

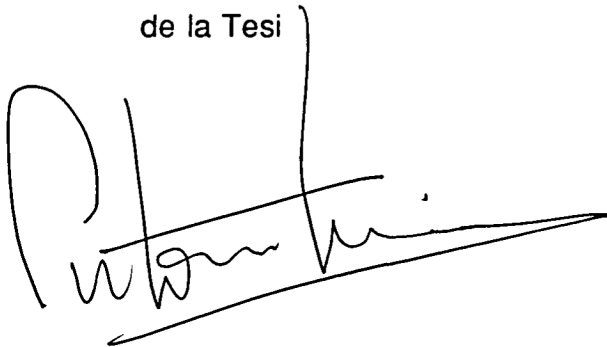
UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE BIOLOGIA

**LES MUTACIONS *hha* I *hap*: INCREMENT DE
L'EXPRESSION DE PROTEÏNES HETERÒLOGUES
CLONADES A *Escherichia coli***

Vist-i-plau del Director

de la Tesi



Dr. Antonio Juárez Giménez

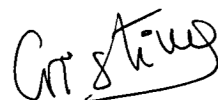
Memòria presentada per

Cristina Madrid Xufre

per optar al Grau de

Doctor en Ciències

Biològiques



Barcelona, Novembre de 1992

El meu agraïment va dedicat a totes aquelles persones que he conegut i m'han ajudat durant la realització d'aquest treball i la preparació de la memòria. Al Dr. Antonio Juárez, per la direcció del treball. Als companys del grup, Pilar Diaz, Cèlia Badenas, Jose M^a Nieto i Manuel Carmona, així com a la resta de companys del Departament, per la seva ajuda. A en Lluís i a la meva família, pel seu suport incondicional.

Als meus pares

ÍNDEX

RESUM

- 1 INTRODUCCIÓ
- 2 MATERIALS I MÈTODES
- 3 RESULTATS
- 4 DISCUSSIÓ
- 5 CONCLUSIONS
- 6 BIBLIOGRAFIA

1	<u>INTRODUCCIÓ</u>	1
1.1	<u>Regulació de l'expressió gènica i expressió de proteïnes heteròlogues a <i>Escherichia coli</i></u>	2
1.1.1	Factors relacionats amb el replicó	6
1.1.2	Factors relacionats amb l'expressió dels gens clonats	8
1.1.2.1	Regulació de la transcripció	8
1.1.2.2	Estabilitat del transcrit	12
1.1.2.3	Regulació de la traducció	14
1.1.3	Processament de la proteïna expressada	17
1.1.4	Paper de la soca hoste utilitzada per l'expressió de proteïnes clonades	21
1.2	<u>El gen <i>hha</i> d'<i>Escherichia coli</i></u>	22
1.3	<u>Els gens <i>tolQRAB</i> d'<i>Escherichia coli</i></u>	29
1.4	<u>Objectius d'aquesta tesi</u>	43
2	<u>MATERIALS I MÈTODES</u>	44
2.1	<u>Soques bacterianes, plàsmids i bacteriòfags</u>	45
2.2	<u>Medis de cultiu i antibiòtics</u>	49
2.2.1	Medis de cultiu	49
2.2.2	Antibiòtics	50

2.3	<u>Instrumental tècnic</u>	51
2.4	<u>Mètodes microbiològics</u>	51
2.4.1	Esterilització	51
2.4.2	Sembra, cultiu i manteniment de microorganismes	51
2.5	<u>Mètodes de manipulació i ús de bacteriòfags</u>	53
2.5.1	Sensibilitat a bacteriòfags	52
2.5.2	Manipulació i ús del bacteriòfag lambda i derivats	53
2.5.2.1	Manipulació i ús de lambda::Tn5	53
2.5.2.1.a	Obtenció de lisats de lambda::Tn5	53
2.5.2.1.b	Titulació de lisats de lambda::Tn5	54
2.5.2.1.c	Mutagènesi amb lambda::Tn5	54
2.5.2.2	Manipulació i ús de lambda::Tn10	54
2.5.2.2.a	Obtenció de lisats fàgics	54
2.5.2.2.b	Titulació de lisats de lambda::Tn10	55
2.5.2.2.c	Mutagènesi amb lambda::Tn10	55
2.5.3	Manipulació i ús del bacteriòfag P1 i derivats	56
2.5.3.1	Obtenció de lisats de P1 <i>cm ts</i>	56
2.5.3.2	Obtenció de lisògens per P1 <i>cm ts</i>	56
2.5.3.3	Titulació de lisats de P1 <i>cm ts</i>	57
2.5.3.4	Transducció amb P1 <i>cm ts</i>	57
2.6	<u>Mapatge de mutacions</u>	58
2.6.1	Mapatge amb soques Hfr::Tn10	58
2.6.2	Mapatge per cotransducció de marcadors	60
2.7	<u>Test de sensibilitat a colicines</u>	62
2.8	<u>Competència, transformació i curat de plàsmids d'<i>Escherichia coli</i></u>	63
2.8.1	Obtenció de cèl.lules competents d' <i>Escherichia coli</i>	63
2.8.2	Transformació d' <i>Escherichia coli</i>	63
2.8.3	Curat de plàsmids	64

2.9	<u>Obtenció i manipulació d'àcids nucleics</u>	65
2.9.1	Aïllament de DNA plasmídic	65
2.9.1.1	Mètode de la lisi alcalina	65
2.9.1.2	Extracció fenòlica de preparacions de DNA plasmídic	66
2.9.1.3	Mètode ràpid de lisi alcalina i extracció amb clorur de liti	67
2.9.2	Obtenció de DNA total	68
2.9.3	Tractament amb endonucleases de restricció i RNasa	69
2.9.3.1	Tractament de DNA amb endonucleases de restricció	69
2.9.3.2	Tractament amb RNasa	70
2.9.4	Lligació de molècules lineals de DNA	71
2.9.5	Amplificació de DNA per PCR	71
2.9.6	Electroforesi de DNA en gels d'agarosa i tinció amb bromur d'etidi	72
2.9.6.1	Electroforesi de DNA en gels d'agarosa	72
2.9.6.2	Tinció amb bromur d'etidi	73
2.9.6.3	Marcadors de pes molecular	73
2.9.7	Purificació de fragments de DNA a partir de gels d'agarosa de baix punt de fusió	74
2.9.8	Hibridació d'àcids nucleics	74
2.9.8.1	Marcatge de fragments de DNA amb digoxigenina	74
2.9.8.2	Transferència de DNA a membranes	75
2.9.8.3	Hibridació d'àcids nucleics	76
2.9.8.4	Detecció immunològica de la digoxigenina	77
2.10	<u>Fraccionament de cultius bacterians i aïllament de proteïnes de membrana</u>	78
2.10.1	Fraccionament de cultius bacterians	78
2.10.2	Aïllament de proteïnes de membrana	80
2.11	<u>Valoració de la concentració de proteïnes</u>	81
2.12	<u>Electroforesi de proteïnes en gels de poliacrilamida</u>	82
2.12.1	Electroforesi en gels de poliacrilamida	82
2.12.2	Tinció amb Blau de Coomassie	84
2.12.3	Marcadors de pes molecular	85

	Index
2.13 <u>Transferència de proteïnes a membranes i immunodetecció</u>	86
2.13.1 Transferència de proteïnes a membranes	86
2.13.2 Immunodetecció	87
2.14 <u>Valoracions enzimàtiques</u>	88
2.14.1 Activitat hemolítica	88
2.14.1.1 Detecció de la producció d'hemolisina	88
2.14.1.2 Valoració de l'activitat hemolítica	88
2.14.2 Valoració de l'activitat β -lactamasa	90
2.14.3 Valoració de l'activitat fosfatasa alcalina	91
2.14.4 Activitat carboximetilcel·lulàsica	92
2.14.4.1 Detecció de la producció de CMCasa	92
2.14.4.2 Valoració de l'activitat CMCàsica	92
3 <u>RESULTATS</u>	95
3.1 <u>Caracterització del gen <i>hha</i> mitjançant sondes de DNA</u>	96
3.1.1 Construcció d'una sonda del gen <i>hha</i>	96
3.1.2 Detecció del gen <i>hha</i> al cromosoma d' <i>E.coli</i> , mitjançant hibridacions de tipus "Southern"	100
3.1.3 Detecció del gen <i>hha</i> al cromosoma d'altres soques d'enterobactèries, mitjançant hibridacions de tipus "Southern"	103
3.1.4 Homologia del gen <i>hha</i> amb el gen <i>ymoA</i> de <i>Yersinia enterocolitica</i> . Hibridació de DNA de <i>Yersinia enterocolitica</i> contra la sonda del gen <i>hha</i>	105
3.1.5 Detecció del gen <i>hha</i> per la tècnica de la PCR	110
3.2 <u>Obtenció d'un mutant Hha⁻ a <i>E.coli</i> HB101: detecció de la inestabilitat de Tn5 en el gen <i>hha</i></u>	117
3.2.1 Obtenció de mutants Hha ⁻ a <i>E.coli</i> HB101	118
3.2.2 Estabilitat de la mutació <i>hha</i>	119
3.2.3 Origen dels clons negatius derivats de mutants Hha ⁻	120

3.3	<u>Recerca d'altres mutacions que poden afectar l'expressió de proteïnes heteròlogues a <i>E.coli</i>: estratègia per la identificació de gens que codifiquin per proteases intracel·lulars</u>	127
3.3.1	Mutagènesi de la soca <i>E.coli</i> Hha-2 (pJMKam4) amb Tn10	129
3.3.2	Anàlisi de la degradació de la proteïna ABI508 als mutants obtinguts	130
3.4	<u>Recerca d'altres mutacions que poden afectar l'expressió de proteïnes heteròlogues a <i>E.coli</i>: identificació de les mutacions <i>hap</i></u>	135
3.4.1	Mutagènesi d' <i>E.coli</i> 5K (pHPC3-700) amb Tn5. Obtenció de mutants <i>hap</i>	137
3.4.2	Les insercions de Tn5 es localitzen al cromosoma	138
3.4.3	Les mutacions <i>hap-6</i> i <i>hap-9</i> no corresponen a mutacions en el gen <i>hha</i>	140
3.4.4	Quantificació de la producció d'aerolisina de les soques CM206 i CM209	146
3.4.4.1	Valoració de la producció d'aerolisina de la soca CM206 (pHPC3-700)	146
3.4.4.2	Valoració de la producció d'aerolisina de la soca CM209 (pHPC3-700)	154
3.4.5	Caracterització genètica de les mutacions <i>hap-6</i> i <i>hap-9</i>	160
3.4.5.1	Cotransducció del marcador de resistència del transposó (Km) i el fenotip hemolític de les mutacions <i>hap-6</i> i <i>hap-9</i>	160
3.4.5.2	Mapatge de les mutacions <i>hap-6</i> i <i>hap-9</i>	161
3.4.5.2.a	Construcció del plàsmid pUBM101	161
3.4.5.2.b	Mapatge de les mutacions <i>hap-6</i> i <i>hap-9</i> per conjugació amb soques Hfr::Tn10	163
3.4.5.2.c	Mapatge fi de la mutació <i>hap-9</i> per cotransducció de marcadors	165
3.4.6	Anàlisi de les proteïnes de membrana de la soca CM209	167
3.4.7	Pleotropia de la mutació <i>hap-9</i> . Expressió d'una endoglucanasa de <i>Bacillus polymyxa</i> a la soca CM209	173
3.4.8	Relació entre la mutació <i>hap-9</i> i els gens <i>tolQRAB</i>	176
3.4.8.1	La soca CM209 és tolerant a les colicines A i E1	177

3.4.8.2	L'expressió de l'aerolisina d' <i>A.hydrophila</i> a les soques portadores de mutacions en els gens <i>tolA</i> i <i>tolB</i> és similar a l'expressió de l'aerolisina a la soca CM209	180
3.4.8.3	Les mutacions <i>tolA</i> i <i>tolB</i> no afecten l'expressió d'hemolisina codificada pel plàsmid pANN202-312	187
3.4.8.4	Anàlisi comparativa dels patrons de membrana externa de les soques CM209, A592 i A593	189
3.5	<u>Optimització de l'expressió de proteïnes clonades a <i>E.coli</i>.</u>	
	<u>Construcció d'una soca <i>hha hap-9</i></u>	191
3.5.1	Transducció de la mutació <i>hap-9</i> a la soca Hha-2T (pHPC3-700)	191
3.5.2	Valoració de la producció d'aerolisina de la soca CM329 (pHPC3-700)	194
3.5.3	La soca CM329 expressa l'hemolisina clonada al plàsmid pANN202-312 seguint un comportament similar al de la soca Hha-2T	197
4	<u>DISCUSSIÓ</u>	199
5	<u>CONCLUSIONS</u>	210
6	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	213

Resum

Els mecanismes de regulació de l'expressió gènica a bacterïes, i concretament a *E.coli*, han estat àmpliament estudiats, no només degut a la seva importància per la comprensió del funcionament de la cèl.lula bacteriana, sinó també pel seu interès en el desenvolupament de sistemes d'expressió i producció de proteïnes clonades en aquest microorganisme. És evident que el coneixement dels mecanismes que regulen l'expressió gènica a *E.coli* pot facilitar la manipulació d'aquesta bactèria per tal d'utilitzar-la com a hoste amb la finalitat de produir determinades proteïnes d'interès biotecnològic.

El treball que es presenta en aquesta Tesi comprèn diferents aspectes relacionats amb la mutació *hha*, especialment pel que fa referència al seu paper regulant l'expressió gènica a *E.coli* i a la utilització d'aquesta mutació i d'altres amb la finalitat d'augmentar la producció de proteïnes heteròlogues.

Una part del treball es va centrar en l'estudi de diferents aspectes del gen *hha*. Aquest gen ha estat identificat en funció del seu paper en la modulació de l'expressió de l'alfa-hemolisina clonada al plàsmid multicòpia pANN202-312 (Godessart *et al.*, 1988). Les soques portadores de mutacions en el gen *hha* tenen incrementada la síntesi d'hemolisina. Aquesta mutació és pleotròpica, causant efectes similars sobre l'expressió d'algunes proteïnes heteròlogues clonades (Nieto *et al.*, 1987; Blanco *et al.*, 1991; Carmona, Tesi Doctoral, 1992). El gen *hha* codifica per la proteïna Hha, d'un pes molecular d'aproximadament 8 kDa. Aquesta proteïna està implicada en els mecanismes de regulació de l'hemolisina d'*E.coli*, actuant a nivell transcripcional. Els darrers estudis sobre el mecanisme pel qual la proteïna Hha modula l'expressió de l'hemolisina suggereixen que la regulació està relacionada amb canvis en la topologia del DNA (Carmona, Tesi Doctoral, 1992). La comparació entre les seqüències d'aminoàcids de la proteïna YmoA de *Yersinia enterocolitica* (Cornelis *et al.*,

1991) i de la proteïna Hha va permetre trobar un elevat grau d'homologia. La proteïna YmoA exerceix un paper en la regulació per temperatura (termoregulació) de l'expressió de determinats gens implicats en la virulència d'aquesta bactèria. Resultats preliminars semblen indicar que aquesta regulació es produiria per canvis en el grau de superenrotllament del DNA (Cornelis *et al.*, 1991). S'ha postulat que aquestes dues proteïnes, Hha i YmoA, formarien part d'una nova família de proteïnes que modularien l'expressió gènica per canvis conformacionals en el DNA (Carmona, Tesi Doctoral, 1992; De la Cruz *et al.*, en premsa).

En aquest treball s'han completat i comprovat diferents aspectes relacionats amb la caracterització del gen *hha*. Mitjançant la utilització de sondes del gen marcades i les tècniques d'amplificació de DNA per la metodologia de la PCR, s'ha localitzat el gen *hha* al cromosoma d'*E.coli*. A més a més, s'han realitzat estudis enfocats a determinar quina és la distribució d'aquest gen entre diferents soques d'*Escherichia coli* i d'altres espècies d'enterobactèries: *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* i *Yersinia enterocolitica*. Els resultats mostren una distribució pràcticament homogènia entre les soques d'*E.coli* que s'han utilitzat, mentre que no és detectable a pràcticament cap altra soca d'enterobactèria. El gen *hha* d'*E.coli* només ha estat detectat a la soca C3 de *K.pneumoniae* i a la soca Y754 de *Y.enterocolitica*. Tenint en compte que les proteïnes Hha i YmoA presenten un elevat grau d'homologia, i que les sondes del gen *hha* no proporcionen senyals d'hibridació amb el cromosoma de *Yersinia enterocolitica*, es qüestiona la utilització de les tècniques d'hibridació de tipus "Southern" i de PCR com a sistemes de detecció de la producció de proteïnes semblants a Hha o YmoA en els microorganismes analitzats.

Donat l'efecte pleotròpic de la mutació *hha*, i amb la finalitat de modificar el fons genètic d'una soca d'*E.coli* per tal d'optimitzar l'expressió de proteïnes clonades, es va plantejar l'obtenció de la mutació *hha* a una soca d'*E.coli* amb genotip *recA*, ja que les soques *hha* de les que es disposava fins el moment no eren deficientes per les funcions de recombinació per homologia (RecA), el que pot implicar la inestabilitat dels plàsmids portadors dels gens que es volen expressar. Utilitzant el transposó Tn5 com a element mutagènic, es van poder obtenir mutants *hha* derivats de la soca HB101. La caracterització d'aquests clons va conduir a l'observació d'un fenomen inesperat. En les successives ressembres de clons *hha* apareixien colònies no productores d'hemolisina. L'estudi d'aquest tipus de clons va permetre determinar que el seu origen es devia a transposicions secundàries de Tn5 des de la inserció inicial al gen *hha* cap al gen *hlyA*, gen estructural de l'hemolisina pertanyent a l'operó *hly* clonat al plàsmid pANN202-312. Aquestes insercions impedeixen la síntesi de la toxina i causen el fenotip no productor d'hemolisina.

L'expressió de proteïnes clonades a *E.coli* és dependent dels mecanismes de regulació de l'expressió gènica d'aquest microorganisme. Aquests mecanismes poden actuar a nivell transcripcional, a nivell de l'estabilitat del missatger, a nivell traduccional i a nivell post-traduccional. En aquest darrer nivell s'inclouen els mecanismes de modificació post-traduccional, que condueixen a la formació de la proteïna activa, o el transport de la proteïna a la seva localització específica. Però en aquest mateix nivell també es produeixen els fenòmens de degradació proteolítica. Aquests mecanismes tenen especial importància quan es volen expressar proteïnes heteròlogues clonades a *E.coli*, ja que majoritàriament aquestes proteïnes són degradades. A *E.coli* es coneixen diferents proteases, però se'n sap molt poc del seu paper en la degradació de proteïnes heteròlogues, i a més en pocs casos s'han relacionat amb el gen que

les codifica (Miller, 1987; Gottesman, 1987). Amb la finalitat d'optimitzar una soca d'*E.coli* per l'expressió de proteïnes heteròlogues, una part d'aquest treball ha consistit en l'intent de localitzar per mutagènesi gens que codifiquin per proteases intracel·lulars. Per això, es va triar un model de proteïna heteròloga que és degradada quan s'expressa a *E.coli*, la proteïna quimèrica ABI508 clonada al plàsmid pJMKam4 (Bishai *et al.*, 1987). Per l'expressió d'aquesta proteïna es va utilitzar la soca d'*E.coli* Hha-2 (*hha*), ja que l'expressió de la proteïna ABI508 també és afectada per la pleotropia d'aquesta mutació, produint-se un increment de la seva síntesi (Carmona, Tesi Doctoral, 1992). S'ha posat a punt una metodologia de detecció de clons defectius en activitats proteolítiques intracel·lulars. Malgrat els resultats no han conduït a la identificació de cap mutació que afecti alguna proteasa intracel·lular, la metodologia s'ha mostrat vàlida per aquesta finalitat.

D'altra banda, es pretenia cercar altres mutacions, diferents d'*hha*, que afectin gens que modulin l'expressió de proteïnes heteròlogues, de manera que mutacions en aquests gens puguin proporcionar un augment de la seva expressió. Es va triar un model de proteïna heteròloga expressada a *E.coli*, l'aerolisina d'*Aeromonas hydrophila*, toxina amb activitat hemolítica, clonada al plàsmid multicòpia pHPC3-700 (Chakraborty *et al.*, 1986; Nieto *et al.*, 1987). Aquesta toxina és secretada al medi extern a *Aeromonas hydrophila* seguint la via de la seqüència senyal. Quan s'expressa a *E.coli*, l'aerolisina s'acumula al periplasma (Chakraborty *et al.*, 1986; Howard i Buckley, 1986).

