.</i> , 2001
<i>E. coli</i> CFT073	AAN79056	AAN80477	Welch <i>et al.</i> , 2002
<i>Shigella flexnerii</i>	AAN42060	AAN43232	Jin <i>et al.</i> , 2002
<i>S. typhimurium</i> LT2	AAL19427	NP460424	McClelland <i>et al.</i> , 2001
<i>S. enterica</i> serovar Typhi CT18	NP455070	CAD01906	Parkhill <i>et al.</i> , 2001

Taula 3.1.1. Homòlegs de la proteïna YdgT.

3.2 CONSTRUCCIÓ DE SOQUES MUTANTS *ydgT*

Un cop més, prenent com a model la proteïna H-NS i el seu anàleg StpA, ens vam plantejar la hipòtesi de que la proteïna YdgT intervingués en la regulació de l'expressió gènica, potser complementant la funció de la proteïna Hha. Per tal de caracteritzar el possible paper de la proteïna YdgT, el primer que ens vam plantejar va ser l'obtenció d'una soca mutant pel gen *ydgT*.

Partint de la seqüència corresponent al gen *ydgT* (figura 3.2.1), extreta de la seqüència complerta del genoma d'*Escherichia coli* K-12 MG1655 (Blattner *et al.*, 1997) vam utilitzar el mètode descrit per Datsenko i Wanner (2000) per mutagenitzar aquest gen (material i mètodes, apartat 2.5.1).

```

5461 aaccaggaat ttattatcct gttc gatggt gttggtgatt gtcagggata gtaaagcgcg
5521 ttactctttt cagagcagtt tttcatcoct gaatatttgc catcagcgca ttcttattat
5581 tgtaataaca caagcgttca cttttggtga aattttatca tcactaataa tacctacccc
5641 tttggtatta attattttat ggacccttta tgactgttca ggactactta ttaaatttc
5701 gcaaaatcag ttcactcgaa agtctggaaa aactctacga ccatcttaat tacacctga
5761 cggacgatca ggaactgatc aatatgatc gtgctgccga tcaccgtcgc gcagagctgg
5821 tttctggcgg gcgtttgttt gacctcggcc aggtaccgaa gtccgtctgg cactatgtcc
5881 aataaagaaa gtagcgatcg gttataaaag ccttataata acgcccctaa aattagattt
5941 gcctgtttgc gtcgctattc tggagaacct atgaccacca caacgccaca acgtattgga

```

Figura 3.2.1. Seqüència de nucleòtids del gen *ydgT* d'*Escherichia coli* K-12 (extret d'E.coli K12 MG1655 section 148 to 400 of the complete genome, nº d'accés AE00028). Els triplets subratllats i en negreta indiquen inici (fletxa) i final de la transcripció. Les estrelles indiquen els promotors teòrics per *ydgT* (primera estrella) i per al gen adjacent *ydgK* (segona estrella).

3.2.1 CONSTRUCCIÓ D'UN MUTANT 5K *vdgT*

Es va generar per amplificació amb PCR un fragment de DNA, YdgT-Cm, que fos portador de la resistència a cloramfenicol del plàsmid pKD3 i amb extrems homòlegs al gen *vdgT*.

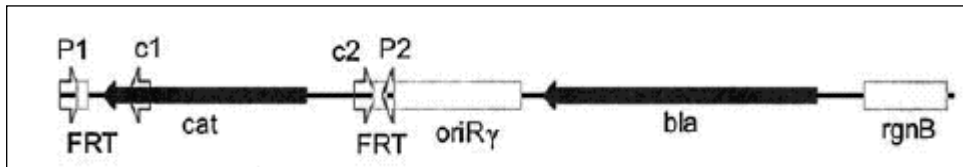


Figura 3.2.2. Representació lineal del plàsmid pKD3 (2804 pb). Extret de Datsenko i Wanner, 2000. P1 i P2 corresponen a la seqüència dels oligonucleòtids utilitzats amb homologia amb pKD3. FRT són les dianes de la recombinasa FLP.

Els oligonucleòtids necessaris per a l'amplificació d'aquest fragment: YDGTP1 i YDGTP2 són els que es mostren a la figura 3.2.3.

YDGTP1:

5' TATCTTGTTCGATGTTGTTGGTGATTGTCAGGGATAGTAA GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC 3'

YDGTP2:

5' TTAAGATGGTCGTAGAGTTTTCCAGACTTTCGAGTGAACATATGAATATCCTCCTTAGT 3'

Figura 3.2.3. Oligonucleòtids utilitzats per a la generació del fragment YdgT-Cm. En blau estan ombrejades les seqüències corresponents als extrems del gen *vdgT*, i en groc les corresponents a les seqüències P1 i P2 respectivament del plàsmid pKD3.

Les seqüències corresponents al gen *vdgT* en els oligonucleòtids YDGTP1 i YDGTP2 van del nucleòtid 5475 al 5514, i del 5749 al 5711 respectivament (veure figura 3.2.1). La recombinació d'aquest fragment amb la seqüència salvatge produiria una deleció des del primer promotor teòric descrit per *vdgT* fins just abans del primer promotor teòric descrit per al següent gen, *vdgK*. El promotor pel gen *vdgK* es solapa amb la seqüència codificadora del gen *vdgT*. Així, encara que el gen *vdgT* acabi al nucleòtid 5885 es

produirà una deleció de pràcticament tot el gen, deixant intacta la seqüència corresponent a *ydgK* i el seu promotor (veure figura 3.2.1)

A partir d'aquests oligonucleòtids es va realitzar la generació del fragment YdgT-Cm per PCR utilitzant com a motllo el plàsmid pKD3 i el següent programa:

Desnaturalització inicial: 94°C, 5'	}	⇒	x 25 cicles
Desnaturalització: 94°C, 30''			
Hibridació: 52°C, 45''			
Elongació: 72°C, 1'30''			

Un cop tractat i purificat el fragment de PCR (apartat 2.5.1.1), es va procedir a la transformació d'aquest a la soca 5K (pKD46) (materials i mètodes 2.5.1.2).

De la transformació dels fragments de PCR van aparèixer 2 colònies resistents a cloramfenicol, que varen ser comprovades per PCR utilitzant oligonucleòtids corresponents a les seqüències del gen *ydgT* presents en els oligonucleòtids YDGT1 i YDGT2 (figura 3.2.4).

YDGT1:
5' TCGATGTTGTTGGTGATTGTC 3'

YDGT2:
5' AGATGGTTCGTAGAGTTTTTCC 3'

Figura 3.2.4. Oligonucleòtids utilitzats per a l'amplificació del gen *ydgT*.

El programa del termociclador utilitzat en aquest cas va ser el mateix que el realitzat per a la generació del fragment YdgT-Cm.

En comprovar els dos possibles mutants obtinguts es va poder observar l'aparició d'una banda de DNA corresponent a 1082 pb, que equivaldria a la mida del fragment YdgT-Cm introduït, en contraposició al gen salvatge, en que l'amplificació utilitzant aquests oligonucleòtids produiria un fragment de 264 pb (veure figura 3.2.5).

Un vegada obtinguts els mutants, que es van anomenar 5K YdgT-1[Cm] i 5K YdgT-2[Cm], es va procedir a eliminar per recombinació homòloga el gen corresponent a la

resistència al cloramfenicol. Per fer-ho es va utilitzar el plàsmid pCP20 que conté la recombinasa FLP que té com a diana les seqüències FRT presents en el fragment YdgT-Cm, i es va seguir el procediment que es detalla en l'apartat 2.5.1.3 de materials i mètodes. De cada un dels mutants vam obtenir gran quantitat de clons no resistents a l'antibiòtic i que altra vegada es van comprovar per PCR pel mateix procediment. En aquest cas, en realitzar la detecció del gen *ydgT* utilitzant els oligonucleòtids YDGT1 i YDGT2, es va amplificar una banda de 126 pb, corresponent al fragment YdgT-Cm sense la seqüència del gen *cat* (figura 3.2.5).

3.2.2 TRANSDUCCIÓ DE LA MUTACIÓ *ydgT*

Com a continuació a l'obtenció de la mutació *ydgT*, es va comprovar si era possible transduir la mutació *ydgt* obtinguda prèviament. Per això, es va partir de la soca YdgT-2[Cm] per poder utilitzar la resistència a cloramfenicol com a marcador de la transducció. Seguint el protocol descrit a l'apartat 2.4.4 de materials i mètodes, es va obtenir un lisat de P1 *vir* a partir de la soca YdgT-2[Cm] i es va utilitzar per transduir la soca *E.coli* 5K i també la seva derivada Hha-3 (*hha*). Es va utilitzar el mateix lisat per a transduir tota una altra sèrie de soques, amb la finalitat d'obtenir una col·lecció en que es combinessin diferents mutacions i poder-les utilitzar en estudis posteriors. Es va transduir la mutació *ydgt* associada a resistència a cloramfenicol a la soca BSN26 (*hha*⁺ *hns*⁺) i derivades d'aquesta, portadores de mutacions *hha* i/o *hns*: BSN26H (*hha*⁻ *hns*⁺), BSN27 (*hha*⁺ *hns*⁻). De la mateixa manera que s'havia fet amb la soca 5K YdgT-2[Cm], es va escindir el gen *cat* mitjançant la transformació del plàsmid pCP20. Es van obtenir així les soques BSN26Y (*ydgt hha*⁺ *hns*⁺), BSN26HY (*ydgt hha hns*⁺) i BSN27Y (*ydgt hha*⁺ *hns*)

Un cop obtinguda tota la col·lecció de mutants, simples o dobles, es van comprovar un a un per PCR de la mateixa manera que en l'apartat anterior.

3.2.3 EFECTE DE LES MUTACIONS SOBRE EL CREIXEMENT

Per tal de determinar si les mutacions obtingudes tenien algun efecte sobre el creixement, es va seguir el creixement de la soca BSN26 i les seves derivades en diferents condicions de temperatura i osmolaritat, ja que aquestes són condicions ambientals que condicionen la regulació de l'expressió per les proteïnes associades al nucleòide Hha i HNS.

3.2.3.1 Efecte de la temperatura en el creixement

Es va realitzar el seguiment de la DO_{600} dels cultius incubats a 37°C i 25°C. Es van utilitzar les soques BSN26, BSN26H, BSN26Y, BSN26HY, BSN27 i BSN27Y, a més a més de les soques BSN27H (*hha hns*), BSN28 (*stpA*) i BSN29 (*stpA hns*).

Les corbes representades en la figura 3.2.6 mostren el creixement a 37°C (A) i a 25°C (B).

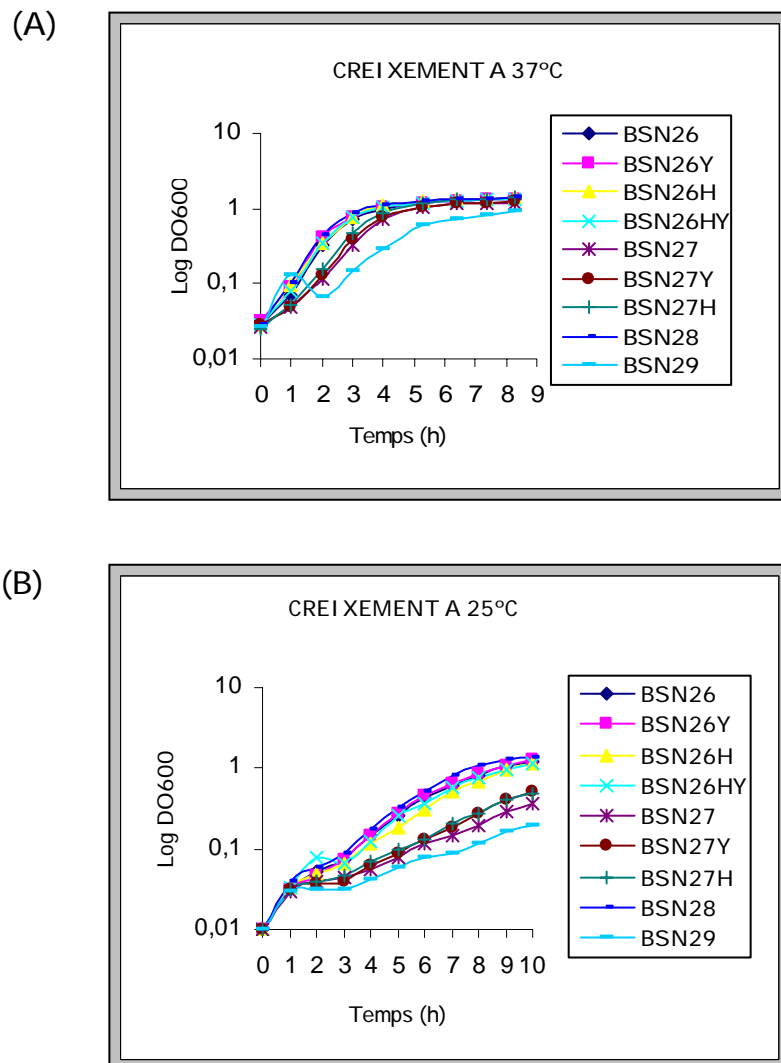


Figura 3.2.6. Corbes de creixement a 37°C (A) i 25°C (B) de les soques isogèniques BSN26, BSN26Y, BSN26H, BSN26HY, BSN27, BSN27Y, BSN27H, BSN28 i BSN29.

Com es pot observar en l'anterior figura, les soques que presenten un creixement més lent són les soques portadores de mutacions *hns*: BSN27 (*hns*), BSN27H (*hns hha*), BSN27Y (*hns ydgT*) i BSN29 (*hns stpA*). Aquest comportament es manifesta tant si els

cultius s'incuben a 37°C com a 25°C. Pel que fa a la resta de soques, el creixement és força igual entre totes elles a ambdues temperatures. Sembla evident, doncs, que la mutació *ydgT* no afecta al creixement de les soques pel que fa a la temperatura. En el cas de la soca BSN27Y, l'enlentiment en el creixement seria derivat de la mutació *hms*, i no pas de la mutació *ydgT*.

3.2.3.2 Efecte de l'osmolaritat en el creixement

Es va seguir igualment la DO₆₀₀ de cultius incubats a 37°C, però en medis amb diferent osmolaritat (LB 0 M de NaCl i 0,5 M de NaCl). A les corbes de la figura 3.2.7 es mostra el creixement en LB 0,5 M de NaCl (A) o LB 0 M de NaCl (B).

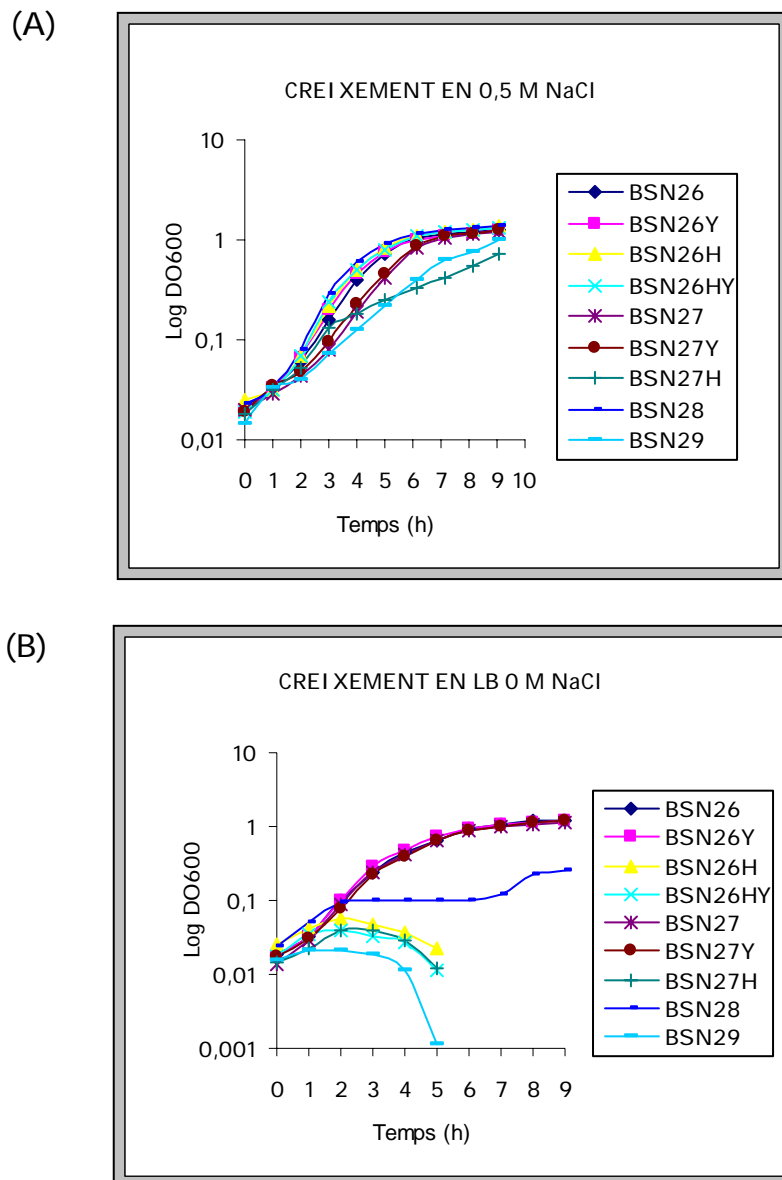


Figura 3.2.7. Corbes de creixement a 0,5 M de NaCl (A) i 0 M de NaCl (B) de les soques isogèniques BSN26, BSN26Y, BSN26H, BSN26HY, BSN27, BSN27Y, BSN27H, BSN28 i BSN29.

Com es pot deduir de la figura 3.2.7, a concentracions 0,5 M de NaCl en el medi de cultiu, totes les soques presenten un creixement molt similar a l'observat en cultius incubats en medi LB a 37°C. És a dir, les soques que presenten un creixement més lent són aquelles portadores de mutacions *hns*.

En canvi, en condicions de baixa osmolaritat, LB 0 M NaCl, les soques que presenten un creixement més lent són les portadores de la mutació *hha* (BSN26H, BSN27H i BSN26HY) o de la mutació *stpA* (BSN28 i BSN29). No només presenten poc creixement, sinó que, a excepció de BSN28, després d'un període de creixement lent, la DO₆₀₀ del cultiu va disminuint. Ni la soca *hns* (BSN27) ni la soca *ydgT* (BSN26Y) presenten un creixement diferent de la soca salvatge (BSN26).

D'aquest resultat se n'extreu que a concentracions de NaCl en el medi de 0,5 M les soques *ydgT* obtingudes en aquest treball tenen un creixement similar al de la soca salvatge. Però en canvi, en condicions de baixa osmolaritat, el doble mutant *hha ydgT* presenta un creixement molt alterat similar al que presenta la soca BSN26H (*hha*). És destacable que el doble mutant BSN26HY (*hha ydgT*) té un comportament, pel que fa al creixement en condicions de baixa osmolaritat, molt similar al doble mutant BSN27H (*hha hns*).

3.3 EFECTE DE LA MUTACIÓ *ydgT* EN L'EXPRESSIÓ DE L'OPERÓ HEMOLÍTIC *hly*

La proteïna Hha intervé en la regulació de l'expressió de la toxina α -hemolisina d'*E.coli*. En un mutant *hha*, s'incrementa significativament l'expressió de l'operó *hly* (veure introducció).

Resultava lògic pensar que l'elevada homologia entre les proteïnes Hha i YdgT podia implicar un elevat nivell de similitud funcional i per tant, que YdgT també podia participar en la regulació de l'operó hemolític.

Per tal de comprovar-ho, es van transformar els diferents mutants obtinguts amb plàsmids portadors de l'operó *hly*.

Com a primera aproximació, i amb la finalitat de realitzar una avaluació ràpida del fenotip hemolític causat per la mutació *ydgT*, es va utilitzar el plàsmid pANN202-312. Aquest plàsmid conté el determinant hemolític *hlyCABD* del plàsmid pHly152 però no conté la seqüència reguladora *hlyR*. A més, a diferència del plàsmid salvatge, aquest és d'elevat número de còpies. Per totes aquestes raons, el plàsmid pANN202-312 era un bon candidat per a la primera avaluació ja que la quantitat d'hemolisina que es pot produir és més elevada, i per tant les diferències més significatives.

Es van transformar les soques 5K (*hha*⁺ *ydgT*⁺), 5K YdgT-2 (*hha*⁺ *ydgT*), 5K Hha-3 (*hha* *ydgT*⁺), i 5K YdgT-2 Hha-3 (*hha* *ydgT*) amb el plàsmid pANN202-312, seguint el protocol descrit a l'apartat 2.4.1.1. Les colònies transformants es van seleccionar per la resistència al cloramfenicol en plaques d'agar sang.

Els fenotips obtinguts ens indicaven que la mutació *ydgT* no causa un efecte clar sobre l'expressió de l'hemolisina, similar al provocat per la mutació *hha*. Tot i que el fenotip en placa no permet quantificar amb precisió la producció d'hemolisina, el fenotip del mutant *ydgT* era més similar al de la soca salvatge que al de la soca *hha*. En canvi, es va poder observar que el fenotip hemolític mostrat pel doble mutant *hha ydgT* és espectacular, les colònies mostren uns halos d'hemòlisi més grans que els de les colònies de la soca *hha*.

Per tal de valorar amb més precisió la producció d'hemolisina de les soques portadores de les diferents mutacions, es va decidir utilitzar el plàsmid pHly152 (*hlyR*, *hlyCABD*, Noegel *et al.* 1981). Aquest plàsmid és conjugatiu, de baix número de còpies, i

presenta l'operó *hly* complet, i per tant evita els artefactes causats per l'expressió en vectors multicòpia i sense el gen *hlyR*.

Per obtenir tota la col·lecció de soques portadores del plàsmid, es va conjuguar la soca BSN26 i les seves respectives derivades (BSN26Y, BSN26H, BSN26HY, BSN27, BSN27Y, BSN27H) amb la soca K-12 pHly152 (materials i mètodes, apartat 2.4.3). Es van seleccionar els transconjugants per les corresponents resistències a antibiòtics i pel fenotip hemolític.

L'observació del fenotip dels transconjugants obtinguts (Fig. 3.3.1), permet comprovar que tal i com succeïa en el cas del plàsmid pANN202-312, el fenotip del mutant *ydgT* és molt similar al mostrat per la soca salvatge (BSN26), mentre que el doble mutant *hha ydgT* (BSN26HY), presenta un halos d'hemòlisi superior al de la soca *hha* (BSN26). Les soques portadores de mutacions *hns* presenten una elevada expressió de l'hemolisina, tal com ja s'ha descrit anteriorment (Nieto *et al.*, 2000)

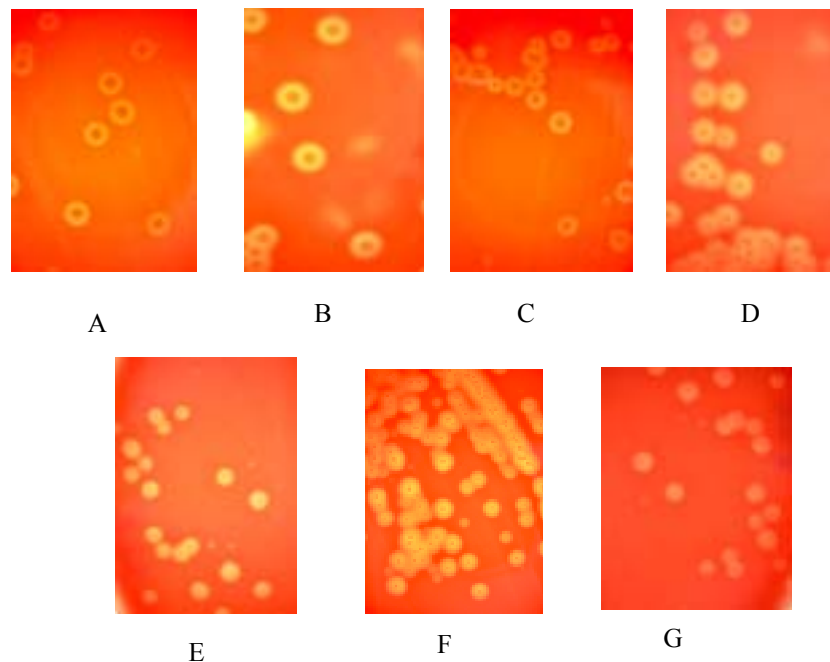


Figura 3.3.1. Fenotip hemolític en plaques d'agar-sang de soques portadores del plàsmid pHly152 A) BSN26 , B) BSN26H, C) BSN26Y, D) BSN26HY, E) BSN27, F) BSN27H i G) BSN27Y.

Una vegada obtingudes totes les soques portadores del plàsmid pHly152, es va valorar la producció d'hemolisina mitjançant dues aproximacions experimentals complementàries: per una banda l'avaluació de l'activitat hemolítica dels sobrenedants de diferents cultius, i per l'altra la detecció del polipèptid HlyA mitjançant immunodetecció.

3.3.1. VALORACIÓ DE L'ACTIVITAT HEMOLÍTICA

Es va valorar l'activitat hemolítica present als sobrenedants dels cultius en fase exponencial (DO_{600} de 0,4 i 0,8) (apartat 2.8.4.1), ja que està descrit que la màxima producció de la toxina es produeix entre aquests intervals de creixement (Mouriño *et al.*, 1994).

La temperatura està considerada com a un factor ambiental que influeix en l'expressió de diversos factors de virulència, entre ells l'hemolisina d'*E.coli*. Està descrit que a baixa temperatura s'inhibeix la producció d'aquesta toxina (Mouriño *et al.*, 1994). Per comparar la producció d'hemolisina de les diferents soques, es van utilitzar condicions de 37°C de temperatura d'incubació, a on l'expressió de l'operó *hly* és més elevada.

En la figura 3.3.2, es mostra un histograma on es representen els valors d'activitat hemolítica externa corresponents a cultius de les soques BSN26 (pHly152), BSN26Y (pHly152), BSN26H (pHly152), BSN26HY (pHly152), BSN27 (pHly152), BSN27Y (pHly152) i BSN27H (pHly152) a 37°C i en medi LB.

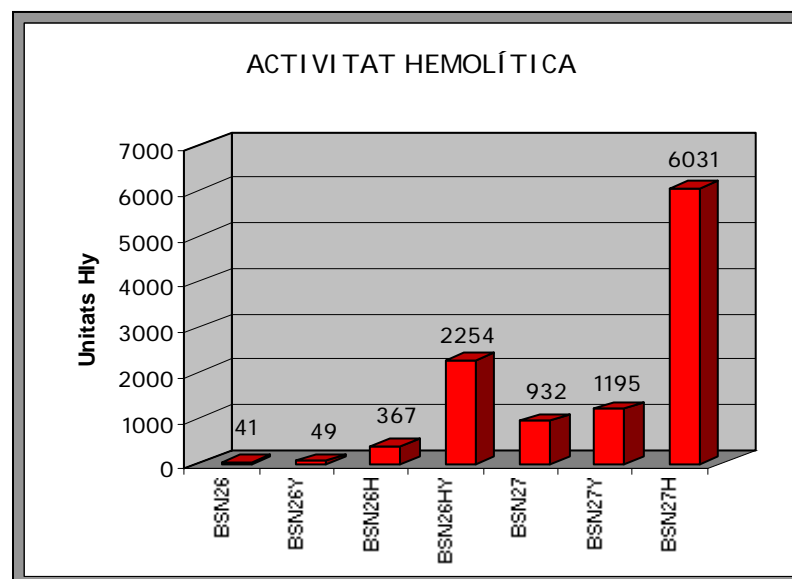


Figura 3.3.2. Valoració de l'activitat hemolítica externa de cultius de soques portadores del plàsmid pHly152 crescudes en medi LB a 37°C.

El resultat obtingut mostra que la mutació *ydgT* per si sola no causa cap efecte significatiu sobre l'expressió de l'hemolisina, ja que presenta una activitat hemolítica molt similar a la de la soca parental, unes 8 vegades menys que la detectada al cultiu de la soca *hha*. Aquest fet ens permetia hipotetitzar que potser és la proteïna Hha la responsable de la regulació de l'expressió de l'operó *hly*, i que YdgT podria tenir un paper davant una manca d'Hha. Els resultats obtinguts en els dobles mutants *hha ydgT*, ens van permetre comprovar que efectivament la doble mutació causa un important increment de l'activitat hemolítica superior a la suma dels efectes de les dues mutacions individuals. Les unitats d'hemolisina detectades en el cas del doble mutant són 6 vegades superiors a les del mutant *hha*.

També s'observa a l'histograma presentat que el doble mutant *hha ydgT* té un efecte 2,5 vegades superior al que presenta el mutant *hns*, però tot i així és inferior al que causa la doble mutació *hha hns*.

3.3.2. IMMUNODETECCIÓ D'HEMOLISINA

L'avaluació de l'activitat hemolítica proporciona una dada quantitativa tot i que no hi ha una correlació exacta i precisa entre l'activitat hemolítica obtinguda en l'assaig i la quantitat d'hemolisina a la mostra (un increment de tres cops en la quantitat d'hemolisina en la mostra pot resultar en valors d'activitat hemolítica deu cops majors). La detecció de la quantitat total d'hemolisina a la mostra proporciona una informació complementària de gran valor. Per confirmar els resultats obtinguts en l'apartat anterior, es va realitzar una immunodetecció de l'hemolisina (HlyA) present en el sobrenedant dels cultius de les soques estudiades (materials i mètodes 2.8.9 i 2.8.1.3).

A la figura 3.3.3 es mostren els resultats d'aquesta immunodetecció.

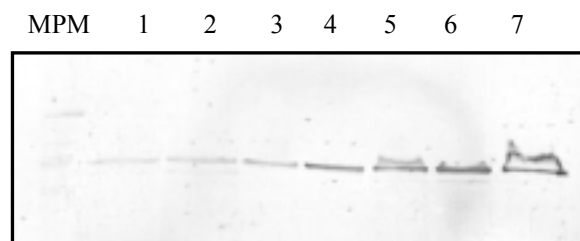


Figura 3.3.4. Immunodetecció d'HlyA externa de cultius de les soques 1) BSN26 (pHly152), 2) BSN26Y (pHly152), 3) BSN26H (pHly152), 4) BSN26HY (pHly152), 5) BSN27 (pHly152), 6) BSN27Y (pHly152) i 7) BSN27H (pHly152) en medi LB a 37°C.

Tal i com es pot apreciar en la immunodetecció, les soques BSN26Y i BSN26H no produeixen significativament més hemolisina que la soca parental BSN26. En canvi, es pot observar que es detecta més quantitat de polipèptid HlyA en el sobrenedant del cultiu de la soca BSN26HY. En aquest cas, els nivells d'hemolisina observats en les soques dobles mutants (BSN26HY, BSN27H, i BSN27Y) i la BSN27 són molt similars. Els resultats indiquen que la mutació *hns* causa un augment de la producció d'hemolisina, i que aquest augment també és observable en el cas de la soca doble mutant *hha ydgT*, sobretot si el comparem amb la producció d'hemolisina per part de les soques *hha* (BSN26H) o *ydgT* (BSN26Y).

3.3.3. EFECTE DE LA TEMPERATURA I L'OSMOLARITAT EN LA PRODUCCIÓ D'HEMOLISINA EN UN FONDS GENÈTIC *ydgT*

La producció de l'hemolisina està regulada per factors ambientals. En condicions d'elevada osmolaritat i baixa temperatura la seva síntesi està reprimida (Mouriño *et al.*, 1994). La mutació *hha* causa una desrepressió parcial de l'expressió de l'hemolisina en aquestes condicions (Mouriño *et al.*, 1996).

A fi i efecte de determinar quin era el paper de la proteïna YdgT en la regulació de l'expressió de l'operó hemolític en les condicions descrites com a repressores, és a dir, baixa temperatura i elevada osmolaritat, es va fer una valoració de l'activitat hemolítica i detecció de l'hemolisina externa total de diferents soques en les esmentades condicions.

3.3.3.1 Efecte de la temperatura en l'expressió de l'hemolisina

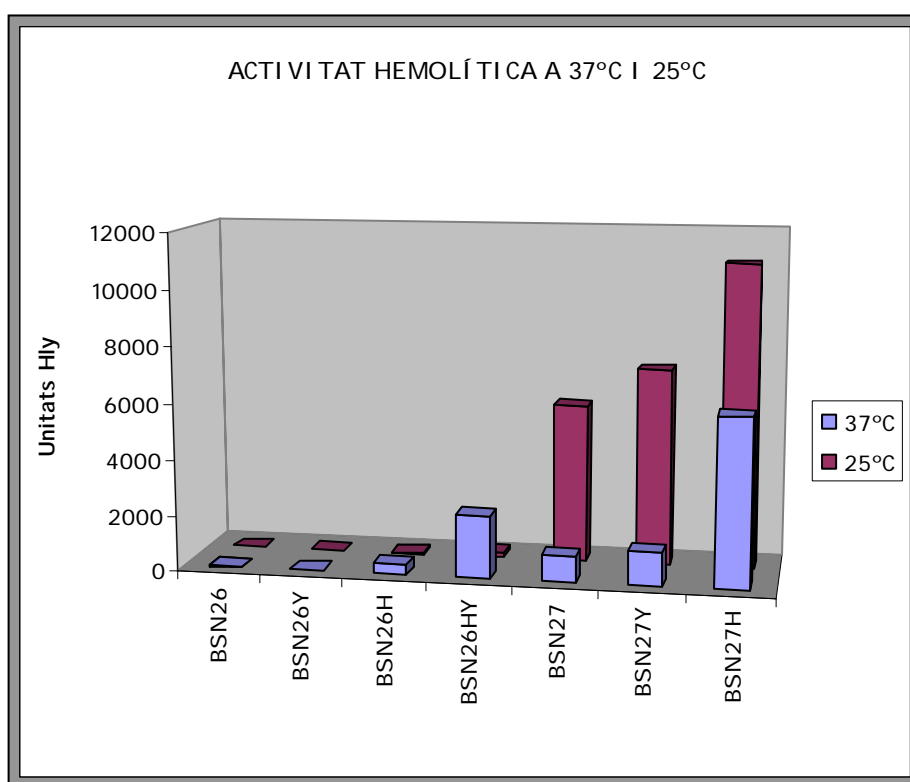
Els resultats exposats als apartats 3.3.1 i 3.3.2 indicaven que la mutació *ydgT* no causa un increment de l'expressió de l'hemolisina respecte a la soca parental, al menys en les condicions assajades, és a dir, 37°C. La soca portadora de la doble mutació, *hha ydgT* sí que causa un notable increment.

L'expressió de l'hemolisina és dependent de factors ambientals, i està reprimida a 25°C. Es va valorar l'activitat hemolítica i l'hemolisina total produïda per diferents soques, per tal de determinar quin efecte causa la mutació *ydgT* a baixa temperatura, per comparació amb les dades obtingudes en cultius a 37°C.

Les soques estudiades van ser: BSN26, BSN26Y, BSN26H, BSN26HY, BSN27, BSN27Y i BSN27H, portadores del plàsmid hemolític pHly152.

3.3.3.1.1 Valoració de l'activitat hemolítica

A la figura 3.3.4 es mostren els resultats representats tant en diagrama de barres com en taula obtinguts en la realització de la mesura de l'activitat hemolítica de les soques portadores del plàsmid pHly152, en cultius incubats a 25°C, en comparació als resultats obtinguts a 37°C (apartat 3.3.1).



	BSN26	BSN26Y	BSN26H	BSN26HY	BSN27	BSN27Y	BSN27H
37°C	41	49	367	2254	932	1195	6031
25°C	1	1	15	200	5697	7053	10878

Figura 3.3.4. Valoració de l'activitat hemolítica externa a cultius de les soques BSN26, BSN26Y, BSN26H, BSN26HY, BSN27, BSN27Y i BSN27H, totes elles portadores del plàsmid pHly152 i crescudes en medi LB a 37°C i a 25°C. A la taula es mostren les unitats d'hemolisina determinades.

Els resultats mostren que tal i com ja havíem observat, a 37°C l'activitat hemolítica detectada a cultius de la soca portadora de la doble mutació *hha ydgT* (BSN26HY) és molt superior a la que es detecta en els mutants simples, i que aquesta activitat és fins i tot superior a la que es pot detectar en cultius de la soca BSN27 (*hns*). En canvi, a 25°C els resultats no són proporcionals als de 37°C. És a dir, el doble mutant *hha ydgT* presenta una activitat molt més baixa que la detectada en cultius del mutant *hns*. De tota manera, però, l'activitat hemolítica del doble mutant *hha ydgT* és més elevada que la presentada pels mutants simples *hha* o *ydgT*, en un rang similar al detectat a 37°C. Sembla que el paper de les proteïnes Hha i YdgT seria més important a 37°C que a 25°C.

3.3.3.1.2 Immunodetecció de l'hemolisina externa total

Per a corroborar els resultats obtinguts de l'activitat hemolítica, es va procedir a fer una immunodetecció del polipèptid HlyA dels mateixos cultius crescuts a 37°C i 25°C (Fig. 3.3.5).

