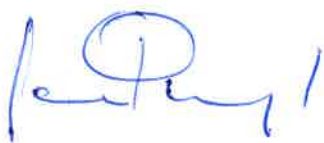


# Anàlisi Funcional de Dominis de Proteïnes Implicades en la Motilitat de *Mycoplasma genitalium*

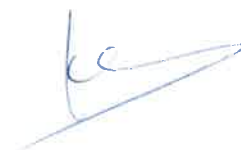
Alicia Broto Hernández  
2014

Tesi doctoral presentada per Alicia Broto Hernández, llicenciada en Bioquímica,  
per optar al grau de Doctor en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina  
per la Universitat Autònoma de Barcelona.

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



Dr. Jaume Piñol Ribas



Dr. Enrique Querol Murillo



**Als meus pares**



# Índex

Abreviatures

<b>Introducció general</b>	<b>1</b>
Els micoplasmes	1
Tècniques de manipulació genètica	2
El concepte de genoma mínim i el model de cèl·lula mínima	4
<i>Mycoplasma genitalium</i> : un patògen humà emergent	6
Mecanisme d'infecció i evasió del sistema immunitari de l'hoste	8
Adherència i motilitat	8
Variabilitat antigènica	9
Efectes citopàtics i toxines	10
Internalització a la cèl·lula hoste	11
Morfologia cel·lular: Organela terminal i citoesquelet	12
Arquitectura de l'organela terminal	13
Multifuncionalitat de l'organela terminal	16
Motilitat	16
Divisió cel·lular dels micoplasmes	19
<b>Objectius</b>	<b>21</b>
<b>Capítol I. Caracterització funcional d'una nova proteïna de <i>M. genitalium</i></b>	<b>23</b>
<b>Introducció</b>	<b>23</b>
<b>Resultats</b>	<b>24</b>
1. Obtenció d'una soca defectiva en proteïna MG218-s	24
1.1. Disseny de l'estratègia per introduir mutacions puntuals al genoma de <i>M. genitalium</i>	25
1.2. Anàlisi genòmic dels transformants obtinguts en el primer i segon pas de l'estratègia de mutació del genoma de <i>M. genitalium</i>	27
1.3. Determinació de l'inici de traducció de la proteïna MG218-s	28
1.4. Determinació de l'inici de transcripció del nou gen	30
1.5. Obtenció de mutants defectius en MG218-s	31
2. Caracterització del mutant defectiu en MG218-s	32
2.1. Perfil proteic	32
2.2. Estudi de la capacitat d'hemadsorció	34
2.3. Estudi de la motilitat del mutant defectiu en MG218-s	34
2.4. Morfologia cel·lular	35
2.5. Anàlisi de la ultraestructura del mutant defectiu en MG218-s	36
3. Estudis de complementació amb el gen <i>mg218-s</i>	37
3.1. Construcció del vector pMT $\Delta$ ncat	37
3.2. Construcció del vector pMT $\Delta$ ncat218s i assaig de complementació de la soca MD-P3	38
3.3. Estudi del fenotip dels mutants MD-P3+MG218s	39
3.4. Localització de la proteïna MG218-s a <i>M. genitalium</i> per fluorescència	40
3.5. Estudi de l'efecte de la reintroducció de la proteïna MG218-s en diferents mutants defectius en la proteïna	40
<b>Discussió</b>	<b>41</b>

<b>Capítol II. Estudi de la funció del domini de la caixa EAGR a la proteïna MG200 de <i>M. genitalium</i></b>	<b>49</b>
<b>Introducció</b>	<b>49</b>
<b>Resultats</b>	<b>50</b>
1. Obtenició de mutants $\Delta E$	50
1.1. Construcció del vector pMTncat200 $\Delta E$	50
1.2. Assaig de transformació de la soca C12 amb pMtnecat200 $\Delta E$	50
1.3. Identificació dels punts d'inserció del minitrasposó en els mutants $\Delta E$	51
2. Caracterització del fenotip de mutants $\Delta E$	52
2.1. Perfil proteic	52
2.2. Assaig qualitatiu de la capacitat d'hemadsorpció	52
2.3. Immunolocalització de les proteïnes MG200 i MG200 $\Delta E$	53
2.4. Estudi de la motilitat dels mutants $\Delta E$	53
<b>Discussió</b>	<b>54</b>
<b>Capítol III. Estudi de la funció de la regió amino-terminal de la proteïna MG200 de <i>M. genitalium</i></b>	<b>57</b>
<b>Introducció</b>	<b>57</b>
<b>Primera Part. Caracterització de la funció de l'extrem amino-terminal de la proteïna MG200</b>	<b>59</b>
<b>I. Resultats</b>	<b>59</b>
I.1. Disseny de tres modificacions amino-terminals en la proteïna MG200	59
I.2. Obtenició de les soques mutants DJ, C <sub>J</sub> i C <sub>JGF</sub>	60
I.2.1. Disseny dels vectors pBDJ, pBC <sub>J</sub> i pBC <sub>JGF</sub> i assaig de transformació a <i>M. genitalium</i>	60
I.2.2. Anàlisi genòmic dels clons obtinguts en les transformacions	61
I.3. Caracterització de les soques mutants DJ, C <sub>J</sub> i C <sub>JGF</sub>	63
I.3.1. Perfil proteic dels mutants de MG200	63
I.3.2. Estudi de la capacitat d'Hemadsorció	64
I.3.3. Anàlisi de l'operó MgPa en els genomes dels mutants DJ, C <sub>J</sub> i C <sub>JGF</sub>	65
I.3.4. Estudi de la motilitat dels mutants de MG200	66
<b>Segona Part. Estudis de complementació de la soca C12</b>	<b>66</b>
<b>II. Resultats</b>	<b>66</b>
II.1. Desenvolupament d'un anticòs policlonal contra la regió amino-terminal de la proteïna MG200 i revisió del perfil proteic dels mutants C2 i C12	66
II.2. Disseny dels vectors pMTncatC <sub>J</sub> , pMTncatC <sub>JGF</sub> i pMTncat200 i assaig de transformació en el mutant C12	68
II.3. Perfil proteic dels mutants derivats de la soca C12 amb una de les versions de proteïna MG200	69
II.4. Estudi de la morfologia de les cèl·lules per microscòpia de rastreig	69
II.5. Estudi de la capacitat d'Hemadsorció	71
II.6. Microcinematografies	71
<b>Discussió</b>	<b>72</b>
<b>Resum</b>	<b>73</b>

<b>Conclusions</b>	<b>75</b>
<b>Materials i Mètodes</b>	<b>77</b>
1. Material biològic	77
1.1. Descripció de soques, vectors i encebadors	77
Soques d' <i>E. coli</i>	77
Soques de <i>M. genitalium</i>	77
Vectors	78
Encebadors utilitzats	80
1.2. Medis de cultiu i suplement utilitzats	82
Cultiu de soques d' <i>E. coli</i>	82
Cultiu de soques de <i>M. genitalium</i>	83
1.3. Condicions de cultiu	84
Cultiu de soques d' <i>E. coli</i>	84
Cultiu de soques de <i>M. genitalium</i>	84
1.4. Conservació de soques	84
Conservació de soques d' <i>E. coli</i>	84
Conservació de soques de <i>M. genitalium</i>	84
1.5. Mesura de la densitat òptica d'un cultiu	85
1.6. Protocols de transformació de soques bacterians utilitzats en aquest estudi	85
Transformació de soques d' <i>E. coli</i>	85
Transformació de soques de <i>M. genitalium</i> per electroporació	85
2. Mètodes de DNA recombinant	86
2.1. Extracció de DNA plasmídic	86
2.2. Extracció de DNA genòmic de les soques de <i>M. genitalium</i>	86
2.3. Quantificació de DNA	86
2.4. Seqüenciació de DNA	87
2.5. Digestió de fragments de DNA	87
2.6. Lligació de fragments de DNA	87
2.7. Electroforesi de DNA en gels d'agarosa	87
2.8. Purificació de fragments de DNA dels gels d'agarosa	87
2.9. Amplificació de fragments de DNA per PCR	87
2.10. Marcatge no radioactiu de fragments de DNA per PCR	87
2.11. Transferència de tipus Southern	88
3. Construcció dels diferents plasmidis desenvolupats en aquest estudi	88
4. Tècniques de manipulació de RNA i assaig per <i>primer extension</i>	92
5. Tècniques d'anàlisi de proteïnes	93
5.1. Extracció de mostres de proteïna total	93
5.2. Quantificació de mostres de proteïna	93
5.3. Electroforesi discontinua en gels de poliacrilamida (SDS-PAGE)	93
5.4. Tinció amb Blau de Comassie dels gels d'electroforesi	93
5.5. Transferència de tipus Western (Western-blot)	94
5.6. Expressió i purificació del fragment J3GF de la proteïna MG200 a <i>E. coli</i>	94
5.7. Diàlisi del fragment J3GF de la proteïna MG200 a <i>E. coli</i>	95
5.8. Obtenció d'anticossos policlonals contra el fragment J3GF de la proteïna MG200	95
6. Tècniques utilitzades pel fenotipat de les soques de <i>M. genitalium</i>	95
6.1. Hemadsorció (HA)	95

6.1.1. Assaig HA Qualitativa	95
6.1.2. Assaig HA Quantitativa per citometria	96
6.2. Estudis microcinematogràfics	96
6.3. Localització de proteïnes per microscòpia de fluorescència	97
6.3.1. Detecció de proteïnes de fusió fluorescents	97
6.3.2. Immunolocalització	97
6.4. Microscòpia electrònica de transmissió	98
6.5. Microscòpia electrònica de rastreig	98

<b>Bibliografia</b>	<b>101</b>
---------------------	------------

Agraïments

Annex



## Abreviatures

3D	tridimensional
aa	aminoàcids
Ac	anticòs
ATCC	american Type Culture Collection
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolyl fosfat
BrEt	Bromur d'etidi
cfu	Colony forming units
C-ter	Carboxi terminal
CIRCE	Controlling inverted repeat of chaperone expression
dil	Dilució
DNA	àcid desoxiribonucleic
dNTP	Deoxi-nucleòtids trifosfat
EAGR	Enriched in aromatic and glycine residues
EDTA	Etilendiamintetraacètic
EHA	Eficiència d'hemadsorció
EtOH absolut	Etanol 100 % (CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH)
g	Constant gravitatòria 9,8 m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>
h	hora(es)
HA	Hemadsorció
His	histidina
Hoechst 33342	2'-[4-ethoxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'-bi-1H-benzimidazole trihydrochloride trihydrate
IPTG	b-D-isopropil-tiogalactòsid
kb	kiloparells de base (10 <sup>3</sup> bp)
kDa	kiloDaltons (10 <sup>3</sup> Da)
LB	medi de cultiu Luria-Bertani
MD	Mutagènesi dirigida
min	minuts
MOT	Multi-organela terminal
N-ter	Amino terminal
NBT	Nitroblue tetrazonium chloride
NC	nitrocel·lulosa
nt	Nucleòtid(s)
O.D.	densitat òptica
o/n	overnight (toda la noche, 15 h aprox.)
OT	Organela terminal
p/v	pes per volum (g/100ml)
PA	fosfatasa alcalina
pb	Parell de bases
PBS	Phosphate buffer saline (tampó fosfat salí)
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PID	malaltia inflamatòria pèlvica
PSA	persulfat amònic
RBS	Ribosome binding site (lloc d'unió del ribosoma)
Regió G/F	Regió rica en glicina i fenilalanina
RNA	àcid ribonucleic
rpm	revolucions per minut
s	segons
SDS	Sodium DodecylSulphate
SDS-PAGE	electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS

SEM	Microscòpia electrònica de restreig
TA	Temperatura ambient
TAE	tp. Tris-acètic EDTA
TEA	Trietanolamina
TEM	Microscòpia electrònica de transmissió
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilètilendiamina
tetM	Gen de resistència a tetraciclina
UNG	Uretritis no gonocòccica
UV	ultravioleta
V	volts
v/v	volum per volum (mL en 100 mL)
Vol.	Volum
WT	Soca salvatge (Wild-type)
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactoside

# Introducció

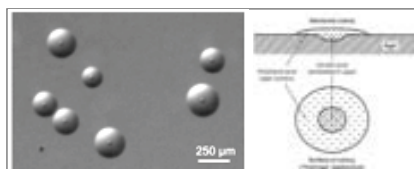
## Els micoplasmes

Els micoplasmes són els procariotes autoreplicatius més petits que es poden cultivar en medi axènic. Pertanyen a la classe *Mollicutes* (Figura 1), un ampli grup de bacteris que no tenen paret cel·lular i presenten un baix contingut en G+C en el seu genoma (Razin, 1985; Dybvig and Voelker, 1996). Es caracteritzen per tenir una mida molt reduïda (0,2-0,5 µm) i membranes riques en colesterol i lipoproteïnes. Una altra característica és l'ús del codó TGA com a codó de triptòfan, en comptes de codó de stop, el que dificulta l'expressió heteròloga de proteïnes d'aquests microorganismes.

Característiques	<i>Mollicutes</i>	Altres procariotes
Paret cel·lular	Absent	Present
Membrana plasmàtica	Conté colesterol (en la majoria d'espècies)	Sense colesterol
Mida del genoma	Entre 564 i més de 2.220 kb	Entre 1.050 i més de 10.000 kb
Contingut en G+C dels genomes	23-40 mol%	25-75 mol%
Nº de operons rARN	1 o 2 (3 operons rARN a <i>Mesoplasma lactucae</i> )	Entre 1 i 10
Longitud 5S rARN	104-113 nucleòtids	>114 nucleòtids
Nº de gens tARN	30 ( <i>M. capricolum</i> ), 33 ( <i>M. pneumoniae</i> )	84 ( <i>B. subtilis</i> ), 86 ( <i>E. coli</i> )
Ús del codó UGA	Codifica per triptofan a <i>Mycoplasma</i> , <i>Ureoplasma</i> , <i>Spiroplasma</i> i <i>Mesoplasma</i>	Codó de stop
RNA polimerasa	Resistent a rifampicina	Sensible a rifampicina

**Figura 1.** Característiques distintives entre *Mollicutes* i la resta d'Eubactèries. Taula extreta de (Razin *et al.*, 1998).

Es tracta de microorganismes estretament relacionats amb els bacteris Gram-positius. De fet es creu que van evolucionar de forma regressiva per reducció de genoma d'un avantpassat Gram-positiu, específicament de la família *Bacillaceae* (Woese *et al.*, 1980). El reduït genoma dels micoplasmes oscil·la entre les 564 kb de *M. parvum* (do Nascimento *et al.*, 2014) i les 1358 kb de *M. penetrans* (Sasaki *et al.*, 2002). Aquesta austeritat genòmica fa que tinguin limitades les opcions metabòliques de replicació i supervivència. La reduïda capacitat biosintètica que presenten imposa uns requeriments nutricionals molt estrictes que inclouen la necessitat d'incorporar aminoàcids, nucleòtids, àcids grassos i esterols a partir de fonts externes (Pollack *et al.*, 1997). Aquesta necessitat fa que hagin adquirit un estil de vida parasitari obligat. D'altra banda, també cal destacar que són difícils de cultivar. Calen medis molt rics, com per exemple SP4 (Tully *et al.*, 1979) i, tot i així, creixen lentament. Per exemple, l'aïllament en placa de colònies de *M. genitalium* pot trigar entre 7 i 15 dies i les colònies que es desenvolupen tenen una característica forma d'ou ferrat amb una mida entre 0,1-0,4 mm (Figura 2).



**Figura 2.** Colònies de *Mycoplasma genitalium* desenvolupades en medi sòlid. L'endinsament de la regió central de la colònia a l'interior de l'agar dona lloc a colònies en forma d'ou ferrat.

Els micoplasmes, on s'inclouen els gèneres de *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma*, *Spiroplasma* i *Anaeroplasmata*, són paràsits o comensals obligats d'un ampli ventall d'hostes, que inclouen humans, mamífers, rèptils, peixos, artròpodes i plantes (Razin *et al.*, 1998). Com a patògens són agents causants de



malalties de caràcter molt divers que inclouen patologies respiratòries, urinàries, oculars, etc., tant cròniques com agudes, caracteritzades per una baixa mortalitat i una elevada morbiditat.

Del gènere *Mycoplasma* s'han descrit prop de 100 espècies (Razin *et al.*, 1998) i d'aquestes es considera que 15 són d'origen humà (Figura 3) (Tully, 1993; Jensen, 2006). La majoria es consideren comensals del tracte respiratori o urogenital, però n'hi ha quatre, entre elles *Mycoplasma genitalium*, que presenten propietats patogèniques. Els micoplasmes poden causar malalties agudes i cròniques en múltiples llocs i amb complicacions d'ampli abast. Cal destacar, que també han estat implicats com a cofactors en patologies molt diverses com en la patogènesis del SIDA, la transformació de cèl·lules malignes, les aberracions cromosomals i altres patologies més complexes com la fatiga crònica o diverses artritis (Tsai *et al.*, 1995; Taylor-Robinson, 1996; Baseman and Tully, 1997).

Soca	aïllat per primer cop	Lloc de colonització		Metabolitza		considerat patogènic
		tracte genital	tracte respiratori	Glucosa	Arginina	
<i>M. hominis</i>	1937	+			+	+
<i>M. fermentans</i>	1952	+?		+	+	+
<i>U. Urealyticum</i> <sup>a</sup>	1954	+				+
<i>M. salivarium</i>	1955		+		+	
<i>M. primatum</i>	1955		+		+	
<i>M. pneumoniae</i>	1962		+	+		+
<i>M. orale</i>	1964		+		+	
<i>M. buccale</i>	1965		+		+	
<i>M. faucium</i>	1965		+		+	
<i>M. Lipophilum</i>	1974		+		+	
<i>M. genitalium</i>	1981	+		+		+
<i>M. pirum</i>	1985	+		+		?
<i>M. Spermophilum</i>	1991	+			+	?
<i>M. penetrans</i>	1991	+		+	+	?
<i>M. amphoriforme</i>	2005		+	+		?

**Figura 3.** Característiques de les espècies de micoplasma d'origen humà, que pertanyen als gèneres de *Mycoplasma* i *Ureaplasma*. <sup>a</sup>Metabolitza urea únicament. El 2002, es va dividir en *U. urealyticum* i *U. parvum*. ?, sense certesa. Taula extreta de (Taylor-Robinson and Jensen, 2011).

En l'àmbit científic, els micoplasmes també són coneguts com a contaminants freqüents de cultius cel·lulars i són relativament difícils de detectar i eliminar (Chen, 1976; Drexler and Uphoff, 2002; Shlomo Rottem *et al.*, 2012). Cal tenir en compte, que gràcies a la seva mida tant reduïda i l'absència de paret cel·lular fa que siguin fàcilment filtrables per membranes amb porus de diàmetre tant petit com 0,22 µm.

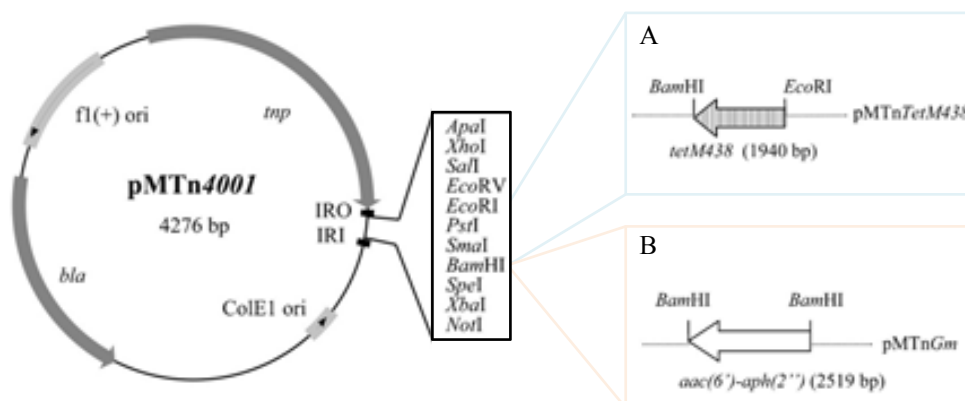
### Tècniques de manipulació genètica

El reduït nombre d'eines de manipulació genètica disponibles a l'hora de treballar amb micoplasmes ha dificultat l'estudi de la biologia d'aquests microorganismes. És una important limitació a l'hora de treballar amb aquests microorganismes que, com hem vist, són difícils de cultivar *in vitro*. No obstant, cal destacar que ens els últims anys s'han aconseguit millorar i ampliar les tècniques disponibles.

L'ús de plasmidis replicatius en micoplasmes queda restringit a unes poques espècies. Només s'han trobat dos plasmidis naturals al gènere micoplasma, pADP201 i pKMK1, que provenen de *M. mycoides subsp. mycoides* (Bergemann *et al.*, 1989; King and Dybvig, 1992). El seu baix nombre de còpies i la incapacitat de replicar en altres espècies diferents de *M. mycoides* i *M. capricolum* va promoure el disseny de

plasmidis artificials basats en l'origen de replicació del cromosoma bacterià (OriC) a *M. capricolum subsp. capricolum* (Janis *et al.*, 2005), a *Mycoplasma agalactiae* (Chopra-Dewasthaly *et al.*, 2005), a *Spiroplasma citri* (Renaudin *et al.*, 1995) i a *M. pulmonis* (Cordova *et al.*, 2002). El fet de no haver pogut desenvolupar plasmidis autoreplicatius funcionals per a les diferents espècies de micoplasma, han propiciat que l'ús dels transposons hagi esdevingut l'eina per excel·lència i la més utilitzada en la manipulació genètica dels micoplasmes. No obstant, hi ha varies espècies de micoplasmes que encara romanen refractàries a la transformació per transposons.

Els transposons disponibles per treballar en micoplasmes són el Tn4001 i Tn916, que van ser originalment aïllats de les bactèries Gram-positives *Staphylococcus aureus* (Lyon *et al.*, 1984) i *Enterococcus faecalis* (Franke and Clewell, 1981), respectivament. La utilitat del transposó Tn4001 (4,7 kb) es va demostrar per primer cop a *M. pneumoniae* (Hedreyda *et al.*, 1993) i posteriorment es va fer servir amb èxit en altres espècies com *M. gallisepticum* (Cao *et al.*, 1994) i *M. genitalium* (Reddy *et al.*, 1996). La reduïda mida del transposó Tn4001 ha promogut el seu ús com a vector de clonatge en un plasmidi suïcida. No obstant, la inestabilitat i dinamisme dels transposons naturals un cop s'han transposat, dificulta la interpretació dels resultats. És per això que es van dissenyar minitransposons, plasmidis que incorporen els transposons naturals però modificats, de forma que el gen de la transposasa queda fora de la zona transposable, solucionant així el problema de la inestabilitat (Figura 4). La construcció de minitransposons derivats de pMTn4001 ha representat un gran avanç en l'obtenció de mutants estables en micoplasma (Pour-El *et al.*, 2002; Pich, Burgos, Planell, *et al.*, 2006).



**Figura 4.** Representació esquemàtica del vector pMTn4001, on es mostra *multicloning site* amb les dianes de restricció disponibles (*ApaI-NotI*). *tnp*, gen de la transposasa (*tnp*); IR-OR y IR-OI, seqüències invertides repetides interna i externa, respectivament. L'esquelet del vector es basa en el plasmidi pBluscript II SK<sup>+</sup> (ColE1 ori, origen de replicació de *E. coli*; *bla*, gen de resistència a ampicil·lina; fl(+)-ori, origen de replicació del bacteriòfag F1). En les caps es representa el clonatge dels gens de resistència a tetraciclina modificat *tetM438* per l'obtenció del vector pMTnTetM438 (A), o el gen de resistència a gentamicina, *acc(6')-aph(2'')*, per obtenir el vector pMTnGm (B). Figura modificada de (Pich *et al.*, 2006).

D'altra banda, els gens de resistència als aminoglicòsids gentamicina, kanamicina i tobramicina, *aac(6')-aph(2'')*, i a tetraciclina (*tetM*) que es troben en els transposons Tn4001 i Tn916, respectivament, s'han utilitzat com a marcadors de selecció en les diferents espècies de micoplasma (Voelker and Dybvig, 1996). En el cas de *M. genitalium*, es fa servir una versió modificada del gen *tetM*, que incorpora en el seu extrem 5' la fusió d'un fragment de 22 pb, corresponents a la regió promotora del gen *mg438*, un gen d'expressió constitutiva a *M. genitalium* (Pich, Burgos, Planell, *et al.*, 2006). Aquesta regió de 22 pb, on només s'han identificat dues possibles caixes -10 i cap caixa -35 ni cap seqüència RBS, és capaç de promoure la transcripció d'aquest gen a *M. genitalium*. Aquests dos gens marcadors es van fer servir per modificar el minitransposó pMTn4001, obtenint els minitransposons pMTnTetM438, portador del gen de resistència a tetraciclina modificat *tetM438* i pMTnGm, portador del gen *aac(6')-aph(2'')* (Figura 4.B i



4.C) (Pich, Burgos, Planell, *et al.*, 2006). L'ús del marcador *tetM438* comporta diverses avantatges front el gen *aac(6')-aph(2'')*, com per exemple la millora de les eficiències de transformació per transposició i l'obtenció de colònies resistents en un menor temps d'incubació (Pich, Burgos, Planell, *et al.*, 2006). Cal dir, però, que en els últims anys s'han incorporat com a marcadors de selecció a micoplasmes els gens de resistència puromicina i a cloramfenicol, que en parlarem més endavant (Renaudin *et al.*, 1992; Algire *et al.*, 2009; Burgos *et al.*, 2012; Calisto *et al.*, 2012).

La utilització de transposons ha suposat un gran avanç en la manipulació genètica de micoplasmes, però el desenvolupament d'altres tècniques més dirigides, com la recombinació homòloga, ha permès eliminar l'aleatorietat associada als transposons. La recombinació homòloga permet l'obtenció de mutants nuls per un gen diana determinat. No obstant, aquesta tècnica només s'ha pogut utilitzar amb èxit en unes poques espècies de micoplasma: *Acholeplasma laidlawii* (Dybvig and Woodard, 1992), *M. gallisepticum* (Cao *et al.*, 1994), *M. pulmonis* (Cordova *et al.*, 2002), *M. genitalium* (Dhandayuthapani *et al.*, 1999), y recentment *M. pneumoniae* (Krishnakumar *et al.*, 2010). La recombinació homòloga a *M. genitalium* és una eina molt valuosa per determinar i estudiar la biologia d'aquest patogen.

## El concepte de genoma mínim i el model de cèl·lula mínima

*M. genitalium* amb un genoma de només 580 kb posseeix un dels genomes més petits que es coneixen entre els organismes autoreplicatius (Figura 5). El 1995 es va convertir en un dels primers organismes en tenir el genoma completament seqüenciat (Fraser *et al.*, 1995). Un any més tard també s'obtenia la seqüència del genoma de *M. pneumoniae*, de tan sols 816 kb (Himmelreich *et al.*, 1996). Aquesta fita va redreçar l'interès dels científics envers els micoplasmes, ja que aquests dos organismes estan considerats uns dels millors models experimentals per definir el genoma mínim (Hutchison III *et al.*, 1999; Glass *et al.*, 2006). La idea de genoma mínim fa referència al conjunt més petit de gens que podria sustentar el funcionament d'una cèl·lula en les condicions ideals, és a dir, amb accés a nutrients essencials i absència d'estrès ambiental (Koonin, 2002).

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

**Figura 5.** Característiques principals d'alguns genomes bacterians. Taula modificada de (Razin *et al.*, 1998).

*M. genitalium* actualment té anotats 525 gens, 482 dels quals codificarien proteïnes i 43 gens correspondrien a rRNAs i tRNAs. Val a dir que en un estudi de proteòmica recent s'han arribat a identificar el 85,3 % de les proteïnes predites en aquest genoma (Párraga Niño *et al.*, 2012). Com la majoria dels micoplasmes, requereix colesterol pel seu creixement i és anaerobi facultatiu. No disposa de la majoria d'enzims relacionats amb el cicle de Krebs o la síntesi d'aminoàcids, nucleòtids, àcids grassos i vitamines. En canvi, conserva els enzims necessaris per la glicòlisi i genera energia per fosforilació a nivell de substrat (Dybvig and Voelker, 1996; Razin *et al.*, 1998). Per contrarestar aquestes deficiències metabòliques disposa d'enzims multifuncionals que li permet compensar la pèrdua d'algunes capacitats biosintètiques, com per exemple, la promiscuïtat biosintètica de la lactat deshidrogenasa de *M. genitalium*, que sembla compensar la manca de malat deshidrogenasa (Cordwell *et al.*, 1997). D'altra banda, el seu genoma conté un gran nombre de transportadors multiespecífics, així com diversos gens relacionats amb l'adhesió i antígens variables de superfície, que són importants per mantenir l'estil de vida parasitari i evadir el sistema immune de l'hoste. El genoma de *M. genitalium* conserva els gens

essencials necessaris per la replicació del DNA, transcripció i traducció, però presenta reducció important en el nombre de gens de rRNA, tRNA i factors de transcripció o altres proteïnes reguladores. Una altra paradoxa que revela l'anàlisi de genoma de *M. genitalium*, i també de *M. pneumoniae*, és l'aparent absència d'una seqüència canònica RBS en molts dels seus gens així com l'absència d'una caixa -35 en els seus promotors o de seqüències terminadores de la transcripció (Fraser *et al.*, 1995; Weiner III *et al.*, 2000; Pich, Burgos, Planell, *et al.*, 2006; Lluch-senar *et al.*, 2007; Güell *et al.*, 2009). Aquestes característiques han convertit a *M. genitalium* en un dels millors models per arribar a entendre els termes moleculars que governen el funcionament d'una maquinària cel·lular (Razin, 1992).

Com hem vist *M. genitalium* presenta un metabolisme mínim i molt poca redundància gènica. Prenent el seu genoma com a model de partida, es van proposar definir el genoma mínim mitjançant una aproximació “*top-down*” que consistiria en determinar quins gens serien essencials per mantenir la capacitat autoreplicativa de la cèl·lula, suprimint tots aquells gens dispensables. Mitjançant un assaig global de mutagènesi per transposó es va estimar el conjunt més petit de gens essencials pel manteniment de la viabilitat de *M. genitalium*. En condicions de creixement de laboratori, aquest conjunt seria de 265-350 gens, tot i que en un treball posterior van corregir aquesta xifra fins a 382 (Hutchison III *et al.*, 1999; Glass *et al.*, 2006). De totes formes, la llista de gens dispensables que es va determinar estaria incompleta, perquè amb posterioritat s'han aïllat mutants amb transposons inserits en gens que havien estat considerats com essencials (Pich, Burgos, Ferrer-Navarro, *et al.*, 2006; Lluch-senar *et al.*, 2007; Pich *et al.*, 2008; Lluch-Senar *et al.*, 2010). El resultat més sorprenent és que una tercera part dels gens essencials eren de funció desconeguda, suggerint que encara falta descobrir i entendre molts mecanismes moleculars importants pel manteniment d'una cèl·lula procariota.

Seguint amb la idea de genoma mínim, cal tenir en compte que encara caldria determinar quants dels gens que havien trobat que eren individualment dispensables, es podrien delectonar simultàniament. Ara bé, en aquest punt el projecte es va trobar amb una limitació important deguda a la impossibilitat de produir delectacions simultànies de gens. Donades les eines de manipulació genètica que es poden aplicar amb *M. genitalium* es podrien fer delectacions seqüencials, però, tot i així, donat que calen gens marcadors per seleccionar les cèl·lules modificades, el nombre de delectacions que es podrien fer seria molt limitat.

Per poder superar aquest obstacle, l'equip del Dr. Venter va proposar que l'aproximació s'hauria de fer sintetitzant químicament genomes reduïts. La síntesi i assemblatge d'un genoma sencer era un repte important, donat que fins al moment només s'havien sintetitzat genomes vírics (Cello *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2003) i la seqüència més llarga de DNA sintetitzada era de 32 kb del *cluster* de gens *poliketide* (Kodumal *et al.*, 2004). Aquesta fita que semblava impossible, l'any 2008 es va fer realitat quan es va publicar la síntesi i assemblatge d'un genoma sintètic, que també havia pres *M. genitalium* com a model, posant a l'abast la tecnologia per fabricar un genoma a la carta (Gibson *et al.*, 2008). A més a més, també es va desenvolupar una nova tecnologia que permetria fer funcionals aquests genomes sintètics. Es tractava d'una nova tècnica que permetia substituir el genoma original d'una cèl·lula de partida per una altre genoma, sintètic o no. La tècnica es basava en un mecanisme per transferir DNA lliure de proteïnes que permetia “reprogramar” bacteris i la van anomenar “transplantament de genoma” (Lartigue *et al.*, 2007). Aquestes dues noves tècniques van permetre l'obtenció de la primera cèl·lula sintètica (Gibson *et al.*, 2010).

Aquesta nova tecnologia encara té limitacions importants (Cohan, 2010), com ara la divergència entre donants i receptors, però permetrà construir un bacteri amb qualsevol conjunt desitjat de canvis respecte un organisme existent, incloent delectacions o insercions enormes de gens d'altres organismes així com canvis específics en els gens existents. D'aquesta forma es podrà profunditzar en qüestions fonamentals de la fisiologia microbiana, l'ecologia o l'evolució, que estaven limitades a l'estudi de genomes existents,

com per exemple l'estudi del genoma mínim i els micoplasmes que estàvem comentant. La biologia sintètica, amb aquestes tècniques, també obre les portes al disseny d'organismes que podrien, per exemple, incorporar noves vies de síntesi d'antibiòtics que són difícils d'obtenir químicament, nous candidats a vacunes o cèl·lules productores de biocombustibles, tot i que aquesta possibilitat també ve acompanyada d'un important debat ètic i moral, que qüestionen els límits de l'aplicació d'aquesta tecnologia (Editorial The Lancet, 2010; Cohan, 2010).

Per arribar al disseny racional de nous organismes com ambiciona la biologia sintètica, falta comprendre molt bé tots els sistemes que governen el funcionament d'una cèl·lula, des dels elements bàsics que la formen fins a la regulació de tots els processos que permeten que sigui totalment autònoma. Des de la seqüenciació dels primers genomes i l'inici de l'era de la genòmica, s'han desenvolupat diferents tècniques per abastar de forma massiva la caracterització del proteoma, el transcriptoma, el metaboloma, etc. Informació qualitativa i, sobretot, quantitativa que ajudarà a comprendre el funcionament dels sistemes biològics existents (Serrano, 2007). En aquest camp de la biologia de sistemes ha contribuït molt l'anàlisi d'una cèl·lula mínima, simple i quantitativa, ja provada per la naturalesa, com *M. genitalium* o *M. pneumoniae* (Güell *et al.*, 2009; Kühner *et al.*, 2009; Yus *et al.*, 2009; Maier *et al.*, 2011; Güell *et al.*, 2011; Yus *et al.*, 2012; Wodke *et al.*, 2013). I, com a fita important, cal mencionar que amb la conjunció de tots els estudis òmics que s'han realitzat, ha estat possible modelar informàticament el funcionament fisiològic d'una cèl·lula, basada en *M. genitalium* (Karr *et al.*, 2012). El desenvolupament d'aquest tipus de models informàtics permetrà el disseny experimental més racional i la millora de la seva interpretació i pot contribuir a accelerar els descobriments biològics, podent, per exemple, identificar gaps de coneixement o comprovar la validesa de teories existents, i la millora de la bioenginyeria (Karr *et al.*, 2012; Macklin *et al.*, 2014).

### ***Mycoplasma genitalium*: un patogen humà emergent**

*Mycoplasma genitalium* és un patogen humà emergent de transmissió sexual (Anagnius *et al.*, 2005; Manhart, Holmes, *et al.*, 2007; McGowin and Anderson-Smits, 2011; Cazanave *et al.*, 2012). Va ser descobert fa 33 anys, quan es va aïllar per primer cop de mostres uretrals de dos pacients amb uretritis no gonocòccica (UNG) (Tully *et al.*, 1981) i posteriorment es va demostrar que causava uretritis en primats inoculats intrauretralment (Taylor-Robinson, 1996). No obstant, donada la dificultat d'aïllar aquest microorganisme a partir de mostres clíniques i l'elevada reactivitat serològica que presenta amb *M. pneumoniae*, el principal agent causant de pneumònia atípica en humans (Krause and Balish, 2001), no va ser fins a inicis dels anys 1990' que es va poder evidenciar la forta associació entre *M. genitalium* i la UNG independent de *Chlamydia trachomatis* (Jensen, 2004). Es va aconseguir gràcies al desenvolupament d'assaig específics i sensibles per la detecció de *M. genitalium* mitjançant PCR.

Les dades indiquen que *M. genitalium* és el responsable entre el 20 i el 35 % dels casos de UNG independent de clamídia (McGowin and Anderson-Smits, 2011). Clínicament, la UNG independent de clamídia causada per *M. genitalium*, no es diferencia d'aquella causada per *C. trachomatis*. No obstant, la presència de *M. genitalium* a la uretra en el post-tractament s'ha associat significativament amb la uretritis persistent o recurrent (Deguchi *et al.*, 2009).

Com hem dit, aquest micoplasma és un reconegut agent etiològic independent causant de UNG aguda i persistent en homes. En dones, a part de la uretritis, també s'ha relacionat amb diversos síndromes inflamatoris de l'aparell reproductor, com la cervicitis, l'endometritis, la malaltia inflamatòria pèlvica (PID) i la infertilitat. En estudis sobre la infertilitat causada per *M. genitalium* s'ha suggerit que també podria estar implicat en complicacions durant l'embaràs, com per exemple el part prematur (McGowin and Anderson-Smits, 2011; Cazanave *et al.*, 2012).



A part de les malalties genitourinàries causades per aquest microorganisme també s'ha vinculat amb diverses patologies extragenitourinàries com l'artritis, la pneumònia o la fatiga crònica (Taylor-Robinson, 2002; Jensen, 2004; Anagnrius *et al.*, 2005). I, més recentment, s'ha vinculat amb la transformació maligne de cèl·lules prostàtiques benignes (Namiki *et al.*, 2009) i la transmissibilitat del HIV (Napierala Mavedzenge and Weiss, 2009).

Les dades de prevalença de *M. genitalium* presentades en l'últim *review* publicat el 2012 (Cazanave *et al.*, 2012) indiquen una taxa d'infecció per *M. genitalium* en la població global és del 1-4 % en homes i del 1 al 6,4 % en dones i destaquen que la presència del microorganisme pot ser asimptomàtica. S'ha determinat que la prevalença en homes amb UNG aguda és del 13-46 %, mentre que en homes asimptomàtics seria del 0-15 % (Ishihara *et al.*, 2004).

Com a reconegut agent de transmissió sexual, la prevalença registrada en centres de prevenció de malalties de transmissió sexual és del 4-38 % i en individus amb parelles infectades augmenta fins al 63 %. La transmissió sexual s'ha pogut comprovar també a nivell molecular analitzant diversos marcadors moleculars, com el gen *mg191*, on s'ha vist que les parelles presentaven el mateix serotip (Cazanave *et al.*, 2012). D'altra banda, cal destacar la forta associació entre la infecció per *M. genitalium* i el HIV amb una prevalença del microorganisme del 3,1-47,5 %. A més a més, els individus infectats amb *M. genitalium* presentaven un increment significatiu en la susceptibilitat d'infecció per HIV (Napierala Mavedzenge and Weiss, 2009).