Es van fer experiments de mutagènesi de la soca d'*E.coli* 5K (pHPC3-700) amb Tn5, amb la finalitat de trobar mutacions que poguessin afectar la síntesi o secreció de l'aerolisina. Els experiments de mutagènesi van conduir a l'obtenció de dos mutants, denominats *hap-6* i *hap-9* (*hap* per "high aerolysin production"),

que presentaven, a diferència de la soca parental, grans halos d'hemòlisi en plaques d'agar-sang. La caracterització preliminar i el mapatge aproximat de les dues mutacions va mostrar que es tractava de mutacions diferents, pel que es va decidir caracteritzar únicament la mutació *hap-9*. S'ha estudiat l'expressió d'aerolisina per part de la soca mutant CM209 (*hap-9*). S'ha comprovat que aquesta mutació modifica tant la síntesi d'aquesta proteïna com la seva secreció al medi extern. S'ha demostrat que la sortida d'aerolisina al medi extern no és deguda a la secreció real de la proteïna, ja que va acompanyada de la presència de determinats enzims periplasmàtics al medi extern. S'ha constatat que l'augment en la producció és moderat, aproximadament de 1,35 vegades més respecte la soca parental. D'altra banda, l'anàlisi de les envoltures de la soca mutant ha permès constatar que a la membrana externa de les cèl·lules de la soca CM209 hi manca la proteïna LamB, present als extractes corresponents a la soca parental. Així mateix, s'ha pogut observar que l'expressió de l'aerolisina, en el cas de la soca CM209, altera la composició de la membrana externa, afectant la presència i quantitat d'algunes proteïnes de baix pes molecular. També ha estat evidenciada la pleotropia de la mutació *hap-9*, demostrant que l'expressió d'una altra proteïna heteròloga, una endoglucanasa de *Bacillus polymyxa*, està incrementada a la soca CM209.

El mapatge de la mutació *hap-9* per conjugació amb soques Hfr::Tn10 i cotransducció de marcadors amb P1, va permetre localitzar la mutació al minut 16,7 del mapa de lligament del cromosoma d'*E.coli*. L'estudi dels gens censats en aquesta regió va suggerir que els únics gens que podrien estar relacionats amb la mutació *hap-9* eren els gens *tolQRAB*. Ha estat descrit que mutacions en aquests gens presenten diversos efectes pleotròpics, entre els que cal destacar l'alliberament de proteïnes periplasmàtiques al medi extern (mutacions "leaky", Webster, 1991). Tant l'anàlisi de l'expressió de l'aerolisina a soques mutants pels

gens *tolA* i *tolB*, com l'espectre de resistències a colicines de la soca CM209, suggereix que la mutació *hap-9* correspon a una mutació en un dels gens *tolQ*, *tolR* o *tolA*. Ja ha estat descrit que mutacions en aquests gens poden causar efectes pleotròpics en l'alliberament de proteïnes periplasmàtiques, i que aquest efecte pot anar acompanyat d'un moderat increment en la seva síntesi (Fognini-Lefebvre i Portalier, 1984).

Com a part final del treball, s'ha intentat la construcció d'una soca d'*E.coli* en la que la combinació de les mutacions *hha* i *hap-9* pugui contribuir a optimitzar l'expressió de proteïnes heteròlogues clonades.

1 Introducció

1.1 REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA I EXPRESSIÓ DE PROTEÏNES HETERÒLOGUES A *Escherichia coli*.

El desenvolupament de sistemes biològics que permetin la producció de proteïnes clonades ha estat un objectiu de gran importància durant els darrers anys. L'obtenció de proteïnes en elevades quantitats pot tenir interès tant per la recerca bàsica com per la producció de proteïnes d'interès biològic, farmacèutic, comercial, etc.

D'entre els quatre sistemes biològics que han estat utilitzats per l'expressió de proteïnes clonades (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, llevats i cèl.lules de mamífer), la bactèria *E.coli* és el sistema més àmpliament utilitzat. Els avenços en el coneixement de la seva genètica i fisiologia han fet que es constituís com l'hoste preferent per l'expressió i producció de proteïnes. Els seus avantatges es basen en la ràpida generació de biomassa, gràcies a la seva elevada taxa de creixement, així com al baix cost dels cultius. D'altra banda, entre els desavantatges que presenta *E.coli*, es troben la seva limitada capacitat de secretar proteïnes al medi extern, així com la incapacitat de produir determinades modificacions post-traduccionals (com la formació de ponts di-sofre o la glicosilació) a les proteïnes sintetitzades.

Pel que fa a *E.coli* com a hoste utilitzat per l'expressió de proteïnes clonades, s'han desenvolupat diversos sistemes d'expressió directa, de fusions i de secreció. Les fusions són sistemes en els quals la proteïna que es vol expressar es sintetitza fusionada a un pèptid conegut, com per exemple la β -galactosidasa (*lacZ*) o altres, generalment amb activitat enzimàtica coneguda, mitjançant la fusió de les corresponents seqüències de DNA. Les fusions amb proteïnes d'activitat coneguda faciliten el seguiment de la producció de la

proteïna expressada, així com la seva localització als diferents compartiments cel·lulars. La utilització de fusions garanteix normalment l'inici de la traducció i l'estabilitat de pèptids petits, tot i que es considera que l'expressió directa és la més adequada per proteïnes de 100 a 300 aminoàcids (Goeddel, 1990). Els sistemes de secreció són aquells en els quals la proteïna que es vol expressar és sintetitzada juntament amb una seqüència senyal adequada per la secreció de la fusió, com és el cas de les fusions que utilitzen la seqüència senyal de la fosfatasa alcalina, de manera que si aquesta seqüència és correctament processada, és possible obtenir la proteïna d'interès amb un extrem N-terminal natiu localitzada al periplasma d'*E.coli* (Gray *et al.*, 1985).

Un problema força general en l'expressió de proteïnes heteròlogues és el que constitueix la proteolisi de les proteïnes expressades, tot i que en la major part dels casos aquest efecte és prou baix com per permetre l'acumulació d'una elevada fracció de la proteïna d'interès. Tanmateix, és important tenir present que algunes proteïnes són extremadament tòxiques per *E.coli*, i la seva degradació pot ser induïda ràpidament.

La producció de proteïnes heteròlogues a *E.coli* i la seva purificació amb diverses finalitats, implica l'obtenció d'una fracció abundant de la proteïna en els cultius utilitzats. Amb aquest objectiu s'han construït diversos plàsmids que permeten una elevada expressió. Tenen gran importància el tipus de plàsmid, els promotors i els senyals d'inici de la traducció utilitzats (Balbás i Bolivar, 1990).

En els sistemes basats en l'expressió de proteïnes clonades en plàsmids, es poden seguir dues vies majoritàries: clonar el fragment corresponent de DNA amb totes les regions necessàries per una correcta transcripció i traducció, o bé clonar el gen en un vector especialment dissenyat per l'expressió.

Els elements mínims dels que ha de constar un vector d'expressió són: origen de replicació, marcador que permeti la seva selecció i manteniment, promotor fort, regió d'unió amb els ribosomes, i un codó ATG d'inici de la traducció. Aquests elements assegurarien una correcta transcripció i traducció. Els coneixements sobre els passos limitants en la síntesi i estabilitat del mRNA han conduït a la construcció de sofisticats vectors que contenen fragments de DNA que ajuden a evitar fenòmens com la terminació prematura de la transcripció o la inestabilitat del mRNA.

Els factors que influencien la producció de proteïnes clonades a *E.coli* són aquells que exerceixen un control sobre l'expressió gènica en general, i es poden dividir en quatre blocs (revisat per Balbás i Bolivar, 1990):

- **Factors relacionats amb el replicó en el que s'han clonat els gens:** tipus de replicó, número de còpies per cèl.lula, gens per la seva selecció, manteniment i correcta segregació, i presència de seqüències que causen inestabilitat.

- **Factors relacionats amb l'expressió dels gens clonats:**
 - **Regulació de la transcripció:** promotor i seqüències reguladores que controlen la taxa d'inici de la transcripció. Terminadors, antiterminadors i atenuadors, que controlen l'elongació i la terminació de la transcripció.

 - **Estabilitat i processament del transcrit:** seqüències de reconeixement per RNases, seqüències palindròmiques

repetitives extragèniques (REP) i altres seqüències que determinen la taxa de degradació del mRNA produït.

- **Regulació de la traducció:** seqüència Shine- Dalgarno (S-D) o RBS ("ribosome binding site"), codons AUG, distància entre la seqüència S-D i el codó d'inici de la traducció, ribosomes i altres seqüències que controlen la taxa d'inici de la traducció. Tipus de codons i codó de terminació, que regulen l'elongació i la terminació de la síntesi de proteïnes.
- **Processament de la proteïna expressada:** modificacions post-traduccionals de la proteïna, taxa de degradació proteolítica i secreció.
- **Factors relacionats amb la bactèria utilitzada com a hoste per l'expressió:** presència o absència de determinats factors cel.lulars necessaris per la correcta síntesi o secreció de les proteïnes d'interès.

1.1.1 Factors relacionats amb el replicó.

Pel clonatge de proteïnes que es volen expressar es poden utilitzar vectors d'elevat o de baix número de còpies per cèl.lula. La utilització de plàsmids que mantenen un elevat número de còpies és adequada quan l'expressió de la proteïna en gran quantitat no presenta problemes, com podria ser la toxicitat per la cèl.lula productora. En general, la quantitat de proteïna sintetitzada augmenta en funció de la dosi gènica, conseqüència del número de còpies del plàsmid que la codifica.

Cal tenir present que en els sistemes de vectors amb promotors induïbles/reprimibles, el mateix plàsmid ha de ser portador del gen que codifica pel repressor (per exemple el gen *lacI* per promotors pTac), ja que sinó, el número de molècules repressores codificades per un únic gen cromosòmic no és suficient per bloquejar l'elevat número de seqüències operadores presents al sistema multicòpia.

Els gens codificats pel plàsmid, les condicions de cultiu i la fisiologia de la soca hoste també tenen influència sobre l'estabilitat del plàsmid i per tant sobre la quantitat de proteïna produïda. Els plàsmids de replicació relaxada, com pBR322 i els seus derivats, han estat els més utilitzats en sistemes d'expressió (Balbás *et al.*, 1986). La principal raó és que compleixen els criteris bàsics com a vectors, i que es coneixen els seus mecanismes de replicació, estabilitat, mobilització i amplificació. L'amplificació és l'augment en el número de còpies de determinats plàsmids, que s'aconsegueix per replicació del DNA plasmídic en condicions d'inhibició de la síntesi proteica i per tant, inhibició de la divisió cel.lular i de la replicació del cromosoma (Clewell, 1972). Aquest mecanisme permet augmentar considerablement el número de còpies del gen que es vol

expressar. En el cas de pBR322, el número de còpies per cèl.lula pot passar de 18 a 1000 en presència de cloramfenicol (Balbás *et al.*, 1986).

També cal tenir present que de vegades és necessària la utilització de dos vectors o més de forma simultània a la mateixa cèl.lula. En funció de la problemàtica de la incompatibilitat de plàsmids amb sistemes de replicació similars, ha estat molt útil el desenvolupament de diferents vectors adequats amb orígens de replicació compatibles entre ells. Aquest seria el cas del vector pACYC184 (Bolivar i Backman, 1979), derivat de p15A, compatible amb els derivats de ColE1 (pBR322 i tots els seus derivats).

Pels plàsmids relaxats, el número de còpies és dependent de la taxa de creixement. Així, si aquesta és elevada, disminueix el número de còpies, provocant alteracions en la correcta segregació del plàsmid a la divisió cel.lular (Klotsky i Schwartz, 1987). La solució més extesa per evitar aquest problema ha estat la incorporació de marcadors que permetin la selecció del plàsmid. Aquests marcadors són generalment gens de resistència a antibiòtics, de manera que és necessària la incorporació dels corresponents antibiòtics al medi de cultiu. Un altre tipus d'instabilitat, la instabilitat estructural, és la provocada per canvis físics en el DNA, com delecions, insercions o reordenaments. Aquesta instabilitat és més problemàtica que la instabilitat en la segregació, ja que en aquest cas és independent del manteniment dels marcadors. Des de fa temps es coneix el fet que el clonatge utilitzant vectors de tipus còsmids, que permeten el clonatge de fragments grans de DNA (aproximadament 30 Kb), produeix molècules recombinants d'una relativa instabilitat (Diaz i Juárez, 1991). També cal evitar la utilització de plàsmids amb seqüències repetides o altament palindròmiques entre el replicó i el fragment de DNA clonat. A més a més, tenint en compte que en moltes ocasions la base molecular de la instabilitat de

molècules recombinants de DNA és deguda a processos de recombinació entre seqüències homòlogues del vector i de l'insert, és recomanable la utilització de soques d'*E.coli* portadores de la mutació *recA*, com per exemple *E.coli* HB101. Aquest tipus de soques tenen inactivats els mecanismes de recombinació per homologia. En conclusió, les propietats del vector, el fons genètic de la soca hoste utilitzada i les condicions de cultiu són factors que tenen influència sobre la interacció hoste-vector, que cal que sigui adequada pel manteniment del vector i l'expressió dels gens clonats.

1.1.2 Factors relacionats amb l'expressió dels gens clonats.

1.1.2.1 Regulació de la transcripció.

El primer pas en l'expressió gènica és l'inici de la transcripció. Tenint en compte que, de manera general, les bactèries regulen l'expressió gènica a nivell transcripcional, l'inici de la transcripció és un dels processos més importants i limitants de l'expressió gènica. La freqüència d'inici de la transcripció, que a *E.coli* pot variar des d'una vegada per generació a una vegada per segon (McClure, 1985), ve donada per les diferents seqüències que actuen com a promotors, i pot ser a més modulada per altres factors.

La seqüenciació d'un gran nombre de promotors d'*E.coli* ha permès constatar l'existència de 2 regions, de 6 pb cadascuna, que són les més conservades en tots ells. Aquestes seqüències, anomenades -35 i -10 per la seva situació amb respecte al punt d'inici de la transcripció, juguen un important paper en el control de l'inici de la transcripció juntament amb la distància que les separa, ja que aquesta és la regió que reconeix l'holoenzim RNA polimerasa per formar el complex d'inici de la transcripció.

En el cas d'*E.coli*, un promotor òptim seria el format per un hexàmer TTGACA en posició -35 separat per 17 pb d'un hexàmer TATAAT en posició -10, a 5-9 pb del punt d'inici de la transcripció (Hoopes i McClure, 1987).

A més del promotor, hi ha altres factors que regulen l'inici de la transcripció. Malgrat que l'holoenzim RNA polimerasa format per un nucli $\alpha_2\beta\beta'$ i una subunitat σ^{70} és el responsable de la transcripció de la major part de gens coneguts a *E.coli*, el descobriment d'altres factors σ a *E.coli* i a altres bacteries proporciona un nou mecanisme de regulació, ja que els factors σ desenvolupen un important paper en el reconeixement dels promotors. La subunitat σ és la responsable del reconeixement del promotor per part de la RNA polimerasa, i es separa una vegada ha començat la transcripció. A *E.coli*, els gens implicats en el xoc tèrmic i en el metabolisme del nitrogen tenen promotors que no són reconeguts per la subunitat σ^{70} , i que requereixen subunitats σ diferents. Així, s'ha observat que quan *E.coli* es sotmet a un xoc tèrmic es produeix de manera transitòria l'elevada expressió d'una sèrie de gens que tenen promotors que només són reconeguts per la subunitat σ^{32} (Grossman *et al.*, 1987). Aquesta subunitat és el producte del gen *rpoH* (o *htpR*) que es transcriu utilitzant la subunitat σ majoritària. D'altra banda, els gens implicats en la fixació i assimilació del nitrogen són transcrits amb la participació de la subunitat σ^{60} , producte del gen *glnF* (Hirschman *et al.*, 1985). S'ha observat que, en ambdós casos, els promotors tenen escassa homologia amb la seqüència consens -10 dels promotors d'*E.coli* (Ausubel, 1984; Cowing *et al.*, 1985), fet que indicaria que el reconeixement de la seqüència -10 com a promotor per part de l'holoenzim RNA polimerasa depèn específicament de la subunitat σ^{70} .

Alteracions en l'estructura física i/o química del DNA també poden afectar l'inici de la transcripció. Aquest és el cas de l'efecte produït per la metilació

(Roberts *et al.*, 1985) o el grau de superenrotllament del DNA (Pruss i Drlica, 1989; Drlica, 1992).

Altres factors que afecten l'inici de la transcripció són efectors proteics que poden actuar com a activadors o com a repressors. Aquests efectors actuen per unió a seqüències de DNA anomenades operadors, regulant de manera específica un gen o un grup de gens. Les proteïnes activadores s'uneixen generalment a regions properes a la seqüència -35, mentre que els repressors ho fan a regions situades entre -40 i +10, inhibint la iniciació de la transcripció per impediment de la unió de la RNA polimerasa al promotor, o dificultant la formació del complex promotor obert. També s'ha descrit l'existència d'elements reguladors a distància, com seqüències activadores situades a 100 pb del punt d'inici de la transcripció, o la repressió a distància en operons regulats per AMPc (Buck *et al.*, 1986; Reitzer i Magasanik, 1986; Magasanik, 1989).

Després de la unió de l'holoenzim RNA polimerasa a la seqüència del promotor amb la formació del complex promotor tancat, es produeix la transició cap al complex promotor obert amb la desnaturalització d'aproximadament 12 pb, començant des de la posició -9 fins a la +3, respecte a la primera base que es transcriu. Llavors es dissocia la subunitat σ i comença l'elongació. El complex promotor obert és inestable, i s'estabilitza una vegada ha començat l'elongació del mRNA. Després de l'elongació, es produeix la terminació de la transcripció i la dissociació del complex mRNA-RNA polimerasa-DNA.

Han estat descrits dos grans grups de terminadors a *E.coli*, en funció dels requeriments que presenta la RNA polimerasa per acabar la transcripció (Platt, 1986; Yager i Von Hippel, 1987): els terminadors rho-independents o simples,

en que no cal cap factor addicional, i els terminadors rho-dependents, en que és necessària la participació del factor Rho per que es produeixi la terminació.

En algunes ocasions, la terminació de la transcripció pot ser evitada per interacció de factors específics amb la RNA polimerasa, que provoquen una modificació de l'enzim de tal manera que aquest no reconeix el terminador i continua la transcripció. Aquest fenomen, anomenat antiterminació, és un mecanisme fonamental en la regulació de l'expressió gènica de bacteries i bacteriòfags.

Hi ha altres mecanismes que poden modular la terminació de la transcripció induïnt una terminació prematura, com és el cas de l'atenuació. El fenomen de l'atenuació, descobert a l'operó del triptòfan d'*Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium*, provoca, de manera general, la terminació prematura de la transcripció si en el medi hi ha quantitats adequades del producte gènic corresponent (Yanofsky, 1981). Degut a la regulació negativa que exerceixen els atenuadors, aquests s'han d'evitar en sistemes desenvolupats per l'expressió de proteïnes heteròlogues.

Els terminadors de la transcripció són els punts que determinen el moment en que es dissocia el complex mRNA-RNA polimerasa-DNA. Hi ha nombrosos factors que col·laboren en la terminació: la seqüència de nucleòtids, la presència d'estructures secundàries al mRNA que s'està sintetitzant i diversos factors proteics.

1.1.2.2 Estabilitat del transcrit.

Un altre nivell de regulació és el que es dona quan el transcrit ja està sintetitzat, mitjançant el control de la taxa de degradació d'aquest mRNA, i per tant de la seva vida mitja (Belasco i Higgins, 1988).

El nivell dels diferents mRNAs presents a *E.coli* reflecteix la relació establerta entre la seva velocitat de síntesi i de degradació. L'alta velocitat de síntesi i degradació dels missatgers és el que permet a les cèl.lules procariotes respondre d'una manera ràpida als canvis en les condicions de creixement. Tanmateix, no tots els transcrits es degraden a la mateixa velocitat. Per exemple, el mRNA corresponent al gen *ompA* té una vida mitja de 15 min, una de les més llargues descrites a procariotes (Von Gabain *et al.*, 1982). Per això, la velocitat diferencial de recanvi dels mRNAs juga un paper fonamental en la modulació de l'expressió gènica.

La inactivació de la molècula de mRNA pot ser funcional o química. La inactivació funcional és l'alteració del missatger que impossibilita la traducció sense que hi hagi una degradació pròpiament dita. Aquest tipus de inactivació és generalment provocada per un tall endonucleolític prop de l'extrem 5', que implica la destrucció de la regió d'inici de la traducció o del començament de la seqüència codificant (Belasco i Higgins, 1988). La inactivació química és la degradació del mRNA a mononucleòtids deguda a l'acció d'exonucleases que actuen en sentit 3'---> 5', i que poden començar a degradar a partir de l'extrem 3' del missatger o a localitzacions internes produïdes prèviament per endonucleases (Petersen, 1992).

Els coneixements actuals sobre els enzims i altres factors implicats en el procés de degradació del mRNA són força limitats. Dues exonucleases, la RNasa II i la polinucleòtid fosforilasa, semblen ser les principals responsables de la degradació dels missatgers (Donovan i Kushner, 1986). Per una altra banda només s'ha pogut demostrar la participació de tres RNases amb activitat endonucleolítica en els processos de degradació del mRNA a *E.coli*: la RNasa III, la RNasa E i la RNasa K (King i Schlessinger, 1987; Petersen, 1992).

Hi ha diferents factors que tenen influència sobre la degradació del mRNA: la presència o absència de ribosomes, la taxa de traducció, les estructures secundàries del mRNA en posició 5' i 3' que poden inhibir l'acció de les nucleases, la presència de seqüències específiques en posició 5' o 3' que responen a efectors, les seqüències palindròmiques repetitives extragèniques (REP), la taxa de creixement, i la utilització d'hostes RNasa-deficients o mutants letals condicionals (revisat per Balbás i Bolivar, 1990).