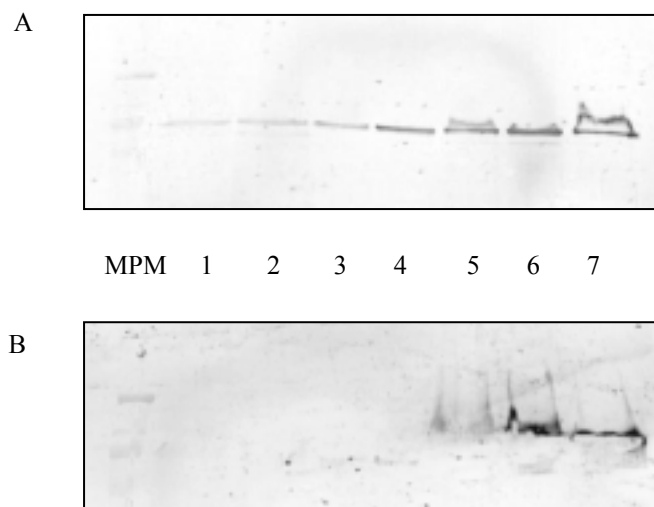


Figura 3.3.5. Immunodetecció d'HlyA externa de cultius de les soques 1) BSN26 (pHly152), 2) BSN26Y (pHly152), 3) BSN26H (pHly152), 4) BSN26HY (pHly152), 5) BSN27 (pHly152), 6) BSN27Y (pHly152) i 7) BSN27H (pHly152) en medi LB a A) 37°C i B) 25°C.

En efecte, la quantitat d'hemolisina detectada a 37°C en cultius de la soca BSN26HY (pHly152) està en el rang de la detectada a mutants derivats de la BSN27, tal i com s'havia

observat en les determinacions de l'activitat hemolítica. En canvi això no es dona a 25°C, on es veu clarament que la producció d'hemolisina és dependent principalment de la mutació *hms*. Per tant, es reforça la possible idea de que potser Hha i YdgT són importants en la regulació de l'operó *hly* principalment a 37°C.

3.3.3.2 Efecte de l'osmolaritat

L'expressió de l'hemolisina està regulada per l'osmolaritat del medi. Així, aquesta expressió està reprimida en condicions d'elevada osmolaritat. La mutació *hha* desreprimeix l'expressió en aquestes condicions.

Ens vam plantejar estudiar si la proteïna YdgT tenia algun paper en la repressió de l'expressió de l'hemolisina segons l'osmolaritat del medi.

L'estudi de l'expressió de l'hemolisina va presentar el problema de que no es podia realitzar en condicions de baixa osmolaritat. Per una banda, la valoració de l'activitat hemolítica en cultiu no és possible, degut a la lisi dels eritròcits en absència de NaCl, i per altra banda, els problemes de creixement presentats per les soques en condicions de baixa osmolaritat impedièren l'anàlisi de l'hemolisina total expressada per immunodetecció.

Així, en aquest cas tant sols es va realitzar la immunodetecció de l'hemolisina en cultius crescuts en medi d'elevada osmolaritat, és a dir, 0,5M de NaCl (figura 3.3.6).

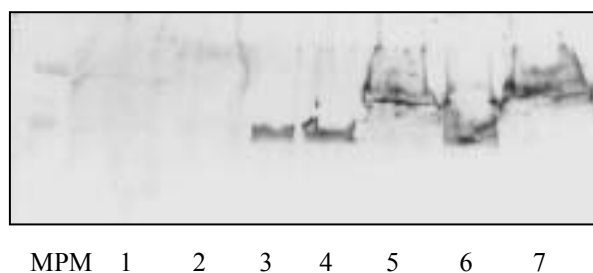


Figura 3.3.6. Immunodetecció d'HlyA externa de cultius de les soques 1) BSN26 (pHly152), 2) BSN26Y (pHly152), 3) BSN26H (pHly152), 4) BSN26HY (pHly152), 5) BSN27 (pHly152), 6) BSN27Y (pHly152) i 7) BSN27H (pHly152) en medi LB 0,5M NaCl.

La mutació *ydgT* no causa un efecte clar sobre l'expressió de l'hemolisina en condicions d'elevada osmolaritat. És a dir, no es detecta el polipèptid HlyA, igual que succeeix amb els cultius de la soca salvatge (BSN26). En canvi, sí que es pot detectar un increment important d'hemolisina en cultius de la soca *hha* (BSN26H) i en el cas del doble mutant BSN26HY. En aquest cas, però, la quantitat d'hemolisina és similar a la detectada en el mutant *hha*. El mutant *hns* i el doble mutant *hha hns* presenten una elevada quantitat d'hemolisina, ja que hi ha una desrepressió de l'expressió, tal com ja s'havia descrit (Nieto *et al.*, 2000). El doble mutant *hns ydgT* presenta també una desrepressió de l'expressió de l'hemolisina en condicions d'elevada osmolaritat, equivalent però a la detectada en *hns* i derivats.

3.4 ESTUDIS DE COMPLEMENTACIÓ DE LA MUTACIÓ *hha* PEL GEN *ydgT*

En base als resultats obtinguts a l'apartat anterior i donada l'elevada homologia trobada entre les proteïnes YdgT i Hha (66 % de similaritat), vam decidir estudiar si la funció de la proteïna Hha en la regulació de l'operó de l'hemolisina podia ser substituïda per YdgT, és a dir, si el fenotip hemolític causat per la mutació *hha* podia ser complementat pel gen *ydgT*.

Ja ha estat descrita la complementació de la funció de la proteïna Hha per una altra proteïna reguladora pertanyent a la mateixa família, la proteïna YmoA de *Yersinia enterocolitica*, tot i que aquesta complementació és dependent de la dosi gènica (Balsalobre *et al.*, 1996). I a l'inrevés, el gen *hha* quan està incorporat en un plàsmid de número mig de còpies, complementa l'efecte de la mutació *ymoA* (Mikulskis i Cornelis, 1994).

Per tal de determinar doncs, si YdgT podia complementar Hha, es va clonar el gen *ydgT* en vectors d'alt i baix número de còpies, es van transformar els plàsmids recombinants a la soca Hha-3 (pANN202-312), i es va determinar l'efecte en *trans* de l'expressió del gen clonat sobre l'expressió de l' α -hemolisina. La raó per la qual es va utilitzar el plàsmid hemolític pANN202-312, és que l'expressió de hemolisina dependent d'aquest plàsmid és més elevada que en el cas del plàsmid pHly152. Això permetria una millor avaluació del fenotip.

3.4.1 CONSTRUCCIÓ DELS PLÀSMIDS PLG-YDGT I PUC-YDGT

Per a realitzar els experiments de complementació de la mutació *hha* es va clonar el gen *ydgT* en un plàsmid multicòpia com és el pUC19 (de 15 a 20 còpies per cèl·lula) i en un plàsmid de baix número de còpies com el pLG338-30 (de 1 a 5 còpies per cèl·lula).

El gen *ydgT* fou amplificat mitjançant PCR utilitzant com a motlle el DNA de la soca d'*E. coli* 5K (material i mètodes 2.6.3). Com a cebadors es varen utilitzar les seqüències YdgT-Eco i YdgT-Bam/2 (Fig. 3.4.1) que permetien l'amplificació del gen *ydgT* i dels seus putatius promotors. A més, els cebadors introduïen una diana *EcoRI* i una diana *BamHI* als extrems 5' i 3' respectivament.

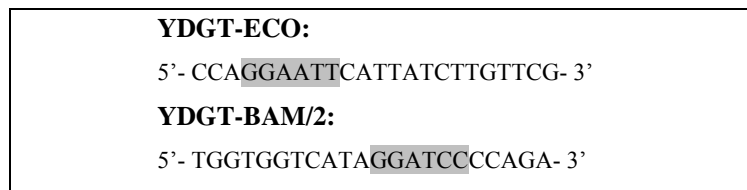


Figura 3.4.1. Oligonucleòtids utilitzats per a l'amplificació del gen *ydgT* més els 2 promotors putatius. En gris es ressalten les dianes *Eco* RI i *Bam*H I respectivament.

La temperatura d'hibridació que es va utilitzar en l'amplificació va ser de 52°C.

El producte de l'amplificació va ser digerit amb els enzims de restricció corresponents i clonat en el vector pLG338-30 i pUC19 prèviament digerits amb els mateixos enzims. Els plàsmids resultants es van anomenar pLG-ydgT i pUC-ydgT respectivament.

3.4.2 TRANSFORMACIÓ DELS PLÀSMIDS RECOMBINANTS (PLG-YDGT I PUC-YDGT) A LA SOCA Hha-3 (PANN202-312). DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT HEMOLÍTICA.

Els plàsmids pLG-ydgT i pUC-ydgT varen ser transformats a la soca Hha-3 (pANN202-312), soca mutant pel gen *hha* i que produeix halus d'hemòlisi de diàmetre superior a la soca parental.

Els transformants varen ser plaquejats en plaques d'agar-sang amb els antibiòtics corresponents als plàsmids i al marcador de la mutació *hha* (Km) per tal de fer una primera visualització del fenotip.

Els resultats obtinguts permetien observar que els transformants obtinguts amb el plàsmid pLG-ydgT mostraven un fenotip hemolític similar al de la soca Hha-3 (*hha*) (halus hemolític gran), mentre que els transformants obtinguts amb el plàsmid pUC-ydgT mostraven halos d'hemòlisi més petits, similars als de la soca 5K (*hha*⁺).

Per determinar quin és el grau de la complementació en cadascun dels casos, es va fer una valoració de l'activitat hemolítica externa en cultius de les soques estudiades. Els resultats es mostren a la taula 3.4.1.

Soca	Plàsmid	Unitats Hly
5K	-	4,5
Hha-3	-	361,2
Hha-3	pUCydgT	6,34
Hha-3	pLGydgT	307,7

Taula 3.4.1. Complementació de l'efecte de la mutació *hha* sobre l'expressió de l'hemolisina pel gen *ydgT*. Es mostren les unitats d'hemolisina determinades en cultius en LB a 37°C. Totes les soques són portadores del plàsmid pANN202-312.

És aparent que les unitats d'hemolisina determinades al cultiu de la soca Hha-3 pANN202-312 pLGydgT són equivalents a les de la mateixa soca sense el plàsmid portador del gen *ydgT*. Per tant, el gen *ydgT* en baix número de còpies no complementa l'efecte de la mutació *hha*. En canvi, la presència del gen *ydgT* en elevat número de còpies causa una reversió del fenotip pel que fa a l'hemolisina expressada, de manera que la soca Hha-3 pANN202-312 pUCydgT mostra un valor d'unitats d'hemolisina equivalents al de la soca salvatge 5K pANN202-312.

3.5 EFECTE DE LA MUTACIÓ *hha* SOBRE L'EXPRESSIÓ DEL GEN *ydgT*

S'ha descrit que l'expressió del gen *stpA* es veu incrementada a nivell transcripcional en mutants *hns* (Sondén i Uhlin, 1996; Zhang *et al.*, 1996). En base a aquest fet i als resultats obtinguts en els apartats 3.3 i 3.4, que indiquen que la proteïna YdgT pot complementar en certa mesura la funció de la proteïna Hha en la regulació de l'operó hemolític, ens preguntàvem si la transcripció del gen *ydgT* es veia influenciada per la mutació *hha*.

Per això es van determinar els nivells de mRNA del gen *ydgT* en un fons genètic *hha*, mitjançant l'assaig de protecció en front la RNasa ONE™ descrit en l'apartat de material i mètodes 2.7.3.

El RNA total de cèl·lules de les soques BSN26 (wt) i BSN26H (*hha*) provinents de cultius crescuts en medi LB i incubats fins a la meitat de la fase exponencial i al principi de la fase estacionària (DO₆₀₀ de 0,5 i 1 respectivament), fou extret pel mètode del fenol acídic calent (apartat 2.7.1) i analitzat mitjançant l'assaig de la RNasa ONE™.

Com a sonda es va utilitzar el RNA anti-sentit del gen *ydgT* marcat radioactivament (apartat 2.7.3.1). Aquest RNA es va obtenir a partir de la clonació en el vector pET3b del gen *ydgT* de manera que mitjançant transcripció *in vitro* es sintetitzés una sonda de RNA complementària al missatger. Per això, es va amplificar el gen amb els oligonucleòtids que es mostren a la figura 3.5.1, que alhora que amplifiquen, introdueixen dianes apropiades per a que el fragment pogués ser clonat. La temperatura d'hibridació que es va utilitzar en l'amplificació va ser de 48°C.

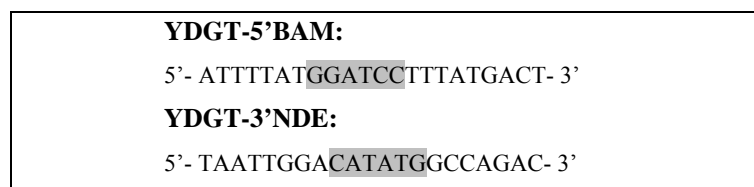


Figura 3.5.1. Oligonucleòtids utilitzats en l'amplificació del gen *ydgT* per a la construcció d'una sonda. En gris es ressalten les dianes *BamH* I i *Nde* I, respectivament.

Es va comparar la transcripció del gen *ydgT* entre ambdues soques (BSN26 i BSN26H) i a ambdós punts del creixement (fig. 3.5.2). Podem veure que tant a la meitat de la fase exponencial com a l'inici de la fase estacionària hi ha un increment en la transcripció del gen *ydgT* a la soca BSN26H (*hha*). L'única diferència observable entre els resultats obtinguts amb RNA aïllat en ambdues fases del creixement, és que a DO_{600} de 0,5 els nivells de transcripció del gen *ydgT* a les dues soques són més elevats que a DO_{600} de 1.

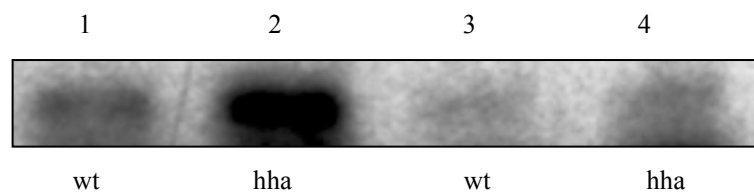


Figura 3.5.2. Anàlisi de la transcripció del gen *ydgT* mitjançant assaig de protecció front la RNasa ONE™ en la soca salvatge (BSN26) i la soca mutant *hha* (BSN26H). Experiment realitzat utilitzant el RNA aïllat en fase exponencial ($DO_{600}=0,5$)(1 i 2) i a l'inici de la fase estacionària ($DO_{600}=1$)(3 i 4).

Els resultats obtinguts mostren que en un fons genètic *hha* es produeix un increment de la transcripció del gen *ydgT*. Així mateix, aquests resultats també permeten constatar que l'expressió del gen *ydgT* és més elevada en fase exponencial.

3.6. EFECTE DE LES MUTACIONS *hha* i *ydgT* SOBRE L'EXPRESSIONIÓ DELS GENS *hns* i *stpA*

3.6.1. EFECTE DE LES MUTACIONS *hha* I *ydgT* SOBRE L'EXPRESSIONIÓ DEL GEN *hns*

En la regulació de l'expressió de l'operó *hly* del plàsmid pHly152, la proteïna H-NS juga un paper rellevant (Madrid *et al.*, 2002a). Tenint en compte la interacció H-NS-Hha, i el propi paper de la proteïna YdgT, semblava interessant determinar si Hha o YdgT regulen l'expressió d'H-NS. Per analitzar la hipotètica regulació de l'expressió del gen *hns* per Hha o YdgT, es va realitzar una anàlisi de les quantitats relatives del mRNA corresponent al gen *hns* present en cultius en fase exponencial del creixement de les soques BSN26, BSN26Y, BSN26H, BSN26HY i BSN27. Per fer-ho es va posar a punt la tècnica de RT-PCR (material i mètodes 2.7.4).

Per a la retrotranscripció o transcripció inversa del mRNA a DNA còpia es va utilitzar l'oligonucleòtid HNS-RT2 que alhora ens serviria pel pas posterior de PCR com a oligonucleòtid 3'-5'. L'oligonucleòtid HNS-PCR era el cebador necessari per a la PCR situat en posició 5'-3' (Fig. 3.6.1). Ambdós oligonucleòtids es van afegir simultàniament a l'inici de la reacció de RT-PCR. La temperatura d'hibridació utilitzada en la RT-PCR va ser de 54°C.

HNS-RT2:
5'- AGATTTAACGGCAGCAAGGC- 3'

HNS-PCR:
5'- ATGAGCGAAGCACTTAAAATTC- 3'

Figura 3.6.1. Oligonucleòtids utilitzats per a la transcripció inversa (HNS-RT2) d'un fragment del mRNA d'*hns* i posterior amplificació del DNA còpia d'*hns*' (HNS-RT2 i HNS-PCR).

Per a l'elecció dels oligonucleòtids calia tenir en compte que la regió a amplificar correspongués a la seqüència codificant del gen *hns*. En aquest cas, es van triar

oligonucleòtids tals que permetessin l'amplificació del nucleòtid +1 fins al +252 de la regió codificant d'*hns*. A aquest fragment retro-transcrit i posteriorment amplificat el vam anomenar *hns'*. A més, per a l'elecció dels oligonucleòtids, es van triar zones d'uns 20 parells de bases que presentessin poca homologia amb la seqüència del gen *stpA*, ja que al ser homòleg a *hns* es podien donar falsos resultats degut a l'amplificació de *stpA* i no d'*hns* (figura 3.6.2). Per comprovar que l'assaig no detectava RNA del gen *stpA*, es va utilitzar també com a control RNA aïllat de la soca BSN27 (*hns*). També es va comprovar que les mostres estiguessin lliures de DNA determinant que no hi havia amplificació després d'inactivar la transcriptasa inversa.

```

hns      ATGAGCGAAGCACCTAAAATCTGAAACAACATCCGACTCTTCGTGCGCAGGCAAGAGAA 60
stpA     ATGTCCGTAATGTACAAAGTTAAATAACATTGCGACCCTCCGTGCGATGGCTCGCGAA 60
          ***  ** *      *  *** * * ** ***** * * * * * *****  *** * ***

hns      TGTACTTGAACCGTGGAGAAATGCTGGAAAAATTAGAAGTTGTTGTTAACGAACGT 120
stpA     TTCTCCATTGACGTCTTGAAGAAATGCTCGAAAAATTCAGGGTTGTCATAAAGAAAGA 120
          *  *  ****      ** ***** ***** ***** ***** * * * * *

hns      CGCGAAGAAGAAAGCGCGCTGCTGC-TGAAGTTGAAGAGCGCACTCGTAAACTGCAGCA 179
stpA     CGTGAAGAAGAA-GAACAGCAGCAGCGTGAAGTGGCAGAGCGC-CAGGAAAAAATTAGCA 178
          ** ***** *  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

hns      A-TATCGGAAATGCTGATCGCTGACGGTATTGACCCGAACGAGCTGCTGAATAECCTTG 238
stpA     CCTGGCTGGAGCTGATGAAAGCTGACGGAATTAACCCGGAAGAGTTATTGGGTAATAGCT 238
          *  *  **  *  * * *  ***** * * * * * * * * * * * * * *

hns      CCGCCGTTAAATCTGGCACAAAGCTAAACGTGCTCAGCGTCCGGCAAAATATAGCTACG 298
stpA     CTGCTGCTGCACCAAGCGCTGGTAAAAAACGCCAGCCGCGTCCGGCGAAATATAAATTCA 298
          * * * * * * * * * * ***** * ***** ***** ***** * *

hns      TTGACGAAAACGGCGAAACTAAAACCTGGACTGGCCAGGCGGTACTCCAGCTGTAATCA 358
stpA     CCGATGTTAACGGTGAACCTAAAACCTGGACCGGTACAGGCGGTACACCGAAGCCAATTG 358
          ** *  ***** ***** ***** ***** ** ***** ***** **  ***

hns      AAAAAGCAATGGATGAGCAAGGTAATCCCTCGACGATTCCTGATCAAGCAATAA 414
stpA     CTCAGGCGCTGGCAGAGGTAATCTCTCGACGATTCCTGATCTAA----- 405
          * * *  ***  ** ***** ***** ***** ***** *

```

Figura 3.6.2. Comparació de les seqüències de nucleòtids dels gens *hns* i *stpA* mitjançant el programa Clustal W (v 1.82), i oligonucleòtids triats per a la RT-PCR.

A la figura 3.6.3 es mostren els resultats obtinguts després de la prova de RT-PCR.

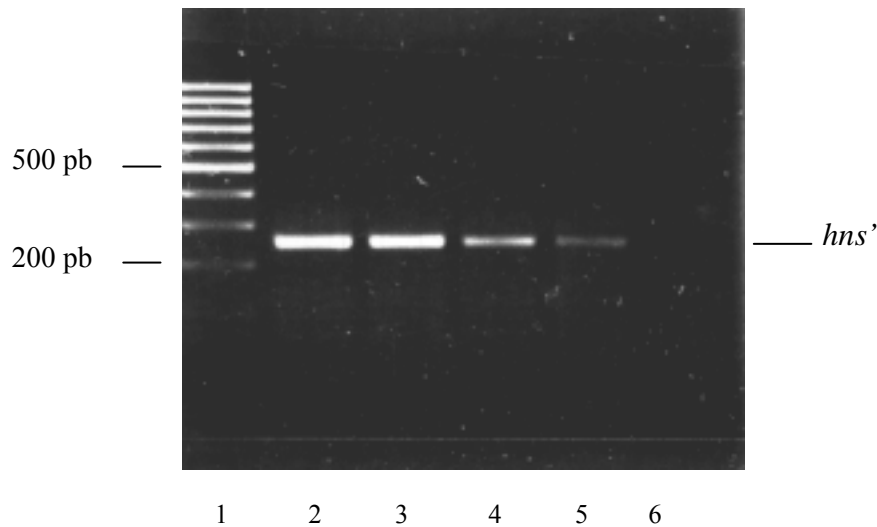


Figura 3.6.3. Anàlisi electroforètica en agarosa 0,8% del mRNA del gen *hns* retro-transcrit i amplificat (*hns'*) de diferents soques. 1) Marcador de pes molecular 100 bp-ladder, 2) BSN26, 3) BSN26Y, 4) BSN26H, 5) BSN26HY i 6) BSN27

Tal i com es pot deduir de la figura 3.6.3, la quantitat d'*hns'* obtinguda en la RT-PCR té el seu valor màxim a la soca BSN26. A la soca BSN26Y (*ydgT*) es pot comprovar que si hi ha diferències respecte la soca salvatge, aquestes no són detectables amb aquesta tècnica. En canvi, en el mutant *hha* (BSN26H) hi ha una clara disminució en l'expressió del gen *hns* que es fa molt més evident en el doble mutant *hha ydgT* (BSN26HY). A la soca BSN27 (*hns*), degut a que no té el gen *hns* i a que no s'ha donat amplificació del mRNA de *stpA*, no es detecta cap banda.

Per tant, sembla ser que quan hi ha manca de la proteïna Hha o Hha i YdgT en el cas d'un doble mutant, es produeix una disminució de la transcripció del gen *hns*. Aquestes dades són vàlides almenys per a la fase exponencial del creixement.

3.6.2. EFECTE DE LES MUTACIONS *hha* I *vdgT* SOBRE L'EXPRESSION DEL GEN *stpA*

Vistos aquests resultats, ens vam preguntar si aquestes proteïnes també podien exercir algun tipus de control sobre l'expressió del gen que codifica per a la proteïna paràloga d'H-NS, el gen *stpA*. Per fer-ho, en primer lloc es va realitzar una immunodetecció de la proteïna StpA en extractes de les soques BSN26, BSN26Y, BSN26H, BSN26HY, BSN27 i BSN28 (Figura 3.6.4).

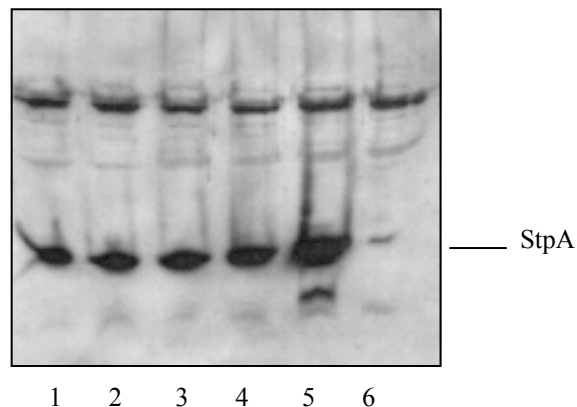


Figura 3.6.4. Anàlisi electroforètica en SDS-PAGE en Tris-Tricina i posterior immunodetecció amb anticossos anti-StpA sobre extractes de les soques 1) BSN26, 2) BSN26Y, 3) BSN26H, 4) BSN26HY, 5) BSN27 i 6) BSN28.

Com es pot observar a la figura 3.6.4, amb aquesta metodologia no es poden detectar diferències en les quantitats de la proteïna StpA entre les diferents soques, exceptuant la soca BSN27, ja en mutants *hns* hi ha una sobreexpressió del gen *stpA* que es tradueix en un augment en la quantitat de StpA. Cal remarcar que la petita banda detectada a la soca BSN28 (*stpA*) es pot atribuir a la proteïna H-NS detectada amb els anticossos anti-StpA, que tot i que en menys mesura que els anticossos anti-H-NS també presenten certa reacció creuada.

Degut a que a partir d'aquest experiment no podíem treure cap conclusió pel que fa als efectes de les mutacions *hha* i/o *ydgT* sobre l'expressió del gen *stpA*, vam decidir realitzar experiments de RT-PCR per a determinar les quantitats relatives de mRNA corresponent al gen *stpA* present en cultius en fase exponencial del creixement de les soques BSN26, BSN26Y, BSN26H, BSN26HY, BSN27 i BSN28.

Per a la retrotranscripció o transcripció inversa del mRNA a DNA còpia es va utilitzar l'oligonucleòtid STPA-RT que alhora ens serviria pel pas posterior de PCR com a oligonucleòtid 3'-5'. L'oligonucleòtid STPA-PCR era el cebador necessari per a la PCR situat en posició 5'-3' (Fig. 3.6.5). Ambdós oligonucleòtids es van afegir simultàniament a l'inici de la reacció de RT-PCR.

<p>STPA-RT: 5'- ATAGTCCTGCTGCTGCACCA - 3'</p> <p>STPA-PCR: 5'- ATGTCCGTAATGTTACAAAGTT- 3'</p>

Figura 3.6.5. Oligonucleòtids utilitzats per a la transcripció inversa (STPA-RT) d'un fragment del mRNS de *stpA* i posterior amplificació del DNA còpia de *stpA*' (STPA-RT i STPA-PCR).

Per a l'elecció dels oligonucleòtids calia tenir en compte que la regió a amplificar correspongués a la seqüència codificant del gen *stpA*. En aquest cas, es van triar oligonucleòtids tals que permetessin l'amplificació del nucleòtid +1 fins al +252 de la regió codificant de *stpA*. A aquest fragment retro-transcrit i posteriorment amplificat el vam anomenar *stpA*'. A més, com en el cas de la RT-PCR del gen *hns*, per a l'elecció dels oligonucleòtids, es van triar zones d'uns 20 parells de bases que presentessin poca homologia amb la seqüència del gen *hns*, ja que al ser homòleg a *hns* es podien donar falsos resultats degut a l'amplificació d'*hns* i no de *stpA*. La seqüència utilitzada va ser la equivalent a la que es va utilitzar en els experiments de RT-PCR d'*hns*, però en aquest cas de *stpA* (Figura 3.6.2). Per comprovar que l'assaig no detectava RNA del gen *hns*, es va utilitzar també com a control RNA aïllat de la soca BSN28 (*stpA*). També es va comprovar que les mostres estiguessin lliures de DNA determinant que no hi havia amplificació després d'inactivar la transcriptasa inversa.

A la figura 3.6.6 es mostren els resultats obtinguts en realitzar la prova de RT-PCR del gen *stpA*.

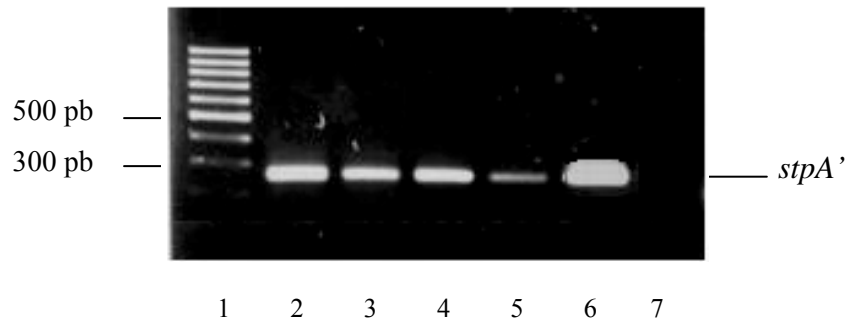


Figura 3.6.6. Anàlisi electroforètica en agarosa 0,8% del mRNA del gen *stpA* retro-transcrit i amplificat (*stpA'*) de diferents soques. 1) Marcador de pes molecular 100 bp-ladder, 2) BSN26, 3) BSN26Y, 4) BSN26H, 5) BSN26HY, 6) BSN27 i 7) BSN28.

Si prenem com a referència la soca salvatge BSN26, podrem observar que les dues mutacions *hha* i *ydgT* mostren un nivell de mRNA corresponent a *stpA* lleugerament inferior, mentre que en el cas del doble mutant *hha ydgT* si que es detecta una important disminució de la quantitat de mRNA. Sembla que ambdues proteïnes podrien intervenir en l'expressió del gen *stpA*, ja que cadascuna de les mutacions per separat causa una lleugera disminució de l'expressió, que és més dràstica en el cas del doble mutant. La soca BSN27 que correspon al mutant *hns* presenta tal i com s'indica a la bibliografia un augment en l'expressió de StpA degut a que el gen *stpA* està regulat negativament per H-NS (Zhang *et al.*, 1996; Free i Dorman, 1997).

3.7 INTERACCIÓ DE LES PROTEÏNES YDGT I HHA AMB ALTRES PROTEÏNES

La proteïna Hha d'*Escherichia coli* interacciona amb la proteïna H-NS, formant un complexe que intervé en la regulació de l'expressió de l'operó de l'hemolisina (Nieto *et al.*, 2000). Per altra banda la proteïna StpA, anàloga a H-NS, i que pot suplir algunes de les seves funcions, forma heterodímers amb H-NS (Johansson *et al.*, 2001).

La nostra hipòtesi plantejava la idea que la proteïna YdgT pogués exercir un paper similar a StpA amb respecte a Hha, i per això es va estudiar la possible interacció de YdgT amb d'altres proteïnes associades al nucleoide. Per això es va realitzar la purificació de proteïnes de fusió amb una cua d'histidines en condicions no desnaturalitzants i l'observació de possibles interaccions per co-purificació amb d'altres proteïnes (Hoffman i Roeder, 1991; Gamer *et al.*, 1992; Pichoff *et al.*, 1998).

3.7.1 CONSTRUCCIÓ DE LA PROTEÏNA RECOMBINANT HIS-YDGT

Per estudiar la possible interacció de la proteïna YdgT amb altres proteïnes es va construir una proteïna de fusió His-YdgT.

Per a la realització d'aquesta construcció, en primer lloc es va amplificar el gen *ydgT* des del codó d'inici fins 95 nucleòtids més enllà del codó de finalització de la seva transcripció. En els oligonucleòtids utilitzats es van introduir dianes pels enzims de restricció *NdeI* i *BamHI*, per la seva posterior clonació al vector pET3b. A la figura 3.7.1 es mostren els oligonucleòtids utilitzats. La temperatura d'hibridació que es va utilitzar en l'amplificació va ser de 48°C.

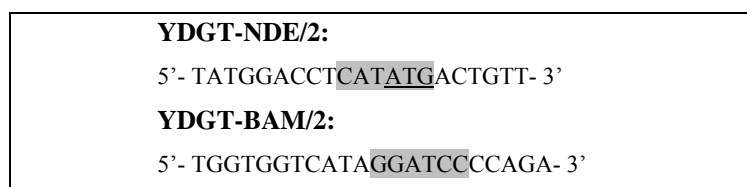


Figura 3.7.1. Oligonucleòtids utilitzats en l'amplificació del gen *ydgT* per a la clonació en el vector pET3b. En gris es ressalten les dianes *NdeI* i *BamHI*. Subratllat es mostra el triplet d'inici de la transcripció.

Un cop clonat el gen *ydgT* en el vector es va procedir a la introducció d'una cua d'histidines anterior al triplet d'inici de la transcripció. D'aquesta manera aconseguiríem una proteïna amb una cua de 6 histidines en l'extrem amino-terminal. La cua d'histidines es va construir a partir de la unió de dos oligonucleòtids complementaris (Fig. 3.7.2) que en ser transcrits codifiquen per una cua de 6 histidines. Els 2 oligonucleòtids s'uneixen de manera que deixen en ambdós extrems la diana *Nde* I per a poder ser clonats en un lloc *Nde* I entre la seqüència del plàsmid i el gen *ydgT*.

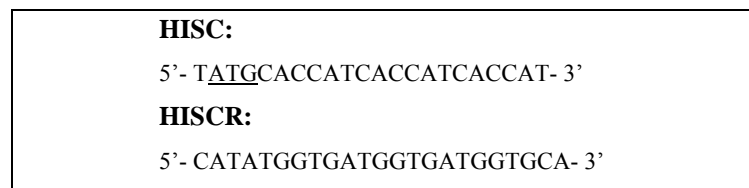


Figura 3.7.2. Oligonucleòtids utilitzats per a la introducció d'una cua de 6 histidines a l'extrem 5' del gen *ydgT*. Subratllat es mostra el codó d'inici de la transcripció.

Per a la introducció de la seqüència 6 x His (més el triplet d'inici de la transcripció) en primer lloc es va linearitzar el plàsmid pET-*ydgT* per la diana *Nde*I i a continuació es va fer una lligació amb una barreja equimolar dels oligonucleòtids HISC i HISCR. La construcció obtinguda tenia la seqüència que es mostra a la figura 3.7.3.

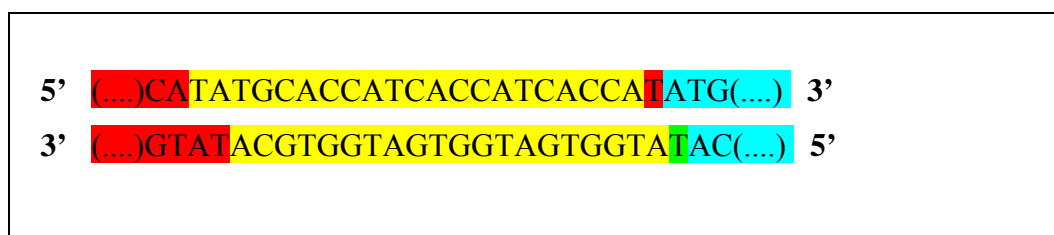


Figura 3.7.3. Seqüència simplificada del plàsmid pET-His-YdgT. En vermell es mostra seqüència corresponent al plàsmid, en groc els oligonucleòtids HISC (seqüència superior) i HISCR (seqüència inferior), en blau el codó d'inici gen *ydgT* i en verd coincideixen l'inici del gen amb un nucleòtid de l'oligonucleòtid HISCR.

La barreja es va transformar a la soca 5K i es van comprovar els clons per amplificació a partir de colònia utilitzant els cebadors HISC i YDGT-3'NDE (apartat 3.5). Els clons positius portadors del plàsmid pET-His-YdgT es van recomprovar per

seqüenciació (apartat 2.6.4) des de cebadors que hibridaven amb seqüències del propi vector (Figura 3.7.4). Es van utilitzar els cebadors des d'ambdues direccions. En ambdós casos la temperatura d'hibridació que es va utilitzar en l'amplificació va ser de 50°C.

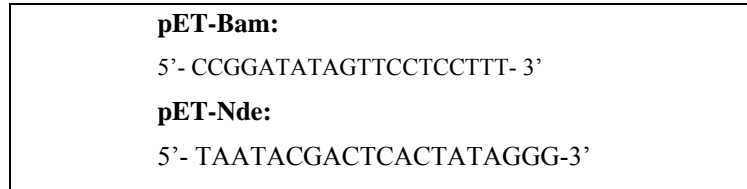


Figura 3.7.4. Oligonucleòtids utilitzats per a la seqüenciació del gen recombinant *his-ydgT* clonat en el plàsmid pET3b.

3.7.2 SOBREEXPRESSION I PURIFICACIÓ D'HIS-YDGT

Una vegada construïda la proteïna de fusió His-YdgT i clonada en un vector d'expressió, es va procedir a la seva purificació seguint el protocol descrit en l'apartat 2.8.5.

Partint del model de la interacció H-NS amb la proteïna His-Hha (Nieto *et al.*, 2000), es va decidir realitzar el mateix estudi per His-YdgT.

Es va sobreexpressar la proteïna His-YdgT a la soca BL21 (DE3) pLysS i l'extracte obtingut es va barrejar amb una matriu de Ni²⁺-NTA agarosa. Després de permetre la unió de les proteïnes, i rentar les proteïnes no unides, es van eluir les proteïnes retingudes mitjançant rentats amb imidazol 200 mM (materials i mètodes 2.8.5). Les proteïnes es van analitzar en gels de poliacrilamida en Tris-Tricina-SDS (apartat 2.8.3.1.2)

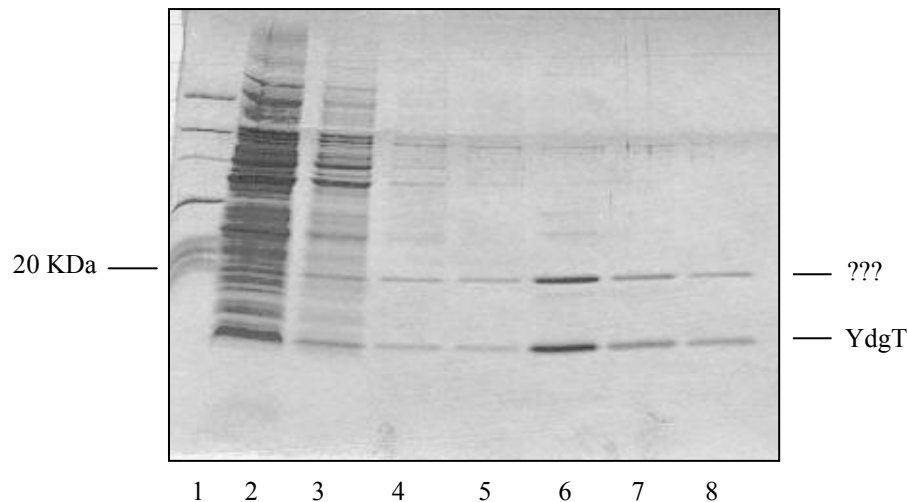


Figura 3.7.5. Anàlisi electroforètica i tinció amb Coomassie de fraccions eluïdes de Ni²⁺-NTA agarosa. 1) Marcador de pes molecular (Low Range, Bio-Rad), 2, 3, 4 i 5) Rentats de la matriu, 6, 7 i 8) Elució de proteïnes amb imidazol 200 mM.