La manca de paret cel·lular fa que *M. genitalium* sigui intrínsecament resistent a antibiòtics que actuen a aquest nivell com els  $\beta$ -lactàmics, que són la família més àmplia dins l'arsenal terapèutic i la més utilitzada tant per l'ampli espectre d'acció com per les seves propietats farmacocinètiques. El tractament de les infeccions per *M. genitalium* no està estandarditzat (Cazanave *et al.*, 2012). Es recomanen els macròlids, especialment l'azitromicina, però també s'utilitzen tetraciclins o quinolones. No obstant, el tractament amb tetraciclins té un índex de fracàs elevat i en els últims anys s'ha anat observant una creixent resistència també als tractaments tant per macròlids com per fluoroquinolones. El tractament amb azitromicina en dosis única d'1 g té una taxa d'èxit de curació del 79-87 % i en règim de 5 dies, després del fracàs amb doxyciclina, pot incrementar fins al 96 %, però com a segona línia de tractament després del tractament per dosis única d'azitromicina la taxa de curació decau fins al 34 %, demostrant la resistència adquirida a macròlids de pacients pretractats. Si el tractament amb azitromicina no resultar ser efectiu es pot fer servir moxifloxacín, que és l'únic antibiòtic amb èxit de cura, però només s'hauria d'utilitzar en cas de que les altres teràpies fracassessin (Manhart, Golden, *et al.*, 2007; Jernberg *et al.*, 2008; McGowin and Anderson-Smits, 2011; Cazanave *et al.*, 2012). L'eradicació de la infecció per *M. genitalium* és important per evitar la persistència, especialment en dones donat que la inflamació prolongada en llocs del tracte reproductor superior pot causar seqüeles permanents com la infertilitat (Quayle, 2002).

La preocupació per trobar un bon tractament contra les infeccions de *M. genitalium* és una preocupació creixent, no només per l'increment de la resistència a antibiòtics sinó perquè el tractament amb tetraciclins, àmpliament utilitzat per tractar casos d'uretritis i cervicitis, ha fallat i es desconeixen les raons (Falk *et al.*, 2003), no s'ha demostrat un mecanisme de resistència. D'altra banda, és de destacar l'increment de la preocupació pel cas d'un micoplasma molt proper a *M. genitalium* com és *M. pneumoniae*, donat l'augment de la resistència d'aquest micoplasma als macròlids (Jacobs, 2012; Bébéar, 2012) com es va informar a l'Àsia, on fins al 90 % de les soques són resistents. Tanmateix, l'augment de soques de *M. pneumoniae* resistents sembla ser un fenomen generalitzat a tot el món, incloent el nord d'Europa, EEUU i Israel (Citti and Blanchard, 2013). Aquests fets fan que sigui important el monitoratge de les soques resistents i també la recerca de noves teràpies contra les infeccions de micoplasmes humans,



entre els quals trobem *M. genitalium*, i també ha renovat l'interès pel desenvolupament vacunes preventives contra aquests patògens (Citti and Blanchard, 2013).

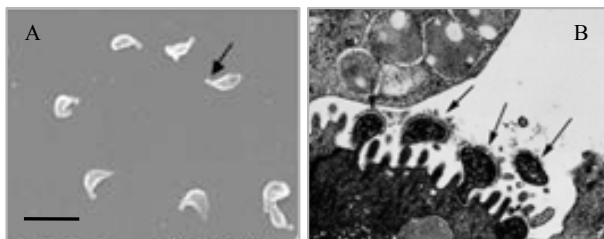
## Mecanisme d'infecció i evasió del sistema immunitari de l'hoste

*M. genitalium*, malgrat la seva simplicitat genòmica i la senzillesa a nivell metabòlic, és un patògen extremadament sofisticat. La seva eficàcia com a patògen és deguda a la capacitat per adherir-se i colonitzar les cèl·lules hostes i dels diferents sistemes que li permeten eludir el sistema immunitari de l'hoste.

### Adherència i motilitat

La primera línia de defensa de l'hoste són les mucoses, que representen una important barrera física que protegeix els teixits de les possibles infeccions. No obstant, el 90% de les infeccions en humans comencen en una mucosa, ja sigui genitourinària, respiratòria o gastrointestinal (Alvarez *et al.*, 2003). Per aquest motiu, el sistema immunitari mucosal té una gran importància per prevenir l'inici d'un procés infecciós. Els micoplasmes, com a sofisticats patògens, han desenvolupat sistemes que els hi permeten unir-se a diferents components d'aquesta mucosa. En el cas de *M. genitalium* s'ha trobat que l'enzim glicolític gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa pot unir mucina, un dels components majoritaris de les superfícies mucoses (Alvarez *et al.*, 2003). Sembla que aquest micoplasma exposa part d'aquest enzim citoplasmàtic a la superfície, on podria actuar com a receptor de mucina, convertint la mucosa en un substrat ideal per adherir-se i desplaçar-se (Alvarez *et al.*, 2003). Estudis realitzats en altres espècies de micoplasma han revelat mecanismes similars que permetrien l'adhesió a diferents components de la matriu extracel·lular. Un altre exemple seria el factor d'elongació Tu (EF-Tu) i la subunitat E1  $\beta$  de la piruvat deshidrogenasa de *M. pneumoniae* que poden unir fibronectina (Dallo *et al.*, 2002).

Travessar les mucoses és important, però l'adhesió a la cèl·lula hoste es considera el primer pas per la infecció i posterior colonització dels teixits. Els mecanisme principal de patogènesi de *M. genitalium* és, per tant, l'adhesió a la superfície de les cèl·lules epitelials genitals, mediada per l'organela terminal (Figura 6). L'organela terminal és una protuberància que trobem en un dels extrems de la cèl·lula i que està enriquida en proteïnes de citadherència. Les adhesines principals d'aquest micoplasma són les proteïnes transmembrana P140 (també coneguda com a MG191 o MgpB) i P110 (MG192 o MgpC). Cal destacar l'elevada reactivitat serològica creuada que presenta la proteïna P140 amb la proteïna P1 de *M. pneumoniae*, donada l'elevada homologia que existeix entre les dues proteïnes (Dallo *et al.*, 1989). Una altra fet que dóna suport a la importància de les adhesines com a factors de virulència és que els mutants espontanis deficientes en adherència presenten mancances d'aquestes proteïnes (Mernaugh *et al.*, 1993). Es desconeix quin és el receptor o receptors cel·lulars d'aquestes adhesines, però hi ha estudis que indiquen que els residus d'àcid siàlic de la superfície de les cèl·lules de l'hoste podrien actuar com a dianes de reconeixement (Baseman, Banai, *et al.*, 1982; Nagai and Miyata, 2006; Kasai *et al.*, 2013).



**Figura 6.** (A) Micrografia de *M. genitalium* per microscòpia electrònica de rastreig. La fletxa senyala l'organela terminal en una de les cèl·lules. La barra d'augment indica 1  $\mu\text{m}$ . (B) Micoplasmes adherits a la superfície de cèl·lules eucariotes per microscòpia electrònica de transmissió. Les fletxes indiquen cèl·lules de micoplasma individuals. Foto propietat de Daniel R. Brown.

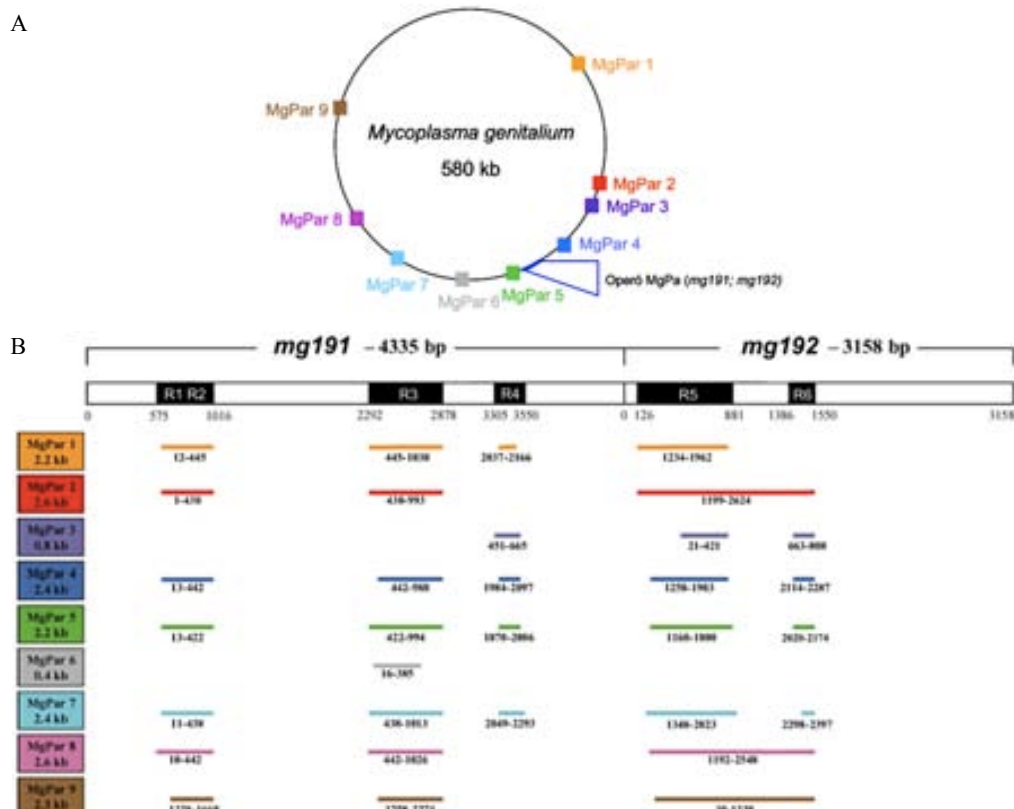
L'organela terminal també és responsable del sistema de motilitat de les cèl·lules, contribuint a la

colonització i disseminació de la infecció. S'ha observat que mutants deficients en motilitat de *M. pneumoniae* tenen problemes per colonitzar les cèl·lules NHBE (Jordan *et al.*, 2007). S'ha suggerit que la motilitat tindria un paper important perquè el micoplasma aconsegueixi traspasar la mucosa i arribi als receptors cel·lulars. D'altra banda, també cal mencionar que en un estudi més recent, fent servir un model murí per reproduir la infecció via vaginal amb *M. genitalium*, s'ha demostrat la ràpida disseminació de la infecció cap al tracte superior de l'aparell reproductor femení i, a més a més, també es va detectar la presència del micoplasma en el genoll dels ratolins 7 dies després de la inoculació intravaginal del micoplasma (McGowin *et al.*, 2010). Aquest resultat, a part de ser el primer cop que es demostra la capacitat d'aquest micoplasma de colonitzar i infectar el tracte reproductor superior, obre la possibilitat d'estudiar la implicació de la motilitat del micoplasma en la seva disseminació a través de teixits, mitjançant l'estudi del de l'evolució de les infeccions causades per mutants deficients en motilitat.

Totes aquestes evidències assenyalen per tant, un paper central de l'organela terminal en la patogènesi dels micoplasmes, però sobre aquesta estructura i les seves funcions parlarem més endavant.

### Variabilitat antigènica

Els principals determinants de la resposta immune de l'hoste front *M. genitalium* són les adhesines P140 i P110 (Svenstrup *et al.*, 2006). Aquestes proteïnes estan codificades en l'operó MgPa (Figura 7), on trobem tres gens: el *mg190* (o *mgpA*), que codifica per una proteïna de funció desconeguda, i els *mg191* (o *mgpB*) i *mg192* (o *mgpC*), que codifiquen les proteïnes P140 i P110, respectivament (Musatovova *et al.*, 2003). Al llarg del genoma de *M. genitalium* trobem distribuïdes nou regions no codificants que contenen seqüències repetides de l'operó MgPa. Aquestes regions es coneixen com a "MgPa islands" (MgPaI) o "MgPa repeats" (MgPar) i representen un 4,7 % del genoma de *M. genitalium* (Fraser *et al.*, 1995).



**Figura 7.** Mecanisme de variabilitat antigènica de *M. genitalium*. **(A)** Diagrama il·lustrant la localització del operó MgPa en el genoma de *M. genitalium* i la distribució de les regions homòlogues MgPaI. **(B)** Esquema mostrant els segments de



seqüència homòloga entre els gens *mg191* i *mg192* (caixes R1 a R5) i els diferents MgPaI. Les línies de color indiquen les regions d'homologia amb l'operó MgPa en cada MgPaI i la numeració indica els extrems 5' i 3' de la regió d'homologia en els gens *mg191* i *mg192*. Les diferents MgPaI tenen longituds i arquitectura diferent respecte la posició de les caixes. Figura extreta de (Burgos, 2009), prèviament modificada de (Iverson-Cabral *et al.*, 2006; Iverson-Cabral *et al.*, 2007).

Organisme	Sistema de variació	Gens involucrats	Elements involucrats en la variació	Nivell de regulació
<i>M. hyorhinis</i>	Vlp	Família de gens	Extensió homopolímers, poly(A)	Control transcripcional
<i>M. bovis</i>	Vsp	Família de gens	Transposició DNA	Control transcripcional
<i>M. gallisepticum</i>	pMGA	Família de gens	Repeticions oligonuclòtids (GAA) <sub>n</sub>	Control transcripcional
<i>M. pulmonis</i>	Vsa	Família de gens	Inversions DNA	Control transcripcional
<i>M. hominis</i>	Vaa	Còpia única	Extensió homopolímers, poly(A)	<i>Framshift</i> traduccional
<i>M. fermentans</i>	P78	Part d'un operó	Extensió homopolímers, poly(A)	<i>Framshift</i> traduccional

**Figura 8.** Característiques genètiques dels sistemes de variació d'antígens de superfície a micoplasmes. Taula extreta de (Razin *et al.*, 1998).

Aquestes seqüències repetides proporcionen una font il·limitada de variabilitat antigènica a *M. genitalium*, perquè poden recombinar entre elles i amb els gens de l'operó MgPa (Iverson-Cabral *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2007). Aquestes recombinacions també s'ha suggerit que poden originar variacions de fase que podrien activar o desactivar, tant de forma reversible com irreversible, l'expressió de les adhesines P140 i P110 (Burgos *et al.*, 2006). La variació de fase en les proteïnes P140 i P110, provocaria la pèrdua de l'organela terminal del micoplasma i de la incapacitat per adherir-se a la cèl·lula hoste o a qualsevol altre superfície.

En altres espècies de micoplasma també s'han descrit mecanismes genètics de variació antigènica, que solen estar associats a lipoproteïnes exposades a la membrana (Figura 8). Aquests mecanismes estan relacionats amb la variació de la mida de proteïnes immunogèniques mitjançant recombinacions de dominis repetits o en l'alteració de l'estat transcripcional i/o traduccional mitjançant ruptures del marc de lectura o reordenacions de seqüències més grans de DNA, ja siguin per deleccions, inversions, insercions, conversions o duplicacions (Bhugra *et al.*, 1995; Citti and Wise, 1995; Zhang and Wise, 1996; Razin *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 2000; Citti *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2012).

### Efectes citopàtics i toxines

Les infeccions provocades per *M. genitalium* són majoritàriament asimptomàtiques. Fet que contribueix en la persistència de les infeccions d'aquest microorganisme, que sembla que s'ha adaptat per respectar al màxim l'hoste que el manté. No obstant, en alguns casos sí que s'originen lesions en el teixit epitelial.

Els micoplasmes no disposen de factors de virulència típics com toxines, citolisines o invasines, i es coneix poc sobre la manera poden produir aquestes lesions, especialment en les espècies més virulentes. En el cas de les infeccions per *M. genitalium*, s'ha suggerit que la simptomatologia derivada de la infecció podria ser conseqüència principalment de la resposta inflamatòria del mateix hoste.

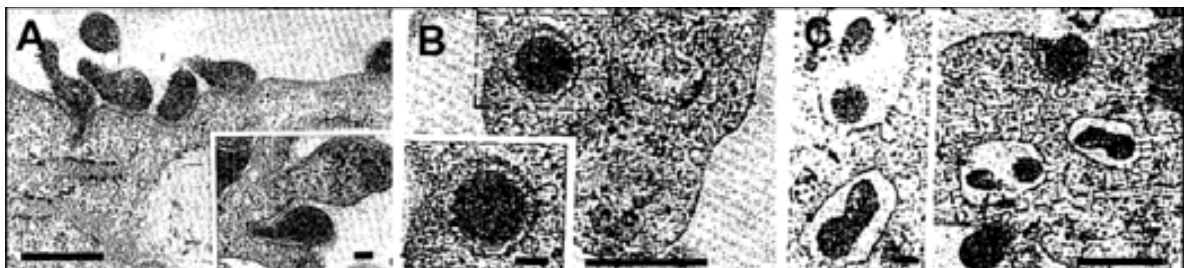
No obstant, en els últims anys s'han trobat possibles factors de virulència que podrien donar lloc als efectes citopàtics provocats específicament per micoplasmes. Un exemple és la toxina CARDS amb activitat ADP-ribosiltransferasa, codificada pel gen *mpn372* de *M. pneumoniae*. Igual que la subunitat S1 de la toxina pertussis secretada per *Bordetella pertussis* (Locht and Antoine, 1995), la toxina CARDS podria produir la ribosilació de l'ADP de la proteïna G, interferint en la transmissió dels senyals dels receptors de la superfície cel·lular. Han demostrat que el subministrament de la proteïna MPN372 produeix una vacuolització extensiva i en darrer terme la mort de les cèl·lules exposades (Kannan and Baseman, 2006). D'altra banda, els micoplasmes produeixen superòxids i peròxid d'hidrogen a uns

nivells susceptibles d'induir citotoxicitat i no disposen d'enzims com la catalasa o la superòxid dismutasa per eliminar l'estrès oxidatiu resultant del seu metabolisme. Alguns estudis han vinculat l'estrès oxidatiu derivat de la producció de peròxid a l'activitat hemolítica que exhibeixen algunes espècies de micoplasma (Kannan and Baseman, 2000). Per exemple, *M. mycoides* alliberaria el peròxid produït per l'enzim GlpO directament a l'interior de la cèl·lula hoste, causant-li la mort (Pilo *et al.*, 2005). Com hem dit, els micoplasmes no disposen de catalasa o peròxid dismutasa, però tenen altres sistemes que els permeten fer front a l'estrès oxidatiu que produeixen tant ells mateixos com la resposta immunitària innata de l'hoste. *M. genitalium* per exemple, disposa del gen *mg408* que codifica per un enzim que catalitza la reducció dels residus de metionina oxidats de les proteïnes (MsrA). La disrupció d'aquest gen incrementa la sensibilitat del bacteri al peròxid d'hidrogen i disminueix la virulència de la soca defectiva (Dhandayuthapani *et al.*, 2001; Das *et al.*, 2012).

### Internalització a la cèl·lula hoste

El caràcter crònic de les malalties causades per *M. genitalium* es deu en gran part a la capacitat d'aquest patògen per internalitzar-se, replicar-se i subsistir dins de la cèl·lula hoste (Dallo and Baseman, 2000).

S'ha comprovat, en estudis *in vitro* amb models de cèl·lules epitelials vaginals (Herbst-Kralovetz *et al.*, 2008), que 2h després de la infecció *M. genitalium* s'ha adherit a les cèl·lules hoste i a les 3h, l'adhesió va seguida de la invasió del microorganisme que s'internalitza dins la cèl·lula hoste (McGowin, Ma, *et al.*, 2009). El mecanisme d'internalització és encara desconegut, però de moment s'ha observat que quan aquest micoplasma entra en contacte directe amb una cèl·lula, es forma una depressió amb característiques similars a les invaginacions recobertes per clatrina (Mernaugh *et al.*, 1993), suggerint que el mecanisme d'invasió cel·lular dels micoplasmes podria ser similar al de *Chlamydia psittaci* o *C. trachomatis* (Hodinka *et al.*, 1988). L'òrganel·la terminal del micoplasma està sempre en contacte amb la membrana cel·lular. Per aquest motiu, s'ha suggerit que receptors situats en aquesta estructura podrien ser els desencadenants del procés invasiu. Un cop internalitzat, *M. genitalium* es localitza en vacuoles generalment a la regió perinuclear, però també s'ha indicat la possible localització nuclear, una localització sorprenent en altres bacteris (Figura 9) (Jensen *et al.*, 1994; Baseman *et al.*, 1995; Ueno *et al.*, 2008; McGowin, Popov, *et al.*, 2009; Taylor-Robinson and Jensen, 2011).



**Figura 9.** Interacció entre *M. genitalium* i fibroblasts de pulmó després de 2 h (A) i 12 h d'incubació (B i C). A partir de les 12 h després de la infecció es comencen a observar micoplasmes internalitzats en vesícules del tipus clatrina. Les barres d'augment indiquen 500 nm i les més petites 100 nm. Figura extreta de (Mernaugh *et al.*, 1993).

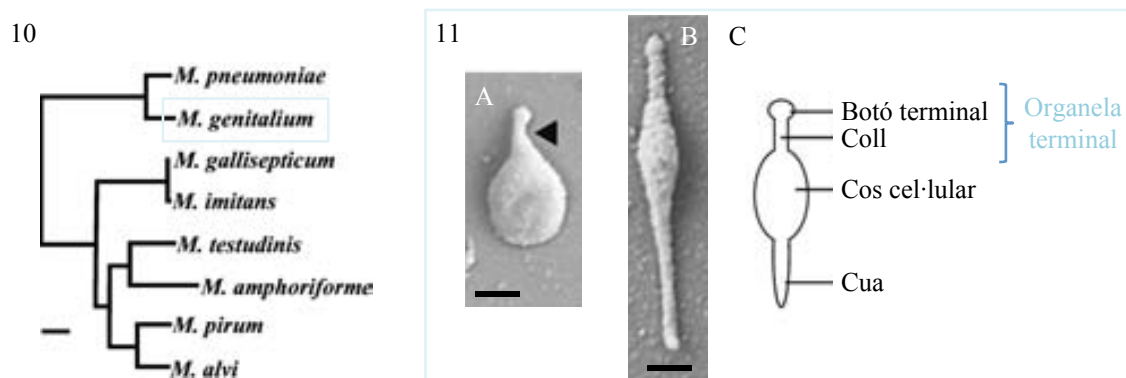
La infecció indueix la resposta innata del sistema immunitari específicament mediada pel reconeixement de lipoproteïnes expressades a la superfície de la cèl·lula del micoplasma. Aquestes lipoproteïnes interaccionen amb els receptors TLR1, TLR2 i TLR6 induint l'activació de la via NF- $\kappa$ B, que permeten l'activació i reclutament de monòcits i macròfags a la mucosa vaginal o de la cèrvix (McGowin, Ma, *et al.*, 2009). Tot i que la fagocitosi de *M. genitalium* per macròfags pot eradicar la infecció de forma efectiva, la localització intracel·lular del microorganisme li permet escapar del sistema immunitari de l'hoste i, al mateix temps, li confereix resistència als tractaments amb antibiòtics, donat que molts no

poden travessar la membrana cel·lular, afavorint la cronicitat de les infeccions (Cazanave *et al.*, 2012).

### Morfologia cel·lular: Organela terminal i citoesquelet

Una de les característiques distintives dels micoplasmes és l'absència de capa de peptidoglicà, que fa que no siguin susceptibles de tinció Gram i els fa més sensibles a detergents, alcohols i canvis osmòtics. L'absència de paret cel·lular afavoreix les morfologies esfèriques o pleomòrfiques dels micoplasmes. Tot i així, algunes espècies de micoplasma tenen morfologies concretes i característiques. En el cas de *M. genitalium* es pot observar una prolongació de la membrana en un dels pols de la cèl·lula, que li atorga la característica forma de "pera". Aquesta protuberància es coneix com a organela terminal i és característica de les espècies de *Mycoplasma* que formen part del *cluster* filogenètic de *M. pneumoniae* (excepte *Mycoplasma alvi*) (Figura 10) (Hatchel and Balish, 2008).

L'organela terminal es pot dividir en una part proximal o coll, enganxada al cos cel·lular, i una part més distal o botó terminal, que consisteix en un petit engruiximent després del coll (Figura 11). Entre les diferents espècies que presenten aquesta morfologia existeixen algunes diferències distintives, com la forma més allargada de *M. pneumoniae* o la curvatura de l'organela terminal que presenta *M. genitalium*. A *M. pneumoniae* també es pot distingir clarament una cua en el pol oposat de la cèl·lula. Cal dir, que recentment en el nostre grup s'ha pogut determinar que *M. genitalium* també presentaria aquesta cua, tot i que desconeixem la possible funció d'aquesta (manuscrit en preparació).



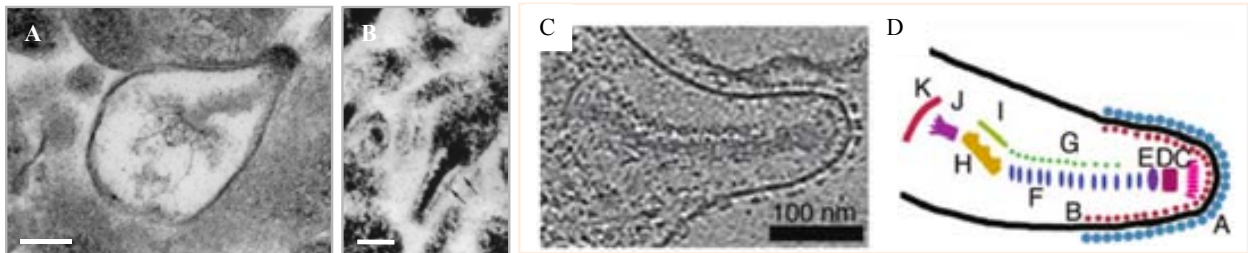
**Figura 10.** Arbre filogenètic basat en les seqüències del rRNA 16S dels micoplasmes del *cluster* de *M. pneumoniae*. Figura extreta de (Hatchel and Balish, 2008).

**Figura 11.** Micrografies de microscòpia electrònica de rastreig de cèl·lules de micoplasma cresques sobre cobreobjectes de vidre. (A) *M. genitalium*; (B) *M. pneumoniae*; (C) Representació esquemàtica d'una cèl·lula de micoplasma. El cap de fletxa senyala la curvatura de l'organela terminal *M. genitalium*. La barra d'augment indica 250 nm. Figura modificada de (Hatchel and Balish, 2008).

El secret dels micoplasmes per mantenir una morfologia tant característica, en absència de paret cel·lular, és la presència d'un complex citoesquelet intern (Trachtenberg, 1998), que polaritza la cèl·lula estructurant l'organela terminal (Figura 12.A i 12.B).

Les cèl·lules de micoplasma són sensibles a l'ús de detergents. Aquest fet ha permès estudiar el citoesquelet d'aquests microorganismes, donat que roman intacte després de tractar les cèl·lules amb el detergent Triton X-100. Després de tractar les cèl·lules d'aquesta forma, s'observa una estructura complexa de proteïnes coneguda com a fracció insoluble en Triton X-100 o "*Triton shell*" (Meng and Pfister, 1980; Gobel *et al.*, 1981). Aquesta estructura està formada per un eix proteic d'uns 220 nm de llarg i 50 nm de gruix, segons l'espècie, que suportaria el coll de l'organela terminal (Hatchel and Balish, 2008). S'ha observat també que aquest eix està constituït per dues barres estriades separades per un petit espai i que semblen estar connectades per unes fibres radials a la perifèria de la membrana (Hegermann *et*

*al.*, 2002). A la part més distal d'aquest eix s'observa una estructura més gruixuda que constitueix el botó terminal. La part proximal de l'eix s'uneix a un complex format per dos anells de proteïnes en forma de roda que connecten amb unes fibres radials, també ancorades a la membrana. Sembla que també existeixen fibres que s'endinsen al citosol, així també com una estructura proteica íntimament associada al voltant de la membrana cel·lular. Mitjançant criotomografia electrònica es va fer una reconstrucció més detallada i tridimensional de l'organela terminal de *M. pneumoniae* (Henderson and Jensen, 2006; Seybert *et al.*, 2006). En la reconstrucció es va veure que la ultraestructura de l'organela terminal estaria constituïda per un mínim d'onze proteïnes diferents, el que dóna idea de la seva gran complexitat (Figura 12.C i 12.D).



**Figura 12.** Citoesquelet i arquitectura de l'organela terminal. Micrografies de microscòpia electrònica de transmissió de (A) *M. genitalium* i (B) *M. pneumoniae*, on es va observar per primer cop que l'organela terminal presentava al mig un eix electrodens envoltat d'una àrea electrolúcida (Biberfeld and Biberfeld, 1970). (C) Micrografia per criotomografia electrònica on es pot observar en detall la ultraestructura de l'organela terminal de *M. pneumoniae* i (D) Representació esquemàtica de les 11 estructures proteïques que componen l'organela terminal segons la reconstrucció feta per criotomografia electrònica. Figura modificada de (Henderson and Jensen, 2006).

Aprofitant el tractament amb el detergent Tritó X-100 també s'han pogut aïllar i identificar la major part de les proteïnes del citoesquelet de *M. pneumoniae* (Regula *et al.*, 2001). Moltes de les proteïnes identificades estan implicades en metabolisme, com les subunitats  $\alpha$  i  $\beta$  de la piruvat deshidrogenasa. També s'han identificat proteïnes relacionades amb transcripció i traducció, com el factor d'elongació Tu, relacionades amb la resposta a l'estrès, com la DnaK, i relacionades amb divisió cel·lular, com el FtsZ. Donat que la DnaK és estructuralment homòloga a l'actina (Flaherty *et al.*, 1991) i el factor d'elongació Tu té la capacitat per formar filaments *in vitro* (Beck *et al.*, 1978), no es descarta que aquestes proteïnes realment formin part del citoesquelet d'aquests micoplasmes. A part d'aquestes proteïnes, també es van identificar un conjunt de proteïnes exclusives de micoplasma, que no tenien funció assignada, tot i que com veure a continuació, tenen un paper fonamental en el desenvolupament de l'organela terminal i estan associades al manteniment de la capacitat de citadherència (Krause, 1998). Es tracte de les proteïnes HMW1, HMW2, HMW3, P65, P40, P90, P1 i P200.

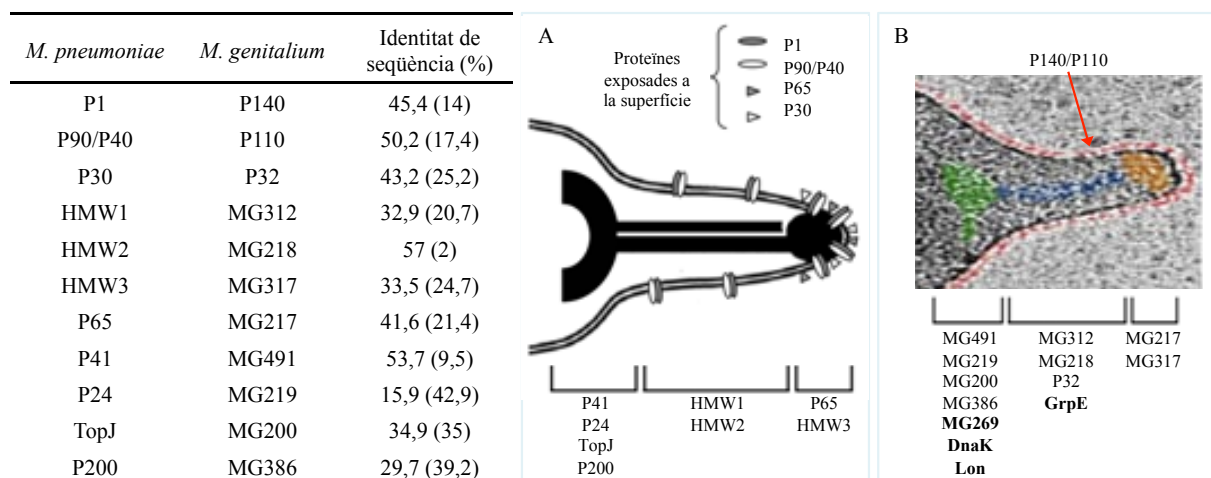
### Arquitectura de l'organela terminal

L'arquitectura del citoesquelet i l'organela terminal ha estat tradicionalment estudiada a *M. pneumoniae*. Aquest micoplasma és el microorganisme filogenèticament més proper a *M. genitalium*. Aquests dos patògens, a part d'estar emparentats morfològicament i serològicament, també mostren una gran identitat de seqüència entre els seus gens i proteïnes relacionats amb la citadherència (Figura 13.A) (Dallo *et al.*, 1989). A més a més, la majoria dels gens que codifiquen per aquestes proteïnes tant a *M. pneumoniae* com a *M. genitalium* es troben formant operons, mostrant que també comparteixen una mateixa organització cromosòmica (Dallo *et al.*, 1989; Waldo 3rd *et al.*, 1999; Musatovova *et al.*, 2003). Les proteïnes de citadherència en menor grau també estan conservades a *M. gallisepticum*, ara bé, pel que fa a la resta d'espècies del *cluster pneumoniae*, es desconeix si presenten proteïnes ortòlogues als components de l'organela terminal de *M. pneumoniae* i *M. genitalium*.

Mitjançant l'aïllament i caracterització de mutants d'aquest micoplasma deficientes en adhesió es van



poder identificar algunes de les proteïnes que formen part de l'organela terminal (Krause *et al.*, 1982; Baseman, Cole, *et al.*, 1982; Reddy *et al.*, 1996). Van trobar adhesines específiques involucrades directament en l'adhesió del micoplasma com són les proteïnes de membrana P1 i P30, però també es van identificar altres proteïnes que s'han considerat accessòries per l'adherència. En primer lloc trobaríem el complex format per les proteïnes P90 (B) i P40 (C) que és essencial per mantenir la proteïna P1 associada a la fracció insoluble Triton X-100 (Layh-Schmitt and Harkenthal, 1999). D'altra banda, hi ha les proteïnes d'alt pes molecular HMW1, HMW2 i HMW3 que, tot i no tenir un paper directe en l'adherència, són essencials per mantenir la integritat de l'esquelet que suporta l'organela terminal (Krause and Balish, 2004). Aquestes proteïnes són molt interessants perquè són úniques de micoplasma (Proft and Herrmann, 1994). I, per últim, amb l'aïllament de mutants deficients en motilitat s'han pogut identificar noves proteïnes integrants de l'organela terminal, com són la proteïna P41, P24, P200 i TopJ (Jordan *et al.*, 2007; Hasselbring and Krause, 2007b; Cloward and Krause, 2009).



**Figura 13.** Proteïnes integrants de l'organela terminal de *M. pneumoniae* i *M. genitalium*. A la taula s'han inclòs les proteïnes identificades que formen l'organela terminal de *M. pneumoniae* i les proteïnes homòlogues identificades a *M. genitalium*. La identitat de seqüència entre les proteïnes ortòlogues s'ha calculat en base alineaments realitzats amb el algorisme EMBOSS (EMBL-EBI). Entre parèntesi s'indica el % de gaps obtinguts en els alineaments. Cal ressaltar que en base als alineaments, les proteïnes P24 i MG219 no es poden considerar homòlogues, però es creu que podrien ser funcionalment similars donat que el gens codificants comparteixen la mateixa localització en l'operó P65. (A) Localització aproximada de les diferents proteïnes en l'organela terminal a *M. pneumoniae* (Seto and Miyata, 2003; Kenri *et al.*, 2004; Jordan *et al.*, 2007; Cloward and Krause, 2009) i (B) a *M. genitalium*. Figura modificada de (Martínez Mariscal, 2013).

La majoria de les proteïnes estructurals de *M. pneumoniae* associades a la citadherència són riques en prolina i estan fosforilades (Proft *et al.*, 1996; Su *et al.*, 2007; Schmidl, Gronau, Pietack, *et al.*, 2010). De fet s'ha vist que l'estabilitat de les proteïnes de citadherència a *M. pneumoniae* requereix l'activitat de la quinasa PrkC (Schmidl, Gronau, Hames, *et al.*, 2010). A més a més, s'ha trobat que moltes d'aquestes proteïnes presenten regions amb homologia de seqüència amb proteïnes estructurals de mamífers. La proteïna accessòria de citadherència HMW2 per exemple, presenta regions homòlogues a la miosina (Krause *et al.*, 1997) i les proteïnes P65, HMW1 i HMW3 presenten seqüències repetides internes similars a l'espectrina, una proteïna de membrana present en organismes eucariotes (Krause, 1996; Krause, 1998).

Mitjançant fusions a proteïnes fluorescents i tècniques d'immunofluorescència s'ha confirmat que totes les proteïnes identificades co-localitzen a l'organela terminal, tot i que el límit de resolució del microscopi òptic i la reduïda mida dels micoplasmes dificulta la determinació d'una ubicació més concreta. No obstant, es creu que les proteïnes HMW1 i HMW2 formen part de l'eix central de l'organela



terminal (Figura 13.B) i serien els constituents principals del eix electro-dens (Seto and Miyata, 2003; Balish *et al.*, 2003; Kenri *et al.*, 2004). La proteïna HMW3 es trobaria en una posició més distal (Stevens and Krause, 1992; Seto and Miyata, 2003) on podria ser el constituent principal del botó terminal, segons estudis realitzats sobre la proteïna homòloga a *M. genitalium* (MG317) (Pich *et al.*, 2008). En la zona més distal de l'organela terminal co-localitzen les proteïnes P65 i P30 (Seto and Miyata, 2003) i, en canvi, en la zona més proximal, que coneixem com a “wheel-like structure”, es trobarien les proteïnes P24, P41, P200 i TopJ (Kenri *et al.*, 2004; Jordan *et al.*, 2007; Cloward and Krause, 2009). L'adhesina principal P1, juntament amb les proteïnes P90 i P40, es localitza al llarg de l'organela terminal, encara que una porció també es trobaria distribuïda per tota la superfície cel·lular (Baseman, Cole, *et al.*, 1982). Les proteïnes P1, P90, P40 i P30 són proteïnes exposades en la superfície cel·lular mentre que les proteïnes HMW1 i P65 s'han detectat tant en la superfície com en l'interior de *M. pneumoniae* (Krause and Balish, 2004). Cal destacar que recentment, en el nostre laboratori, s'han aconseguit localitzar a *M. genitalium* per primer cop un total de 15 proteïnes a l'organela terminal (Figura 13.B). Mitjançant l'ús de proteïnes de fusió amb la proteïna fluorescent eYFP, s'ha pogut realitzar la localització relativa de les diferents proteïnes de l'organela terminal del micoplasma prenent com a referència la proteïna P32. En aquest treball també es van poder assignar a l'organela terminal proteïnes prèviament no descrites com a integrants d'aquesta estructura (Figura 13.B), tot i que en alguns casos sí es van detectar en la fracció insoluble en TX-100 (Regula *et al.*, 2001), com són les proteïnes *mg269*, GrpE, DnaK i Lon (Martínez Mariscal, 2013).

La gran complexitat d'interaccions existents en l'organela terminal es pot veure reflectida en el fet que la pèrdua d'algunes d'aquestes proteïnes afecta l'estabilitat i la localització d'altres components de l'organela terminal. En alguns casos s'ha demostrat que aquest fenomen té un origen post-traducciona (Popham *et al.*, 1997), suggerint que totes aquelles proteïnes que no es poden incorporar al citoesquelet són prematurament degradades, un fet molt habitual entre les proteïnes que formen part d'estructures d'ordre superior. L'exemple més clar és el paper central que té la proteïna HMW2 en l'estabilitat d'aquesta estructura, donat que la seva absència comporta la reducció dels nivells de les proteïnes HMW1, HMW3, P65 i P30 (Krause and Baseman, 1982; Dallo *et al.*, 1996; Fisseha *et al.*, 1999). Globalment aquestes observacions indiquen una interdependència entre les proteïnes associades a l'organela terminal i suggereixen l'existència d'un encaix seqüencial i jeràrquic dels seus components. De fet, la seqüència d'assemblatge en la formació de l'organela terminal de *M. pneumoniae* ha estat proposada, però la regulació d'aquest procés d'assemblatge, tant a nivell temporal com espacial, segueix sent difícil d'assolir (Balish and Krause, 2002; Seto and Miyata, 2003; Krause and Balish, 2004; Hasselbring *et al.*, 2006; Hasselbring and Krause, 2007b).