S'han suggerit tres possibles vies per tal de manipular l'estabilitat del mRNA: la utilització de mutants deficients en activitat RNàsica mitjançant soques amb mutacions letals condicionals, la inserció de seqüències que augmentin l'estabilitat del mRNA, i la modulació de les condicions de creixement. Pel que fa al primer punt, malgrat que es coneixen mutants per la RNasa majoritària d'*E.coli*, es creu que no és una sola RNasa la responsable de la degradació de tots els mRNAs. Pel que respecta a les seqüències que poden ajudar a mantenir l'estabilitat del mRNA, és un fet conegut que un extrem 3' altament estructurat actua com a barrera per la degradació exonucleolítica en sentit 3'---> 5' del transcrit. Les seqüències REP, situades a les regions intercistròniques i als extrems 3' de les unitats transcripcionals, provoquen un acúmulo dels mRNA corresponents als gens que les precedeixen. La seva utilització podria

incrementar, teòricament, la vida mitja dels transcrits. També hi ha evidències que demostren que alguns mRNAs tenen diferent estabilitat en funció de la taxa de creixement (Nilsson *et al.*, 1984). Com que el temps de vida mitja és una característica de cada transcrit, caldria que fóra avaluada en diferents velocitats de creixement, així com en cultius amb diferents fonts d'energia i de nitrogen. Malgrat tot, no es troben a la bibliografia exemples d'estabilització de mRNA amb el propòsit d'augmentar l'expressió gènica.

La utilització de sistemes multicòpia per l'expressió de determinats gens, amb el conseqüent augment en la dosi gènica i en el número de molècules de mRNA, pot compensar parcialment la inestabilitat del transcrit.

1.1.2.3 Regulació de la traducció.

La traducció també constitueix un punt de regulació de l'expressió gènica (McCarthy i Guarlezi, 1990). Aquest procés comprèn tres etapes: iniciació, elongació i terminació.

En funció de la informació de la que es disposa, es pot afirmar que la iniciació de la traducció és l'etapa fonamental en la regulació post-transcripcional. L'inici de la traducció és un procés que implica tres espècies diferents de RNA: el mRNA, el rRNA 16S i el fMet-tRNA, a més d'interaccions amb la proteïna ribosomal S1 i tres factors proteics (IF1, IF2 i IF3). Els elements del missatger que condicionen l'inici de la traducció són el codó d'iniciació, la seqüència S-D (Shine-Dalgarno) o RBS ("ribosome binding site"), la distància entre aquests dos elements i la seva seqüència, i a més a més les estructures secundàries del mRNA. La variació en la freqüència d'inici de la traducció de diferents mRNAs reflecteix les variacions en aquests elements.

El conjunt de factors per la màxima eficiència en la traducció són els que s'especifiquen a continuació (Balbás i Bolívar, 1990):

- 1) el codó preferencial d'inici és AUG, malgrat també es poden trobar els codons GUG, UUG, AUU i AUA.
- 2) la seqüència RBS, que té al menys 4 nucleòtids de la seqüència AGGAGG.
- 3) la distància entre la RBS i el codó AUG, de 6 a 12 nucleòtids.
- 4) els nucleòtids situats en sentit 5' d'AUG, al costat de RBS, han de ser adenosines o uridines.
- 5) les seqüències GCAU o AAAA situades després d'AUG incrementen la taxa de traducció.
- 6) la regió al voltant del lloc d'inici de la traducció ha de ser relativament poc estructurada.

De tota manera, el paràmetre més important que afecta l'inici de la traducció és l'efecte inhibitor d'estructures secundàries del mRNA i la repressió per proteïnes (Gold, 1988). L'efecte de les proteïnes pot ser el bloqueig del lloc d'unió dels ribosomes o l'estabilització d'estructures secundàries inhibidores de la traducció. Les interaccions RNA:RNA també poden exercir una regulació negativa sobre la traducció, com l'efecte produït per petites molècules de RNA de seqüència invertida i complementària ("RNA antisense"; Simons i Kleckner, 1988; Inouye, 1988). Una proteïna o el seu mRNA poden també regular la seva

pròpia traducció, fenomen anomenat auto-regulació. Aquest seria el cas de les proteïnes ribosòmiques, amb expressió regulada principalment a nivell de la traducció. Un excés de proteïnes ribosòmiques, que no podran formar part dels ribosomes, inhibeix la traducció dels seus propis missatgers. La similitud en les seqüències i estructures secundàries del rRNA i del mRNA corresponents a les proteïnes ribosòmiques fa que, mentre que es sintetitzi rRNA, aquestes proteïnes s'hi uneixin per formar els ribosomes. Però si hi ha excés de proteïnes ribosòmiques, aquestes passen a unir-se al seu propi mRNA, prop de la regió de Shine-Dalgarno, inhibint la traducció (Nomura *et al.*, 1984; Jinks-Robertson i Nomura, 1987).

Una vegada iniciada la traducció, l'elongació de la cadena peptídica no es produeix a una velocitat constant. S'ha demostrat que gens dèbilment expressats es caracteritzen per contenir en la seva seqüència codons que són reconeguts per espècies rares o poc freqüents de tRNA (Bulmer, 1987). La construcció de gens sintètics, amb l'objectiu d'augmentar l'expressió de les proteïnes codificades, hauria d'incorporar aquells codons més freqüentment reconeguts a *E.coli*, o bé evitar aquells codons que són infreqüents (Itakura *et al.* 1977; Ferreti *et al.*, 1988).

L'alliberament de la cadena polipeptídica es realitza amb la intervenció de 2 factors d'alliberament que reconeixen els tres codons de terminació: el factor RF1, que reconeix els codons UAA i UAG, i el factor RF2, que reconeix els codons UAA i UGA. Els tres codons mostren diferents eficàcies en la terminació de la traducció, i sembla que el codó UAA és el més freqüent en els gens que s'expressen en elevat nivell (Sharp i Bulmer, 1988). El triplet UAA seria el que s'incorporaria preferentment en gens sintètics. L'estratègia més comú, però, ha

estat la utilització de repeticions en tàndem de triplets de terminació (Ferreti *et al.*, 1988).

1.1.3 Processament de la proteïna expressada.

L'expressió gènica també pot ser regulada en etapes post-traduccionals, ja que no sempre la proteïna sintetitzada és activa. Si és necessària alguna modificació per obtenir la forma activa de la proteïna, és clar que la regulació sobre aquests mecanismes de modificació forma part del sistema de regulació global.

Exemples clàssics de modificacions post-traduccionals els constitueixen el processament de la seqüència senyal de les proteïnes que han de ser translocades fora del citoplasma i que només són actives a la seva localització final, o l'addició de diglicèrids a la lipoproteïna de la membrana externa. Hi ha, però, altres reaccions de modificació, com la metilació, l'acetilació, l'adenilació o la fosforilació. En el cas de l'alfa-hemolisina d'*E.coli*, per exemple, l'activació requereix l'acció de la proteïna HlyC i l'addició de grups acil (Hardie *et al.*, 1991; Issartel *et al.*, 1991).

La secreció de proteïnes al medi extracel.lular a bacterïes Gram-negatives, atravesant les dues envoltas cel.lulars, pot seguir, de manera general, dos patrons (Pugsley, 1988). En el primer cas, les proteïnes són secretades en un procés d'un únic pas, sense necessitat d'intervenció de cap seqüència senyal. En el segon, les proteïnes són exportades al periplasma via seqüència senyal, i la seva translocació a través de la membrana externa és més o menys específica per a determinades proteïnes o grups de proteïnes, i pot dependre

exclusivament de la proteïna que es secreta o necessitar la intervenció d'altres proteïnes (Filloux *et al.*, 1990).

En el cas d'*E.coli*, la secreció de proteïnes al medi extracel.lular es limita a molts pocs exemples coneguts: les colicines i l'alfa-hemolisina. En ambdós casos, la secreció és independent de la via de la seqüència senyal, i segueix vies específiques. La secreció de l'alfa-hemolisina requereix tres productes: HlyB, HlyD (Wagner *et al.*, 1984) i TolC (Wandersman i Delepelaire, 1990). En el cas de les colicines, la secreció requereix el producte d'un gen ("lysis gene") present al mateix plàsmid que codifica per la colicina (Pugsley, 1984a).

Un altre tipus de regulació post-traducciona l és la regulació per proteolisi. La majoria dels gens d'*E.coli* són regulats a nivell transcripcional o traducciona l, sintetitzant-se proteïnes que són estables i que només es perden per dilució durant el creixement cel.lular. Hi ha, però, altres proteïnes que són degradades ràpidament en determinades circumstàncies, o que són altament inestables. Aquestes dues possibilitats no són excloents, ja que una proteïna inestable pot ser estabilitzada en determinades condicions. La degradació proteolítica esdevé un altre nivell de regulació de l'expressió gènica, tant pel que fa al sistema de degradació com a altres proteïnes o components cel.lulars que poden estar implicats en la protecció contra la degradació, o en l'activació d'aquest procés (Gottesman, 1987).

La proteolisi és un procés molt selectiu i regulat, que té una gran influència en el grau d'acumulació de proteïnes a *E.coli*, ja que permet l'eliminació de pèptids no necessaris proporcionant una font d'aminoàcids i energia en determinades condicions de limitació de nutrients.

La degradació proteolítica és molt important en el cas de proteïnes clonades, ja que generalment aquestes proteïnes són reconegudes com a "anormals" pel sistema proteolític, conduïnt a la ràpida hidròlisi de les proteïnes expressades (Gold, 1990). Aquesta selecció o reconeixement implica que les proteïnes pròpies de la bactèria han de tenir certs factors conformacionals que les protegeixen de la degradació. Els mecanismes d'aquest "reconeixement" no són coneguts. Si la conformació de les proteïnes heteròlogues és similar a la dels productes propis, es pot disminuir la taxa de degradació.

Una estratègia utilitzada per tal d'evitar la degradació selectiva de productes clonats ha estat la generació de fusions gèniques (fusions traduccionals), dirigint la síntesi de proteïnes híbrides o secretables. En el cas de les proteïnes híbrides, la proteïna transportadora estabilitza el producte contra la degradació. Els productes híbrids resultants de les fusions, però, requereixen un processament per l'alliberament de la proteïna d'interès. Un aspecte interessant de les proteïnes "anormals" ràpidament sintetitzades és la seva acumulació en grànuls característics, anomenats cossos d'inclusió (Williams *et al.*, 1982). Aquest fenomen facilita la purificació, i constitueix per tant un avantatge.

En el cas de la generació de proteïnes secretables, la degradació es pot evitar mitjançant l'exportació de la proteïna a l'espai periplasmàtic. La generació de proteïnes secretables es basa en el fet que moltes proteïnes d'*E.coli* són translocades al periplasma per la presència d'una seqüència senyal al seu extrem amino-terminal (Randall i Hardy, 1984). La presència de la seqüència senyal, però, no és suficient per exportar les proteïnes a través de les dues envoltures. En determinats casos, la fusió es pot realitzar de tal manera que el processament de la seqüència senyal permeti obtenir una proteïna amb un extrem N-terminal natiu al periplasma. Aquest seria el cas de la producció de

l'hormona de creixement humana a *E.coli*, per fusió amb la seqüència senyal de la fosfatasa alcalina (Gray *et al.*, 1985).

Una altra estratègia per evitar la degradació proteolítica és la utilització de soques deficientes en proteases. Lon és la proteasa d'*E.coli* més ben caracteritzada. La seva activitat és ATP-dependent (Gottesman, 1987). Per una altra banda, soques deficientes pel gen *htpR*, implicat en la resposta al xoc tèrmic, són generalment deficientes per la proteolisi (Baker *et al.*, 1984; Goff *et al.*, 1984). En general s'utilitzen soques deficientes en proteases, però amb mutacions letals condicionals, ja que les mutacions constitutives en proteases tenen el desavantatge de provocar creixements anormals i una incrementada labilitat. La utilització d'inhibidors de proteases tampoc és recomanable, ja que molts d'aquests agents indueixen l'expressió dels gens de la resposta al xoc tèrmic (Goff i Goldberg, 1985).

La regulació de l'expressió gènica no està només limitada a la transcripció i l'estabilitat del mRNA. L'inici de la traducció depèn de la regió 5' no traduïda del mRNA. Hi ha evidències que no només la seqüència RBS o el codó AUG determinen l'eficiència del procés, i que tant l'estructura com la seqüència d'aquesta regió afecten l'accessibilitat del transcrit pel ribosoma. En aquest aspecte, és important disposar de vectors d'expressió que continguin una seqüència RBS adequada prop d'un "polilinker" que permeti el clonatge dels gens d'interès.

1.1.4 Paper de la soca hoste utilitzada per l'expressió de proteïnes clonades.

A més d'intentar millorar tots aquells aspectes referents al DNA o mRNA corresponents al gen que es vol expressar, també té importància la soca bacteriana que s'utilitzi com a hoste per la seva expressió. Cal no oblidar que un sistema d'expressió està format per dos elements: el DNA i la soca bacteriana. El fons genètic de la bactèria hoste juga un paper important en l'expressió i acumulació final de producte, com és el cas d'alguns exemples ja citats de soques deficientes en proteases, o amb un fons genètic *recA*.

La identificació i caracterització en els darrers anys de nous gens moduladors de l'expressió gènica, com el gen *hha* d'*Escherichia coli* (Nieto *et al.*, 1991), així com el desconeixement de gens que codifiquen per proteases d'*E.coli* no descrites fins ara, fa pensar que hi ha altres gens encara no descrits que poden estar implicats en la modulació de l'expressió gènica. La seva identificació pot contribuir al desenvolupament de soques bacterianes modificades genèticament amb la finalitat d'utilitzar-les com a hostes en els sistemes d'expressió de proteïnes clonades.

1.2 EL GEN *hha* D'*Escherichia coli*.

El gen *hha* d'*Escherichia coli* ha estat identificat per la seva implicació en la regulació de l'expressió de l'alfa-hemolisina en aquesta bactèria (Nieto *et al.*, 1991).

L'alfa-hemolisina és una citotoxina considerada com a factor de virulència a *E.coli*, a més de ser un dels pocs exemples coneguts de proteïnes secretades al medi extern per aquest microorganisme. L'alfa-hemolisina no posseeix un pèptid senyal N-terminal, i segueix un mecanisme de secreció independent de la via de la seqüència senyal. El coneixement de l'organització genètica i del mecanisme de secreció de l'hemolisina ha permès englobar aquesta toxina en una família de citotoxines de bactèries Gram-negatives relacionades genètica i funcionalment, la família RTX, que inclou proteïnes de diferents espècies bacterianes, com la leucotoxina de *Pasteurella haemolytica* (Strathdee i Lo, 1987) o l'adenilat ciclasa/hemolisina de *Bordetella pertussis* (Glaser *et al.*, 1988).

Els determinants genètics que codifiquen per la síntesi i secreció de l'alfa-hemolisina poden ser plasmídics o cromosòmics. Tant estudis d'hibridació com la seqüenciació dels diferents determinants han permès trobar un elevat grau d'homologia entre ells (Berger *et al.*, 1982; Müller *et al.*, 1983; Hess *et al.*, 1986). En tots els casos estudiats, el determinant de l'hemolisina està format per un bloc de quatre gens continus, *hlyCABD*. El gen estructural que codifica pel precursor de l'hemolisina, amb un pes molecular de 107 kDa, és el gen *hlyA*. El producte del gen *hlyC*, de 18 kDa, és necessari per l'activació de l'hemolisina (Nicaud *et al.*, 1985). Per l'activació també cal que es doni una acilació dependent de la proteïna cel.lular transportadora de grups acil (Hardie *et al.*, 1991; Issartel *et al.*, 1991). Els gens *hlyB* i *hlyD* codifiquen per proteïnes

implicades en la secreció de la toxina al medi extern (Mackman *et al.*, 1985), procés en el que també hi intervé el producte del gen *tolC* (Wandersman i Delepelaire, 1990).

Un dels determinants hemolítics més ben caracteritzat és el del plàsmid pHly152. Aquest determinant conté, a més a més dels gens *hlyCABD*, una seqüència de 600 pb, *hlyR*, situada 1500 pb en posició 5' respecte a *hlyC*, necessària en *cis* per la correcta expressió i secreció de l'hemolisina (Vogel *et al.*, 1988). La transcripció de l'operó *hlyCABD* produeix dos missatgers, un de majoritari de 4 Kb (*hlyCA*) i un altre de minoritari de 8 Kb (*hlyCABD*). Ambdós comencen al mateix promotor, localitzat 400 pb davant del gen *hlyC*, i s'ha proposat que la síntesi del transcrit minoritari és dependent d'un procés d'antiterminació en un terminador rho-independent situat entre *hlyA* i *hlyB* (Koronakis *et al.*, 1988). En determinants hemolítics que no inclouen la seqüència *hlyR* es detecta una disminució molt important en la transcripció dels gens *hlyB* i *hlyD*, mentre que la transcripció dels gens *hlyC* i *hlyA* resulta menys afectada. Ha estat postulat que la seqüència *hlyR* seria necessària per evitar la terminació de la transcripció entre *hlyA* i *hlyB* (Koronakis *et al.*, 1988) .

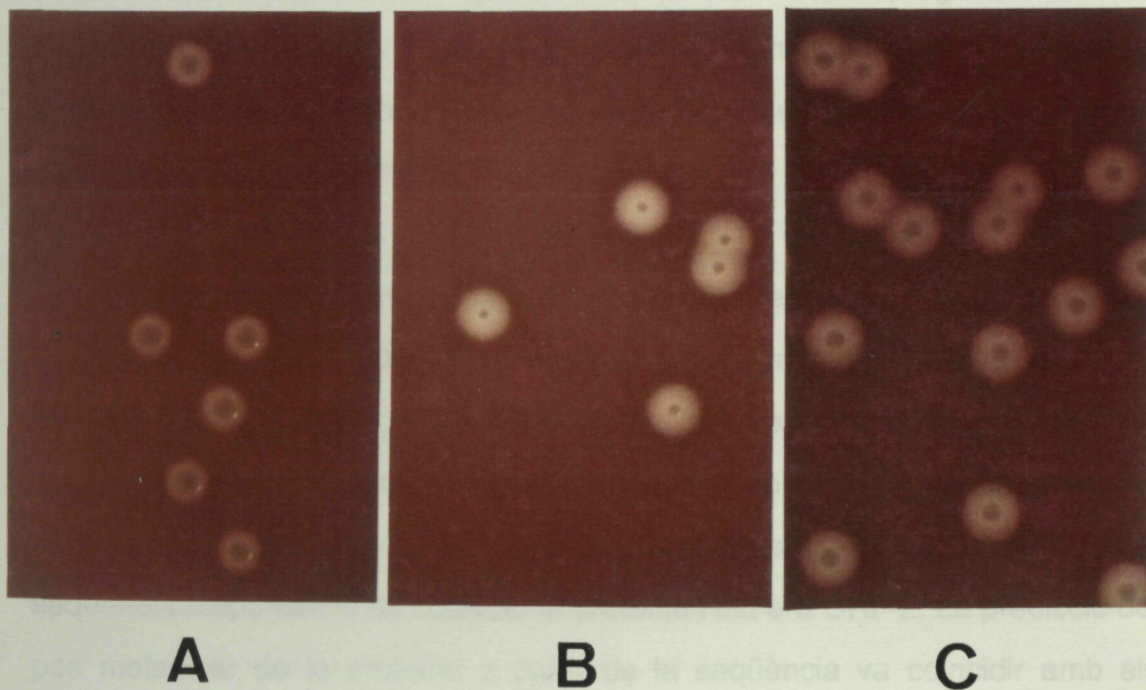
El plàsmid pANN202-312 és el resultat del clonatge del determinant hemolític del plàsmid pHly152 al vector pACYC184, però sense incloure la seqüència *hlyR*. Malgrat l'augment en el número de còpies de l'operó, les cèl.lules portadores d'aquest plàsmid presenten una escassa producció d'hemolisina. En l'intent d'obtenir més informació sobre els mecanismes de regulació de l'expressió de l'alfa-hemolisina codificada pel plàsmid pANN202-312, es va mutagenitzar la soca *E.coli* 5K (pANN202-312), que produeix petits halos d'hemòlisi quan creix en plaques d'agar-sang, esperant que alguna mutació cromosòmica fóra capaç de restaurar els nivells de producció d'hemolisina que

s'esperarien degut a l'augment en la dosi gènica. La mutagènesi amb transposons va permetre aïllar una sèrie de mutants, denominats *hha* ("high hemolytic activity"), en els quals s'incrementava dràsticament la producció d'hemolisina. La caracterització genètica va posar de manifest que tots els mutants tenien el transposó inserat al mateix locus. El fenotip dels mutants *hha* és similar al de soques parentals portadores del plàsmid pANN202-312R, que a més a més dels gens *hlyCABD* inclou la seqüència *hlyR*. Aquests resultats semblaven indicar que la mutació *hha* compensava l'absència de la seqüència *hlyR* al plàsmid pANN202-312 (Figura 1.2.1).