El resultat obtingut permetia observar que l'elució de la proteïna His-YdgT anava acompanyada de la presència d'una segona proteïna, de pes molecular inferior a 20 kDa.

3.7.3 IDENTIFICACIÓ DE LA PROTEÏNA CO-PURIFICANT: H-NS

La massa aparent de la proteïna que eluia amb His-YdgT, d'uns 15 kDa, suggeria que podia o bé ser H-NS (15,5 kDa) o bé StpA (15,3 kDa). Per tal d'esbrinar si es tractava d'alguna d'aquestes proteïnes es va realitzar una anàlisi d'aquestes fraccions per immunodetecció (apartat 2.8.9) utilitzant anticossos anti-H-NS, i anticossos anti-StpA (Fig. 3.7.6). Cal tenir en compte que els anticossos anti-H-NS presenten reacció creuada front a StpA, mentre que en el cas invers, aquesta reacció és molt menor.

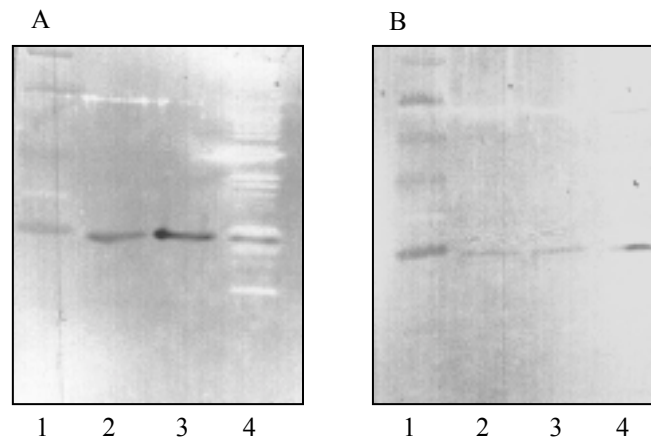


Fig. 3.7.6. Immunodetecció amb anti-sèrum anti-H-NS (A) i anti-StpA (B). 1) MPM (Broad Range Prestained, Bio-Rad), 2 i 3) fraccions eluïdes amb imidazol 200 mM (carrils 5 i 6 de la figura 3.7.5), 4) extracte cruu corresponent a una sobreexpressió d'His-YdgT (10 µg).

Com es pot deduir de l'anterior figura, la proteïna desconeguda corresponia a H-NS o StpA. Per tal de reconfirmar-ho i concloure de quina de les dues proteïnes es tractava es va determinar la seqüència N-terminal de la proteïna co-purificant per degradació d'Edman (apartat 2.8.6.1). La seqüència obtinguda coincideix exactament amb la seqüència amino-terminal de la proteïna H-NS, excepte pel primer aminoàcid (Metionina) (Fig. 3.7.7). En aquests 8 aminoàcids hi ha diferències entre les seqüències d'H-NS i de StpA, de manera que es va poder concloure que la proteïna co-purificant era H-NS.

H-NS:	sealkilnnirtlraqare....
Seqüència N-terminal:	sealkiln
StpA:	svmlqslnnirtlrama....

Figura 3.7.7. Vuit primers aminoàcids (excepte la metionina, M) obtinguts en la seqüenciació N-terminal per degradació d'Edman, que coincideixen (en gris) amb la seqüència amino-terminal d' H-NS però no de StpA.

3.7.4 EFECTE DE LA FORÇA IÒNICA DEL MEDI SOBRE L'ESTABILITAT DEL COMPLEX HIS-YDGT-H-NS

La interacció entre Hha i H-NS es pot dissociar incrementant la concentració de KCl a 1 M en el tampó dels rentats de la matriu de Ni-NTA agarosa a la que s'hi ha unit un extracte sobreexpressat en His-Hha (Nieto *et al.*, 2000).

Es va provar de dissociar la unió entre His-YdgT i H-NS de la mateixa manera (apartat 2.8.5.3). Després de realitzar la unió de l'extracte sobreexpressat en His-YdgT a la matriu d'agarosa, es va augmentar l'astringència del tampó efectuant rentats amb concentracions creixents de KCl abans d'eluir la proteïna unida (i indirectament H-NS) amb imidazol 200 mM. Les concentracions utilitzades de KCl varen ser de 0,5 M, 1 M i 2 M. Es va realitzar una electroforesi de les fraccions (Fig. 3.7.8) i es va poder observar que la unió His-YdgT-H-NS, a diferència del que passava amb His-Hha-H-NS, no es trenca ni utilitzant concentracions de KCl 2 M, ja que en els rentats no apareix cap proteïna, i només apareixen les dues proteïnes (His-YdgT i H-NS) en l'elució amb imidazol 200 mM. Aquest resultat indica que la unió entre His-YdgT (i per extensió YdgT) i H-NS és una unió forta.

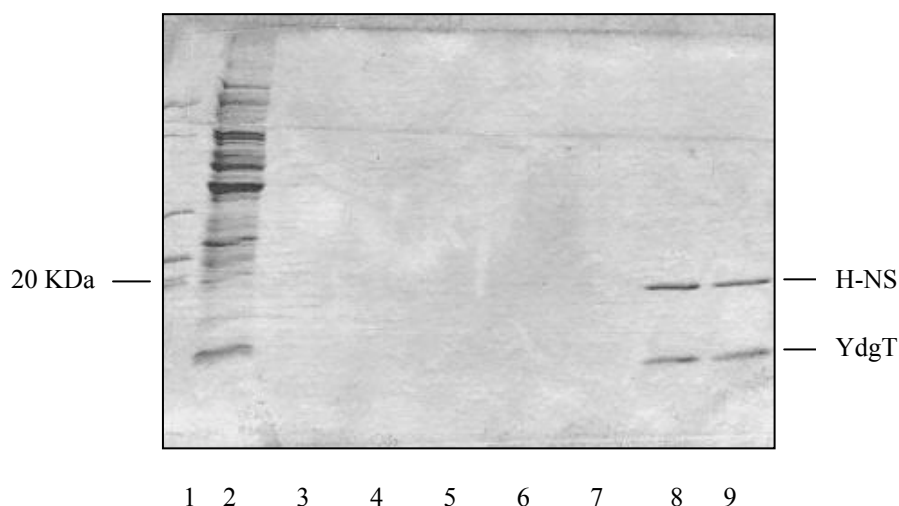


Figura 3.7.8. Anàlisi electroforètica i tinció de Coomassie de fraccions corresponents a rentats utilitzant concentracions creixents de KCl en el tampó. 1) Marcador de pes molecular (Low Range, Bio-Rad), 2 i 3) Rentats de la matriu, 4) Rentat amb KCl 0,5 M, 5 i 6) Rentats amb KCl 1 M, 7) Rentat amb KCl 2 M, 8 i 9) Elució utilitzant imidazol 200 mM.

3.7.5 PURIFICACIÓ D' YDGT-HIS

Resultats obtinguts modificant o truncant la proteïna Hha indiquen que és necessària tota la seqüència d'aminoàcids per unir-se a H-NS, i especialment l'extrem carboxi-terminal, ja que si la unió d'Hha a la matriu d'agarosa es fa mitjançant la unió d'una cua d'histidines a l'extrem carboxil, no es detecta co-purificació d'H-NS (Nieto *et al.*, 2002).

Per tal de comprovar si en el cas de la interacció entre YdgT i H-NS passava el mateix, es va col·locar la cua de sis histidines a l'extrem C-terminal de la proteïna.

Per fer-ho, es va seguir una estratègia diferent a la usada quan la cua d'histidines es situava a l'extrem N-terminal d'YdgT. Es va amplificar per PCR un fragment que contingués el gen *ydgT* unit a una cua d'histidines a l'extrem 3', i amb dianes als extrems adequades per al seu clonatge. Els oligonucleòtids utilitzats per fer-ho possible es mostren a la figura 3.7.9. La temperatura d'hibridació que es va utilitzar en l'amplificació va ser de 42°C.

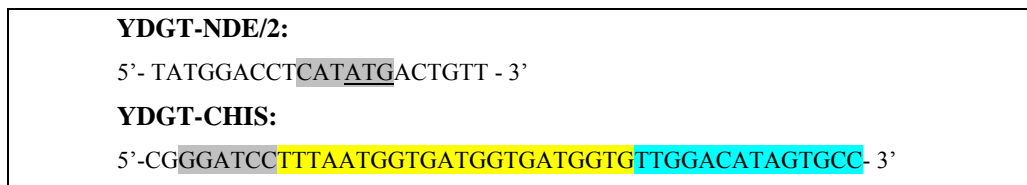


Figura 3.7.9. Oligonucleòtids utilitzats en l'amplificació del gen *ydgT* amb una cua de 6 histidines per a la clonació en el vector pET3b. En gris es ressalten les dianes *NdeI* i *BamHI* respectivament. Subratllat es mostra el triplet d'inici de la transcripció. En groc es mostra la seqüència codificant per la cua de 6 histidines i en blau es ressalta la seqüència final del gen *ydgT* excepte per l'últim triplet de "stop".

El producte de PCR obtingut es va digerir amb els enzims de restricció *NdeI/BamHI* i es va clonar en el vector d'expressió pET3b linearitzat amb els mateixos enzims. El plàsmid recombinant obtingut es va transformar a la soca BL21 (DE3) pLysS i es va procedir a la inducció de l'expressió d'YdgT-His i la seva purificació segons el protocol descrit en l'apartat de material i mètodes 2.8.5.

L'anàlisi electroforètica de les fraccions eluïdes es mostra a la figura 3.7.10.

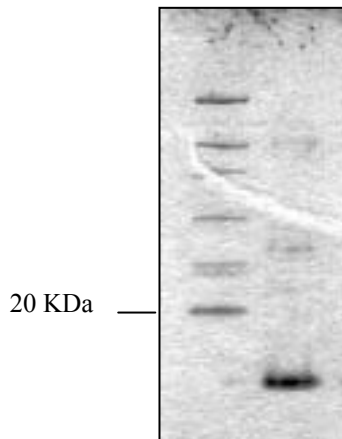


Figura 3.7.10. Anàlisi electroforètica i tinció amb Coomassie de l'elució amb imidazol 200 mM després de la unió a una matriu de Ni-NTA d'un extracte sobreexpressat en YdgT-His

En la figura anterior es pot observar que només es detecta una banda, de la mida corresponent a YdgT-His. Per tant, tal i com passava en el cas d'Hha-His, la proteïna YdgT és incapaç d'unir-se a H-NS quan té no té l'extrem carboxi-terminal lliure.

3.7.6. INTERACCIÓ D'HIS-YDGT AMB STPA

El resultat obtingut respecte a la identitat de la proteïna co-purificant amb His-YdgT no permetia descartar que YdgT interaccionés amb altres proteïnes tals com StpA o Hha. H-NS és una proteïna abundant (unes 20.000 còpies per cèl·lula), mentre que Hha o StpA són proteïnes molt menys abundants. Això implica que una possible interacció d'YdgT amb altres proteïnes podria quedar emmascarada per l'abundant presència d'H-NS. Per aquesta raó es van plantejar una sèrie d'experiments per determinar la possibilitat d'interacció amb altres proteïnes diferents d'H-NS

3.7.6.1 Construcció de la soca BL21 (DE3) $\Delta hns::Tc^r$

Per eliminar la interacció d'His-YdgT amb H-NS, vam construir una soca en la que sobreexpressar His-YdgT o altres proteïnes d'interès en un fons genètic Δhns . Una soca similar ja està descrita a la bibliografia per Zhang *et al.*, 1996.

Es va obtenir un lisat del bacteriòfag P1 *vir* a partir de la soca BSN27 ($\Delta hns::Tc^r$) i es va transduir la mutació (apartat 2.4.4) a la soca BL21 (DE3) pLysS. Es van seleccionar les colònies resistents a Cm i Tc. Per comprovar el fenotip *hns* d'aquestes colònies, es van

sembrar en plaques de β -glucosidasa, ja que la mutació *hns* causa una desrepressió de l'operó *bgl*, fent que en aquest medi les colònies adquireixin coloració groc-taronja, a diferència de les colònies de la soca salvatge que serien verdes (Defez i Felice, 1981)

Una vegada obtinguda la soca, es va sobreexpressar i purificar la proteïna His-YdgT, i es va poder observar que la proteïna co-purificant, corresponent a H-NS que s'havia observat anteriorment, no apareixia. (Fig. 3.7.11).

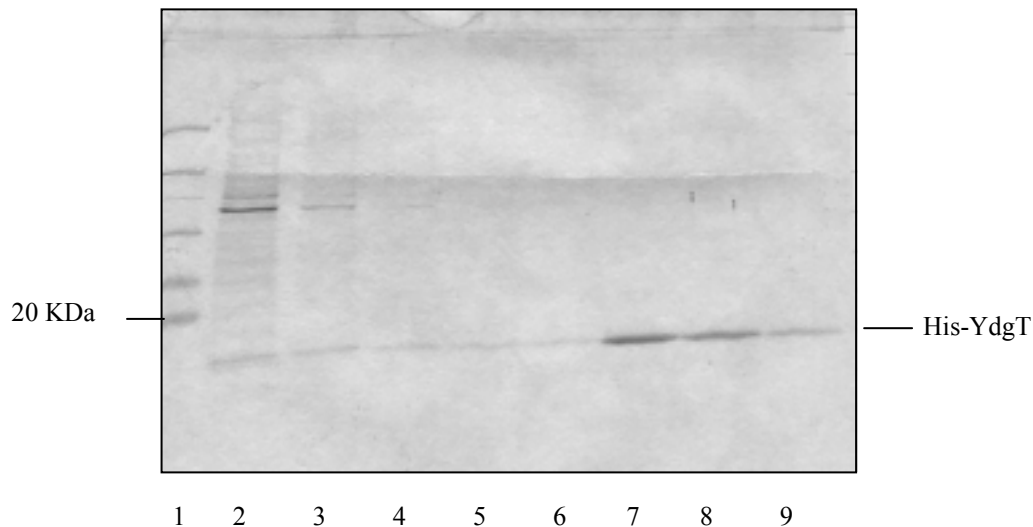


Figura 3.7.11. Anàlisi electroforètica i tinció amb Coomassie de fraccions eluïdes de Ni²⁺-NTA agarosa d'un extracte de la soca BL21 (DE3) Δ *hns* pLysS + pET-His-YdgT. 1) Marcador de pes molecular (Low Range, Bio-rad), 2, 3, 4, 5 i 6) Rentats de la matriu, 7, 8 i 9) Elució de proteïnes amb imidazol 200 mM.

3.7.6.2 Unió d'un extracte cru sobreexpressat en His-YdgT amb un extracte cru sobreexpressat en StpA

La sobreexpressió i purificació d'His-YdgT en un fons genètic *hns* no permetia detectar la possible interacció amb altres proteïnes. Aquest fet podia ser degut a la baixa concentració d'aquestes altres proteïnes, com podria ser el cas de StpA.

Per aquest motiu vam abordar l'experiment per detectar la possible interacció partint de la barreja de dos extractes ens els que s'havia sobreexpressat per una banda His-YdgT, i per una altra StpA, en ambdós casos en un fons genètic *hns* (BL21 (DE3) Δ *hns* pLysS pET-His-YdgT i BL21 (DE3) Δ *hns* pLysS pET-StpA respectivament). Partint de 500 ml de

cadascun dels cultius i seguint el protocol detallat en l'apartat 2.8.5.1 de material i mètodes, es van obtenir 10 ml de cada extracte cru ric en proteïna recombinant. Es van barrejar 10 ml de l'extracte cru sobreexpressat en His-YdgT amb 5 ml de l'extracte cru sobreexpressat en StpA i se li van afegir 500 µl de Ni-NTA agarosa. La barreja es va incubar durant 5 hores a 4°C, en agitació orbital per tal de permetre la unió entre proteïnes, si és que existia, i deixar que His-YdgT unida o no a StpA s'unís a la matriu d'agarosa.

A continuació es van passar a realitzar els rentats de la matriu d'agarosa, tant els habituals com també rentats utilitzant concentracions creixents de KCl per poder determinar, en cas que existís alguna interacció His-YdgT-StpA, si aquesta es podia dissociar. Els resultats obtinguts es mostren a la figura 3.7.12

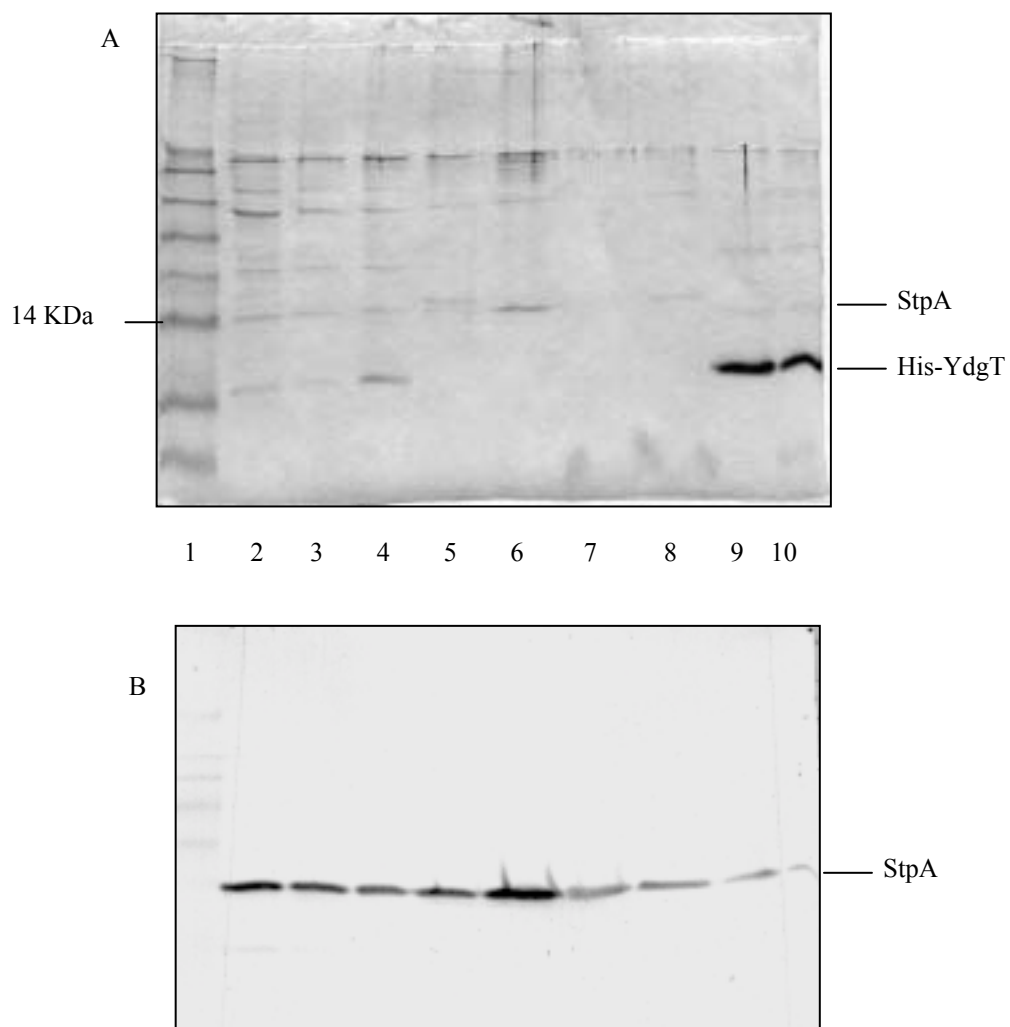


Figura 3.7.12. Interacció d' His-YdgT amb StpA. Anàlisi electroforètica i tinció amb Coomassie (A) o immunodetecció amb anticossos anti-StpA (B) 1) Marcador de pes molecular, 2, 3 i 4) Rentats de la matriu, 5) Rentat amb KCl 0,5 M, 6 i 7) Rentats amb KCl 1 M, 8) Rentats amb KCl 2 M, 9 i 10) Elució amb imidazol 200 mM.

D'aquestes imatges es dedueix que His-YdgT s'uneix a StpA, però que aquesta unió no és tant forta com la interacció amb H-NS, ja que a mida que va augmentant la concentració de KCl en el tampó dels rentats, sobre tot a 1 M, s'allibera la major part de StpA, mentre que His-YdgT no es perd en els rentats ja que només s'elueix amb imidazol 200 mM.

3.7.7 INTERACCIÓ D'HIS-YDGT AMB HHA

De la mateixa manera que havíem plantejat l'estudi de la possible interacció entre His-YdgT i StpA, i partint del fet que H-NS i StpA interaccionen per formar heterodímers (Shi i Bennet, 1994), ens vam plantejar la possibilitat d'estudiar la interacció entre His-YdgT i Hha. Per això es van unir extractes sobreexpressats en His-YdgT i Hha, en ambdós casos obtinguts en un fons genètic Δhns , i es va permetre la seva interacció, així com la unió d'His-YdgT a la matriu d'agarosa.

Aquesta vegada, la detecció de les proteïnes purificades només es podia fer per immunodetecció amb anticossos anti-Hha ja que el pes molecular de les dues proteïnes és tan similar que no haguéssim pogut percebre dues bandes de diferent tamany en un gel SDS-PAGE tenyit amb Coomassie (His-YdgT té uns 9 KDa degut a la unió la cua de 6 histidines i Hha té 8,63 KDa).

A la figura 3.7.13 es mostra la interacció His-YdgT amb Hha.

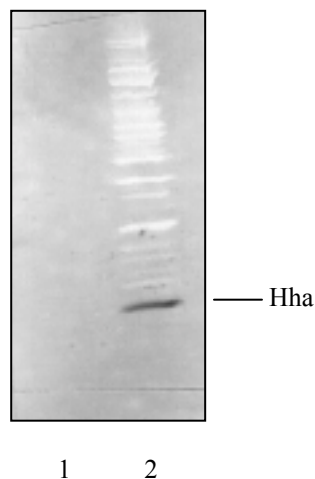


Figura 3.7.13. Immunodetecció d'Hha en la interacció d'His-YdgT amb Hha. 1) Fracció eluïda amb imidazol 200 mM de la matriu de Ni-NTA agarosa després de la unió dels extractes sobreexpressats en His-YdgT i Hha, 2) Extracte cru sobreexpressat en Hha.

Ja que en l'extracte corresponent a la sobreexpressió d'Hha si que es detecta proteïna, el fet que en la barreja no hi hagi cap senyal fa pensar que la proteïna His-YdgT no s'uneix a Hha, o almenys no ho fa en les condicions utilitzades.

3.7.8 INTERACCIÓ D'HIS-HHA AMB STPA

Com ja hem vist en l'apartat 3.7.5, la proteïna His-YdgT, i per extensió podriem dir que YdgT, té la capacitat d'unir-se a StpA. Aquest fet suggeria que, donada l'homologia existent entre Hha i YdgT, potser Hha també podia unir-se a StpA.

Així, seguint la mateixa estratègia que en els apartats anteriors, es van unir extractes sobreexpressats en His-Hha i StpA, en ambdós casos en un fons genètic *hns* (BL21 (DE3) $\Delta hns::Km^r$ pLysE + pET-His-Hha i BL21 (DE3) $\Delta hns::Tc^r$ pLysS + pET-StpA respectivament) i es va permetre la seva interacció així com la unió d'His-Hha a la matriu d'agarosa. En realitzar la purificació d'His-Hha de la barreja de proteïnes, de la mateixa manera que es va fer en l'estudi de la interacció His-YdgT-StpA, es va fer un gradient de concentracions de KCl en el tampó dels rentats, per determinar si la unió, en cas de produir-se, es podia trencar o no.

En les anàlisis per electroforesi i tinció amb Coomassie, i també per immunodetecció de StpA, podem veure que tal i com es va observar per His-YdgT i StpA, les proteïnes His-Hha i StpA també interaccionen, tot i que aquesta interacció només es detecta en absència de la proteïna H-NS. El resultat obtingut en la immunodetecció també permet observar que en aquest cas StpA es comença a alliberar a partir de concentracions de KCl de 0,5 M (Fig 3.7.14).

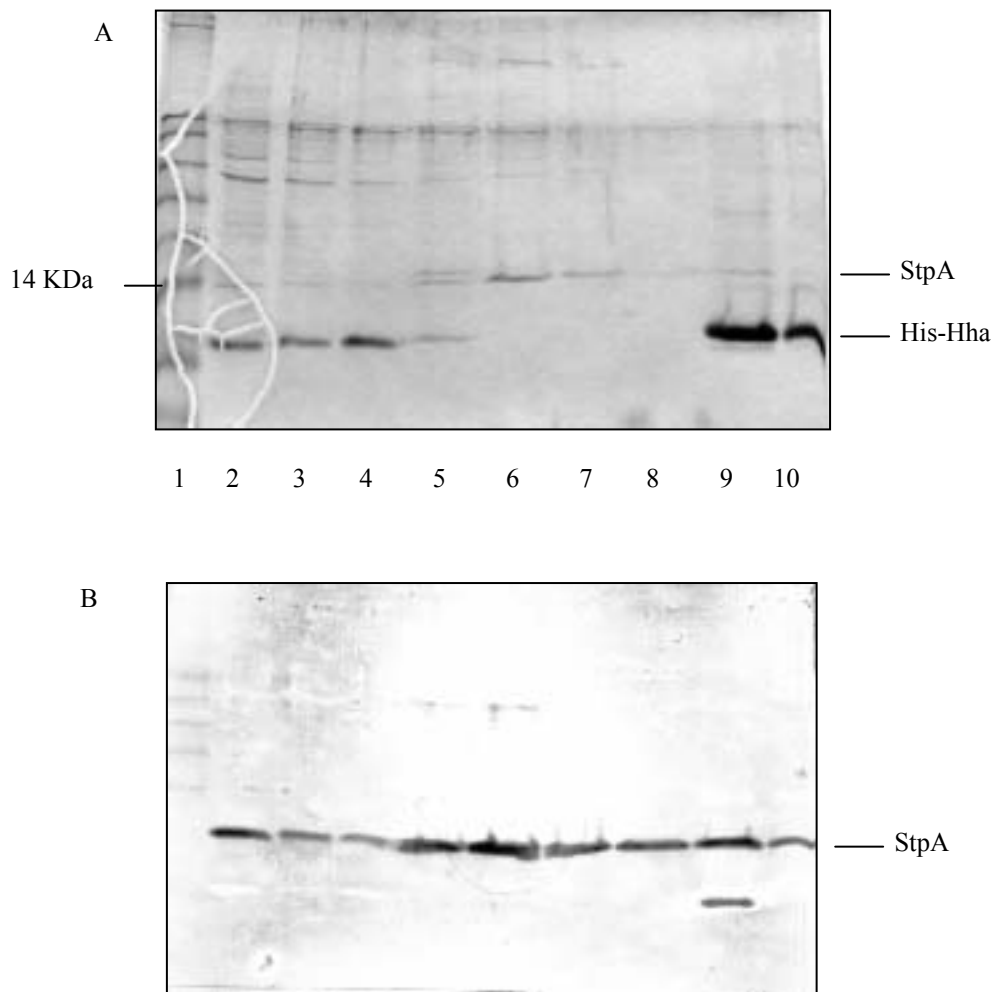


Figura 3.7.14. Interacció d'HisHha amb StpA. Anàlisi electroforètica i tinció amb Coomassie (A) o immunodetecció amb anticossos anti-StpA (B). 1) Marcador de pes molecular (Low Range, Bio-Rad), 2, 3 i 4) Rentats de la matriu, 5) Rentat amb KCl 0,5 M, 6 i 7) Rentats amb KCl 1 M, 8) Rentats amb KCl 2 M, 9 i 10) Elució amb imidazol 200 mM.

3.8 IMMUNODETECCIÓ DE LA PROTEÏNA YDGT

La localització i l'estudi de la proteïna YdgT, i dels possibles complexos que pugui formar amb d'altres proteïnes, va fer necessària l'obtenció d'anticossos que ens permetessin la seva detecció. Per això es van obtenir anticossos policlonals que ens permetessin detectar la proteïna YdgT o His-YdgT, i no reaccionessin amb altres proteïnes homòlogues, com Hha.

3.8.1 PRODUCCIÓ I PURIFICACIÓ DE LA PROTEÏNA HIS-YDGT

Per a la immunització dels dos conills utilitzats en l'obtenció de l'antisèrum, calia obtenir en suficient quantitat proteïna purificada. Es van obtenir extractes sobreexpressats d'His-YdgT i es va purificar la proteïna per afinitat a Ni-NTA-agarosa (apartat 2.8.5). Un cop ja teníem una quantitat adequada de proteïna semi-purificada, ja que amb ella va coeluir H-NS i segurament d'altres proteïnes com StpA encara que en menys quantitat, es va procedir a una segona purificació mitjançant electroforesi preparativa en la qual s'aïllava His-YdgT a partir d'un gel de poliàcrilamida en Tris-Tricina-SDS (apartat 2.8.8). Una vegada purificada la proteïna de la matriu d'acrilamida, es va concentrar per centrifugació en condicions de buit fins a volums de 500 i 650 µl, tenint cura que les sals del tampó no precipitessin.

3.8.2 OBTENCIÓ D'ANTI-SÈRUM ANTI-YDGT

Es va seguir el protocol d'immunització de dos conills (anomenats a partir d'ara 971 i 971). El sèrum obtingut va ser rentat amb un extracte total obtingut de la soca 5K *ydgT* per tal de disminuir el senyal de fons, ja que així podríem eliminar en certa manera els anticossos contra proteïnes que no fossin YdgT.

Es va comprovar que la immunodetecció donava un resultat més net després del rentat de l'antisèrum amb l'extracte de 5K *ydgT* (figura 3.8.1).

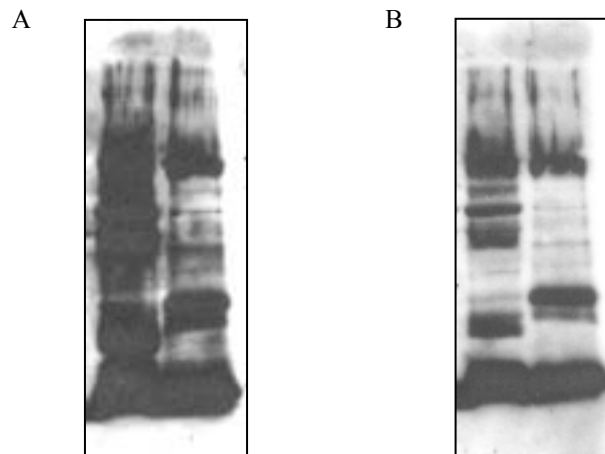


Figura 3.8.1. A) Revelat amb antisèrum anti-His-YdgT del conill 971 (dilució 1/1000), B) Revelat amb antisèrum anti-His-YdgT del conill 971 després del rentat amb extracte de la soca 5K *ydgT* (dilució 1/1000). En el primer carril es va carregar una mostra d'un dels rentats del procés de purificació d'His-YdgT, mentre que en el segon carril es va carregar His-ydgT purificada per Ni-NTA-agarosa.

A continuació, es va assajar quina dilució de l'antisèrum era adequada per a la detecció de la proteïna YdgT o His-YdgT. Les dilucions que es van provar d'anti-sèrum van ser 1/10.000 i 1/100.000. La dilució òptima de l'antisèrum obtingut del conill 971 va ser 1/100.000, i en el cas de l'anti-sèrum obtingut del conill 972 la dilució adequada seria la 1/10.000 (fig. 3.8.2). També es va comprovar l'absència de detecció d'YdgT en el sèrum pre-immune.

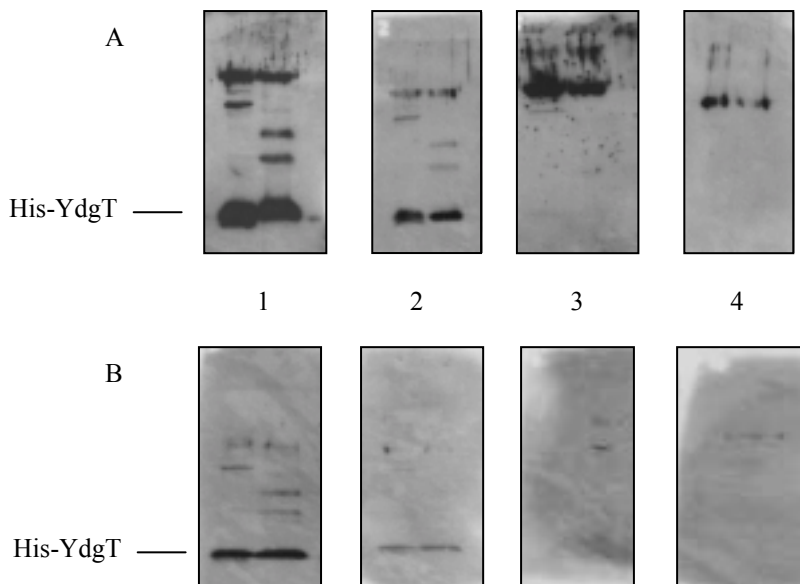


Fig. 3.8.2. Determinació de la dilució de treball de l'antisèrum anti-His-YdgT del conill 971 (A) i 972 (B) mitjançant immunodetecció per Western blotting. En el primer carril es va carregar una mostra d'His-ydgT purificada per Ni-NTA-agarosa mentre que en el segon carril es va carregar un dels rentats del procés de purificació. 1) Dilució del sèrum immune 1/10.000, 2) Dilució del sèrum immune 1/100.000, 3) Dilució del sèrum pre-immune 1/10.000, 4) Dilució del sèrum pre-immune 1/100.000.

Posteriorment es va determinar l'especificitat d'aquest anticòs, és a dir, calia veure si presentava reactivitat creuada amb altres proteïnes. Per això, es va realitzar una electroforesi en gel de poliacrilamida en Tris-Tricina-SDS de proteïnes purificades mitjançant Ni-NTA-agarosa (His-Hha, His-YdgT i H-NS-His) i es va procedir a la immunodetecció amb anticossos anti-YdgT utilitzant una dilució de l'antisèrum 1/10.000 (Fig. 3.8.3).

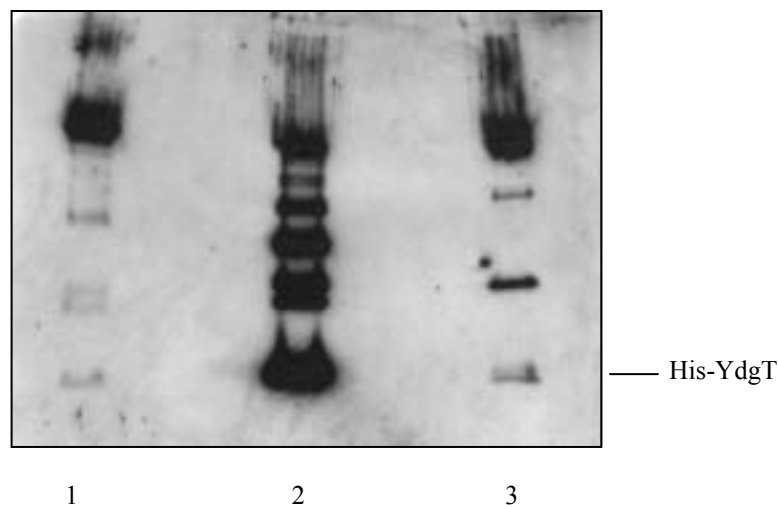


Fig. 3.8.3. Immunodetecció amb anticossos anti-YdgT (dilució 1/10.000) de les proteïnes 1)His-Hha, 2) His-YdgT i 3) H-NS-His.

Com es desprèn de la figura anterior, els anticossos anti-YdgT presenten una lleugera reactivitat creuada amb les proteïnes Hha i H-NS, per això es va decidir que la dilució més adequada per treballar i evitar aquests senyals seria una dilució 1/100.000 de l'antisèrum obtingut del conill 971.

Si ens fixem en la mostra de His-YdgT, veurem que es detecten un elevat número de bandes de tamany superior a His-YdgT. No es tracta de reactivitat amb altres proteïnes, ja que si no també ens apareixerien en el cas de les mostres corresponents a His-Hha o H-NS-His, donat que s'expressen en el mateix fons genètic, sinó que es tracta de la mateixa proteïna His-YdgT que en condicions d'emmagatzematge a -20°C i en determinades ocasions (podem veure que a la figura 3.8.1 no passava) es forma agregats proteics.

3.9 DETECCIÓ D'HETEROLIGÒMERS ENTRE LES PROTEÏNES YDGT, HHA I H-NS

Els resultats obtinguts en aquest treball, juntament amb altres resultats previs (Nieto *et al.*, 2000) han permès constatar que les proteïnes Hha i YdgT interaccionen amb H-NS. També s'ha pogut determinar la interacció de les dues proteïnes amb StpA.

Per tal de complementar els estudis *in vitro* realitzats i corroborar l'existència de complexos YdgT-H-NS i Hha-H-NS, així com determinar quina importància poden tenir les proteïnes YdgT i Hha en l'oligomerització d'H-NS, es va plantejar com a objectiu analitzar la formació d'aquests complexos *in vivo*. Per fer-ho es van establir diverses estratègies que s'exposen a continuació.