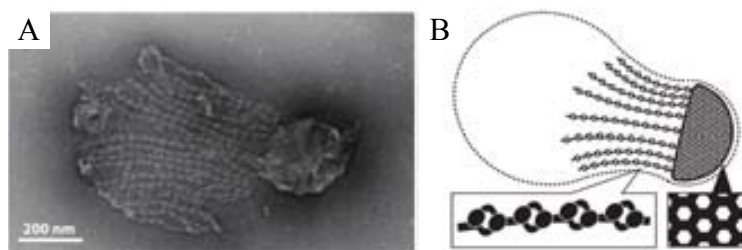
En els últims anys, també s'ha avançat en el coneixement de la ultraestructura de *M. genitalium* (Pich, Burgos, Ferrer-Navarro, *et al.*, 2006; Burgos *et al.*, 2006; Burgos *et al.*, 2007; Burgos *et al.*, 2008; Pich *et al.*, 2008). En general s'han trobat una gran similitud entre la ultraestructura d'aquest micoplasma i la descrita a *M. pneumoniae*, com hem pogut veure amb la localització de les proteïnes integrants d'aquesta estructura (Figura 13), però cal dir que també s'han trobat algunes diferències que podem exemplificar amb el paper de la proteïna MG217, homòloga de p65, en la curvatura que presenta l'organela terminal d'aquest micoplasma (Burgos *et al.*, 2008). Una altra diferència força discutida es la diferència entre les funcions assignades entre les proteïnes homòlogues MG200 de *M. genitalium* (Pich, Burgos, Ferrer-Navarro, *et al.*, 2006) i TopJ de *M. pneumoniae*, però aquest aspecte el discutirem més endavant en aquest treball.

Per tal de seguir aprofundint en aquest coneixement, en el grup de Biologia Molecular del IBB, amb col·laboració amb el grup de Biologia Estructural del Dr. Fita (IBMB-CSIC), s'està treballant en un projecte per poder elucidar la ultraestructura de l'organela terminal de *M. genitalium*. En aquest sentit,



s'està treballant per poder determinar l'estructura a nivell atòmic de les proteïnes que formen part d'aquest complex, així com de les interaccions que existeixen entre elles, per poder realitzar una reconstrucció de l'organela terminal. Aquest projecte comença a donar fruits, com són l'estructura del domini EAGR de la proteïna MG200 (Calisto *et al.*, 2012), homòloga a TopJ de *M. pneumoniae*, o l'estructura de la proteïna MG491, homòloga a p41 (manuscrit en preparació). A més a més, també s'estan determinant les interaccions entre les diferents proteïnes que conformen aquesta estructura, com per exemple la interacció entre un pèptid carboxi-terminal de la proteïna p41 i el domini EAGR de la proteïna MG200 (Martinelli *et al.*, acceptat a JBC) o la interacció entre l'extrem carboxi-terminal de la proteïna MG200 i la proteïna MG219 (manuscrit en preparació).

Bàsicament hem fet referència al citoesquelet i la ultraestructura de l'organela terminal de *M. pneumoniae* i *M. genitalium*, però cal senyalar que també hi ha estudis sobre el citoesquelet d'altres espècies de micoplasma com seria *M. gallisepticum* (patogen aviar) i *M. mobile* (patogen de peixos). L'organela terminal de *M. gallisepticum*, tot i que es coneix com a "bleb", conté un citoesquelet similar al de *M. pneumoniae*, tot i que no és sorprenent ja que tots dos micoplasmes pertanyen al mateix cluster filogenètic. On trobem una estructura i composició diferent del citoesquelet és en el cas de *M. mobile*. Les cèl·lules d'aquest micoplasma també presenten una petita prolongació de la membrana que s'ha anomenat "cap" (*head-like structure*) i s'uneix al cos cel·lular per una regió que s'anomena coll. El citoesquelet de *M. mobile* està caracteritzat per una malla proteica en forma de medusa que s'estén per tot el cos (Figura 14) (Miyata and Ogaki, 2006; Nakane and Miyata, 2007; Nakane and Miyata, 2009).



**Figura 13.** Citoesquelet de *M. mobile*. (A) Micrografia de microscòpia electrònica de transmissió on es visualitza el citoesquelet de *M. mobile* per tinció negativa. La membrana cel·lular i el citosol es van eliminar mitjançant un tractament suau amb 0,1 % Triton X-100. (B) Representació esquemàtica del d'una cèl·lula de *M. mobile* amb el seu citoesquelet amb forma de malla. Imatges extretes de (Miyata, 2010).

### Multifuncionalitat de l'organela terminal

Com hem vist abans, es considera que el principal mecanisme de patogenicitat del micoplasma és l'adherència a la cèl·lula hoste. *M. genitalium* s'adhereix a la superfície de les cèl·lules epitelials a través de l'organela terminal, on concentra la majoria de les adhesines. El micoplasma sempre manté en contacte amb la cèl·lula l'organela terminal, pel que fins i tot s'ha suggerit que podria tenir un paper important en la internalització del microorganisme dins les cèl·lules hoste. Només cal afegir, per recalcar l'estreta relació entre aquesta complexa estructura i l'adherència, que en un treball recent s'ha demostrat l'absolut requeriment de les proteïnes P140 i P110, que són les principals adhesines de *M. genitalium*, pel correcte desenvolupament de l'organela terminal (Burgos *et al.*, 2006).

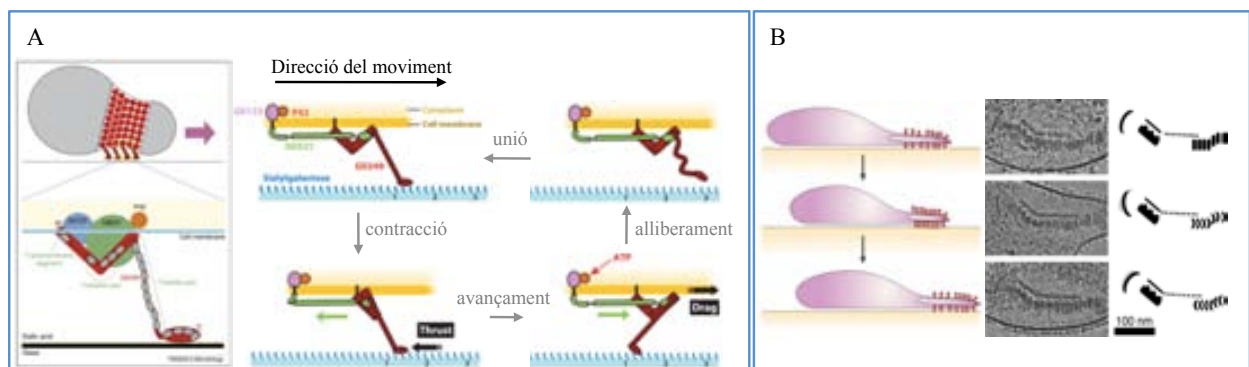
No obstant, a part de l'important rol en adherència que exerceix l'organela terminal, aquesta està relacionada amb altres funcions importants per l'estil de vida parasitari d'aquests micoplasmes, com són la motilitat i la divisió cel·lular.

### Motilitat

El moviment de cèl·lules de micoplasma es va demostrar en els anys 1970' (Bredt, 1973) i fins ara s'han descrit fins a 13 espècies mòtils, que són *M. mobile*, *M. pulmonis*, *M. penetrans*, *M. hominis*, *M. agassizii*,

*M. testudineum* i 7 espècies de cluster *pneumoniae* (*M. pneumoniae*, *M. testudinis*, *M. amphoriforme*, *M. gallisepticum*, *M. imitans*, *M. genitalium* i *M. pirum*) (Hatchel and Balish, 2008). □

En el món microbià trobem múltiples formes de moviment (Jarrell and McBride, 2008). El més estès entre els procariotes seria el flagel·lar, que permet un desplaçament òptim en un medi líquid. Ara bé, les espècies mòtils de micoplasma tenen l'habilitat de desplaçar-se per sobre de superfícies sòlides sense l'ajuda de flagels, pili o altres proteïnes motores convencionals (McBride, 2001). De fet, en l'anàlisi dels 6 genomes de micoplasma mòtils seqüenciats que hi ha disponibles fins ara (Fraser *et al.*, 1995; Himmelreich *et al.*, 1996; Chambaud *et al.*, 2001; Papazisi *et al.*, 2003; Jaffe *et al.*, 2004; Pereyre *et al.*, 2009), no s'han trobat gens relacionats amb cap sistema de moviment bacterià conegut o amb homologia a proteïnes motores eucariotes, indicant que aquests microorganismes mòtils disposen d'un mecanisme nou en el món bacterià. El seu moviment s'ha englobat en el grup de motilitat per lliscament o *gliding motility*, on s'inclouen mecanismes diversos de diferents microorganismes que també es desplacen sobre superfícies sòlides sense l'ajuda de flagels o estructures similars (McBride, 2001).



**Figura 15.** Models de motilitat proposats per explicar la motilitat en els micoplasmes. **(A)** Model “cent-peus”. de motilitat. S’ha inclòs un esquema amb la localització cel·lular de la maquinària de gliding de *M. mobile* i un diagrama representant el motor molecular. Modificat de (Miyata, 2008; Miyata, 2010). **(B)** Model d’“oruga” basat en canvis conformationals de l’eix electrodens de l’organela terminal observats per criotomografia electrònica amb mostres de *M. pneumoniae*. Figures extretes de (Henderson and Jensen, 2006; Jarrell and McBride, 2008).

Per tal d’explicar el moviment dels micoplasmes s’han proposat dos models diferents (Miyata, 2008). El primer model és el de “cent-peus”, característic de *M. mobile* (Figura 15.A). Aquest és el micoplasma més ràpid de tots, ja que es pot desplaçar a una velocitat de  $4 \mu\text{m s}^{-1}$ , i el seu moviment per lliscament és el que ha estat millor documentat fins al moment (Uenoyama *et al.*, 2004; Seto, Uenoyama, *et al.*, 2005; Uenoyama and Miyata, 2005; Adan-Kubo *et al.*, 2006; Nagai and Miyata, 2006; Ohtani and Miyata, 2007; Miyata, 2008; Uenoyama *et al.*, 2009; Sato *et al.*, 2012; Tulum *et al.*, 2014; Kinoshita *et al.*, 2014). Aquest model es basa en una maquinària de motilitat formada per quatre grans proteïnes (Gli349, Gli123, Gli521 i P42) localitzades a la base de la protrusió de la membrana, que estaria suportada per un complex citoesquelet intern en forma de malla (Nakane and Miyata, 2007). Concretament, proposen que les quatre proteïnes de l’aparell mòtil formarien un complex amb forma de pota flexible que podria adoptar diferents conformacions. La pota estirada tindria una longitud de 50 nm i al voltant del coll del micoplasma, que és la regió que uneix el cos amb el cap o protrusió de la membrana, es trobarien distribuïdes múltiples potes. El moviment generat per la hidròlisi d’ATP des de dins de la cèl·lula es transmetria a les potes a través d’una proteïna que faria d’engranatge produint un moviment repetitiu d’unió, propulsió endavant i alliberament de les potes sobre una superfície, a la que s’hi unirien a través de residus sialil-galactosa (Miyata, 2010). És interessant que el conjunt de proteïnes Gli i P42 només es troben conservades a *M. pulmonis* (Chambaud *et al.*, 2001).

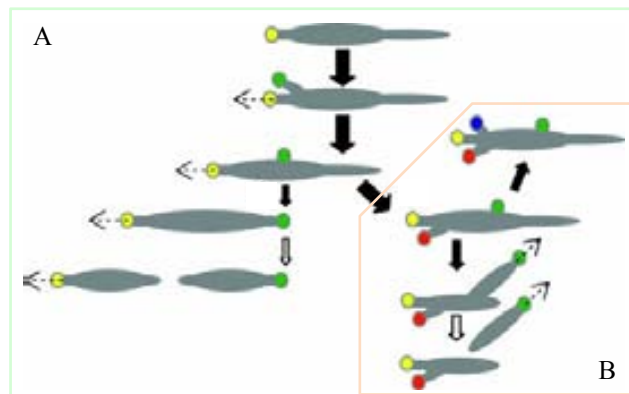
El fet que altres micoplasmes no disposen dels gens homòlegs als que codifiquen per les proteïnes

relacionades amb motilitat de *M. mobile*, obre les portes a la possibilitat que existeixi un mecanisme de motilitat diferent (Fraser *et al.*, 1995; Himmelreich *et al.*, 1997; Jaffe *et al.*, 2004). Així, el segon model és el d'“eruga” i és el model proposat per explicar la motilitat de les espècies de micoplasma que tenen organela terminal, com *M. genitalium* i *M. pneumoniae* (Figura 15.B). En aquest segon model, l'organela terminal podria donar lloc a un tipus de desplaçament amb algunes característiques similars al moviment de les erugues, de forma que el desplaçament s'originaria per contracció/distensió de l'organela terminal. Aquesta hipòtesi es basaria en diverses observacions. En primer lloc, el paper central de l'organela terminal sorgiria del fet que s'ha observat que sempre marca el sentit de la marxa. A més a més, a *M. pneumoniae* s'ha observat que en mutants deficients en proteïna P41, l'organela terminal sovint se separa del cos cel·lular i aquesta continua desplaçant-se durant un màxim de 30 minuts (Hasselbring and Krause, 2007a). Aquest fenotip suggereix que aquesta proteïna P41 tindria un paper essencial per mantenir unit el citoesquelet de l'organela al cos cel·lular i evidencia que la totalitat de la maquinària de motilitat resideix a l'organela terminal. No obstant, la manera com l'organela terminal participa en el moviment és una incògnita i només existeixen conjectures. Per exemple, hi ha evidències que l'eix electro-dens pot ser flexible i variable conformacionalment (Henderson and Jensen, 2006). No obstant, s'ha criticat que fins ara els estudi publicats en defensa d'aquest model, es basin en observacions realitzades en condicions de suspensió i no en condicions reals de lliscament (Miyata, 2010). De fet, hi ha qui considera que de fet la motilitat de tots els micoplasmes es pot explicar amb el primer model (Miyata, 2010). Tot i l'absència de proteïnes homòlogues en aquests micoplasmes, a favor d'aquesta idea es destaca que tots els micoplasmes mòtils tenen en comú que es desplacen en la mateixa direcció i sentit d'estructures polars diferenciades on es concentra la maquinària responsable del moviment (Miyata and Uenoyama, 2002; Hasselbring and Krause, 2007a). D'altra banda, a *M. pneumoniae* s'ha observat que anticossos contra la P1 redueixen la velocitat de desplaçament fins que acaben per desenganxar el micoplasma de la superfície (Seto, Kenri, *et al.*, 2005), suggerint la possibilitat que la proteïna P1 actuï de manera similar a la proteïna Gli349 de *M. mobile*. En la mateixa línia, han demostrat que *M. pneumoniae* es desenganxa de la superfície quan s'afegeixen residus de sialil-monosacàrids, suggerint que la proteïna P1 podria actuar com a pota de forma equivalent a la proteïna Gli349 de *M. mobile* que uneix residus sialil-galactosa (Nagai and Miyata, 2006; Kasai *et al.*, 2013). I afegeixen que en tots els casos la maquinària es suporta amb un complex citoesquelet formant una complexa estructura de més de 10 proteïnes (Miyata, 2010). D'aquesta forma es defensa que el mecanisme de motilitat seria el mateix en els dos grups filogenètics de micoplasmes, tot i la divergència entre les proteïnes integrants del mateix, fet que s'explicaria per una evolució ràpida deguda a les necessitats d'aquests patògens (Miyata, 2010).

En estudis sobre la motilitat a *M. pneumoniae*, proteïnes originàriament relacionades amb adhesió, com la P1 i la P30, s'han relacionat també amb la maquinària de motilitat (Hasselbring *et al.*, 2005; Seto, Kenri, *et al.*, 2005; Relich and Balish, 2011). El fet que els micoplasmes s'hagin d'adherir a una superfície sòlida per poder desplaçar-se, dificulta la identificació dels elements que conformarien la maquinària mòtil. En aquest sentit, en estudis a partir de mutants deficients en motilitat, tant a *M. pneumoniae* com a *M. genitalium*, la major part dels gens implicats inequívocament en el mecanisme de motilitat contribueixen paral·lelament al manteniment de l'estructura de l'organela terminal i en la capacitat d'adhesió. S'ha suggerit que les maquinàries d'adhesió i de motilitat podrien estar relacionades i no es pot descartar que de fet no siguin independents. No obstant, s'han pogut identificar dues proteïnes a *M. genitalium* que estarien involucrades únicament en la motilitat del micoplasma, les proteïnes MG200 i MG386 (Pich, Burgos, Ferrer-Navarro, *et al.*, 2006). Per poder clarificar quin serà el model que s'ajustarà més al moviment d'aquests micoplasmes caldrà determinar els elements que conformen la maquinària de motilitat i el paper que hi juguen per poder fer una reconstrucció de forma similar a com s'ha pogut fer a *M. mobile*.

## Divisió cel·lular dels micoplasmes

La divisió cel·lular per fissió binària sembla el model més estès entre els micoplasmes, tot i que no es descartat que hi hagin altres sistemes (Miyata and Seto, 1999). En el cas de micoplasmes amb morfologia polars, com *M. genitalium* i *M. pneumoniae*, tot i que encara es desconeix el mecanisme exacte de divisió cel·lular, hi ha evidències que l'organela terminal hi juga un paper fonamental. A partir d'observacions fetes amb diferents tècniques de microscòpia, s'ha proposat un model de divisió cel·lular que començaria amb una primera fase en que es produiria la formació d'una nova organela terminal adjacent a l'organela preexistent i durant aquesta fase la cèl·lula romandria immòbil. Un cop finalitzada la duplicació, sembla que es reactivaria la capacitat mòtil de l'organela terminal original, que iniciaria el desplaçament endavant. D'aquesta forma, la nova organela terminal, encara no mòtil, s'aniria quedant desplaçada cap al pol oposat de la cèl·lula. Com és lògic, els mutants deficients en motilitat presenten alteracions en aquest procés de migració de les organelles terminals. En la última fase, amb una organela a cada pol de la cèl·lula es produiria la citocinesi originant dues cèl·lules filla (Figura 16.A) (Bredt, 1968; Seto *et al.*, 2001; Hasselbring *et al.*, 2006). En aquest model, la duplicació i migració de l'organela terminal estarien coordinats amb la replicació dels cromosomes. Aquesta afirmació la sostenen dues observacions; per una banda les cèl·lules amb una sola organela terminal contenen menys DNA que aquelles cèl·lules amb dues organelles terminals i, per l'altra, les cèl·lules que presenten una organela terminal a cadascun dels seus pols són les que contenen una major quantitat de DNA, suggerint l'estat diploide de la cèl·lula, necessari abans de la citocinesi (Seto *et al.*, 2001).



**Figura 16.** Esquema del model actual de divisió cel·lular. (A) Esquema general de duplicació de l'organela terminal i divisió per fissió binària vàlid per *M. genitalium* i *M. pneumoniae*, tot i que, en aquest últim és freqüent observar l'aparició de múltiples organelles abans de que es produeixi la separació de les cèl·lules filla (B). Figura extreta de (Hasselbring *et al.*, 2006).

El fet que la formació de noves organelles terminals coincideixi amb la divisió cel·lular suggereix un paper funcional d'aquesta estructura en el procés. Un altre hipòtesi molt interessant és la possibilitat que components de l'organela terminal puguin unir el cromosoma del micoplasma, de forma que la separació de les organelles terminals podria promoure a la vegada la segregació dels cromosomes. No obstant, falten dades experimentals per suportar aquest rol de l'organela terminal en el cicle de divisió cel·lular. No obstant, els mecanismes que regulen i coordinen aquests processos són encara desconeguts. Aquest model tampoc explica com es produiria la citocinesi. En el món microbià es considera que la proteïna FtsZ és essencial per la divisió cel·lular per fissió binària, però en el cas dels micoplasma hi ha espècies que no tenen el gen *ftsZ*, codificant per aquesta proteïna, i a *M. genitalium* s'ha demostrat que no és essencial pel seu creixement (Lluch-Senar *et al.*, 2010). En aquest moment, s'ha proposat que la força exercida per cada organela en direccions oposades podria facilitar la citocinesi i, per tant, la motilitat tindria un paper important en el procés. No obstant, cal recalcar que mutants no adherents i, per tant, no mòtils, poden

finalitzar la divisió cel·lular, segurament per la presència de FtsZ.

La duplicació de l'organela terminal és important per la divisió cel·lular d'aquests micoplasmes. Coexisteixen dues teories per explicar com es podria produir aquesta duplicació: una suggereix que el procés és semiconservatiu a partir d'una organela preexistent i l'altra que es poden formar “*de novo*”. En imatges de microscòpia electrònica s'han observat cèl·lules amb un eix electro-dens bifurcat per la part distal, que podria donar suport a la primera teoria (Hegermann *et al.*, 2002; Nakane and Miyata, 2009), però en oposició, altres autors suggereixen que el procés hauria de ser “*de novo*”, perquè mutants sense una estructura preexistent poden generar organeles terminals noves (Willby *et al.*, 2004). Una altra observació interessant que fan a *M. pneumoniae* és que en absència de proteïna P41, les noves organeles terminals es formen en posicions laterals allunyades de l'organela terminal preexistent, que descarta la necessitat espacial d'aquesta i atorga un paper essencial a aquesta proteïna en el control de la localització de l'organela terminal nova (Hasselbring and Krause, 2007b).

Una altra qüestió és la regulació temporal d'aquesta duplicació de l'organela terminal. A *M. pneumoniae* s'ha observat que generalment la duplicació de l'organela terminal es produeix diverses vegades abans de la generació de cèl·lules filla (Hasselbring *et al.*, 2006). Aquests resultats suggereixen que a *M. pneumoniae* la duplicació de l'organela terminal no està coordinada amb la divisió cel·lular (Figura 16.B). Ara bé, en el cas de *M. genitalium* sembla que sí existeix una regulació estricta de la duplicació de l'organela terminal, perquè en la població de la soca salvatge no s'han observat cèl·lules amb més de dues organeles terminals. L'aparició de tres o més organeles terminals només s'ha observat en mutants amb deficiències de motilitat o en mutants amb nivells reduïts de P140 i P110 (Pich *et al.*, 2009). En el primer cas sembla clar que és conseqüència d'un alentiment de la migració de l'organela terminal al pol oposat de la cèl·lula i també del procés de citocinesi. De l'observació que amb la reducció dels nivells de P140 i P110 s'incrementa l'aparició de cèl·lules amb múltiples organeles s'ha suggerit que els nivells d'aquestes dues proteïnes podrien directe o indirectament regular temporalment la duplicació de l'organela terminal a *M. genitalium* (Pich *et al.*, 2009).

## Objectius

### Capítol I

- Determinar l'inici de traducció i transcripció d'una nova proteïna identificada a *M. genitalium*, que comparteix seqüència amb l'extrem carboxi-terminal de la proteïna MG218.
- Obtenir una soca de *M. genitalium* que no expressi aquesta nova proteïna, però sense alterar l'expressió de les proteïnes codificades per l'operó del gen *mg218*.
- Estudi de la funció de la nova proteïna a partir de la caracterització del fenotip de la soca defectiva.

### Capítol II

- Estudiar la funció biològica de la caixa EAGR de la proteïna MG200 de *M. genitalium*.

### Capítol III

- Comprovar si els mutants de *M. genitalium* amb insercions de transposó al locus MG\_200 expressen un fragment amino-terminal de la proteïna.
- Determinar quin rol té la regió amino-terminal de la proteïna MG200, on trobem dominis amb funció xaperona.
- Estudiar el paper dels dominis amino-terminals en la funció global de la proteïna MG200 de *M. genitalium*.

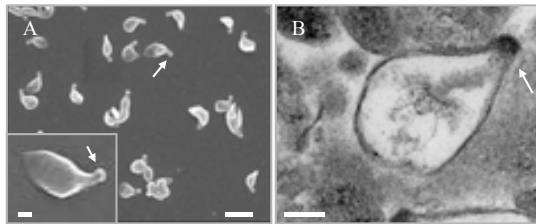




# Capítol I. Caracterització funcional d'una nova proteïna de *M. genitalium*

## Introducció

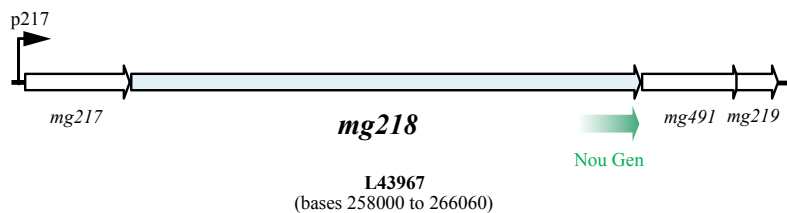
Amagades darrera una simplicitat aparent, *M. genitalium* presenta diverses característiques típiques dels organismes eucariotes (Trachtenberg, 1998). Un bon exemple és el complex citoesquelet que trobem sota la seva membrana cel·lular, que dóna forma i polaritza la cèl·lula. Aquest citoesquelet defineix l'apèndix que trobem en un dels extrems de la cèl·lula, que es coneix com a organela terminal (OT) o "tip structure" i atorga a la cèl·lula forma de pera (Figura I.1). Aquesta organela terminal està relacionada amb funcions tan diverses i importants per la cèl·lula com poden ser la divisió cel·lular, l'adhesió del micoplasma a les cèl·lules hoste i la motilitat.



**Figura I.1.** Micrografies de *M. genitalium*. Les fletxes senyalen l'OT. (A) Imatges de microscòpia electrònica de rastreig. La barra d'augment indica 1 µm (100 nm en l'ampliació de la cantonada inferior esquerre). (B) Imatges de microscòpia electrònica de transmissió. La barra d'augment indica 100 nm.

La proteïna MG218 és una de les proteïnes principals del citoesquelet de *M. genitalium* i té un paper central en la formació de l'organela terminal (Pich *et al.*, 2008). Aquesta proteïna de 1805 aa és una de les proteïnes més grans de *M. genitalium* i està codificada pel segon gen d'un operó vinculat amb funcions relacionades amb l'adherència (Musatovova *et al.*, 2003), on trobem de forma seqüencial els gens *mg217* (MG217), *mg218* (MG218), *mg491* (P41) i *mg219* (P24) (Figura I.2), tots ells gens que codifiquen proteïnes relacionades amb l'organela terminal (Burgos *et al.*, 2008; Pich *et al.*, 2008);(González-González, García-Morales, *et al.*, en preparació).

És interessant que mitjançant Western blot amb un anticòs policlonal contra la regió carboxi-terminal de la proteïna MG218, es va identificar una nova proteïna, d'aproximadament 25 kDa. Aquesta nova proteïna podria ser producte d'una proteòlisi dirigida a partir de la proteïna MG218, però en l'estudi de diversos mutants amb insercions de transposó en el gen *mg218*, que expressaven formes truncades de la proteïna MG218, es va refutar aquesta hipòtesi, perquè la proteïna MG218-s era present en tots ells (Pich *et al.*, 2008). Aquesta petita proteïna no s'originaria per proteòlisi dirigida, sinó que seria producte de la traducció d'un gen amb un promotor propi localitzat dins del gen *mg218*, tot i que encara caldria determinar el lloc específic de l'inici de traducció del mateix. La pregunta que ens plantejàvem era per què aquest microorganisme, amb un dels genomes més reduïts que es coneix, ha preservat un gen amb promotor propi per l'expressió d'una proteïna que és exactament l'extrem carboxi-terminal d'una altra proteïna que és 10 cops més gran?



**Figura I.2.** Representació esquemàtica de la regió del gen *mg218* en el genoma de *M. genitalium*. El promotor que trobem a l'inici de l'operó s'ha indicat amb una gran fletxa en angle recte. La situació del nou gen s'ha marcat amb una fletxa amb degradat verd, ja que no es coneix l'inici del mateix.

A *M. pneumoniae*, l'espècie filogenèticament més propera a *M. genitalium*, s'havia identificat anys enrere la proteïna P28, o més tard anomenada HMW2-s, que resulta ser la proteïna ortòloga de MG218-s (Krause *et al.*, 1997; Fisseha *et al.*, 1999). L'extrem animo-terminal de la proteïna HMW2-s així com la seqüència del promotor associat a la seva expressió s'han pogut identificar (Boonmee *et al.*, 2009), ara bé la impossibilitat d'obtenir un mutant defectiu d'aquesta proteïna a *M. pneumoniae*, ha dificultat l'estudi de la seva funció. Tot i que s'ha proposat una hipòtesi sobre la possible contribució de la proteïna HMW2-s en l'estructuració de la proteïna HMW2 en la formació de l'eix del citoesquelet de l'organela terminal, no s'ha pogut demostrar (Balish, Santurri, *et al.*, 2003).

Gràcies a la possibilitat de generar modificacions genètiques dirigides en el genoma de *M. genitalium*, aquest micoplasma es converteix en el millor model per poder estudiar la funció d'aquesta petita proteïna conservada a *M. genitalium* i *M. pneumoniae*. L'objectiu que es va plantejar és l'obtenció i caracterització d'una soca mutant de *M. genitalium* defectiva en proteïna MG218-s, però sense afectar l'expressió de la proteïna MG218. Per tal d'assolir aquests objectius, cal a més a més els inicis de transcripció i traducció del gen corresponent a aquesta nova proteïna.

## Resultats

### 1. Obtenció d'una soca defectiva en proteïna MG218-s

Per tal de poder estudiar la funció de la proteïna MG218-s es va plantejar delecionar el seu gen codificant a *M. genitalium* per obtenir una soca defectiva de la que es podria estudiar el fenotip degut a l'absència de la proteïna en qüestió. El mètode habitual per generar mutants d'aquesta mena a *M. genitalium* és el reemplaçament gènic per doble recombinació homòloga (Burgos *et al.*, 2006; Burgos *et al.*, 2007; Burgos *et al.*, 2008; Pich *et al.*, 2008; Lluch-Senar *et al.*, 2010). Per això, primer cal dissenyar un vector que conté un gen marcador envoltat per les regions flanquejants al fragment que es vol delecionar. D'aquesta forma es promou l'intercanvi d'aquest fragment pel gen marcador, mitjançant recombinació entre els fragments d'homologia o braços que flanquegen la regió d'interès. És important destacar que no es coneix, fins al moment, cap vector autoreplicatiu a *M. genitalium*. Els plasmidis que s'utilitzen com a vectors a *M. genitalium* només contenen l'origen de replicació ColE1 d'*E. coli* i aquest no és funcional en el micoplasma, és per això que els anomenem vectors suïcides. D'aquesta forma, les cèl·lules de *M. genitalium* que incorporen el gen marcador al ser transformades només es podran haver originat de dues formes: (a) per integració del vector sencer en el seu cromosoma, si es produeix recombinació per un sol punt o braç, o (b) per la integració única del gen marcador al substituir el fragment que es volia delecionar, en el cas que es produeixi una doble recombinació recombinació pels dos braços d'homologia presents en el vector.

El cas que ens concerneix plantejava dues dificultats. Per una banda, com hem mencionat, el gen que codifica la proteïna MG218-s se superposa totalment amb l'extrem 3' del gen que codifica la proteïna MG218, pel que la deleció directe del gen codificant per MG218-s, mitjançant reemplaçament gènic, provocaria el truncament del gen *mg218*. D'aquesta forma l'estudi del fenotip de la soca resultant no ens permetria assignar cap funció concreta a la nostra proteïna d'estudi. Per l'altra banda, es desconeixia l'inici de traducció de la proteïna MG218-s. Fins al moment, només se sabia que el gen d'interès estava solapant amb l'extrem 3' del gen *mg218* i que el pes molecular aproximat de la proteïna MG218-s era de 25 kDa (Pich *et al.*, 2008). Amb aquesta informació, en el treball en que s'identifica la proteïna, els autors també van fer una predicció del possible codó d'inici del gen (Pich *et al.*, 2008), però caldria demostrar-ho empíricament.

### 1.1. Disseny de l'estratègia per introduir mutacions puntuals al genoma de *M. genitalium*

Donada la impossibilitat de deleccionar el gen codificant per la proteïna MG218-s, sense afectar directament l'expressió de la proteïna MG218, es va dissenyar una nova estratègia que permetria abolir l'expressió del gen d'interès, reduint l'impacte sobre l'altra proteïna, MG218. La nova estratègia consistiria en introduir mutacions puntuals al genoma de *M. genitalium*, per tal de suprimir l'inici de traducció del nou gen, prevenint la seva traducció i així abolir l'expressió de la proteïna MG218-s. Al mateix temps caldria que les mutacions fossin conservadores amb la seqüència del gen *mg218* per així evitar o minimitzar els efectes sobre l'expressió i estabilitat de la proteïna MG218.

L'estratègia per introduir mutacions puntuals al genoma de *M. genitalium* es basa en el reemplaçament gènic i es divideix en dues etapes (Figura I.3.A). En la primera etapa es deleccionaria un fragment de l'extrem 3' del gen *mg218*, que inclou completament la regió de l'ORF d'interès. En la segona etapa, es restauraria la regió deleccionada en la primera part, però aquest cop incloent les mutacions puntuals desitjades, que s'haurien generat prèviament per PCR mutagènica sobre el fragment que es reintrodueix.

L'estratègia es va dividir en dos passos per tal de poder assegurar un 100 % d'efectivitat en la introducció de les mutacions desitjades. La recombinació entre els plasmidis i el genoma es pot produir a través de qualsevol punt dins d'un braç d'homologia. En aquesta estratègia en dues etapes, primer es suprimeix el fragment que haurà d'incloure les mutacions desitjades i en el segon pas es restaura aquest fragment. D'aquesta forma, la regió que es modifica es tracta com si fos un insert i així el 100 % dels clons generats per reemplaçament gènic inclouran les mutacions desitjades.

A continuació explicarem més detalladament els dos passos d'aquesta estratègia.

#### Primera etapa

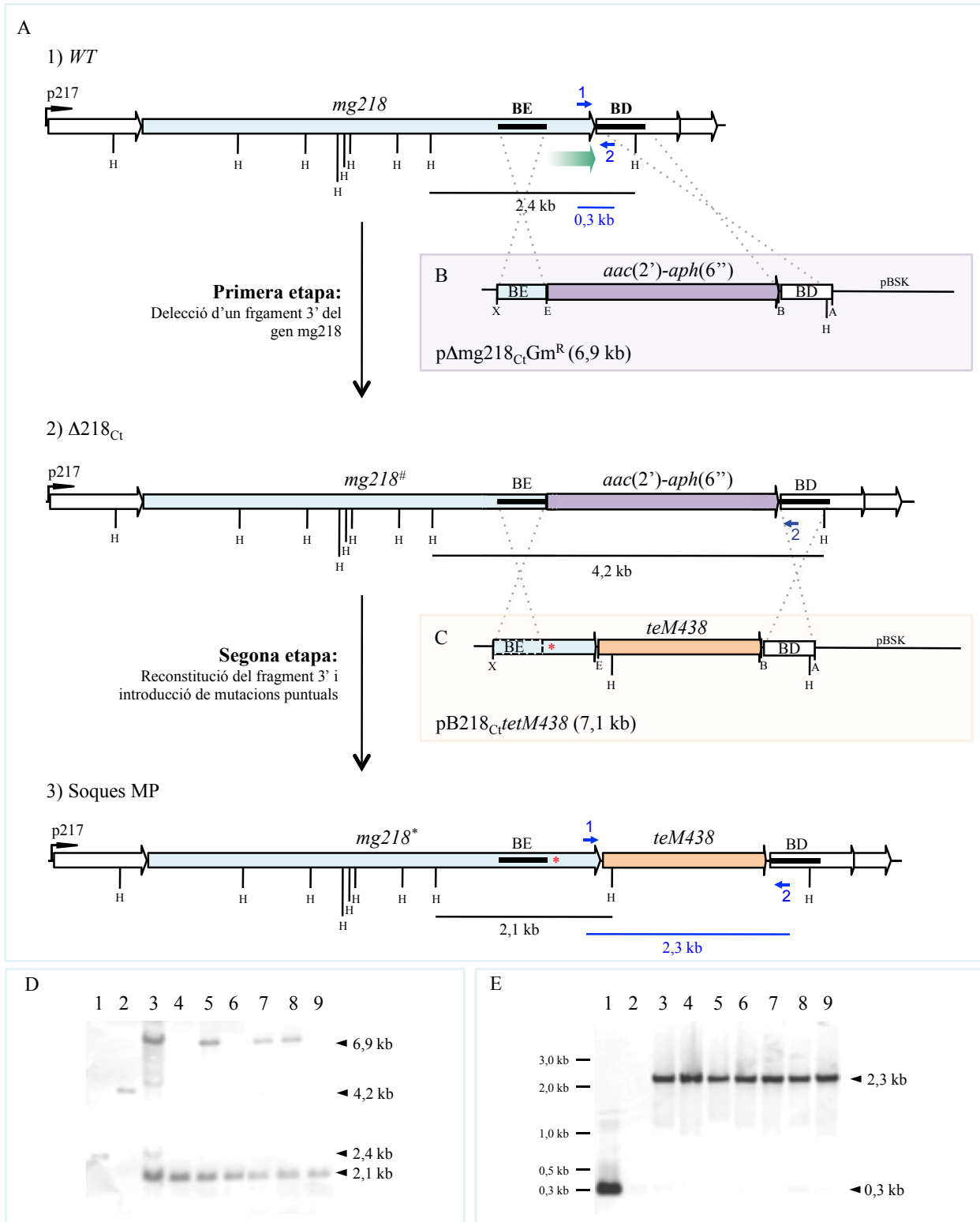
El primer pas de l'estratègia consistiria en deleccionar la seqüència codificant per l'extrem carboxi-terminal de la proteïna MG218, que conté la totalitat del nou ORF. Aquesta delecció es va realitzar mitjançant reemplaçament gènic per doble recombinació homòloga. En aquest cas, es va dissenyar el vector  $p\Delta mg218_{Ct}Gm^R$ , que està format per l'esquelet d'un pBluscript II SK<sup>+</sup> i conté un fragment de 2,5 kb amb el gen marcador *aac(6<sup>'</sup>)-aph(2<sup>'')</sup>* de resistència a gentamicina (Dybvig and Voelker, 1996; Dhandayuthapani *et al.*, 1999; Pich, Burgos, Planell, *et al.*, 2006), envoltat per les regions flanquejants del fragment que es vol deleccionar, en aquest cas un fragment d'aproximadament 750 pb de l'extrem 3' del gen *mg218*. És important destacar que a l'extrem del braç esquerre d'homologia es va incloure un codó STOP, per acabar la traducció del

gen *mg218* en el punt en que es volia truncar el gen. El vector resultant,  $p\Delta mg218_{Ct}Gm^R$  (Figura I.3.A), es va fer servir per transformar per electroporació cèl·lules de la soca salvatge G37 de *M. genitalium*. Les cèl·lules transformants resultants es van seleccionar en presència de gentamicina, tal i com es descriu a l'apartat de materials i mètodes. Així, en aquesta primera etapa, es va obtenir el mutant  $\Delta 218_{Ct}$ , pas previ a l'obtenció del mutant desitjat, defectiu en MG218-s.

#### Segona etapa

El segon pas de l'estratègia consisteix en restaurar l'extrem 3' del gen *mg218* en el mutant obtingut en el primer pas, introduint-hi al mateix temps les mutacions puntuals desitjades. Per aquest motiu cal dissenyar un nou vector suïcida similar al vector  $p\Delta mg218_{Ct}Gm^R$ , ja que mantindrem els braços d'homologia per produir el reemplaçament gènic en el mateix lloc del genoma. En aquest cas, però, es fa servir un gen marcador diferent, que substituiria el que es va utilitzar en la primera etapa. El gen marcador triat per aquest segon pas és el gen de resistència a tetraciclina, *tetM438* (Pich, Burgos, Planell, *et al.*, 2006).