La valoració de l'activitat hemolítica en soques *hha* va permetre determinar que: 1) l'augment de l'activitat externa es relacionava amb un augment de la producció citoplasmàtica de proteïna, 2) que aquest augment no era degut a alteracions de les envolttes bacterianes, i 3) que no anava acompanyat de la sortida al medi extern de proteïnes periplasmàtiques, descartant-se per tant que es tractés d'una mutació de tipus "leaky" (Godessart *et al.*, 1988; Nieto, Tesi Doctoral, 1991).

El mapatge per conjugació amb soques Hfr i cotransducció de marcadors amb el bacteriòfag P1, va situar la mutació *hha* al minut 10,5 del mapa de lligament d'*Escherichia coli* (Godessart *et al.*, 1988). Es va comprovar que no corresponia a cap mutació en algun gen prèviament descrit. L'únic gen situat a la mateixa regió que podia tenir relació amb la mutació *hha* era el gen *nusB*, descrit com a factor de terminació de la transducció. La transformació d'una soca *nusB* amb el plàsmid pANN202-312 i la valoració de la seva activitat hemolítica va confirmar que no hi havia relació entre els dos gens (Nieto, Tesi Doctoral, 1991).

Figura 1.2.1 Colònies de les soques 5K (pANN202-312) (A), una soca *hha* (pANN202-312) (B) i 5K (pANN202-312R) (C).



A

B

C

El clonatge i subclonatge del gen *hha* va conduir a l'obtenció del plàsmid pUBM22, portador d'un insert de 1,7 Kb capaç de complementar la mutació *hha*, i posteriorment es va obtenir el plàsmid pUBM23, amb un insert de 1,4 Kb. L'anàlisi de restricció d'aquest fragment, juntament amb la informació de la que es disposava sobre la seva localització al cromosoma d'*E.coli*, va permetre situar la regió clonada dins el mapa físic de tot el cromosoma d'*E.coli* publicat per Kohara i col.laboradors (Kohara *et al.*, 1987) entre les coordenades 490 i 490,6 (Nieto *et al.*, 1991), que corresponen al minut 10,45 del mapa genètic d'*E.coli*. Estudis de mutagènesi insercional amb el transposó Tn5 i anàlisi de complementació van permetre delimitar la seqüència del gen *hha* en un fragment de 350 pb (Nieto *et al.*, 1991).

La seqüenciació del gen *hha* va mostrar la presència de dues pautes de lectura oberta: ORF-1 i ORF-2. De tota manera, es va demostrar que insercions de Tn5 dins la seqüència d'ORF-1, en regions no comuns amb ORF-2, no anul.laven l'efecte de complementació de la mutació *hha*, mentre que totes les insercions dins d'ORF-2 anul.laven la complementació. Això va suggerir que la seqüència responsable de codificar la proteïna Hha era ORF-2. La predicció del pes molecular de la proteïna a partir de la seqüència va coincidir amb els resultats obtinguts a partir de les anàlisis en minicèl.lules dels pèptids codificats per pUBM22. Segons la seqüència, la proteïna Hha tindria 72 aminoàcids i un pes molecular de 8.629 Da, i les anàlisis en minicèl.lules mostraven una proteïna d'aproximadament 8.000 Da.

La proteïna Hha modula l'expressió de l'hemolisina codificada pel plàsmid pANN202-312 a nivell transcripcional. L'anàlisi de l'efecte de la mutació *hha* sobre la transcripció de l'operó de l'hemolisina va demostrar que, a soques *hha*, la quantitat del transcrit *hlyCA* era 15 vegades més gran que a la soca parental.

La presència de la seqüència *hlyR* també produeix un augment en la concentració d'aquest transcrit, encara que en menor magnitud, només de 4 vegades (Jubete, Tesi Doctoral, 1992; Nieto *et al.*, 1991). L'increment en la concentració del transcrit podria ser degut a un increment en la transcripció o a una major estabilitat d'aquest missatger. S'ha determinat, però, que la vida mitja del mRNA corresponent a *hlyCA* és menor a la soca mutant que a la soca parental (Jubete, Tesi Doctoral, 1992). Sembla, per tant, que l'efecte de la mutació *hha* és el d'augmentar els nivells de transcripció de l'operó de l'hemolisina, independentment de la seqüència *hlyR* (Carmona, resultats no publicats).

També s'ha pogut demostrar que la mutació *hha* no limita el seu efecte a l'expressió de l'hemolisina, sinó que té un comportament pleotròpic. La mutació afecta l'expressió de proteïnes heteròlogues clonades a *E.coli* provocant, en tots els casos, un augment de la seva expressió. Aquest efecte ha estat determinat per l'aerolisina d'*Aeromonas hydrophila* (Nieto *et al.* 1987), per una endoglucanasa de *Clostridium cellulolyticum* (Blanco *et al.*, 1991), i per la proteïna quimèrica, entre la toxina diftèrica i la interleuquina-2, ABI508 (Carmona, Tesi Doctoral, 1992).

La recerca inicial de possibles homologies entre la seqüència de la proteïna Hha i d'altres proteïnes descrites no va permetre trobar en cap cas una homologia significativa. El percentatge més elevat d'identitat va ser del 29% amb el producte gènic de *sulA*, component del sistema SOS que inhibeix la divisió cel.lular. La recent publicació de la seqüència del gen *ymoA* de *Yersinia enterocolitica* (Cornelis *et al.*, 1991) va permetre trobar una homologia del 83% entre la seqüència d'aminoàcids de les proteïnes YmoA i Hha. La mutació *ymoA* va ser aïllada a *Y.enterocolitica* en intentar analitzar la regulació per temperatura

de l'expressió de diferents factors de virulència en aquest microorganisme. Els productes dels gens *yop* (proteïnes implicades en la virulència) i *yadA* (adhesines) són expressats per *Y.enterocolitica* a 37°C, però no a 20°C. Mutants *ymoA* expressen també aquests factors de virulència a 20°C. El fenotip dels mutants *ymoA* és similar al dels mutants *drdX* d'*E.coli* (Goransson *et al.*, 1990), i *virR* de *S.flexnerii* (Maurelli i Sansonetti, 1988). En ambdós casos, es tracta d'al·lels del mateix gen, el gen *hns*, que codifica per la proteïna tipus histona H-NS (Hinton *et al.*, 1992). Per aquest motiu i per altres evidències experimentals, malgrat la manca d'homologia entre les proteïnes H-NS i YmoA, Cornelis i col.laboradors han proposat com a hipòtesi que la proteïna YmoA sigui també una proteïna de tipus histona. Resultats preliminars (Cornelis *et al.*, 1991) suggereixen que aquesta proteïna podria estar implicada en la regulació del grau de superenrotllament del DNA. L'homologia entre els gens *ymoA* i *hha* va fer pensar que el gen *hha* podria codificar per una proteïna relacionada també amb la topologia del DNA, una proteïna "histone-like". Recentment s'han obtingut resultats que suggereixen que la proteïna Hha està també relacionada amb canvis en el grau de superenrotllament del DNA (Carmona, Tesi Doctoral. 1992; De la Cruz *et al.*, en premsa). Això suggereix que la proteïna Hha i la proteïna YmoA podrien formar part d'una nova família de proteïnes que modulen l'expressió gènica a bacteries mitjançant canvis en la topologia del DNA.

1.3 ELS GENS *tolQRAB* DEL CROMOSOMA D'*Escherichia coli*.

Els gens *tolQRAB*, mapats al minut 16,7 del mapa de lligament d'*Escherichia coli* (Bachmann, 1990), han estat descrits per la seva implicació en la tolerància a colicines, la tolerància a la infecció per bacteriòfags filamentosos i per altres efectes pleotròpics associats a mutacions en aquests gens (com per exemple les mutacions "leaky").

Estudis genètics han conduït a la identificació de diferents gens, els productes dels quals són necessaris pel transport de colicines del grup A i el DNA de cadena senzilla de bacteriòfags filamentosos a l'interior de les cèl·lules sensibles d'*E.coli*. Aquestes mutacions, que no afecten la unió de les colicines o dels bacteriòfags als corresponents receptors, no permeten la translocació del DNA fàgic o de les colicines fins la seva diana, i per això han estat anomenades **tolerants** (*tol*). Els productes codificats per aquests gens formen part d'un sistema de transport conegut com a sistema d'importació Tol.

El terme colicines ja va ser utilitzat l'any 1946, per Gratia i Fredericq, per anomenar una nova classe d'antibiòtics que causaven la mort a cèl·lules sensibles de la mateixa espècie o d'espècies bacterianes properes a la que els produïa, generalment *Escherichia coli*. Més endavant, es va ampliar el concepte a bacteriocines, en trobar molècules similars en altres enterobactèries (Reeves, 1965).

Les colicines són proteïnes d'elevat pes molecular, d'entre 40 i 60 kDa, codificades per plàsmids. El mateix plàsmid que codifica la colicina també proporciona els productes gènics necessaris per la immunitat colicinogènica

(insensibilitat de la cèl.lula productora a la colicina produïda) i pels mecanismes de secreció de les colícines al medi extracel.lular (Pugsley, 1984a; 1984b).

L'acció de les colícines contra les cèl.lules sensibles comprèn tres etapes:

- . **Adsorció** al receptor de la superfície de la cèl.lula sensible.

- . **Translocació** fins la diana cel.lular.

- . **Efecte** sobre la diana cel.lular provocant la mort de la bactèria sensible.

S'han trobat evidències que indiquen que aquestes tres etapes podrien estar associades a tres dominis diferents de la seqüència d'aminoàcids de les colícines. La regió N-terminal seria la implicada en la translocació de la colicina des de la superfície bacteriana fins a la diana cel.lular, el domini d'unió al receptor es localitzaria a la regió intermèdia de la proteïna, i la regió C-terminal seria l'encarregada de l'acció sobre la diana cel.lular (Cramer *et al.*, 1983; Pugsley, 1984b; Lazdunski *et al.*, 1988).

Una vegada alliberades de la cèl.lula productora, per un mecanisme en el qual intervenen productes gènics codificats pels mateixos plàsmids que codifiquen per les colícines (Pugsley, 1984a), cal que aquestes s'adsorbeixin als receptors específics de la superfície de les cèl.lules sensibles, en la que seria la primera etapa del seu efecte.

Diferents colícines poden utilitzar el mateix receptor, encara que el domini reconegut pot ser el mateix, com és el cas de les colícines E2 i E3, o diferent,

com en les colicines E1 i E3. La unió de la colicina al receptor específic es dona tant a 37°C com a 4°C, i és un procés independent de cap aport energètic (Pugsley, 1984a).

Hi ha diferents proteïnes de membrana externa d'*Escherichia coli*, que actuen com a receptors per les colicines. El producte codificat pel gen *btuB* actua com a receptor per les colicines E (Mock i Pugsley, 1982). La mateixa proteïna, juntament amb la proteïna de membrana externa OmpF i el lipopolisacàrid, formen el receptor de la colicina A (Chai *et al.*, 1982). Les colicines B i D utilitzen el mateix receptor, el producte gènic de *fepA* (Pugsley, 1984a). D'altra banda, les colicines I (Ia i Ib) utilitzen el producte gènic de *cir* (Nau i Konisky, 1989), i el receptor de la colicina K és el producte gènic de *tsx* (Hantke, 1976).

La major part de proteïnes de membrana que actuen com a receptors per les colicines estan també implicades en altres funcions fisiològiques, generalment la captació de nutrients. BtuB és el receptor de la vitamina B₁₂, Tsx és una proteïna implicada en la captació de nucleòsids, i FepA i Cir participen en la captació de ferro (Pugsley, 1984a).

L'associació entre colicines i nutrients pel que fa als receptors, podria explicar el manteniment d'aquestes molècules a la superfície cel.lular. És evident que la seva presència a la membrana no oferiria cap avantatge a la cèl.lula si el receptor només fos utilitzat per les colicines (Di Masi *et al.*, 1973).

Les colicines també comparteixen receptors amb determinats bacteriòfags, com BF23, que s'adsorbeix a BtuB (Cavard i Lazdunski, 1981), o el fag T6, que ho fa a Tsx (Hantke, 1976).

Com que un mateix receptor pot ser compartit per diferents molècules (colicines, nutrients...) que utilitzen diferents vies de translocació, s'ha suggerit que només serien funcionals per a cadascuna de les molècules aquells receptors que mantinguin una interacció directa amb les proteïnes implicades en la translocació d'aquesta molècula a través de la membrana (Pattus, 1990).

L'estudi dels receptors de les colicines s'ha fet mitjançant l'obtenció de mutants resistents. Cal diferenciar entre els mutants **resistents** i els **tolerants**. El primer terme es reserva per aquelles mutacions que tenen alterada la funció del receptor, de manera que les colicines no es poden adsorbir a la superfície cel·lular, mentre que els mutants tolerants són aquells que tenen alterada alguna etapa de la translocació. En aquest darrer tipus de mutants les colicines es poden adsorbir als receptors però no poden accedir a la diana cel·lular.

La majoria de les colicines conegudes exerceixen el seu efecte sobre les cèl·lules sensibles seguint un dels dos patrons generals (Konisky, 1982; Pugsley, 1984b; Pattus *et al.*, 1990):

- . degradació enzimàtica de DNA o RNA: colicines E2, E3, E4, E5, E6, E7, i DF13.
- . desestabilització energètica de la membrana per formació de porus o canals. Són les anomenades colicines formadores de porus. Inclou les colicines A, B, E1, Ia, Ib i K.

Les colicines E3 o DF13 són enzims amb activitat RNàsica, i la colicina E2 presenta activitat endonucleolítica sobre el DNA. Aquest tipus d'acció, amb dianes cel·lulars localitzades al citoplasma, implica que aquestes colicines han

de travessar les envoltres cel.lulars per poder interaccionar amb la seva diana. S'ha demostrat que les colicines E3 i DF3 tenen activitat RNàsica endògena, i la seva acció es localitza sobre el rRNA 16S, de manera que s'interfereix la síntesi de proteïnes. La colicina E2 actua inhibint la síntesi de DNA, i condueix a la seva degradació.

L'altre tipus d'activitat mostrat per les colicines és la formació de canals a la membrana citoplasmàtica, amb la consegüent pèrdua del potencial de membrana. Les cèl.lules tractades amb aquestes colicines perden potassi, i esdevenen més permeables al magnesi i al cobalt. La pèrdua de magnesi i potassi constitueixen les causes primàries de la mort cel.lular.

L'entrada de les colicines a les cèl.lules sensibles té lloc en dues etapes: unió al receptor i translocació. Aquestes dues etapes es diferencien en que durant la primera fase les colicines són sensibles a proteases i poden ser reconegudes per anticossos, mentre que a la segona etapa en són inaccessibles. A més a més, a diferència del procés d'adsorció, el procés de translocació és dependent de l'energia del potencial de membrana i només és parcialment efectiu a baixes temperatures (Pugsley, 1984a).

L'estudi de la translocació de les colicines fins la seva diana s'ha desenvolupat mitjançant l'obtenció de mutants tolerants. Aquests estudis han permès conèixer diferents gens implicats en la translocació, dels quals s'han identificat la major part dels productes gènics i la seva localització. La majoria dels mutants tolerants tenen efectes pleotròpics sobre la tolerància o insensibilitat a colicines i bacteriòfags, l'alliberament de proteïnes periplasmàtiques i la sensibilitat de les cèl.lules a determinats detergents i agents quelants. Aquest fet

ha estat el principal obstacle pel coneixement de les vies de translocació de les diferents colicines.

L'estudi d'un gran nombre de mutants tolerants i de les toleràncies creuades a diferents colicines va permetre classificar les colicines en dos grans grups (Davies i Reeves, 1975), relacionats amb la via de translocació que segueixen:

- . **Grup A:** colicines amb translocació dependent dels productes gènics de *tolQRAB*, que inclou les colicines A, E1, E2, E3, K, L, i N.

- . **Grup B:** colicines amb translocació dependent de TonB, ExbB i ExbD, que inclou les colicines B, Ia, Ib, V, D i M.

Aquestes dues vies de translocació són comunes amb l'entrada de DNA d'alguns bacteriòfags. Així, el fag T1 utilitza la mateixa via de translocació que les colicines del grup B, i els bacteriòfags filamentosos la mateixa que les colicines del grup A (Pattus *et al.*, 1990).

TonB és una proteïna necessària en processos de captació de nutrients, com la vitamina B₁₂ o el ferro. S'ha suggerit que aquesta proteïna podria estar ancorada a la membrana citoplasmàtica per l'extrem amino-terminal, i a la membrana externa per l'extrem carboxil (Pattus *et al.*, 1990). També s'han presentat evidències de que hi ha una interacció directa entre la proteïna TonB i els receptors de membrana TonB-dependents (Heller *et al.*, 1988). S'ha demostrat que les colicines Ton-B dependents tenen al seu extrem amino-terminal el mateix pentapèptid consens que els receptors de membrana implicats

en l'entrada de nutrients TonB-dependents (Schramm *et al.*, 1987; Nau i Konisky, 1989).

El conjunt de gens *tolQRAB* ha estat complex de definir ja que mutacions en aquests gens afecten diferents processos: translocació de colicines de la classe A, entrada de DNA de bacteriòfags filamentosos, etc... a més a més de causar altres efectes pleotròpics, com l'alliberament al medi extern de proteïnes periplasmàtiques (mutants "leaky") o la sensibilitat a determinats detergents, agents quelants, etc. Els diferents efectes produïts per mutacions en aquesta regió han provocat que diversos autors descriguin les mateixes mutacions en funció de diferents fenotips: tolerància a colicines (Nagel de Zwaig i Luria, 1967), tolerància a la infecció per bacteriòfags filamentosos (Sun i Webster, 1986), o alliberament de proteïnes periplasmàtiques (mutants "leaky"; Lazzaroni i Portalier, 1981).

Els gens *tolA* i *tolB* es van descriure l'any 1967 (Nagel de Zwaig i Luria, 1967). Aquests autors van caracteritzar diferents mutacions que causaven tolerància a colicines i les van agrupar en tres classes: *tolII* (*tolA*), que causava tolerància a les colicines A, E1, E2, E3 i K, a més d'elevada sensibilitat a desoxicolat sòdic i EDTA; *tolIII* (*tolB*), amb les mateixes característiques que *tolII*, excepte pel que fa a la tolerància a la colicina E1; i *tolIV*. Les mutacions a *tolII* i *tolIII* es van mapar prop del minut 17 per cotransducció amb *gal*, mentre que la mutació *tolIV* es va situar cap al minut 40, prop del gen *his*.

Es va demostrar que els efectes pleotròpics de les mutacions descrites en els gens *tolA* i *tolB* no eren deguts a mutacions múltiples (Bernstein *et al.*, 1972). Més endavant es va descriure un altre grup de complementació en aquesta regió, que causava tolerància parcial a colicines del grup A, raó per la qual es

va anomenar *tolP* (Bershtein *et al.*, 1972). Fins aquell moment, la regió va quedar ordenada com a *tolP-tolA-tolB*.

L'any 1986 es va descriure un nou gen, anomenat *fii*, que mapava a la mateixa regió que els gens *tolA* i *tolB*, al costat de *tolA*. Es va relacionar aquest gen amb una proteïna de 24 kDa. Mutacions en el gen *fii* causaven tolerància a la infecció per bacteriòfags filamentosos (Sun i Webster, 1986). En aquests mutants els bacteriòfags poden adsorbir-se a la superfície de la bactèria, el que indica que el seu receptor no està alterat, però no poden introduir el seu DNA. La relació entre *fii* i *tolP* no és clara, ja que mentre s'havia descrit que mutacions en el gen *tolP* causaven tolerància parcial a colicines, mutacions en el gen *fii* presenten el mateix fenotip de resistències a colicines que les mutacions a *tolA*. També es va demostrar que aquesta regió, *fii-tolA-tolB*, quedava inclosa dins un fragment de 4,3 Kb del cromosoma d'*E.coli* (Sun i Webster, 1986).

La seqüenciació del DNA corresponent al gen *fii* (Sun i Webster, 1987), va demostrar que hi havia tres possibles pautes de lectura oberta (ORF): ORF1, ORF2 i ORF3, de les quals es van poder identificar els corresponents productes en assajos en minicèl·lules de plàsmids portadors de les diferents seqüències. Es va demostrar que la ORF1 codificava per una proteïna de 16 kDa i que la mutagènesi per inserció d'aquesta seqüència no donava cap fenotip relacionat amb les mutacions *tol*. Per una altra banda, es va identificar la ORF2 com la seqüència corresponent a *fii*, codificant per una proteïna de 24 kDa. La mutagènesi per inserció en aquesta ORF causava el fenotip de la mutació *fii*. Finalment, es va determinar que la seqüència corresponent a l'ORF3 codifica per una proteïna de 17 kDa. La mutagènesi d'aquesta seqüència causa un fenotip similar a *tolA* o *fii*.

Es va proposar ordenar la regió *tol* del minut 17 del cromosoma d'*E.coli* com a *tolQRAB*, on *tolQ* correspon a *fii* i el nou gen, *tolR*, a la seqüència d'ORF3 (Sun i Webster, 1987). Sembla que *tolP* correspondria a *tolQ* (Bachmann, 1990), però la relació no és clara.

Els mutants en els gens *tolQ*, *tolR* o *tolA*, presenten fenotips molt similars (tolerància a les colicines A, E1, E2, E3, K i resistència a la infecció per fags filamentosos), mentre que els mutants *tolB* són sensibles a la colicina E1 i a la infecció per fags filamentosos, però resistents a les colicines A, E2, E3 i K.