3.8.1 ANÀLISI D'OLIGÒMERS MITJANÇANT GELS NADIUS

La metodologia que es va seguir per aquest tipus d'estudi va consistir en l'electroforesi en condicions no desnaturalitzants de proteïnes purificades o co-purificades. Aquesta metodologia permetria visualitzar les proteïnes en estat nadiu, és a dir, en l'estat en que es troben la cèl·lula, i per tant, aquelles proteïnes que estiguessin formant complexos proteics (dímers, trímers, tetràmers, etc.) correrien en el gel com a un únic element. Mitjançant aquest sistema, les proteïnes migren en el gel segons la seva càrrega neta, que depèn del seu punt isoelèctric i del pH del tampó. El pH dels tampons utilitzats en aquestes electroforesis ha estat de 8,8. Així, les proteïnes amb un punt isoelèctric inferior a 8,8 adquireixen una càrrega neta negativa mentre que les proteïnes amb un punt isoelèctric superior a 8,8 adquireixen càrrega neta positiva (figura 3.9.1).

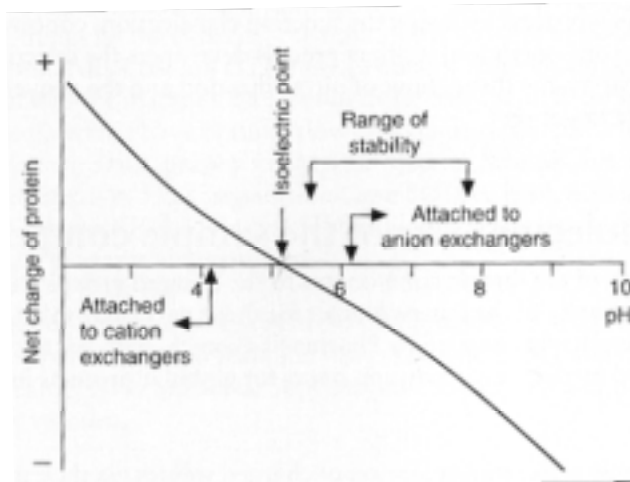


Fig. 3.9.1. Gràfic representatiu de la càrrega neta d'una proteïna segons el seu punt isoelèctric i el pH del medi on es troba.

Com que es desconeixia el punt isoelèctric dels possibles oligòmers i de la pròpia proteïna YdgT o His-YdgT (punt isoelèctric teòric de 6,25) es van carregar i córrer dos gels per a cada experiment. En un dels gels la migració aniria del pol positiu al negatiu, de manera que les proteïnes amb càrrega neta positiva migrarien en el sentit del gel, i l'altre gel correria del pol negatiu al positiu on en aquest cas les proteïnes que migrarien en el sentit del gel serien les que adquirissin càrrega neta negativa.

3.9.1.1 Anàlisi electroforètica en condicions nadiues de proteïnes purificades

Una primera aproximació va ser la de realitzar una electroforesi no desnaturitzant d'un conjunt de proteïnes purificades pel sistema d'afinitat a una matriu de Ni-NTA agarosa, segons la metodologia que es detalla a l'apartat 2.8.5. El conjunt de mostres analitzades corresponia a proteïnes purificades de manera individual (H-NS, His-YdgT i His-Hha), o a co-purificacions (His-YdgT + H-NS i His-Hha + H-NS).

Es van realitzar dues electroforesis, cadascuna en una polaritat, en gels de poliacrilamida de dues fases al 10 % en la fase de resolució (materials i mètodes 2.8.3.1.3). Com a controls es van carregar en ambdós gels lisozim (Merck) i BSA (Boehringer Mannheim), ja que en condicions no desnaturitzants i pH 8,8, el lisozim té càrrega neta positiva, i el BSA té càrrega neta negativa.

Els resultats que es varen obtenir (Fig. 3.9.2) mostraven que les proteïnes analitzades, a excepció del lisozim, migraven cap el pol positiu en les condicions de pH utilitzades, el que indica per tant que totes deuen tenir un punt isoelèctric inferior a 8,8. El gel corresponent a l'electroforesi en l'altra polaritat no es mostra, ja que la única proteïna que migra cap el pol negatiu és el lisozim.

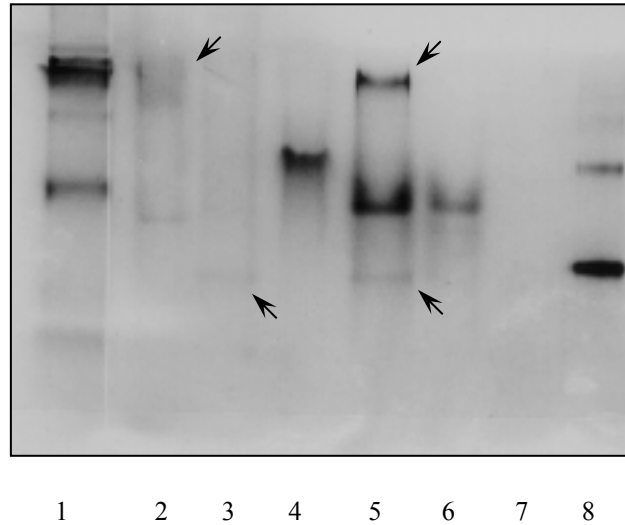


Fig. 3.9.2. Gel de poliacrilamida en Tris-Glicina. 1) MPM (Low Range, Bio-Rad) 2) His-Hha, 3) His-Hha + H-NS, 4) H-NS (1 µg), 5) His-YdgT + H-NS, 6) His-YdgT, 7) Lisozim, 8) BSA. S'indiquen les bandes més representatives que podrien correspondre a hetero- o homo-oligòmers.

Les formes d'H-NS predominants a la cèl.lula presenten punts isoelèctrics de 6,5 i 7,5 (Spassky *et al.*, 1984), de manera que al pH utilitzat en els gels, de 8,8, tindrien càrrega neta negativa.

La proteïna Hha té un punt isoelèctric teòric d'entre 8 i 10, i presenta en condicions natives dues isoformes (Balsalobre, Tesi Doctoral, 1998). El fet de detectar les bandes en el gel en que les proteïnes migren en direcció al pol positiu, indica que a pH de 8,8 la proteïna té càrrega neta negativa, i per tant, el pI real és inferior a 8,8.

En el cas d'YdgT, si el pI real s'acosta al teòric (6,25), a pH 8,8 tindrà càrrega neta negativa

Si ens fixem en el carril en que es va carregar la proteïna His-YdgT + H-NS (carril 5) veiem l'aparició de dues bandes (marcades amb la fletxa) que no s'observaven en les mostres corresponents a His-YdgT o H-NS carregades per separat. Sembla evident pensar que les noves bandes podrien correspondre a oligòmers formats per ambdues proteïnes.

En el carril en que es va carregar la barreja d' His-Hha + H-NS, es torna a observar, encara que poc intensament, segurament degut a la quantitat de mostra, una de les bandes que havíem visualitzat també en la barreja His-YdgT + H-NS i que migrava més ràpidament. Aquesta banda, que podria tenir un punt isoelèctric similar en ambdós casos, podria correspondre a heteroligòmers His-Hha + H-NS i His-YdgT + H-NS.

3.9.2 CROSS-LINKING *in vivo* I PURIFICACIÓ DELS OLIGÒMERS

Una altra aproximació per a la confirmació de la interacció entre Hha-H-NS i YdgT-H-NS *in vivo* va consistir en combinar en un sol protocol el cross-linking de proteïnes i la purificació dels complexos formats, és a dir, la formació d'enllaços covalents entre residus de lisina de proteïnes que interactuen *in vivo*, amb la purificació per afinitat a Ni-NTA agarosa de proteïnes amb cues d'histidines.

Aquesta estratègia ens permetria també determinar el pes molecular dels complexos formats, i per tant de manera indirecta establir la relació estequiomètrica en la interacció entre ambdues proteïnes.

3.9.2.1 Anàlisi d'oligòmers His-YdgT-H-NS per immunodetecció

Es va sobreexpressar la proteïna His-YdgT a la soca BL21 (DE3) pLysE. Una vegada obtingut l'extracte, es va tractar amb DMS per tal d'unir covalentment les proteïnes interaccionants. Es va purificar llavors la proteïna His-YdgT per afinitat a Ni-NTA agarosa, de manera que co-purificarien les proteïnes unides. Les preparacions obtingudes es van analitzar per electroforesi desnaturalitzant en Tris-Glicina-SDS. En aquestes condicions, els enllaços covalents no es desnaturalitzaran, i per immunodetecció amb anticossos anti-H-NS i anti-YdgT es podria establir quines bandes corresponien als heterooligòmers. Els resultats obtinguts es mostren a la figura 3.9.3.

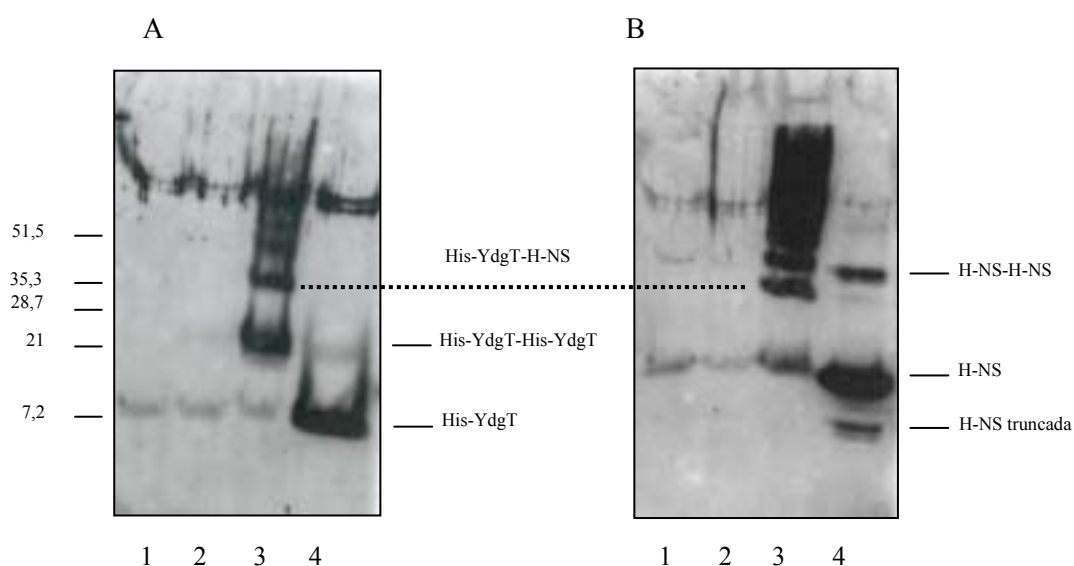


Figura 3.9.3. Immunodetecció utilitzant sèrum anti-YdgT (A) o anti-H-NS (B), de 1) purificació d'His-YdgT en tampó A, 2) purificació d'His-YdgT sense tractament previ amb DMS, 3) purificació d'His-YdgT de l'extracte prèviament tractat amb DMS, 4) His-YdgT (A) o H-NS (B) com a control.

En ambdós casos es detecten bandes que corresponen a monòmers His-YdgT o H-NS, degut possiblement a que no el 100% de les interaccions queden unides covalentment, és a dir, que el procés de cross-linking no és efectiu al 100%. Així mateix també es detecten dímers H-NS-H-NS, o His-YdgT-His-YdgT, ja que es detecten bandes comunes amb les immunodetectades en el cas de les mostres de proteïna purificada utilitzades com a control.

A les mostres corresponents als tractaments amb DMS, es pot observar que s'immunodetecta una banda comuna, tant amb el sèrum anti-YdgT com amb el sèrum anti-H-NS, que pel pes molecular correspondria a un complexe H-NS-His-YdgT (marcat amb una línia discontinua). Per tant, en aquestes condicions, s'ha pogut detectar la formació *in vivo* d'un complexe H-NS-His- dgT.

A la immunodetecció amb ambdós antisèrums de les mostres sotmeses al procés de cross-linking, es detecten bandes de tamany superior. La resolució de la metodologia utilitzada no ens ha permès determinar amb exactitud la naturalesa d'aquests complexes. Cal dir que el tamany de les proteïnes H-NS (15,4 kDa) i His-YdgT (9,5 kDa) fa difícil diferenciar entre multímers d'una sola d'elles, o complexes múltiples de les dues proteïnes.

3.9.2.2 Anàlisi d'oligòmers His-Hha-H-NS per immunodetecció

De la mateixa manera que en l'anterior apartat, es va sobreexpressar la proteïna His-Hha a la soca BL21 (DE3) pLysE, es va unir covalentment a proteïnes que interaccionessin amb ella i es va purificar His-Hha i els corresponents oligòmers. Les preparacions obtingudes es van analitzar per electroforesi desnaturalitzant i immunodetecció amb anticossos anti-H-NS i anti-Hha. Els resultats obtinguts es mostren a la figura 3.9.4.

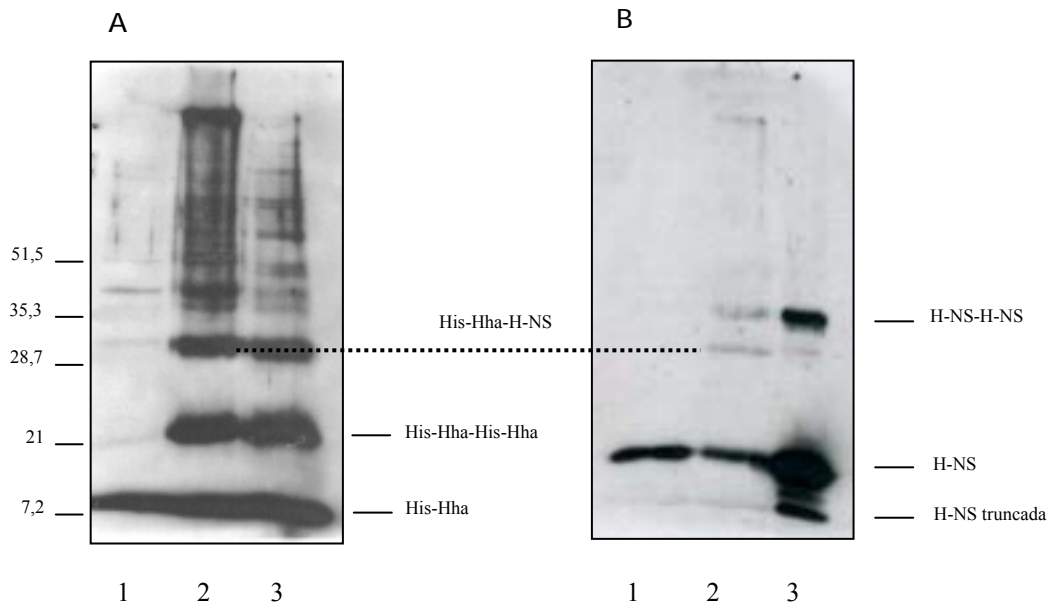


Figura 3.9.4. Immunodetecció utilitzant sèrum anti-Hha (A) o anti-H-NS (B), de 1) purificació d'His-Hha en tampó de cross-linking sense tractament previ amb DMS, 2) purificació d'His-Hha en tampó de cross-linking de l'extracte prèviament tractat amb DMS, 3) His-Hha (A) o H-NS (B) com a control.

La immunodetecció utilitzant sèrums anti-Hha i anti-H-NS permet detectar una banda comuna (marcada en línia discontinua), que pel tamany que presenta deu correspondre a un complex H-NS-Hha.

A la mostra corresponent a la proteïna His-Hha purificada per afinitat i utilitzada com a control en l'electroforesi (carril 3A de la figura 3.9.4), es detecten les mateixes bandes que a la mostra tractada amb DMS. Ja ha estat observada amb anterioritat la formació d'agregats quan les mostres han estat llargs períodes de temps a -20°C , i que no són desnaturalitzables per la metodologia utilitzada (Balsalobre, Tesi Doctoral, 1998). Aquest fet explicaria l'aparició d'aquestes bandes, ja que la mostra d'His-Hha utilitzada s'havia obtingut en un fons genètic *hns*⁺.

3.10 ESTUDI DE LA PLEIOTROPIA DE LES MUTACIONS *hha*, *ydgT* i *hha ydgT*

Una de les característiques de les mutacions que afecten a les proteïnes associades al nucleòide és la de presentar un fenotip pleiotròpic (revisat a Atlung i Ingmer, 1997). En aquest treball s'ha identificat YdgT com una proteïna homòloga a Hha, i que intervé en la regulació de l'expressió gènica, segurament per interacció amb d'altres proteïnes. Ens vam plantejar, doncs, estudiar l'efecte sobre el patró d'expressió causat per la doble mutació *hha ydgT*, així com l'efecte de les mutacions independents *hha* o *ydgT*, per tal d'establir els efectes específics de cadascuna d'elles. Per fer-ho, es va realitzar un estudi comparatiu de l'expressió dels patrons proteïcs de les soques BSN26 (wt), BSN26Y (*ydgT*), BSN26H (*hha*) i BSN26HY (*ydgT hha*) mitjançant i) fraccionament cel·lular i anàlisi electroforètica (SDS-PAGE) i també ii) anàlisi del patró proteic en electroforesi en dues dimensions (2D-PAGE).

3.10.1 FRACCIONAMENT CEL·LULAR

Es va fer una primera aproximació a l'anàlisi de la pleiotropia de les diferents mutacions: *hha*, *ydgT* i *hha ydgT*, mitjançant l'anàlisi per SDS-PAGE dels diferents compartiments cel·lulars (periplasma i citoplasma) de les soques BSN26, BSN26Y, BSN26H i BSN26HY. L'obtenció de les fraccions es va realitzar tal i com es descriu a l'apartat de material i mètodes 2.8.1.3.

3.10.1.1 Efecte sobre proteïnes periplasmàtiques

L'anàlisi electroforètica de la fracció periplasmàtica de les diferents soques posava de manifest l'existència de diferències en el patró de l'expressió de proteïnes, tal i com es mostra a la figura 3.10.1.

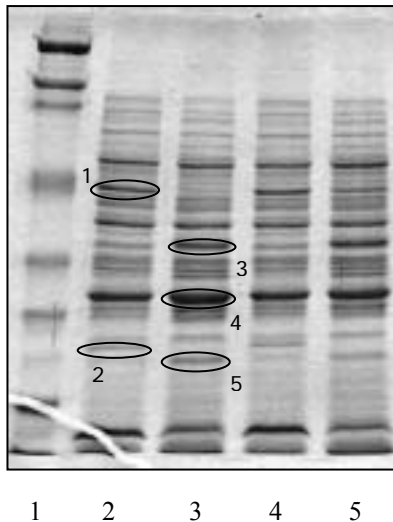


Figura 3.10.1. Anàlisi electroforètica i tinció amb Coomassie. Es van carregar 7,5 µg de proteïna provinent de la fracció periplasmàtica de les soques 2) BSN26, 3) BSN26H, 4) BSN26Y i 5) BSN26HY. Al carril 1 es va carregar el MPM (Broad Range, prestained, Bio-Rad). Les elipses assenyalen les bandes que presenten diferències.

Tal i com es pot observar en figura 3.10.1, existeixen almenys 5 diferències observables. Les diferències es donen bàsicament entre la soca salvatge i el mutant *hha*, en el que apareixen o s'observa un increment en l'expressió de 3 bandes (números 3, 4 i 5) i també el cas contrari, en el que apareixen 2 bandes (números 1 i 2) a la soca salvatge. Les diferències existents en el mutant *hha* són també observables en el doble mutant *hha ydgT* (BSN26HY) excepte per a la proteïna número 1 que tot i que apareix en menys quantitat que la soca salvatge, sí que es pot detectar.

Pel que fa la soca BSN26Y (mutant *ydgT*) no s'observa cap diferència significativa respecte la soca salvatge.

3.10.1.2 Efecte sobre proteïnes citoplasmàtiques

En realitzar l'anàlisi electroforètica de les fraccions citoplasmàtiques de les diferents soques, es va poder comprovar que, a diferència del que passava en la fracció periplasmàtica, gairebé no són observables diferències significatives, tal com es mostra a la figura 3.10.2.

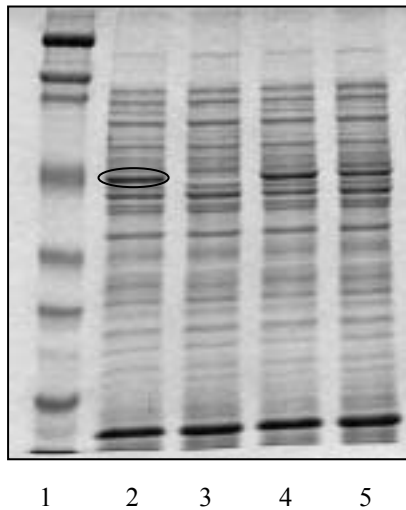


Figura 3.10.2. Anàlisi electroforètica i tinció amb Coomassie fraccions citoplasmàtiques (7,5 µg de proteïna) de les soques 2) BSN26, 3) BSN26H, 4) BSN26Y i 5) BSN26HY. Al carril 1 es va carregar el MPM (Broad Range, prestained, Bio.-Rad). L'elipse assenjala la banda que manca en el mutant *hha* però no en la resta de soques.

Tant sols és detectable una diferència, tal com es senyala a la figura. Pel tamany aparent d'aquesta proteïna, i el seu patró d'expressió a les diferents soques, sembla clar que aquesta diferència és la mateixa que l'observada a l'anàlisi de les fraccions periplasmàtiques (veure banda 1 a la figura 3.10.1). Així, i donat aquests resultats, no podem concretar quina seria la localització d'aquesta proteïna.

3.10.1.3 Efecte sobre proteïnes de membrana externa

L'anàlisi electroforètica de la fracció de proteïnes de membrana externa de les diferents soques posava de manifest l'existència de diferències en el patró de l'expressió de diverses proteïnes, tal i com es mostra a la figura 3.10.3.

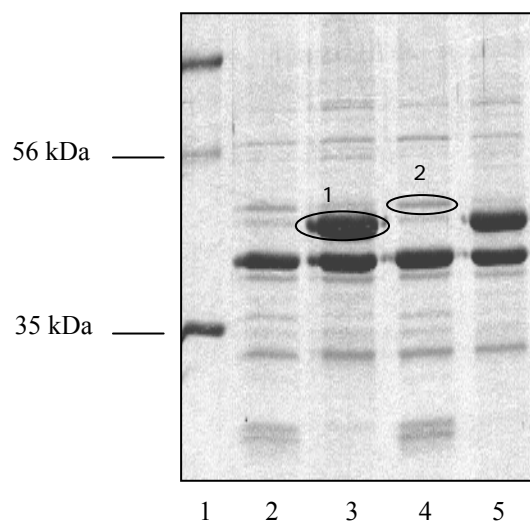


Figura 3.10.3. Anàlisi electroforètica en gel de poliacrilamida al 15% i tinció amb Coomassie dels extractes de membrana externa de les soques 2) BSN26, 3) BSN26H, 4) BSN26Y i 5) BSN26HY. Al carril 1 es va carregar el MPM (Broad Range, prestained, Bio.-Rad).

Tal i com es pot observar en figura 3.10.3, existeixen almenys 2 diferències observables. De la mateixa manera que passava amb les proteïnes periplasmàtiques, les diferències es donen bàsicament entre la soca salvatge i el mutant *hha*, en el que s'observa un increment en l'expressió de la banda número 1. També en el cas contrari, observem la desaparició d'una banda (número 2) en la soca mutant *hha* però que sí que és observable en les soques salvatge i mutant *ydgT*. Les diferències existents en el mutant *hha* són també observables en el doble mutant *hha ydgT* (BSN26HY). Pel que fa la soca BSN26Y (mutant *ydgT*) no s'observa cap diferència significativa respecte la soca salvatge.

3.10.2 IDENTIFICACIÓ DE LES PROTEÏNES PERIPLASMÀTIQUES I DE MEMBRANA EXTERNA

Per tal d'identificar les proteïnes que mostraven diferències en la seva expressió en les fraccions periplasmàtiques i en la membrana externa de les diferents soques, es van retallar les bandes corresponents dels gels d'acrilamida i es van digerir amb tripsina per posteriorment analitzar els fragments de cada proteïna mitjançant espectrometria de masses (MALDI-TOF) tal i com s'indica a material i mètodes 2.8.6.2.

Els tamanys dels fragments de cada proteïna analitzada van ser introduïts en el banc de dades del NCBI (www.ncbi.nih.gov).

3.10.2.1 Proteïnes periplasmàtiques

De la manera com s'acaba de descriure, vam poder identificar la banda corresponent al número 4 de la figura 3.10.1 com el precursor d'una proteïna periplasmàtica que tindria un tamany de 30,95 kDa i 296 aminoàcids.

Aquesta proteïna correspon al precursor de la proteïna periplasmàtica d'unió a la D-ribosa, codificada pel gen *rbsB*. Té un pes molecular de 30,8 kDa (Nº d'accés al SwissProt: P02925). El gen *rbsB* codifica la proteïna periplasmàtica d'unió a ribosa ("ribose binding protein"), implicada en el sistema de transport d'elevada afinitat per la ribosa, i que també funciona com a quimiorreceptor per quimiotaxis.

La resta de proteïnes per les que havíem trobat diferències no van poder ser identificades amb aquesta metodologia.

3.10.2.2 Proteïnes de membrana externa

De la mateixa manera que per a l'identificació de les proteïnes periplasmàtiques, van ser identificades dues proteïnes d'expressió diferencial entre les diferents soques.

La proteïna enumerada com a 1 de la figura 3.10.3, va ser identificada com a la proteïna OmpC (Nº d'accés al SwissProt: P06996). La tècnica no va permetre determinar si es tracta de la proteïna precursora (de 40,3 kDa) o la forma ja madura d'aquesta (de 38,3 kDa) degut a que no es va detectar el pèptid senyal de 21 aminoàcids.

La proteïna OmpC o proteïna de membrana externa 1B és una porina formada per homotrímers i pertany a la família de porines OMPC/PHOE. Entre les seves funcions cal destacar la formació de porus de difusió passiva que permeten el pas de materials hidrofòbics de baix pes molecular a través de la membrana externa.

La metodologia utilitzada, no va permetre la identificació de la banda número 2 obtinguda a partir de membrana externa de les soques BSN26 i BSN26Y.

3.10.3 ELECTROFORESI EN GELS DE DOS DIMENSIONS (2D-PAGE)

Per a obtenir major resolució en la detecció de les diferències en el patró d'expressió proteic entre les soques estudiades, els extractes cel·lulars de les soques BSN26, BSN26Y, BSN26H i BSN26HY, obtinguts segons s'indica a l'apartat 2.8.1.5, varen ser analitzats mitjançant 2D-PAGE.

La primera dimensió va consistir en un isoelectroenfoc de les proteïnes utilitzant un rang d'anfolits de pH 4-7. En la segona dimensió, es van separar les proteïnes pel tamany molecular mitjançant un gel de poliacrilamida al 12 % en Tris-Glicina-SDS (material i mètodes 2.8.3.2). Posteriorment els gels van ser tenyits amb nitrat de plata (apartat 2.8.3.4.3).

A la figura 3.10.4 (A, B, C i D), es mostren els gels obtinguts per a cadascun dels extractes.

A: BSN26

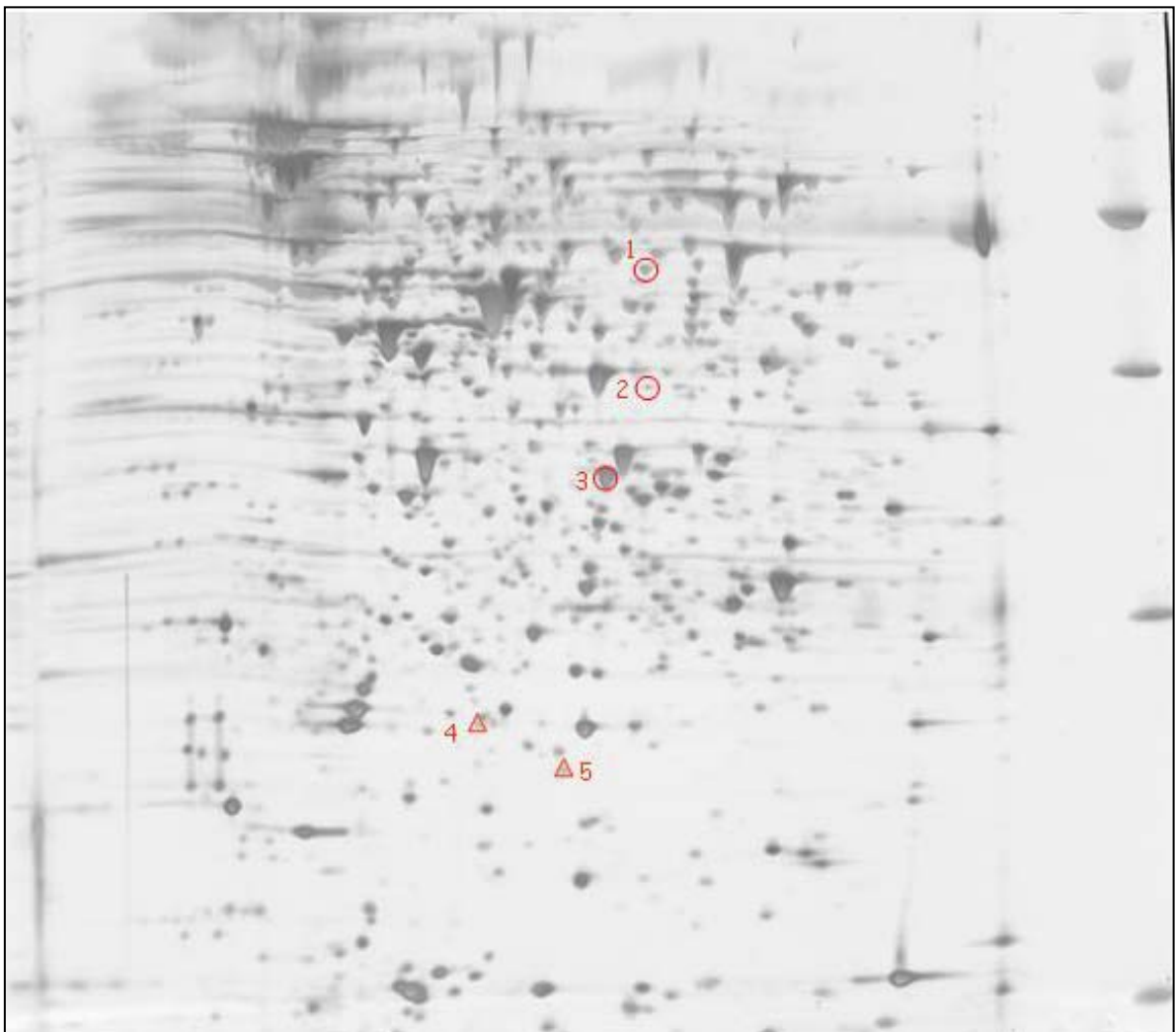


Figura 3.10.4.A. Anàlisi electroforètica mitjançant 2D-PAGE d'un extracte cel.lular de la soca BSN26

B: BSN26Y

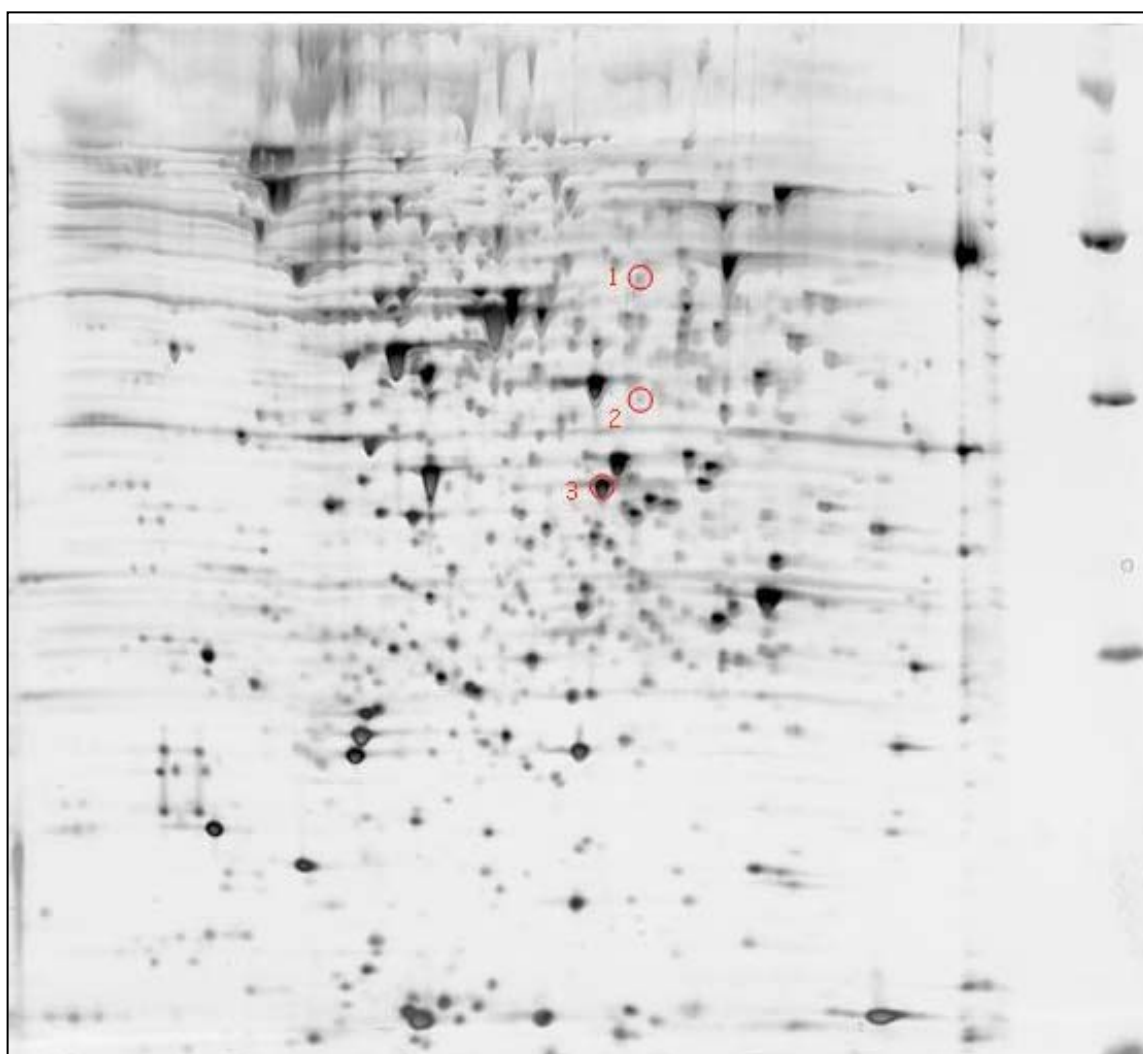


Figura 3.10.4.B. Anàlisi electroforètica mitjançant 2D-PAGE d'un extracte cel.lular de la soca BSN26Y

C: BSN26H

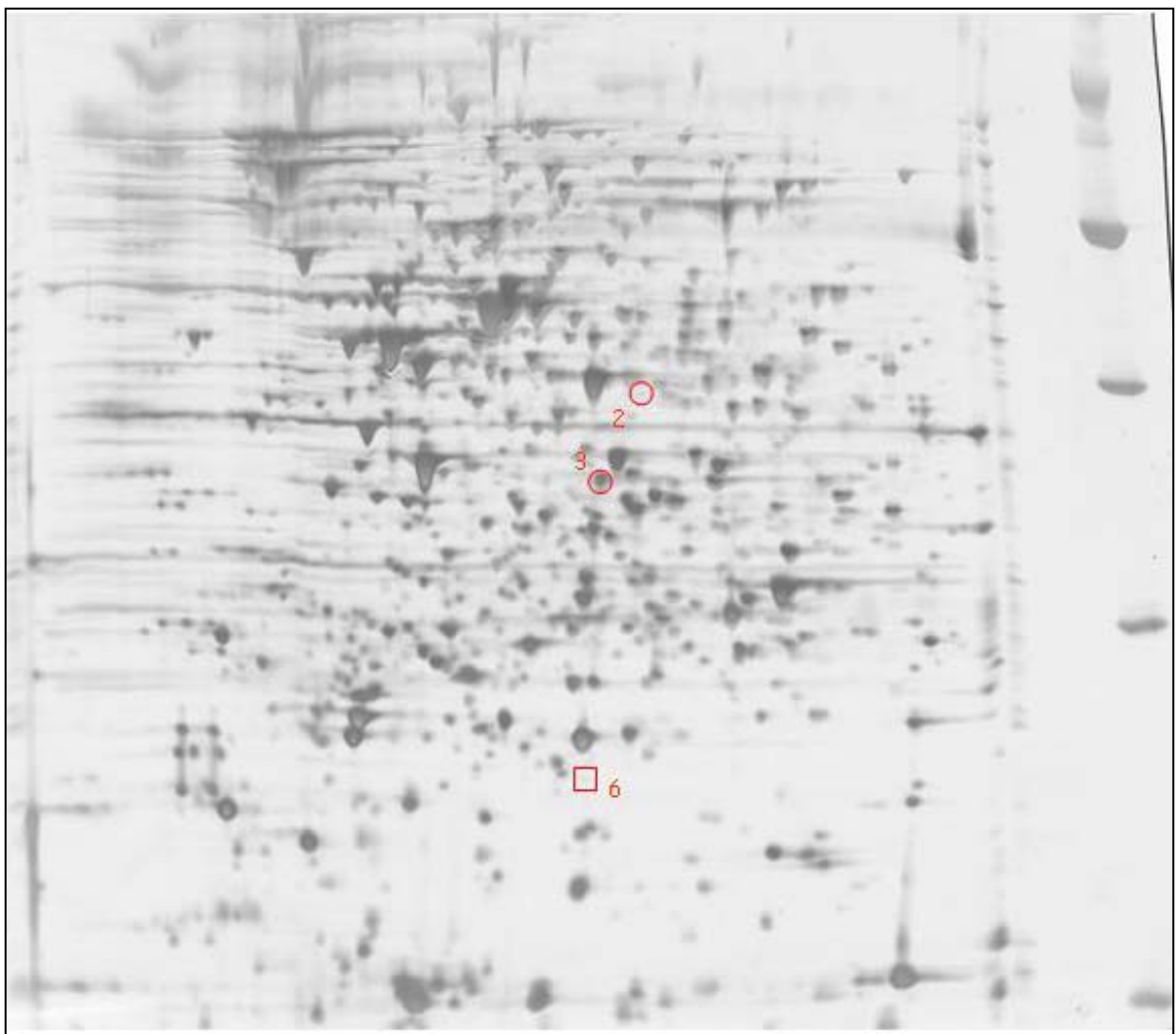


Figura 3.10.4.C. Anàlisi electroforètica mitjançant 2D-PAGE d'un extracte cel.lular de la soca BSN26H

D: BSN26HY

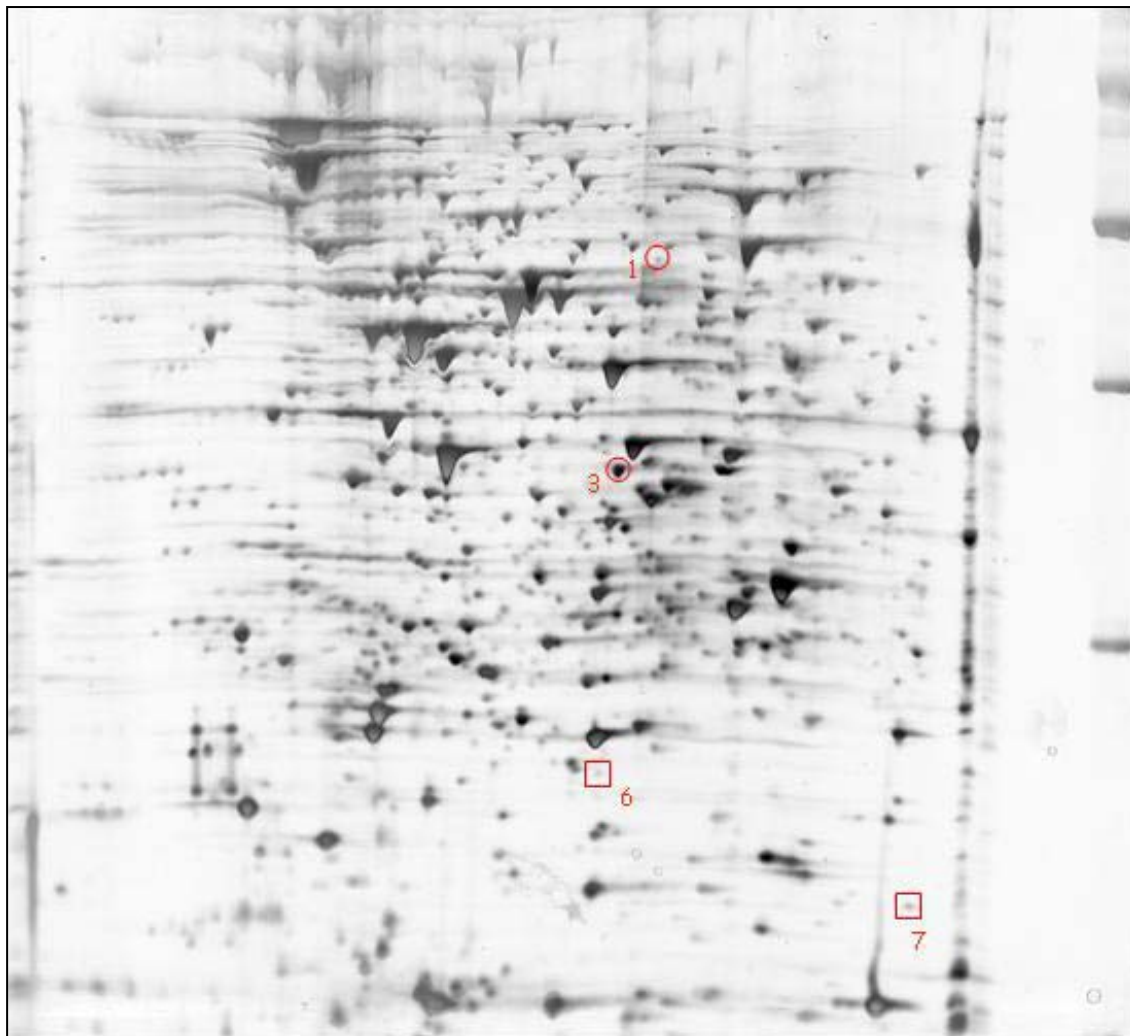


Figura 3.10.4.D. Anàlisi electroforètica mitjançant 2D-PAGE d'un extracte cel.lular de la soca BSN26HY

Per l'anàlisi de les imatges, i la comparació dels gels, es va utilitzar el programa ImageMaster v 3.0 d'Amersham Biosciences.