2



**Figura 1.3.** Obtenció d'una soca de *M. genitalium* defectiva en proteïna MG218-s. **(A)** Esquema de l'estratègia utilitzada per introduir mutacions puntuals en la seqüència del gen *mg218*. S'ha representat de forma esquemàtica la regió del genoma del gen *mg218* en la soca salvatge de partida i en les soques mutants que s'obtenen en el primer i segon pas de reemplaçament gènic. Amb un asterisc vermell s'ha senyalat la mutació puntual introduïda. **(B)** Representació esquemàtica del vector pΔ*mg218*<sub>Ct</sub>Gm<sup>R</sup> linealitzat utilitzat en el primer pas i **(C)** del vector pB218<sub>Ct</sub>*tetM438* utilitzat en el segon pas. S'han indicat els llocs de tall per *Hind*III (H), *Xba*I (X), *Eco*RI (E), *Bam*HI (B) i *Apa*I (A). BE i BD indiquen braç esquerre i braç dret d'homologia i s'ha representat esquemàticament amb línies puntejades els possibles successos de recombinació homòloga que es poden donar entre els vectors utilitzats i els genomes en cada pas. **(D)** Anàlisi per Southern blot dels DNA genòmics extrets de la soca salvatge (1),

la soca parental  $\Delta 218_{Ct}$  (2) i de les soques MD-1 (3), MD-2 (4), MD-3 (5), MD-4 (6), MD-P (7), MD-35 (8), i MD-P3 (9). Els genomes es van digerir amb *HindIII* i com a sonda en va utilitzar el BE. S'han indicat amb barres negres els fragments esperats en cada soca sobre les 3 representacions esquemàtiques de la figura A. (E) Anàlisi per PCR de la puresa de soca salvatge (1), la soca parental  $\Delta 218_{Ct}$  (2) i de les soques MD-1 (3), MD-2 (4), MD-3 (5), MD-4 (6), MD-P (7), MD-P3 (8), i MD-35 (9). S'han marcat amb fletxes baves (1 i 2) la posició dels dos encebadors utilitzats i amb barres blaves la mida dels fragments esperats sobre les 3 representacions esquemàtiques de la figura A.

El vector dissenyat per aquest segon pas incorpora també el fragment que volem reconstituir en el genoma del micoplasma. Per aconseguir-ho cal que el fragment estigui inclòs entre els braços d'homologia presents en el vector, juntament amb el gen de resistència. En aquest cas, com es tractava de reparar l'extrem 3' del gen *mg218*, que era exactament la continuació de la seqüència present en el braç d'homologia esquerre del vector, es amplificà per PCR un fragment d'aproximadament 1,4 kb de l'extrem 3' d'aquest gen, incloent així el braç esquerre seguit del fragment que es volia restaurar. El producte resultant de la PCR es va clonar en un vector pBE digerit amb *EcoRV*, obtenint el vector pBE.218<sub>Ct</sub>. Finalment, aquest vector es va fer servir per generar les mutacions puntuals que es volien introduir en el genoma del micoplasma, abans d'incorporar aquest fragment en el vector dissenyat per aquest segon pas de l'estratègia. Més endavant discutirem les mutacions concretes que es van generar.

Les mutacions puntuals es va realitzar mitjançant mutagènesis dirigida per PCR. Donat que l'amplificació partia d'un fragment de DNA circular, com és el cas del vector pBE.218<sub>Ct</sub>, es va dissenyar una PCR inversa, de forma que només calien dos encebadors orientats de forma oposada a una PCR convencional. A més a més, tots dos encebadors estan dissenyats per hibridar de forma contigua i així iniciar la amplificació en el mateix punt. D'aquesta forma s'aconsegueix linealitzar el fragment de DNA circular, obrint-lo en el punt d'hibridació dels encebadors. Un cop linealitzat el motlle els encebadors hibriden en els extrems del fragment i tenim una amplificació com en les PCR convencionals. Per la mutagènesis dirigida, els encebadors es dissenyen per incorporar les mutacions desitjades en la seva seqüència, com veurem a continuació. Finalment, és important que els encebadors utilitzats estiguin fosforilats en el seu extrem 5' per facilitar la relligació de l'amplicó, fent servir la T4 DNA lligasa. D'aquesta forma es reconstitueix el vector circular i es pot escindir el fragment d'interès mitjançant la digestió amb els enzims de clonatge. Aquest vector també s'aprofita per confirmar la introducció de les mutacions en el fragment 218<sub>Ct</sub> mitjançant la seqüenciació dirigida de l'insert amb els encebadors Fup-17 i Rup-17.

Les diferents versions del fragment 218<sub>Ct</sub> mutat es van fer servir per substituir el braç esquerre del vector del pas anterior, al que també s'havia substituït el gen marcador, i així es van obtenir una sèrie de vectors suïcides, amb el nom genèric de pB218<sub>Ct</sub>*tetM438* (Figura I.3.A).

La soca  $\Delta 218_{Ct}$  es va transformar per electroporació amb els diferents vectors pB218<sub>Ct</sub>*tetM438*. En aquest cas, les cèl·lules transformants resultants es van seleccionar en presència de tetraciclina. D'aquesta forma es va obtenir una col·lecció de soques mutants candidates a ser la soca mutant defectiva en MG218-s que s'estava buscant.

## **1.2. Anàlisi genòmic dels transformants obtinguts en el primer i segon pas de l'estratègia de mutació del genoma de *M. genitalium***

Després de la transformació, en primer lloc s'analitza el genoma dels clons aïllats per confirmar la presència de les deleccions o modificacions introduïdes. Donat que la selecció de les cèl·lules transformades es va realitzar a través de l'expressió del gen marcador, els diferents clons aïllats podrien ser producte de la recombinació a través d'un únic braç d'homologia present en el vector utilitzat, que hauria produït la inserció de tot el vector suïcida en el genoma, o podrien ser producte d'una doble recombinació que hauria promogut el reemplaçament gènic esperat. Per tal de discernir entre les dues possibilitats es va dissenyar un assaig de diagnòstic per Southern blot, que està esquematitzat a la figura

I.3 (A i D). Donat que en els dos passos de l'estratègia es realitza un reemplaçament gènic en el mateix punt del genoma, els clons obtinguts en tots dos passos de transformació es van sotmetre al mateix anàlisi per Southern blot. Breument, es va digerir el DNA genòmic dels diferents clons a analitzar amb l'enzim de restricció *HindIII*. Posteriorment, els fragments de DNA resultants es van separar electroforèticament i es van transferir a una membrana de niló. Finalment, mitjançant la hibridació d'una sonda de reconeixement específica es van poder discernir entre els clons que eren producte del reemplaçament gènic esperat, dels que havien incorporat el plasmidi sencer en el genoma. La sonda utilitzada correspon al fragment equivalent al braç esquerre present en el plasmidi p $\Delta$ mg218<sub>Ct</sub>Gm<sup>R</sup>.

Com calia esperar, en el cas de la soca salvatge es va detectar una única banda de 2,4 kb, que va servir de control positiu en l'anàlisi (Figura I.3.D). En l'anàlisi dels clons aïllats en el primer pas de l'estratègia es va detectar una única banda de 4,2 kb en tots els casos, indicant que eren dobles recombinants i, per tant, tots ells mutants  $\Delta$ 218<sub>Ct</sub>. El segon pas de l'estratègia implicava la restauració del fragment delecionat en el primer pas i la introducció de les mutacions puntuals a un dels clons aïllats en el primer pas, en aquest cas va treballar amb el clon 10. Aquest pas es va realitzar diverses vegades per obtenir soques que contindrien diferents mutacions puntuals. Com comentarem més endavant, l'eficiència de transformació en aquest segon pas va resultar molt baixa, donades les característiques de la soca  $\Delta$ 218<sub>Ct</sub>, i això va dificultar l'obtenció de clons. No obstant, en cadascuna de les transformacions es va aïllar un mínim d'un clon transformant que es va poder analitzar. L'anàlisi per Southern blot va revelar una única banda de 2,1 kb en el cas dels clons MD-2, MD-4 i MD-P3, resultant de la doble recombinació esperada. En canvi, en els cas dels clons MD-1, MD-3, MD-P i MD-35 es van obtenir dues bandes, 2,1 kb i 6,9 kb, com correspondria en el cas d'integració del vector suïcida en el genoma a través de la recombinació única del braç esquerre d'homologia. És interessant que, en aquests últims quatre casos, tot i no haver-se produït la doble recombinació esperada, tots ells presentaven la integració del vector en el genoma a través de la recombinació del braç esquerre i, per tant, en tots els casos es va poder reconstituir el gen *mg218*.

Un cop determinat el genotip dels diferents clons, es va comprovar la puresa dels *stocks* generats de les diferents soques mutants. Aquesta anàlisi es va realitzar mitjançant PCR amb els encebadors 5-dgnKOp28 i 3-dgnKOp28, dissenyats especialment per detectar el genoma tipus de la soca salvatge. Un dels encebadors hibridava a prop de l'extrem 3' del gen *mg218* i l'altre en la regió de l'extrem 5' del gen *mg491*, que trobem a continuació del gen *mg218* (Figura I.3.A i E). D'aquesta forma, en el cas de la soca salvatge s'amplificava un petit amplicó de 0,3 kb, localitzat en el punt de sutura 3' de la delecio dissenyada en el primer pas. En el cas del mutant  $\Delta$ 218<sub>Ct</sub> no es detecta cap producte resultant de la PCR, ja que el fragment complementari a un dels encebadors ha estat delecionat del genoma. En el cas de les soques amb el gen *mg218* reconstituït, cal tenir en compte que també han incorporat el gen de resistència *tetM438* i, per tant, l'amplicó que es podia amplificar amb aquest parell d'encebadors haurà augmentat aproximadament 2 kb, donada la mida d'aquest gen de resistència. En l'anàlisi de les soques mutants no es detecta en cap cas la banda corresponent a la soca salvatge i, d'aquesta forma, es confirma que els *stocks* no estaven contaminats (Figura I.3.E).

Finalment, cal destacar que es van comprovar i confirmar les mutacions introduïdes específicament a cadascuna de les soques obtingudes en el segon pas, mitjançant la seqüenciació dirigida de genoma amb un encebador seqMutDir, dissenyat especialment per aquesta avaluació.

### 1.3. Determinació de l'inici de traducció de la proteïna MG218-s

Fins al moment, hem vist com es van obtenir mutants de *M. genitalium* amb mutacions puntuals en el genoma. Falta per determinar quines van ser aquestes mutacions (Figura I.4.A).

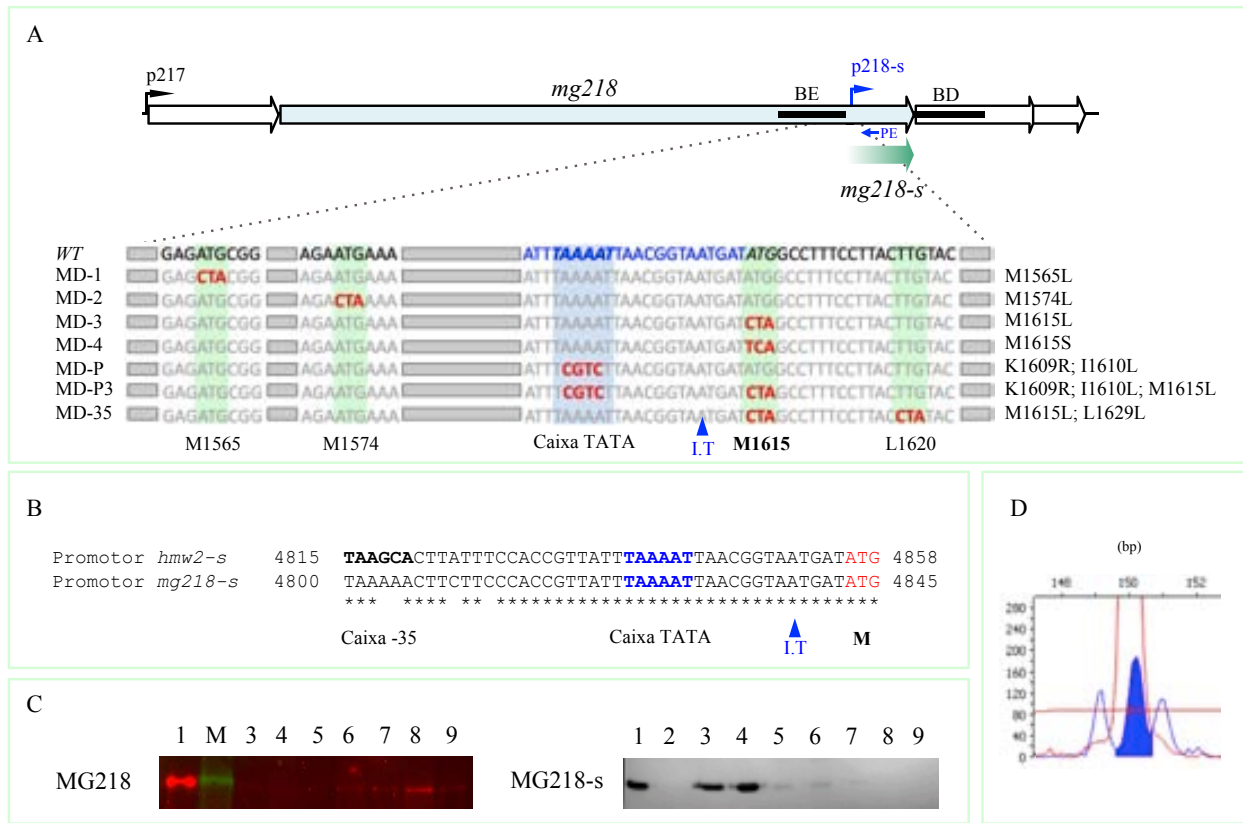
A fi de suprimir l'expressió de la proteïna MG218-s es volia mutar el codó d'inici de traducció de la proteïna, que es troba dins de la seqüència del gen *mg218*. Aquesta idea sorgeix perquè s'havia demostrat que la substitució del codó d'inici de traducció de la proteïna HMW2-s suprimia la seva expressió a *M. pneumoniae* (Boonmee *et al.*, 2009). Ara bé, la senzillesa aparent d'aquesta idea es veia complicada pel fet que no es coneixia quin era aquest codó d'inici. Com hem mencionat prèviament, de la proteïna MG218-s només se sabia la posició del gen en el genoma i el seu pes molecular aproximat, que era de 25 kDa. Amb aquestes dues dades es va aproximar el nombre d'aminoàcids que podria tenir la proteïna (aproximadament 200 aa, amb una mitjana de pes molecular de 110 Da per aminoàcid) i, per tant, quina seria la longitud aproximada del gen. Així, partint des de l'extrem 3' del gen *mg218*, seguint el seu mateix marc de lectura i tenint en compte la longitud aproximada del nou gen, es van localitzar 3 codons ATG dins de la seqüència del gen *mg218*, que serien bons candidats per ser el codó d'inici de traducció de la proteïna en estudi. Aquests tres codons ATG correspondrien amb les *Met1565*, *Met1574* i *Met1615* de la proteïna MG218, en els dos últims casos coincidint amb les prediccions fetes per (Pich *et al.*, 2008). Donades aquestes tres possibilitats, es van dissenyar encebadors per fer tres mutagènesis dirigides. En cada cas se substituiria un d'aquests codons ATG pel triplet CTA, que codifica per l'aminoàcid *Leu* i que no s'ha descrit en cap cas que aquest triplet pugui funcionar com a codó d'inici alternatiu de traducció a *M. genitalium*, a diferència d'altres codons *Leu*. Com que tant l'aminoàcid *Met* com *Leu* són aminoàcids grans, alifàtics i hidrofòbics, amb aquesta substitució s'esperava un canvi conservat d'aminoàcid en la seqüència de la proteïna MG218 que minimitzaria l'impacte sobre la seva estructura i funció. De fet, consultant matrius de freqüències de substitució relatives entre aminoàcids basades en models evolutius, el canvi més freqüent de *Met* és *Leu*, seguit dels aminoàcids *Ile*, *Val* i *Ala* (Dayhoff *et al.*, 1978; Veerassamy *et al.*, 2003; Lemaitre *et al.*, 2011). Pel nou mètode descrit per lliurar mutacions puntuals al genoma de *M. genitalium*, es van generar les soques mutants MD-1 (*Met1565Leu*), MD-2 (*Met1574Leu*) i MD-3 (*Met1615Leu*).

Per tal de determinar l'efecte de les tres mutacions introduïdes en la seqüència del gen *mg218* en els diferents mutants generats, es van analitzar els nivells d'expressió de les dues proteïnes afectades per la mateixa. L'anàlisi del perfil proteic d'aquests mutants mitjançant Western blot fent servir un anticòs policlonal de ratolí contra la proteïna MG218 (Pich *et al.*, 2008), va revelar que en tots els casos s'havia restaurat l'expressió de la proteïna MG218 *full-length* (Figura I.4.C; també es pot veure per SDS-PAGE en la figura I.5.A). D'aquesta forma es confirmava l'èxit de la reconstitució del gen *mg218* en tots els casos. També es va analitzar per Western blot la presència de la proteïna MG218-s en aquests mutants amb un anticòs policlonal de ratolí contra la proteïna (Pich *et al.*, 2008). Així es va demostrar que els mutants MD-1 i MD-2 expressaven la proteïna MG218-s i ho feien en nivells comparables als de la soca salvatge. En canvi, el mutant MD-3 presentava una reducció dràstica dels nivells d'expressió de la proteïna MG218-s, tot i que encara es podien detectar traces de la proteïna (Figura I.4.C). Aquest resultat indicava que l'inici de traducció més probable per la proteïna MG218-s seria el codó ATG corresponent amb la *Met1615*. I, per tant, el gen codificant per la proteïna MG218-s correspondria a les coordenades 264019-264594 en el genoma de *M. genitalium*.

Donat que la mutació del codó ATG pel triplet CTA no va abolir l'expressió de la proteïna MG218-s totalment, es va generar un quart mutant que tenia aquest codó ATG, corresponent a la *Met1615*, substituït pel triplet TCA, que codifica per Ser. Aquesta mutació introduiria un canvi menys conservat en la proteïna *mg218*, però no hi ha cap codó Ser a micoplasma que pugui funcionar com a codó alternatiu d'inici de traducció. En canvi dels 6 possibles codons *Leu*, n'hi ha tres (TTA, TTG i CTG) que sí funcionen com a codons d'inici de traducció alternatiu i es volia descartar que els baixos nivells de proteïna MG218-s que s'obtenien en el mutant MD-3 eren conseqüència d'un pseudo-reconeixement de l'inici de traducció. En l'anàlisi del perfil proteic d'aquest mutant, que es va anomenar MD-4, es van

□

obtenir resultats equivalents als del mutant MD-3. Aquest mutant MD-4 també expressava la proteïna MG218 *full-length* i nivells molt reduïts, però detectables, de proteïna MG218-s (Figura I.4.C).



**Figura I.4.** Mutacions puntuals introduïdes a la seqüència del gen *mg218* de *M. genitalium*. (A) Sobre la representació esquemàtica de la regió del gen *mg218* en el genoma de *M. genitalium* s'ha senyalat el promotor que trobem a l'inici de l'operó amb una gran fletxa negra. (B) Alineament de les regions promotores del gen *hmw2-s* de *M. pneumoniae* i *mg218-s* de *M. genitalium*. Les coordenades indicades són del gen *hmw2* i *mg218*, respectivament. En vermell s'ha destacat el triplet ATG d'inici de traducció de les dues proteïnes. M indica metionina. En blau s'ha destacat la caixa TATA de la regió promotora. En negra s'han destacat la caixa -35 de la regió promotora del gen *hmw2-s* de *M. pneumoniae* (Boonmee *et al.*, 2009). (C) Anàlisi per Western blot amb els anticossos anti-MG218<sub>Nt</sub> per detectar la proteïna MG218 i anti-MG218<sub>Ct</sub> per detectar la proteïna MG218-s. La numeració indica soca salvatge (1), la soca parental Δ218<sub>Ct</sub> (2) i de les soques MD-1 (3), MD-2 (4), MD-3 (5), MD-4 (6), MD-P (7), MD-P3 (8), i MD-35 (9). M, indica Marcador de pes molecular (Dual x-tra de Bio-Rad) i la banda que es veu equival a 250 kDa. (D) Fragment del cromatograma obtingut en l'anàlisi per *primer extension* realitzada amb l'encebador Fam-primextp28, on es pot veure el pic corresponent la senyal per 6-Fam. Es representen unitats de fluorescència aleatòries i la mida del fragment en pb.

#### 1.4. Determinació de l'inici de transcripció del nou gen

Com hem mencionat a la introducció, es treballava amb la hipòtesi de que la proteïna MG218-s és producte de l'expressió d'un gen localitzat dins de la seqüència del gen *mg218*. Un cop s'havia identificat l'inici de traducció de la proteïna i s'havia determinat la seqüència exacte del seu gen, semblava confirmar aquesta hipòtesi. No obstant, encara falta demostrar l'existència d'un transcrit específic per aquest gen i identificar el seu promotor associat.

L'inici de transcripció del gen *mg218-s* es va identificar mitjançant la tècnica de *primer extension*, que es basa en la reacció de la transcriptasa inversa. Aquesta tècnica requereix el disseny d'un encebador específic que hibrida en una regió coneguda del transcrit d'estudi i que està marcat amb un fluorocrom en el seu extrem 5'. En aquest cas, es va dissenyar l'encebador Fam-primextp28 (Figura I.4.A), que hibridava a 145 pb *downstream* de l'inici del gen, que acabem de identificar en l'ATG codificant per la



Met1615 de la proteïna MG218, i estava marcat amb fluoresceïna (6-Fam). Partint d'una extracció de RNA total de la soca salvatge G37 de *M. genitalium*, es va fer servir aquest encebador per hibridar el transcrit d'interès i amb la transcriptasa inversa produir un cDNA des del punt d'hibridació fins a l'extrem 5' del transcrit. Un cop acabada la reacció, es va desnaturalitzar l'híbrid cDNA-RNA i es va degradar el RNA. Finalment, la mida del cDNA es va determinar per electroforesis capil·lar amb el sistema ABI 3130XL (Applied Biosystems), en presència d'un marcador de pes molecular marcat també amb un fluorocrom diferent, ja que la detecció dels fragments es realitza per fluorescència, que és el sistema més sensible per treballar amb mostres reduïdes. La determinació de l'inici de transcripció del gen *mg218-s* es va fer per duplicat. En paral·lel, es va realitzar es va la determinació de l'inici de transcripció del gen *mg281*, prèviament determinat amb la mateixa tècnica per (Lluch-senar *et al.*, 2007), com a control positiu de la tècnica i també, es va fer un control negatiu, sense motlle de partida. Tot i que en el cromatograma obtingut en l'anàlisi de la mostra es va detectar un únic pic de molt baixa intensitat, cal destacar que en les dues rèpliques es va obtenir el mateix resultat i, a més a més, aquest pic no es va detectar ni en el control negatiu ni en el control positiu de la tècnica, suggerint que el resultat observat en les mostres no era fruit del soroll de fons propi de la tècnica (Figura I.4.D). Donat que els resultats de les dues rèpliques eren consistents i indicaven que la mida del fragment analitzat era de 150 pb, es va identificar l'inici de transcripció a 5 pb *upstream* de l'inici de traducció.

Tenint en compte l'inici de transcripció i l'inici de traducció del gen *mg218-s*, es va fer una aproximació de la regió promotora del gen. El promotor del gen *hmw2-s*, ortòleg del gen *mg218-s* a *M. pneumoniae*, havia estat descrit prèviament (Boonmee *et al.*, 2009). En aquesta regió promotora els autors havien pogut identificar les caixes -10 i -35 característiques dels promotors procariotes. L'alineament de les seqüències *upstream* dels gens *mg218-s* de *M. genitalium* i *hmw2-s* de *M. pneumoniae* presenta una identitat de seqüència del 100 % en les 30 pb *upstream* de l'inici del gen, com havien indicat (Boonmee *et al.*, 2009) (Figura I.4.B). Aquest fragment inclou la caixa -10 del promotor identificat a *M. pneumoniae* pel gen *hmw2-s*. Si es fa l'alineament d'un fragment una mica més llarg (43 pb), que inclouria també la caixa -35 del promotor identificat a *M. pneumoniae*, la homologia encara és del 91 %. A *M. genitalium* no trobem una caixa -35 clara en aquesta regió promotora, però cal tenir en compte que encara no s'ha descrit cap seqüència consens d'aquestes caixes a *M. genitalium* (Fraser *et al.*, 1995; Weiner III *et al.*, 2000; Pich, Burgos, Planell, *et al.*, 2006; Lluch-senar *et al.*, 2007; Güell *et al.*, 2009). Donada aquesta elevada homologia i d'acord amb la predicció de (Boonmee *et al.*, 2009), es va considerar que el promotor del gen a *M. genitalium* correspondria amb aquesta regió d'aproximadament 50 pb abans de l'inici del gen, que inclou una caixa -10. Com veurem més endavant, aquest resultat es va poder comprovar empíricament.

### 1.5. Obtenció de mutants defectius en MG218-s

Un cop identificat l'inici de transcripció i de traducció del gen *mg218-s*, juntament amb el possible promotor associat, es va plantejar la possibilitat d'obtenir un nou mutant que tingués totalment suprimida l'expressió de la proteïna MG218-s, ja que els mutants amb el codó d'inici modificat, reduïen l'expressió de la proteïna de forma dràstica, però encara l'expressaven. Aquesta fuga era difícil d'explicar, però teníem dues hipòtesis. Per una banda, la inactivació del promotor hauria de suprimir la producció del mRNA associat i així suprimir l'expressió de la proteïna. D'altra banda, era possible que el transcrit que s'estava produint en els mutants amb el codó d'inici mutat, s'estigués traduïnt a partir d'un altre codó d'inici alternatiu. Analitzant la seqüència del gen es va trobar un codó TTG, que codificava la *Leu5* de la proteïna MG218-s. Aquest és un dels codons identificats a micoplasma com a codó d'inici alternatiu i estava localitzat molt a prop de l'inici del transcrit, pel que no descartàvem que es pogués produir la traducció a partir del mateix. Amb aquestes dues idees es van generar tres soques mutants més (Figura I.4.A). La primera de les soques tenia el codó d'inici ATG i, simultàniament, el possible codó d'inici alternatiu TTG substituïts per triplets CTA. D'aquesta forma es va obtenir la soca MD-35, que

incorporava només una mutació en la proteïna MG218, la mutació *Met1615Leu*, ja que l'altra substitució produïa un modificació silenciosa. En la segona soca, que es va anomenar MD-P, la seqüència de la caixa -10 que s'havia trobat en la regió promotora identificada, 5'-TAAAAT-3', es va substituir per la seqüència 5'-TCGTCT-3', de forma que s'incorporaven les mutacions *Lys1609Arg* i *Ile1610Leu* en la proteïna MG218. Per últim, la tercera soca contenia simultàniament les modificacions de la caixa -10 del promotor, present en el mutant MD-P, com la modificació del codó d'inici de traducció present en el mutant MD-3. Aquesta soca es va anomenar MD-P3 i incorporava les mutacions *Met1615Leu*, *Lys1609Arg* i *Ile1610Leu* en la proteïna MG218.

Novament, l'efecte de les mutacions introduïdes en la seqüència del gen *mg218* es va determinar analitzant els nivells d'expressió de les dues proteïnes afectades. Com en els casos anteriors, mitjançant Western blot amb anticossos policlonals específics contra aquestes proteïnes, es van analitzar els perfils proteics dels mutants MD-35, MD-P i MD-P3. En els tres casos es va tornar a constatar la restauració de l'expressió de la proteïna MG218 *full-length*, confirmant l'èxit de la reconstitució del gen *mg218* (Figura I.4.C; en aquest cas també es pot veure el SDS-PAGE de la Figura I.5.A). La sorpresa es va trobar a l'analitzar la presència de la proteïna MG218-s. En el cas del mutants MD-P encara es van poder detectar nivells mínims de la proteïna per Western blot. Aquest resultat suggeria que el promotor associat al gen era suficientment fort per produir transcrit, tot i la modificació de la caixa -10 o, potser, la possible traducció de la proteïna partint del mRNA transcrit a partir del promotor del gen *mg217*, que produeix un policistró que inclou els 4 gens de l'operó. Només amb la combinació de les mutacions P3 i 35 aconseguíem abolir l'expressió de la proteïna MG218-s per sota dels nivells detectables per Western blot (Figura I.4.C). Això suggereix que el promotor del gen codificant per aquesta proteïna inclou la regió compresa pels nucleòtids 264001-264004 en el genoma de *M. genitalium* i confirma que el codó corresponent a la *Met1615* de la proteïna MG218 és també el codó d'inici del gen *mg218-s*.

## 2. Caracterització del mutant defectiu en proteïna MG218-s

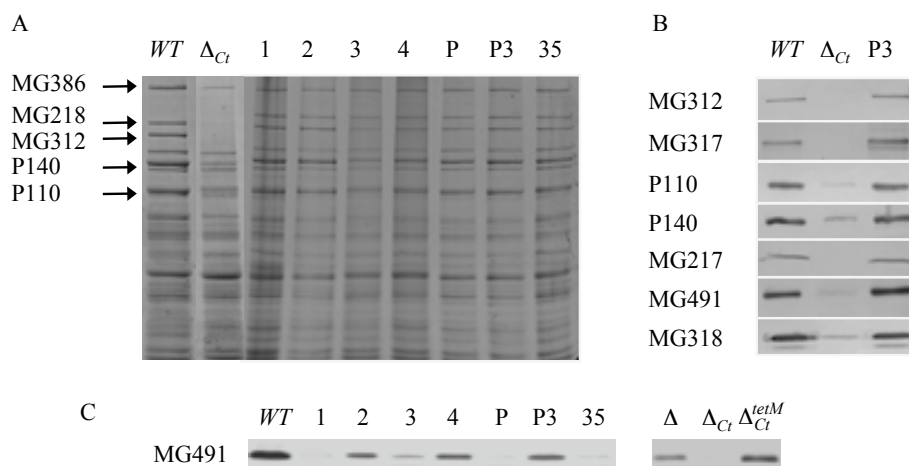
L'anàlisi dels diferents mutants obtinguts amb aquest nou sistema d'introducció de mutacions puntuals a la seqüència del gen *mg218*, va permetre trobar dos casos que havien abolit l'expressió de la proteïna MG218-s, convertint-se en bons candidats per l'estudi de la funció de la proteïna. Ara bé, només en el cas MD-P3 es va aïllar un clon pur generat per doble recombinació. És per això que es va triar aquesta soca i, a partir d'aquí, ens referirem a ella com la soca defectiva en MG218-s.

Recordarem que aquesta soca MD-P3 conté mutacions tant en la caixa -10 del promotor del gen *mg218-s*, ara ja acotat, com en el codó d'inici de traducció del mateix.

### 2.1. Perfil proteic

La soca MD-P3 havia estat seleccionada com a model de soca defectiva en proteïna MG218-s, ja que s'havia pogut demostrar, mitjançant la tècnica de western blot amb anticossos específics, que aquesta soca no expressava la proteïna MG218-s, però sí expressava la proteïna MG218 *full-length* (Figura I.4.C).

Un cop constatades l'absència de la proteïna MG218-s i la presència de la proteïna MG218, es va analitzar el perfil proteic global de la soca MD-P3 mitjançant la tècnica de separació de proteïnes per electroforesis monodimensional en gels SDS-PAGE. Gràcies a que *M. genitalium* té un dels genomes més reduïts que es coneix, amb prop de 480 proteïnes predites, una tècnica senzilla com aquesta permet detectar canvis en el perfil proteic del microorganisme, com ja s'ha pogut demostrar amb anterioritat (Pich, Burgos, Ferrer-Navarro, *et al.*, 2006; Burgos *et al.*, 2006; Pich *et al.*, 2008).



**Figura I.5.** Perfil proteic de la soca salvatge (*WT*), de la soca parental  $\Delta 218_{Ct}$  ( $\Delta_{Ct}$ ) i de les diferents soques amb mutacions puntuals: MD-1 (1); MD-2 (2); MD-3 (3); MD-4 (4); MD-P (P); MD-P3 (P3) i MD-35 (35) de *M. genitalium*. **(A)** SDS-PAGE 7.5 %. Les fletxes indiquen les bandes corresponents a proteïnes de l'OT. **(B)** Anàlisi per Western blot amb els anticossos anti-HMW1 (ortòleg MG312), anti-HMW3 (ortòleg de MG317), anti-P110, anti-P140, anti-MG217 i anti-P41 (ortòleg de MG491) i anti-MG318. **(C)** Anàlisi per Western blot de l'expressió de la proteïna MG491 en diferents mutants resistents a gentamicina (1, 3, P i 35) o tetraciclina (2, 4 i P3). Es comparen els nivells de proteïna MG491 entre els mutants  $\Delta 218$  (Pich *et al.*, 2008) ( $\Delta$ );  $\Delta 218_{Ct}$  ( $\Delta_{Ct}$ ) i  $\Delta_{Ct}tetM$  ( $\Delta_{Ct}^{tetM}$ ).

El perfil proteic de la soca MD-P3 es va comparar amb el de la soca salvatge i no es van detectar diferències entre les dues soques (Figura I.5.A). D'altra banda, es va analitzar també la soca parental  $\Delta 218_{Ct}$ . Per Western blot amb anticossos específics s'havia pogut constatar l'absència de proteïna MG218-s, però cal destacar que tampoc es va detectar la proteïna MG218 truncada (dada no mostrada), que esperaríem trobar, donat que amb els mutants amb insercions per transposó en el gen *mg218*, s'havia demostrat que expressaven versions truncades i estables de la proteïna (Pich *et al.*, 2008). L'anàlisi del perfil proteic de la soca  $\Delta 218_{Ct}$  per SDS-PAGE mostra clarament la pèrdua o disminució de bandes corresponents a proteïnes d'alt pes molecular com la proteïna MG312 o les adhesines P110 i P140 (Figura I.5.A). Per Western blot amb anticossos específics en cada cas, es van analitzar els nivells d'expressió de les diferents proteïnes relacionades amb l'organela terminal. Es van analitzar les proteïnes MG312, MG317, P140, P110, MG217, MG491, MG318 i MG200. D'aquesta forma es va confirmar que la soca MD-P3 no presenta diferències significatives en els nivells d'expressió d'aquestes proteïnes respecte la soca salvatge (Figura I.5.B), però en canvi la soca  $\Delta 218_{Ct}$  presenta nivells reduïts o nuls de totes les proteïnes examinades.

Els efectes pleiotròpics en proteïnes prèviament relacionades amb l'estructura i funció de l'organela terminal de *M. genitalium* observats com a conseqüència de la deleció de l'extrem 3' del gen *mg218* serien similars als que s'havien descrit prèviament amb la deleció total del gen *mg218* ( $\Delta 218$ ) (Pich *et al.*, 2008). Tot i així, cal destacar una diferència important entre aquests dos mutants,  $\Delta 218$  i  $\Delta 218_{Ct}$ . El mutant  $\Delta 218_{Ct}$ , portador del gen resistència a gentamicina, presenta una disminució dràstica dels nivells d'expressió de proteïna MG491, indicant que es podria tractar d'un efecte polar de la deleció del fragment 3' del gen *mg218*, ja que el gen codificant per la proteïna MG491 es troba *downstream* d'aquest gen de selecció. En canvi, en el mutant defectiu total  $\Delta 218$ , que és portador del gen de resistència *tetM438*, no es va evidenciar la pèrdua de proteïna MG491 i, per això, van descartar l'existència d'efectes polars en aquest cas (Pich *et al.*, 2008). Per comprovar si la diferència en els nivells d'expressió de la proteïna MG491 és deguda a la presència del fragment amb el gen de resistència a gentamicina, es va repetir l'obtenció de la soca  $\Delta 218_{Ct}$ , però en aquest cas es va fer servir com a gen de selecció el gen modificat de

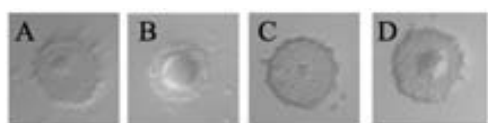
resistència a tetraciclina *tetM438*, obtenint la soca  $\Delta 218_{Ct}tetM$ . En un nou anàlisi per western blot per detectar la proteïna MG491 es va poder constatar que aquest nou mutant  $\Delta 218_{Ct}tetM$  no perd la proteïna MG491 (Figura I.5.C) i de fet presenta un perfil proteic idèntic al del mutant defectiu total  $\Delta 218$ , com veurem més endavant (Figura I.11). En paral·lel, es van comprovar els nivells d'expressió d'aquesta proteïna en tots els mutants MD. Aquests mutants els podem agrupar en dos grups: a) els mutants MD-2, MD-4 i MD-P3 que són mutants obtinguts per doble recombinació i portadors de la resistència a tetraciclina i b) els mutants MD-1, MD-3, MD-P i MD-35 que van integrar el vector pB218<sub>Ct</sub>*tetM438* en el genoma per recombinació a través del braç esquerre i, per tant, són portadors del gen de resistència a tetraciclina i del fragment amb el gen de gentamicina, que es troba situat davant del gen *mg491*, com en el clon parental  $\Delta 218_{Ct}$ . D'aquesta forma s'ha comprovat que només en els mutants que tenen el fragment amb el gen de resistència a gentamicina just en posició *upstream* al gen *mg491* s'observen nivells reduïts de proteïna MG491 (Figura I.5.C).

Si considerem només els mutants resistents a tetraciclina, sembla que la deleció del fragment 3' de la proteïna MG218, que suprimeix també la proteïna MG218-s, desestabilitza la proteïna MG218 truncada, a diferència del que s'havia observat amb els mutants que presenten insercions de transposó en el gen *mg218*, que expressarien una versió truncada de la proteïna MG218 i mantindrien l'expressió de la proteïna MG218-s, com en el cas del mutant C6 (Pich *et al.*, 2008). No obstant, les diferències

## 2.2. Estudi de la capacitat d'Hemadsorció

La capacitat dels micoplasmes per unir-se a eritròcits proporciona un senzill sistema per avaluar de la capacitat d'adhesió de les soques de micoplasma. És la capacitat d'hemadsorció.

Donat que perfil proteic del mutant MD-P3 no mostrava deficiències en proteïnes relacionades amb l'adherència i, a més a més, la soca mutant no semblava tenir problemes per adherir-se al plàstic dels flascons de cultiu, no esperàvem deficiències en la capacitat d'adhesió de la soca. Per això es va fer una avaluació qualitativa de la capacitat d'hemadsorció. Aquesta anàlisi es realitza partint de colònies individuals de la soca d'estudi, crescudes en plaques de medi SP4 sòlid, que es cobreixen amb una solució d'eritròcits durant dues hores i, a continuació, es realitzen tres rentats suaus per retirar les cèl·lules d'eritròcits no unides a les colònies de la placa. El resultat de l'anàlisi qualitativa no va revelar diferències en la capacitat d'adherència de la soca MD-P3 respecte la soca salvatge (Figura I.6).