Altres autors van aïllar, de manera independent, altres mutacions per les seves característiques d'alliberament de proteïnes periplasmàtiques ("leaky"), que afectaven a la mateixa regió del cromosoma d'*E.coli*. Una d'aquestes mutacions, anomenada originalment *lkyB*, es va seleccionar per causar l'alliberament de la fosfatasa alcalina al medi extern (Lazzaroni i Portalier, 1981). Es va trobar que els mutants en aquests locus presentaven una elevada sensibilitat al desoxicolat sòdic i a l'EDTA, eren resistents a les colicines E1 i A, i parcialment resistents a alguns bacteriòfags. De tota manera, la caracterització de les envoltures de mutants *lkyB*, que demostrava una disminució en el contingut de les proteïnes de membrana externa OmpF i LamB (Lazzaroni *et al.*, 1986), no els va relacionar llavors amb les mutacions *tol* descrites prèviament. Una altra mutació descrita com a secretora de β -lactamasa, *exc*, també es va mapar a la mateixa regió (Fognini-Lefebvre i Portalier, 1984). Posteriorment, la major part de mutacions descrites com a *lkyB* o *exc* van ser assignades als locus descrits *tolA* i *tolB* (Fognini-Lefebvre *et al.*, 1987). Algunes de les mutacions descrites com a *exc* no van ser relacionades amb cap dels gens *tol*, ja que no conferien tolerància a les colicines de la classe A (Fognini-Lefebvre *et al.*, 1987), i aquests autors van

definir un altre locus, anomenant-lo *excC*. Malgrat tot, el darrer mapa de lligament del cromosoma d'*E.coli* (Bachmann, 1990), assigna aquest locus a *tolA*.

L'anàlisi més detallada del gen *tolA*, va demostrar que codifica per una proteïna de 421 aminoàcids, amb un pes molecular de 44 kDa (Levengood i Webster, 1989; Levengood *et al.*, 1991; Webster, 1991). La seqüència d'aminoàcids de TolA pot dividir-se en tres dominis. El domini amino-terminal, de 34 aminoàcids, seria el punt d'ancoratge a la membrana interna. El domini carboxi-terminal, de 120 residus, sembla ser el necessari per la funció de TolA, per interacció amb el complex del receptor de la membrana externa. Els residus entre aquests dos dominis estarien localitzats al periplasma, connectant el domini funcional amb el domini d'ancoratge a la membrana interna. Sembla ser que TolA és una proteïna present en molt poca quantitat a la cèl.lula, i per aquesta raó difícilment observable, encara que estigui clonada en un vector multicòpia, si s'ha mantingut el seu promotor.

Pel que fa a *tolB*, la seqüenciació predeïa una proteïna de 431 aminoàcids, amb un pes molecular de 47,5 kDa i localització a les envoltures cel.lulars. L'anàlisi en minicèl.lules de plàsmids portadors de la seqüència corresponent va demostrar que hi havia dues proteïnes, una del pes predit, 47,5 kDa, i una de més petita, de 43 kDa, possiblement resultat del processament post-traducciona l de l'anterior. La proteïna de 47,5 kDa, TolB, es troba associada a la membrana citoplasmàtica. En canvi, s'ha observat que la proteïna de 43 kDa, TolB*, es localitza a l'espai periplasmàtic (Levengood i Webster, 1989; Webster, 1991).

El gen *tolQ* ha estat seqüenciat i codifica per una proteïna de 230 aminoàcids, amb un pes molecular de 25,5 kDa (Sun i Webster, 1987). Les anàlisis de la seva seqüència d'aminoàcids suggereixen que la proteïna TolQ

conté tres dominis que podrien correspondre a dominis d'unió a la membrana. Sembla ser que la proteïna TolQ s'uneix inicialment a la membrana interna o citoplasmàtica, per després acoblar-se a zones d'adhesió entre les dues membranes (Bourdineaud *et al.*, 1989).

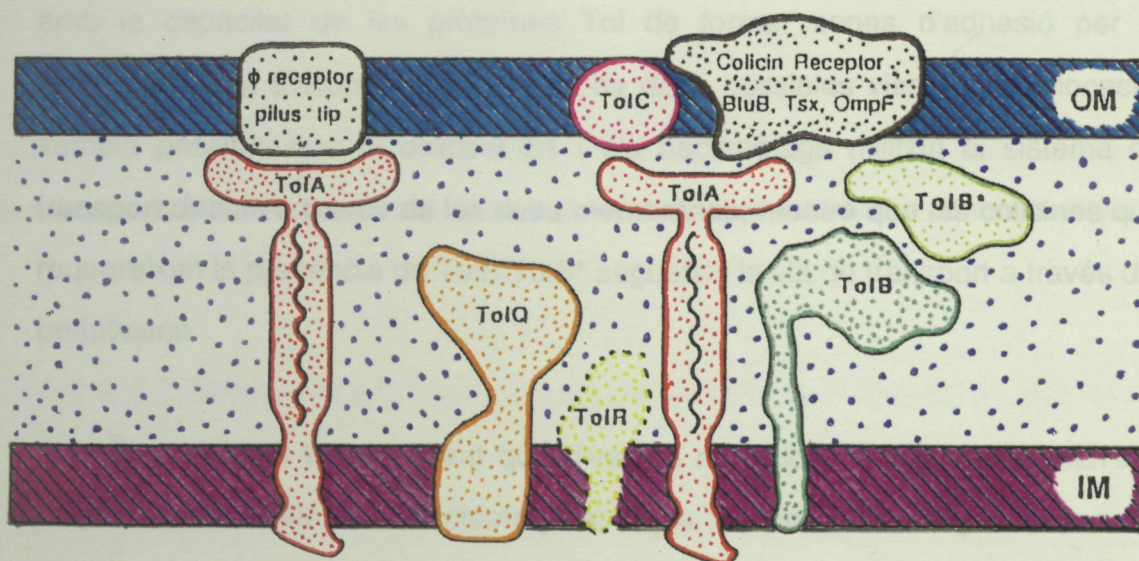
TolR és una proteïna de 141 aminoàcids i 15,5 kDa (Sun i Webster, 1987), de la qual no es coneix la seva localització, excepte que conté un possible domini d'ancoratge a la membrana.

A més de les proteïnes TolQ, TolR, TolA i TolB, hi ha altres proteïnes Tol que intervenen en els processos de transport específic de colicines fins la seva diana, i que estan codificades per gens situats a altres regions del cromosoma (Webster, 1991). Així, el producte del gen *tolC* (mapat al minut 66) és necessari per l'entrada de colicina E1. La proteïna TolC, de 467 aminoàcids i 52 kDa, correspon segurament a una proteïna minoritària de la membrana externa. A més a més, mutacions en el gen *tolZ* (mapat al minut 78) confereixen tolerància a certes colicines del grup A i B. Aquest fet està segurament relacionat amb la funció de TolZ en la generació de gradients electroquímics de protons (Matsuzawa *et al.*, 1984), ja que alguns estudis suggereixen que és necessari un estat energitzat de la membrana per la translocació de determinades colicines (Jetten i Jetten, 1975; Okamoto, 1975). De tota manera, no es disposa de cap dada sobre el pes molecular o la localització de TolZ.

La funció concreta de cadascuna de les proteïnes codificades pel grup de gens *tolQRAB* no ha estat determinada. La seva relació amb la tolerància a determinades colicines o bacteriòfags no resideix en el fet que aquestes proteïnes actuïn com a receptors a la superfície bacteriana. L'any 1991, Webster va proposar un model pel sistema de transport Tol-dependent (Figura 1.3.1, pàg.

41; Webster, 1991). En aquest model, les proteïnes TolQRA formen la major part del sistema, ja que mutacions en aquests gens són les que afecten a l'espectre més ampli de colicines del grup A i bacteriòfags filamentosos. TolB, proteïna situada a la membrana interna, només està implicada en el sistema de translocació de determinades macromolècules. Mutacions en el gen *tolB* no afecten l'entrada de la colicina E1 o del DNA de bacteriòfags filamentosos. Per tal que es produeixi la correcta translocació de les colicines des del receptor fins a la diana cel·lular és necessària la presència d'altres proteïnes Tol. Per exemple, la proteïna TolC és necessària per tal que el complex ColE1-BtuB interaccioni amb el sistema TolQRA. Les proteïnes TolB i TolB* podrien desenvolupar la mateixa funció per les colicines A, K, i E (a excepció de la colicina E1). Un altre factor que també intervé en la translocació de les colicines sembla que és la fluïdesa de la membrana. S'ha demostrat que les colicines A i K s'uneixen al seu receptor però no són translocades a temperatures inferiors a 15°C (Bourdineaud *et al.*, 1990). Igualment, l'estructura de les molècules que s'han de transportar també pot influenciar el procés d'entrada.

Figura 1.3.1 Representació esquemàtica de la possible localització de les proteïnes Tol més ben caracteritzades. La localització de TolR està basada en la predicció de la seva seqüència d'aminoàcids (extret de Webster, 1991).



La localització de les proteïnes Tol en el model proposat per Webster (Figura 1.3.1, pàg. 41) és consistent amb les dues possibles vies d'entrada de macromolècules. En el primer cas, la molècula seria transportada a través de la membrana externa fins l'espai periplasmàtic, amb la posterior entrada a través de la membrana interna. La proteïna TolB*, per la seva localització periplasmàtica, podria jugar un paper actiu en aquest model de transport. El segon cas correspondria a la translocació directa a través de les zones d'adhesió. La possible localització de TolQ en aquestes zones seria consistent amb la capacitat de les proteïnes Tol de formar zones d'adhesió per la translocació. Si s'assumeix l'existència de dues possibles vies de translocació, sembla possible que la colicina E1 i els bacteriòfags utilitzin el sistema de transport directe a través de les dues membranes, mentre que les colícines que requereixen la presència de TolB/TolB* segueixin la via de transport a través del periplasma.

És important tenir present que diverses mutacions en els gens *tolQRAB* presenten diferents efectes pleotròpics, i que ha estat descrit que mutacions independents dins el mateix cistró condueixen a efectes fenotípics diferents (Fognini-Lefebvre *et al.*, 1987), que van des de la tolerància a colícines, fins a la disminució en la quantitat de determinades proteïnes de membrana externa o l'alliberament diferencial de proteïnes periplasmàtiques. Cal destacar que en la descripció d'algunes mutacions en els gens *tolA* o *tolB* s'ha demostrat que l'efecte d'alliberament de proteïnes al medi va acompanyat d'un augment en la producció de la proteïna alliberada, com en el cas de mutacions definides inicialment com *exc* en relació a l'alliberament de β -lactamasa (Fognini-Lefebvre i Portalier, 1984).

1.4 OBJECTIUS D'AQUESTA TESI.

Els objectius d'aquest treball s'emmarquen en el context d'una àmplia línia d'investigació, que ha tingut com a plantejament la caracterització de la mutació *hha* d'*E.coli*, per tal d'estudiar el mecanisme pel qual la proteïna Hha regula l'expressió gènica, i aprofitar les característiques pleotròpiques d'aquesta mutació per dissenyar una soca d'*E.coli* que optimitzi l'expressió de proteïnes heteròlogues. Dins aquest plantejament global, en aquest treball s'han considerat els següents objectius:

1. Disseny d'una sonda del gen *hha* per estudiar, mitjançant hibridacions de tipus "Southern", la seva distribució a diferents soques d'*E.coli* i a la família *Enterobacteriaceae*.
2. Obtenció d'un mutant *hha* derivat de la soca *E.coli* HB101, per tal de poder aprofitar la mutació *hha* per l'expressió de proteïnes heteròlogues clonades en plàsmids multicòpia en un fons genètic *recA*.
3. Identificació de nous gens moduladors de l'expressió gènica a *E.coli* amb la finalitat de construir una soca en la que, aprofitant les característiques de la mutació *hha*, s'incloguessin altres mutacions que possibilitessin optimitzar l'expressió gènica.

2 Materials i mètodes

2.1 SOQUES BACTERIANES, PLÀSMIDS I BACTERIÒFAGS.

La major part de les soques utilitzades en aquest treball pertanyen a l'espècie *Escherichia coli*, bactèria classificada a la Família *Enterobacteriaceae*, a la secció 5 (bacils Gram negatius facultativament anaerobis), del Volum I de la 1^{era} edició del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Les característiques de les soques utilitzades es troben a la Taula 2.1.1. S'han utilitzat, de manera puntual, altres soques d'*E.coli*, així com d'altres espècies bacterianes de la mateixa família. Aquestes han estat soques de *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia intermedia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* i *Salmonella typhimurium*. Les característiques d'aquestes soques es troben descrites als apartats corresponents. A la Taula 2.1.2 es troben indicats els plàsmids que s'han utilitzat i a la Taula 2.1.3 els bacteriòfags. S'han utilitzat bacteriòfags derivats de lambda i de P1. Els dos bacteriòfags, de genoma compost per DNA de cadena doble, han estat utilitzats rutinàriament com a eines de laboratori. Els derivats del fag lambda s'han utilitzat generalment com a vectors de transposons per mutagènesi, i els derivats de P1 com a vehicles de transducció generalitzada.

Taula 2.1.1 Soques d'*Escherichia coli*.

Soca	Característiques	Referència
5K	F- $r_k^- m_k^-$ <i>rpsL thr thi leu lacZ</i>	Juárez <i>et al.</i> (1984)
HB101	<i>supE44 hsd20 r_b^- m_b^- recA56 ara-14</i> <i>proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	Sambrook <i>et al.</i> (1989)
C600	<i>supE44 hsdR thi-1 thr-1 leuB6</i> <i>lacY1 tonA21</i>	Young i Davis (1983)
Hha-2	5K <i>hha::Mud1</i>	Godessart <i>et al.</i> (1988)
Hha-2T	derivat ts+ d'Hha-2	Nieto <i>et al.</i> (1987)
CM209	5K <i>hap-9::Tn5</i>	Aquest treball
CM206	5K <i>hap-6::Tn5</i>	Aquest treball
CM329	5K <i>hap-9::Tn5, hha::Mud1</i>	Aquest treball
A592	F- <i>thr-1 leuB6 tonA21 lacY1 supE44</i> <i>tolA1 lambda- thi-1</i>	B. Bachmann
A593	F- <i>thr-1 leuB6 tonA21 lacY1 supE44</i> <i>tolB2 lambda- thi-1</i>	B. Bachmann

Taula 2.1.2 Plàsmids.

Plàsmid	Característiques	Referència
pANN202-312	<i>hlyA, hlyC, hlyB, hlyD, Cm^r</i>	Goebel i Hedgpeth (1982)
pHPC3-700	<i>aerC, aerA, aerB, Ap^r, Tc^r</i>	Nieto <i>et al.</i> (1987)
pUBM22	<i>hha+</i> , Ap ^r	Nieto <i>et al.</i> (1991)
pUBM20	<i>hha+</i> , Ap ^r	Nieto <i>et al.</i> (1991)
pUBM90	<i>hha+</i> , Ap ^r	Carmona (Tesi Doctoral, 1992)
pUBM101	<i>aerC, aerA, aerB, Ap^r, Cm^r</i>	Aquest treball
pUBM120	<i>hha+</i> , Cm ^r	Aquest treball
pACYC184	vector de clonatge, Ap ^r , Cm ^r	Bolivar i Backman (1979)
pBR322	vector de clonatge, Ap ^r , Tc ^r	Bolivar i Backman (1979)
pBP47	CMCasa de <i>B. polymyxa</i> , Tc ^r	F.I.J. Pastor
pJMKam-4	ABI508, Km ^r	Murphy <i>et al.</i> (1989)

Taula 2.1.3 Bacteriòfags.

Bacteriòfag	Característiques	Referència
Lambda 467	lambdab221, <i>rex</i> ::Tn5, cl857, <i>Oam</i> 29, <i>Pam</i> 80	De Bruijn i Lupsky (1984)
Lambda 561	lambdab221, cl857::Tn10 <i>Oam</i> 29, <i>Pam</i> 80	Way <i>et al.</i> (1984)
P1 <i>cm ts</i>	<i>Cm'</i> <i>cts</i>	Miller (1972)

2.2 MEDIS DE CULTIU I ANTIBIÒTICS.

2.2.1 Medis de cultiu.

Es van utilitzar diferents medis, líquids i sòlids, pel cultiu de bacteries:

- LB (Luria Broth; Sambrook *et al.*, 1989). El medi es va preparar segons la següent composició: NaCl 10 g/l (Panreac), peptona trípica de caseïna 10 g/l (Adsa-Micro), extracte de llevat 5 g/l (Adsa-Micro), i va ser utilitzat de manera rutinària com a medi de cultiu líquid pel creixement bacterià.

- Agar-LB: utilitzat com a medi sòlid per cultius en plaques, té la mateixa composició que el medi líquid LB, més 15 g/l d'agar-agar (Agar per Bacteriologia, Adsa-Micro).

- Agar-sang: medi de cultiu sòlid preparat afegint sang de be desfibrinada estèril (Oxoid o Biocheck) al 5% a Agar-LB refredat a 50°C.

- Agar-tou-LB: utilitzat per l'obtenció de lisats fàgics, té la mateixa composició que el medi líquid LB, amb una concentració d'agar-agar de 6 a 8 g/l.

- YM: medi emprat pel creixement de la soca *E.coli* CS1045, utilitzada per la replicació de lambda::Tn10. La seva composició és: NaCl 2,5 g/l, peptona trípica de caseïna 10 g/l, extracte de llevat 2 g/l i maltosa 2 g/l (Merck).

- Agar-YM: utilitzat per l'obtenció de lisats de lambda::Tn10, té la mateixa composició que el medi YM més 15 g/l d'agar-agar.

- Agar tou-YM: utilitzat per l'obtenció de lisats fàgics, té la mateixa composició que el medi YM, més agar-agar al 0,6-0,8%.

2.2.2 Antibiòtics.

Els medis de cultiu es van suplementar amb diferents antibiòtics en funció de les necessitats. Els antibiòtics van ser preparats i utilitzats tal com es descriu a la bibliografia general (Sambrook *et al.*, 1989).

- Ampicilina (Ap): preparada una solució mare de la sal sòdica (Boehringer Mannheim) a una concentració de 50 mg/ml en aigua destil.lada i esterilitzada per filtració, es va utilitzar a concentracions finals de 25 a 50 µg/ml.

- Cloramfenicol (Cm): preparada una solució mare de cloramfenicol (Fluka) a una concentració de 100 mg/ml en etanol absolut (Panreac), es va utilitzar a una concentració final de 50 µg/ml pel cultiu de soques amb resistència plasmídica, i a 12,5 µg/ml pel de soques lisògenes pel bacteriòfag P1 *cm ts*.

- Kanamicina (Km): es va preparar una solució mare de sulfat de kanamicina (Sigma Chemical) a una concentració de 25 mg/ml en aigua destil.lada i es va esterilitzar per filtració. Es va utilitzar a concentracions finals de 25 a 50 µg/ml.

- Estreptomicina (Sm): preparada una solució mare de sulfat d'estreptomicina (Boehringer Mannheim) a una concentració de 25 mg/ml en aigua destil.lada i esterilitzada per filtració, es va utilitzar a concentracions finals de 25 µg/ml.

- Tetraciclina (Tc): la solució mare de tetraciclina (Fluka, Boehringer Mannheim) es va preparar a una concentració de 12,5 mg/ml en etanol (Panreac) al 50%. Va ser esterilitzada per filtració i guardada protegida de la llum. Es va utilitzar a una concentració final de 15 µg/ml.

2.3 INSTRUMENTAL TÈCNIC.

Es va utilitzar instrumental general de laboratori, del que no s'anomenen marques i característiques, excepte en casos específics que es troben descrits als corresponents apartats.

2.4 MÈTODES MICROBIOLÒGICS.

2.4.1 Esterilització.

Els medis de cultiu, el material de plàstic i vidre i les solucions que ho requerien i ho permetien, es van esterilitzar amb autoclau durant 15 min a una temperatura de 121°C. Aquelles solucions que no permetien l'esterilització per calor, van ser esterilitzades per filtració a través de filtres estèrils de 0,2 µm de diàmetre de porus (Millipore).

2.4.2 Sembra, cultiu i manteniment de microorganismes.

La sembra de microorganismes, tant en medi sòlid com en medi líquid, es va realitzar tal com és habitual a les metodiques de treball en Microbiologia, seguint les adequades precaucions d'esterilitat.

En general, els cultius en medi líquid es van mantenir en agitació (agitador orbital Braun), a 200 r.p.m., i a diferents temperatures dependent de les soques. Les mesures del creixement bacterià utilitzades van ser l'enumeració viable per banc de dilucions i sembra en placa, i la lectura de la densitat òptica dels cultius a 600 nm (Espectrofotòmetre Shimadzu UV-265FW).

El manteniment de les soques es va realitzar per ressebra en placa cada dos mesos i manteniment a 4°C, i per congelació de cultius líquids a -70°C en DMSO (dimetilsulfòxid) al 7%.

Els lisats de bacteriòfags es van conservar a 4°C, en el mateix sobrenedant en el que es van obtenir, afegint-hi unes gotes de cloroform per tal d'evitar la contaminació bacteriana.