Com es pot observar, hi ha 7 proteïnes que mostren diferències significatives entre els patrons corresponents als extractes analitzats. Els triangles marquen proteïnes només presents a la soca salvatge BSN26 (4 i 5). Els *spots* encerclats corresponen a proteïnes presents a les soques BSN26, BSN26Y, BSN26H, i en alguns casos també a la soca BSN26HY, en ordre decreixent pel que fa a la intensitat del *spot* (1, 2 i 3). Amb un quadrat s'indiquen les proteïnes que tan sols apareixen a la soca BSN26HY i/o BSN26H (*spots* 6 i 7).

A la taula 3.10.1, es mostra la relació d'aquestes i les abundàncies relatives.

Nº <i>spot</i>	BSN26	BSN26Y	BSN26H	BSN26HY
1	+++	+++	?	+
2	+++	+++	+	-
3	+++	++	+	+
4	+++	-	-	-
5	+++	-	-	-
6	-	-	++	+++
7	-	-	-	+++

Taula 3.10.1. Comparació de les intensitats dels *spots* detectats (veure figura 3.11.4 A,B,C,D).
(?: no determinable)

Els 7 *spots* corresponents a les diferències detectades de la taula 3.10.1, van ser aïllats del gel i digerits amb tripsina per a continuació analitzar els espectres obtinguts per MALDI-TOF. Aquest anàlisi es va realitzar al laboratori de la Unitat d'Espectrometria de Masses Estructural i Biològica de l'IIBB (CSIC).

De les 7 proteïnes analitzades tant sols va ser possible identificar-ne 3 (taula 3.10.2).

Nº <i>spot</i>	Proteïna identificada / Gen	Mr (kDa) / pI	Accés SwissProt
1	Triptofanasa (L-triptofan indol-liasa) (TNasa) / <i>tnaA</i> Proteïna A de membrana externa	52,77 / 5,88	P00913
3	(Proteïna de membrana externa II*, OmpA) / <i>ompA</i>	37,2 / 5,99	P02934
4	dTDP-L-rhamnosa sintetasa / <i>rfbC</i>	21,27 / 5,48	P37745

Taula 3.10.2. Proteïnes identificades mitjançant l'anàlisi per MALDI-TOF dels *spots* obtinguts en els gels 2D-PAGE de les soques BSN26, BSN26Y, BSN26H i BSN26HY.

Una de les proteïnes identificades és la triptofanasa, enzim implicat en el catabolisme del triptòfan. El pas que catalitza l'enzim és el següent:



L'*spot* corresponent a aquesta proteïna és molt reduït en el cas de l'anàlisi de l'extracte de la soca BSN26HY, mutant *hha ydgT*. En el cas de la soca BSN26H, en el gel no es detecta, de manera que semblaria que no hi ha expressió. Cal tenir en compte que en aquest cas en concret aquesta zona no ha quedat massa ben resolta a l'electroforesi, el que dificulta la interpretació.

El segon *spot* identificat correspon a la proteïna de membrana externa OmpA. Degut a que no es va trobar el pèptid senyal en la determinació mitjançant tripsinització i posterior anàlisi per MALDI-TOF, no vam poder determinar si es tracta de la proteïna precursora o de la forma madura d'OmpA. En aquest cas, també hi ha una clara diferència en l'expressió d'aquesta proteïna en les diferents soques, sent més elevada en la soca salvatge i el mutant *ydgT*. La diferència en l'expressió de la proteïna OmpA que es produeix entre una soca salvatge i una soca *hha* ja va ser caracteritzada quan els extractes s'havien obtingut a partir de cultius incubats en medis d'elevada osmolaritat. En aquestes

condicions el processament de la proteïna precursora a proteïna madura era més eficaç en la soca salvatge que en la soca mutant (Balsalobre *et al.*, 1999).

La tercera proteïna identificada fou la dTDP-L-rhamnosa sintetasa, enzim que forma part de la via de biosíntesi de l'antigen O del lipopolisacàrid. En aquest cas aquesta proteïna només es detecta a la soca salvatge, és a dir, en cap dels mutants, tant en els simples com en el doble, no hi ha expressió clara de la proteïna.

Hommais *et al.*, van publicar l'any 2002 un llistat de gens dels quals la seva expressió es veia significativament alterada en un mutant *hns* (http://www.pasteur.fr/recherche/unites/REG/HNS/2c_transcriptome1.htm). Aquests experiments es van realitzar mitjançant "DNA arrays". En buscar en aquest llistat les 3 proteïnes identificades en els experiments de 2D-PAGE, no es va trobar que existissin diferències en l'expressió d'aquestes en mutants *hns*.

Aquestes podrien constituir un grup de proteïnes regulades per Hha / YdgT, sense la intervenció d'H-NS.

3.10.4 ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE TRIPTOFANASA EN LES SOQUES BSN26, BSN26Y, BSN26H I BSN26HY

Per tal de corroborar l'alteració en l'expressió de la triptofanasa en el mutant *hha ydgT* i possiblement també en el mutant *hha*, es va realitzar una prova qualitativa en la que es determinava la producció d'indol per part de les diferents soques crescudes en un medi ric en triptòfan (material i mètodes 2.2.1).

Després de fer créixer les soques BSN26, BSN26Y, BSN26H i BSN26HY durant tota la nit en 5 ml de medi Indol sense agitació i a 37°C, es van afegir 4 gotes de reactiu de Kovac (Scharlau) a cada cultiu i es va esperar uns segons fins que la reacció del reactiu amb l'indol formés un anell rosat a la superfície del cultiu (figura 3.10.5).

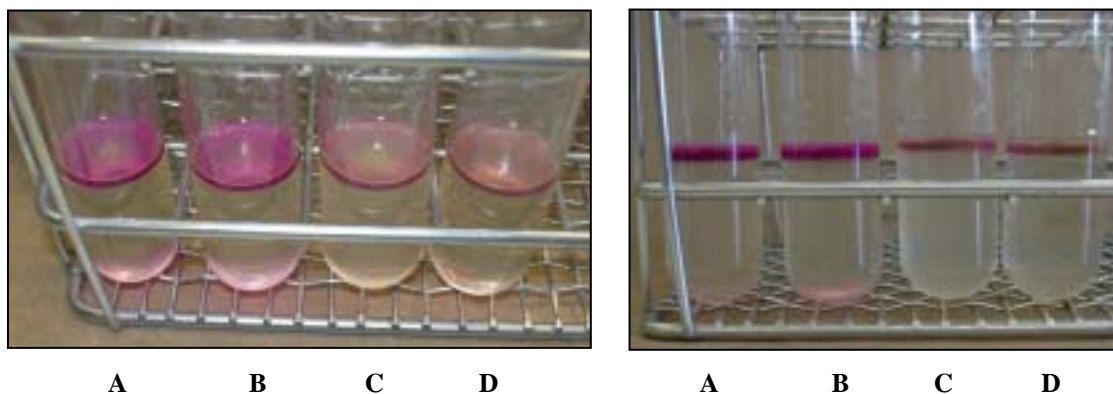


Figura 3.10.5. Prova de l'indol realitzada sobre cultius de les soques A) BSN26, B) BSN26Y, C) BSN26H i D) BSN26HY.

Tot i que la prova com ja hem dit, és qualitativa, ens va permetre diferenciar clarament dos comportaments pel que fa a la prova de l'indol, és a dir, a la detecció de l'activitat triptofanasa. Per una banda la soca salvatge i el mutant *ydgT* produïen un cercle rosat clarament definit, mentre que la soca *hha* i la doble mutant *hha ydgT* provocaven un cercle rosat molt menys intens, fet que es correlacionava amb que si aquestes soques presentaven menys expressió de la triptofanasa es produiria menys indol, producte que es detecta en aquesta prova. Per tal de descartar la possibilitat de que la diferència en la intensitat de la detecció de l'indol fos deguda a una major quantitat de cèl·lules, es va realitzar de manera paral·lela un recompte de viables, obtenint en tots els cultius recomptes de $2-3 \times 10^8$ cèl./ml. Per tant les diferències observades no poden ser degudes a un simple increment en el número de cèl·lules /ml en els cultius de la soca salvatge i la soca mutant *ydgT*.

Com ja hem comentat, s'ha descrit que la mutació *hns* no causa una alteració de l'expressió de la proteïna TnaA. Per tant, en aquest cas es tractaria d'un efecte específic de les mutacions *hha* o *hha ydgT*. Per comprovar aquesta dada es va realitzar també la prova de l'indol sobre un cultiu de la soca BSN27, i es va poder comprovar que efectivament aquesta soca és capaç de transformar el triptòfan a indol, provocant una intensitat en la reacció comparable a la de la soca salvatge.

Per tant, els resultats obtinguts suggereixen que la proteïna Hha, i segurament en menor grau la proteïna YdgT, juguen un paper important en la regulació del catabolisme del triptòfan. Aquest efecte no s'ha detectat per a la proteïna H-NS. Possiblement l'efecte de la proteïna YdgT queda restringit en un fons genètic *hha*. En aquest cas, la manca de la proteïna Hha provocarà la sobreexpressió d'YdgT, i conseqüentment, un efecte parcial d'YdgT sobre l'expressió del gen *tnaA*.

Di Martino i col·laboradors (2002) van descriure que l'enzim triptofanasa estava implicat en l'adherència a cèl·lules epitelials i en la formació de biofilms i que pot fer-ho mitjançant la modulació del pH. Una inactivació del gen *tnaA* està associada amb una disminució tant de l'adherència a cèl·lules epitelials com de la formació de biofilms en poliestirè. Per tal de comprovar la capacitat de les soques BSN26, BSN26Y, BSN26H, BSN26HY i BSN27 per a formar biofilms es van realitzar per hexaplicat dos tipus d'assajos que permeten mesurar aquesta capacitat (material i mètodes 2.10).

Els resultats obtinguts es mostren a la figura 3.10.6.

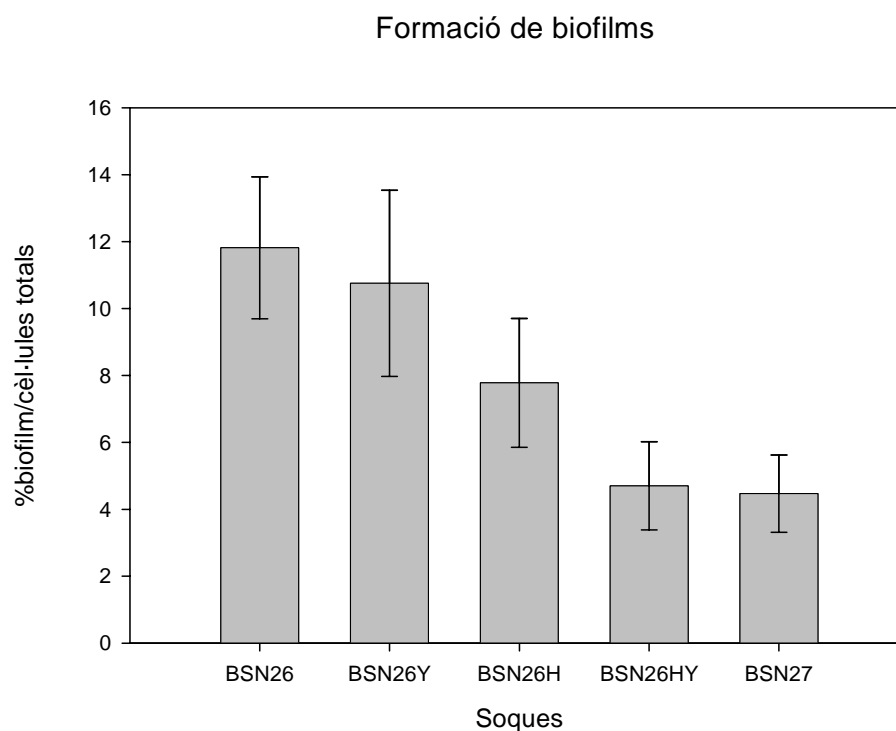


Figura 3.10.6. Diagrama de barres amb la variació estàndard del percentatge de formació de biofilms per part de les soques BSN26, BSN26Y, BSN26H, BSN26HY i BSN27..

A la taula 3.10.3 es mostren els valors obtinguts per dues metodologies diferents: i) relació de la formació de biofilm respecte les cèl·lules totals, ii) Valors de la DO_{595} dels biofilms tenyits amb cristall violeta

Soca	%biofilm/cèl·lules totals	Formació de biofilm tenyit amb CV (DO_{595})
BSN26	11,81 ± 2,12	0,73 ± 0,13
BSN26Y	10,75 ± 2,78	1,30 ± 0,14
BSN26H	7,77 ± 1,92	0,56 ± 0,06
BSN26HY	4,70 ± 1,31	0,34 ± 0,09
BSN27	4,46 ± 1,15	0,12 ± 0,08

Taula 3.10.3. Formació de biofilms de les diferents soques analitzades, per les dues metodologies utilitzades.

Com es pot deduir de la taula 3.10.3, la soca BSN26HY és la que presenta menys capacitat a l'hora de formar biofilms (menys de la meitat respecte la soca salvatge), seguidament ens trobem amb les soques BSN26H i BSN26Y que segons el tipus d'assaig ens donen més o menys igualades però sembla clar que hi ha una línia de tendència on la BSN26H té menys capacitat de formar biofilms i on la BSN26Y en alguns casos sembla ser que pot revertir el fenotip i assimilar-se a la soca salvatge. Es dona doncs, una correlació entre la quantitat de triptofanasa expressada i la capacitat de formar biofilms ja que la soca BSN26HY (mutant *hha ydgT*) ja havíem dit que era la soca que menys en produïa en l'anàlisi per electroforesi en 2 dimensions. Així i tot, si mirem la soca BSN27 en la qual no es produeix cap efecte sobre l'expressió de triptofanasa com ja havíem comentat, la formació de biofilms està molt reduïda, tant com en la soca BSN26HY o fins i tot en algun cas té menys capacitat de formar biofilms que el doble mutant *hha ydgT*.

3.10.5 ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ D'OmpA EN LES SOQUES BSN26, BSN26Y, BSN26H, BSN26HY i BSN27

En referència al spot nº 3 de la taula 3.10.1, es va analitzar l'expressió de la proteïna pOmpA/OmpA en les soques BSN26, BSN26Y, BSN26H, BSN26HY i BSN27 per tal de comprovar els resultats obtinguts en els gels 2D-PAGE. Per això, donat que aquesta és una proteïna de membrana externa, es va fer un aïllament de les proteïnes de membrana externa d'aquestes soques i es va analitzar mitjançant electroforesi en gel de poliacrilamida (figura 3.10.7).

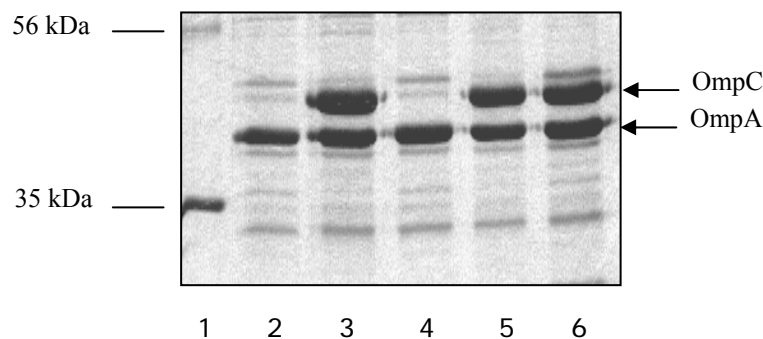


Figura 3.10.7. Anàlisi electroforètica en gel de poliacrilamida al 15% i tinció amb Coomassie dels extractes de membrana externa de les soques 2) BSN26, 3) BSN26H, 4) BSN26Y, 5) BSN26HY i 6) BSN27. Al carril 1 es va carregar el MPM (Broad Range, prestained, Bio-Rad). Es senyala les bandes corresponents a OmpC i OmpA.

En un primer moment no vam ser capaços de determinar quina d'aquestes bandes corresponia a la proteïna OmpA. En retallar les diferents bandes del gel, tripsinitzar i analitzar per MALDI-TOF vam determinar quina d'elles era OmpA i a més vam poder determinar una altra proteïna amb expressió diferencial, OmpC, diferència que ja havia estat detectada en l'estudi de les proteïnes de membrana referit a l'inici d'aquest apartat. Els mutants *hha*, *hha ydgT* i *hns* mostren una sobreexpressió d'OmpC. Hommais *et al.*, 2001 ja havien descrit una sobreexpressió 3,24 vegades major d'aquesta porina en mutants *hns* (http://www.pasteur.fr/recherche/unites/REG/HNS/2c_transcriptome1.htm).

Com es pot comprovar en l'anàlisi del gel, no existeixen diferències detectables en la quantitat d'OmpA madura entre les diferents soques, contràriament al que podíem observar en l'anàlisi per 2D-PAGE del qual no podem saber si vam detectar OmpA precursora o la forma madura.

Està descrit que mutacions en el gen *ompA* fan decreïxer l'eficiència de conjugació del plàsmid de tipus F de 2 a 3 logaritmes quan són presents en la cèl·lula receptora però no en la cèl·lula donadora (Achtman *et al.*, 1978; Anthony *et al.*, 1994). Els requeriments d'OmpA així com també de LPS (pirofosforiletanolamina, PPEA del nucli) en la cèl·lula receptora són completament aliviats quan la conjugació es realitza en medi sòlid (Achtman *et al.*, 1978). Partint d'aquesta premisa i donat que existia una expressió diferencial de la proteïna OmpA/pOmpA entre les diferents soques, vam decidir analitzar les freqüències de conjugació en medi líquid del plàsmid pOX38-Gen (plàsmid F seleccionable per gentamicina) utilitzant com a receptores les soques BSN26, BSN26Y, BSN26H, BSN26HY i BSN27.

Els resultats de les freqüències de conjugació es mostren a la figura 3.10.8 i són la mitja de dos experiments de conjugació.

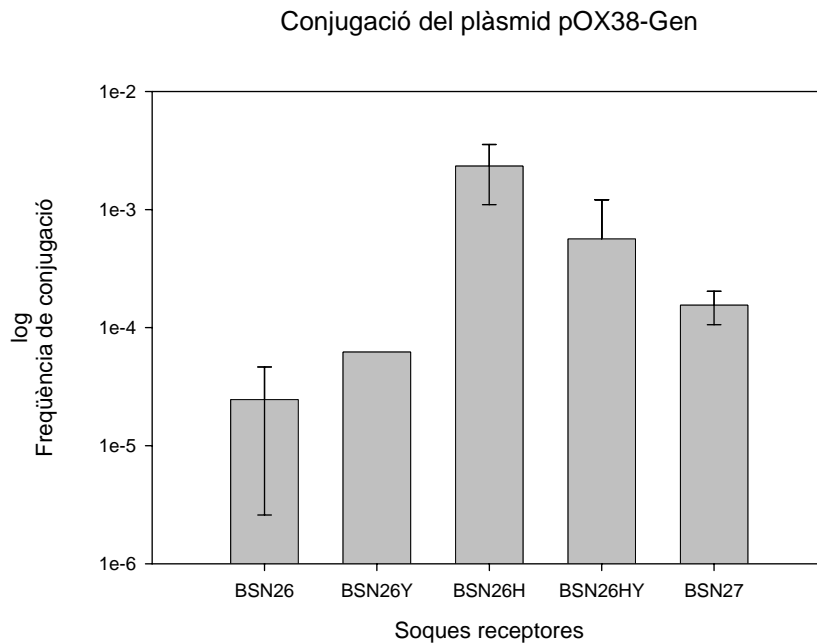


Figura 3.11.8. Gràfic de barres de la mitja dels logaritmes de les freqüències de conjugació entre una soca donadora portadora del plàsmid pOX38-Gen i les soques receptors BSN26, BSN26Y, BSN26H, BSN26HY i BSN27. Les línies verticals indiquen la desviació estàndard.

Els valors en les freqüències de conjugació obtinguts en realitzar conjugacions del plàsmid pOX38-Gen en medi líquid indiquen que en el cas de la soca BSN26H, els valors respecte a la salvatge difereixen en pràcticament 2 logaritmes (95 vegades més elevada). Els valors obtinguts amb la soca *ydgT*, en canvi, són similars a la soca salvatge (2,5 vegades). En el doble mutant *hha ydgT* les freqüències, tot i ser més elevades que en la salvatge, no arriben als valors de la soca BSN26H (només 23 vegades més elevada). Aquest efecte ja ha estat observat per a altres fenotips d'aquesta soca en els que la doble mutació tenia un efecte fenotípic més lleu que la soca BSN26H. Pel que fa a la soca BSN27, de la qual ja havíem dit que no presentava cap efecte sobre l'expressió del gen *ompA*, els valors en la freqüència de conjugació tan sols són 6,3 vegades majors que en la soca salvatge. Aquests valors no són comparables als obtinguts amb la soca BSN26HY, i encara menys amb els de la soca BSN26H.

Anthony i col·laboradors (1994) també van demostrar que la conjugació del plàsmid R-100, un plàsmid altament relacionat amb el plàsmid F i del mateix grup d'incompatibilitat (FII), no es veia afectada pels nivells de la proteïna OmpA en la cèl·lula receptora. Per tal de demostrar que les diferències obtingudes en les freqüències de conjugació del plàsmid pOX38-Gen eren degudes als diferents nivells d'OmpA a la

cèl·lula receptora i no a altres factors, es va realitzar la conjugació utilitzant com a soca donadora la soca *E.coli* 5K Rifampicina R-100 i les diferents soques isogèniques BSN26, BSN26Y, BSN26H, BSN26HY i BSN27 com a receptores. Les freqüències de conjugació del plàsmid R-100 es mostren a la taula 3.10.4.

Freqüència de conjugació del plàsmid R-100	
BSN26	$1,85 \cdot 10^{-4}$
BSN26Y	$4,6 \cdot 10^{-4}$
BSN26H	$3,87 \cdot 10^{-4}$
BSN26HY	$1,6 \cdot 10^{-4}$
BSN27	$5,9 \cdot 10^{-7}$

Taula 3.10.4. Freqüències de conjugació del plàsmid R-100 en conjugacions en que les soques receptores van ser la BSN26, BSN26Y, BSN26H, BSN26HY i BSN27.

Tal i com podem comprovar a la taula, no hi ha diferències significatives en les freqüències de conjugació del plàsmid R-100 entre les diferents soques utilitzades com a receptores. La única diferència la trobem en la soca BSN27, en la que la conjugació és pràcticament inexistent. Les diferències que observàvem en la conjugació del plàsmid pOX38-Gen són per tant probablement degudes a la quantitat d'OmpA de cada soca.

4.1 IDENTIFICACIÓ DE LA NOVA PROTEÏNA YDGT ANÀLOGA A LA PROTEÏNA HHA. EFECTE DE LA MUTACIÓ *ydgT* EN L'EXPRESSIÓ DE L'OPERÓ HEMOLÍTIC *hly*.

Les proteïnes de la família H-NS estan àmpliament repartides entre els bacteris Gram-negatius. Bertin *et al.* (1999 i 2001) van especular que les proteïnes tipus H-NS havien evolucionat d'una proteïna ancestral d'una àmplia especificitat (com H-NS d'enterobacteriàcies) a proteïnes més especialitzades, tant per efecte d'una duplicació, (com la proteïna paràloga StpA d'*E.coli* i *S.typhimurium*) com per efecte de la divergència (com les proteïnes ortòlogues BpH3, BbH3, XrvA, SBP, HvrA i VicH de *B. pertussis*, *B. bronchiseptica*, *X. oryzae*, *R. sphaeroides*, *R. capsulatus* i *V. cholerae* respectivament), o fins i tot per efecte d'una transferència horitzontal (proteïna Ler en soques d'*E. coli* EHEC o EPEC) (Tendeng i Bertin, 2003). Un cas similar el podem trobar en la família de proteïnes Hha/YmoA distribuïdes entre la família d'*Enterobacteriaceae* i codificades tant a nivell de cromosoma com a nivell plasmídic. Entre les enterobactèries en les que han estat descrites proteïnes de la família Hha/YmoA es troben *E. coli*, *Salmonella*, *Yersinia*, *S. flexneri* i *W. brevipalpis*.

Els antecedents d'interacció d'H-NS i Hha, juntament amb la identificació d'una nova proteïna paràloga a la proteïna Hha (38% d'identitat i 66% de similaritat), anomenada YdgT (número d'accés al SwissProt P76179) de pes molecular molt similar a la proteïna Hha (8,28 kDa front 8,6 kDa respectivament), que no forma part de cap operó (igual que en el cas de la resta proteïnes tipus histona), i que es localitza, a més de a *E. coli* en altres enterobactèries, com *Salmonella* i *Shigella*, va suggerir que YdgT podia representar l'equivalent a StpA. Per tant, algunes de les preguntes respecte a la funció d'YdgT s'han plantejat seguint el model H-NS/StpA.

L'efecte de la mutació *ydgT* recorda al de la mutació *stpA*: no és aparent un efecte fenotípic significatiu. Això es fa evident quan s'analitza l'efecte de la mutació *ydgT* sobre l'expressió de l'operó *hly*: no és aparent una desregulació. Els resultats obtinguts en les diferents aproximacions utilitzades han demostrat que la mutació *ydgT* no causa un efecte significatiu pel que fa a l'expressió de l'hemolisina respecte a la soca parental, contràriament a l'efecte de la mutació *hha*, que causa un increment de l'activitat hemolítica 8 vegades superior a la de la soca parental. És destacable però, que l'efecte causat per la combinació d'ambdues mutacions (*hha ydgT*) és fins a 6 vegades

més elevat que l'efecte de la mutació *hha*. Tal i com es comentava a l'apartat corresponent de resultats, el doble mutant *hha ydgT* té un efecte 2,5 vegades superior al que presenta el mutant *hns*. Aquest fet indica que Hha i segurament YdgT en absència d'Hha, li són necessàries a H-NS per a la correcta formació del complex nucleo-proteic responsable de la repressió de l'operó hemolític. Però en canvi, quan hi ha manca de la proteïna H-NS, les proteïnes Hha i YdgT poden continuar exercint una repressió parcial de l'expressió de l'operó. Tot i així, els valors més elevats d'activitat hemolítica els presenta la doble mutació *hha hns* en el que el sistema està totalment desreprimat degut al rol dominant d'ambdues proteïnes en la regulació d'aquest operó (Nieto *et al.*, 2000).

L'obtenció de dobles mutants *hha ydgT* representa un punt important per entendre el paper de la proteïna YdgT. Com ja s'ha esmentat, l'anàlisi de l'expressió de l'operó *hly* en soques *hha ydgT* clarament suggereix que la proteïna YdgT, probablement sobreexpressada, compensa la carència de la proteïna Hha: la producció d'hemolisina de la soca BSN26HY (*hha ydgT*) és superior a la de la soca BSN26H (*hha*).

Com ja s'ha referit anteriorment les proteïnes Hha i YdgT són paràlogues i degut a la seva gran similitud de seqüència a nivell d'aminoàcids podria ser que es detectés també un gran paral·lelisme en les seves funcions, tal i com succeeix en el cas de les proteïnes H-NS i StpA (Zhang *et al.*, 1996). Si la proteïna YdgT té una funció similar a la proteïna Hha o fins i tot si YdgT realitza les funcions d'Hha en absència d'aquesta, és lògic pensar que en quan es produeix una manca d'ambdues proteïnes cap altra pot exercir les seves funcions i el sistema queda desregulat de manera similar al que succeeix en l'expressió de l'operó *hly* en el doble mutant *hha hns*.

També es va determinar quin era el paper de la proteïna YdgT en la regulació de l'expressió de l'operó hemolític en les condicions descrites com a repressores, és a dir, baixa temperatura i elevada osmolaritat. Els resultats obtinguts fan pensar que la implicació de la parella de proteïnes Hha-YdgT en la regulació de l'operó hemolític es dona principalment a 37°C.

En el cas que ens ocupa, l'activitat hemolítica causada per la mutació *hha* s'ha pogut complementar pel gen *ydgT*, però aquesta complementació és depenent de la dosi gènica. Quan el gen *ydgT* és clonat en un plàsmid de baix número de còpies (pLG338-30) aquest és incapaç de complementar l'efecte de la mutació *hha* ni total ni parcialment. En canvi quan el gen *ydgT* està clonat en un vector d'elevat número de còpies (pUC19) es dona una reversió del fenotip hemolític dels mutants *hha* comparable al fenotip de la soca salvatge. Aquest fet és similar al que s'havia observat en

complementar la mutació *hha* amb el gen *ymoA* de *Yersinia enterocolitica*. Aquesta complementació també és dependent de la dosi gènica, i només es dona quan el gen *ymoA* està clonat en un vector de número de còpies mig, i no quan està clonat en un vector de baix número de còpies (Balsalobre *et al.*, 1996). Segurament les petites diferències entre les dues proteïnes, tant pel que fa al tamany com a la composició en aminoàcids, poden ser la causa de la ineficiència en la complementació de l'alel *hha*. Les proteïnes Hha i YdgT són també lleugerament diferents, en la mida i en la composició. Cal tenir en compte que la proteïna YdgT és una mica més similar a YmoA (42% d'identitat) que a Hha (38% d'identitat), i que com en el cas d'YmoA, aquesta podria ser la causa de la dependència de la dosi gènica en la complementació.

Per tant, la proteïna YdgT és capaç d'assolir les funcions de la proteïna Hha, éssent necessàries elevades concentracions de la proteïna perquè la complementació de la funció sigui total. Per aquesta raó en els mutants *hha*, la proteïna YdgT tant sols complementa parcialment la funció repressora d'Hha perquè segurament no deu assolir els nivells necessaris per a fer-ho totalment.

Pel que fa referència al creixement, les condicions de baixa osmolaritat clarament plantegen la necessitat per la cèl.lula de la presència de la proteïna Hha. El doble mutant *hha ydgT* encara es troba lleugerament més afectat que el mutant *hha*, el que també suggereix que la proteïna YdgT, moderadament, compensa l'absència d'Hha en condicions de creixement a baixa osmolaritat.

Segurament, la proteïna YdgT, en un fons genètic *hha*, és insuficient per a compensar completament la manca de la proteïna Hha. A més, el doble mutant *hha ydgT* té un comportament molt similar al doble mutant *hha hns* pel que fa referència al creixement en absència de NaCl, és a dir, un efecte molt sever en el creixement cel·lular sota condicions de baixa osmolaritat, indicant que tot i que segurament YdgT no és indispensable en un fons genètic *hha+*, és necessària per al creixement òptim sota condicions en les que manca Hha, segurament perquè complementa certes funcions. Alteracions en el creixement també han estat observades en soques que presenten mutacions simples i dobles *hns* i *hns stpA* (Zhang *et al.*, 1996), i en aquest model es proposa que StpA actua com a recanvi molecular d'H-NS quan aquesta manca, ja que sota condicions de laboratori sembla ser que els mutants *stpA* no tenen un fenotip clar que les diferenciï de la soca salvatge (Sonnenfeld *et al.*, 2001). Ja ha estat descrit algun cas similar per als mutants en algun dels dos gens que codifiquen per a la proteïna HU

(*hupA* i *hupB*) segurament perquè cadascuna de les dues subunitats pot substituir a l'altra (Wada *et al.*, 1988).

La manca d'un fenotip clarament observable per a mutants *ydgT* segurament és degut a que normalment la cèl·lula conté elevades quantitats de la proteïna Hha respecte a YdgT, com en el cas d'H-NS respecte a StpA (Zhang *et al.*, 1996). Recentment, Dobrindt i col·laboradors (2002) van reforçar aquesta hipòtesi ja que van demostrar que el factor tRNA₅^{Leu} (codificat per *leuX*) afecta l'expressió del determinant hemolític a diferents nivells en la cascada de regulació. Aquest factor reprimeix la transcripció de la proteïna Hha i RfaH, el que comporta un augment en l'expressió d'hemolisina. La inactivació del gen *hha* en un fons genètic *leuX*⁻ no condueix a l'expressió d'Hly a nivells comparables als observats en un fons *leuX*⁺ i això implica que Hha per sí sola i en elevades quantitat no pot participar en la reducció de la transcripció en un mutant *leuX*⁻. Es planteja que com a mínim un altre factor regulador el qual al seu torn hauria de ser regulat per tRNA₅^{Leu} hauria d'estar implicat en la regulació de la transcripció de l'operó *hly* en *E. coli*. Es pot plantejar la hipòtesi doncs, que aquest factor al que Dobrindt i col·laboradors feia referència és la proteïna YdgT.