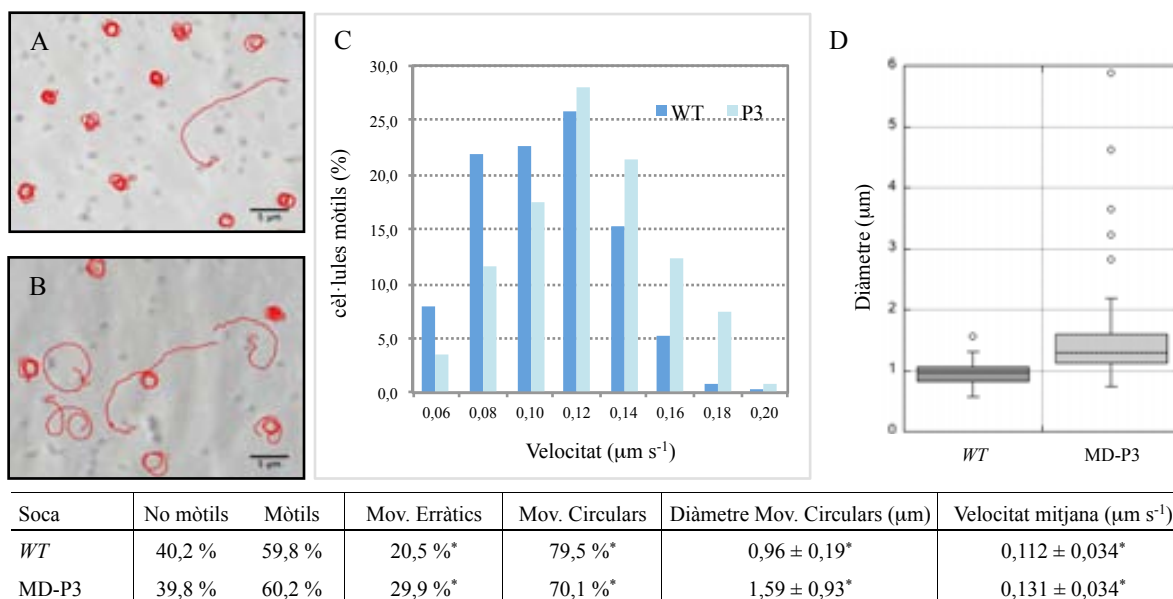
**Figura I.6.** Assaig d'HA qualitativa en colònies de la soca salvatge (A), la soca parental  $\Delta 218_{Ct}$  (B), de la soca defectiva en MG218-s MD-P3 (C) i la soca MD-P3 complementada amb la proteïna MG218-s (clon D3) (D) de *M. genitalium* amb hRBC.

## 2.3. Estudi de la motilitat del mutant defectiu en MG218-s

Les motilitat de la soca MD-P3 es va caracteritzar mitjançant estudis microcinematogràfics. Mitjançant microscòpia de contrast de fase, es pot observar i monitoritzar el moviment de cèl·lules individuals. En aquest estudi es van capturar imatges cada 2 s durant intervals de 2 min per cada cinematografia enregistrada. D'aquesta forma podem analitzar les diferents cèl·lules de forma individualitzada i determinar quin percentatge d'elles es mouen, a quina velocitat es desplacen i com és el perfil que descriuen en el seu recorregut.

En l'anàlisi de soca MD-P3 es va determinar un percentatge de cèl·lules mòtils comparable al de la soca salvatge, però les cèl·lules de la soca mutant exhibien una velocitat mitjana lleugerament superior a l'observada per les cèl·lules de la soca salvatge i la diferència és estadísticament significativa ( $p < 0,0001$ ). No obstant, el més interessant, es va trobar a l'examinar els patrons de moviment exhibits per les

cèl·lules de la soca MD-P3 (Figura I.7). S'ha descrit que en cultiu axènic les cèl·lules de *M. genitalium* descriuen majoritàriament trajectòries circulars i un percentatge reduït de cèl·lules descriuen trajectòries erràtiques, és a dir, sense cap orientació definida (Pich, Burgos, Ferrer-Navarro, *et al.*, 2006; Burgos *et al.*, 2008). En aquest cas, es van analitzar gairebé 300 cèl·lules de la soca MD-P3 i es va determinar que gairebé el 30 % realitzava moviments erràtics. Aquest valor suposa un increment estadísticament significatiu del percentatge de cèl·lules que realitzen moviments erràtics en comparació amb les cèl·lules de la soca salvatge ( $p < 0,05$ ). D'altra banda, es van analitzar els diàmetres de les trajectòries circulars de 50 cèl·lules de la soca MD-P3 i 50 més de la soca salvatge, i es va observar que aquestes trajectòries mostraven diàmetres superiors en el cas de la soca mutant. La distribució dels valors obtinguts s'ha representat en forma de diagrama de caixes (Figura I.7.D), on es pot observar que la mediana de la soca MD-P3 (1,30  $\mu\text{m}$ ) és superior a l'obtinguda per la soca salvatge (0,97  $\mu\text{m}$ ). De fet, si ens fixem en els límits de les caixes representades, marcats pel primer i el tercer quartil, es pot comprovar que el límit inferior en el cas de la soca mutant és superior al límit superior en el cas de la soca salvatge, pel que ambdues medianes són qualitativament diferents. Atès que les dues mostres són suficientment grans, s'assumeix normalitat i, acceptant igualtat de variàncies en les dues poblacions analitzades, s'ha determinat que la mitjana dels diàmetres en la soca MD-P3 és  $1,59 \pm 0,93 \mu\text{m}$  i aquest valor és significativament superior a l'observat en el cas de la soca salvatge,  $0,96 \pm 0,19 \mu\text{m}$  ( $p < 0,0001$ ). Així, tant les consideracions qualitatives com l'aproximació quantitativa indiquen una clara diferenciació de les dues poblacions.



**Figura I.7.** Estudis microcinematogràfics. Representació esquemàtica dels *tracks* enregistrats en la soca salvatge (A) i en la soca mutant MD-P3 de *M. genitalium* (B). (C) Distribució de la velocitat de les cèl·lules mòtils de la soca salvatge (WT) i de la soca mutant MD-P3 (P3). (D) Representació en caixes de la distribució dels diàmetres dels *tracks* circulars realitzats per 50 cèl·lules de la soca salvatge (WT) i de la soca MD-P3. Els asteriscs destaquen els valors estadísticament diferents entre les dues soques ( $p < 0,05$ ).

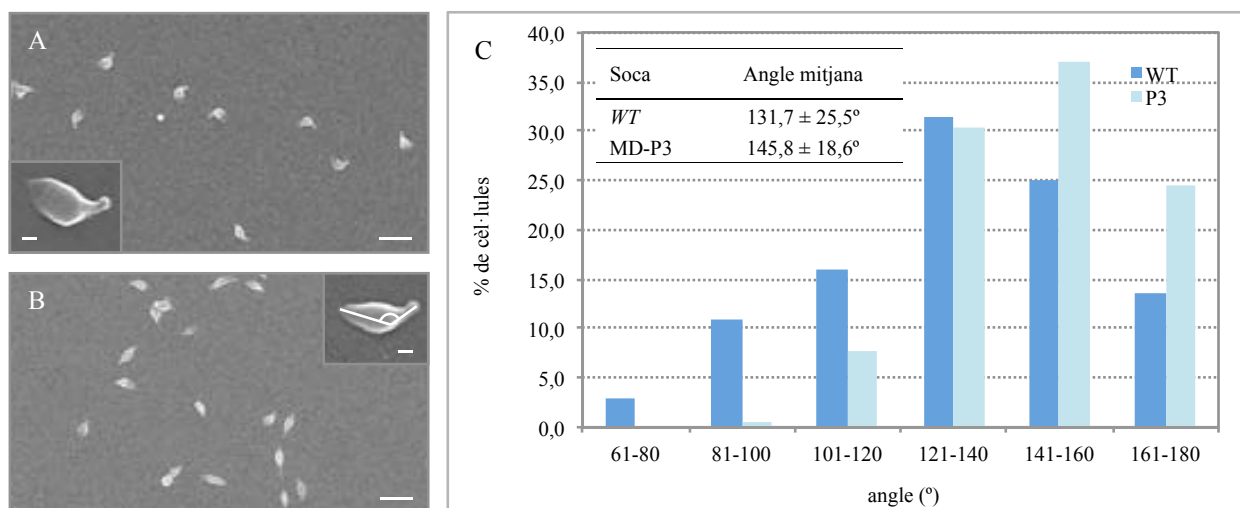
## 2.4. Morfologia cel·lular

La Morfologia cel·lular es va analitzar per microscòpia electrònica de rastreig. L'anàlisi es va realitzar en cambres de cultiu cel·lular Permax (Nunc). Es van créixer cèl·lules del mutant defectiu en MG218-s i de la soca salvatge durant 16 h en condicions estàndard de cultiu. A continuació, es van fixar les cèl·lules amb una solució de glutaraldehid al 1 % i es va procedir amb el protocol de deshidratació i metalització,

□

descriu a l'apartat de materials i mètodes. L'observació es va realitzar amb el microscopi electrònic de rastreig Hitachi S-570.

Les cèl·lules de la soca MD-P3, que tenen MG218 però són defectives en proteïna MG218-s, presenten la mateixa morfologia cel·lular que les cèl·lules de la soca salvatge i exhibeixen organelles terminals *bona fide* (Figura I.8.A i B). D'altra banda el percentatge de cèl·lules que presenten dues organelles terminals, així com la presència de parelles de cèl·lules en divisió és estadísticament comparable a la soca salvatge. La diferència entre les dues soques es revela quan es mesura l'angle format en la intersecció dels eixos que passen de forma longitudinal al llarg de l'organela terminal i del cos cel·lular. En el cas de la soca mutant MD-P3 s'ha determinat un angle mitjana de  $145,8 \pm 18,6^\circ$ , que és gairebé  $15^\circ$  superior a l'obtingut en el cas de la soca salvatge. Aquesta diferència, que implica un increment del 10 %, és estadísticament significativa ( $p$ -valor  $< 0,001$ ) (Figura I.8.C). Aquest resultat és consistent amb els resultats obtinguts en l'anàlisi de la motilitat d'aquesta soca mutant, que presenta una velocitat mitjana comparable a la de la soca salvatge, però els patrons de moviment que descriuen les cèl·lules mutants presenten un increment clar del percentatge de moviments erràtics i també un increment del diàmetre dels cercles en els patrons de moviment circular, tenint en compte la hipòtesi que proposa que l'organela terminal serveix de timó del moviment del micoplasma (Burgos *et al.*, 2008).



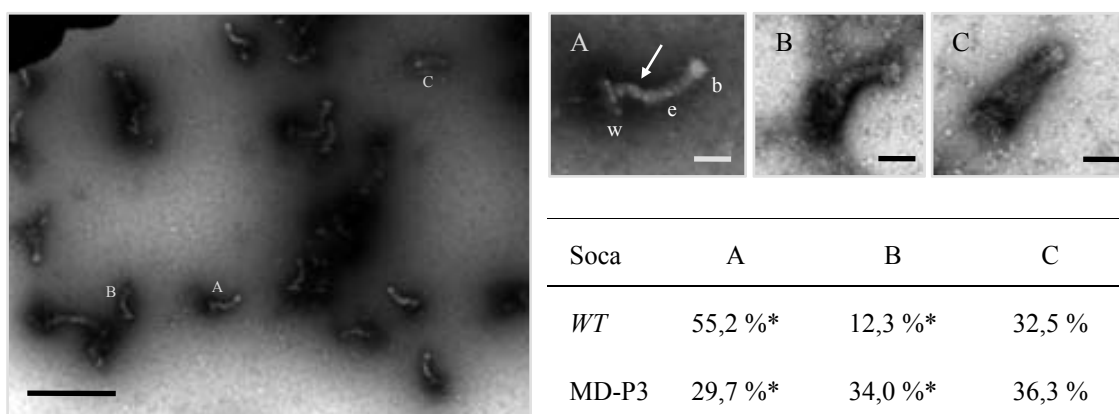
**Figura I.8.** Anàlisi de la morfologia cel·lular per microscòpia electrònica de rastreig. Micrografia de la soca salvatge (A) i de la soca MD-P3 defectiva en proteïna MG218-s (B). Les barres d'augment indiquen  $1 \mu\text{m}$  o  $100 \text{nm}$  en les ampliacions. s'han marcat els eixos del cos cel·lular i de l'OT en una de les ampliacions. (C) Distribució de l'angle d'inclinació existent entre els eixos longitudinals de l'organela terminal (OT) i el cos cel·lular de la soca salvatge (WT) i el mutant MD-P3 (P3). L'angle s'ha mesurat a partir de 200 cèl·lules aïllades per a cada soca.

## 2.5. Anàlisi de la ultraestructura del mutant defectiu en MG218-s

Per últim, es va analitzar el citoesquelet de l'organela terminal de *M. genitalium* per microscòpia electrònica de transmissió. En aquest cas, es van créixer cèl·lules del micoplasma sobre reixetes de coure recobertes amb una fina capa de carboni. Per poder observar la ultraestructura al descobert es van sotmetre les cèl·lules a un breu tractament de lisi amb una solució amb  $0,5 \text{M}$  de KCl i  $0,5 \%$  de Triton X-100 i, a continuació, es van tenyir les mostres amb  $1 \%$  d'acetat d'uranil. D'aquesta forma, es van preparar mostres de la soca MD-P3 i de la soca salvatge.

En l'anàlisi de la ultraestructura del citoesquelet es van detectar tres conformacions diferents: assentat, corbat i triangular (Figura I.9). En el cas de la soca salvatge el  $55,2 \%$  de les estructures aïllades presenten la conformació d'assentat, on es pot identificar fàcilment les tres parts de la ultraestructura, que són el

botó terminal, l'eix central i el *wheel complex*. En aquesta conformació s'observa una doble curvatura de l'eix a la regió propera al *wheel complex*. La resta d'estructures analitzades no mostren aquesta doble curvatura de l'eix i les podem classificar en dos grups diferents. Per una banda, un petit percentatge presenta la conformació corbat, que és molt similar a la d'assentat, però la base de l'eix té una única curvatura poc pronunciada. I, per últim, s'ha determinat la conformació triangle ja que la ultraestructura té una forma que recorda un triangle isòsceles, on la base correspondria al *wheel complex*. Un cop definits aquests tres grups, es van analitzar mostres de ultraestructures aïllades a partir de cèl·lules de la soca MD-P3. En aquest cas es va trobar un nombre comparable d'estructures triangle, però s'observava un increment d'estructures corbades en detriment de les conformacions d'assentat. La soca salvatge presenta un 80 % de conformacions en assentat front un 20 % corbat, mentre que la soca MD-P3 presenta el 50 %, aproximadament, de cadascuna de les dues conformacions. Amb aquestes dades sembla que la diferència es donaria en el nivell d'estructuració de l'eix del citoesquelet de l'organela terminal.



**Figura I.9.** Visualització de l'estructura del citoesquelet de l'organela terminal de *M. genitalium* per tinció negativa després de llisar les cèl·lules amb una solució de 0,5 % Triton X-100 i 0,5 M KCl. Micrografies de microscòpia electrònica de transmissió de les tres conformacions del citoesquelet observades: assentat (A); corbat (B) i en triangle (C). Les tres parts de la ultraestructura s'han senyalat a la figura A, però totes 3 imatges estan en la mateixa orientació, i trobarem les tres parts en el mateix lloc: w, *wheel complex*; e, eix central; b, botó terminal. La fletxa senyala la doble curvatura que presenta l'eix central en la regió més propera al *wheel complex*. La barra d'augment indica 1  $\mu\text{m}$  a la imatge gran i a les ampliacions és de 100 nm. La taula recull la distribució percentual de les tres conformacions A-C, representades a les imatges, en la soca salvatge (WT) i la soca MD-P3 defectiva en proteïna MG218-s. Els asteriscs destaquen els valors estadísticament diferents entre les dues soques ( $p < 0,0001$ ).

### 3. Estudis de complementació amb el gen *mg218-s*

Amb l'objectiu de confirmar que el fenotip observat en el mutant MD-P3 és degut a la deficiència de proteïna MG218-s es va dur a terme un estudi de complementació, reintroduint a la soca defectiva una còpia del gen salvatge.

#### 3.1. Construcció del vector pMTncat

Per alliberar un gen en el genoma de *M. genitalium* de forma no dirigida, s'han utilitzat vectors suïcides portadors d'un minitransposó que produeixen insercions estables al genoma del micoplasma (Pich, Burgos, Ferrer-Navarro, *et al.*, 2006; Burgos *et al.*, 2006; Burgos *et al.*, 2008). Els minitransposons de que disposem per treballar amb *M. genitalium* deriven del transposó Tn4001 (Lyon *et al.*, 1984; Byrne *et al.*, 1989), que s'ha modificat de forma que el gen codificant per la transposasa, que és la proteïna de recombinació que facilitarà la transposició del fragment de DNA, queda exclosa de la regió del vector que s'insereix en el genoma del microorganisme i, així, s'aconsegueix que el punt d'inserció sigui estable. El



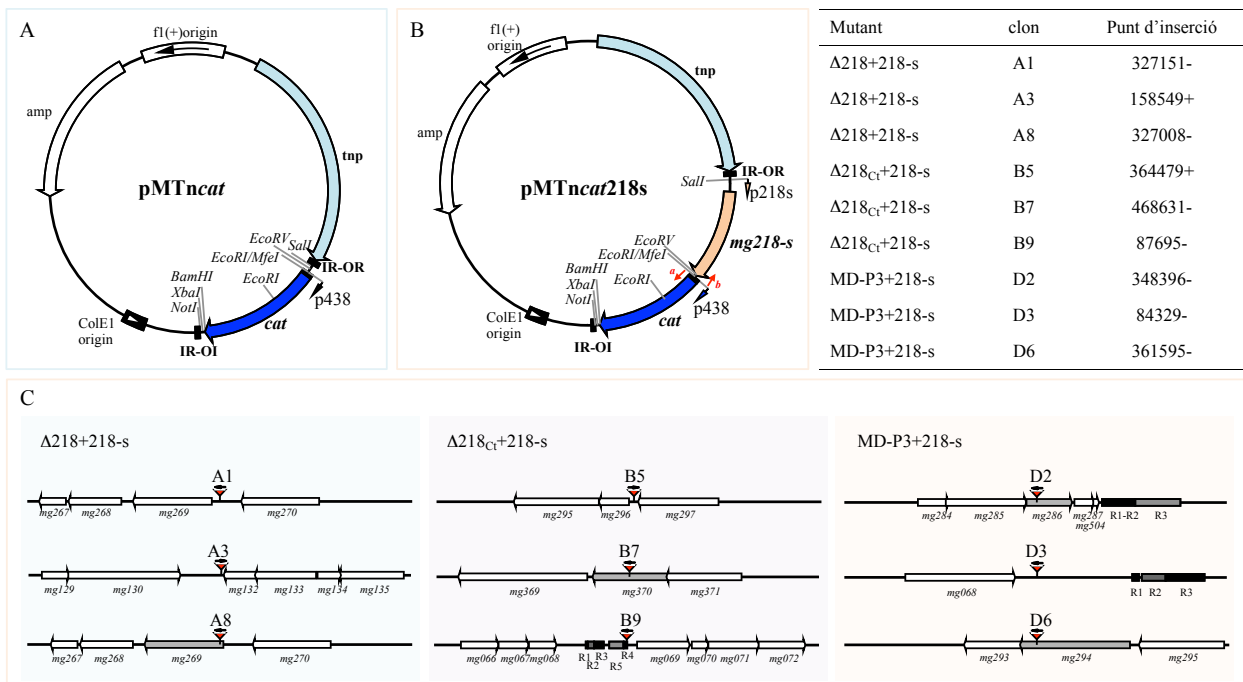
fragment que s'insereix en el genoma conté un gen marcador flanquejat per unes seqüències repetides i invertides, que fa servir la transposasa que produir la transposició.

Fins al moment, per fer modificacions genètiques a *M. genitalium* hem fet servir dos gens marcadors diferents, el gen de resistència a gentamicina o a tetraciclina. Per ampliar el ventall de gens marcadors a *M. genitalium*, es va desenvolupar un tercer minitransposó portador del gen de resistència a cloramfenicol<sup>1</sup>, ja que s'ha descrit la susceptibilitat d'aquest microorganisme a l'exposició d'aquest antibiòtic (Renaudin *et al.*, 1992; Algire *et al.*, 2009).

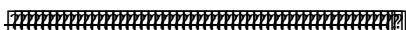
La seqüència codificant pel gen de resistència a cloramfenicol (*cat*, *chloramphenicol acetyltransferase*) es va amplificar per PCR a partir del vector pBB540 (Tomoyasu *et al.*, 2001). Per permetre l'expressió del gen a *M. genitalium*, es va acoblar la regió promotora del gen *mg438* d'aquest micoplasma a l'extrem 5' de la seqüència codificant del gen *cat*, com ja s'havia fet amb el gen de resistència a tetraciclina (Pich, Burgos, Planell, *et al.*, 2006). El fragment resultant, corresponent al gen modificat *catM438*, es va fer servir per substituir el gen de resistència a tetraciclina en el vector pMT*ntetM*, obtenint el vector pMT*ncat* (Figura I.10.A) (Calisto *et al.*, 2012).

### 3.2. Construcció del vector pMT*ncat*218s i assaig de complementació de la soca MD-P3

A partir del genoma de *M. genitalium* es va amplificar per PCR un fragment de 600 pb de l'extrem 3' del gen *mg218* que abasta el gen *mg218-s* juntament amb el promotor propi que s'ha descrit prèviament. Aquest fragment es va clonar en el vector pMT*ncat*, obtenint el vector pMT*ncat*218s (Figura I.10.B). Aquest vector es va fer servir per transformar per electroporació cèl·lules de la soca MD-P3 i les cèl·lules transformades es van seleccionar en presència de tetraciclina i cloramfenicol, tal com s'ha explicat prèviament. D'aquesta forma es van obtenir els mutants MD-P3+MG218s.



**Figura I.10.** Reintroducció d'una còpia salvatge del gen codificant per la proteïna MG218-s per transposició en diferents mutants defectius. (A) Esquema del vector pMT*ncat*, basat en el vector pMT*ntetM* (figura 4 de la introducció). La fletxa gran en angle recte indica la posició del promotor p438 davant del gen *cat*. (B) Esquema del vector pMT*ncat*218-s. S'ha indicat el promotor del



<sup>1</sup>Amb posterioritat al desenvolupament i ús d'aquest minitransposó (Calisto *et al.*, 2012), es va publicar un treball on els autors consideren que és el primer cop que es fa servir exitosament el gen de resistència a cloramfenicol per modificar genèticament *M. genitalium* (Burgos *et al.*, 2012).



gen *mg218-s* amb una altra fletxa gran en angle. Les fletxes vermelles a i b indiquen la posició i orientació dels encebadors utilitzats per amplificar la totalitat del vector i poder clonar el gen *mCherry*, obtenint el vector pMTncatF218sCh. indiquen la posició dels encebadors utilitzats en la PCR recombinant. (C) Taula i esquema dels punts d'inserció del minitransposó en cadascun dels mutants transformats amb pMTncat218-s. Els triangles invertits de color vermell indiquen el punt d'inserció del minitransposó i les fletxes associades indiquen el sentit de la inserció del minitransposó: →, cadena + i ←, cadena -. Els gens *mg269* i *mg286* estan anotats com a proteïna conservada hipotètica; el *mg370* correspondria a una sintasa de pseudouridina de la família RluA i el *mg294* és un possible MSF. A la taula s'ha especificat la posició dels punts d'inserció.

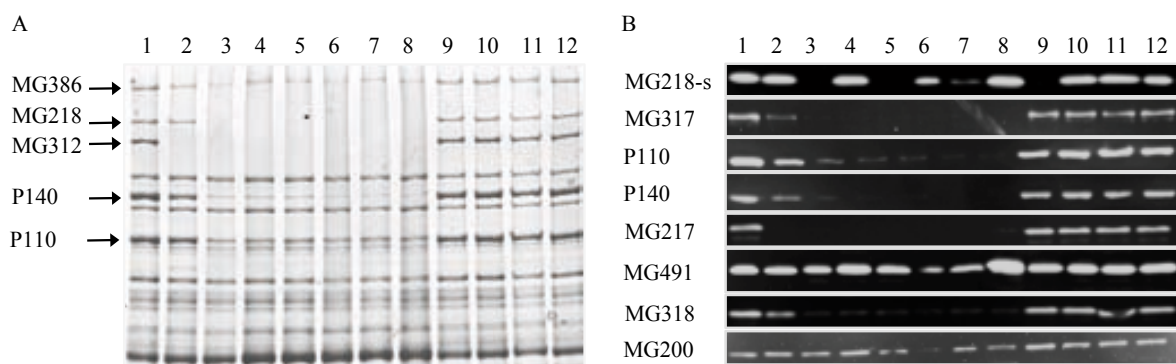
### 3.3. Estudi del fenotip dels mutants MD-P3+MG218-s

Dels diferents clons obtinguts en la transformació de la soca MD-P3 amb el minitransposó portador del gen *mg218-s*, se'n van seleccionar 3 de forma aleatòria per ser caracteritzats. Es tracta dels clons D2, D3 i D6. En primer lloc, per seqüenciació dirigida mitjançant l'encebador CmDown es va determinar el punt d'inserció del minitransposó en el genoma d'aquest mutants (Figura I.10.C) i amb l'encebador CmUp es va revisar la seqüència del fragment inserit en els genomes. D'aquesta forma, es va determinar que la inserció del transposó no va afectar cap gen prèviament relacionats amb l'organela terminal, amb l'única possible excepció del clon 8 de  $\Delta 218$ +MG218-s on el transposó interromp el gen *mg269*. Recentment s'ha demostrat que la proteïna codificada per aquest gen localitza a l'organela terminal tot i que encara es desconeix la seva funció. No obstant, aquest clon no s'ha fet servir en el posterior anàlisi. La seqüenciació dels fragments inserits al genoma va permetre descartar la introducció de mutacions o alteracions en la seqüència del gen *mg218-s* o del seu promotor durant el procés de transposició.

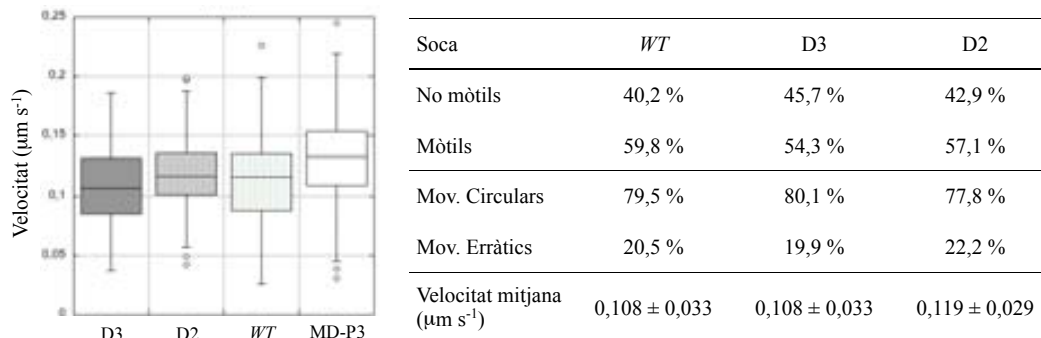
La reintroducció de la proteïna MG218-s en els mutants D1, D2 i D3 es va confirmar per Western blot amb un anticòs policlonal que reconeix la proteïna (Figura I.11.B). Aquest resultat va servir, no només per confirmar la recuperació de la proteïna en els mutants MD-P3, sinó també per confirmar la funcionalitat del promotor que s'havia descrit prèviament (Figura I.4).

El perfil proteic global dels mutants MD-P3+MG218-s així com la capacitat d'adherència analitzada mitjançant un assaig d'HA qualitativa no va revelar diferències amb la soca salvatge, igual que s'havia vist en l'anàlisi de la soca parental. Finalment, es va analitzar la motilitat de dos dels mutants MD-P3+MG218-s, els clons D2 i D3. En tots dos casos es va trobar que el percentatge de cèl·lules mòtils i la velocitat mitjana és estadísticament equivalent a la de la soca salvatge i també ho són els percentatges de cèl·lules mòtils que fan moviments erràtics (Figura I.12).

Aquests resultats suggereixen que hi ha complementació del fenotip defectiu de la soca MD-P3 amb la reintroducció de la proteïna MG218-s.



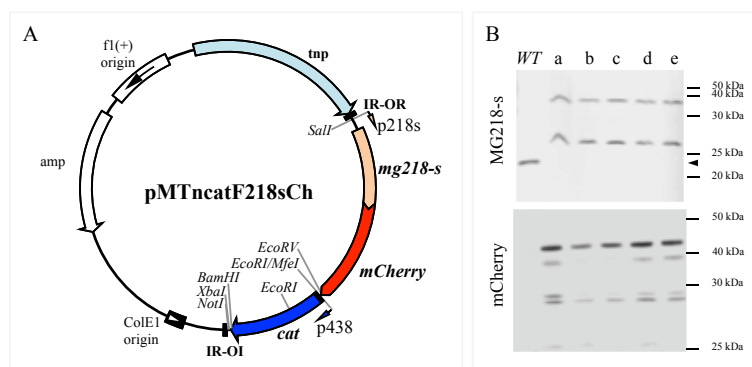
**Figura I.11.** Perfil proteic de la soca salvatge (1); i de les soques mutants C6 (Pich *et al.*, 2008) (2);  $\Delta 218$  clon 8 (Pich *et al.*, 2008) (3);  $\Delta 218$ + 218-s (clon A3) (4);  $\Delta 218_{Ct}tetM$  (5);  $\Delta 218_{Ct}tetM$ +218-s clons B9, B5, B7 (6-8); MD-P3 (9); i MD-P3+218-s clons D3, D2 i D6 (10-12) de *M. genitalium*. (A) SDS-PAGE 7.5 %. Les fletxes indiquen les bandes corresponents a proteïnes de l'OT. (B) Anàlisi per Western blot amb els anticossos anti-MG218<sub>Ct</sub> per identificar la proteïna MG218-s, anti-HMW3 (ortòleg MG317), anti-P110, anti-P140, anti-MG217, anti-P41 (ortòleg de MG491), anti-MG318 i anti-MG200.



**Figura I.12.** Estudis microcinematogràfics. Representació en caixes de la distribució de la velocitat de les cèl·lules mòtils de les soques complementades D2 i D3 i de la soca salvatge (*WT*) i de la soca MD-P3. Les dades resumides a la taula sobre les soques complementades D2 i D3 no són estadísticament diferents a les obtingudes per la soca salvatge (*WT*) (s’han obtingut  $p > 0,05$ ).

### 3.4. Localització de la proteïna MG218-s a *M. genitalium* per fluorescència

Finalment, tenint en compte la complementació del mutant MD-P3 amb la proteïna MG218-s, es va construir un nou minitransposó que permetria introduir una proteïna de fusió entre la proteïna MG218-s i la proteïna fluorescent mCherry (MG218-s::Ch) a la soca MD-P3 i permetria localitzar la proteïna MG218-s dins la cèl·lula.



**Figura I.13.** (A) Esquema del vector pMTncatF218sCh, derivat de pMTncatF218s (figura I.10.B). (B) Anàlisi per Western blot de l’expressió de la proteïna de fusió MG218-s::Ch amb anticossos contra la proteïna MG218-s i anti-mCherry en diferents clons (a-e) obtinguts en la transformació de la soca MD-P3 amb el vector pMTncatF218sCh. El cap de fletxa senyala la banda corresponent a la proteïna MG218-s a la mostra de la soca salvatge (*WT*).

El minitransposó portador de la proteïna de fusió en qüestió, es va obtenir a partir del vector pMTncat218s (Figura I.10.B), que es va modificar per incloure el gen codificant per la proteïna mCherry, de forma que quedava fusionat a l’extrem 3’ del gen *mg218-s*, al que s’havia suprimit el codó de *stop* pertinent. El vector resultant, pMTncatF218sCh (Figura I.11.A), es va fer servir per transformar novament la soca MD-P3 i, d’aquesta forma obtenir mutants MD-P3 complementats amb la proteïna de fusió MG218-s::Ch. No obstant, es va analitzar l’expressió de la proteïna de fusió en 5 clons diferents obtinguts en aquesta transformació i, en tots els casos, es va trobar que aquesta es degrada. Per Western blot amb anticossos contra la proteïna MG218-s es detecten dos fragments, de mida inferior a l’esperada per la proteïna de fusió (aproximadament 50 kDa), indicant que la proteïna de fusió no és estable (Figura I.11.B). Per Western blot amb un anticòs anti-mCherry es va confirma la degradació de la proteïna de fusió expressada (Figura I.13.B). D’aquesta forma, es descarta determinar la localització subcel·lular de la proteïna MG218-s a partir de l’estudi per fluorescència d’aquests mutants.

### 3.5. Estudi de l’efecte de la reintroducció de la proteïna MG218-s en diferents mutants defectius en la proteïna

Fins al moment ens hem centrat en l’estudi de la soca MD-P3 que és defectiva únicament en proteïna MG218-s. No obstant, existeixen dues soques més que també són defectives en proteïna MG218-s, però

també són defectives en proteïna MG218. Es tracta de les soques  $\Delta 218_{Ct}$  i  $\Delta 218$ . Com hem vist més amunt, va ser una sorpresa que tant la deleció del gen *mg218* com la deleció únicament del fragment 3' d'aquest mateix gen produís el mateix efecte en el fenotip de les soques resultants. Amb anterioritat s'havia estudiat el fenotip de soques que expressaven una versió truncada de la proteïna MG218, com el mutant C6, i els fragments amino-terminal de la proteïna eren estables. Ara bé, aquests mutants expressaven també la proteïna MG218-s, a diferència de la soca  $\Delta 218_{Ct}$ , suggerint que la proteïna MG218-s podria tenir un paper en l'estabilització del fragment truncat de la proteïna MG218.

Per estudiar aquesta última hipòtesi es va reintroduir la proteïna MG218-s en les soques  $\Delta 218$  i  $\Delta 218_{Ct}tetM$ , aquesta última sent equivalent a la soca  $\Delta 218_{Ct}$ , però conté el gen de resistència *tetM438*. D'aquesta forma totes les soques de partida serien portadores del mateix gen de resistència. Amb el vector pMTncat218s es van transformar per electroporació cèl·lules d'aquestes dues soques que també són defectives en proteïna MG218-s. Les cèl·lules transformades amb el minitransposó es van seleccionar en presència de tetraciclina i cloramfenicol, com hem descrit abans. D'aquesta forma, es van obtenir els mutants  $\Delta 218+MG218-s$  i  $\Delta 218_{Ct}tetM+MG218-s$ . De cadascuna de les transformacions es van seleccionar aleatòriament 3 clons i es van determinar els punts d'inserció del minitransposó en el genoma de cada mutant (Figura I.10.C). En la majoria dels casos es va determinar que el transposó s'ubicava en regions intergèniques i en cap cas es va trobar que el minitransposó afectes cap dels gens relacionat amb l'estructura de l'organela terminal.

Per Western blot amb un anticòs contra la proteïna MG218-s es va constatar la reintroducció de la proteïna en les soques transformades amb el minitransposó (Figura I.11.B). Ara bé, en l'anàlisi del perfil proteic per SDS-PAGE d'aquests nous mutants en comparació amb la seva corresponent soca parental no es van detectar diferències. En els perfils proteics obtinguts per SDS-PAGE és clara l'absència de la banda corresponent a la proteïna MG218 en tots els casos. No obstant, es va realitzar un Western blot amb un anticòs policlonal específic contra la proteïna MG218 amb que no es va detectar cap traça de la proteïna en cap dels mutants (dada no mostrada). Els nivells d'expressió de les diferents proteïnes de l'organela terminal es van analitzar mitjançant l'estudi dels perfils proteics en SDS-PAGE i per Western blot amb anticossos específics contra cadascuna d'elles i en cap cas es van restaurar els nivells d'expressió de cap de les proteïnes absents en els clons parentals (Figura I.11). Aquests resultats indiquen que la reintroducció de la proteïna MG218-s per si sola no permet establir cap de les proteïnes de l'organela terminal que es perden degut a l'absència de proteïna MG218 i que tampoc permet recuperar l'estabilitat del fragment amino-terminal de la proteïna MG218 que esperaríem trobar en els mutants  $\Delta 218_{Ct}tetM$ .

## Discussió

La proteïna MG218 de *M. genitalium* és l'element principal de l'eix central del citoesquelet de l'organela terminal i té un paper central en la seva formació. És interessant el descobriment de que el gen *mg218* que codifica aquesta proteïna de 220 kDa, també codifica una petita proteïna d'aproximadament 23 kDa, que s'ha anomenat MG218-s. La proteïna MG218-s es va identificar recentment mitjançant western blot amb un anticòs policlonal contra la regió carboxi-terminal de la proteïna MG218. La presència d'aquesta proteïna en mutants de *M. genitalium* amb insercions de transposó en el locus *mg\_218* va demostrar que aquesta proteïna havia de ser producte d'una traducció interna del gen.

La presència de gens que se solapen és un tret comú dels genomes de virus. En el món bacterià és comú trobar gens amb els seus extrems sobreposats, però la presència de gens que se solapen totalment és un fenomen rar (Ellis and Brown, 2003). A principis dels 2000' es va descriure el solapament total dels gens *rpmH* i *rnpA* a *Thermus thermophilus*. Aquests dos gens, que codifiquen per la proteïna ribosomal L34 i

la RNasa P respectivament, són transcrits en un únic policistró en molts bacteris, però el solapament dels dos gens a *T. thermophilus*, suggereix un nou sistema de regulació de l'expressió (Feltens *et al.*, 2003). No obstant, aquest cas descrit a *T. Thermophilus* no presenta similitud amb el cas de *M. genitalium*. El solapament del gen *mg218* i el gen que codifica per la proteïna MG218-s a *M. genitalium* podria ser conseqüència de l'origen del reduït genoma del micoplasma per un procés d'evolució regressiva, però és sorprenent que aquests dos gens no només estan totalment solapats sinó que també comparteixen el marc de lectura, de forma que la proteïna MG218-s comparteix seqüència aminoacídica amb l'extrem carboxi-terminal de la proteïna MG218. La creació de noves proteïnes es pot originar per duplicació, fusió o fissió de seqüències codificants existents (Rancurel *et al.*, 2009), pel que sembla raonable pensar que el solapament d'aquests gens tingui origen en la fusió en fase de dos gens ancestrals, però de totes formes, la pregunta més important és per què s'ha conservat aquesta proteïna? Quina és la funció de la proteïna MG218-s?

A *M. pneumoniae* també s'ha identificat una proteïna de característiques similars a la proteïna MG218-s. En aquest cas es tracta d'una proteïna de 25 kDa que comparteix seqüència amb l'extrem carboxi-terminal de la proteïna HMW2, homòloga a la proteïna MG218 de *M. genitalium*. Aquesta proteïna anomenada P28 o HMW2-s és l'únic ortòleg que es coneix fins al moment de la proteïna MG218-s de *M. genitalium*. La presència d'aquesta proteïna en les dues espècies emfatitza la seva possible importància.

La proteïna HMW2-s de *M. pneumoniae* va ser identificada molt abans que la proteïna MG218-s i fa temps que s'especula sobre la seva possible funció. A partir dels estudis realitzats a *M. pneumoniae*, s'ha proposat un model sobre la formació del citoesquelet de l'organela terminal on la proteïna HMW2-s podria tenir un paper en l'estructura de l'eix d'aquest citoesquelet, juntament amb la proteïna HMW2, però és una hipòtesi purament especulativa, com diuen els mateixos autors (Balish, Santurri, *et al.*, 2003). La impossibilitat d'obtenir un mutant de *M. pneumoniae* defectiu en proteïna HMW2-s sense afectar l'expressió de la proteïna HMW2 dificulta l'estudi de la funció d'aquesta proteïna HMW2-s *in vivo* i, fins al moment, només s'ha pogut descartar que la seva funció estigui relacionada amb la citadherència del micoplasma (Fisseha *et al.*, 1999; Balish, Ross, *et al.*, 2003).

Per aprofundir en l'estudi de la funció d'aquesta petita proteïna caldria disposar d'un mutant que sintetitzes la proteïna HMW2 *full-length*, però no la proteïna HMW2-s. Ara bé, no es disposa de cap mutant de *M. pneumoniae* amb aquestes característiques ni de les eines de manipulació genètica necessàries per fer modificacions dirigides en el genoma d'aquest micoplasma. És per això que *M. genitalium* s'erigia com el millor candidat per poder estudiar la funció d'aquesta petita proteïna conservada en aquestes dues espècies de micoplasma. Tot i així, les dificultats per l'obtenció d'un mutant d'aquestes característiques, donat el solapament existent entre dos gens en qüestió, són evidents. Per poder superar aquest problema, en aquest treball, s'ha desenvolupat un nou sistema per introduir mutacions puntuals en el genoma de *M. genitalium* que ha permès suprimir l'expressió de la proteïna MG218-s, mitjançant la mutació de la seqüència del gen *mg218*, de forma que es preservava l'expressió de la proteïna MG218. D'aquesta forma s'ha obtingut el mutant defectiu únicament en proteïna MG218-s que s'esperava. Aquest seria el primer cop que s'ha generat un mutant de *M. genitalium* amb aquestes característiques.