2.5 MÈTODES DE MANIPULACIÓ I ÚS DE BACTERIÒFAGS.

2.5.1 Sensibilitat a bacteriòfags.

Per determinar la sensibilitat o resistència de diferents soques bacterianes a bacteriòfags es va utilitzar el test de la gota. Per això, una alíquota de 200 µl d'un cultiu de la soca bacteriana que es volia assajar, incubada en el medi adequat, es barrejava amb 3 ml de LB-agar tou al 0,6% i s'extenia en una placa de LB-agar. Una vegada solidificat el medi, es dipositava una gota de lisat fàgic del bacteriòfag. Després de la incubació, es llegia el test per aparició de calbes de lisi.

2.5.2 Manipulació i ús del bacteriòfag lambda i derivats.

El bacteriòfag lambda es va utilitzar com a vector de transposons per mutagènesi. Es van utilitzar dos transposons, Tn5 i Tn10, i per tant dos derivats de lambda: lambda::Tn5 (lambda 467) i lambda::Tn10 (lambda 561).

És important tenir present que per la replicació de vectors derivats del fag lambda que contenen mutacions sense sentit que afecten a gens imprescindibles per la realització de cicles lítics complets, cal utilitzar una soca d'*E.coli* supressora adequada (Eggerston i Söll, 1988).

2.5.2.1 Manipulació i ús de lambda::Tn5.

2.5.2.1.a Obtenció de lisats de lambda::Tn5.

Un cultiu d'una soca d'*E.coli* supressora (com *E.coli* CS1045), crescuda en LB suplementat amb maltosa (Merck) al 0,2%, es va barrejar amb alíquotes de diferents dilucions, en MgSO₄ 0,1 M, d'un lisat fàgic preexistent. Després de permetre l'adsorció durant 15 min a 37°C es van afegir 3 ml de LB-agar tou al 0,6% i es va estendre en plaques de LB-agar. Es va anar seguint l'aparició de les calbes durant la incubació a 37°C, i quan en alguna de les plaques hi havia lisi pràcticament total es va recollir l'agar tou amb medi LB. Després d'afegir unes gotes de cloroform i agitar vigorosament, es va centrifugar 10 min a 12.000 xg. El sobrenedant, lisat fàgic, es va recollir i mantenir a 4°C.

2.5.2.1.b Titulació de lisats de lambda::Tn5.

Per la titulació dels lisats es va seguir el mateix procediment que per la seva obtenció, per comptatge del número de calbes.

2.5.2.1.c Mutagènesi amb lambda::Tn5.

La mutagènesi amb lambda::Tn5, sobre una soca sensible a lambda i no supressora, es va fer seguint el mètode descrit per Shaw i Berg (1979).

Un cultiu de tota la nit de la soca que es volia mutagenitzar es va centrifugar durant 10 min a 3.000 xg i es va ressuspendre en 1/5 volums de MgSO₄ 10 mM. Es van posar en contacte alíquotes de cèl.lules i lisat de lambda::Tn5, obtingut tal com s'ha descrit anteriorment. Després de 30 min a temperatura ambient, es van afegir a la barreja 5 volums de medi LB i es va mantenir en agitació durant 60 min a 30°C per permetre l'expressió dels marcadors corresponents al transposó. Passat aquest temps es va plaquejar sobre el medi adequat suplementat amb 25 µg/ml de kanamicina (resistència codificada pel transposó), per seleccionar insercions al genoma bacterià.

2.5.2.2 Manipulació i ús de lambda::Tn10.

2.5.2.2.a Obtenció de lisats fàgics

Un cultiu de tota la nit en medi YM d'una soca adequada, com *E.coli* CS1045, es va centrifugar 10 min a 3.000 xg i les cèl.lules es van ressuspendre en 0,4 volums de MgSO₄ 10mM. Per l'obtenció dels lisats es va seguir el mateix protocol que amb lambda::Tn5, però recollint els lisats en tampó SM.

-Tampó SM: 5,8 g NaCl
 2,0 g MgSO₄ · 7H₂O
 50 ml Tris-HCl 1M pH 7,5
 5,0 ml gelatina 2%
 Ajustar pH a 7,5 i enrasar a 1 l

2.5.2.2.b Titulació de lisats de lambda::Tn10.

Alíquotes d'un cultiu de la soca *E.coli* CS1045 ressuspès en MgSO₄ 10mM es barrejaven amb diverses dilucions en tampó SM del lisat fàgic. Després d'incubar 20 min a 37°C, s'afegien 3 ml de YM-agar tou i s'extenia la barreja en plaques de YM-agar. Després de la incubació a 37°C, s'obtenia el títol per comptatge del número de calbes.

2.5.2.2.c Mutagènesi amb lambda::Tn10.

Un cultiu en fase exponencial de la soca a mutagenitzar (sensible a lambda i no supressora) en medi YM es centrifugava 10 min a 3.000 xg i es ressuspensia en 1/10 volums de medi YM. Després de barrejar diferents volums de cèl.lules i de lisat fàgic, es permetia l'adsorció durant 30 min a temperatura ambient. S'incubava 60 min a 30 o 37°C, dependent de la soca, i es seleccionaven els mutants en plaques de YM-agar suplementades amb tetraciclina (resistència codificada per Tn10) i pirofosfat sòdic 1,25 mM.

2.5.3 Manipulació i ús del bacteriòfag P1 i derivats.

En aquest treball es va utilitzar un bacteriòfag derivat de P1, portador de gens de resistència a cloramfenicol (12,5 µg/ml) i que és lític a 42°C, però es comporta de forma lisogènica a 30°C: P1 *cm ts* (o també P1 *cm clr100*; Miller, 1972).

2.5.3.1 Obtenció de lisats de P1 *cm ts*.

Es va obtenir un cultiu en fase exponencial d'una soca d'*E.coli* lisògena pel bacteriòfag P1 *cm ts* a 30°C, en medi LB suplementat amb cloramfenicol (12,5 µg/ml) i MgSO₄ 10 mM, i es va induir llavors el cicle lític del profag mantenint el cultiu durant 30-45 min en agitació a 42°C. Després es va incubar durant 60 min o més a 37°C en agitació i, quan la lisi era aparent per observació de la clarificació del cultiu, es van afegir unes gotes de cloroform i es va continuar l'agitació durant 15 min més. Després de centrifugar els cultius lisats durant 10 min a 12.000 xg, es van recollir els lisats i es van conservar a 4°C.

2.5.3.2 Obtenció de lisògens per P1 *cm ts*.

A un cultiu en fase exponencial de la soca que es volia fer lisògena pel bacteriòfag, la soca receptora, es va afegir CaCl₂ fins arribar a una concentració final de 5 mM. Es van barrejar alíquotes, normalment de 100 µl, del cultiu de la soca receptora i d'un lisat fàgic preexistent. Aquesta barreja es va mantenir durant 60 min a 30°C, sense agitació, i es van seleccionar els lisògens plaquejant sobre LB-agar suplementat amb 12,5 µg/ml de cloramfenicol i incubant a 30°C. La lisogènia es va comprovar determinant l'absència de creixement dels lisògens a 42°C.

2.5.3.3 Titulació de lisats de P1 *cm ts*.

Un cultiu de tota la nit de la soca 5K d'*E.coli* es va centrifugar durant 10 min a 3.000 xg i es va ressuspendre en MgSO₄ 10 mM, CaCl₂ 5 mM. Diferents dilucions del lisat fàgic es van barrejar amb alíquotes de 100 µl de la suspensió de bactèries. Es va permetre l'adsorció durant 20 min a 30°C, es van afegir 3 ml de LB agar tou suplementat amb MgSO₄ 10 mM, CaCl₂ 5 mM i es va estendre sobre plaques de LB-agar suplementades amb CaCl₂ 5 mM. Després d'incubar a 37°C durant 24 hores, es va obtenir el títol per comptatge del número de calbes.

2.5.3.4 Transducció amb P1 *cm ts*.

La transducció generalitzada amb P1 *cm ts* es va fer tal com descriu Miller (1972). Es va obtenir un cultiu en fase exponencial de la soca receptora per dilució 1:50 d'un cultiu de tota la nit. Es van recollir les cèl.lules per centrifugació durant 10 min a 3000 xg, es van ressuspendre en el mateix volum de MgSO₄ 10mM CaCl₂ 5 mM i es van mantenir en agitació durant 15 min a 37°C. Alíquotes del cultiu es van posar en contacte amb alíquotes del lisat fàgic obtingut per inducció de lisògens pel fag de la soca donadora de la transducció. Es va incubar durant 20 min a 30°C per permetre l'adsorció. Després es va afegir medi LB i es va incubar durant 45-60 min a 37°C en agitació, per permetre l'expressió dels marcadors. Els transductants es van seleccionar plaquejant sobre el medi selectiu apropiat i incubant a 37°C.

2.6 MAPATGE DE MUTACIONS.

2.6.1 Mapatge amb soques Hfr::Tn10.

El mapatge aproximat de les mutacions es va fer per conjugació (Miller, 1972) entre la soca mutant i cadascuna de les soques Hfr d'una col·lecció de soques que contenen insercions del transposó Tn10 (Tc^r) al llarg del cromosoma d'*E.coli* (Hfr::Tn10; Taula 2.6.1; Wanner, 1986).

Per això, es van barrejar alíquotes de cultius en fase exponencial de la soca receptora (1 ml) i de cadascuna de les soques donadores Hfr::Tn10 (200 µl). La barreja es va mantenir a 30°C durant 100 min per tal de permetre la conjugació, i es van desfer les unions mitjançant agitació forta. Després d'afegir 2 ml de medi LB, es va incubar 30 min a 37°C en agitació per permetre l'expressió fenotípica dels marcadors.

La selecció dels transconjugants es va fer sobre plaques del medi adequat suplementat amb Tc més els marcadors de la soca receptora, excepte el marcador corresponent al transposó causant de la mutació.

Taula 2.6.1 Soques Hfr::Tn10 utilitzades (B. Bachmann. *E.coli* Genetic Stock Center, Yale University. New Haven, USA).

Soca	Característiques
BW6163	Hfr(PO45) <i>zed-977::Tn10 lambda⁻ relA1 thi-1 spoT1</i>
BW6169	Hfr(PO13) <i>argA::Tn10 leuB6 supE gal-6 lambda⁻ thi-1</i>
BW6166	Hfr(PO18) <i>zhf-721::Tn10 supE44 lambda⁻ thi-1 malB16</i>
BW7261	Hfr(PO2A) <i>leu-63::Tn10 tonA22 lambda⁻ ompF627</i> <i>del(argF-lac)169 relA1 spoT1 T₂^R</i>
BW7623	Hfr(PO43) <i>purE79::Tn10 lambda⁻ relA1? spoT1?</i>
BW7622	Hfr(PO44) <i>trpB::Tn10 lambda⁻ spoT1 thi relA1</i>
BW7620	Hfr(PO42) <i>zed-977::Tn10 lambda⁻ lac-42 spoT1 thi-1 relA1</i>
BW5660	Hfr(PO66) <i>src-300::Tn10 del(gpt-lac)5 supE44</i> <i>lambda⁻ thi-1 relA-1? spoT1?</i>
BW6175	Hfr(PO131) <i>argE::Tn10 thr-1 leuB6 azi-15 tonA21</i> <i>lacY1 supE44 lambda⁻ thi</i>
BW6159	Hfr(PO68) <i>ilv-691::Tn10 lambda⁻ relA1 spoT1 thi-1</i>
BW6164	Hfr(PO48) <i>thr43::Tn10 supE42 malB28 sfa-4</i>
BW6165	Hfr(PO120) <i>argE86::Tn10 ara-41 lacY lambda^{ind-} xyl-7 mtl-2</i>
NK6051	Hfr(PO1) <i>purE79::Tn10 del(gpt-lac)5 relA1 spoT1</i> <i>thi-1 lambda⁻</i>

2.6.2 Mapatge per cotransducció de marcadors.

El mapatge fi es va fer per transducció d'insercions de Tn10 properes a la regió on estava mapada la mutació de manera aproximada. La transducció es va realitzar tal com es descriu a l'apartat 2.5.3.4, utilitzant com a donadores diverses soques amb insercions de Tn10 a localitzacions conegudes (Taula 2.6.2). Es van seleccionar els transductants del transposó en plaques del medi adequat suplementades amb Tc (Tn10) i els marcadors de la soca receptora, a excepció del marcador corresponent al transposó causant de la mutació.

Una vegada calculada la freqüència de cotransducció de la Tc^r i el fenotip parental, es va aplicar la fórmula descrita per Wu (1966), per tal d'obtenir la distància entre els marcadors (la mutació i la inserció de Tn10), assumint que cada minut del cromosoma d'*E.coli* correspon a 47,5 Kb i que el bacteriòfag P1 transdueix fragments de DNA de 2 minuts (Bachmann, 1990).

Taula 2.6.2 Soques d'*E.coli* amb insercions de Tn10, utilitzades com a donadores pel mapatge per cotransducció (B. Bachmann. *E.coli* Genetic Stock Center, Yale University. New Haven, USA).

Soca	Tn10 (min)	Característiques
KL743	10	F ⁻ lambda ⁻ <i>zba-3000::Tn10</i>
JW1071	15	Hfr(PO1) <i>zbf-507::Tn10 trp-49</i> <i>lacZ125 relA1 spoT1 lambda⁻</i>
NK6033	16,8	Hfr(PO1) <i>nadA50::Tn10 del(gpt-</i> <i>lac)5 relA1 spoT1 thi-1 lambda⁻</i>
N3030	17	F ⁻ <i>gal-76::Tn10 lambda⁻ IN(rrnD-rrnE)1</i>
S1316	17,8	F ⁻ <i>zbh-428::Tn10 araD139 del(argF-</i> <i>lac)169 bioA24 flbB5301 ptsF25 relA1</i> <i>rpsL150 bisC9:Mucts deoC1 lambda⁻</i>
RW1230	19	F ⁻ <i>zbj-1230::Tn10 del(gpt-proA)62 hisG4</i> <i>thi-1 lacY1 galk2 xyl-5 mtl-1 lambda⁻</i> <i>supE44?</i>

2.7 TEST DE SENSIBILITAT A COLICINES.

La resistència o sensibilitat de soques bacterianes a les diferents colicines utilitzades (E1, A, G i D), es va fer segons el mètode conegut com a "Overlay Test" (Pugsley i Oudega, 1987):

S'obtenia un creixement en estria de les diferents soques productores de colicines en una placa de LB-agar. Després de lisar aquest cultiu per exposició a vapors de cloroform, s'extenia sobre la placa una barreja de 3 ml de LB-agar-tou i 200 µl d'un cultiu de tota la nit de la soca que es volia provar. S'incubava la placa a 37°C tota la nit i es comprovava la sensibilitat de la soca a les colicines observant si hi havia un halo d'inhibició del creixement sobre l'estria de la soca productora de colicines.

Les soques d'*E.coli* utilitzades com a productores de colicines van ser les següents (Pugsley i Oudega, 1987):

- BZB2101 (pColA-CA31): productora de colicina A.
- BZB2103 (pColD-CA23): productora de colicina D.
- BZB2104 (pColE1-K53): productora de colicina E1.
- CA46: productora de colicina G.

2.8 COMPETÈNCIA, TRANSFORMACIÓ I CURAT DE PLÀSMIDS **D'*Escherichia coli***

2.8.1 Obtenció de cèl.lules competents d'*Escherichia coli*

Diferents soques d'*Escherichia coli* es van fer competents per la transformació amb DNA plasmídic per tractament amb CaCl_2 en fred (Cohen *et al.*, 1972). Cultius de tota la nit de la soca corresponent es van diluir 1:50 i incubar fins a la meitat de la fase exponencial (de 2 a 3 hores dependent de la soca i de la temperatura d'incubació). Les cèl.lules, recollides per centrifugació durant 10 min a 3.000 xg i a 4°C, es van ressuspèndre en un 1/2 del volum inicial de CaCl_2 (Panreac) 50 mM, estèril i fred. Després de repetir la centrifugació, però només durant 3 min, les cèl.lules es van ressuspèndre en 1/20 del volum inicial de cultiu de CaCl_2 50 mM. Les cèl.lules competents obtingudes per aquest procediment es van deixar en gel de 1 a 24 hores abans de transformar-les.

2.8.2 Transformació d'*Escherichia coli*

Les cèl.lules competents, obtingudes tal com es descriu a l'apartat anterior, es van utilitzar per la transformació amb DNA plasmídic. Per això, alíquotes de 100 μl de cèl.lules competents es posaven en contacte amb 1-10 μl de la solució de DNA. La barreja s'incubava 30 min en gel i posteriorment es sotmetia a un xoc tèrmic durant 45 s a 42°C. Després d'afegir 900 μl de medi LB, les cèl.lules s'incubaven durant 60 min a 30 o 37°C (dependent de la soca), per permetre l'expressió de les resistències a antibiòtics codificades pel plàsmid. Es seleccionaven els transformants plaquejant sobre el medi sòlid adequat suplementat amb els marcadors del plàsmid.

2.8.3 Curat de plàsmids.

El curat dels plàsmids es va obtenir en la major part dels casos per successius subcultius de la soca portadora del plàsmid en medi líquid LB sense els marcadors de resistència codificats pel plàsmid. Després del subcultiu, es van sembrar les dilucions adequades en plaques de medi LB o agar-sang (en cas que es volgués curar d'un plàsmid que codifiqués per alguna hemolisina) sense antibiòtics. Les colònies obtingudes es van ressemmar per duplicat en plaques del mateix medi de cultiu amb i sense antibiòtics. Aquelles colònies que creixien a la placa sense antibiòtics, i no ho feien a la placa amb antibiòtics corresponien a curats del DNA plasmídic. A més a més, també es va controlar la pèrdua d'altres característiques fenotípiques de codificació plasmídica.

En casos de dificultats en el curat seguint la metòdica exposada anteriorment, es va utilitzar la coumermicina (Danilevskaya i Gragerov, 1979). Els cultius de la soca a curar es feien en medi LB sense els marcadors corresponents al plàsmid i suplementat amb coumermicina a una concentració final de 5 µg/ml. La comprovació del curat es feia de la mateixa manera que en el curat per successius subcultius.

- Solució de coumermicina: es va preparar una solució mare de coumermicina (Sigma Chemicals) a 1 mg/ml en DMSO, i es va mantenir a -20°C, utilitzant-la en un marge de 3 dies.

2.9 OBTENCIÓ I MANIPULACIÓ D' ÀCIDS NUCLEICS.

2.9.1 Aïllament de DNA plasmídic.

2.9.1.1 Mètode de la lisi alcalina.

L'extracció de DNA plasmídic es va realitzar rutinàriament segons el mètode clàssic de la lisi alcalina (Birnboim, 1983), a partir de 10 ml de cultius de tota la nit:

- Centrifugar 10 min a 3.000 xg.
- Ressuspendre en 300 µl de solució I més 6 mg/ml de lisozim. Agitar i incubar 5 min en gel.
- Afegir 600 µl de la solució II. Agitar i tornar a incubar 5 min en gel.
- Afegir 400 µl de la solució III. Agitar i incubar 5 min en gel.
- Centrifugar 5 min en una microcentrífuga.
- Recollir el sobrenedant i afegir 1/10 del volum de solució III i 2 volums d'etanol absolut (Panreac) pre-refredat a -20 °C.
- Precipitar el DNA durant un mínim de 1 hora a -20°C.
- Recollir el DNA per centrifugació durant 5 min en una microcentrífuga. Decantar el sobrenedant.
- Rentar el DNA amb etanol 70% pre-refredat a -20°C i liofilitzar o assecar. En aquestes condicions el DNA pot ser guardat a 4°C.

Si el DNA obtingut es volia utilitzar per transformació, era ressuspès en 30-50 µl d'aigua bidestil·lada estèril, i si es volia digerir amb enzims de restricció, es ressuspensia en 500 µl de tampó TE per ser fenolitzat.

Aquest protocol d'extracció de DNA plasmídic es va adaptar a volums més grans de cultiu, ajustant les quantitats de les solucions utilitzades.

- Solució I: 25 mM Tris-HCl (Boehringer Mannheim)
 10 mM CDTA (àcid trans-1,2-diaminociclohexà
 N,N,N',N'-tetraacètic monohidrat, Fluka)
 55 mM Glucosa (Panreac)
 Ajustar el pH a 8,0

A aquesta solució s'hi va afegir lisozim (de clara d'ou de gallina, Merck) a una concentració de 6 mg/ml abans de la seva utilització.

- Solució II: 1 % SDS (dodecil sulfat sòdic, Merck)
 0,2 N NaOH (Panreac)
- Solució III: 3 M Acetat sòdic (Merck) ajustat a pH 4,8 amb àcid
 acètic glacial.
- Tampó TE: 10 mM Tris-HCl
 1 mM EDTA (àcid etilendiaminotetraacètic, Merck)
 Ajustar el pH a 8,0

2.9.1.2 Extracció fenòlica de preparacions de DNA plasmídic.

El DNA ressuspès en 500 µl de TE es va desproteïnitjar amb una solució de fenol equilibrat i cloroform. Es va fer un primer tractament amb 500 µl de fenol equilibrat, posteriorment es van utilitzar 250 µl de fenol equilibrat més 250 µl de cloroform:alcohol isoamílic, i finalment 500 µl de cloroform:alcohol isoamílic. A cada pas, les dues fases, orgànica i aquosa, es van separar per centrifugació en una microcentrifuga (Eppendorf) durant 2 min. El DNA plasmídic així desproteïnitjat es va precipitar per addició de 1/10 del volum de solució III (apartat anterior) i 2 volums d'etanol absolut pre-refredat a -20°C, deixant les

preparacions com a mínim 1 hora a -20°C . Després de centrifugar durant 5 min i rentar amb etanol al 70% pre-refredat a -20°C , el precipitat obtingut es va liofilitzar o assecar, i es va ressuspèndre en aigua bidestil·lada estèril (30-50 μl).