4.2 INTERACCIONS ENTRE LES PROTEÏNES YDGT, HHA, H-NS I StpA. FORMACIÓ D'HETERO-DÍMERS

La interacció de la proteïna H-NS amb altres proteïnes ja ha estat prèviament descrita. H-NS interacciona amb el producte gènic 5.5 del bacteriòfag T7 (Liu i Richardson, 1993), i amb HF-I (Kajitani i Ishihama, 1991) una proteïna d'unió al RNA i que juga un paper important en la traducció del RNA de *rpoS* (Muffler *et al.*, 1996). A més, H-NS també pot interaccionar amb la seva proteïna homòloga StpA, formant una espècie híbrida que modula l'expressió d'una gran ventall de gens (Sondén i Uhlin, 1996; Johansson *et al.*, 1998).

L'any 2000 es va descriure la formació d'un complex nucleo-proteïc format per H-NS i Hha implicat en la regulació de l'operó *hly* del plàsmid pHly152 (Nieto *et al.*, 2000). Posteriorment també es va descriure la interacció *in vitro* de la proteïna YmoA de *Yersinia enterocolitica* amb H-NS, tant d'*E. coli* com de *Y. enterocolitica*, probablement degut a que el domini d'interacció amino-terminal d'ambdues H-NS és idèntic (Nieto *et al.*, 2002). Els resultats que es presenten en aquest treball demostren que la proteïna YdgT també interacciona amb H-NS. Aquesta interacció a més, és una unió forta, fins i tot més forta que la descrita per Hha-H-NS (Nieto *et al.*, 2000) i també per YmoA-H-NS, les quals es dissocien a concentracions entre d'0,5 M i 1 M de KCl en el tampó (Nieto *et al.*, 2002), mentre que YdgT-H-NS no es dissocia totalment ni tan sols a concentracions de 2 M de KCl, que són 20 vegades més elevades que les concentracions intracel·lulars de K⁺ (Somero, 1986). Alguns dels resultats presentats en aquesta memòria suggereixen que YdgT jugaria un paper regulador secundari, suplint el defecte d'Hha. Però la forta interacció entre YdgT i H-NS podria estar en contradicció amb aquestes dades. L'estabilitat del complex YdgT-H-NS suggereix que el mateix pot tenir algun paper estructural o regulador significatiu. Futurs estudis hauran de determinar o clarificar aquesta qüestió.

En la unió d'YdgT a la proteïna H-NS l'extrem carboxi-terminal d'YdgT està clarament implicat, ja que l'addició d'una cua de 6 histidines a aquest extrem impedeix la unió de les proteïnes, mentre que quan es troba a l'extrem amino-terminal si que es dona unió. Aquest fet ja havia estat descrit per a la proteïna Hha (Nieto *et al.*, 2002).

Un aspecte important de la interacció entre YdgT i H-NS ha estat la demostració de l'existència d'heterodímers. Tanmateix la tècnica utilitzada també ha permès detectar els heterodímers Hha-H-NS.

El fet que no s'hagin pogut detectar altres tipus d'hetero-oligòmers de major número de subunitats pot ser degut a les concentracions de proteïna, ja que està descrit que l'equilibri entre diferents oligòmers d'H-NS ve determinat per la concentració d'aquests (Falconi *et al.*, 1988). En canvi, la presència de DNA no afecta a l'estructura quaternària d'H-NS i per tant, no afectaria en la seva interacció amb d'altres proteïnes tipus histona. Cal esmentar també la dificultat derivada del fet que les proteïnes Hha/YdgT presenten un pes molecular d'aproximadament la meitat que H-NS.. De la mateixa manera que la concentració de proteïna, la força iònica provocada per NaCl també fa variar les proporcions dels productes d'H-NS. Així, a mida que augmenta la concentració de NaCl en el tampó de Cross-linking, la proporció d'homo-oligòmers d'H-NS de major número de subunitats disminueix (Falconi *et al.*, 1988). En els nostres experiments s'han utilitzat concentracions de NaCl de 250 mM. A concentracions similars (266 mM), Falconi i col·laboradors (1988) van descriure una major presència de monòmers i dímers i una gairebé indetectable presència de trímers. Per tant, el fet que no haguem pogut detectar oligòmers de més alt grau pot ser degut o bé a que no existeixen o bé a que a aquestes concentracions de proteïna i/o de NaCl no es poden formar oligòmers majors.

L'existència d'hetero-oligòmers pot, al seu torn, influenciar la unió d'H-NS al DNA, proporcionant al nucleòide tots aquests aspectes dinàmics necessaris per assegurar la seva activitat gènica plena. És a dir, és possible que es doni un equilibri entre la proteïna H-NS lliure o associada amb si mateixa i H-NS unida a Hha o YdgT. Les funcions que podran dur a terme els diferents oligòmers (homo- i hetero-oligòmers) segurament no seran les mateixes.

Com ja s'ha comentat, StpA no només serveix de suport molecular d'H-NS sinó que també existeixen diversos gens controlats exclusivament per la combinació H-NS-StpA (Zhang *et al.*, 1996). Segurament, l'heterodímer H-NS-Hha, o H-NS-YdgT en el seu defecte, també comparteix aquestes característiques, és a dir, és l'espècie híbrida més que les proteïnes per separat la que regularà determinats gens, com és segurament el cas de l'operó hemolític. Potser el complex H-NS-Hha o H-NS-YdgT format no presenta una conformació apte per reprimir un determinat promotor però en canvi si un altre i que per separat no ho podrien arribar a fer mai.

També cal tenir en compte que la regulació d'aquestes proteïnes és molt complexa degut a l'existència de gran nombre de fils connectors entre elles. Les variacions en les concentracions de cada una d'elles determinarà diferències en les concentracions relatives d'hetero-oligòmers i homo-oligòmers, i això al seu torn influirà en l'expressió o repressió de determinats gens.

La proteïna His-YdgT també es pot unir a StpA. La unió entre ambdues proteïnes només es detecta en absència de la proteïna H-NS i és menys forta que en el cas d'YdgT i H-NS. Si només es detecta la interacció amb StpA en absència d'H-NS és degut segurament a l'abundància relativa entre H-NS i StpA, a part de la possible explicació d'una major afinitat d'YdgT per H-NS.

Tal i com es va observar per His-YdgT i StpA, les proteïnes His-Hha i StpA també interaccionen, tot i que aquesta interacció només es detecta en absència de la proteïna H-NS. En aquest cas la interacció d'Hha amb StpA també és més dèbil que en el cas d'Hha amb H-NS i això explicaria perquè, també en aquest cas, existeix una unió preferent per H-NS en detriment a StpA.

Amb aquests experiments es va aconseguir mimetitzar les característiques d'un mutant *hns*. En aquest fons genètic, les proteïnes Hha i YdgT presenten la capacitat d'interaccionar amb StpA, segurament per continuar realitzant, ara les noves parelles, les funcions que abans complien Hha-H-NS o YdgT-H-NS.

Degut a la similitud en el comportament de les proteïnes Hha i YdgT respecte a H-NS i StpA, es va decidir comprovar si Hha i YdgT podrien interaccionar almenys *in vitro*. Els experiments resultants ens van permetre afirmar que, a diferència de StpA i H-NS, aquestes dues proteïnes no tenen la capacitat d'interaccionar, almenys en les condicions utilitzades. Aquest fet podria ser degut a que aquestes proteïnes tindran la capacitat de regular gens específics tan sols a nivell individual o formant complexes amb H-NS o StpA., i perquè no, amb altres proteïnes associades al nucleòide. La seva evolució les hauria convertit en dominis especialitzats d'unió a proteïnes de la família H-NS.

4.3 REGULACIÓ ENTRE LES PROTEÏNES HHA, YDGT, H-NS I STPA

Un cop establert el paper de la proteïna YdgT en el sistema de regulació Hha-*hly* i la interacció amb les proteïnes H-NS i StpA, i considerant que les proteïnes H-NS i StpA s'auto-regulen negativament (Sondén i Uhlin, 1996, Zhang et al., 1996) es va intentar demostrar: i) si la transcripció del gen *ydgT* es veia influenciada per la mutació *hha* i ii) si les proteïnes Hha i/o YdgT exercien alguna regulació o influeixen en l'expressió dels gens *hns* o *stpA*.

En comparar la transcripció del gen *ydgT* entre les soques BSN26 i BSN26H (soca salvatge i soca mutant *hha*) en dos punts de la corba de creixement (DO_{600} de 0,5 i 1), es va poder comprovar en primer lloc que l'expressió d'*ydgT* és majoritària en la fase exponencial del creixement, tant en absència com en presència de la proteïna Hha. Aquest augment en l'expressió en fase exponencial està descrit per altres proteïnes associades al nucleòide així com per la proteïna Hha, de la que els nivells tornen a decréixer en fase estacionària (Mouriño *et al.*, 1998), tal i com passa amb YdgT.

En segon lloc, tant a la fase exponencial com a l'inici de la fase estacionària la transcripció o la quantitat de RNA missatger del gen *ydgT* augmenta en el mutant *hha*.

Així, podem apuntar l'existència d'algun tipus de regulació establerta per la proteïna Hha en l'expressió d'*ydgT* a *E. coli*. Aquesta regulació exercida per Hha sobre *ydgT* ens permetria confirmar el que s'havia hipotetitzat com a conseqüència d'anteriors resultats obtinguts, i és que la proteïna YdgT en un fons genètic *hha* està sobreexpressada i d'aquesta manera pot complementar les funcions d'Hha tot i que no sabem encara en quines i sobre quantes proteïnes ho fa.

Un segon tema que es va decidir estudiar fou l'anàlisi de l'expressió del gen *hns* en un fons genètic *hha*, *ydgT* o *hha ydgT*. La finalitat d'aquest estudi era comprovar si les proteïnes Hha i/o YdgT exercien algun tipus de regulació sobre la transcripció del gen *hns*, en fase exponencial del creixement, que és quan hem vist que aquestes proteïnes assoleixen la màxima expressió (aquest treball i Mouriño *et al.*, 1998). Per fer-ho, es va abordar l'estudi mitjançant la tècnica de RT-PCR, amb la que es retro-transcriu i amplifica el RNA d'un transcrit determinat, en aquest cas d'*hns*.

A través d'aquest experiment, es va determinar que l'expressió del gen *hns* en fase exponencial de creixement i en condicions de 37°C en medi LB es veu alterada en un fons genètic *hha* i en major grau en un fons *hha ydgT*. Pel que fa a la mutació simple

ydgT, no provoca cap efecte en les quantitats de RNA retro-transcrit i amplificat detectades. Aquest, juntament amb l'operó hemolític, seria un altre exemple de proteïna regulada per Hha i YdgT en la que YdgT no té cap efecte fenotípic per si sola però si en el doble mutant *hha ydgT*.

Un efecte a considerar és perquè aleshores les parelles Hha/YdgT i H-NS/StpA no regulen els mateixos gens? Potser a aquest fet caldria sumar-li l'efecte directe d'aquestes proteïnes sobre determinats gens. És a dir, a més de l'efecte indirecte provocat per l'augment de l'expressió d'*hns* produït per Hha i YdgT, també es dona un efecte directe degut a la unió d'aquestes proteïnes entre elles per activar o reprimir certs gens. Ja ha estat descrit que Hha i H-NS s'uneixen per a reprimir l'operó hemolític (Nieto *et al.*, 2000 i Madrid *et al.*, 2002) però el complex format per Hha-H-NS no té perquè tenir la capacitat de formar complexos nucleo-proteïcs en tots els gens que ja se sap que estan regulats per H-NS.

Contràriament, la proteïna H-NS establiria algun tipus de "feed-back" negatiu ja que ha estat demostrat que en un mutant *hns*, l'expressió d'*hha* disminueix 20,75 vegades, molt més que qualsevol altra proteïna d'unió al DNA (amb excepció de Lrp) i que fins i tot la seva homòloga StpA (Hommals *et al.*, 2001) amb la qual està descrit ja un model en el que ambdues proteïnes exerceixen un control paral·lel i una regulació creuada simultània així com auto-regulació per tal de mantenir les concentracions apropiades entre ambdues proteïnes (Zhang *et al.*, 1996; Free i Dorman, 1997).

Per altra banda, el fet que les proteïnes Hha i YdgT arribin al seu màxim nivell d'expressió en fase exponencial de creixement i que aquestes activin la transcripció d'H-NS reforça la hipòtesi proposada per alguns autors en la que H-NS també es veu sobre-expressada en aquesta fase del creixement (Hinton *et al.*, 1992; La Teana *et al.*, 1989; Free i Dorman, 1995; Ali Azam *et al.*, 1999).

Tal i com hem referit anteriorment, Dobrindt i col·laboradors (2002) van demostrar recentment que el factor tRNA₅^{Leu} (codificat per *leuX*) afecta l'expressió del determinant hemolític a diferents nivells en la cascada de regulació, és a dir, aquest factor reprimeix la transcripció de la proteïna Hha. En canvi, no van trobar cap tipus de regulació exercida pel factor tRNA₅^{Leu} sobre l'expressió del gen *hns*. Aquest fet contradiria el proposat en aquest treball ja que si en un mutant *leuX* es produeix un augment de la proteïna Hha i aquesta regula l'expressió d'*hns*, també s'hauria de produir com a efecte indirecte un augment en l'expressió d'aquesta proteïna. És possible però, que l'augment en l'expressió d'*hha* provocat per l'absència de *leuX* no sigui

suficient per a la detecció d'un augment de l'expressió del gen *hns* provocat per la proteïna Hha.

En base als resultats obtinguts pel que fa a la regulació positiva que exerceixen les proteïnes Hha i YdgT sobre l'expressió del gen *hns*, va sorgir la inevitable qüestió de si aquestes proteïnes també serien capaces de regular la proteïna StpA, paràloga a H-NS. Els assajos de RT-PCR van confirmar que efectivament, l'expressió de *stpA* es veu regulada per ambdues proteïnes de la mateixa manera que *hns*. Tal i com hem pogut comprovar, ambdues mutacions provoquen una disminució en la transcripció de *stpA* tot i que aquest efecte no ha estat observat a nivell de detecció de la proteïna. Tot i que l'expressió de *stpA* i per tant el seu mRNA estaria activada per Hha i/o YdgT, és possible que existeixi algun mecanisme pel qual la traducció o l'estabilitat del propi mRNA es vegi reduïda i que faci que els nivells de StpA es mantinguin constants en les diferents soques. O possiblement, la immunodetecció no és una tècnica prou acurada i fina com per a detectar diferències tan subtils en les quantitats de proteïna.

La hipòtesi global proposada ens permetria ampliar models ja descrits fins ara i seria la que es detalla a la figura 4.4.1:

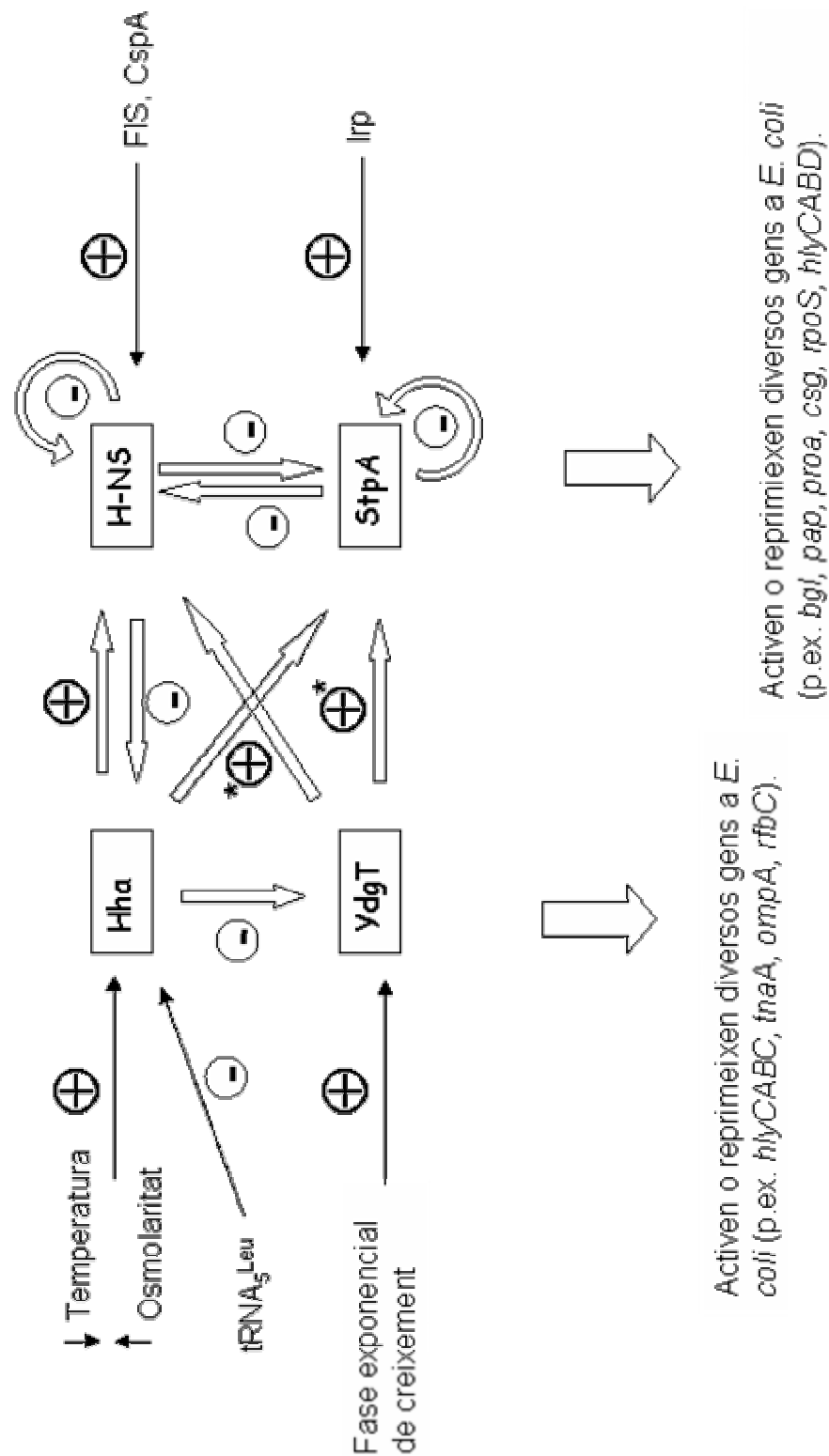


Figura 4.4.1. Hipòtesi global proposada de regulació entre les proteïnes Hha, YdgT, H-NS i StpA. Els asteriscs indiquen sistemes de regulació en els que es requereixen ambdues proteïnes (Hha i YdgT).

4.4 PLEIOTROPIA DE LES MUTACIONS *hha*, *ydgT* i *hha ydgT*

Tot i la gran quantitat d'anys de treball intens investigant la funció de les proteïnes associades al nucleòide en procariotes, la seva funció en la fisiologia bacteriana encara no està totalment clarificada. En paral·lel, s'ha realitzat recentment un gran progrés en l'anàlisi del genoma. Aquests estudis han posat més de manifest els aspectes no coneguts de la fisiologia dels organismes vius, incloent microorganismes model com *Escherichia coli* (Blattner *et al.*, 1997) i *Bacillus subtilis* (Kunst *et al.*, 1997), els quals han estat àmpliament estudiats. Encara avui, la funció d'aproximadament el 40% dels gens predits no ha estat assignada.

A *E. coli*, l'expressió d'*hha* és depenent de la fase de creixement i de diversos factors ambientals (Mouriño *et al.*, 1998.). Les mutacions en el gen *hha* donen com a resultat diversos fenotips, donat que el seu producte està implicat en la regulació de diversos gens aparentment independents (taula 1.3.2.1 de la introducció). Malgrat conèixer uns quants gens regulats per la proteïna Hha, la funció d'aquesta en el metabolisme bacterià i les seves implicacions en la virulència d'*E. coli* segueixen sense ser clarificades. Per tal d'obtenir més informació sobre el paper fisiològic d'aquesta proteïna i de la seva paràloga YdgT, es van comparar diversos patrons d'expressió proteica de les soques salvatge, mutant *hha*, mutant *ydgT* i el doble mutant *hha ydgT*, mitjançant l'anàlisi del patró proteic dels diferents compartiments cel·lulars i l'electroforesi en dues dimensions d'extractes cel·lulars.

L'anàlisi proteòmica ha demostrat que les proteïnes Hha/YdgT juguen un paper important en la regulació de la fisiologia cel·lular i estan implicades en la virulència d'*E. coli*, de manera directa o indirecta, controlant l'expressió de diversos gens i/o la síntesi i processament del seu producte. En les condicions de creixement utilitzades hem pogut visualitzar, a partir de l'anàlisi d'extractes realitzats en 2D-PAGE, al voltant de 1000 *spots*, dels quals els nivells d'acumulació d'almenys un 1% estava alterat en algun tipus de mutant respecte la soca salvatge. El 50% de les proteïnes diferencials (trobades tant per anàlisi electroforètic en 2D-PAGE com en gels de SDS-PAGE) tenien un patró més elevat en la soca salvatge que en els seus respectius mutants (amb l'excepció en alguns casos del mutant simple *ydgT*).

Aquestes diferències corresponen a proteïnes que estan principalment implicades en la composició de l'embolcall cel·lular, el metabolisme d'aminoàcids i en la regulació d'altres proteïnes reguladores. A la següent taula s'exposen les proteïnes que s'han

determinat en el global d'aquest treball que estan regulades, directa o indirectament, per les proteïnes Hha i YdgT.

Proteïna (Nº d'accés (SwissProt))	Efecte de la mutació <i>hha</i> o <i>hha ydgT</i>
Envolcall cel·lular i processos cel·lulars	
HlyA (P08715)	Increment en la síntesi d'hemolisina (HlyA)
OmpA (P02934)	Disminució de la síntesi d'OmpA
OmpC (P06996)	Increment de la síntesi d'OmpC
RfbC (P37745)	Disminució de la síntesi de L-ramnosa sintetasa
RbsB (P02925)	Increment de la síntesi de la proteïna d'unió a ribosa
Metabolisme d'aminoàcids	
TnaA (P00913)	Disminució de la síntesi de triptofanasa
Vies informatives	
H-NS (P08936)	Disminució de la síntesi d'H-NS
YdgT (P76179)	Increment de la síntesi d'YdgT
StpA (P30017)	Disminució de la síntesi de StpA

Taula 1.3.2.1. Proteïnes regulades per les proteïnes Hha i YdgT que han estat descrites en aquest treball.

L'anàlisi electroforètica en dues dimensions d'extractes de les soques mutants *ydgT*, *hha* i *hha ydgT* evidencia que tal i com passa amb Hha, YdgT pot actuar directa o indirectament com activador o com a repressor de l'expressió gènica. A més, proteïnes específiques poden ser regulades, positiva o negativament, tant per Hha com per YdgT. Aquests resultats indiquen que la funció d'YdgT és anàloga a la d'Hha, i que tot i que s'expressa a baixos nivells en condicions normals, la seva inducció en un fons *hha* proporciona suficient activitat com per substituir Hha i controlar diverses proteïnes regulades per Hha. Però el paral·lisme entre Hha i YdgT no és absolut: algunes proteïnes que són regulades per Hha no ho són per YdgT, ja que en aquests casos l'expressió d'una determinada proteïna en el doble mutant és comparable a l'expressió en el mutant *hha* (com per exemple RbsB i OmpC). Tot i així, podem apuntar que YdgT pot substituir moltes propietats d'Hha.

En analitzar detingudament les proteïnes diferencials trobades tant per l'anàlisi en electroforesi SDS-PAGE com per 2D-PAGE, i que es van poder determinar posteriorment mitjançant MALDI-TOF, vam poder comprovar que totes elles podien tenir algun tipus d'implicació en la virulència. Per exemple, RbsB està implicada en processos de quimiotaxi; la porina OmpA en processos de conjugació del plàsmid F; RfbC en la síntesi de l'antigen O, etc.

Una d'aquestes proteïnes en la que trobem una expressió modificada en els mutants *hha* i *hha ydgT* és la proteïna **RbsB** o proteïna d'unió a la ribosa. Aquesta proteïna correspon al precursor de la proteïna periplasmàtica d'unió a la D-ribosa, codificada pel gen *rbsB*. Està implicada en el sistema de transport d'elevada afinitat per la ribosa, i també funciona com a quimioreceptor per quimiotaxi. El sistema de transducció de senyals de la quimiotaxi bacteriana pertany a una família molt abundant de sistemes de regulació de dos components (Wurgler-Murphy i Saito, 1997), cada un compost d'un sensor i d'un regulador de resposta (Ninfa, 1991). El moviment de la bactèria cap a atraients i contra repel·lents està controlat per un sistema de processament de la informació que tradueix canvis en les concentracions dels quimio-efectors en l'ambient en senyals citoplasmàtics que modulen la direcció de la rotació del flagell, i conseqüentment, en el comportament del moviment de les cèl·lules (Larsen *et al.*, 1974). En condicions de manca de la proteïna Hha, es dona una major expressió d'aquesta proteïna. Ohba *et al.* (1997) van determinar una menor expressió de RbsB en mutants *dnaA*. La proteïna DnaA és el factor d'iniciació per a la replicació del DNA cromosòmic a *E. coli* (Hirota *et al.*, 1970; Fuller *et al.*, 1983), és a dir, la iniciació de la replicació del DNA està regulada per l'alteració en l'activitat de la proteïna DnaA, una proteïna amb elevada afinitat per ATP i ADP. Aquests autors assumeixen que les proteïnes que presenten una expressió diferencial en mutants *dnaA* poden estar implicades en la regulació de l'activitat de la proteïna DnaA i per tant, en processos de replicació a *E. coli*. Així doncs, la proteïna RbsB no només estaria implicada en processos de quimiotaxi sinó també en processos de replicació del DNA cromosòmic, i al seu torn, està regulada per Hha de manera inversa a la regulació exercida per DnaA.

En les bactèries Gram-negatives com *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae* o *Escherichia coli*, la L-ramnosa és un residu important en l'antigen O del lipopolisacàrid, el qual és essencial per a la resistència al sèrum (Joiner, 1988) i per a la colonització

(Chiang i Mekalanos, 1999; Burns i Hull, 1998). La incorporació de la L-ramnosa a la paret cel·lular té lloc via el seu precursor, la dTDP-L-ramnosa. Aquest precursor es sintetitza a partir de la glucosa-1-fosfat i la deoxitimidina trifosfat (dTTP) a través d'una via que implica 4 enzims. El tercer enzim d'aquesta via és la **RfbC** o RmlC, que converteix el dTDP-6-deoxi-D-xilo-4-hexulosa a dTDP-6-deoxi-L-lixo-hexulosa. Degut a que les cèl·lules humanes són incapaces de sintetitzar dTDP-L-ramnosa, els 4 enzims d'aquesta via metabòlica representen dianes contra les que podrien actuar nous medicaments. La manca d'un d'aquests enzims (RmlD) a *E. coli* 075:K5 uropatogèniques, condueix a la pèrdua de la resistència al sèrum per part d'aquestes soques (Burns i Hull, 1998). En aquest treball, i mitjançant l'anàlisi per 2D-PAGE, hem demostrat que totes les mutacions, tant simples com dobles d'*hha* i *ydg*, provoquen l'absència de l'enzim L-ramnosa sintetasa. És a dir, en aquest cas, ambdues proteïnes estarien implicades en la regulació de la formació de l'antigen O i per tant, segurament en la resistència al sèrum i a l'escapada a l'activitat bactericida del complement.

Una altra de les proteïnes l'expressió de la qual estava reprimida en tots els mutants en major o menor grau va ser la porina **OmpA**, però no vam poder determinar, a partir de la mostra extreta del gel 2D-PAGE, si en la forma precursora o madura. OmpA és la proteïna de membrana externa d'*E. coli* més ben estudiada. Les funcions d'OmpA per una banda són la contribució al manteniment de la integritat estructural de la membrana externa juntament amb la mureïna i el peptidoglicà (Braun i Bosch, 1972; Lazzaroni i Portalier, 1992), i per altra banda OmpA serveix com a receptor de la colicina (Foulds i Barrett, 1973) i diversos fags (Morona *et al.*, 1984), i es requereix per a la conjugació del plàsmid F.

Un dels sistemes conjugatius més estudiats és el del plàsmid F d'*E. coli* K-12, del que es coneix la seqüència complerta de la regió de transferència de 40 gens (*tra*) (revisat a Frost *et al.*, 1994). Un d'aquests gens codifica per la proteïna TraN, proteïna de membrana externa implicada en l'estabilització de l'aparellament (Durrenberger *et al.*, 1991). S'ha demostrat que la proteïna TraN del plàsmid F és la responsable de la interacció amb la porina OmpA i el LPS de la cèl·lula receptora (Klimke i Frost, 1998). Els requeriments d'OmpA en la cèl·lula receptora són només necessaris en condicions de creixement en medi líquid però no en superfícies sòlides (Achtman *et al.*, 1978). S'ha comprovat a més, que el domini de la proteïna TraN del plàsmid F responsable de la interacció directa o indirecta amb OmpA es troba entre la regió N-terminal de la

proteïna i el residu 399. És justament aquesta regió la que té una clara divergència amb la proteïna TraN del plàsmid R100-1. Aquesta diferència fa que la conjugació d'aquest plàsmid no requereixi d'OmpA a la cèl·lula receptora (Klimke i Frost, 1998). També s'ha observat que mutants *ompA* mostren freqüències de conjugació de 2 a 3 logaritmes menors respecte la soca salvatge.

L'anàlisi mitjançant 2D-PAGE d'extractes de les diferents soques salvatge i mutants *ydgT*, *hha* i *hha ydgT* mostrava diferències en l'expressió de la proteïna OmpA (precursora o madura). Per tal de corroborar aquest resultat, es va realitzar un aïllament de proteïnes de membrana externa de les diferents soques i es va analitzar mitjançant SDS-PAGE. Els resultats semblaven indicar que existia la mateixa quantitat de proteïna OmpA, en aquest cas madura, en tots els casos. Així i tot, cal tenir en compte que l'anàlisi de la proteïna OmpA mitjançant SDS-PAGE es va realitzar a partir de mostres obtingudes de l'extracció de membrana externa de les cèl·lules. Aquesta extracció pot ser no molt precisa o igualitària per a totes elles. A més, les diferències subtils en les quantitats d'OmpA madura poden no ser detectades per SDS-PAGE. És possible que en l'anàlisi per 2D-PAGE haguem detectat la forma precursora d'OmpA que com hem vist varia en cada soca. Aquesta variació pot ser deguda a diferències en l'eficàcia del processament de proteïna precursora a proteïna madura. Per tant, si les mutacions *hha* i *hha ydgT* presenten una menor quantitat de proteïna precursora, pot ser degut a l'existència d'un flux major cap a proteïna madura, tot i que no siguem capaços de detectar-ho en l'anàlisi per SDS-PAGE.

La diferència en l'expressió d'aquesta proteïna en una soca salvatge i en un mutant *hha* ja havia estat caracteritzada en condicions de creixement en elevada osmolaritat (Balsalobre *et al.*, 1999). En aquest cas, no és que es produeixi una disminució en l'expressió d'OmpA en la soca mutant sinó que el processament de la proteïna precursora a la forma madura és més eficaç en la soca salvatge sota condicions d'elevada osmolaritat (Balsalobre *et al.*, 1999), però no havia estat determinat en les condicions assatjades en aquest treball.

Donades les implicacions d'aquesta proteïna en la conjugació del plàsmid F es van realitzar experiments de conjugació d'un plàsmid de tipus F (pOX38-Gen) i es va poder comprovar que les mutacions *hha* i *hha ydgT* en les soques receptores produïen un augment de 2 logaritmes en la freqüència de conjugació. En el cas del doble mutant, inexplicablement, aquesta freqüència no assoleix els nivells del mutant simple *hha* (es situa entre 1 i 2 logaritmes), i això pot ser degut a mutacions compensatòries que es

donen en aquesta soca per augmentar la viabilitat. Aquest efecte ja ha estat descrit per Johansson i col·laboradors (2000) per a la doble mutació *hns stpA*. Degut als resultats obtinguts en l'efecte de la doble mutació, som incapaços de determinar si la manca de la proteïna YdgT té algun efecte en la freqüència de conjugació del plàsmid F, si bé no per si sola, en l'efecte compensatori que podria tenir de la mutació *hha*. Està clar doncs, que almenys la proteïna Hha està implicada en processos conjugatius del plàsmid F en medi líquid i no en canvi del plàsmid R-100 que recordem que no requereix de la proteïna OmpA. Aquest efecte és degut a l'acció indirecta que exerceix la proteïna Hha, i possiblement YdgT, sobre la major expressió o processament de la proteïna OmpA madura. En aquest cas, la proteïna H-NS té un efecte molt poc significatiu en la conjugació d'aquest plàsmid i per tant, segurament en l'expressió o el processament de la proteïna OmpA.

La majoria de soques d'*E. coli* utilitzen el L-triptòfan com a font de carboni i nitrogen via el sistema induïble L-triptofanasa-L-triptòfan permeasa que converteix el triptòfan a piruvat, NH₃ i indol (Snell, 1975). El sistema triptofanasa d'*E. coli* K-12 és expressat a elevats nivells en resposta al L-triptòfan, és extremadament sensible a repressió per catabolit, no està sotmès a regulació per nitrogen, i no està sotmès a regulació pel repressor TrpR de l'operó *trp* (revisat a McFall i Newman, 1996). L'enzim **TnaA** consta de 4 subunitats i és una proteïna citoplasmàtica amb una constant d'afinitat per al triptòfan de 0,33 mM i un pH òptim de 7,2 a 8,8. A part de catalitzar la reacció que ja hem descrit anteriorment, també és capaç de realitzar el pas de L-serina a piruvat i amoni, i L-cisteïna (+ H₂O) a piruvat, amoni i àcid sulfúric. A més, també té la capacitat de realitzar el pas d'Indol + L-serina a triptòfan (+H₂O) i també l'Indol + L-cisteïna a triptòfan (+ àcid sulfúric) (revisat a McFall i Newman, 1996). Alguns autors han proposat aquest enzim com a factor de virulència en patògens que infecten regions alcalines del cos, com ara el conducte pancreàtic, ja que la proteïna TnaA pot contribuir a la supervivència en la fase estacionària retardant l'alcalinització (Blankenhorn *et al.*, 1999).

L'ús de senyals químics per a la comunicació bacteriana és un fenomen àmpliament estès. En bacteris Gram-negatius, aquestes senyals poden ser derivats N-acil de la lactona homoserina, dipèptics cíclics i quinolones. Aquestes senyals regulen una gran varietat de funcions que inclouen la bioluminiscència, diferenciació, virulència, transferència de DNA i la maduració de biofilms. Fins avui, no hi ha cap evidència que

E. coli produeixi cap senyal N-acil de la lactona homoserina. És per això que aquesta bactèria deu utilitzar senyals alternatius com l'acumulació de certs metabolits. La senyalització via metabolits podria permetre a la cèl·lula la regulació d'uns gens diana en resposta a canvis en les condicions ambientals. Una d'aquestes senyals podria ser l'indol (Wang *et al.*, 2001). En mutants *tnaA* s'ha observat una disminució en l'expressió dels gens *tnaB*, *astD* i *gabT* provocada per l'efecte de la manca d'indol (Wang *et al.*, 2001). El producte d'aquests gens està implicat en vies de degradació d'aminoàcids a piruvat, succinat, cisteïna i serina. Estudis realitzats per Zinser i Kolter (1999) han demostrat que l'habilitat de catalitzar aminoàcids és un paràmetre important en l'habilitat de persistir i competir en la fase estacionària. Així doncs, la senyalització duta a terme per l'indol pot jugar un paper important en les vies de preparació de les cèl·lules front un ambient pobre en nutrients ja que el catabolisme dels aminoàcids té un paper rellevant en la producció d'energia. El mateix passa en mutacions *lrp* que confereixen un guany energètic estimulant el catabolisme d'aminoàcids en condicions de manca de carboni (Zinser i Kolter, 2000). En aquesta línia, trobem que un gran nombre de determinants de la virulència al gènere *Salmonella* són gens que codifiquen enzims implicats en el metabolisme. El seu rol en la patogènesi es creu que és atrapar nutrients en els microambients inusuals de l'hoste (Groisman i Ochman, 1994).

Electroforesi en 2D-PAGE d'extractes provinents de les soques BSN26, BSN26Y, BSN26H i BSN26HY i l'assaig de la producció d'indol de les mateixes soques, van posar de manifest que les mutacions *hha* i *hha ydgT* provocaven una disminució de l'expressió de la proteïna TnaA i per tant, una disminució en l'activitat triptofanasa.

Tant l'adherència bacteriana a superfícies biòtiques com l'adherència a superfícies abiòtiques poden jugar un paper molt important en les infeccions. Moltes infeccions nosocomials comencen amb una colonització bacteriana dels biomaterials d'ús mèdic, com els catèters, tubs o pròtesis (Dickinson i Bisno, 1989). Els principals patògens nosocomials, com les *Enterobacteriaceae*, espècies de *Staphylococcus* i *Pseudomonadaceae*, són eficients colonitzadors d'aquests materials. Com a exemple d'infeccions humanes causades per *E. coli* que han tingut la capacitat de formar biofilms tindriem les infeccions en el tracte biliar, prostatitis bacteriana i la infecció nosocomial que provoca cistitis urinària de catèter. Si el bacteri és capaç d'enganxar-se a superfícies biòtiques o abiòtiques pot resultar en la formació d'estructures extremadament complexes anomenades biofilms (Costerton *et al.*, 1999). La formació de biofilms implica interaccions bactèria-bactèria i la constitució d'una matriu extracel·lular

formada d'exopolisacàrids. Les bactèries s'incrusten en la matriu del polímer i s'organitzen en microcolònies que formaran canals per on els nutrients podran circular i a més, les cèl·lules de les diferents regions tenen diferents patrons d'expressió gènica (revisat a Costerton *et al.*, 1999). Un cop format, aquests podran atrapar nutrients i resistir a la fagocitosi, a toxines i a agents antimicrobians (Das *et al.*, 1998).