Per aconseguir suprimir l'expressió de la proteïna MG218-s, s'ha tingut en compte l'estudi de l'expressió de la proteïna HMW2-s i la caracterització del seu promotor associat, en que es va descriure que la substitució del codó ATG d'inici de traducció de la proteïna HMW2-s a *M. pneumoniae* per un triplet ATT abolia la seva expressió (Boonmee *et al.*, 2009). A diferència de la proteïna HMW2-s, que s'havia pogut descriure el seu extrem amino-terminal (Boonmee *et al.*, 2009), del seu ortòleg MG218-s a *M. genitalium* no es coneixia el seu inici de traducció. Davant del desconeixement de l'inici de traducció de

la proteïna MG218-s dins de la seqüència del gen *mg218*, va ser necessari comprovar l'efecte de la mutació de tres codons ATG diferents dins de la seqüència del gen sobre l'expressió de la proteïna MG218-s. Dels tres candidats es va comprovar que només en el cas de mutar el codó ATG que codifica la *Met1615* de la proteïna MG218 provocava una disminució dràstica dels nivells d'expressió de la proteïna MG218-s, suggerint que aquest era el codó d'inici de traducció de la proteïna. Reforçant aquest resultat, per *primer extension*, es va determinar que hi havia un inici de transcripció situat 5 pb *upstream* d'aquest codó ATG determinat i una distància de 9 pb d'una caixa -10 que indicaria la presència d'un promotor davant de l'inici de transcripció. Aquest mateix resultat descartava els altres dos codons ATG candidats, perquè l'inici de transcripció determinat se situava *downstream* respecte aquests dos codons ATG. És cert, que el resultat obtingut en l'anàlisi per *primer extension* es basava en una senyal molt dèbil, que podria ser indicador de reduïts nivells d'expressió del transcrit o de problemes en la manipulació de la mostra, però el control positiu que es va fer en paral·lel va sortir bé i es va obtenir el mateix resultat per duplicat. D'altra banda, la comparació d'aquests resultats obtinguts a *M. genitalium* amb *M. pneumoniae*, trobem una elevada similitud de seqüència en la regió amino-terminal de les proteïnes MG218-s i HMW2-s, així com una identitat total dels 30 pb *upstream* a l'inici de traducció de les mateixes, que inclou la regió -10 del promotor proposat i es diferencien just abans de la regió -35 del mateix, que en general no està conservat a *M. pneumoniae* i *M. genitalium* (Weiner III *et al.*, 2000; Lluch-senar *et al.*, 2007; Güell *et al.*, 2009). Finalment, cal afegir que a partir dels estudis de complementació del mutant defectiu en proteïna MG218-s, s'ha pogut comprovar que la reintroducció del fragment de 600 pb de l'extrem 3' del gen *mg218*, s'ha comprovat que conté un promotor funcional que permet l'expressió de la proteïna MG218-s, com s'ha demostrat per western blot amb un anticòs policlonal contra la proteïna.

Un cop identificat el codó d'inici de traducció es va poder constatar que la supressió de l'expressió de la proteïna MG218-s, no s'aconseguia amb l'única substitució d'aquest codó. Aquest efecte es va observar tant si es mutava el codó ATG pel triplet CTA com pel triplet TCA, però en cap dels dos casos es va aconseguir abolir completament l'expressió de la proteïna. D'altra banda, la mutació de la caixa -10 del promotor associat a l'expressió de la proteïna, també permetia l'expressió de nivells molt reduïts de proteïna. L'abolició de l'expressió de la proteïna, o si més no la seva reducció a nivells no detectables per Western blot, només es va aconseguir amb la mutació simultània del codó corresponent a la *Met1615* i la caixa -10 del promotor associat o alternativament també es va aconseguir la supressió de l'expressió de la proteïna al mutar simultàniament els codons *Met1615* i la *Leu1620*. Aquest resultat semblen suggerir que la traducció de la proteïna es pot estar produint amb una eficiència molt menor a partir d'un codó d'inici de traducció alternatiu, com és el cas del codó TTG de la *Leu1620*. Això suposaria la pèrdua de tan sols 5 aa de l'extrem amino-terminal de la proteïna, i amb les tècniques utilitzades per identificar la proteïna no es podrien diferenciar les dues versions de la proteïna. D'altra banda, ha estat més sorprenent que la modificació realitzada a la caixa -10 del promotor, encara permeti l'expressió d'uns nivells mínims de la proteïna. L'anàlisi de la seqüència davant del gen *mg218-s* no ha revelat la presència de cap seqüència RBS coneguda que indiqui que es podria produir la traducció a partir de la transcripció del gen *mg218*, pel que segurament tot i la mutació en el promotor s'està produint uns mínims de transcripció. El fenomen de *leaking* de l'expressió d'aquesta proteïna és força intrigant, però caldrà estudiar la transcripció d'aquesta regió per aclarir quin és el seu origen o la causa que el produeix. No obstant, donat que l'objectiu en que es centrava aquest treball era en la funció de la proteïna, aquesta pregunta queda oberta.

Dels diferents mutants obtinguts en aquest treball es va seleccionar el mutant MD-P3, amb la doble mutació del promotor i el codó *Met1615*, com a model d'estudi per a la caracterització del fenotip d'una soca defectiva en proteïna MG218-s, perquè es va demostrar en l'anàlisi per Southern blot que presentava la doble recombinació esperada. En absència de la proteïna MG218-s, però en presència de la proteïna

MG218, el perfil proteic de les cèl·lules mutants no mostrava diferències respecte la soca salvatge i en les avaluacions específiques de l'expressió de les proteïnes relacionades amb l'organela terminal no es van trobar deficiències d'expressió en cap cas. La soca MD-P3 presentava nivells d'expressió normals de les adhesines i les cèl·lules analitzades per microscòpia electrònica de rastreig presentaven organelles terminals *bona fide*. En concordança amb aquests resultats, en l'anàlisi qualitatiu de la capacitat d'HA tampoc es van observar diferències amb la soca salvatge. Tots aquests resultats indiquen que la proteïna MG218-s, a diferència de la proteïna MG218, no està implicada en l'estabilitat de cap dels elements que formen part de l'organela terminal ni amb la citadherència de *M. genitalium*, de forma equivalent al que s'havia descrit a *M. pneumoniae*, en que van descartar la participació de la proteïna HMW2-s en la citadherència del micoplasma (Fisseha *et al.*, 1999).

Com hem dit, es va analitzar la morfologia de les cèl·lules de la soca MD-P3 per microscòpia electrònica de rastreig i aquestes a simple vista no eren distingibles de les cèl·lules de la soca salvatge. No obstant quan es mesura l'angle que es forma entre els eixos longitudinals que travessen l'organela terminal i el cos cel·lular, el mutant defectiu en proteïna MG218-s presenta un angle mitjana que és estadísticament significativament major que l'obtingut en l'anàlisi de la soca mutant. Aquest resultat és consistent amb els resultats obtinguts en els estudis microcinematogràfics, on les cèl·lules de la soca mutant presenten un increment significatiu del percentatge de cèl·lules que realitzen moviments erràtics i també s'aprecia un increment significatiu del diàmetre mitjana descrit en els patrons de moviment circulars. La similitud entre aquests resultats i els que s'han descrit pel mutant  $\Delta 217$  (Burgos *et al.*, 2008), podria suggerir un possible rol cooperatiu entre les proteïnes MG217 i MG218-s.

L'anàlisi de la soca defectiva en proteïna MG217 va demostrar el paper de l'organela terminal com a timó del moviment del micoplasma, però, de manera més important, per primer cop es descrivia un element que podria estar implicat en la regulació de la direcció del moviment, possiblement variant l'angle de curvatura de l'organela terminal (Burgos *et al.*, 2008). Les cèl·lules de la soca MD-P3 també presenten una variació de l'angle mitjana de curvatura de l'organela terminal respecte el cos cel·lular, però la diferència d'aquest angle respecte l'observat amb les cèl·lules de la soca salvatge només representa un increment de 15°, que dista considerablement de l'increment de 40° observat en el cas del mutant defectiu en MG217. Per estudiar la possible relació de la proteïna MG218-s amb la curvatura de l'organela o en la seva estructura es va procedir a analitzar la conformació del citoesquelet de les cèl·lules. Gràcies a que la ultraestructura del citoesquelet és resistent al tractament amb Triton X-100 (Meng and Pfister, 1980; Gobel *et al.*, 1981; Hatchel and Balish, 2008), es va aprofitar aquesta propietat per estudiar per tinció negativa i microscòpia electrònica de transmissió la ultraestructura del citoesquelet al descobert després de llisar les cèl·lules amb una solució al 1 % de Triton X-100. La conformació majoritària de la ultraestructura té una lleugera forma de essa, que hem anomenat assentada per simplificar. Aquesta és la forma característica que es pot observar clarament la diferència entre les tres parts que la conformen: el botó terminal, l'eix i el *wheel complex complex*. No obstant, també s'han observat dues conformacions més, la corbada i en triangle. Tant en l'anàlisi realitzat amb cèl·lules de la soca MD-P3 com amb la soca salvatge es van trobar exemples de ultraestructures en les tres conformacions possibles. Ara bé, en el cas de la soca mutant es va trobar un increment significatiu d'unitats amb conformació corbada que anava acompanyada de la disminució d'unitats en conformació assentada, en comparació amb els percentatges observats amb la soca salvatge. La diferència entre la conformació assentada i corbada es troba en la complexitat de l'estructuració de la base de l'eix o la regió més pròxima al *wheel complex*. Aquest resultat suggeriria que la proteïna MG218-s podria participar en l'estructuració d'aquesta regió de l'eix, tot i que no seria imprescindible per aconseguir la correcta estructuració de la doble curvatura de l'eix.

Per poder confirmar si la proteïna MG218-s intervé en l'estructura de l'eix, caldria poder fer una localització subcel·lular positiva d'aquesta proteïna en la regió proximal de l'organela, però tot i que en aquest treball s'ha intentat, no s'ha pogut determinar la localització de la proteïna. No obstant, que la proteïna MG218-s pugui intervenir en l'estructuració d'un dels extrems de l'eix del citoesquelet estaria en la mateixa línia que la proposta que s'ha fet sobre la possible col·laboració de la proteïna HMW2-s en el plegament de la proteïna HMW2 en la formació de l'eix de la ultraestructura. En els estudis realitzats a *M. pneumoniae*, s'ha proposat que la proteïna HMW2-s podria tenir un paper en l'estructura de l'eix del citoesquelet de l'organela terminal, juntament amb la proteïna HMW2, però és una hipòtesi purament especulativa, com diuen els mateixos autors (Balish, Santurri, *et al.*, 2003). A partir de l'anàlisi de la seqüència de la proteïna HMW2 s'ha proposat que aquesta està formada majoritàriament per hèlix  $\alpha$  i també existeixen evidències de la dimerització amb ponts disulfur d'aquesta proteïna, de forma que els dímers podrien estructurar-se en forma d'hèlix superenrotllada discontinua, que recordaria una cadena flexible (Stevens and Krause, 1990; Krause *et al.*, 1997). En base a aquestes prediccions d'estructura, es proposa que l'hèlix superenrotllada de la proteïna HMW2 es podria disposar de forma longitudinal, amb l'extrem amino-terminal ocupant la regió més distal al cos cel·lular, formant l'eix de la ultraestructura de l'organela terminal i les interrupcions del superenrotllament podrien conferir la flexibilitat predita de l'estructura, involucrada en motilitat i en divisió cel·lular. És cert també, que en les prediccions sobre l'estructura de la superhèlix, també han proposat dues regions, ambdues en la regió carboxi-terminal de la proteïna HMW2, que podrien estar formant una superhèlix trivalent i proposen que la proteïna HMW2-s podria participar en la formació d'aquesta triple hèlix (Balish, Santurri, *et al.*, 2003). En el cas de la proteïna MG218 no s'ha fet cap predicció de superhèlix trivalent, però de forma purament especulativa, aquestes dues regions amb predicció de triple hèlix podrien correspondre amb les dues curvatures observades en l'estructura, ja que podrien la triple hèlix podria trencar el patró lineal del dúplex helicoidal. En absència de la proteïna MG218-s podria ser l'extrem carboxi-terminal de MG218 qui suplís la seva funció, de forma que es podria explicar la presència d'estructures en conformació assentada.

És difícil encaixar les peces amb tots els resultats obtinguts. Sembla que l'increment observat en l'angle de curvatura mitjana de l'organela terminal respecte el cos cel·lular s'hauria d'explicar amb la pèrdua de la doble curvatura de l'eix en favor d'una curvatura única, però intuïtivament si l'eix perd una de les curvatures esperaríem una disminució de l'angle i no al revés. Aquesta hipòtesi, implicaria també que la tercera conformació observada és en realitat una visió lateral de la ultraestructura i és la mateixa tant si té conformació assentada com corbada en de perfil frontal. Una altra forma d'interpretar les tres conformacions, potser és una mica arriscada, però seria de forma seqüencial amb el temps. S'ha descrit que per la duplicació del micoplasma, cal que es produeixi una duplicació coordinada de l'organela terminal i els pocs treballs publicats al respecte indiquen que el citoesquelet es començaria a duplicar pel cantó més distal al cos cel·lular, com es pot apreciar en imatges de microscòpia electrònica publicades on es veu l'eix del citoesquelet bifurcat i cadascuna de les bifurcacions acabada amb una estructura en forma de botó terminal (Hegermann *et al.*, 2002; Nakane and Miyata, 2009). En canvi, no tenim imatges on es pugui apreciar si l'eix del citoesquelet s'obre com una cremallera des de la regió més distal a la més proximal o com es produeix la seva duplicació. A partir de l'estudi de les imatges de la ultraestructura que hem realitzat en aquest treball, podem formular una hipòtesi al respecte. En aquest cas, les tres conformacions observades es correspondrien amb modificacions temporals de la seva estructura degut a la duplicació de l'eix, que s'iniciaria amb la desestructuració de la doble curvatura de la base de l'eix i es desplegaria fins al botó terminal, adquirint la forma de triangle, pas previ a la duplicació del botó terminal i la formació de la segona organela terminal en una cèl·lula en divisió. Amb aquesta hipòtesi, s'interpreta que la base de l'eix en la conformació que hem anomenat corbat, en realitat s'hauria d'entendre com un engruiximent per desestructuració de la base, que podria explicar millor l'augment de l'angle de

l'organela. Val a dir que se segueix suggerint que la proteïna MG218-s tindria un paper en l'estructura de la base de l'eix, però no seria imprescindible. D'aquesta forma, la implicació de la proteïna MG218-s en la motilitat seria de forma indirecte, degut a la seva participació en l'estructura del citoesquelet de l'organela terminal.

Amb els resultats obtinguts de l'estudi de la soca defectiva en proteïna MG218-s, no s'ha trobat una funció que justifiqui la conservació d'aquesta proteïna. No obstant, en aquest treball es va obtenir un altre mutant defectiu en proteïna MG218-s amb un fenotip que va resultar sorprenent. Es tracta del mutant  $\Delta 218_{Ct}$ , que es va generar com a pas previ de l'obtenció dels mutant amb les mutacions puntuals.

El sistema dissenyat per la introducció de mutacions puntuals en el genoma de *M. genitalium* està basat en la generació de mutants per substitució gènica, però en aquest cas es produïa un intercanvi entre un fragment original del genoma del micoplasma per una versió modificada del mateix, en el que s'han generat prèviament les mutacions puntuals desitjades per mutagènesis dirigida. Es va optar per fer la substitució del fragment en dos passos de recombinació, perquè donada l'elevada identitat entre els dos fragments que es volien intercanviar es va creure que així es podria augmentar l'eficiència d'introducció de les mutacions. La senzillesa de l'estratègia en dues etapes es va eclipsar quan es va aplicar la tècnica per substituir l'extrem 3' del gen *mg218*, que conté la totalitat del gen codificant per la proteïna MG218-s. La deleció, en el primer pas de l'estratègia, d'un fragment de 800 pb de l'extrem 3' del gen *mg218*, dóna lloc a un mutant molt refractari a la transformació per doble recombinació. Aquest fenomen ja s'havia observat experimentalment en el laboratori. Sembla que els mutants amb defectes en l'expressió de les adhesines, com és el cas del mutant  $\Delta 218_{Ct}$ , presenten eficiències de transformació inferiors a la de la soca salvatge, segurament per l'elevada formació de cenòcits o sincitis cel·lulars en aquests mutants. Aquest fet ha perjudicat l'eficiència de transformació del segon pas de l'estratègia i ha dificultat l'obtenció de clons amb la doble recombinació esperada per cadascuna de les mutacions puntuals assajades. Tot i així, l'ús d'aquesta tècnica ha permès identificar l'inici de traducció de la proteïna i l'obtenció del mutant defectiu en la proteïna MG218-s que hem pogut caracteritzar.

La deleció d'un fragment de l'extrem 3' del gen *mg218* s'esperava que donés lloc a un mutant de característiques similars als mutants de *M. genitalium* amb insercions de transposó en el locus *mg\_218*. Aquests mutants, com el cas del clon C6, expressen fragments truncats de la proteïna MG218, que són estables i que els permet la formació d'organelles terminals de menor envergadura al mateix temps que presenten deficiències lleus de motilitat (Pich *et al.*, 2008). En canvi, al caracteritzar el mutant  $\Delta 218_{Ct}$  es va trobar un fenotip similar al mutant defectiu total,  $\Delta 218$  (Pich *et al.*, 2008), però amb l'agreujament de la pèrdua de la proteïna MG491. No obstant, es va demostrar que la diferència entre aquests dos fenotips era deguda a l'ús de diferents marcadors de selecció en la generació dels mutants. Sembla que l'ús del gen de resistència a tetraciclina *tetM438* permetia mantenir l'expressió dels gens que es troben *downstream* al lloc on s'ha produït la substitució gènica, ja sigui perquè el promotor *mg438* associat al gen de resistència permetia la transcripció d'aquests gens o per la presència d'un possible promotor en l'extrem 3' del mateix gen, ja que s'ha pogut identificar una seqüència que correspondria amb la caixa -10 d'un promotor. En canvi, quan s'ha utilitzat el gen marcador amb la resistència a gentamicina, tot i que també s'ha descrit la presència d'un promotor en la regió 3' del fragment, no s'ha pogut mantenir l'expressió dels gens *downstream* i, per això, es produïa la pèrdua de la proteïna MG491. Aquest resultat posa en relleu també, que la presència del promotor associat a l'expressió de la proteïna MG218-s també està permetent l'expressió dels gens *mg491* i *mg219* en els mutants que tenen insercions de transposó en el gen *mg218* i, per tant, interrompent la transcripció dels gens de l'operó on es troba aquest gen.

Tot i la substitució del gen de resistència a gentamicina pel gen de resistència a tetraciclina, el fenotip del mutant  $\Delta 218_{Ct}tetM$  era equivalent al defectiu total  $\Delta 218$ . Així, la deleció del fragment 3' del gen era la



responsable del fenotip. La diferència clara entre aquest mutant  $\Delta 218_{C_t tetM}$  i el mutant C6 era la pèrdua de la proteïna MG218-s. Amb aquest resultat semblava que la proteïna MG218-s podria estar ajudant a estabilitzar els fragments amino-terminals de la proteïna MG218, que s'expressaven en els mutants per transposició com el C6. L'estudi de complementació del mutant MD-P3 amb una còpia salvatge del gen que codifica la proteïna MG218-s introduïda per transposició, va demostrar que el promotor associat a l'expressió d'aquest gen és plenament funcional. Aprofitant aquest fet, es va reintroduir la proteïna MG218-s en els mutants  $\Delta 218$  i  $\Delta 218_{C_t tetM}$  per transposició. En el primer cas, la proteïna MG218-s, en absència de la proteïna MG218, no és capaç de corregir els efectes pleiotròpics causats per la falta de la proteïna MG218 i aquest resultat concorda perfectament amb les observacions fetes en l'estudi del mutant MD-P3. La reintroducció de la proteïna MG218-s en el mutant  $\Delta 218_{C_t tetM}$  tampoc va permetre estabilitzar i recuperar el fragment amino-terminal de la proteïna MG218 i, per tant, també la recuperació de cap de les altres proteïnes de l'organela terminal, com s'havia hipotetitzat a partir del fenotip dels mutants per transposició. Si la proteïna MG218-s interacciona amb la proteïna MG218, només serà en la regió carboxi-terminal, absent en aquests mutants. Aquesta conclusió reforçaria la hipòtesi de que la proteïna MG218-s intervingui només es la estructuració d'una regió concreta de l'eix de la ultraestructura format per la proteïna MG218.

I, finalment, només queda especular que l'estabilitat dels fragments amino-terminal de la proteïna MG218 que s'observen en els mutant obtinguts per transposició, es degui a la presència d'un altre fragment carboxi-terminal d'aproximadament 115 kDa que es va identificar també en aquests mutants (Pich *et al.*, 2008) i que no hem detectat en el mutant  $\Delta 218_{C_t tetM}$ .

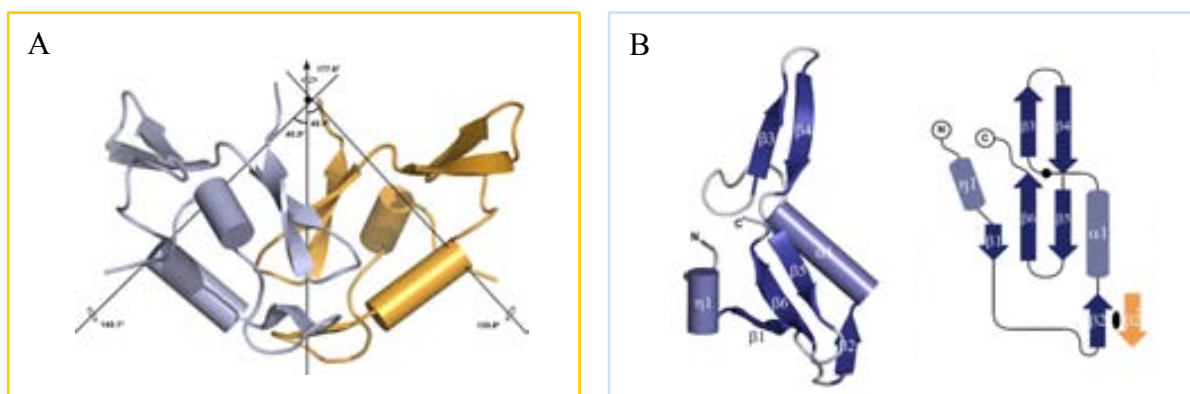


## Capítol II. Estudi de la funció del domini de la caixa EAGR a la proteïna MG200 de *M. genitalium*

### Introducció

L'organela terminal (Henderson and Jensen, 2006; Seybert *et al.*, 2006) no només atorga la morfologia característica en forma de pera a *M. genitalium*, sinó que també té un paper central en funcions essencials per la virulència d'aquest microorganisme, com per exemple l'adherència a la cèl·lula hoste. Una altra d'aquestes funcions és la de motilitat per lliscament que està directament implicada en patogenicitat, donada la seva relació amb la capacitat de colonització de la cèl·lula hoste i la seva disseminació (Kirchhoff *et al.*, 1984; Jordan *et al.*, 2007). Aquesta habilitat de *M. genitalium* per desplaçar-se sobre superfícies sòlides depèn de la capacitat d'adhesió sobre les mateixes. El fet que aquestes dues propietats estiguin estretament lligades ha dificultat la identificació de gens i proteïnes que poguessin estar únicament vinculades al mecanisme de motilitat, qüestionant l'existència de mecanismes independents per aquestes dues propietats.

En un estudi previ del laboratori, es va dissenyar un nou sistema de selecció de mutants deficientes en motilitat generats en un assaig de mutagènesi per transposició (Pich, Burgos, Ferrer-Navarro, *et al.*, 2006). Donat que la tècnica de cultiu utilitzada en aquest sistema requeria un pas previ d'adhesió de les cèl·lules a una superfície sòlida, aquest treball va permetre la identificació de dos gens, *mg200* i *mg386*, involucrats en la maquinària de motilitat, però no amb l'adherència de *M. genitalium*. Les proteïnes MG200 i MG386, vinculades a l'expressió d'aquest dos gens, tenen diverses característiques en comú, de les quals és de destacar la presència de caixes EAGR (Balish *et al.*, 2001). Aquest motiu altament conservat, ric en aminoàcids aromàtics i glicines, sembla ser exclusiu de proteïnes relacionades amb la motilitat de micoplasma. Concretament, només s'han identificat caixes EAGR en les proteïnes MG200, MG386 i MG312 de *M. genitalium* o en els seus ortòlegs corresponents a *M. pneumoniae* (MPN119, MPN567 i MPN447) i a *M. gallisepticum* (MGA1228, MGA0205 i MGA0306), que formen part del mateix grup filogenètic que *M. genitalium* (Dybvig and Voelker, 1996).



**Figura II.1.** Estructura cristal·logràfica a resolució atòmica del domini de la caixa EAGR de la proteïna MG200 de *M. genitalium*. Estructura del dímer (A) i del monòmer (B). Figura modificada de (Calisto *et al.*, 2012).

Recentment, s'ha pogut determinar l'estructura cristal·logràfica a resolució atòmica (2.9 Å) del domini que conté la caixa EAGR de la proteïna MG200 de *M. genitalium* (Calisto *et al.*, 2012). L'anàlisi de l'estructura cristal·litzada va revelar un dímer estabilitzat per un nucli hidrofòbic compacte que s'estén al llarg de la interfície del dímer (Figura II.1.A). L'estructura del monòmer presentava un plegament nou que contenia una precisa simetria dins de la subunitat en relació a dos clars llaços formats per dues fulles

$\beta$  antiparal·leles unides per un petit *loop* (Figura II.1.B). Algunes de les seves característiques, com la plasticitat del domini o la presència d'eixos de simetria intersubunitat i intrasubunitat, suggerien un possible paper d'aquests dominis en interaccions proteïna-proteïna, on les caixes EAGR podrien servir de plataformes d'interacció amb altres macromolècules. No obstant, aquesta hipòtesi no semblava concordar amb l'observació que mutants de *M. genitalium* que expressarien proteïnes amb delecions de les regions que contenen caixes EAGR, com els mutants defectius en MG200 o MG386 o MG312, no presentaven defectes estructurals en la seva organela terminal.

L'objectiu plantejat en aquest segon capítol consistiria en estudiar la funció biològica de la caixa EAGR.

## Resultats

### 1. Obtenció de mutants $\Delta E$

Per tal de determinar la funció biològica de la caixa EAGR, es va dissenyar una estratègia per obtenir una soca mutant de *M. genitalium* que expressaria una versió modificada de la proteïna MG200 sense el domini corresponent a la caixa EAGR de la proteïna. Amb aquest objectiu, es va construir un minitransposó per introduir la versió modificada del gen *mg200* en la soca C12 de *M. genitalium*, ja que en estudis previs s'havia demostrat que és defectiva en proteïna MG200 (Pich, Burgos, Ferrer-Navarro, *et al.*, 2006).

#### 1.1. Construcció del vector pMTncat200 $\Delta E$

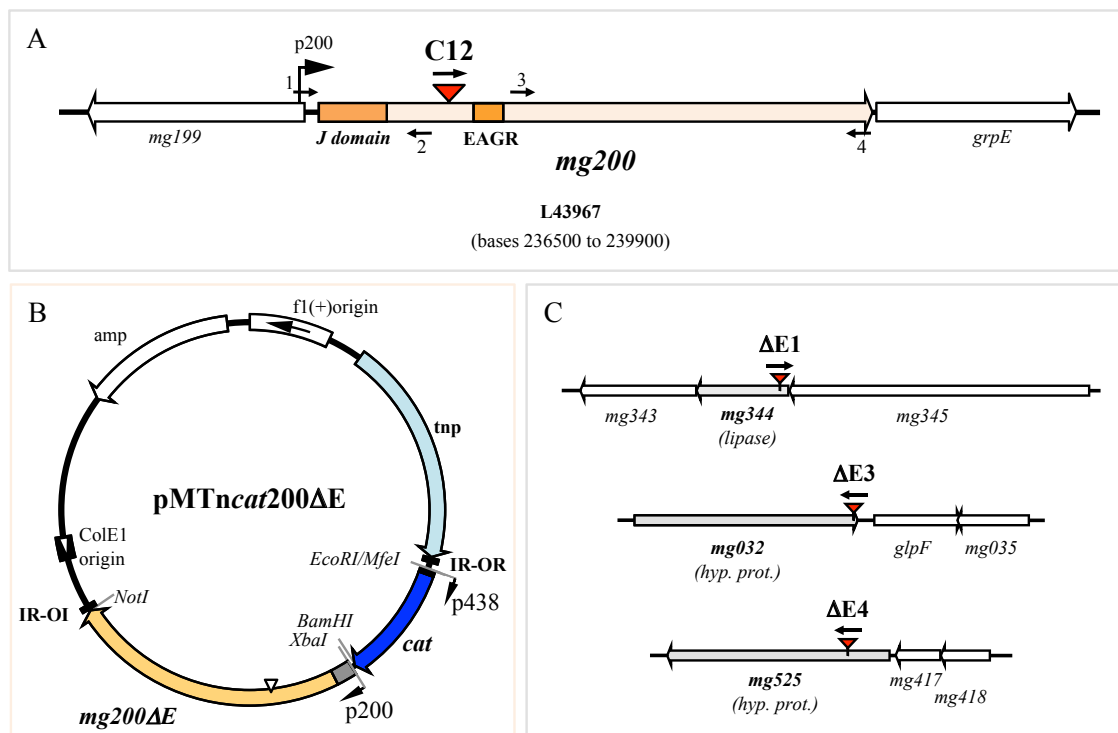
La delecio de la regió que codifica pel domini de la caixa EAGR en el gen *mg200* es va realitzar mitjançant PCR recombinant (Figura II.2.A). En primer lloc, a partir del genoma de *M. genitalium* es va amplificar per PCR el gen *mg200* en dos fragments separats, que flanquejaven la regió codificant pel domini de la caixa EAGR que es volia deleccionar. Per una banda, es va obtenir un fragment que comprenia la regió promotora pròpia (Musatovova *et al.*, 2006) i els 369 pb de l'extrem 5' del gen *mg200*. Per l'altra banda, es va amplificar un fragment de 1185 pb corresponent a l'extrem 3' del gen *mg200*. En un segon pas, es van fusionar els dos fragments en un sol producte de PCR gràcies a les regions complementàries dels dos fragments, introduïdes amb els encebadors utilitzats en el primer pas. Així, al fusionar els dos fragments s'aconsegueix la delecio del domini que conté la caixa EAGR i els dominis flanquejants d'aquesta regió queden units en fase. El producte final de la PCR recombinant es va clonar en el vector pMTncat, obtenint finalment el vector pMTncat200 $\Delta E$  (Figura II.2.B).

El vector pMTncat, com hem vist en el capítol anterior, està basat en un vector suïcida i és portador d'un minitransposó que produeix insercions estables al genoma de *M. genitalium* i conté el gen de resistència a cloramfenicol (*cat*). En el cas del vector que acabem de descriure, pMTncat200 $\Delta E$ , la inserció del minitransposó al genoma incorporaria, no només el gen de resistència a cloramfenicol, sinó també la versió modificada del gen *mg200*.

#### 1.2. Assaig de transformació de la soca C12 amb pMTncat200 $\Delta E$

La soca C12 (Pich, Burgos, Ferrer-Navarro, *et al.*, 2006) conté un minitransposó inserit a prop de l'extrem 5' del gen *mg200* truncant la seqüència codificant de la proteïna MG200 en la seva regió amino-terminal just abans del domini que conté la caixa EAGR (Figura II.2.A). Mitjançant Western Blot amb un anticòs policlonal específic contra la proteïna MG200, havien demostrat que la soca C12 no presentava nivells detectables d'aquesta proteïna. És per això que la soca C12 es presentava com a model ideal per introduir la proteïna MG200 modificada i estudiar els efectes que aquesta modificació provocava en la funció global de la proteïna.

Cèl·lules de la soca C12 es van transformar per electroporació amb el vector pMTnecat200ΔE. Les insercions del minitransposó són estables ja que el gen de la transposasa es perd amb la resta de vector suïcida que no és incorporat al genoma. Les cèl·lules transformades es van seleccionar en presència de cloramfenicol i tetraciclina, ja que la soca parental és resistent a tetraciclina, tal i com es descriu a l'apartat de materials i mètodes. D'aquesta forma es van obtenir els mutants ΔE.



**Figura II.2.** Obtenció de mutants ΔE. (A) Representació esquemàtica de la regió del gen *mg200* en el genoma de *M. genitalium*. El promotor del gen s'ha indicat amb una gran fletxa. Les regions del gen corresponents al domini J (aminoàcids 1-74 de la proteïna MG200) i a la caixa EAGR (aminoàcids 169-201 de la proteïna MG200) s'han ressaltat en caixes taronges. El punt d'inserció del minitransposó MTnecat200ΔE en el clon parental C12 s'ha indicat amb un triangle vermell invertit. Les fletxes amb els números 1-4 indiquen la posició dels encebadors utilitzats en la PCR recombinant. (B) Esquema del vector pMTnecat200ΔE, derivat del vector pMTnecat (Figura I.10.A). Les fletxes grans indiquen la posició del promotor p200 o p438. El triangle invertit blanc indica el lloc on s'ha deletat el domini de la caixa EAGR en el gen *mg200ΔE*. (C) Els triangles invertits de color vermell indiquen el punt d'inserció del minitransposó MTnecat200ΔE en els clons ΔE1, ΔE3 i ΔE4, localitzats en les posicions 441099, 38945 i 521044 del genoma de *M. genitalium*, respectivament. Les fletxes associades indiquen el sentit de la inserció del minitransposó: →, cadena + i ←, cadena -.

### 1.3. Identificació dels punts d'inserció del minitransposó en els mutants ΔE

El punt d'inserció del minitransposó MTnecat200ΔE en tres dels clons ΔE aïllats es va identificar per seqüenciació directa de DNA genòmic amb l'encebador CmUp. Els punts d'inserció del minitransposó es van localitzar en els ORF *mg032* (ΔE3), *mg344* (ΔE1) i *mg525* (ΔE4), que codifiquen per proteïnes hipotètiques, excepte l'ORF *mg344* que codifica per una lipasa (Figura II.2.C). Cal destacar que cap d'aquests gens ha estat prèviament relacionat amb la maquinària de motilitat dels micoplasmes (Pich, Burgos, Planell, *et al.*, 2006; Hasselbring *et al.*, 2006).

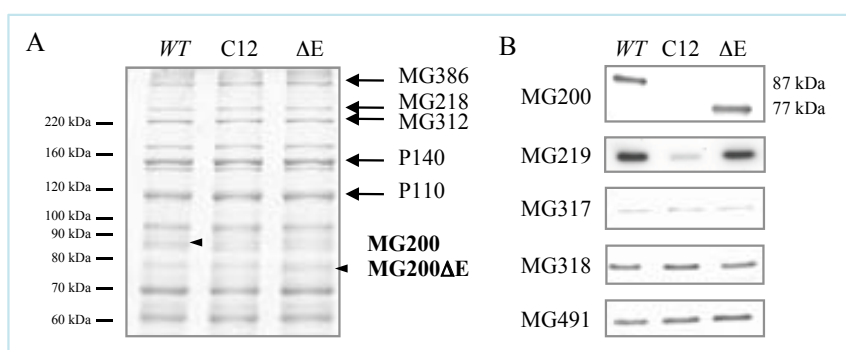
D'altra banda, l'expressió transitòria del gen de la transposasa present en el vector pMTnecat200ΔE podria haver remobilitzat el minitransposó MTnecat200ΔE present en la soca parental, C12, permetent restablir l'expressió del gen *mg200*. Aquest fenomen es va poder descartar mitjançant la seqüenciació de genoma

dels mutants  $\Delta E$  amb l'encebador TetDown (dades no mostrades), demostrant que el minitrasposó original es trobava en el mateix punt d'inserció que en la soca parental, corresponent a la base 237771+.

## 2. Caracterització del fenotip de mutants $\Delta E$

### 2.1. Perfil proteic

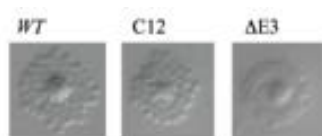
El perfil proteic dels mutants  $\Delta E$  presenta una única banda de 77 kDa quan són analitzats per Western blot fent servir un anticòs policlonal de ratolí contra la proteïna MG200. Com era d'esperar, aquesta banda mostra una disminució de 10 kDa respecte el pes molecular que mostra la banda corresponent a la proteïna MG200 en el perfil proteic de la soca salvatge (Figura II.3). Totes dues proteïnes mostren una mobilitat electroforètica menor a l'esperada segons les prediccions de massa molecular. Aquest fenomen, que ja s'havia descrit prèviament (Pich, Burgos, Ferrer-Navarro, *et al.*, 2006), és comú en proteïnes de micoplasma riques en residus prolina (Proft *et al.*, 1995; Proft *et al.*, 1996; Dirksen *et al.*, 1996). És remarcable que les proteïnes MG200 i MG200 $\Delta E$  s'expressen a nivells molt similars, suggerint que la delecció del domini de la caixa EAGR no produeix efectes significatius sobre l'estabilitat de la proteïna mutant.



**Figura II.3.** Perfil proteic de la soca salvatge (*WT*) i de les soques mutants C12 i  $\Delta E$  de *M. genitalium*. **(A)** SDS-PAGE 7.5 %. Les fletxes indiquen les bandes corresponents a proteïnes de l'OT. Els caps de fletxa indiquen la localització de les bandes corresponents a les proteïnes MG200 i MG200 $\Delta E$ . **(B)** Anàlisi per Western blot amb els anticossos anti-MG200, anti-MG219, anti-HMW3 (ortòleg de MG317), anti-MG318 i anti-P41 (ortòleg de MG491).

Els mutants  $\Delta E$  també es van examinar per buscar la presència d'efectes pleiotròpics en proteïnes prèviament relacionades amb les funcions de citadherència o motilitat a *M. genitalium* (P140, P110, MG218, MG219, MG312, MG317, MG318, MG386 i MG491). Aquest tipus d'efectes s'havien observat en diversos mutants amb deleccions de gens codificants per proteïnes de l'organela terminal (Burgos *et al.*, 2007; Pich *et al.*, 2008). En el cas dels mutants  $\Delta E$  no es van observar diferències significatives en els nivells d'expressió de les diferents proteïnes analitzades en comparació amb els nivells d'expressió detectats en la soca salvatge. A més a més, cal destacar la recuperació de proteïna MG219 en els mutants  $\Delta E$ , ja que s'havia descrit que la soca parental, C12, presentava uns nivells d'expressió molt disminuïts d'aquesta proteïna (Figura II.3.B).

### 2.2. Assaig qualitatiu de la capacitat d'hemadsorpció



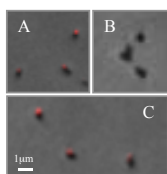
**Figura II.4.** Assaig d'HA qualitativa en colònies de la soca salvatge (*WT*) i C12 i  $\Delta E$  de *M. genitalium* amb hRBC.

Donat que la soca parental, C12, presenta un fenotip d'hemadsorpció positiu, no s'esperaria que els mutants  $\Delta E$  mostressin defectes d'adherència, si el minitrasposó no havia interromput un gen relacionat amb la funció d'adherència. Mitjançant un assaig d'hemadsorpció qualitativa es va poder determinar que les colònies dels mutants  $\Delta E$  presentaven una capacitat d'unió d'eritròcits comparable a l'observada

per la soca parental (Figura II.4), confirmant d'aquesta forma que els gens interromputs pel minitransposó no estan involucrats en adherència.