- Solució de fenol equilibrat: la solució equilibrada de fenol (Merck), es va preparar saturant fenol líquid amb solucions 1 M i 0,1 M de Tris-HCl pH 8,0. El fenol així preparat s'emmagatzemava a 4°C sota una fase superior aquosa de Tris HCl 0,1 M pH 8,0 i protegit de la llum.
- Solució de cloroform:alcohol isoamílic: es va preparar barrejant cloroform (Panreac) i alcohol isoamílic (Panreac) en una relació 24:1.

2.9.1.3 Mètode ràpid de lisi alcalina i extracció amb clorur de liti.

Aquest mètode (Martínez i De La Cruz, 1988), permet obtenir de forma ràpida DNA plasmídic amb puresa suficient per tallar-lo amb enzims de restricció.

Les cèl·lules bacterianes recollides per centrifugació van ser tractades amb les solucions I, II, i III, igual com en el mètode de la lisi alcalina. Després de centrifugar la preparació, el DNA del sobrenedant es va precipitar durant 10 min a temperatura ambient amb 600 μl d'isopropanol (Panreac), i es va recollir per centrifugació durant 5 min en una microcentrífuga. El precipitat va ser ressuspès en 200 μl de TE i es va afegir un volum igual de LiCl 5M (Merck). Es va deixar 5 min a -20°C i es va tornar a centrifugar durant 5 min. El DNA del sobrenedant es va precipitar, amb 1/10 volums de solució III i 2 volums d'etanol absolut pre-refredat, durant 1 hora a -20°C . Després de tornar a centrifugar durant 5 min i rentar amb etanol al 70% pre-refredat, el DNA es va assecar o liofilitzar, i es va

2.9.2 Obtenció de DNA total.

Per l'obtenció de DNA total es va seguir el mètode descrit per Marmur (1961), amb petites modificacions, a partir de cultius de tota la nit en 500 ml de medi.

- Recollir les cèl.lules per centrifugació a 11.300 xg.
- Ressuspendre en 50 ml de NaCl 0,15 M, EDTA 0,01 M, pH 8,0.
- Afegir 1 ml de lizozim (10 mg/ml en Tris-HCl 0,25 M pH 8,0).
- Incubar durant 10 min en gel.
- Afegir-hi 10 µl d'una solució de proteïnasa K (10 mg/ml, Merck), i 2,63 ml de SDS al 20%. Agitar la barreja durant 15 min en un bany a 80°C.
- Deixar refredar a temperatura ambient.
- Afegir 13,16 ml de NaClO₄ 5 M (Merck) i 32,9 ml de cloroform:alcohol isoamílic.
- Mantenir la barreja durant 30 min en agitació suau.
- Separar les fases per centrifugació a 9.800 xg durant 20 min.
- Recollir el sobrenedant i repetir l'extracció amb cloroform:alcohol isoamílic.
- Transferir el sobrenedant a un vas de precipitats, i afegir 2 volums d'etanol 96% (Panreac) pre-refredat a - 20°C.
- El DNA es recull remenant amb una pipeta Pasteur tancada, per adsorció espontània del DNA al vidre.
- Dissoldre el DNA recollit en 15 ml de SSCx0,1.
- Ajustar la concentració de SSC a x1 afegint 0,85 ml de SSCx20.
- Eliminar el RNA de la preparació afegint RNasa A (Boehringer Mannheim) a una concentració final de 50 µg/ml, i incubant 30 min a 37°C.

- Desproteïnitzar la preparació de DNA afegint 8,5 ml de fenol equilibrat i 8,5 ml de cloroform:alcohol isoamílic. Agitar suaument i centrifugar 10 min a 3.000 xg.
- Recuperar el sobrenedant i tornar a extraure amb fenol i cloroform:alcohol isoamílic.
- Tornar a centrifugar i extraure amb cloroform:alcohol isoamílic una vegada més.
- Precipitar el DNA obtingut afegint 1/10 volums de solució III (apartat 2.8.1.1) i 1 volum d'isopropanol, i mantenint 2 hores a -20°C.
- Recollir el DNA per centrifugació durant 10 min a 3.000 xg, i rentar amb etanol al 70% pre-refredat a -20°C.
- Liofilitzar el DNA obtingut i ressuspendre en TE (1-2 ml).

Aquest protocol es va adaptar a altres volums de partida, tot ajustant les quantitats de les solucions utilitzades.

- SSC x 20: 3 M NaCl
 0,3 M Citrat sòdic (Merck)
 Ajustar el pH a 7,0

2.9.3 Tractament amb endonucleases de restricció i RNasa.

2.9.3.1 Tractament de DNA amb endonucleases de restricció.

Les digestions amb enzims de restricció es van realitzar seguint les instruccions dels subministradors dels enzims de restricció (Boehringer Mannheim, Promega). Habitualment es van utilitzar els tampons de restricció

subministrats amb els mateixos enzims o, en cas necessari, es van preparar seguint les instruccions de la bibliografia (Sambrook *et al.*, 1989).

De manera general, les digestions es van dur a terme en volums finals de 10-20 μ l, tenint en compte no afegir mai més d'un 10% d'enzim, ja que un excés de glicerol, present en el tampó d'emmagatzemament de l'enzim, pot inhibir la reacció de digestió.

Per les digestions dobles, si els enzims necessitaven el mateix tampó, s'incubava a la vegada el DNA amb els dos enzims, i si utilitzaven diferents tampons, es feia primer la incubació amb l'enzim que requeria menys concentració de sals, ajustant-la després als requeriments del segon enzim utilitzat.

2.9.3.2 Tractament amb RNasa.

Generalment el DNA es va tractar amb RNasa A (Boehringer Mannheim) abans de l'extracció fenòlica, ja que així es facilita l'eliminació posterior de l'enzim. Per això, rutinàriament es va afegir RNasa A a la solució de DNA a una concentració final de 50 μ g/ml, i es va incubar durant 30 min a 37°C.

- Solució de RNasa A: la solució de RNasa A es va preparar a una concentració de 5 mg/ml en Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 15 mM, i es va incubar durant 5 min a 100°C per tal d'eliminar les possibles DNases existents. La solució així preparada es va mantenir a 4°C.

2.9.4 Lligació de molècules lineals de DNA.

Per les lligacions es va utilitzar la lligasa del bacteriòfag T4 (BioLabs), seguint les instruccions dels subministradors de l'enzim.

2.9.5 Amplificació de DNA per PCR.

L'amplificació de DNA, mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR), es va utilitzar per l'obtenció de sondes marcades amb digoxigenina i per la detecció del gen *hha* a diferents soques bacterianes.

Es van seguir les indicacions generals de la bibliografia (Sambrook *et al.* 1989) i dels subministradors de l'enzim (Promega), utilitzant un processador termoregulable (COY 50/60). Les barreges de reacció, preparades en volums de 50 µl, contenen 0,25 mM de cada nucleòtid (Pharmacia), 1 unitat d'enzim *Taq* DNA polimerasa (Promega) i 45 ng de cada "primer" (Symbicom) en el tampó subministrat amb l'enzim (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,8 (a 25°C), 1,5 mM MgCl₂ i 0,1% Triton X-100), més el DNA motlle a copiar (DNA plasmídic o cromosòmic). Per evitar l'evaporació de la mostra s'afegien unes gotes d'oli mineral (Sigma Chemicals).

Els cicles utilitzats en la reacció de PCR, si no s'especifica el contrari, van ser els següents:

- 1) 94°C 4 min / 55°C 40 s / 70°C 30 s x 1
- 2) 92°C 30 s / 55°C 40 s / 70°C 30 s x 29

La visualització dels fragments amplificats es va fer analitzant una alíquota de 10 µl de la mostra després de la reacció en gels d'agarosa al 2% en tampó TBE (veure apartat 2.9.6.1).

Si el fragment de DNA amplificat es volia utilitzar per marcar-lo com a sonda o per clonar, es purificava per extracció fenòlica i precipitació amb etanol, o bé utilitzant el "kit" Magic PCR Preps (Promega).

2.9.6 Electroforesi de DNA en gels d'agarosa i tinció amb bromur d'etidi.

2.9.6.1 Electroforesi de DNA en gels d'agarosa.

Les preparacions de DNA plasmídic, digestions amb enzims de restricció, lligacions i els productes obtinguts per PCR es van analitzar en gels d'agarosa (Boehringer Mannheim) a concentracions del 0,8 al 2% en tampó TBE, seguint les indicacions generals de la bibliografia (Sambrook *et al.*, 1989). Abans de l'electroforesi es va afegir a la mostra 1/5 volums de tampó de mostres x 5 (Sambrook *et al.*, 1989).

Les electroforesis es van desenvolupar en cubetes horitzontals LKB o Pharmacia (GNA-100 i GNA-200). El voltatge aplicat pel recorregut (fonts d'alimentació Pharmacia GPS 200/400 o Bio-Rad 200/2.0)) va ser de 5-10 volts cm^{-1} .

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

- Tampó TBE x 10: 0,9 M Tris
0,9 M àcid bòric
0,02 M EDTA
pH 8,3 (no ajustat)

2.9.6.2 Tinció amb bromur d'etidi.

Per tal de visualitzar les bandes de DNA separades per electroforesi es va utilitzar el bromur d'etidi, agent fluorescent utilitzat per tenyir el DNA. Es van submergir els gels en una solució de bromur d'etidi (Merck) a una concentració aproximada de 0,5 µg/ml, durant 15-30 min. Els gels van ser després observats per transil.luminació amb llum ultraviolada (Transil.luminador Fotodyne), i fotografiats a través d'un filtre vermell (Kodak 23A).

- Solució de bromur d'etidi: es va preparar una solució mare de bromur d'etidi (Merck) a una concentració de 10 mg/ml en aigua destil.lada. Es va emmagatzemar a temperatura ambient, protegida de la llum.

2.9.6.3 Marcadors de pes molecular.

Generalment es van utilitzar com a marcadors de pes molecular als gels d'agarosa els fragments de la digestió amb *HindIII* del DNA del bacteriòfag lambda (Boehringer Mannheim, Promega), que cobreixen un rang des de 23,13 fins a 0,56 Kb.

En altres casos, en que es requerien marcadors de pes molecular més baix, es va utilitzar una barreja de fragments de DNA del plàsmid pBR328 tallat amb *BglI* i *HinfI* (Boehringer Mannheim), que van des de 2,17 fins a 0,154 Kb,

o bé el DNA del bacteriòfag ϕ X174 tallat amb *Hae*III (Promega), que dóna fragments que van des de 1,35 fins a 0,072 Kb.

2.9.7 Purificació de fragments de DNA a partir de gels d'agarosa de baix punt de fusió (LMP).

Els fragments de DNA d'interès per clonar o per utilitzar com a sonda es van aïllar a partir de gels d'agarosa de baix punt de fusió (NuSieve, FMC Bio Products). Les electroforesis d'aquest tipus es van desenvolupar també en tampó TBE, però a 4°C donades les característiques de l'agarosa. Les bandes d'interès es van localitzar per irradiació amb llum ultraviolada de longitud d'ona llarga (Làmpara Black Ray) per tal d'evitar el trencament de les cadenes, i es van retallar amb un bisturi. Es va fondre l'agarosa a 60°C i es va purificar el DNA per extracció fenòlica i precipitació o utilitzant el "kit" Gene Clean II (Bio 101).

2.9.8 Hibridació d'àcids nucleics.

Pel marcatge i detecció d'àcids nucleics, es va utilitzar el "kit" de marcatge i detecció no radioactiu d'àcids nucleics de Boehringer Mannheim.

2.9.8.1 Marcatge de fragments de DNA amb digoxigenina.

El marcatge de fragments de DNA es va fer per "Random Primer" o, en cas de disposar d'uns "primers" del fragment a marcar, per PCR.

El marcatge per "random primer" es va fer utilitzant el "kit" de marcatge i detecció d'àcids nucleics (Boehringer Mannheim). El DNA que es volia marcar es va desnaturalitzar per incubació a 100°C durant 10 min, seguit d'un

refredament ràpid en un bany de gel/alcohol. A aquest DNA desnaturalitzat se li van afegir hexanucleòtids (Boehringer Mannheim), una barreja de nucleòtids (0,1 mM de cada nucleòtid i 0,035 mM de Dig-dUTP, Boehringer Mannheim), 2 unitats de polimerasa Klenow (Boehringer Mannheim) i aigua destil.lada estèril fins un volum final de 20 µl. La reacció es va incubar tota la nit a 37°C i es va aturar amb EDTA 0,02 M pH 8,0. El DNA marcat es va precipitar amb 1/10 volums de LiCl 4M (Merck) i 3 volums d'etanol absolut pre-refredat a -20°C durant 60 min a -70°C. Després de centrifugar durant 15 min en una microcentrífuga (Eppendorf) a 4°C i rentar el precipitat amb etanol al 70% pre-refredat, el DNA es va liofililitzar i ressuspendre en tampó TE (habitualment 20-30 µl, dependent de la quantitat de DNA inicial).

En el cas de voler marcar fragments de DNA dels quals es disposava de "primers" específics, el marcatge es va fer per PCR, seguint el protocol descrit anteriorment, i substituint els nucleòtids per una barreja que contingüés Dig-dUTP.

Generalment es va comprovar el marcatge aplicant una petita alíquota del DNA a una membrana prèviament equilibrada amb H₂O_d i SSC x 20, fixant el DNA i desenvolupant la detecció immunològica tal com es descriu als següents apartats.

2.9.8.2 Transferència de DNA a membranes.

Els fragments de DNA que es volien transferir a una membrana (Zeta-Probe, Bio-Rad) es van separar primer en un gel d'agarosa de 2 mm de gruix, del 0,8 al 1 %, utilitzant l'equip Mini-Protean II (Bio-Rad). Una vegada desenvolupada l'electroforesi en tampó TBE, el gel es va tenyir amb bromur

d'etidi per ser fotografiat. Després de desnaturalitzar el DNA submergint el gel durant 15 min en una solució de NaOH 250 mM, tant el gel com la membrana es van equilibrar en tampó de transferència. Per la transferència es va utilitzar també l'equip Mini-Protean II, aplicant un voltatge de 60 V durant 1 hora, d'acord amb les instruccions dels subministradors de l'equip.

El DNA transferit es va fixar a la membrana assecant-la durant 30 min a 120°C en una estufa de buit.

- Tampó de transferència: 40 mM Tris
- 40 mM àcid bòric
- 1 mM EDTA
- pH 8,3 (no ajustat)

En alguns casos el DNA que es volia hibridar era desnaturalitzat i aplicat directament com a gota a una membrana ("dot"). Després de la fixació, s'hibridava de la mateixa manera que en el cas del DNA transferit des de gels d'agarosa.

2.9.8.3 Hibridació d'àcids nucleics.

Per la hibridació calia bloquejar abans la membrana, prehibridant amb solució d'hibridació durant 2-3 hores a 42°C. Després de substituir aquesta solució per solució d'hibridació fresca contenint la sonda de DNA marcada i desnaturalitzada, s'incubava tota la nit a la mateixa temperatura.

Les condicions de rentat de les membranes es van variar dependent de les condicions d'astringència desitjades, però en general es van fer 2 rentats de

5 min a temperatura ambient amb 2 x SSC; SDS 0,1% i dos rentats més de 15 min a 65°C amb 0,1 x SSC; SDS 0,1%. Es passava després al revelat dels filtres mitjançant una reacció immunològica de detecció de la digoxigenina.

- Solució d'hibridació: 5 x SSC
 - 5 % agent de bloqueig (Boehringer Mannheim)
 - 0,1 % lauril sarcosinat sòdic (Sigma Chemicals)
 - 0,02 % SDS
 - 50 % formamida desionitzada
- SSC x 20: (apartat 2.9.2)
- Solució de formamida desionitzada: preparada barrejant 50 ml de formamida (Merck) amb 5 g de reïna de bescanvi iònic (AG501X8, Bio-Rad), agitant 30 min i decantant la formamida després de deixar reposar la barreja.

2.9.8.4 Detecció immunològica de la digoxigenina.

La membrana, una vegada rentada com es descriu en l'apartat anterior, es va incubar durant 1 min en tampó #1, seguit d'un bloqueig de 30 min en tampó #2. Després de rentar breument en tampó #1, la membrana es va incubar 30 min en una solució d'anticòs contra la digoxigenina conjugat amb fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim) diluït 1:5000 en tampó #1, tal com indiquen els subministradors. Es va eliminar l'excés d'anticòs mitjançant dos rentats de 15 min en tampó #1, i es va equilibrar la membrana en tampó #3. Seguidament es va desenvolupar la reacció colorimètrica amb 10 ml de tampó #3 més 45 µl de NBT i 35 µl de BCIP. Quan es va considerar oportú, es va aturar la reacció submergint la membrana en tampó #4, i es va deixar assecar.

- Tampó #1: 100 mM Tris- HCl pH 7,5
150 mM NaCl
- Tampó #2: agent de bloqueig (Boheringer Mannheim) al 0,5 % en tampó #1.
- Tampó #3: 100 mM Tris-HCl pH 9,5
100 mM NaCl
50 mM MgCl₂
- Tampó #4: 10 mM Tris-HCl pH 8,0
1 mM EDTA
- NBT: es preparava una solució de NBT (Nitroblue tetrazolium chloride, Boehringer Mannheim) a 75 mg/ml en DMF (dimetilformamida) al 70%.
- BCIP: es preparava una solució de BCIP (5-brom-3-clor-4-indolil fosfat, Boehringer Mannheim) a 50 mg/ml en DMF.

2.10 FRACCIONAMENT DE CULTIUS BACTERIANS I AÏLLAMENT DE PROTEÏNES DE MEMBRANA.

2.10.1 Fraccionament de cultius bacterians.

Per tal de valorar activitats enzimàtiques a diferents compartiments cel·lulars, analitzar el seu contingut per electroforesi (SDS-PAGE) o per altres finalitats, es van obtenir fraccions externes, periplasmàtiques i citoplasmàtiques de cultius bacterians al llarg de la corba de creixement. En alguns casos, tan sols es va separar la fracció externa de la fracció interna.

El cultiu inicial es va obtenir per dilució 1:50 d'un cultiu de tota la nit de la soca bacteriana a analitzar. En els punts de la corba en els que es volien obtenir

les fraccions, una alíquota del cultiu es va utilitzar per seguir el creixement mitjançant la lectura de la densitat òptica a 600 nm i una altra alíquota es va utilitzar pel fraccionament cel.lular (Nieto *et al.*, 1987). La fracció externa la constituïa el sobrenedant obtingut per centrifugació durant 5 min de 1 ml del cultiu en una microcentrífuga (Eppendorf). En algunes ocasions es van concentrar les proteïnes corresponents a la fracció externa afegint 3 volums d'acetona freda (Panreac), i mantenint la barreja durant un mínim de 2 hores a 4°C. Després de centrifugar durant 15 min en una microcentrífuga es va ressuspendre en el volum desitjat, generalment 1/10 del volum inicial. Per l'obtenció de la fracció interna, es van centrifugar 10 ml de cultiu i les cèl.lules es van ressuspendre en 1 ml de tampó de xoc més 100 µl d'una solució de liozím (5 mg/ml). Després de 20 min en gel es va congelar i descongelar la suspensió de cèl.lules, i es va centrifugar durant 1 min en una microcentrífuga. El sobrenedant obtingut es va utilitzar com a fracció interna.

En cas de voler separar la fracció interna en periplasma i citoplasma, es van centrifugar 10 ml del cultiu i les cèl.lules es van ressuspendre en 1 ml de tampó de xoc més 100 µl d'una solució de liozím (1mg/ml). Després de 3 min en gel, la suspensió es va centrifugar en una microcentrífuga durant 30 s. El sobrenedant corresponia a la fracció periplasmàtica. El precipitat d'aquesta centrifugació es va ressuspendre novament en 1 ml de tampó de xoc més 100 µl de liozím (5 mg/ml). Després de 20 min en gel, es va congelar, es va descongelar, i es va tornar a centrifugar durant 1 min en una microcentrífuga. El sobrenedant era considerat la fracció citoplasmàtica.

Les diferents fraccions cel.lulars es van mantenir en gel i es van utilitzar ràpidament, si el que es volia era valorar activitats enzimàtiques. Per l'anàlisi electroforètica o immunodetecció, les fraccions es van guardar a -20°C.

En algunes valoracions enzimàtiques, com per exemple la valoració d'activitat carboximetilcel·lulàsica, la sacarosa del tampó de xoc podia interferir en la valoració. En aquest cas, la fracció interna es va obtenir per sonicació de la suspensió de cèl·lules en Tris-HCl 100 mM pH 7,0, PMSF 1 mM durant 2 x 60 s a 100 W (sonicador Braun).