Di Martino i col·laboradors (2002) van descriure que l'enzim triptofanasa està implicat en l'adherència a cèl·lules epitelials i en la formació de biofilms. Aquest enzim pot participar en la modulació del pH en l'ambient que envolta la cèl·lula durant aquests processos, ja que a elevats pH en el medi extern els nivells d'expressió augmenten de 3 a 10 vegades, el que provoca una neutralització d'aquest medi (Blankenhorn *et al.*, 1999). S'ha demostrat que la inactivació d'aquest enzim està associat a una disminució de l'adherència epitelial i la formació de biofilms en poliestirè (Di Martino *et al.*, 2002). Així, es va plantejar l'estudi de la formació de biofilms sobre poliestirè per part de les diferents soques. Com era d'esperar, les soques que tenen reduïda l'expressió de triptofanasa, com són els casos de la soca BSN26H i BSN26HY tenen una més reduïda capacitat de formar biofilms. Tot i que la soca BSN26Y no presenta un fenotip significativament diferent al de la soca salvatge, podem afirmar que la proteïna YdgT deu estar implicada en processos de formació de biofilms ja que la formació d'aquests en el doble mutant és menor que en el mutant simple *hha*, i per tant, YdgT, un cop més, és capaç d'aliviar, parcialment, el fenotip de la mutació *hha*. Com ja s'ha remarcat en l'apartat de resultats, la mutació *hns* no proporciona una disminució ni de l'expressió de l'enzim TnaA ni de la seva activitat, tot i així, es dona una clara disminució en la capacitat de formar biofilms. Cal tenir en compte, que la formació de biofilms és un fenomen multi-factorial que implica molts tipus d'organel·les de superfície com pili, fimbries, curli, flagel; adhesines; lipopolisacàrids i senyals de *quorum-sensing* que ja han estat descrites a *Pseudomonas aeruginosa* (revisat a Costerton *et al.*, 1999). Donat el caràcter pleiotròpic que té la mutació *hns* no podem descartar que l'efecte provocat sobre la formació de biofilms sigui degut a algun altre (o a varis) efecte causat sobre altres proteïnes implicades en el procés. Aquest fet és extensible a l'efecte observat en les mutacions en els gens *hha* i/o *ydgT*.

Cèl·lules d'*E.coli* reaccionen a canvis en l'osmolaritat mitjançant la síntesi de diferents quantitats de dues porines de membrana externa, **OmpC** i **OmpF**. Ambdós porus permeten el moviment de molècules petites, però el diàmetre d'OmpC és una mica menor. Un increment en el número d'un determinat tipus de porus és compensat per la disminució de l'altre. Un sistema de dos components que consisteix en un sensor EnvZ i un regulador de resposta OmpR, regula la síntesi dels dos porus. La taxa de síntesi d'OmpC i OmpF ve determinat per l'estat de fosforilació d'OmpR. La transcripció d'*ompC* s'estimula per la proteïna OmpR fosforilada, mentre que quan aquesta està defosforilada activa la transcripció d'*ompF* inhibint alhora la d'*ompC*. A elevada osmolaritat i elevada temperatura, les cèl·lules contenen relativament més OmpC, mentre que a baixa osmolaritat predomina OmpF. Aquest patró es tradueix en que OmpC és la forma predominant durant el creixement en el tracte intestinal, i que OmpF predomina quan s'està fora d'aquest. Els porus petits excloïxen moltes de les molècules tòxiques que podem trobar en el tracte intestinal, mentre que els porus grans permeten que els substrats de les solucions diluïdes entrin a la cèl·lula ràpidament (revisat a Nikaido, 1996).

Els nostres resultats indiquen que les proteïnes Hha i H-NS, reprimeixen l'expressió d'OmpC. Aquest fet és molt interessant si tenim en compte la termo-osmoregulació que duen a terme aquestes proteïnes sobre determinats gens o operons (com ja hem vist en el cas de l'operó *hlyCABD*, Nieto *et al.*, 2000). Això voldria dir, que aquestes proteïnes que són capaces de respondre a canvis en l'osmolaritat del medi, regularien l'expressió de proteïnes que varien les seves concentracions segons factors ambientals com la mateixa osmolaritat.

L'extensiva similaritat de seqüència entre Hha i YdgT efectivament reflecteix la seva íntima i complexa relació funcional. Tal i com ja havíem comentat, sembla clar que la mutació *ydgT* no presenta un fenotip obvi sota les condicions assajades a no ser que vagi de la mà de la mutació *hha*. Això és degut al paper clau que té la proteïna Hha en la regulació de l'expressió gènica a *Escherichia coli* i l'efecte de recanvi molecular que té la proteïna YdgT. Un cop més, cal remarcar les similituds que trobem, en aquest aspecte i en d'altres amb les proteïnes H-NS i StpA.

Tot i que molts investigadors que estudien proteïnes associades al nucleòide han focalitzat els seus esforços en l'estudi dels mecanismes de regulació per alguna de les proteïnes esmentades en aquest treball, és evident que aquestes proteïnes rutinàriament

no treballen soles. Les proteïnes associades al nucleoide sovint actuen en consonància per reprimir o activar la transcripció conjuntament amb d'altres proteïnes associades al nucleoide i amb reguladors globals o específics de gen.

- 1- La proteïna YdgT d'*Escherichia coli* és homòloga a la proteïna Hha, presentant un 38% d'identitat i un 68 % de similitud a nivell d'aminoàcids.
- 2- S'ha obtingut un mutant *ydgT* per deleció, i s'ha comprovat que no presenta cap fenotip significatiu. L'obtenció d'un doble mutant *hha ydgT* ha permès constatar que la desregulació causada per la doble mutació és superior a la que causa la mutació *hha*. Aquest fet que posa en evidència el paper de la proteïna YdgT en la regulació de l'expressió de determinats gens, de manera que la proteïna YdgT és capaç d'atenuar parcialment el fenotip causat per la mutació *hha*.
- 3- L'expressió del gen *ydgT* és més elevada en fase exponencial que en fase estacionària del creixement, i en ambdós casos es veu augmentada en un fons genètic *hha*.
- 4- L'expressió del gen *hns* en fase exponencial es veu alterada en mutants *hha* i *hha ydgT*, produint-se una disminució de l'expressió. En el cas de l'efecte d'aquestes proteïnes sobre l'expressió del gen *stpA*, en aquest cas només s'observa una disminució significativa de l'expressió en el doble mutant *hha ydgT*.
- 5- S'ha posat de manifest que la proteïna YdgT interacciona amb la proteïna H-NS. El domini de la proteïna YdgT implicat en aquesta interacció és l'extrem amino-terminal. Aquesta unió és forta, resistent a elevades concentracions de KCl.
- 6- La proteïna YdgT també interacciona amb la proteïna StpA, mentre que en les condicions assajades no s'ha detectat interacció amb la proteïna Hha.
- 7- S'ha detectat hetero-oligomers *in vivo* entre les proteïnes YdgT/H-NS i Hha/H-NS. Els complexos detectats estan formats per la unió d'una molècula de casadauna de les proteïnes. Els assajos realitzats no han permès identificar possibles hetero-oligomers de major pes molecular.
- 8- L'anàlisi electroforètica d'extractes proteics corresponents a les soques BSN26, BSN26H, BSN26Y i BSN26HY, ha permès constatar que hi ha diferències en l'expressió d'almenys 8 proteïnes, localitzades al periplasma o a la membrana externa. D'aquestes proteïnes ha estat possible identificar-ne dues: la proteïna perilasmàtica d'unió a D-ribosa, codificada pel gen *rsbB*, i la proteïna de membrana externa OmpC, implicada en la formació de porus per a la difusió passiva de compostos de baix pes molecular a través de la membrana.
- 9- Mitjançant l'anàlisi del patró d'expressió de les mateixes soques en gels bidimensionals s'han detectat diferències en 7 spots, dels quals alguns només es

detecten a la soca salvatge, altres es detecten en diferent intensitat a les diferents soques, i altres només es detecten a les soques mutants *hha* o *hha ydgT*.

- 10- S'ha pogut identificar 3 de les proteïnes que presenten diferent expressió a l'anàlisi bidimensional. Aquestes proteïnes corresponen a la triptofanasa codificada pel gen *tnaA*, la proteïna OmpA codificada pel gen *ompA*, i la dTDP-L-ramnosa sintetasa, codificada pel gen *rfbC*.

- Achtman, M., Morelli, G. i Schwuchow, S.** (1978). *Cell-cell interactions in conjugating Escherichia coli: role of the F pili and fate of mating aggregates.* Journal of Bacteriology **135**: 1053-1061.
- Ali Azam, T. i Ishihama, A.** (1999). *Twelve species of the nucleoid-associated protein from Escherichia coli. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity.* The Journal of Biological Chemistry **274**: 33105-33113.
- Ali Azam, T., Iwata, A., Nishimura, A., Ueda, S. i Ishihama, A.** (1999). *Growth Phase-dependent variation in protein composition of the Escherichia coli nucleoid.* Journal of Bacteriology **181**: 6361-6370.
- Ali Azam, T.A., Hiraga, S. i Ishihama, A.** (2000). *Two types of localization of the DNA-binding proteins within the Escherichia coli nucleoid.* Genes to Cells **5**: 613-626.
- Almiron M., Link A.J., Furlong D. i Kolter R.** (1992). *A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved Escherichia coli.* Genes and Development **6**: 2646-2654.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, Z., Miller, W. i Lipman, D.J.** (1997). *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.* Nucleic Acids Research. **25**: 3389-3402.
- Amit, R., Oppenheim, A.B. i Stavans, J.** (2003). *Increased bending rigidity of single DNA molecules by H-NS, a temperature and osmolarity sensor.* Biophysical Journal **84**: 2467-2473.
- Anthony, K.G., Sherburne, C., Sherburne, R. i Frost, L.S.** (1994). *The role of the pilus in recipient cell recognition during bacterial conjugation mediated by F-like plasmids.* Molecular Microbiology **13**: 939-953.
- Atlung, T. i Hansen, F.G.** (2002). *Effect of different concentrations of H-NS protein on chromosome replication and the cell cycle in Escherichia coli.* Journal of Bacteriology **184**: 1843-1850.
- Atlung, T. i Ingmer, H.** (1997). *H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression.* Molecular Microbiology **24**: 7-17.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. i Struhl, K. (eds.)** (1992). *Current Protocols in Molecular Biology.* Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience.
- Badaut, C., Williams, R., Arluison, V., Bouffarartigues, E., Robert, B., Buc, H. i Rimsky, S.** (2002). *The degree of oligomerization of the H-NS Nucleoid Structuring*

- Protein is related to specific binding to DNA. The Journal of Biological Chemistry* **277**: 41657-41666.
- Bailey, M.J.A., Koronakis, V., Schmoll, T. i Hughes, C.** (1992). *Escherichia coli HlyT protein, a transcriptional activator of haemolysin synthesis and secretion, is encoded by the rfaH (sfrB) locus required for expression of sex factor and lipopolysaccharide genes.* *Molecular Microbiology* **6**: 1003-1012.
- Balsalobre, C.** (1998). *La proteina Hha es un modulador global de la expresion génica en Escherichia coli.* Tesi Doctoral. Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.
- Balsalobre, C., Johansson, J., Uhlin, B.E., Juárez, A. i Muñoa, F.J.** (1999). *Alterations in protein expression caused by the hha mutation in Escherichia coli: influence of growth medium osmolarity.* *Journal of Bacteriology* **181**: 3018-3024.
- Balsalobre, C., Juárez, A., Madrid, C., Mouriño, M., Prenafreta, A. i Muñoa, F.J.** (1996). *Complementation of the hha mutation in Escherichia coli by the ymoA gene from Yersinia enterocolitica: dependence on the gene dosage.* *Microbiology* **142**: 1841-1846.
- Barth, M., Marschall, C., Muffler, A., Fischer, D. i Hengge-Aronis, R.** (1995). *Role for the histone-like protein H-NS in growth phase-dependent and osmotic regulation of sigma S and many sigma S-dependent genes in Escherichia coli.* *Journal of Bacteriology* **177**: 3455-3464.
- Berlyn, M.K.B., Low, K.B. i Rudd, K.E.** (1996). *Integrated linkage map of Escherichia coli.* A: F. C. Neidhardt et al., ed., *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*, 2nd ed., vol. 2. Washington DC: ASM Press.
- Bertin, P., Benhabiles, N., Krin, E., Laurent-Winter, C., Tendeng, C., Turlin, E., Thomas, A., Danchin, A. i Brasseur, R.** (1999). *The structural and functional organization of H-NS-Like proteins is evolutionarily conserved in Gram-Negative bacteria.* *Molecular Microbiology* **31**: 319-329.
- Bertin, P., Hommais, F., Krin, E., Soutourina, O., Tendeng, C., Derzelle, S. i Danchin, A.** (2001). *H-NS and H-NS-like proteins in Gram-negative bacteria and their multiple role in the regulation of bacterial metabolism.* *Biochimie* **83**: 235-241.
- Bhriain, N.N., Dorman, C.J., Higgins, C.F.** (1989). *An overlap between osmotic and anaerobic stress responses: a potential role for DNA supercoiling in the coordinate regulation of gene expression.* *Molecular Microbiology* **3**: 933-942.
- Birnboim, H.C.** (1983). *A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA.* *Methods in Enzymology* **100**: 243-254.

- Blanco, A., Juárez, A. i Pastor, F.I.J.** (1991). *Overproduction of a Clostridium cellulolyticum endoglucanase by mutant strains of Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letters **81**: 221-226.
- Blankenhorn, D., Phillips, J. i Slonczewski, J.L.** (1999). *Acid- and Base-induced proteins during aerobic and anaerobic growth of Escherichia coli revealed by two-dimensional gel electrophoresis*. Journal of Bacteriology **181**: 2209-2216.
- Blattner, F.R., Plunkett, G. III, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B. i Shao, Y.** (1997). *The complete genome sequence of Escherichia coli K-12*. Science **277**: 1453-1474.
- Bloch, V., Yang, Y., Margeat, E., Chavanieu, A., Augé, M.T., Robert, B., Arold, S., Rimsky, S. i Kochoyan, M.** (2003). *The H-NS dimerization domain defines a new fold contributing to DNA recognition*. Nature Structural Biology **10**: 212-218.
- Bolívar, F., Rodríguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L. i Boyer, H.W.** (1977). *Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system*. Gene **2**: 95-113.
- Bracco, L., Kotlarz, D., Kolb, A., Diekmann, S. i Buc, H.** (1989). *Synthetic curved DNA sequences can act as a transcriptional activators in Escherichia coli*. EMBO Journal **8**: 4289-4296.
- Bradford, M.M.** (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry. **72**: 248-254.
- Brandi, A., Spurio, R., Gualerzi, C.O. i Pon, C.L.** (1999). *Massive presence of the Escherichia coli "major cold-shock protein" CspA under non-stress conditions*. EMBO Journal **18**: 1653-1659.
- Braun, V. i Bosch, V.** (1972). *Sequence of the murein-lipoprotein and the attachment site of the lipid*. European Journal of Biochemistry **28**: 51-69.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. i Short, J.M.** (1987). *XLI-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with Beta-Galactosidase section*. Biotechniques. **5**: 376-379.
- Burland, V., Shao, Y. Perna, N.T., Plunkett, G., Sofia, H.J. i Blattner, F.R.** (1998). *The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of Escherichia coli O157:H7*. Nucleic Acids Research **26**: 4196-4204.

- Burnette, W.N.** (1981). "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry* **112**: 195-203.
- Burns, S.M. i Hull, S.I.** (1998). Comparison of loss of serum resistance by defined lipopolysaccharide mutants and an acapsular mutant of uropathogenic *Escherichia coli* O75:K5. *Infection and Immunity* **66**: 4244-4253.
- Caramel, A. i Schnetz, K.** (2000). Antagonistic control of the *Escherichia coli* *bgl* promoter by FIS and CAP in vitro. *Molecular Microbiology* **36**: 85-92.
- Carmona, M., Balsalobre, C., Muñoz, F.J., Mouriño, M., Jubete, Y., De la Cruz, F. i Juárez, A.** (1993). *Escherichia coli* *hha* mutants, DNA supercoiling and expression of haemolysin genes from recombinant plasmid pANN202-312. *Molecular Microbiology* **9**: 1011-1018.
- Ceschini, S., Lupidi, G., Coletta, M., Pon, C.L., Fioretti, E. i Angeletti, M.** (2000). Multimeric self-assembly equilibria involving the histone-like protein H-NS, a thermodynamic study. *The Journal of Biological Chemistry* **275**: 729-734.
- Cheperanov, P.P. i Wackernagel, W.** (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^r and Km^r cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**: 2-14.
- Chiang, S.L. i Mekalanos, J.J.** (1999). *rfb* mutations in *Vibrio cholerae* do not affect surface production of toxin-coregulated pili but still inhibit intestinal colonization. *Infection and Immunity* **67**: 976-980.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. i Hsu, L.** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA* **69**: 2110-2114.
- Collis, C.M., Molloy, P.L., Both, G.W i Drew, .R.** (1989). Influence of the sequence-dependent flexure of DNA on transcription in *E. coli*. *Nucleic Acid Research* **17**: 9447-9468.
- Cornelis, G., Laroche, Y., Balligand, G., Sory, M.P. i Wauters, G.** (1987). *Yersinia enterocolitica*, a primary model of bacterial invasiveness. *Review of Infectious Diseases* **9**: 64-87.
- Cornelis, G., Sluiter, C., Delor, I., Gelb, D., Kaniga, K., Lambert de Rouvroit, C., Sory, M.P., Vanooteghem, J.C. i Michiels, T.** (1991). *ymoA*, a *Yersinia*

- enterocolitica* chromosomal gene modulating the expression of virulence functions. *Molecular Microbiology* **5**: 1023-1034.
- Cornelis, G., Sluiter, C., Lambert de Rouvroit, C. i Michiels, T.** (1989). *Homology between VirF, the transcriptional activator of the Yersinia virulence regulon, and AraC, the Escherichia coli arabinose operon regulator.* *Journal of Bacteriology* **171**: 254-282.
- Costerton, J.W., Steward, P.S. i Greenberg, E.P.** (1999). *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.* *Science* **284**: 1318-1322.
- Cunningham, T.P., Montelaro, R.C. i Rushlow, K.E.** (1993). *Lentivirus envelope sequences and proviral genomes are stabilized in Escherichia coli when cloned in low-copy-number plasmid vector.* *Gene* **9**: 93-98.
- Cusick, M.E. i Belfort, M.** (1998). *Domain structure and RNA annealing activity of the Escherichia coli regulatory protein StpA.* *Molecular Microbiology* **28**: 847-857.
- Dame, R.T., Wyman, C. i Goosen, N.** (2000). *H-NS mediated compaction of DNA visualised by atomic force microscopy.* *Nucleic Acids Research* **28**: 3504-3510.
- Dame, R.T., Wyman, C. i Goosen, N.** (2001). *Structural basis for preferential binding of H-NS to curved DNA.* *Biochimie* **83**: 231-234.
- Dame, R.T., Wyman, C., Wurm, R., Wagner, R., i Goosen, N.** (2002). *Structural basis for H-NS-mediated trapping of RNA polymerase in the open initiation complex at the rrnB P1.* *Journal of Biological Chemistry* **277**: 2146-2150.
- Das, J.R., Bhakoo, M., Jones, M.V. i Gilbert, P.** (1998). *Changes in the biocide susceptibility of Staphylococcus epidermis and Escherichia coli associated with rapid attachment to plastic surfaces.* *Journal of Applied Microbiology* **84**: 852-858.
- Datsenko, K.A. i Wanner, B.L.** (2000). *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products.* *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **97**: 6640-6645.
- De la Cruz, F., Carmona, M. i Juárez, A.** (1992). *The Hha protein from Escherichia coli is highly homologous to the YmoA protein from Yersinia enterocolitica.* *Molecular Microbiology* **6**: 3451-3454.
- Defez, R. i De Felice, M.** (1981). *Cryptic operon for beta-glucoside metabolism in Escherichia coli K12: genetic evidence for a regulatory protein.* *Genetics* **97**: 11-25.
- Deighan, P., Free, A. i Dorman, C.J.** 2000. *A role for the Escherichia coli H-NS-like protein StpA in OmpF porin expression through modulation of micF RNA stability.* *Molecular Microbiology* **38**: 126-139.

- Dersch P., Kneip S. i Bremer E.** (1994). *The nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS is required for the efficient adaptation of Escherichia coli K-12 to a cold environment.* Molecular and General Genetics **245**: 255-259.
- Dersch, P., Schmidt, K. i Bremer, E.** (1993). *Synthesis of the Escherichia coli K-12 nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS is subjected to growth-phase control and autoregulation.* Molecular Microbiology **8**: 875-889.
- Di Martino, P., Merieau, A., Phillips, R., Orange, N. i Hulen, C.** (2002). *Isolation of an Escherichia coli strain mutant unable to form biofilm on polystyrene and to adhere to human pneumocyte cells: involvement of tryptophanase.* Canadian Journal of Microbiology **48**: 132-137.
- Dickinson, G.M. i Bisno, A.L.** (1989). *Infections associated with indwelling devices: infections related to extravascular devices.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy **33**: 602-607.
- Dobrindt, U., Emödy, L., Gentschev, I., Goebel, W. i Hacker, J.** (2002). *Efficient expression of the α -haemolysin determinant in the uropathogenic Escherichia coli strain 536 requires the leuX-encoded $tRNA_5^{Leu}$.* Molecular Genetics and Genomics **267**: 370-379.
- Donato, G.M. i Kawula, T.H.** (1998). *Enhanced binding of altered H-NS protein to flagellar rotor protein FliG causes increased flagellar rotational speed and hypermotility in Escherichia coli.* Journal of Biological Chemistry **273**: 24030-24036.
- Dorman, C.J. i Deighan, P.** (2003). *Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria.* Current Opinion in Genetics and Development **13**: 179-184.
- Dorman, C.J. i Porter, M.E.** (1998). *The Shigella virulence gene regulatory cascade: a paradigm of bacterial gene control mechanisms.* Molecular Microbiology **29**: 677-684.
- Dorman, C.J., Hinton, J.C.D. i Free, A.** (1999). *Domain organization and oligomerization among H-NS-like nucleoid-associated proteins in bacteria.* Trends in Microbiology **7**: 124-128.
- Dorman, C.J., Ni Bhriain, N. i Higgins, C.F.** (1990). *DNA supercoiling and environmental regulation of virulence gene expression in Shigella flexneri.* Nature **344**: 789-792.
- Dower, W.J., Miller, F.J. i Ragsdale, C.W.** (1988). *High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation.* Nucleic Acids Research **16**: 6127-6145.

- Drlica K. i Rouviere-Yaniv J.** (1987). *Histonelike proteins of bacteria*. Microbiology Reviews **51**: 301-319.
- Durrenberger, M.B., Villiger, W. i Bachi, T.** (1991). *Conjugational junctions: morphology of specific contacts in conjugating Escherichia coli bacteria*. Journal of Structural Biology **107**: 146-156.
- Edman, P.** (1970). *Sequence determination*. Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics **8**: 211-255.
- Ernst, A., Reich, S. i Boger, P.** (1990). *Modification of dinitrogenase reductase in the cyanobacterium Anabaena variabilis due to C starvation and ammonia*. Journal of Bacteriology **172**: 748-755.
- Esposito, D., Petrovic, A., Harris, R., Ono, S., Eccleston, J.F., Mbabaali, A., Haq, I., Higgins, C.F., Hinton, J.C., Driscoll, P.C., i Ladbury, J.E.** (2002). *H-NS oligomerization domain structure reveals the mechanism for high order self-association of the intact protein*. Journal of Molecular Biology **324**: 841-850.
- Fahlen, T.F., Wilson, R.L., Boddicker, J.D. i Jones, B.D.** (2001). *Hha is a negative modulator of transcription of hila, the Salmonella enterica serovar Typhimurium invasion gene transcriptional activator*. Journal of Bacteriology **183**: 6620-6629.
- Falconi, M., Brandi, A., La Teana, A., Gualerzi, C.O. i Pon C.L.** (1996). *Antagonistic involvement of FIS and H-NS proteins in transcriptional control of hns expression*. Molecular Microbiology **19**: 965-975.
- Falconi, M., Colonna, B., Prosseda, G., Micheli, G. i Gualerzi, C.O.** (1998). *Thermoregulation of Shigella and escherichia coli EIEC pathogenicity. A temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of virF promoter to transcriptional repressor H-NS*. EMBO Journal **17**: 7033-7043.
- Falconi, M., Gualtieri, M.T., La Teana, A., Losso, M.A. i Pon, C.L.** (1988). *Proteins from the prokaryotic nucleoid: primary and quaternary structure of the 15-kD Escherichia coli DNA binding protein H-NS*. Molecular Microbiology **2**: 323-329.
- Falconi, M., Higgins, N.P., Spurio, R., Pon, C.L. i Gualerzi, C.O.** (1993). *Expression of the gene encoding the major bacterial nucleoid protein H-NS is subject to transcriptional auto-repression*. Molecular Microbiology **10**: 273-282.
- Falconi, M., McGovern, V., Gualerzi, G., Hillyard, D. i Higgins, N.P.** (1991). *Mutations altering chromosomal protein H-NS induce mini-Mu transposition*. New Biologist **3**: 615-625.

- Falconi, M., Prosseda, G., Giangrossi, M., Beghetto, E. i Colonna B.** (2001). *Involvement of FIS in the H-NS-mediated regulation of virF gene of Shigella and enteroinvasive Escherichia coli.* *Molecular Microbiology* **42**: 439-452.
- Felmlee T., Pellett S. i Welch R.A.** (1985). *Nucleotide sequence of an Escherichia coli chromosomal hemolysin.* *Journal of Bacteriology* **163**: 94-105.
- Finkel S.E. i Johnson R.C.** (1992). *The Fis protein: it's not just for DNA inversion anymore.* *Molecular Microbiology* **6**: 3257-3265.
- Foulds, J. i Barrett, C.** (1973). *Characterization of Escherichia coli mutants tolerant to bacteriocin JF246: Two new classes of tolerant mutants.* *Journal of Bacteriology* **116**: 885-892.
- Free, A. i Dorman, C.J.** (1995). *Coupling of Escherichia coli hns mRNA levels to DNA synthesis by autoregulation: implications for growth phase control.* *Molecular Microbiology* **18**: 101-113.
- Free, A., i Dorman, C.J.** (1997). *The Escherichia coli stpA gene is transiently expressed during growth in rich medium and is induced in minimal medium and by stress conditions.* *Journal of Bacteriology* **179**: 909-918.
- Free, A., Porter, M.E., Deighan, P., i Dorman, C.J.** (2001). *Requirement for the molecular adapter function of StpA at the Escherichia coli bgl promoter depends upon the level of truncated H-NS protein.* *Molecular Microbiology* **42**: 903-917.
- Free, A., Williams, R.M. i Dorman, C.J.** (1998). *The StpA protein functions as a molecular adapter to mediate repression of the bgl operon by truncated H-NS in Escherichia coli.* *Journal of Bacteriology* **180**: 994-997.
- Freundlich, M., Ramani, N., Mathew, E., Sirko, A. i Tsui, P.** (1992). *The role of integration host factor in gene expression in Escherichia coli.* *Review, Molecular Microbiology* **6**: 2557-2563.
- Friedrich, K., Gualerzi, C.O., Lammi, M., Losso, M.A. i Pon, C.L.** (1988). *Proteins from the prokaryotic nucleoid. Interaction of nucleic acids with the 15 kDa Escherichia coli histone-like protein H-NS.* *FEBS Letters* **229**: 197-202.
- Frost, L.A., Ippen-Ihler, K. i Skurray, R.A.** (1994). *Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor.* *Microbiology Reviews* **58**: 162-210.
- Fuller, S.R. i Kornberg, A.** (1983). *Purified dnaA protein in initiation of replication at the Escherichia coli chromosomal origin of replication.* *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **80**: 5817-5821.

- Gamer, J., Bujard, H. i Bukau, B.** (1992). *Physical interaction between heat shock proteins DnaK, DnaJ, and GrpE and the bacterial heat shock transcription factor sigma 32*. Cell. **69**: 833-842.
- Gardel, C.L. i Mekalanos, J.J.** (1994). *Regulation of cholera toxin by temperature, pH and osmolarity*. Methods in Enzymology **235**: 517-526.
- Ghosal D., Sommer H. i Saedler H.** (1979). *Nucleotide sequence of the transposable DNA-element IS2*. Nucleic Acids Research **6**: 1111-1122.
- Glaser, P., Ladant, D., Selzer, D., Pichot, F., Ullmann, A. i Daunchin, A.** (1988). *The calmodulin-sensitive adenylate-cyclase of Bordetella pertussis: cloning and expression in Escherichia coli*. Molecular Microbiology **2**: 19-30.
- Godessart, N., Muñoa, F.J., Regué, M. i Juárez, A.** (1988). *Chromosomal mutations that increase the production of a plasmid-encoded haemolysin determinant in Escherichia coli*. Journal of General Microbiology. **134**: 2779-2787.
- Goebel, W. i Hedgpeth, J.** (1982). *Cloning and functional characterization of the plasmid encoded hemolysin determinant of Escherichia coli*. Journal of Bacteriology **151**: 1290-1298.
- Goebel, W., Royer-Pokora, B., Lindenmaier, W. i Bujard, H.** (1974). *Plasmids controlling synthesis of hemolysin in Escherichia coli: molecular properties*. Journal of Bacteriology **118**: 964-973.
- Goldberg, M.D., Johnson, M., Hinton, J.C. i Williams, P.H.** (2001). *Role of the nucleoid-associated protein Fis in the regulation of virulence properties of enteropathogenic Escherichia coli*. Molecular Microbiology **41**: 549-559.
- Gonzalez-Gil, G., Bringmann, P. i Kahmann R.** (1996). *FIS is a regulator of metabolism in Escherichia coli*. Molecular Microbiology **22**: 21-29.
- Goosen, N. i van de Putte P.** (1995). *The regulation of transcription initiation by integration host factor*. Molecular Microbiology **16**: 1-7.
- Göransson, M., Sonden, B., Nilsson, P., Dagberg, B., Forsman, K., Emanuelsson, K. i Uhlin, B.E.** (1990). *Transcriptional silencing and thermoregulation of gene expression in Escherichia coli*. Nature **344**: 682-685.
- Graeme-Cook, K.A., May, G., Bremer, E. i Higgins, C.F.** (1989). *Osmotic regulation of porin expression: a role for DNA supercoiling*. Molecular Microbiology **3**: 1287-1294.

- Gray L., Baker K., Kenny B., Mackman N., Haigh R. i Holland I.B.** (1989). *A novel C-terminal signal sequence targets Escherichia coli haemolysin directly to the medium.* Journal of Cell Science Supply **11**: 45-57.
- Groisman, E.A. i Ochman, H.** (1994). *How to become a pathogen.* Trends in Microbiology **2**: 289-94.
- Hanahan, D., Jessee, J. i Bloom, F.R.** (1991). *Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria.* Methods in Enzymology. **204**: 63-113.
- Hardie, K.R., Issartel, J.P., Koronakis, E., Hughes, C., Koronakis, V.** (1991). *In vitro activation of Escherichia coli prohaemolysin to the mature membrane-targeted toxin requires HlyC and a low molecular-weight cytosolic polypeptid.* Molecular Microbiology **5**: 1669-1679.
- Harrison J.A., Pickard D., Higgins C.F., Khan A., Chatfield S.N., Ali T., Dorman C.J., Hormaeche C.E. i Dougan G.** (1994). *Role of hns in the virulence phenotype of pathogenic salmonellae.* Molecular Microbiology **13**: 133-140.
- Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., Han, C.-G., Ohtsubo, E., Nakayama, K., Murata, T., Tanaka, M., Tobe, T., Iida, T., Takami, H., Honda, T., Sasakawa, C., Ogasawara, N., Yasunaga, T., Kuhara, S., Shiba, T., Hattori, M. i Shinagawa, H.** (2001). *Complete genome sequence of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12.* DNA Research **8**: 11-22.
- Henzel, W.J., Billeci, T.M., Stults, J.T. i Wong, S.C.** (1993). *Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases.* Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA **90**: 5011-5015.
- Hess, J., Wels, W., Vogel, M. i Goebel, W.** (1986). *Nucleotide sequence of a plasmid-encoded haemolysin determinant and its comparison with a corresponding chromosomal haemolysin sequence.* FEMS Microbiology Letters **34**: 1-11.
- Higgins, C.F., Dorman, C.J., Stirling, D.A., Waddel, L., Booth, I.R., May, G. i Bremer, E.** (1988). *A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in S. typhimurium and E. coli.* Cell **52**: 569-584.
- Higgins, C.F., Hinton, J.C.D., Hulton, C.S.J., Owen-Hughes, T., Pavitt, G.D. i Seirafi, A.** (1990). *Protein HI: a role for chromatin structure in the regulation of bacterial gene expression and virulence.* Molecular Microbiology **4**: 2007-2012.

- Hill, C.S., Packman, L.C., i Thomas, J.O.** (1990). *Phosphorylation at clustered -Ser-Pro-X-Lys/Arg- motifs in sperm-specific histones H1 and H2B*. EMBO Journal **9**: 805-813.
- Hinton, J.C.D., Santos, D.S., Seirafi, A., Hulton, C.S.J., Pavitt, G.D. i Higgins, C.F.** (1992). *Expression and mutational analysis of the nucleoid-associated protein of Salmonella typhimurium*. Molecular Microbiology **6**: 2327-2337.
- Hirota, Y., Mordoh, J. i Jacob, F.** (1970). *On the process of cellular division in Escherichia coli. 3. Thermosensitive mutants of Escherichia coli altered in the process of DNA initiation*. Journal of Molecular Biology **53**: 369-387.
- Hochuli, E.** (1988). *Large-scale chromatography of recombinant proteins*. Journal of Chromatography **444**: 293-302.
- Hoe, N.P. i Goguen, J.D.** (1993). *Temperature sensing in Yersinia pestis: translation of the LcrF activator protein is thermally regulated*. Journal of Bacteriology **175**: 7901-7909.
- Hoffman, A. i Roeder, R.G.** (1991). *Purification of His-tagged proteins in non-denaturing conditions suggests a convenient method for protein interaction studies*. Nucleic Acids Research. **19**: 6337-6338.
- Holland, I.B., Mackman, N. i Nicaud, J.M.** (1986). *Secretion of proteins from bacteria*. Biotechnology **4**: 427-431.
- Hommais, F., Krin, E., Laurent-Winter, C., Soutourina, O., Malpertuy, A., Le Caer, J.P., Danchin, A. i Bertin, P.** (2001). *Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS*. Molecular Microbiology **40**: 20-36.
- Houman, F., Díaz-Torres, M.R. i Wright, A.** (1990). *Transcriptional antitermination in the bgl operon of E. coli is modulated by a specific RNA binding protein*. Cell **62**: 1153-63.
- Hromockyj A.E., Tucker S.C. i Maurelli A.T.** (1992). *Temperature regulation of Shigella virulence: identification of the repressor gene virR, an analogue of hns, and partial complementation by tyrosyl transfer RNA (tRNA^I(Tyr))*. Molecular Microbiology **6**: 2113-2124.
- Hsieh, L., Rouviere-Yaniv, J. i Drilca, K.** (1991). *Bacterial DNA supercoiling and [ATP]/[ADP] ratio: changes associated with salt shock*. Journal of Molecular Biology **219**: 443-450.

- Hulton, C.S.J., Seirafi, A., Hinton, J.C.D., Sidebotham, J.M., Waddell, L., Pavitt, G.D., Owen-Hughes, T., Spassky, A., Buc, H. i Higgins, C.F.** (1990). *Histone-like protein H1 (H-NS), DNA supercoiling, and gene expression in bacteria*. *Cell* **63**: 631-642.
- Hurme, R. i Rhen, M.** (1998). *Temperature sensing in bacterial gene regulation- what it all boils down to*. *Molecular Microbiology* **30**: 1-6.
- Hurme, R., Berndt, K.D., Normark, S.J. i Rhen, M.** (1997). *A proteinaceous gene regulatory thermometer in Salmonella*. *Cell* **90**: 55-64.
- Issartel, J.P., Koronakis, V. i Hughes, C.** (1991). *Activation of E.coli prohaemolysin to the mature toxin by acyl carrier protein-dependent fatty acylation*. *Nature* **351**: 759-761.
- Jin, Q., Yuan, Z.H., Xu, J.G., Wang, Y., Shen, Y., Lu, W.C., Wang, J.H., Liu, H., Yang, J., Yang, F., Qu, D., Zhang, X.B., Zhang, J.Y., Yang, G.W., Wu, H.T., Dong, J., Sun, L.L., Xue, Y., Zhao, A.L., Gao, Y.S., Zhu, J.P., Kan, B., Chen, S.X., Yao, Z.J., He, B.K., Chen, R.S., Ma, D.L., Qiang, B.Q., Wen, Y.M., Hou, Y.D. i Yu, J.** (2002). *Genome sequence of Shigella flexneri 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of Escherichia coli K12 and O157*. *Nucleic Acids Research* **30**: 4432-4441.
- Johansson, J., Balsalobre, C., Wang, S.Y., Urbonaviciene, J., Jin, D.J., Sondén, B. i Uhlin, B.E.** (2000). *Nucleoid proteins stimulate stringently controlled bacterial promoters: A link between the cAMP-CRP and the (p)ppGpp regulons in Escherichia coli*. *Cell* **102**: 475-485.
- Johansson, J., Dagberg, B., Richet, E. i Uhlin, B.E.** (1998). *H-NS and StpA proteins stimulate expression of maltose regulon in Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **180**: 6117-6125.
- Johansson, J., Eriksson, S., Sondén, B., Wai, S.N. i Uhlin, B.E.** (2001). *Heteromeric interactions among-nucleoid-associated bacterial proteins: localization of StpA-stabilizing regions in H-NS of Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **183**: 2343-2347.
- Johansson, J., i Uhlin, B.E.** (1999). *Differential protease-mediated turnover of H-NS and StpA revealed by a mutation altering protein stability and stationary-phase survival of Escherichia coli*. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA* **96**: 10776-10781.