### 2.3. Immunolocalització de les proteïnes MG200 i MG200ΔE

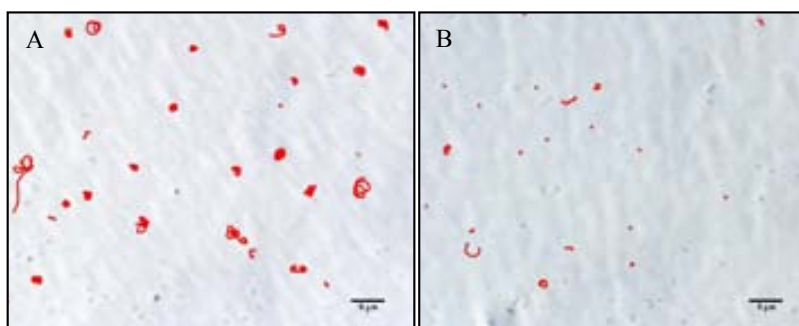
De forma indirecte es va voler comprovar l'impacte de la deleció del domini de la caixa EAGR sobre l'estructura tridimensional de la proteïna. Per això es va comparar la localització de la proteïna MG200ΔE en les cèl·lules mutants i la proteïna MG200 en la soca salvatge. La localització de les dues proteïnes es va realitzar mitjançant un assaig d'immunolocalització, fent servir el protocol detallat a materials i mètodes. Breument, les dues proteïnes es van localitzar mitjançant un anticòs policlonal de ratolí contra la proteïna MG200 (Pich, 2008) en mostres de cèl·lules fixades i permeabilitzades tant de la soca ΔE3 com de la soca salvatge. Finalment, mitjançant un anticòs secundari contra ratolí i conjugat amb el fluorocrom Alexa555 es van poder visualitzar per fluorescència la localitzacions subcel·lular d'aquesta proteïna. En tots dos casos es va determinar que la proteïna es localitza en un dels pols de la cèl·lula (Figura II.5), d'acord amb la localització de la proteïna ortòloga TopJ de *M. pneumoniae* (Cloward and Krause, 2009). Aquest resultat indica que la deleció del domini de la caixa EAGR no afecta la localització subcel·lular de la proteïna a la cèl·lula i suggereix que té un impacte mínim sobre l'estructura global de la proteïna.



**Figura II.5.** Localització subcel·lular de la proteïna MG200 o derivats en la soca salvatge (A) i de les soques mutants C12 (B) i ΔE3 (C) de *M. genitalium*, per immunofluorescència. Es mostra la superposició de les imatges de contrast de fase i de l'anàlisi d'immunofluorescència. En vermell s'indica la localització de la proteïna en les cèl·lules WT i ΔE3. No es va detectar senyal per fluorescència en les cèl·lules de la soca C12.

### 2.4. Estudi de la motilitat dels mutants ΔE

En els estudis previs de la soca parental C12 s'havia demostrat que aquesta soca presentava una deficiència severa en la capacitat de motilitat, tant a nivell de percentatge de cèl·lules mòtils (<5%) com en la velocitat mitjana exhibida per les cèl·lules mòtils. És important destacar que també es va determinar que la reintroducció del gen *mg200*, mitjançant un transposó, en la soca C12 permetia restablir paràmetres de motilitat equiparables als exhibits per la soca salvatge.



soca	% No Mòtils	% Mòtils (Períodes de repòs)	Velocitat mitjana ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )
WT	15,5	84,5 (26,6)	0,104
C12	95,2	4,8	-
ΔE3	60,5	39,5 (54,4)	0,053

**Figura II.6.** Estudis microcinematogràfics. Representació esquemàtica dels *tracks* enregistrats en la soca salvatge (A) i en la soca mutant ΔE3 de *M. genitalium* (B).

La motilitat dels mutants ΔE es va caracteritzar mitjançant estudis microcinematogràfics. En l'anàlisi dels diferents mutants ΔE es va constatar que tots exhibien un fenotip consistent, en que s'observava un

percentatge reduït de cèl·lules mòtils i, al mateix temps, una reducció en el valor de la velocitat mitjana que exhibien les cèl·lules mòtils respecte als paràmetres obtinguts amb la soca salvatge. Per exemple, el clon 3 ( $\Delta E3$ ) presentava un 60,5 % de cèl·lules no-mòtils i una velocitat mitjana propera al 50 % de l'exhibida per la soca salvatge (Figura II.6). Un elevat percentatge de les cèl·lules mòtils dels mutants  $\Delta E$  també realitzaven períodes de repòs durant la finestra de 2 min d'observació del seu moviment. En el cas del mutant  $\Delta E3$  el 54,4 % de les cèl·lules mòtils analitzades es parava durant més de 5 s durant els 2 min d'observació, respecte el 26,6 % en el cas de les cèl·lules de la soca salvatge. No obstant, aquests resultats mostraven que la motilitat de les cèl·lules  $\Delta E$  no està tant greument afectada com en la soca parental C12.

## Discussió

La capacitat de *M. genitalium* per desplaçar-se per sobre de superfícies sòlides es coneix des dels anys 1980' (Kirchhoff *et al.*, 1984). Ara bé, avui dia encara queden molts interrogants sobre la maquinària de motilitat d'aquest micoplasma (o micoplasmes del seu mateix *cluster* filogenètic, com *M. pneumoniae*) i existeix controvèrsia entre els models que podrien explicar com és aquest moviment (Miyata, 2010).

L'organela terminal de *M. genitalium* té un paper protagonista en la motilitat d'aquest micoplasma. Les cèl·lules es desplacen en la direcció i sentit de l'organela terminal, que sembla que dirigeix el moviment com un timó, i, a més a més, aquesta estructura també concentra les proteïnes responsables de l'adherència del micoplasma a superfícies sòlides, que és imprescindible per permetre el desplaçament per lliscament de les cèl·lules de *M. genitalium*. En aquest escenari no sembla sorprenent que la majoria de proteïnes relacionades amb la motilitat identificades fins al moment, estiguin també implicades en l'adhesió del microorganisme. Aquest fet posa en relleu que les maquinàries de motilitat i d'adhesió comparteixen elements comuns i semblava difícil poder identificar elements específics de la maquinària de motilitat. No obstant, sí que es va aconseguir identificar elements propis d'aquesta maquinària, com són les proteïnes MG200 i MG386 (Pich, Burgos, Ferrer-Navarro, *et al.*, 2006). Una característica interessant d'aquestes dues proteïnes és que comparteixen diversos elements en les seves estructures, però de tots ells semblava interessant la presència d'unes seqüències riques en glicina i aminoàcids aromàtics conegudes com a caixes EAGR (Balish *et al.*, 2001). El fet que aquest motiu siguin exclusiu d'aquestes dues proteïnes juntament amb la proteïna MG312 de *M. genitalium*, i de les respectives proteïnes ortòlogues a *M. pneumoniae* i *M. gallisepticum* va fer hipotetitzar que seria un element important per la maquinària de motilitat d'aquests micoplasmes del *cluster M. pneumoniae*.

A partir de la interpretació de l'estructura atòmica del domini de la caixa EAGR de la proteïna MG200 i de les interaccions establertes entre els monòmers al dimeritzar o amb el solvent present en el cristall amb que es va resoldre l'estructura, es va suggerir que aquests dominis podrien estar implicats en interaccions macromoleculares (Calisto *et al.*, 2012). Les caixes EAGR podrien servir de plataformes d'interacció, on les simetries observades tant intersubunitats com intrasubunitats permetrien la formació d'arranjaments regulars, similars als observats en l'anàlisi de la ultraestructura de l'organela terminal de *M. pneumoniae* per criotomografia electrònica (Henderson and Jensen, 2006; Seybert *et al.*, 2006). Acceptant aquesta hipòtesi sobre la funció de les caixes EAGR sembla que aquests dominis haurien de tenir un paper important en la ultraestructura de l'organela terminal. No obstant, no s'han descrit defectes estructurals aparents en l'organització de l'organela terminal en cèl·lules de *M. genitalium* que contenen o bé una petita deleció en la proteïna MG312 que suprimeix la caixa EAGR o delecions de fragments més grans en les proteïnes MG200 i MG386 que també suprimeixen les caixes EAGR presents en les seves estructures (Pich, Burgos, Ferrer-Navarro, *et al.*, 2006; Burgos *et al.*, 2007; Pich *et al.*, 2009).



En aquest treball ens vam proposar concretar el paper de les caixes EAGR en la motilitat de *M. genitalium*, complementant amb estudis biològics les observacions realitzades en l'estudi estructural del domini.

En aquest cas, s'ha utilitzat per l'estudi un model basat en una soca de *M. genitalium* defectiva en proteïna MG200 a la que s'ha reintroduït per transposició una còpia modificada del gen *mg200* que permetria l'expressió de la proteïna MG200 $\Delta$ E, obtenint així els mutants  $\Delta$ E. Les dificultats tècniques associades a l'obtenció d'un mutant defectiu en un fragment intern d'un gen per doble recombinació, se simplificaven utilitzant aquest sistema, que està àmpliament acceptat i s'ha fet servir en diferents estudis sobre *M. pneumoniae* (Hasselbring and Krause, 2007; Cloward and Krause, 2010; Chang *et al.*, 2011). Donada la possible variabilitat de fenotip que es pot trobar com a conseqüència del punt d'inserció del transposó en el genoma de *M. genitalium*, s'ha de tenir la precaució d'analitzar més d'un dels clons obtinguts per transposició.

En aquest treball es van analitzar tres clons  $\Delta$ E diferents, que es va demostrar que expressaven la proteïna truncada MG200 $\Delta$ E i que presentaven deficiències importants de motilitat, com s'havia hipotetitzat. L'interès d'estudiar els mutants  $\Delta$ E estava determinar de quina forma afectava la motilitat del micoplasma l'absència del domini de la caixa EAGR de la proteïna MG200.

En els estudis per seqüenciació dirigida de genoma, HA qualitativa i de perfil proteic es va descartar que cap dels clons  $\Delta$ E pogués tenir defectes estructurals en l'organela terminal o en la seva capacitat d'adherència, afectant indirectament la motilitat. No es van observar diferències entre els tres clons analitzats. En cap cas la inserció del transposó en el genoma del micoplasma havia afectat cap gen prèviament relacionat amb l'adherència de *M. genitalium* i els tres clons  $\Delta$ E mostraven resultats d'HA comparables tant a la soca parental C12, com a la soca salvatge, demostrant que no hi havia una afectació en la capacitat d'adherència. D'altra banda, el perfil proteic d'aquests mutants tampoc mostra diferències amb la soca salvatge, excepte la disminució de pes molecular de la proteïna MG200, deguda a la supressió del domini de la caixa EAGR. Cal destacar la recuperació de proteïna MG219 en els mutants  $\Delta$ E, ja que s'havia descrit que la soca parental, C12, presentava uns nivells d'expressió molt disminuïts d'aquesta proteïna (Figura II.3.B). Aquest fet també es va observar en el mutant TopJ de *M. pneumoniae*, que és defectiu en proteïna TopJ i presenta nivells molt reduïts de proteïna P24, considerades proteïnes ortòlogues de les proteïnes MG200 i MG219, respectivament (Cloward and Krause, 2009). És interessant el fet que recentment s'ha demostrat que la proteïna MG219 estaria involucrada en el mecanisme de motilitat de *M. genitalium* (L. González *et al.*, en preparació). En aquest escenari, una reducció dels nivells de proteïna MG219 podria contribuir en la gravetat del fenotip deficient en motilitat que exhibeixen les cèl·lules de la soca parental C12. Aquestes observacions implicarien que altres regions de la proteïna MG200, diferents de la caixa EAGR, serien crítiques per la presència de la proteïna MG219. De fet, s'ha comprovat que la proteïna MG219 interaccionaria directament amb l'extrem carboxi-terminal de la proteïna MG200 (Calisto *et al.*, manuscrit en preparació) i sembla que aquesta interacció seria necessària per estabilitzar la proteïna MG219, donat que en tots els mutants de *M. genitalium* que expressen versions truncades de la proteïna MG200 presenten disminucions de la proteïna MG219, comparables a les observades en la soca C12 (veure capítol III).

Amb aquests resultats, l'única diferència observada entre els mutants  $\Delta$ E i la soca salvatge era que els mutants expressaven una versió truncada de la proteïna MG200 que no tenia el domini de la caixa EAGR. La modificació del gen codificant per aquesta proteïna es va fer per PCR, amplificant el gen en dos fragments que flanquejaven el domini que es volia delectonar i fusionant a continuació els dos fragments en ordre i en fase, directament. D'aquesta forma es va incorporar una fragment que contenia el promotor propi del gen *mg200* i la versió modificada del mateix al transposó utilitzat per l'obtenció dels mutants

$\Delta E$ . En l'anàlisi per Western blot dels nivells d'expressió de la proteïna MG200 $\Delta E$  respecte la versió salvatge de la mateixa es va determinar que totes dues s'expressaven en quantitats similar, el que suggereix que la deleció del domini de la caixa EAGR en la proteïna MG200 no semblava haver tingut un impacte en l'estabilitat de la mateixa. No obstant, aquest resultat no permet descartar que la proteïna MG200 $\Delta E$  presenti diferències estructurals respecte la proteïna salvatge. Per poder determinar si la deleció introduïda en la seqüència de la proteïna MG200 altera la seva estructura, caldria poder determinar primer com és l'estructura nativa de la proteïna, però amb les tècniques d'anàlisi d'estructura de proteïnes de que disposem, aquesta fita ha estat impossible fins al moment (Calisto *et al.*, 2012). Per poder descartar que possibles defectes estructurals de la proteïna MG200 $\Delta E$  poguessin alterar la seva funció es va comparar la localització subcel·lular de les dues versions de la proteïna. La mateixa localització i el fet que els mutants  $\Delta E$  restableixen els nivells d'expressió de la proteïna MG219, disminuïts en la soca parental, dóna suport a la idea que la proteïna mutant MG200 $\Delta E$  manté moltes de les funcionalitats de la proteïna nativa, MG200, i suggereix que té un impacte mínim sobre l'estructura global de la proteïna. No obstant, per reforçar aquest resultat, cal afegir que la Dra. Bárbara M. Calisto, va analitzar per Dicroïsmo Circular (CD) i Espectroscòpia les dues formes de la proteïna. Els resultats de l'anàlisi comparatiu dels espectres de ultravioleta proper i llunyà de les dues proteïnes va mostrar que la proteïna mutant manté una estructura ben definida tot i l'absència del domini de la caixa EAGR, suggerint que la orientació relativa de la resta de dominis de la proteïna es manté (Calisto *et al.*, 2012).

El fenotip dels mutants  $\Delta E$ , amb paràmetres de motilitat entremitjos entre la soca parental C12 i la soca salvatge, clarament indica un rol específic del domini de la caixa EAGR de la proteïna MG200 en la motilitat de *M. genitalium*. És interessant destacar que aquest fenotip entremig és molt similar al fenotip descrit per els mutants de *M. genitalium* que tenen una petita deleció en la regió N-terminal de la proteïna MG312 que inclou una caixa EAGR (Burgos *et al.*, 2007). El paral·lelisme entre aquests resultats suggereixen que les caixes EAGR d'aquestes dues proteïnes compartirien la seva implicació en la maquinària de motilitat, tot i que no serien essencials per sí soles.

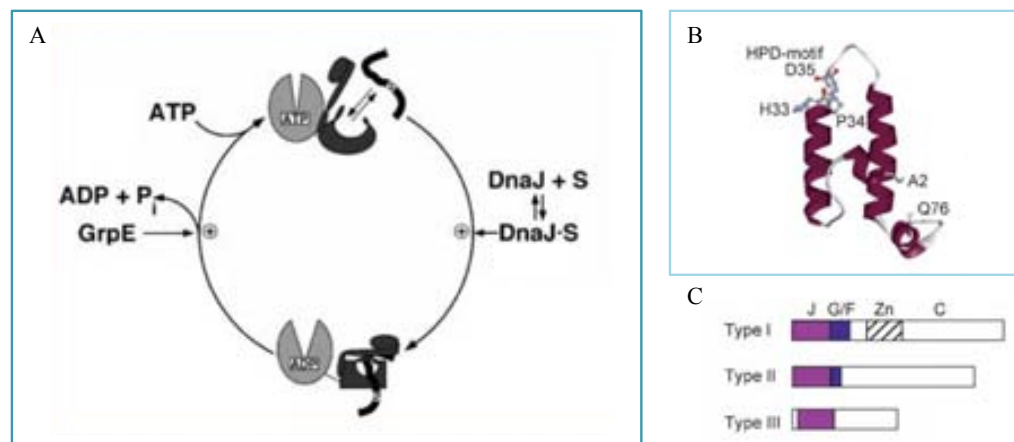
La supressió de les caixes EAGR de les proteïnes MG312 i MG200 dóna lloc a cèl·lules de micoplasma amb desavantatges mòtils similars, suggerint que les caixes EAGR tenen un paper rellevant i específic en la motilitat. Un dels models proposats per explicar la motilitat dels micoplasmes es basa en la flexibilitat conformacional de la ultraestructura de l'organela terminal per empènyer les cèl·lules endavant (Henderson and Jensen, 2006; Seybert *et al.*, 2006; Miyata, 2008). El potencial de polimerització de la caixa EAGR juntament amb la seva plasticitat estructural i la variabilitat de seqüència, especialment en els llaços formats per fulles  $\beta$  antiparal·leles, sembla molt adequat per proporcionar les frontisses versàtils que es requeriria per donar dinamisme al complex molecular de l'organela terminal.

## Capítol III. Estudi de la funció de la regió amoni-terminal de la proteïna MG200 de *M. genitalium*

### Introducció

La proteïna MG200 de *M. genitalium* és una proteïna multidomini de 601 aa, que és considerada un element important de la maquinària de motilitat d'aquest microorganisme (Pich, Burgos, Ferrer-Navarro, *et al.*, 2006; Calisto *et al.*, 2012). Ara bé, és interessant destacar que la proteïna MG200 té un domini J en el seu extrem amino-terminal i que també presenta homologia feble en el seu extrem carboxi-terminal amb la proteïna CbpA de *E. coli*. És per això que la proteïna MG200 va ser originalment anotada com a proteïna de domini J (Peterson *et al.*, 1993; Fraser *et al.*, 1995).

Els dominis J són característics de les proteïnes DnaJ-like o proteïnes J. Aquestes proteïnes participen en el sistema de xaperones DnaK/DnaJ/GrpE (figura III.1), que està involucrat en un ampli ventall de funcions relacionades amb el plegament de proteïnes depenent d'ATP, com per exemple el plegament i assemblatge de proteïnes de nova síntesi, la translocació de proteïnes a través de membrana o el control de l'activitat de proteïnes reguladores (Schmid *et al.*, 1994; Bukau and Horwich, 1998; Mayer *et al.*, 2000; Mayer and Bukau, 2005). En aquest sistema, les proteïnes J són necessàries per l'activació de l'activitat ATPasa de la proteïna DnaK i per facilitar la interacció entre la proteïna DnaK i el seu substrat (Liberek *et al.*, 1991; Szabo *et al.*, 1994; McMacken and Karzai, 1996; Suh *et al.*, 1999; Johnson and Craig, 2001).

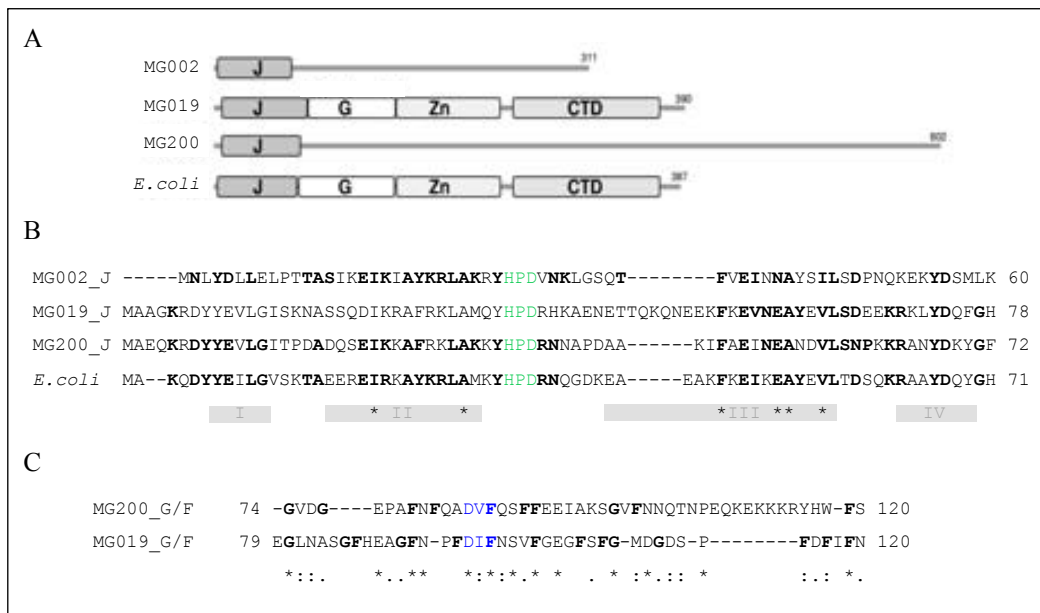


**Figura III.1.** Proteïnes J i sistema de xaperones DnaK/DnaJ/GrpE. (A) Model del cicle d'actuació de la xaperona DnaK a *E. coli*. (B) Representació de l'estructura secundària del domini J. S'ha destacat el tripletp HPD. (C) Estructura dels dominis en els 3 subtipus de proteïnes J. Els dominis s'han indicat com J, domini J; G/F, regió rica en Gly i Phe; Zn, domini de dit de zinc; C, domini carboxi-terminal. (Figura modificada de Mayer and Bukau, 2005).

La família de les proteïnes J es divideix en tres subtipus, depenent dels dominis presents en les seves estructures (figura III.1.C) (Walsh *et al.*, 2004; Hennessy *et al.*, 2005). Aquests dominis estan involucrats en l'especificitat i modulació de les diferents funcions de la DnaK. Els tres subtipus de proteïnes J només comparteixen la presència del domini J, que defineix la família de proteïnes. Normalment aquest domini es troba localitzat en l'extrem amino-terminal d'aquestes proteïnes i és el responsable d'interaccionar amb la DnaK, com hem comentat en el paràgraf anterior. Els subtipus I i II tenen en comú també la presència d'una regió rica en glicines i fenilalanines (G/F) després del domini J. Tot i que hi ha controvèrsia en la funció real d'aquesta regió, sembla que atorgaria especificitat de substrat a la proteïna J, que és qui presenta o facilita la unió d'aquest substrat amb la DnaK (Wall *et al.*, 1995; Huang *et al.*,

1999; Yan and Craig, 1999). Aquestes proteïnes presenten altres dominis que involucrats en el reconeixement de substrat, però la regió G/F estaria implicada específicament en el reconeixement de pèptids parcialment plegats o desplegats, depenent del punt de vista (Perales-Calvo *et al.*, 2010). El subtipus I està caracteritzat, a més a més, per la presència d'un domini de dit de zinc i una regió carboxi-terminal força conservada entre els membres d'aquest grup. Aquests dos dominis s'ha relacionat amb el reconeixement i interacció de pèptids desplegats (Szabo *et al.*, 1996). Cal recalcar que només els subtipus I i II s'han relacionat amb processos de plegament de proteïnes. En cap cas s'ha trobat que un membre del subtipus III que uneixi pèptids desplegats, pel que es descarta que estigui implicat en el plegament de proteïnes. Els membres d'aquest tercer subtipus recluten diferents isoformes de DnaK en llocs específics de la cèl·lula i participen en funcions diverses, com per exemple sistemes de translocació, ribosomes o vesícules amb clatrina, que generalment impliquen l'assemblatge o intervenció de complexos proteics.

*M. genitalium* presenta un genoma molt reduït, que sembla que es va originar per un procés d'evolució reduccionista, en el que es van perdre molts dels gens ancestrals. No obstant, en el genoma d'aquest microorganisme s'han descrit tres gens diferents que codificarien proteïnes de la família de les proteïnes J. Es tracta dels gens *mg002*, *mg019* i *mg200* que codifiquen les proteïnes MG002, la MG019 i la MG200, respectivament, (Figura III.2.A). La presència de diferents proteïnes J no és inusual, donat que, com hem vist prèviament, les diferents proteïnes J poden modular l'activitat i la localització de la proteïna DnaK dins de la cèl·lula. En el cas de les diferents espècies de micoplasma, només trobem múltiples còpies de gens *dnaJ-like* en dos casos més, *M. pneumoniae* i *M. gallisepticum*, que pertanyen al mateix grup filogenètic que *M. genitalium*, (Musatovova *et al.*, 2006).



**Figura III.2.** Comparació de les proteïnes J de *M. genitalium*. (A) Comparació estructural de les proteïnes J de *M. genitalium* amb la proteïna DnaJ de *E. coli*. J pel domini J; G, regió rica en Gly i Phe; Zn, domini de dit de zinc; CTD, domini carboxi-terminal. (B) Alineament dels dominis J de *M. genitalium* amb el domini J de la proteïna DnaJ de *E. coli*. En verd s'ha destacat el triplet HPD. Les capses grises senyalen la posició de les hèlix  $\alpha$  predites (I-IV); els asteriscs indiquen els residus hidrofòbics que són requisit per l'estabilitat de les hèlix. (C) Alineament de les regions G/F de la proteïna MG200 i la proteïna MG019 de *M. genitalium*. En negreta s'han destacat els residus Gly i Phe; en blau s'ha destacat el triplet DV/IF característic de les regions G/F. (Figures A i B modificada de Musatovova *et al.*, 2006).

Les tres proteïnes J de *M. genitalium* presenten un domini J en seu extrem amino-terminal (Figura III.2.B). En l'anàlisi de seqüència aminoacídica d'aquest domini en les tres proteïnes, es van poder identificar les quatre hèlix  $\alpha$  que structuren el domini i el característic triplet catalític HPD present en el

*loop* d'unió entre les hèlix II i III, de forma que en els tres casos el domini podria ser funcional (Szyperski *et al.*, 1994; Pellecchia *et al.*, 1996; Suh *et al.*, 1999; Genevaux *et al.*, 2002). En l'anàlisi de la resta de l'estructura secundària d'aquestes proteïnes s'havia trobat que només la proteïna MG019 presenta els dominis característics de les proteïnes J de tipus I i, és per això, que s'ha considerat com el verdader homòleg de la proteïna DnaJ clàssica d'*E. coli*, involucrada en el plegament de proteïnes (Musatovova *et al.*, 2006). Les altres dues proteïnes, MG002 (de funció desconeguda fins al moment) i MG200, es van classificar com a proteïnes J de tipus III, ja que només s'havia pogut identificar amb claredat un domini J en la seva estructura secundària (Musatovova *et al.*, 2006). Ara bé, un anàlisi més exhaustiu de la proteïna MG200 ens va permetre identificar una possible regió rica en glicines i fenilalanines (G/F) a continuació del seu domini J, com és característic de les proteïnes J de tipus II. Aquesta regió G/F a la proteïna MG200 (Figura III.2.C), que no s'havia descrit fins al moment, presenta un nombre més reduït de glicines i fenilalanines de l'esperat en aquestes regions, però, cal destacar, que també es va poder identificar el triplet DVF característic (Wall *et al.*, 1995). D'aquesta forma, *M. genitalium* posseiria 3 proteïnes J, però només una de cadascun dels subtipus. Per últim, cal mencionar que les proteïnes DnaJ han estat tradicionalment relacionades amb la resposta per xoc tèrmic. La proteïna MG019 de *M. genitalium* és la que proteïna que té una homologia estructural i de seqüència més elevada amb la DnaJ de *E. coli*. A més a més, s'ha trobat que la regió promotora associada al gen *mg019* presenta una seqüència CIRCE (*controlling inverted repeat of chaperone expression*), que regula l'expressió de les proteïnes que se sobreexpressen en resposta a un xoc tèrmic. No obstant, s'ha comprovat experimentalment, que de fet en situació de xoc tèrmic només se sobreexpressa la proteïna MG200 (Musatovova *et al.*, 2006).

Per què una proteïna que ha estat relacionada amb la motilitat de *M. genitalium*, com és la proteïna MG200, conté dominis relacionats amb funcions xaperona en el seu extrem amino-terminal? Si la proteïna MG200 és una proteïna J de tipus II, quina funció de DnaK estaria modulant i quina regió de la proteïna MG200 atorga aquesta especificitat? I, com a últim interrogant, si la proteïna MG200 té dues funcions, és imprescindible que les dues funcions convisquin en el mateix polipèptid o es poden separar en dos polipèptids independents?

## **Primera Part. Caracterització de la funció de l'extrem amino-terminal de la proteïna MG200**

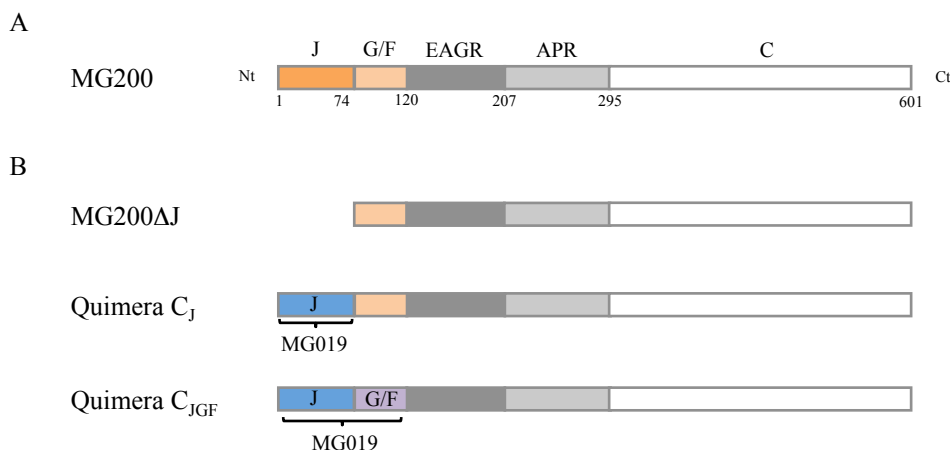
Donada la presència d'un domini J en l'estructura de la proteïna MG200, s'havia hipotetitzat que aquesta proteïna podria tenir un paper en el plegament de les proteïnes de l'organela terminal de *M. genitalium* (Cloward and Krause, 2009). No obstant, s'ha demostrat la implicació la proteïna MG200 en la motilitat de *M. genitalium*. A més a més, les soques C2 i C12 (Pich, Burgos, Ferrer-Navarro, *et al.*, 2006) defectives en proteïna MG200, no presenten defectes estructurals en l'organela terminal, com caldria esperar si es confirma la hipòtesi anterior. És per això que l'objectiu proposat per aquest tercer capítol és l'estudi de la funció de l'extrem amino-terminal de la proteïna MG200 i la determinació de la regió que atorga especificitat a aquesta funció.

### **I. Resultats**

#### **I.1. Disseny de tres modificacions amino-terminals en la proteïna MG200**

Per tal de poder estudiar la contribució de la funció dels dominis amino-terminals de la proteïna MG200 en la funció global de la proteïna, es van dissenyar 3 modificacions en aquest extrem de la proteïna (Figura III.3). La primera modificació consistia en la supressió del domini J de la proteïna, obtenint una versió truncada de la proteïna, MG200ΔJ. La segona modificació consistia en substituir el domini J de la proteïna pel domini J de la proteïna MG019, creant una proteïna quimèrica que anomenarem C<sub>J</sub>. I per

últim, donat que la regió G/F podria estar implicada en l'especificitat de substrat de la proteïna J, es va dissenyar una segona proteïna quimèrica, que anomenarem C<sub>JGF</sub>. Aquesta quimera estaria constituïda per 120 aa de l'extrem amino-terminal de la proteïna MG019, que engloben el domini J i a seva regió G/F, substituint els 120 aa equivalents de l'extrem amino-terminal de la proteïna MG200. D'aquesta forma, la quimera C<sub>JGF</sub> estaria formada pel domini J i la regió G/F de la proteïna MG019 i els dominis carboxi-terminals de la proteïna MG200, que s'ha descrit que tenen un paper en la motilitat de *M. genitalium* (Pich, Burgos, Ferrer-Navarro, *et al.*, 2006; Calisto *et al.*, 2012).



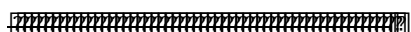
**Figura III.3.** Esquema del dominis presents en l'estructura de la proteïna MG200 de *M. genitalium* (A) i de les tres proteïnes derivades (B). J pel domini J, en taronja correspon a la proteïna MG200 i en blau a la proteïna MG019; G/F, regió rica en Gly i Phe, en taronja clar correspon a la proteïna MG200 i en lila a la proteïna MG019; EAGR, domini de la caixa EAGR; APR, regió rica en prolina; C, fragment carboxi-terminal. Nt i Ct indiquen els extrems amino-terminal i carboxi-terminal; els números indiquen els residus que delimiten els diferents dominis.

## 1.2. Obtenció de les soques mutants ΔJ, C<sub>J</sub> i C<sub>JGF</sub>

### 1.2.1. Disseny dels vectors pBAJ, pBC<sub>J</sub> i pBC<sub>JGF</sub> i assaig de transformació a *M. genitalium*

Aprofitant la possibilitat de generar mutants per doble recombinació homòloga a *M. genitalium*, es van dissenyar tres vectors que permetrien generar tres soques mutants (Figura III.4), cadascuna d'elles expressant una de les proteïnes MG200 mutants dissenyades: la versió truncada MG200ΔJ o les quimeres C<sub>J</sub> o C<sub>JGF</sub>.

En primer lloc, es va construir el vector pBAJ (Figura III.4.B). Aquest està format per l'esquelet d'un pBluscript II SK<sup>+</sup> i conté un fragment de 2 kb amb el gen marcador *tetM438* de resistència a tetraciclina (Pich, Burgos, Planell, *et al.*, 2006), flanquejat per dos braços d'homologia, que permetran deleccionar el fragment codificant pel domini J en el gen *mg200* a *M. genitalium* per doble recombinació. Per una banda, el braç d'homologia esquerre és un fragment d'aproximadament 1 kb de la regió 5' del gen *mg200*, que conté la regió promotora d'aquest gen i el gen *mg199*. Per l'altra banda, el braç d'homologia dret és un altre fragment d'aproximadament 1 kb que conté la regió promotora del gen *mg200* (Musatovova *et al.*, 2006) i l'extrem 5' del mateix gen fins després de la regió codificant pel domini APR, però al que s'ha deleccionat la regió codificant pel domini J de la proteïna MG200<sup>2</sup>. Tots dos braços d'homologia contenen el fragment corresponen a la regió promotora descrita pel gen *mg200*, donat que es sospitava que també podria estar actuant de regió promotora del gen *mg199* i per evitar truncar la seqüència d'aquest últim gen, que, tot i haver estat anotat com a pseudogen per un possible *frameshift*, la



<sup>2</sup> A l'apartat 3 de materials i mètodes s'ha detallat la construcció del vector pBAJ i s'explica com es va deleccionar la regió 5' del gen *mg200* mitjançant una PCR invertida.

proteïna codificada per aquest gen es va identificar recentment en un estudi sobre el proteoma de *M. genitalium* (Párraga Niño *et al.*, 2012). Aquest gen *mg199* codificaria una possible ribonucleasa HIII necessària per degradar el RNA en *duplex* DNA-RNA, formats durant la replicació, recombinació o reparació del DNA, i podria ser un gen essencial (Glass *et al.*, 2006; Karr *et al.*, 2012; Sanghvi *et al.*, 2013). Cal destacar que en aquesta construcció, el gen de resistència a tetraciclina està orientat en *antisense* respecte al gen *mg200*<sup>3</sup>.

El vector resultant, pBAJ, es va fer servir per transformar per electroporació cèl·lules de la soca salvatge G37 de *M. genitalium* i les cèl·lules transformants resultants es van seleccionar en presència de tetraciclina, tal i com es descriu a l'apartat de materials i mètodes. D'aquesta forma es van aïllar 14 clons resistents a tetraciclina, tot i que caldria determinar quins d'ells haurien incorporat la deleció del fragment codificant pel domini J, ja que en algun cas podria haver-se produït la recombinació del braç esquerre a través de la seqüència homòloga corresponent al promotor del gen *mg200* i, per tant, evitant la deleció del fragment desitjat.

Per produir les altres dues soques de *M. genitalium* que haurien d'expressar una de les dues quimeres dissenyades, es van construir els vectors pBC<sub>J</sub> i pBC<sub>JGF</sub>, basats en el vector anterior pBAJ, però modificant el fragment corresponent al braç d'homologia dret. Aquests dos nous vectors, en lloc de produir la deleció de la regió codificant pel domini J en el gen *mg200*, permetrien substituir un fragment de l'extrem 5' del gen *mg200* per un fragment del gen *mg019*, per intercanvi al·lèlic. En el cas del vector pBC<sub>J</sub> la substitució afectaria només al domini J i, en l'altre cas, pBC<sub>JGF</sub> se substituiria la regió codificant pel domini J i la regió G/F. Aquests vectors, pBC<sub>J</sub> i pBC<sub>JGF</sub>, de la mateixa forma que amb el vector pBAJ, es van utilitzar per transformar cèl·lules de la soca salvatge G37 de *M. genitalium* i els transformants resultants es van seleccionar en presència de tetraciclina. En aquestes dues noves transformacions es van aïllar 10 i 2 clons resistents a tetraciclina, respectivament.

### 1.2.2. Anàlisi genòmic dels clons obtinguts en les transformacions

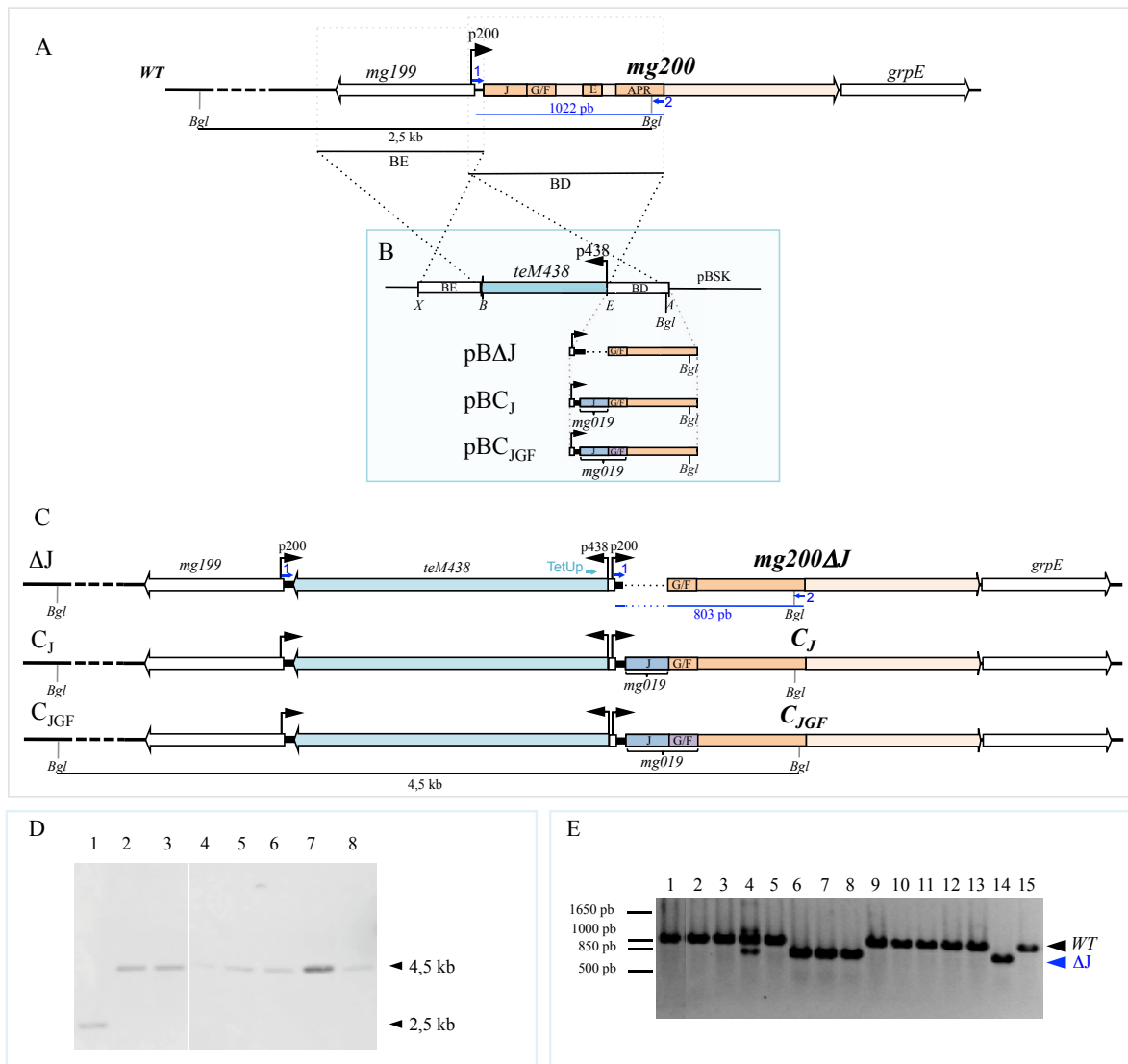
Els diferents clons obtinguts en les tres transformacions descrites en l'apartat anterior es van analitzar tant per Southern blot com per PCR per confirmar la identitat de les soques esperades ΔJ, C<sub>J</sub> i C<sub>JGF</sub>.