- Tampó de xoc: 33 mM Tris HCl pH 8,0
1 mM EDTA
20 % Sacarosa (Panreac)
1 mM PMSF (Fenil-metil-sulfonil-fluorur) (Merck)

El tampó es preparava amb tots els components, excepte el PMSF, s'esterilitzava a l'autoclau i es mantenia a 4°C. En el moment d'utilitzar-lo, s'atemperava i s'afegia el PMSF a partir d'una solució 100 mM en isopropanol (Panreac).

- Solucions de lisozim: es van preparar dues solucions de lisozim (Merck) a concentracions de 1 i 5 mg/ml en H₂O. Aquestes solucions es preparaven just abans d'utilitzar-les.

2.10.2 Aïllament de proteïnes de membrana.

Per l'obtenció de proteïnes de membrana externa (OM) i interna (IM), es va utilitzar la solubilitat diferencial que presenten aquestes proteïnes en lauril sarcosinat sòdic (Filip *et al.*, 1973), seguint el mètode descrit per Crosa i Hodges (1981) lleugerament modificat (Diaz i Juárez, 1991).

Un cultiu de tota la nit de la soca bacteriana que es volia analitzar es centrifugava durant 10 min a 3.000 xg, i es rentava dues vegades amb 1 ml de Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 7,3. Les cèl·lules es sonicaven durant 2 x 30

s a 100 W (sonicador Braun) i la suspensió es centrifugava durant 1 min en una microcentrífuga (Eppendorf) per tal d'eliminar les bactèries que no s'havien lisat. Les proteïnes totals de membrana, que es trobaven al sobrenedant, es recollien per centrifugació durant 60 min en una microcentrífuga a 4°C. El precipitat es ressuspenia en Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 7,3 i s'afegia lauril sarcosinat sòdic (Sigma Chemicals) a una concentració final del 0,6%. Generalment s'utilitzava un volum del tampó més un volum de lauril sarcosinat sòdic al 1,2%. Després de permetre la dissolució de les proteïnes de membrana interna en lauril sarcosinat sòdic durant 20 min a temperatura ambient, es centrifugava en una microcentrífuga durant 30 min, també a temperatura ambient. El sobrenedant d'aquesta centrifugació contenia majoritàriament les proteïnes de membrana interna (IM), i el precipitat, que es ressuspenia en 100 µl d'aigua destil·lada, contenia majoritàriament les proteïnes de membrana externa (OM). En ambdós casos, les proteïnes es precipitaven amb 3 volums d'acetona (Panreac) freda durant un mínim de 2 hores a 4°C, i després de centrifugar durant 15 min en una microcentrífuga, es ressuspenien en 100 µl d'H₂O_d.

2.11 VALORACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNES.

Per la mesura de la concentració de proteïnes segons el mètode de Bradford (1976), es va utilitzar l'equip comercial de "Bio-Rad Protein Assay" (Bio-Rad).

Alíquotes de 100 µl de les mostres a assajar o dels patrons de proteïna (albúmina sèrica bovina en un rang de concentracions de 0,1 a 1 mg/ml) es barrejaven amb 5 ml del reactiu comercial de Bio-Rad, diluït 5 vegades i filtrat. Les barreges s'agitaven, i es mesurava la DO a 595 nm en un interval de 5 a 60

min, enfront d'un blanc en el qual la mostra era substituïda pel tampó en que estaven dissoltes les proteïnes a valorar.

Una vegada fetes les lectures, s'extrapolava la concentració de proteïna de les mostres problema a partir de la seva densitat òptica, segons la recta patró construïda amb les densitats òptiques corresponents al patró de concentracions.

2.12 ELECTROFORESI DE PROTEÏNES EN GELS DE POLIACRILAMIDA.

2.12.1 Electroforesi en gels de poliacrilamida.

La separació i l'anàlisi de proteïnes es va fer per electroforesi en gels verticals de poliacrilamida i dodecil sulfat sòdic (SDS-PAGE) en les condicions descrites per Laemmli (1970), utilitzant un gel de compactació al 5% i un rang de concentració d'acrilamida en el gel de resolució del 11 al 15%. Les electroforesis en van realitzar rutinàriament en aparells Mini-Protean II (Bio-Rad).

Per la preparació dels gel de resolució es van seguir les següents proporcions:

	11%	13%	15%
Tampó de resolució x 4	3,25 ml	1,625 ml	2,4 ml
Acilamida-bisacrilamida 30%	4,78 ml	2,825 ml	3,0 ml
H ₂ O _d	4,87 ml	2,05 ml	1,2 ml
APS 10%	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl

Una vegada dipositat el gel de resolució en el suport utilitzat, es va afegir aigua destil.lada per crear una superfície horitzontal de polimerització. Quan el gel de resolució estava polimeritzat, es va afegir el gel de compactació al 5% i es va deixar polimeritzar, prèvia col.locació de la pinta. La preparació del gel de compactació, utilitzat sempre al 5%, es va fer seguint les següents proporcions:

Tampó de compactació x 4	1,12 ml
Acrilamida-bisacrilamida 30%	0,85 ml
H ₂ O _d	2,90 ml
APS 10%	35 µl
TEMED	10 µl

Una vegada polimeritzat el gel de compactació, es va retirar la pinta i es van rentar les butxaques amb aigua destil.lada.

Les mostres es van carregar a les butxaques mitjançant una microxeringa (Hamilton) després d'afegir-hi un volum igual de tampó de mostres x 2 i incubar 5 min a 100°C. L'electroforesi es va desenvolupar en tampó de recorregut, a 40 V pel gel de compactació i 150 V pel de resolució.

Aquest procediment va ser l'utilitzat tant si les proteïnes separades es volien tenyir amb Blau de Coomassie com si es volien transferir a membranes de nitrocel.lulosa.

- Solució d'acrilamida-bisacrilamida: es va preparar amb 30 g d'acrilamida (Boehringer Mannheim) i 0,8 g de bisacrilamida (N, N' etilenbisacrilamida, Bio-Rad) en un volum de 100 ml d'H₂O_{bd}. Es va filtrar la solució i es va guardar a 4°C protegida de la llum.

- Tampó de resolució x 4: 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
0,4% SDS
- Tampó de compactació x4: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8
0,4% SDS
- Solució d'APS: es va preparar una solució d'APS (persulfat d'amoni, Bio-Rad) al 10% en H₂O_d just abans de la utilització.
- Solució de TEMED: es va utilitzar una solució comercial 6,6 M de TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina, Bio-Rad).
- Tampó de recorregut x 10: 0,25 M Tris
1,92 M Glicina (Merck)
1% SDS
- Tampó de mostres x 2: 10% Glicerol (Panreac)
5% β-mercaptoetanol (Bio-Rad)
2,3% SDS
0,0625 M Tris-HCl pH 6,8
0,1% bromofenol blue

2.12.2 Tinció amb Blau de Coomassie.

La tinció amb Blau de Coomassie es va fer submergint el gel durant períodes successius de 30 min en les solucions A, B, i C (prèviament filtrades), i finalment en una solució d'àcid acètic (Panreac) al 10%.

- Solució A: 1.275 ml H₂O_d
1 g Blau de Coomassie R-250 (Bio-Rad)
200 ml àcid acètic
525 ml isopropanol 95%

- Solució B: 1.590 ml H₂O_d
0,1 g Blau de Coomassie R-250
200 ml àcid acètic
210 ml isopropanol 95%
- Solució C: 1.800 ml H₂O_d
200 ml àcid acètic
0,05 g Blau de Coomassie R-250

2.12.3 Marcadors de pes molecular.

Com a marcadors de pes molecular en els gels de proteïnes es van utilitzar barreges comercials de proteïnes de pes molecular conegut, cobrint un rang des de 97,4 fins a 14,4 kDa (Bio-Rad).

En alguns casos, quan les proteïnes separades per electroforesi es volien transferir a membranes, es van utilitzar marcadors de pes molecular pretenyits (Bio-Rad). Cal tenir present que l'addició del colorant fa que les proteïnes migrin de manera diferent a la que els correspon pel seu pes molecular. Per això aquests marcadors no són útils per extrapolar directament altres pesos moleculars, però sí per tenir una evidència clara de l'eficiència de la transferència.

2.13 TRANSFERÈNCIA DE PROTEÏNES A MEMBRANES I IMMUNODETECCIÓ.

2.13.1 Transferència de proteïnes a membranes.

Les proteïnes que es volien transferir a membranes de nitrocel.lulosa (Bio-Rad) eren primer separades en gels de SDS-PAGE, tal com es descriu a l'apartat anterior. Per la transferència es va utilitzar el sistema Mini-Protean II (Bio-Rad).

Després de l'electroforesi, es va submergir el gel durant 10 min en H_2O_d per tal d'eliminar el tampó de recorregut utilitzat a l'electroforesi. Després, tant el gel com la membrana es van equilibrar durant 30 min en tampó de transferència. La transferència es va dur a terme durant 3 hores a 75 V, amb agitació constant, seguint les indicacions dels subministradors de l'equip.

Per comprovar l'eficiència de la transferència, en cas de no haver utilitzat marcadors pretenyits, es va tenyir la part del filtre corresponent al marcador de pesos moleculars amb una solució de Ponceau (Sigma Chemicals) al 0,5% en àcid acètic al 1% durant 5 min, i decoloració amb H_2O_d .

- Tampó de transferència (4°C):
 - 25 mM Tris
 - 190 mM Glicina
 - 20% metanol (Panreac)
 - pH 8,3 (no ajustat)

2.13.2 Immunodetecció.

La membrana de nitrocel·lulosa, a la qual s'havien transferit les proteïnes, es va equilibrar durant 30 min en tampó B. Es va preparar una dilució de l'anticòs contra les proteïnes a detectar en TNB i es va utilitzar aquesta solució per incubar la membrana durant 30 min. Després de rentar tres vegades amb TNB per tal d'eliminar l'excés d'anticòs, es va incubar durant 30 min en una solució de TNB més l'anticòs anti-IgG conjugat. A partir d'aquí es segueixen procediments diferents dependent de l'enzim utilitzat en el conjugat. En aquest treball, l'enzim utilitzat va ser la peroxidasa.

Es va eliminar l'excés d'anticòs conjugat mitjançant dos rentats de 10 min en TNB i es va equilibrar breument la membrana en PBS. El revelat es va fer per una reacció colorimètrica amb una solució de 10 ml de PBS més 0,5 mg de diaminobenzidina (Sigma Chemicals) i 10 µl d'H₂O₂ al 30% (Panreac). Es va deixar desenvolupar la reacció a temperatura ambient i una vegada detectades les bandes es va aturar la reacció amb H₂O_d i es va deixar assecar la membrana.

- Tampó B: 10 mM Tris-HCl pH 7,4
 150 mM NaCl
 0,1% Brij 35 (Sigma Chemicals)
- Tampó TNB: 10 mM Tris-Cl pH 7,4
 500 mM NaCl
 0,1% Brij 35

- PBS: 8 g NaCl
0,2 g K₂PO₄ (Merck)
2,9 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O (Merck)
0,2 g KCl (Merck)
0,2 ml Tween-20 (Panreac)
Ajustar el pH a 7,4 i enrasar a 1.000 ml.
- Tampó #3: 0,1 M Tris-HCl pH 9,5
0,1 M NaCl
0,05 M MgCl₂
- NBT (veure apartat 2.8.8.4).
- BCIP (veure apartat 2.8.8.4)

2.14 VALORACIONS ENZIMÀTIQUES.

2.14.1 Activitat hemolítica.

2.14.1.1 Detecció de la producció d'hemolisina.

La detecció de la producció d'hemolisina de diferents soques es va realitzar per sembra en plaques d'agar-sang i observació de la mesura dels halos d'hemòlisi produïts.

2.14.1.2 Valoració d'activitat hemolítica.

Per la valoració de l'activitat hemolítica a diferents fraccions cel·lulars de cultius de soques d'*E.coli*, es van barrejar alíquotes de les fraccions obtingudes tal com es descriu a l'apartat 2.9.1 (generalment 200 µl per fraccions externes

i 50-100 µl per fraccions internes), amb 1200 µl d'una suspensió d'eritròcits de be. Les mostres es van incubar durant períodes variables (generalment 60 min) a 37°C. Després de centrifugar les mostres durant 10 s en una microcentrífuga per eliminar els eritròcits no lisats, es va mesurar la densitat òptica del sobrenedant a 543 nm, com a reflexe de l'hemoglobina alliberada per la lisi dels eritròcits.

L'activitat hemolítica corresponent al sobrenedant es va quantificar en forma d'unitats d'activitat seguint la següent fórmula (Godessart *et al.*, 1988):

$$\frac{DO_{543} - DO_{543} \text{ control}}{DO_{600} \times \text{min} \times \text{ml}} \times 1.000$$

L'activitat hemolítica corresponent a les fraccions internes (periplasma o citoplasma) es va quantificar com a activitat específica, i es va calcular segons la fórmula (Godessart *et al.*, 1988):

$$\frac{DO_{543} - DO_{543} \text{ control}}{\text{min} \times \text{mg proteïna}} \times 1.000$$

- DO_{543} : densitat òptica a 543 nm de la mostra assajada.
- DO_{543} control: densitat òptica a 543 nm del control en el qual en lloc de mostra hi ha el medi corresponent (medi LB o tampó de xoc)
- DO_{600} : densitat òptica a 600 nm del cultiu bacterià en el moment de la valoració.
- min: temps d'incubació de la reacció de lisis dels eritròcits.
- ml: ml de la fracció cel.lular utilitzats en l'assaig.
- mg: mil·ligrams de proteïna en el volum de la fracció cel.lular que s'asaja.

- Solució d'eritròcits de be: els eritròcits utilitzats als assajos eren rentats amb NaCl 0,9%. Es partia de 3 ml de sang desfibrinada de be (Oxoid, Biochek) que es centrifugaven durant 6 s en una microcentrífuga. Els eritròcits es ressuspenien en el mateix volum de NaCl (Panreac) 0,9%. Aquest rentat es repetia 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 (Panreac) 200 mM, freds, i aquesta suspensió es mantenia en gel.

2.14.2 Valoració d'activitat β-lactamasa.

La valoració de l'activitat β-lactamasa (enzim periplasmàtic) es va realitzar tal com es descriu a la bibliografia (Collmer *et al.*, 1985), seguint el descens de l'absorbància a 235 nm produït per la degradació de la penicilina. Les reaccions es van realitzar en tampó fosfat potàsic 0,1 M pH 7,0, 0,5 mg/ml de penicilina G sòdica (Gibco) i menys del 3,5% del volum de la fracció a valorar. Les valoracions es van fer en volums de 2 ml de tampó, als quals s'afegien 20 μl d'una solució de penicilina G sòdica 50 mg/ml i de 20 a 100 μl de la fracció cel.lular que es volia assajar.

- Tampó fosfat potàsic 0,1 M pH 7,0: es va preparar barrejant 61 ml de K₂HPO₄ 0,1 M amb 39 ml de KH₂PO₄ 0,1M.
- Unitats d'activitat extracel.lular:

$$\frac{\text{Descens DO}_{235}}{\text{min} \times \text{DO}_{600} \times \text{ml}}$$

- Unitats d'activitat intracel.lular (activitat específica):

$$\frac{\text{Descens } DO_{235}}{\text{min} \times \text{mg proteïna}}$$

- Descens DO_{235} : descens de la densitat òptica a 235 nm de la mostra assajada.
- min: temps de seguiment del descens de la densitat òptica a 235 nm.
- DO_{600} : densitat òptica del cultiu en el moment de la valoració.
- ml: volum de la mostra assajada.
- mg: mg de proteïnes de la fracció cel.lular (interna) assajada.

2.14.3 Valoració d'activitat fosfatasa alcalina.

La valoració de l'activitat de l'enzim fosfatasa alcalina (enzim periplasmàtic), es va realitzar tal com s'ha descrit prèviament (Garen i Levinthal, 1960), en tampó Tris-HCl 1 M pH 8,0 i utilitzant com a substrat l'ONPP (4-nitrofenil fosfat, Boheringer Mannheim). Les barreges de reacció es van preparar amb 2,5 ml de Tris-HCl 1M pH 8,0, 300 µl d'una solució d'ONPP (2 mg/ml) i 200 µl de la fracció cel.lular que es volia valorar. Les mostres es van incubar a 37°C durant períodes de fins a 20 hores, i es va detectar l'activitat per mesura de l'absorbància a 410 nm enfront d'un blanc que no contenia mostra.

- Unitats de fosfatasa alcalina extracel.lular:

$$\frac{DO_{410}}{DO_{600} \times \text{min} \times \text{ml}} \times 1000$$

- Unitats de fosfatasa alcalina intracel.lular (activitat específica):

$$\frac{DO_{410}}{DO_{600} \times \text{mg proteïna}} \times 1000$$

- DO_{410} : densitat òptica a 410 nm de la mostra assajada.
- DO_{600} : densitat òptica a 600 nm del cultiu en el moment de la valoració.
- min: temps d'incubació de la reacció.
- ml: volum de la mostra assajada.
- mg proteïna: mg proteïna de la mostra assajada.

2.14.4 Activitat carboximetilcel.lulàsica.

2.14.4.1 Detecció de la producció de carboximetilcel.lulasa.

La detecció de l'activitat carboximetilcel.lulàsica (CMCàsica) de diferents soques es va realitzar per sembra en plaques de LB-agar més carboximetilcel.lulosa (CMC, Sigma Chemicals) al 0,5%. Una vegada incubades les plaques, els halos de degradació del CMC es van posar de manifest per tinció amb Roig Congo (Teather *et al.*, 1982) al 0,5% durant 1,5 min i decoloració amb NaCl 1M.

2.14.4.2 Valoració d'activitat carboximetilcel.lulàsica.

Per la valoració de l'activitat carboximetilcel.lulàsica als diferents compartiments cel.lulars, és necessari en aquest cas realitzar un fraccionament que no impliqui la utilització de tampó de xoc, ja que la sacarosa interfereix en

la valoració. En aquest cas, doncs, únicament es va valorar l'activitat CMCàsica de fraccions externes i internes, obtingudes per sonicació.

La mesura de l'activitat CMCàsica es basa en la valoració de l'alliberament de sucres reductors per la degradació de CMC. Per això, primer es va fer la reacció de degradació de CMC, barrejant volums iguals de mostra i de CMC al 3.2% en tampó citrat-fosfat pH 6,8. Generalment es van utilitzar 500 µl per les fraccions externes i 50-100 µl per les internes. Les barreges de reacció es van incubar durant 60 min a 55°C. Després d'aquest temps es va ajustar el volum de reacció a 1 ml amb aigua destil.lada i es va procedir a la determinació de sucres reductors pel mètode de Nelson-Somogyi (Spiro, 1966).

S'afegia a la mostra 1 ml de reactiu alcalí de coure i s'incubava durant 10 min a 100°C. Després de refredar en un bany d'aigua, es va afegir 1 ml de reactiu d'arseno-molibdat, es va agitar i es van afegir 3 ml d'aigua destil.lada, i es va barrejar per inversió. Després es van centrifugar les mostres durant 5 min a 3.000 xg, per tal d'eliminar les restes de CMC, i es va fer la lectura de densitat òptica a 520 nm com a reflexe de la glucosa alliberada.

Per tal de determinar la quantitat de sucres reductors alliberats, es va fer la mateixa determinació amb un patró de glucosa cobrint un rang de concentracions conegudes entre 10 i 100 µg/ml.

- Unitats de CMCasa: es descriu una unitat com la quantitat d'enzim que catalitza l'alliberament de sucres reductors equivalents a 1 μM de glucosa per minut. Aquestes unitats van ser utilitzades fent la correcció corespondent al creixement bacterià (DO_{600}).

$$\frac{\mu\text{M de glucosa}}{\text{min} \times \text{DO}_{600} \times \text{ml}} \times 1000$$

- Solució de CMC: la solució de CMC (Sigma Chemicals), es va preparar al 0,5% en tampó citrat fosfat pH 6,8.
- Tampó citrat fosfat pH 6,8: es va preparar barrejant 9,1 ml d'àcid cítric 0,1 M amb 40,9 ml de Na_2HPO_4 0,1 M i 50 ml d'aigua destil.lada.
- Reactiu alcalí de coure: es va preparar barrejant les solucions I i II en una relació 4:1, just abans de la seva utilització.
 - Solució I: 15 g de tartrat sòdic potàsic i 30 g de CO_3Na_2 es dissolien en 300 ml d'aigua destil.lada. S'afegien després 20 g de CO_3HNa , i una solució de Na_2SO_4 (180 g/500 ml). Finalment s'enrasava a 1 l amb H_2O_d .
 - Solució II: es preparava per dissolució de 5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ i 45 g de Na_2SO_4 en 250 ml d'aigua destil.lada.
- Reactiu d'arseno molibdat: es preparava dissolent 25 g de molibdat d'amoni en 450 ml d'aigua destil.lada, i barrejant aquesta solució amb 21 ml de H_2SO_4 96%. Després d'agitar s'afegia una dissolució de 3 g de $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ en 25 ml d'aigua destilada. Després de deixar el reactiu durant 24-48 hores a 37°C , es guardava en una ampolla opaca. Abans de la seva utilització, es barrejava en una relació 1:2 amb H_2SO_4 1,5 N.