- Johnson, R.C. i Reznikoff, W.S.** (1984). *Copy number control of Tn5 transposition*. Genetics **107**: 9-18.
- Joiner, K.A.** (1988). *Complement evasion by bacteria and parasites*. Annual Review of Microbiology **42**: 201-230.
- Jordi, B.J.A.M., Fielder, A.E., Burns, C.M., Hinton, J.C.D., Dover, N., Ussery, D.W. i Higgins, C.F.** (1997). *DNA binding is not sufficient for H-NS-mediated repression of proU expression*. The Journal of Biological Chemistry **272**: 12083-12090.
- Juárez, A., Hughes, C., Vogel, M. i Goebel, W.** (1984). *Expression and regulation of the plasmid-encoded haemolysin determinant of Escherichia coli*. Molecular and General Genetics. **197**: 196-203.
- Jubete, Y., Zabala, J.C., Juárez, A. i De la Cruz, F.** (1995). *hlyM, a transcriptional silencer downstream of the promoter in the hly operon of Escherichia coli*. Journal of Bacteriology **177**: 242-246.
- Kajitani, M. i Ishihama, A.** (1991). *Identification and sequence determination of the host factor gene for bacteriophage Q β* . Nucleic Acids Research **19**: 1063-1066.
- Kellenberger, E.** (1990). *Intracellular organization of the bacterial genome*. The bacterial chromosome. Chapter 12, pg: 173-186. Ed. K. Drlica and M. Riley. ASM.
- Kim, S.R. i Komano, T.** (1992) *Nucleotide sequence of the R721 shufflon*. Journal of Bacteriology **174**: 7053-7058.
- Klimke, W.A. i Frost, L.S.** (1998). *Genetic analysis of the role of the transfer gene, traN, of the F and R100-1 plasmids in mating pair stabilization during conjugation*. Journal of Bacteriology **180**: 4036-4043.
- Koronakis, V., Cross, M. i Hughes, C.** (1988). *Expression of the Escherichia coli hemolysin secretion gene hlyB involves transcript anti-terminator within the hly operon*. Nucleic Acids Research **16**: 4789-4800.
- Koronakis, V., Koronakis, E. i Hughes, C.** (1989). *Isolation and analysis of the C-terminal signal directing export of Escherichia coli hemolysin protein across both bacterial membranes*. EMBO Journal **8**: 595-605.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.K., Codani, J.J., Connerton, I.F., Danchin, A, et al.** (1997). *The complete genome sequence of the gram-positive bacterium Bacillus subtilis*. Nature **390**: 886-887.

- La Teana, A., Brandi, A., Falconi, M., Spurio, R., Pon, C.L., i Gualerzi, C.O.** (1991). *Identification of a cold shock transcriptional enhancer of the Escherichia coli gene encoding nucleoid protein H-NS*. Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA **88**: 10907-10911.
- La Teana, A., Falconi, M., Scarlato, V., Lammi, M., Pon, C.L.** (1989). *Characterization of the structural genes for the DNA-binding protein H-NS in Enterobacteriaceae*. FEBS Letters. **13**: 34-38.
- Laemmli, U.K.** (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of head of the bacteriophage T4*. Nature **227** (259): 680-685.
- Larsen, S.H., Reader, R.W., Kort, E.N., Tso, W.W. i Adler, J.** (1974). *Change in direction of flagellar rotation is the basis of the chemotactic response in Escherichia coli*. Nature **249**: 74-77.
- Laurent-Winter, C., Ngo, S., Danchin, A. i Bertin, P.** (1997). *Role of Escherichia coli histone-like nucleoid-structuring protein in bacterial metabolism and stress response. Identification of targets by two-dimensional electrophoresis*. European Journal of Biochemistry **244**: 767-773.
- Lazzaroni, J.C. i Portalier, R.** (1992). *The excC gene of Escherichia coli K-12 required for cell envelope integrity encodes the peptidoglycan-associated lipoprotein*. Molecular Microbiology **6**: 735-742.
- Lederberg, J.** (1951). *Genetic studies with bacteria*. p. 263-289. In L.C. Dunn (ed), Genetics in the 20th Century. Macmillan, New York.
- Lejeune, P. i Danchin, A.** (1990). *Mutations in the bglY gene increase the frequency of spontaneous deletions in Escherichia coli K12*. Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA **87**: 360-363.
- Lewis, D.E., Geanakopoulos, M. i Adhya S.** (1999). *Role of HU and DNA supercoiling in transcription repression: specialized nucleoprotein repression complex at gal promoters in Escherichia coli*. Molecular Microbiology **31**: 451-461.
- Lindler, L.E. i Tall, B.D.** (1993). *Yersinia pestis pH 6 antigen forms fimbriae and is induced by intracellular association with macrophages*. Molecular microbiology **8**: 311-324.
- Lindler, L.E., Klempner, M.S. i Straley, S.C.** (1990). *Yersinia pestis pH 6 antigen: genetic, biochemical and virulence characterization of a protein involved in the pathogenesis of bubonic plague*. Infection and Immunity **58**: 2569-2577.

- Liu, Q. i Richardson, C.** (1993). *Gene 5.5 protein of bacteriophage T7 inhibits the nucleoid protein H-NS of Escherichia coli*. Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA **90**: 1761-1765.
- Lucht, J.M., Dersch, P., Kempf, B. i Bremer, E.** (1994). *Interactions of the nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS with the regulatory region of the osmotically controlled proU operon of Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry **269**: 6578-6586.
- Luck, S.N., Turner, S.A., Rajakumar, K., Sakellaris, H. i Adler, B.** (2001). *Ferric dicitrate transport system (Fec) of Shigella flexneri 2a YSH6000 is encoded on a novel pathogenicity island carrying multiple antibiotic resistance genes*. Infection and Immunity **69**: 6012-6021.
- Lupas, A.** (1996). *Coiled coils: new structures and new functions*. Trends in Biochemistry Science **21**: 375-382.
- Madrid, C., Nieto, J.M. i Juárez, A.** (2002b). *Role of the Hha/YmoA family of proteins in the thermoregulation of the expression of virulence factors*. International Journal of Medical Microbiology **291**: 425-432.
- Madrid, C., Nieto, J.M., Paytubi, S., Falconi, F., Gualerzi, C.O. i Juárez, A.** (2002a). *Temperature- and H-NS-Dependent regulation of a plasmid-encoded virulence operon expressing Escherichia coli hemolysin*. Journal of Bacteriology **184**: 5058-5066.
- Mahan, M.J., Slauch, J.M. i Mekalanos, J.** (1996). *Environmental regulation of virulence gene expression in Escherichia, Salmonella, and Shigella spp.* A: F. C. Neidhardt et al., ed., *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*, 2nd ed., vol. 2. Washington DC: ASM Press. Pàg: 2803-2815.
- Marshal, D.G., Sheenan, B.J. i Dorman, C.J.** (1999). *A role for the leucine-responsive regulator protein and integration host factor in the regulation of the Salmonella plasmid virulence (spv) locus in Salmonella typhimurium*. Molecular Microbiology **34**: 134-145.
- Marykwas, D.L., Schmidt, S.A. i Berg, H.C.** (1996). *Interacting components of the flagellar motor of Escherichia coli revealed by two-hybrid system in yeast*. Journal of Molecular Biology **256**: 564-576.
- Maurelli, A.T. i Sansonetti, P.J.** (1988). *Identification of a chromosomal gene controlling temperature regulated expression of Shigella virulence*. Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA **85**: 2820-2824.

- McClelland, M., Sanderson, K.E., Spieth, J., Clifton, S.W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., Hou, S., Layman, D., Leonard, S., Nguyen, C., Scott, K., Holmes, A., Grewal, N., Mulvaney, E., Ryan, E., Sun, H., Florea, L., Miller, W., Stoneking, T., Nhan, M., Waterston, R. i Wilson, R.K.** (2001). *Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2*. *Nature*. **413**: 852-856.
- McFall, E. i Newman, E.B.** (1996). *Amino acids as carbon sources*. A: F. C. Neidhardt et al., ed., *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*, 2nd ed., vol. 2. Washington DC: ASM Press.
- McLeod, S.M. i Johnson, R.C.** (2001). *Control of transcription by nucleoid proteins*. *Current Opinion in Microbiology* **4**: 152-159.
- Menestrina G., Moser C., Pellet S. i Welch R.** (1994). *Pore-formation by Escherichia coli hemolysin (HlyA) and other members of the RTX toxins family*. *Toxicology* **87**: 249-267.
- Mikulskis, A.V. i Cornelis, G.** (1994). *A new class of proteins regulating gene expression in enterobacteria*. *Molecular Microbiology* **11**: 77-86.
- Miller, J.H.** (1992). *A Short Course in Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Mojica F.J. i Higgins, C.F.** (1997). *In vivo supercoiling of plasmid and chromosomal DNA in Escherichia coli hns mutant*. *Journal of Bacteriology* **179**: 3528-3533.
- Morona, R., Klose, M. i Henning, U.** (1984). *Escherichia coli K-12 outer membrane protein (OmpA) as a bacteriophage receptor: Analysis of mutant genes expressing altered proteins*. *Journal of Bacteriology* **159**: 570-578.
- Morschhauser, J., Uhlin, B.E. i Hacker, J.** (1993). *Transcriptional analysis and regulation of the sfa determinant coding for S fimbriae of pathogenic Escherichia coli strains*. *Molecular and General Genetics* **238**: 97-105.
- Mouriño, M., Balsalobre, C., Madrid, C., Nieto, J.M., Prenafreta, A., Muñoa, F.J. i Juárez, A.** (1998). *Osmolarity modulates the expression of the Hha protein from Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* **160**: 225-229.
- Mouriño, M., Madrid, C., Balsalobre, C., Prenafreta, A., Muñoa, F.J., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J.E. i Juárez, A.** (1996). *The Hha protein as a modulator of expression of virulence factors in Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **64**: 2881-2884.

- Mouriño, M., Muñoa, F.J., Balsalobre, C., Díaz, P., Madrid, C. i Juárez, A.** (1994). *Environmental regulation of the α -hemolysin expression in Escherichia coli*. Microbial Pathogenesis **16**: 249-259.
- Muffler, A., Fischer, D., Altuvia, S., Storz, G. i Hengge-Aronis, R.** (1996). *The RNA-binding protein HF-I, known as a host factor for phage Q β RNA replication, is essential for rpoS translation in Escherichia coli*. Genes and Development **10**: 1143-1151.
- Mukerji, M. i Mahadevan, S.** (1997). *Characterization of the negative elements involved in silencing the bgl operon of Escherichia coli: possible roles for DNA gyrase, H-NS, and CRP-cAMP in regulation*. Molecular Microbiology **24**: 617-627.
- Müller M.M., Vianney A., Lazzaroni J.C., Webster R.E. i Portalier R.** (1993). *Membrane topology of the Escherichia coli TolR protein required for cell envelope integrity*. Journal of Bacteriology **175**: 6059-6061.
- Nataro, J.P., Yikang, D. i Walter, K.** (1994). *AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative Escherichia coli*. Journal of Bacteriology **176**: 4691-4699.
- Nicaud, J.M., Mackman, N., Gray, L. i Holland, I.B.** (1985). *Characterization of HlyC and mechanism of activation and secretion of haemolysin from Escherichia coli*. FEBS Letters **187**: 339-344.
- Nieto, J.M. i Juárez, A.** (1996). *A new member of the Hha/YmoA class of bacterial regulators in plasmid R100 of Escherichia coli?* Molecular Microbiology **19**: 407.
- Nieto, J.M. i Juárez, A.** (1999). *The putative Orf4 of Broad-Host-Range conjugative plasmid R446 could be related to the H-NS family of bacterial nucleoid-associated proteins*. Plasmid **41**: 125-127.
- Nieto, J.M., Bailey, M.J.A., Hughes, C. i Koronakis, V.** (1996). *Suppression of transcription polarity in the escherichia coli haemolysin operon by a short upstream element shared by polysaccharide and DNA transfer determinants*. Molecular Microbiology **19**: 705-713.
- Nieto, J.M., Carmona, M., Bolland, S., Jubete, Y., De la Cruz, F. i Juárez, A.** (1991). *The hha gene modulates haemolysin expression in Escherichia coli*. Molecular Microbiology **5**: 1285-1293.
- Nieto, J.M., Carmona, M., Muñoa, P., Díaz, P., Madrid, C., Badenas, C., Balsalobre, C., Mouriño, M. i Juárez, A.** (1994). *The Hha protein of Escherichia coli and its role modulating gene expression*. Current Topics in Molecular Genetics **2**: 65-74.

- Nieto, J.M., Madrid, C., Miquelay, E., Parra, J.L., Rodriguez, S. i Juárez, A.** (2002). *Evidence for direct protein-protein interaction between members of the enterobacterial Hha/YmoA and H-NS families of proteins.* Journal of Bacteriology. **184**: 629-635.
- Nieto, J.M., Madrid, C., Prenafreta, A., Miquelay, E., Balsalobre, C., Carrascal, M. i Juárez, A.** (2000). *Expression of the hemolysin operon in Escherichia coli is modulated by a nucleoid-protein complex that includes the proteins Hha and H-NS.* Molecular and General Genetics **263**: 349-358.
- Nieto, J.M., Prenafeta, A., Miquelay, E., Torrades, S. i Juarez, A.** (1998). *Sequence, identification and effect on conjugation of the rmoA gene of plasmid R100-1.* FEMS Microbiology Letters **169**: 59-66.
- Nieto, J.M., Tomas, J. i Juarez, A.** (1987). *Secretion of an Aeromonas hydrophila aerolysin by a mutant strain of Escherichia coli.* FEMS Microbiology Letters **48**: 413-417.
- Nikaido, H.** (1996). Outer membrane. A Escherichia coli and Salmonella, cellular and Molecular Biology. Second edition. Neidhart, F.C. *et al.*, ed. Volum 2, 29-47.
- Ninfa, A.J.** (1991). *Protein phosphorylation and the regulation of cellular processes by the homologous two-component regulatory systems of bacteria.* A Genetic Engineering: Principles and Methods. Setlow, J.K. (ed.). New York: Plenum Press, pàg. 39-72.
- Noegel, A., Rdest, U. i Goebel, W.** (1981). *Determinations of the functions of hemolytic plasmid pHly152 of Escherichia coli.* Journal of Bacteriology **145**: 233-247.
- Nogueira, T. i Springer, M.** (2000). *Post-transcriptional control by global regulators of gene expression in bacteria.* Current Opinion in Microbiology **3**: 154-158.
- Norton, V.G., Imai, B.S., Yau, P. i Bradbury, E.M.** (1989). *Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change.* Cell **57**: 449-457.
- Nye M.B., Pfau J.D., Skorupski K. i Taylor R.K.** (2000). *Vibrio cholerae H-NS silences virulence gene expression at multiple steps in the ToxR regulatory cascade.* Journal of Bacteriology **182**: 4295-4303.
- Oberto J. i Rouviere-Yaniv J.** (1996). *Serratia marcescens contains a heterodimeric HU protein like Escherichia coli and Salmonella typhimurium.* Journal of Bacteriology **178**: 293-297.
- Ohba, A., Mizushima, T., Katayama, T. i Sekimizu, K.** (1997). *Amounts of proteins altered by mutations in the dnaA gene of Escherichia coli.* FEBS Letters **404**: 125-128.

- Olsén, A., Arnqvist, A., Hammar, M., Sukupolvi, S. i Normark, S. (1993). *The RpoS sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of csgA, the subunit gene of fibronectin-binding curli in Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **7**: 523-536.
- Olsén, P.B., Schembri, M.A., Gally, D.L. i Klemm, P. (1998). *Differential temperature modulation by H-NS of the fimB and fimE recombinase genes which control the orientation of the type 1 fimbrial phase switch*. *FEMS Microbiology Letters* **162**: 17-23.
- Owen-Hughes, T.A., Pavitt, G.D., Santos, D.S., Sidebotham, J.M., Hulton, C.S.J., Hinton, J.C.D. i Higgins, C.F. (1992). *The chromatin-associated protein H-NS interacts with curved DNA to influence DNA topology and gene expression*. *Cell* **71**: 255-265.
- Packman, L.C. (1993). *Protein chemical methods for molecular biologists*. *Methods in Molecular Cell Biology* **4**: 189-198.
- Park, S.F., Stirling, D.A., Hulton, C.S., Booth, I.R., Higgins, C.F., i Stewart, G.S. (1989). *A novel, non-invasive promoter probe vector: cloning of the osmoregulated proU promoter of Escherichia coli K12*. *Molecular Microbiology* **3**: 1011-1023.
- Parkhill, J., Dougan, G., James, K.D., Thomson, N.R., Pickard, D., Wain, J., Churcher, C., Mungall, K.L., Bentley, S.D., Holden, M.T.G., Sebaihia, M., Baker, S., Basham, D., Brooks, K., Chillingworth, T., Connerton, P., Cronin, A., Davis, P., Davies, R.M., Dowd, L., White, N., Farrar, J., Feltwell, T., Hamlin, N., Haque, A., Hien, T.T., Holroyd, S., Jagels, K., Krogh, A., Larsen, T.S., Leather, S., Moule, S., O'Gaora, P., Parry, C., Quail, M., Rutherford, K., Simmonds, M., Skelton, J., Stevens, K., Whitehead, S. i Barrell, B.G. (2001). *Complete genome sequence of a multiple drug resistant Salmonella enterica serovar Typhi CT18*. *Nature* **413**: 848-852.
- Perna, N.T., Plunkett, G.I.I.I., Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., Mayhew, G.F., Evans, P.S., Gregor, J., Kirkpatrick, H.A., Posfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E.J., Davis, N.W., Lim, A., Dimalanta, E.T., Potamousis, K., Apodaca, J., Anantharaman, T.S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D.C., Welch, R.A. i Blattner, F.R. (2001). *Genome sequence of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7*. *Nature* **409**: 529-533.

- Pettijohn, D.E.** (1996). *The nucleoid*. A: F. C. Neidhardt et al., ed., *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2nd ed., vol. 2. Washington DC: ASM Press. Pàg: 158-166.
- Pichoff, S., Alibaud, L., Guedant, A., Castanie, M.P. i Bouche, J.P.** (1998). *An Escherichia coli gene (yaeO) suppresses temperature-sensitive mutations in essential genes by modulating Rho-dependent transcription termination*. Molecular Microbiology **29**: 859-869.
- Plaskon, R.R. i Wartell, R.M.** (1987). *Sequence distributions associated with DNA curvature are found upstream of strong E. coli promoters*. Nucleic Acids Research **15**: 785-796.
- Porter, M.E. i Dorman, C.J.** (1997). *Differential regulation of the plasmid-encoded genes in the Shigella flexneri virulence regulon*. Molecular and General Genetics **256**: 93-103.
- Prasad, I. i Schaeffer, S.** (1974). *Regulation of the β -glucoside system in Escherichia coli K12*. Journal of Bacteriology **120**: 638-650.
- Pratt, L.A. i Kolter, R.** (1998). *Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili*. Molecular Microbiology **30**: 285-93.
- Preston, K.E., Radomski, C.C. and Venezia, R.A.** (2000). *Nucleotide sequence of a 7-kb fragment of pACM1 encoding an IncM DNA primase and other putative proteins associated with conjugation*. Plasmid **44**: 12-23.
- Pruss, G.J. i Drlica, K.** (1989). *DNA supercoiling and prokaryotic transcription*. Review, Cell **56**: 521-523.
- Renzoni, D., Esposito, D., Pfuhl, M., Hinton, J.C.D., Higgins, C.F., Driscoll, P.C. i Ladbury, J.E.** (2001). *Structural characterization of the N-terminal oligomerization domain of the bacterial chromatin-structuring protein, H-NS*. Journal of Molecular Biology **306**: 1127-1137.
- Rimsky, S., Zuber, F., Buckle, M. i Buc, H.** (2001). *A molecular mechanism for the repression of transcription by the H-NS protein*. Molecular Microbiology **42**: 1311-1323.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. i Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

- Schägger, H. i von Jagow, G.** (1987). *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa*. Analytical Biochemistry. **166**: 368-379.
- Schmoll, T., Ott, M., Oudega, B. i Hacker, J.** (1990). *Use of a wild-type gene fusion to determine the influence of environmental conditions of the *S fimbrial adhesin* in an *Escherichia coli* pathogen*. Journal of Bacteriology **172**: 5103-5111.
- Schneider, R., Lurz, R., Luder, G., Tolksdorf, C., Travers, A. i Muskhelishvili, G.** (2001). *An architectural role of the *Escherichia coli* chromatin protein FIS in organising DNA*. Nucleic Acids Research **29**: 5107-5114.
- Schneider, R., Travers, A., Kutateladze, T. i Muskhelishvili, G.** (1999). *A DNA architectural protein couples cellular physiology and DNA topology in *Escherichia coli**. Molecular Microbiology **34**: 953-964.
- Schnetz, K., Toloczyki, C. i Rak, B.** (1987). *Beta-glucoside (*bgl*) operon of *Escherichia coli* K12: nucleotide sequence, genetic organization and possible evolutionary relationship to regulatory component of two *Bacillus subtilis* genes*. Journal of Bacteriology **169**: 2579-2590.
- Schröder, O. i Wagner, R.** (2002). *The bacterial regulatory protein H-NS- A versatile modulator of nucleic acid structures*. Biological Chemistry **383**: 945-960.
- Sherburne, C.K., Lawley, T.D., Gilmour, M.W., Blattenr, F.R., Burland, V., Grotbeck, E., Rose, D.J. i Taylor, D.E.** (2000). *The complete DNA sequence and analysis of the R27, a large IncHI plasmid from *Salmonella typhi* that is temperature sensitive for transfer*. Nucleic Acids Research **28**: 2177-2186.
- Sheikh, J., Hicks, S., Dall'Agnol, M., Phillips, A.D. i Nataro, J.P.** (2001). *Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli**. Molecular Microbiology **41**: 983-997.
- Shi, X. i Bennett, G.N.** (1994). *Plasmids bearing *hfq* and the *hns*-like gene *stpA* complement *hns* mutants in modulating arginine decarboxilase gene expression in *Escherichia coli**. Journal of Bacteriology **176**: 6769-6775.
- Shimamura, T., Watanabe, S. i Sasaki, S.** (1985). *Enhancement of enterotoxin production by carbon dioxide in *Vibrio cholerae**. Infection and Immunity **49**: 455-6.
- Shindo, H., Iwaki, T., Ieda, R., Kurumizaka, H., Ueguchi, C., Mizuno, T., Morikawa, S., Nakamura, H. i Kuboniwa, H.** (1995). *Solution structure of the DNA binding domain of a nucleoid-associated protein, H-NS, from *Escherichia coli**. FEBS Letters **360**: 125-131.

- Shindo, H., Ohnuki, A., Ginba, H., Katoh, E., Ueguchi, C., Mizuno, T. i Yamazaki, T.** (1999). *Identification of the DNA binding surface of H-NS protein from Escherichia coli by heteronuclear NMR spectroscopy*. FEBS Letters **455**: 63-69.
- Smith, H.** (1968). *Biochemical challenge of microbial pathogenicity*. Bacteriological Reviews **32**: 164-184.
- Smyth, C. P., Lundbäck, T., Renzoni, D., Siligardi, G., Beavil, R., Layton, M., Sidebotham, J.M., Hinton, J.C.D., Driscoll, P.C., Higgins, C.F. i Ladbury, J.E.** (2000). *Oligomerization of the chromatin-structuring protein H-NS*. Molecular Microbiology **36**: 962-972.
- Snell, E.E.** (1975). *Tryptophanase: structure, catalytic activities and mechanisms of action*. Advances in Enzymology **42**: 287-333.
- Somero, G.N.** (1986). *Protons, osmolytes, and fitness of internal milieu for protein function*. American Journal of Physiology **251**: 197-213.
- Sondén, B. i Uhlin, B.E.** (1996). *Coordinated and differential expression of histone-like proteins in Escherichia coli: regulation and function of the H-NS analog StpA*. EMBO J. **15**: 4970-4980.
- Sonnenfield, J.M., Burns, C.M., Higgins, C.F. i Hinton, J.C.** (2001). *The nucleoid-associated protein StpA binds curved DNA, has a greater DNA-binding affinity than H-NS and is present in significant levels in hns mutants*. Biochimie **83**: 243-249.
- Spassky, A., Rimsky, S., Garreau, H. i Buc, H.** (1984). *H1a, an E. coli DNA-binding protein which accumulates in stationary phase, strongly compacts DNA in vitro*. Nucleic Acids Research **12**: 5321-5340.
- Spurio, R., Dürrenberger, M., Falconi, M., La Teana, A., Pon, C.L. i Gualerzi, C.O.** (1992). *Lethal overproduction of the escherichia coli nucleoid protein H-NS: ultramicroscopic and molecular autopsy*. Molecular and General Genetics **231**: 201-211.
- Spurio, R., Falconi, M., Brandi, A., Pon, C.L. i Gualerzi, C.O.** (1997). *The oligomeric structure of nucleoid protein H-NS is necessary for recognition of intrinsically curved DNA and for DNA bending*. EMBO Journal **16**: 1795-1805.
- Steck, T.R., Franco, R.J., Wang, J.Y. i Drlica, K.** (1993). *Topoisomerase mutations affect the relative abundance of many Escherichia coli proteins*. Molecular Microbiology **10**: 473-481.

- Stojiljkovic, I., Braumler, A.J. i Hantke, K.** (1994). *Fur regulon in gram-negative bacteria. Identification and characterization of new iron-regulated Escherichia coli genes by a fur titration assay.* Journal of Molecular Biology **236**: 531-545.
- Strathdee, C.A. i Lo R.Y.C.** (1987). *Extensive homology between the leucotoxin of Pasteurella hemolytica A1 and the α -hemolysin of Escherichia coli.* Infection and Immunity **155**: 3233-3236.
- Studier, F.W. i Moffatt, B.A.** (1986). *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.* Journal of Molecular Biology **189**: 113-130.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. i Dubendorff, J.W.** (1990). *Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes.* Methods in Enzymology **185**: 60-89.
- Suttorp, N., Floer, B., Schnittler, H., Seeger, W. i Bhakdi, S.** (1990). *Effects of Escherichia coli haemolysin on endothelial cell function.* Infection and Immunity **58**: 3796-3801.
- Tendeng C., Badaut C., Krin E., Gounon P., Ngo S., Danchin A., Rimsky S. i Bertin P.** (2000). *Isolation and characterization of vicH, encoding a new pleiotropic regulator in Vibrio cholerae.* Journal of Bacteriology **182**: 2026-2032.
- Tendeng, C. i Bertin, P.N.** (2003). *H-NS in Gram-negative bacteria: a family of multifaceted proteins.* TRENDS in Microbiology **11**: 511-518
- Thompson, J.F., Moitoso de Vargas, L., Koch, C., Kahmann, R. i Landy, A.** (1987). *Cellular factors couple recombination with growth phase: characterization of a new component in the lambda site-specific recombination pathway.* Cell **50**: 901-908.
- Tietze, E. i Tschäpe, H.** (1994). *Temperature-dependent expression of conjugation pili by IncM plasmid-harboring bacteria: identification of plasmid-encoded regulatory functions.* Journal of Basic Microbiology **34**: 105-116.
- Tippner, D. i Wagner, R.** (1995). *Fluorescence analysis of the Escherichia coli transcription regulator H-NS reveals two distinguishable complexes dependent on binding to specific or nonspecific DNA sites.* The Journal of Biological Chemistry **270**:22243-22247.
- Tobe T., Yoshikawa M., Mizuno T. i Sasakawa C.** (1993). *Transcriptional control of the invasion regulatory gene virB of Shigella flexneri: activation by virF and repression by H-NS.* Journal of Bacteriology **175**: 6142-6149.

- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.** (1979). *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications*. Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA. **76**: 4350-4354.
- Trachman, J.D. i Maas, W.K.** (1998). *Temperature regulation of heat-labile enterotoxin (LT) synthesis in Escherichia coli is mediated by an interaction of H-NS protein with the LT A-subunit DNA*. Journal of Bacteriology **180**: 3715-3718.
- Tupper, A.E., Owen-Hughes, T.A., Ussery, D.W., Santos, D.S., Ferguson, D.J.P., Sidebotham, J.M., Hinton, J.C.D. i Higgins, C.F.** (1994). *The chromatin-associated protein H-NS alters DNA topology in vitro*. EMBO Journal **13**: 258-268.
- Ueguchi, C. i Mizuno, T.** (1993). *The Escherichia coli nucleoid protein H-NS functions directly as a transcriptional repressor*. EMBO Journal **12**: 1039-1046.
- Ueguchi, C., Kakeda, M. i Mizuno, T.** (1993). *Autoregulatory expression of the Escherichia coli hns gene encoding a nucleoid protein: H-NS functions as a repressor of its own transcription*. Molecular and General Genetics **236**: 171-178.
- Ueguchi, C., Seto, C., Suzuki, T. i Mizuno, T.** (1997). *Clarification of the dimerization domain and its functional significance for the Escherichia coli nucleoid protein H-NS*. Journal of Molecular Biology. **274**: 145-151.
- Ueguchi, C., Suzuki, T., Yoshida, T., Tanaka, K.I. i Mizuno, T.** (1996). *Systematic mutational analysis revealing the functional domain organization of Escherichia coli nucleoid protein H-NS*. Journal of Molecular Biology **263**: 149-162.
- Ussery, D., Larsen, T.S., Wilkes, K.T., Friis, C., Worning, P., Krogh, A. i Brunak, S.** (2001). *Genome organisation and chromatin structure in Escherichia coli*. Biochimie **83**: 201-212.
- Ussery, D.W., Hinton, J.C.D., Jordi, B.J.A.M., Granum, P.E., Seirafi, A., Stephen, R.J., Tupper, A.E., Berridge, G., Sidebotham, J.M. i Higgins, C.F.** (1994). *The chromatin-associated protein H-NS*. Biochimie **76**: 968-980.
- Varhavsky, A.J., Nedospasov, A., Bakayev, V.V., Bakayeva, T.G. i Georgiev, G.** (1977). *Histone-like proteins in the purified Escherichia coli deoxyribonucleoprotein*. Nucleic Acids Research **4**: 2725-2745.
- Venkatesan, M.M., Goldberg, M.B., Rose, D.J., Grotbeck, E.J., Burland, V. i Blattner, F.R.** (2001). *Complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of Shigella flexnerii*. Infection and Immunity **69**: 3271-3285.

- Vogel, M. Hess, J., Then, I, Juárez, A. i Goebel, W.** (1988). *Characterization of a sequence (hlyR) which enhances synthesis and secretion of hemolysin in Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics* **212**: 76-84.
- Wada, M., Kano, Y., Ogawa, T., Okazaki, T. i Imamoto, F.** (1988). *Construction and characterization of the deletion mutant of hupA and hupB genes in Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **204**: 581-591.
- Wandersman, C. i Delepelaire, P.** (1990). *TolC, an Escherichia coli outer membrane protein required for hemolysin secretion*. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA* **87**: 4776-4780.
- Wang, D., Ding, X. i Rather, P.N.** (2001). *Indole can act as an extracellular signal in Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **183**: 4210-4216.
- Weinstein, D.L., Holmes, R.K. i O'Brien, D.** (1988). *Effects of iron and temperature on Shiga-like toxin I production by Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **56**: 106-111.
- Welch RA, Dellinger EP, Minshew B i Falkow S.** (1981). *Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal E. coli infections*. *Nature* **294**: 665-667.
- Welch, R.A. i Pellett, S.** (1988). *Transcriptional organization of the Escherichia coli hemolysin genes*. *Journal of Bacteriology* **170**: 1622-1630.
- Welch, R.A., Burland, V., Plunkett, G.D. III, Redford, P., Roesch, P., Rasko, D.A., Buckles, E.L., Liou, S.-R., Boutin, A., Hackett, J., Stroud, D., Mayhew, G.F., Rose, D.J., Zhou, S., Schwartz, D.C., Perna, N.T., Mobley, H.L.T., Sonnenberg, M.S. i Blattner, F.R.** (2002). *Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic Escherichia coli*. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA* **99**: 17020-17024.
- Werel, W., Schicker, P. i Heumann, H.** (1991). *Flexibility of the DNA enhances promoter affinity of Escherichia coli*. *EMBO Journal* **10**: 2589-2594.
- White-Ziegler C.A., Angus Hill M.L., Braaten B.A., van der Woude M.W. i Low D.A.** (1998). *Thermoregulation of Escherichia coli pap transcription: H-NS is a temperature-dependent DNA methylation blocking factor*. *Molecular Microbiology* **28**: 1121-1137.
- Williams, R.M. i Rimsky, S.** (1997) *Molecular aspects of the E.coli nucleoid protein H-NS: a central controller of gene regulatory networks*. *FEMS Microbiology Letters* **156**:175-185.

- Williams, R.M., Rimsky, S. i Buc, H.** (1996). *Probing the structure, function, and interactions of the Escherichia coli H-NS and StpA proteins by using dominant negative derivatives.* Journal of Bacteriology **178**: 4335-4343.
- Wilson, J.W., Schurr, M.J., LeBlanc, C.L., Ramamurthy, R., Buchanan, K.L. i Nickerson, C.A.** (2002). *Mechanisms of bacterial pathogenicity.* Postgraduate Medical Journal **78**: 216-224.
- Wilson, R.L., Libby, S.J., Freet, A.M., Boddicker, J.D., Fahlen, T.F. i Jones, B.D.** (2001). *Fis, a DNA nucleoid-associated protein, is involved in Salmonella typhimurium SPI-1 invasion gene expression.* Molecular Microbiology **39**: 79-88.
- Wooldridge, K.G. i Williams, P.H.** (1993). *Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria.* FEMS Microbiology Reviews **12**: 325-348.
- Wurgler-Murphy, S.M. i Saito, H.** (1997). *Two-component transducers and MAPK cascades.* Trends in Biochemistry Science **22**: 172-176.
- Xu, J. i Johnson, R.C.** (1995). *Identification of genes negatively regulated by Fis: Fis and RpoS comodulate growth-phase dependent gene expression in Escherichia coli.* Journal of Bacteriology **177**: 938-947.
- Yamada, H., Muramatsu, S. i Sasakawa, C.** (1990). *An Escherichia coli protein that preferentially binds to sharply curved DNA.* Journal of Biochemistry **108**: 420-425.
- Yamada, H., Yoshida, T., Tanaka, K., Sasakawa, C. i Mizuno, T.** (1991). *Molecular analysis of the Escherichia coli hns gene encoding a DNA-binding protein, which preferentially recognizes curved DNA sequences.* Molecular and General Genetics **230**: 332-336.
- Yamashino, T., Ueguchi, C. i Mizuno, T.** 1995. *Quantitative control of the stationary phase-specific sigma factor, sigma S, in Escherichia coli: involvement of the nucleoid protein H-NS.* EMBO Journal **14**: 594-602.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. i Messing, J.** (1985). *Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.* Gene **33**: 103-119.
- Yee A., Chang X., Pineda-Lucena A., Wu B., Semesi A., Le B., Ramelot T., Lee G.M., Bhattacharyya S., Gutierrez P., Denisov A., Lee CH., Cort J.R., Kozlov G., Liao J., Finak G., Chen L., Wishart D., Lee W., McIntosh L.P., Gehring K., Kennedy M.A., Edwards A.M. i Arrowsmith C.H.** (2002). *An NMR approach to structural proteomics.* Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA **99**: 1825-30.

- Yoshida, T., Ueguchi, C. i Yamada, H.** (1993). *Function of Escherichia coli nucleoid protein, H-NS: molecular analysis of a subset of proteins whose expresión is enhanced in a hns deletion mutant.* Molecular and General Genetics **237**: 113-122.
- Yoshioka, Y., Ohtsubo, H. i Ohtsuo, E.** (1987). *Repressor gene finO in plasmids R100 and F: constitutive transfer of plasmid F is caused by insertion of IS3 into F finO.* Journal of Bacteriology **169**: 619-623.
- Yother, J., Chamness, T.W. i Goguen, J.** (1986). *Temperature-controlled plasmid regulon associated with low calcium response in Yersinia pestis.* Journal of Bacteriology **165**: 704-711.
- Zhang, A. i Belfort, M.** (1992). *Nucleotide sequence of a newly-identified Escherichia coli gene, stpA, encoding an H-NS-like protein.* Nucleic Acids Research **20**: 67.
- Zhang, A., Derbyshire, V., Galloway Salvo, J.L. i Belfort, M.** (1995). *Escherichia coli protein StpA stimulates self-splicing by promoting RNA assembly in vitro.* RNA **1**: 783-793.
- Zhang, A., Rimsky, S., Reaban, M.E., Buc, H. i Belfort, M.** (1996). *Escherichia coli protein analogs StpA and H-NS: regulatory loops, similar and disparate effects on nucleic acid dynamics.* EMBO Journal **15**: 1340-1349.
- Zinser, E.R. i Kolter, R.** (1999). *Mutations enhancing amino acid catabolism confer a growth advantage in stationary phase.* Journal of Bacteriology **181**: 5800-5807.
- Zinser, E.R. i Kolter, R.** (2000). *Prolonged stationary-phase incubation selects for lrp mutations in Escherichia coli K-12.* Journal of Bacteriology **182**: 4361-4365.