En primer lloc, mitjançant un assaig per Southern blot (Figura III.4.D) es va determinar quins clons eren fruit de la doble recombinació esperada i quins podien ser descartats per haver incorporat la totalitat del vector utilitzat en el genoma. El DNA genòmic dels diferents clons aïllats es va digerir amb *Bgl*III i després de separar electroforèticament els fragments resultants de la digestió i transferir-los en una membrana de niló, es va fer servir una sonda específica contra el fragment corresponent al braç esquerre d'homologia, present en els vectors utilitzats en les transformacions, es van poder identificar els clons resultants de la doble recombinació desitjada.

Com calia esperar, en el cas de la soca salvatge es va detectar una única banda de 2,5 kb, que va servir de control positiu en l'anàlisi. En l'anàlisi dels clons aïllats en la transformació amb el vector pBAJ, es va detectar una única banda de 4,5 kb en tots els casos, indicatiu de la doble recombinació esperada. De forma similar, en les clons aïllats en les transformacions amb els vectors pBC<sub>J</sub> i pBC<sub>JGF</sub>, es va poder determinar que tots ells que presentaven la doble recombinació esperada<sup>4</sup> (Figura III.4.D).

<sup>3</sup> La inserció del gen de resistència a tetraciclina tetM438 en aquesta posició i orientació en el genoma de *M. genitalium* ha estat comprovat que no altera l'expressió de la proteïna MG200 (dada no mostrada).

<sup>4</sup> En cas de ser recombinants per un sol braç hauríem de trobar dues bandes (BE: 4,5 + 6,9 kb; BD: 2,5 + 6,9 kb)



**Figura III.4.** Obtenció de les soques mutants  $\Delta J$ ,  $C_J$  i  $C_{JGF}$  de *M. genitalium* per doble recombinació. **(A)** Representació esquemàtica de la regió del gen *mg200* en el genoma de *M. genitalium* (bases 235400-240000). El promotor del gen s'ha indicat amb una gran fletxa i p200. **(B)** Representació esquemàtica global dels vectors utilitzats per modificar per doble recombinació la soca salvatge i obtenir les 3 soques mutants  $\Delta J$ ,  $C_J$  i  $C_{JGF}$ . S'ha detallat la composició del braç dret d'homologia (BE) en cadascun dels vectors: pBAJ, pBC<sub>J</sub> i pBC<sub>JGF</sub>. **(C)** Representació esquemàtica del resultat de l'intercanvi al·lèlic produït en les tres transformacions de *M. genitalium* amb que s'han obtingut els mutants  $\Delta J$ ,  $C_J$  i  $C_{JGF}$ . Els promotors s'indiquen amb una gran fletxa i p200 o p438.

Les regions del gen *mg200* corresponents al domini J (J), a la regió rica en Gly i Phe (G/F) i a la caixa EAGR (E) i el domini ric en prolines (APR) s'han ressaltat en caixes taronges i les regions del gen *mg019* corresponents al domini J (J), a la regió rica en Gly i Phe (G/F) s'ha ressaltat en una caixa blava o lila, respectivament. S'indiquen els llocs de tall per *Bgl*III (*Bgl*), *Xba*I (*X*), *Eco*RI (*E*), *Bam*HI (*B*) i *Apa*I (*A*). BE i BD indiquen braç esquerre i braç dret d'homologia i s'ha representat esquemàticament amb línies puntejades negres els possibles successos de recombinació homòloga que es poden donar entre les regions homòlogues presents als vectors utilitzats (B) i el genoma de *M. genitalium* (A). Amb línies puntejades grises s'emmarquen regions equivalents en mida i composició. **(D)** Anàlisi per Southern blot dels DNA genòmics extrets de la soca salvatge (1), els clons 5 i 7 del mutant  $\Delta J$  (2-3), els clons 1, 2 i 10 del mutant  $C_J$  (4-6) i els clons 5 i 7 del mutant  $C_{JGF}$  (7-8). Els genomes es van digerir amb *Bgl*III i com a sonda es va utilitzar el BE. S'han indicat amb barres negres els fragments esperats en cada soca sobre les representacions esquemàtiques de la figura A i C. **(E)** Anàlisi per PCR de la deleció de la regió codificant pel domini J en el gen *mg200* en els diferents clons aïllats en la transformació de la soca salvatge amb el vector pBAJ. (1) soca salvatge i (2-15) clons aïllats 1-8 i 10-14, respectivament. S'han marcat amb fletxes baves (1 i 2) la posició dels dos encebadors utilitzats i amb barres blaves la mida dels fragments esperats sobre les representacions esquemàtiques de la figura A i C. El fragment deletionat s'ha marcat amb una línia discontinua.



Partint dels clons aïllats en la transformació amb el vector pBAJ que s'acabava de demostrar que són resultat de la doble recombinació esperada, calia determinar quins havien incorporat la deleció de la regió codificant pel domini J en la seqüència del gen *mg200*. Per això, es va analitzar novament el DNA genòmic d'aquests clons per PCR fent servir els encebadors 5p.mg200-XbaI i 3mg200Nter-ApaI, que permetrien amplificar un petit fragment de 1022 pb o de 803 pb en cas d'haver deletat el fragment del domini J, com s'esperava en el cas de la soca ΔJ que s'havia dissenyat. Dels 14 clons analitzats només 4 presentaven la deleció esperada (clons 5, 6, 7 i 14) resultant en una eficiència sospitosament baixa, suggerint que la deleció podia ser letal o estar afectant greument al creixement de les cèl·lules que havien incorporat la deleció (Figura III.4.E). Cal dir que es va poder confirmar per seqüenciació directe de genoma amb l'encebador TetUp la deleció de l'extrem 5' del gen *mg200* en un dels clons que havia sortit positiu per PCR (clon 5, dada no mostrada).

Els clons aïllats en les transformacions amb els vectors pBC<sub>J</sub> i pBC<sub>JGF</sub>, que s'havia confirmat que eren dobles recombinants, mitjançant seqüenciació dirigida de genoma amb l'encebador TetUp es van comprovar i confirmar les modificacions introduïdes a l'extrem 5' del gen *mg200* específicament a cadascuna de les soques (dada no mostrada).

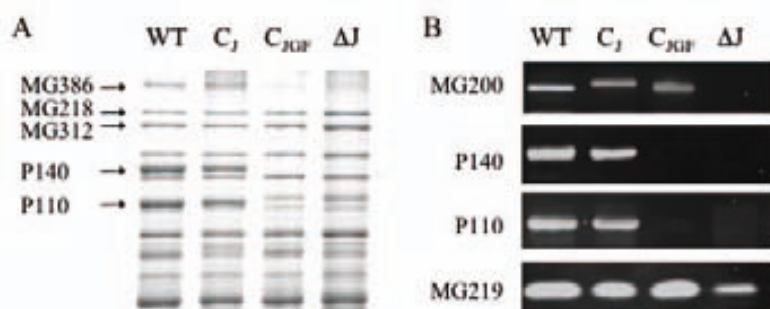
### I.3. Caracterització de les soques mutants ΔJ, C<sub>J</sub> i C<sub>JGF</sub>

#### I.3.1. Perfil proteic dels mutants de MG200

L'expressió de les proteïnes MG200 mutants es va analitzar per Western blot fent servir un anticòs policlonal de ratolí contra la proteïna MG200 (Pich, 2008), donat que les tres proteïnes MG200 mutants preserven > 80 % de la proteïna MG200 salvatge i, per tant, aquest anticòs permetia reconèixer les tres variants de la proteïna (MG200ΔJ, C<sub>J</sub> i C<sub>JGF</sub>). El resultat obtingut mostrava la pèrdua total de la proteïna MG200 en el mutant ΔJ, ja que no es van detectar ni tan sols traces de la proteïna truncada, indicant que l'absència del domini J a l'extrem amino-terminal de la proteïna provoca una desestabilització de la mateixa. En canvi, les dues proteïnes quimèriques són estables i s'expressen a nivells comparables als de la proteïna salvatge, suggerint que les modificacions de l'extrem amino-terminal, introduïdes en tots dos casos, no produeixen efectes significatius sobre l'estabilitat de la proteïna.

La comparació del perfil proteic dels tres mutants de MG200 amb el de la soca salvatge, mitjançant SDS-PAGE, no va revelar gaires diferències (Figura III.5). El patró de bandes del mutant C<sub>J</sub> és equivalent al de la soca salvatge. Les diferències més evidents s'observen en els mutants ΔJ i C<sub>JGF</sub>, que presenten un patró de bandes similar entre ells. En tots dos casos, destaca la pèrdua de les bandes de 110 kDa i 140 kDa, corresponents a les proteïnes P110 i P140, respectivament. L'absència d'aquestes dues proteïnes, que són les adhesines principals de *M. genitalium*, va ser confirmada mitjançant Western blot amb anticossos específics contra aquestes dues proteïnes. Sembla que només el mutant C<sub>J</sub> és capaç de retenir nivells de proteïna P110 i P140 comparables a la soca salvatge de les dues adhesines de *M. genitalium*. Cal afegir que es va analitzar l'expressió de la proteïna MG200 en els mutants defectius en adhesines CI, CII i Δ191 (Mernaugh *et al.*, 1993; Burgos *et al.*, 2006) per western blot i, tots els casos es van trobar nivells de proteïna similars als de la soca salvatge (dada no mostrada).

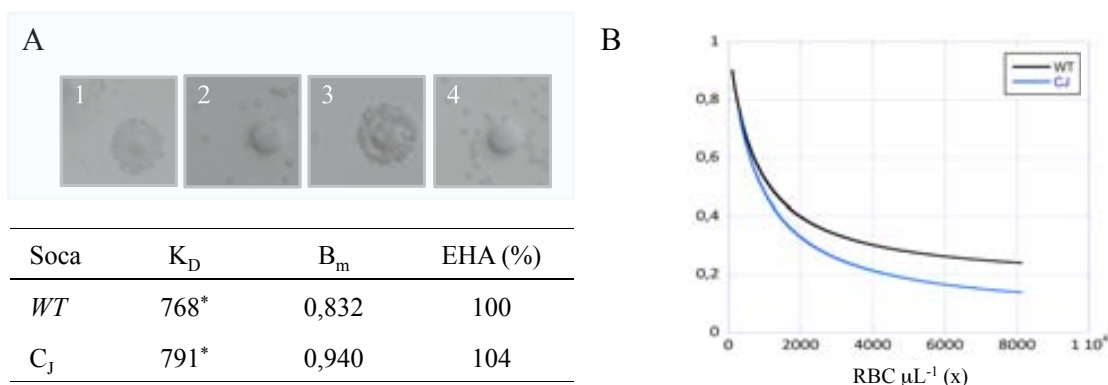
En l'anàlisi del perfil proteic per SDS-PAGE o per Western blot amb anticossos específics contra les diferents proteïnes presents en l'organela terminal de *M. genitalium*, no es van detectar més diferències significatives entre les soques mutants analitzades i la soca salvatge, a part de les ja mencionades (Figura III.5). Només cal afegir que en el cas dels mutants ΔJ i C<sub>JGF</sub> es va observar també la disminució de la quantitat de proteïna MG386 que acompanya l'absència de les adhesines (Burgos *et al.*, 2006) o la disminució de proteïna MG219 en absència de proteïna MG200 (Pich, Burgos, Ferrer-Navarro, *et al.*, 2006; Calisto *et al.*, 2012), fenòmens que ja s'havien descrit amb anterioritat.



**Figura III.5.** Perfil proteic de la soca salvatge (*WT*) i de les soca mutants *C<sub>J</sub>*, *C<sub>JGF</sub>* i  $\Delta J$  de *M. genitalium*. **(A)** SDS-PAGE 7.5 %. Les fletxes indiquen les bandes corresponents a proteïnes de l'OT. **(B)** Anàlisi per Western blot amb els anticossos anti-MG200, anti-P140, anti-P110, anti-MG219.

### I.3.2. Estudi de la capacitat d'Hemadsorció

Mitjançant un assaig d'hemadsorció (HA) qualitativa es va analitzar la capacitat d'adherència de les tres soques mutants. Donat que la capacitat d'adherència de les soques de *M. genitalium* depèn directament de les proteïnes P110 i P140, en l'assaig d'HA en colònia va mostrar com només el mutant que expressa la quimera *C<sub>J</sub>* és capaç d'unir eritròcits humans de forma comparable a la soca salvatge (Figura III.6.A), de forma consistent amb els resultats observats amb els perfils proteics.



**Figura III.6.** **(A)** Assaig d'HA qualitativa en colònies de la soca salvatge (1) i de les soques mutants  $\Delta J$  (2), *C<sub>J</sub>* (3) i *C<sub>JGF</sub>* (4) de *M. genitalium* amb hRBC. **(B)** Representació gràfica de l'HA quantitativa amb una concentració inicial de micoplasmes constant i concentracions creixents de hRBC. A la taula s'han especificat els valors  $K_D$  i  $B_m$  de les dues soques i l'eficiència d'HA (EHA). L'asterisc senyala els valors que no són estadísticament diferents als obtinguts en l'anàlisi de la soca salvatge (p-valor < 0,05).

Aquest resultat es va confirmar de forma quantitativa mitjançant el nou mètode de quantificació de la capacitat d'hemadsorció per citometria (García-Morales *et al.*, 2014). En aquest nou mètode, els autors proposen interpretar la capacitat d'unió d'eritròcits de les cèl·lules de *M. genitalium* com un interacció proteïna-proteïna. D'aquesta forma la capacitat d'HA seguiria una cinètica de tipus Langmuir, que s'ajustaria a un model matemàtic definit per la següent expressió:

$$y = 1 - \frac{B_m \cdot x}{K_D + x}$$

on *y* és la fracció lliure de micoplasmes, en tant per *u*, i *x* la concentració d'eritròcits. D'aquesta forma, la cinètica d'unió d'eritròcits es defineix amb dos paràmetres: a) la constant de dissociació  $K_D$  indicatiu de com és la unió o, en altres paraules, quines proteïnes participarien en la interacció proteïna-proteïna que defineix la unió d'eritròcits i b) la capacitat màxima d'unió  $B_m$  com a paràmetre indicatiu del límit de saturació de la unió, que es relacionaria amb la quantitat de proteïna que participa en la unió que està disponible en la membrana dels micoplasmes.

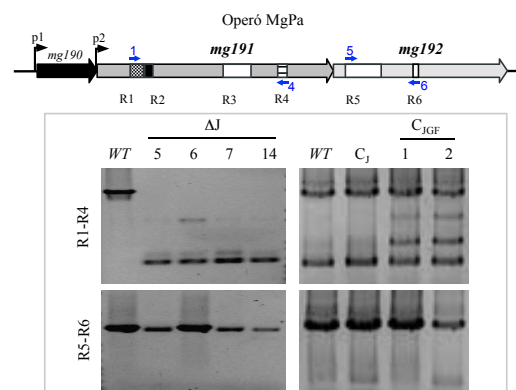
En aquest estudi es va analitzar la capacitat d'HA de les 3 soques mutants i la soca salvatge seguint el protocol descrit pels autors. D'aquesta forma, es van determinar experimentalment els paràmetres  $K_D$  i  $B_m$  per cadascuna de les soques (Figura III.6.B), a una concentració inicial constant de micoplasma igual per a tots els casos. Després, per poder comparar de forma senzilla i intuïtiva la capacitat d'HA de les soques mutants respecte la soca salvatge, s'ha definit el percentatge d'eficiència d'HA (EHA %) com la relació  $K_D/B_m$  de la soca mutant respecte la soca salvatge. D'aquesta forma, es va determinar que la soca  $C_J$  presenta una eficiència d'HA (EHA) del 104 % respecte la soca salvatge. En el cas de les soques  $\Delta J$  i  $C_{JGF}$  no es van poder determinar les eficiències d'HA de forma quantitativa, atès que el comportament de les soques no s'ajusta al model utilitzat, perquè són soques que no uneixen eritròcits tal com es va veure en l'assaig qualitatiu d'HA.

### I.3.3. Anàlisi de l'operó MgPa en els genomes dels mutants $\Delta J$ , $C_J$ i $C_{JGF}$

La deficiència en la capacitat d'adherència dels mutants  $\Delta J$  i  $C_{JGF}$  s'explica de forma senzilla per la pèrdua de les proteïnes P110 i P140 que hem observat en els perfils proteïcs. Ara bé, faltava determinar quina seria la causa que explicaria la pèrdua d'aquestes adhesines. Evidentment, donat que estem treballant amb mutants amb deficiències en una proteïna classificada com a proteïna J no es pot descartar el paper d'aquesta en l'estabilitat de les adhesines, però calia determinar primer que els clons analitzats no haguessin sofert recombinació en la regió de l'operó MgPa, on es localitzen els gens *mg191* i *mg192*, que codifiquen les proteïnes P140 i P110, respectivament, abolint així a nivell genòmic l'expressió de les adhesines, com hem explicat a l'apartat de variabilitat antigènica de la introducció.

El DNA genòmic dels diversos clons dels mutants  $\Delta J$  i  $C_{JGF}$  es va analitzar per PCR amb les parelles d'encebadors (a) R1p140 i R4p140 i (b) R5p110 i R6p110, per determinar si s'havia alterat l'operó MgPa per recombinació amb les caixes d'homologia presents en les illes d'homologia MgPaI, que pogués haver truncat algun dels dos gens d'interès, *mg191* i *mg192*, prevenint l'expressió de les adhesines P110 i P140 (Burgos *et al.*, 2006). En el cas dels quatre clons  $\Delta J$  analitzats es van detectar diferències clares en l'anàlisi de la PCR realitzada amb el parell d'encebadors (b), on s'analiza la regió del gen *mg192*, indicant que s'ha produït recombinació en aquesta regió de l'operó, tot i que aquesta no es pot especificar (Figura III.7). En l'anàlisi dels dos clons  $C_{JGF}$  s'observen diferències en l'anàlisi de la PCR (a) respecte la soca salvatge, suggerint que s'ha produït algun fenomen de recombinació en l'operó MgPa dels clons analitzats, com en els clons  $\Delta J$ . És per això que es va procedir a seqüenciar l'operó MgPa sencer dels dos clons per seqüenciació directe de genoma mitjançant una bateria d'encebadors seqüencials que permetria cobrir tota la regió (es pot veure la llista d'encebadors utilitzats en l'apartat de materials i mètodes). El resultat de la seqüenciació va revelar que en els dos casos s'havia produït recombinació entre les caixes R3 del gen *mg191* i l'illa de recombinació MgPaI IV del genoma, que introduïa un *frameshift* que truncava el gen *mg191*, amb conseqüències comparables a les d'un fenotip de CII (Mernaugh *et al.*, 1993; Burgos *et al.*, 2006).

**Figura III.7.** Anàlisi per PCR de l'operó MgPa. En la representació esquemàtica de l'operó s'ha indicat la posició dels encebadors utilitzats en les dues PCR. La primera, R1-R4, avalua el gen *mg191* i s'han utilitzat els encebadors 1 (R1p140) i 4 (R4p140). La segona avalua el gen *mg192* i s'han utilitzat els encebadors 5 (R5p110) i 6 (R6p110). Es mostren els resultat obtingut en l'anàlisi de la soca salvatge (*WT*), els quatre clons de la soca  $\Delta J$  (5, 6, 7 i 14). La soca  $C_J$  i els dos clons de la soca  $C_{JGF}$  (1 i 2).

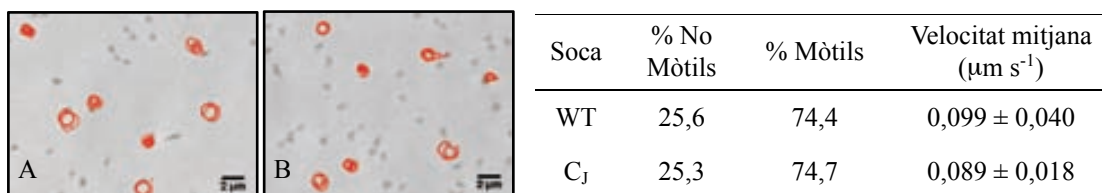


La soca C<sub>J</sub> també es va analitzar i, com s'esperava, donat que no té defectes d'adherència, no es van trobar diferències respecte la soca salvatge.

### I.3.4. Estudi de la motilitat dels mutants de MG200

Per últim, es va analitzar la motilitat del mutant C<sub>J</sub>. Els altres dos mutants de MG200 no es van poder incloure en aquest estudi davant la impossibilitat d'estudiar la motilitat de mutants no adherents.

La motilitat del mutant C<sub>J</sub> es va caracteritzar mitjançant estudis microcinematogràfics. L'anàlisi de 500 cèl·lules totals de la soca C<sub>J</sub> va demostrar que aquest mutant presentava un nombre equivalent de cèl·lules mòtils en comparació amb la soca salvatge (Figura III.8). A més a més, a partir de l'anàlisi de 200 cèl·lules mòtils de la soca C<sub>J</sub> es va determinar que la seva velocitat mitjana és de 0,089  $\mu\text{m s}^{-1}$ , un valor molt similar a l'obtingut en paral·lel per la soca salvatge (0,099  $\mu\text{m s}^{-1}$ ). No obstant, la diferència observada entre els valors de velocitat mitjana obtinguts per la soca C<sub>J</sub> i la soca salvatge són estadísticament diferents (p-valor < 0,05). Així podem dir que la soca C<sub>J</sub> presenta una velocitat mitjana que és el 90 % de l'observada per la soca salvatge.



**Figura III.8.** Estudis microcinematogràfics. Representació esquemàtica dels *tracks* enregistrats en la soca salvatge (A) i en la soca mutant C<sub>J</sub> de *M. genitalium* (B).

## Segona Part. Estudis de complementació de la soca C12

Gràcies a l'estudi realitzat amb les tres proteïnes MG200 mutants s'ha pogut determinar que la proteïna MG200 no només té un paper important en la maquinària de motilitat sinó que també està implicada en l'estabilitat de les adhesines principals de *M. genitalium*, les proteïnes P110 i P140. Amb els resultats analitzats fins al moment, sembla que aquestes dues funcions de la proteïna MG200 estarien associades a dues parts diferenciades de la mateixa; l'extrem amino-terminal, on trobem el domini J i la regió G/F, estaria implicada en l'estabilitat de les adhesines, mentre que la resta de la proteïna estaria implicada en motilitat.

De forma virtual sembla que les dues funcions assignades a la proteïna MG200 es poden relacionar amb fragments diferenciats de la mateixa. Seria possible separar les dues funcions escindint la proteïna en dos polipèptids independents?

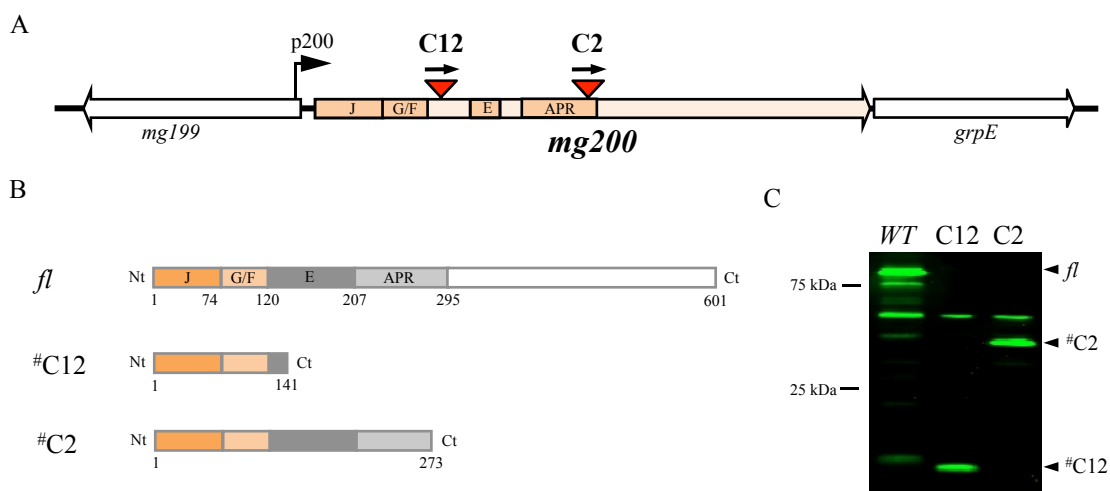
En aquesta segona part del capítol, es va plantejar estudiar aquesta última hipòtesi. L'objectiu era determinar si les dues fraccions de la proteïna MG200 eren funcionals per separat i de forma independent a l'altra fragment.

## II. Resultats

### II.1. Desenvolupament d'un anticòs policlonal contra la regió amino-terminal de la proteïna MG200 i revisió del perfil proteic dels mutants C2 i C12

Per caracteritzar la funcionalitat del fragment amino-terminal de la proteïna MG200, es va proposar revisar la caracterització dels mutants C2 i C12 (Pich, Burgos, Ferrer-Navarro, *et al.*, 2006). Aquests dos

mutants amb fenotip adherent i no mòtil, havien estat aïllats en un assaig de mutagènesi per transposició. L'estudi d'aquests mutants va determinar que tots dos tenien un transposó interrompent el locus *mg\_200* i en cap dels dos mutants es va detectar la proteïna MG200, mitjançant un Western blot amb un anticòs específic contra aquesta proteïna (Figura III.9). L'absència de proteïna MG200 en aquests mutants adherents contradiria fortament les conclusions dels resultats de la primera part d'aquest capítol. Ara bé, ja que les dues soques estaven generades per transposició, seria possible que expressessin un fragment amino-terminal de la proteïna MG200 que no seria reconeguda per l'anticòs utilitzat i que permetria explicar el fenotip adherent d'aquestes soques.



**Figura III.9.** (A) Representació esquemàtica de la regió del gen *mg200* en el genoma de *M. genitalium* (bases 236500-239900). El promotor del gen s'ha indicat amb una gran fletxa. Les regions del gen corresponents al domini J (J), a la regió rica en Gly i Phe (G/F), a la caixa EAGR (E) i el domini ric en prolines (APR) s'han ressaltat en caixes taronges. El punt d'inserció del minitransposó MT*tetM438* en els clons C12 (237771+) i C2 (238166+) s'ha indicat amb un triangle vermell invertit amb una fletxa que indica la orientació del transposó inserit (Pich, Burgos, Ferrer-Navarro, *et al.*, 2006). (B) Representació esquemàtica de la proteïna MG200 (*fl*) i dels fragments amino-terminal expressats per les soques C12 (#C12) i C2 (#C2). Els diferents dominis s'han marcat amb colors diferents. Els números indiquen a longitud de la seqüència en nombre d'aa. (C) Anàlisi per Western blot amb l'anticòs anti-J3GF, que reconeix la regió amino-terminal de la proteïna MG200. Els caps de fletxa senyalen els fragments #C12 i #C2, que fins ara no s'havien detectat.

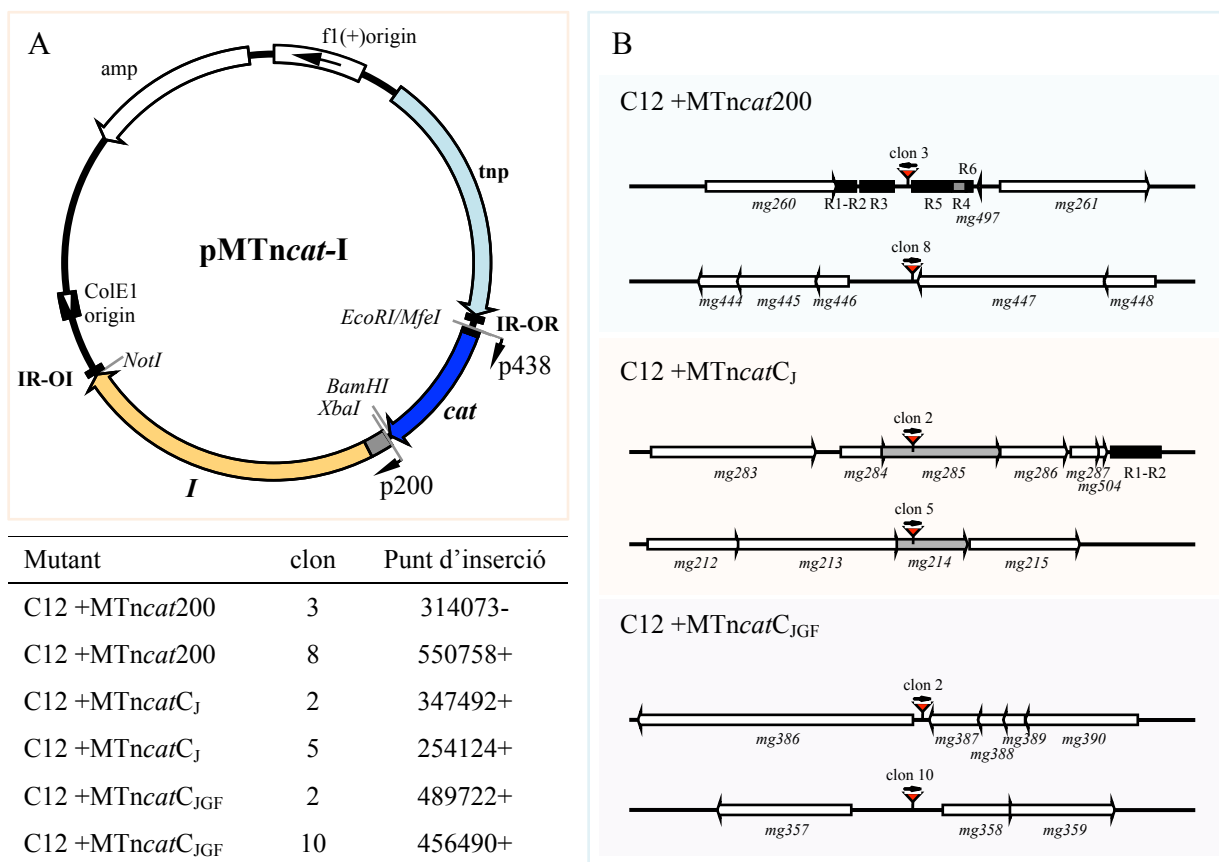
Aparentment, l'anticòs policlonal anti-MG200 de què disposàvem no podia reconèixer la regió amino-terminal de la proteïna. Per tant, es va generar un nou anticòs policlonal específicament contra la regió amino-terminal de la proteïna MG200 corresponent al domini J i la regió G/F, que anomenarem J3GF. Per l'obtenció d'aquest anticòs es va expressar de forma recombinant el fragment J3GF a *E. coli* i es va fer servir per immunitzar un ratolí. Amb aquest nou anticòs es van tornar a analitzar els perfils proteics dels mutants C2 i C12 per Western blot. En aquest cas, es va detectar una banda d'aproximadament 40 kDa en el mutant C2 i una d'aproximadament 15 kDa en el mutant C12. Com a control positiu d'aquest anàlisi es va incloure la soca salvatge i, com era d'esperar, es va detectar una banda de 87 kDa corresponent a la proteïna MG200 *full-length*. Les noves bandes detectades en les mostres dels mutants C2 i C12 coincidien bé amb la mida teòric esperat dels fragments amino-terminal de la proteïna MG200 que podrien expressar cadascun dels mutants, tenint en compte el punt d'inserció del minitransposó en el gen *mg200* en cada cas (Figura III.9.C).

Dels dos casos analitzats, és interessant el cas de la soca C12, ja que donat el punt d'inserció del minitransposó en el gen *mg200*, aquest mutant expressaria un fragment de tan sols 140 aa, que abastaria únicament el domini J i la regió G/F de la proteïna MG200. Aquesta soca és adherent i no s'han observat deficiències en els nivells d'expressió de les proteïnes P110 i P140 (Pich, Burgos, Ferrer-Navarro, *et al.*,

2006), pel que es suggereix que aquest petit fragment amino-terminal de la proteïna MG200 és suficient per establir les adhesines a *M. genitalium*.

## II.2. Disseny dels vectors pMTncat<sub>C<sub>J</sub></sub>, pMTncat<sub>C<sub>JGF</sub></sub> i pMTncat200 i assaig de transformació en el mutant C12

L'estudi del fragment carboxi-terminal de la proteïna MG200 es presentava amb més complicacions, ja que aquest fragment no és estable per sí sol, com s'ha comprovat amb la versió truncada MG200ΔJ. D'altra banda, cal tenir en compte que per poder estudiar la motilitat a *M. genitalium* és imprescindible que les soques d'estudi siguin adherents. Per això, l'estratègia consistiria en partir de la soca adherent C12 i estudiar la capacitat del fragment carboxi-terminal de la proteïna MG200 per restaurar la motilitat de la soca. Donat que com hem dit, aquest fragment no és estable, es faria servir la quimera C<sub>JGF</sub> com a model estable e la fracció carboxi-terminal de la proteïna MG200, ja que s'ha demostrat que no és capaç d'establir les proteïnes P110 i P140.



**Figura III.10.** Punts d'inserció dels minitransposons en la soca C12. **(A)** Esquema comú dels vectors pMTncat200, pMTncat<sub>C<sub>JGF</sub></sub> i pMTncat<sub>C<sub>J</sub></sub>, derivats del vector pMTncat (Figura I.10.A). La *I* indica insert i correspon al gen *mg200*, o el gen modificat *C<sub>J</sub>* o *C<sub>JGF</sub>*, respectivament (estan esquematitzats a la figura III.4.C). Les fletxes grans indiquen la posició del promotor p200 o p438. El triangle invertit blanc indica el lloc on s'ha deletat el domini de la caixa EAGR en el gen *mg200ΔE*. **(B)** Esquema dels llocs d'inserció dels minitransposons al genoma de la soca C12 en cadascun dels mutants. Els triangles invertits de color vermell indiquen el punt d'inserció. Les fletxes associades indiquen el sentit de la inserció del minitransposó: →, cadena + i ←, cadena -. El gen *mg285* és anotat com a proteïna conservada hipotètica i el *mg214* correspondria a una proteïna de condensació i segregació A la taula s'ha especificat la posició dels punts d'inserció.

Per poder determinar la capacitat de restauració de la motilitat de la soca C12 per part d'un fragment carboxi-terminal funcional i estable de la proteïna MG200, es va preparar un assaig de transformació del mutant C12 de *M. genitalium* amb els vectors pMTncat<sub>C<sub>JGF</sub></sub>, pMTncat<sub>C<sub>J</sub></sub> i pMTncat200. Aquests vectors

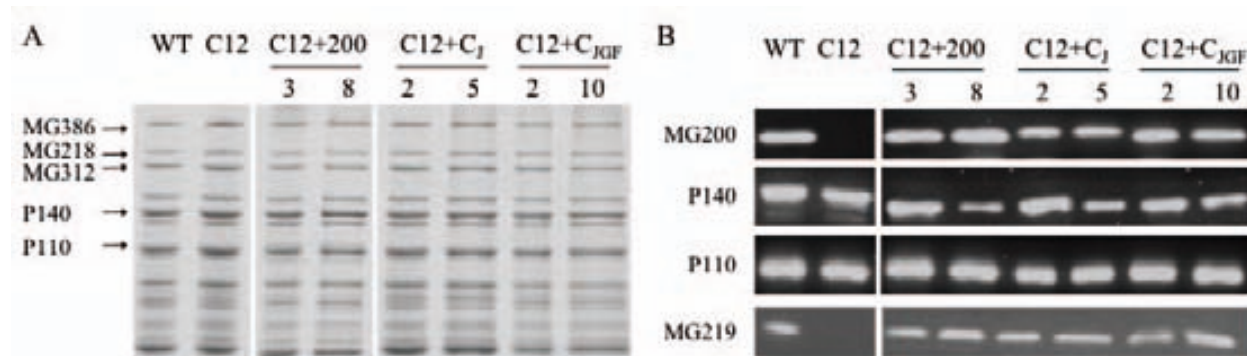
contenen el minitransposó *MTncat* modificat per incloure un dels fragments codificants per una de les dues quimeres o la versió salvatge de la proteïna MG200 (Figura III.10.A), de forma que en inserir-se en el genoma de les cèl·lules transformades s'incorpora la resistència a cloramfenicol juntament amb aquest fragment codificant per una de les versions de la proteïna MG200 en qüestió. En cadascuna de les tres transformacions es van aïllar a l'atzar deu colònies i d'aquestes es van seleccionar dos clons per ser analitzats en profunditat.

Els 6 clons seleccionats es van analitzar per seqüenciació directe de genoma amb l'encebador CmUp, per determinar els punts d'inserció del minitransposó. En la majoria dels casos es va determinar que el minitransposó s'havia inserit en una regió intergènica i en cap cas es va trobar que aquest hagués afectat cap gen relacionat prèviament amb la maquinària de motilitat o adherència (Regula *et al.*, 2001; Pich, Burgos, Planell, *et al.*, 2006; Hasselbring *et al.*, 2006) (Figura III.10.B). També per seqüenciació directe del DNA genòmic d'aquests clons amb l'encebador CmDown es va confirmar la presència del fragment codificant per les proteïnes mutants i amb l'encebador TetTown es va descartar la possible remobilització del transposó *MTtet438* de la soca parental, C12, deguda a l'expressió transitòria de la transposasa durant la nova transformació (dades no mostrades).

### II.3. Perfil proteic dels mutants derivats de la soca C12 amb una de les versions de proteïna MG200

Per Western blot amb l'anticòs policlonal de ratolí contra la proteïna MG200, es van analitzar els dos clons seleccionats en cadascuna de les tres transformacions de la soca C12 i es va confirmar l'expressió de la proteïna derivada de MG200 corresponent ( $C_{JGF}$ ,  $C_{JGF}$  o MG200) introduïda per transposició en nivells comparables als observats per la proteïna MG200 en la soca salvatge (Figura III.11).

L'anàlisi dels perfils proteics mitjançant SDS-PAGE d'aquests mutants derivats de la soca C12 no mostra diferències respecte la soca salvatge. A més a més, per Western blot amb un anticòs policlonal de ratolí específic contra la proteïna MG219, també es va constatar en tots els casos la recuperació de la proteïna MG219, que està disminuïda en el clon parental (Figura III.11.B). I, finalment, cal destacar que en cap cas es van detectar deficiències en els nivells d'expressió de les dues adhesines, P110 i P140, com ja s'havia demostrat en el cas de la soca parental C12.



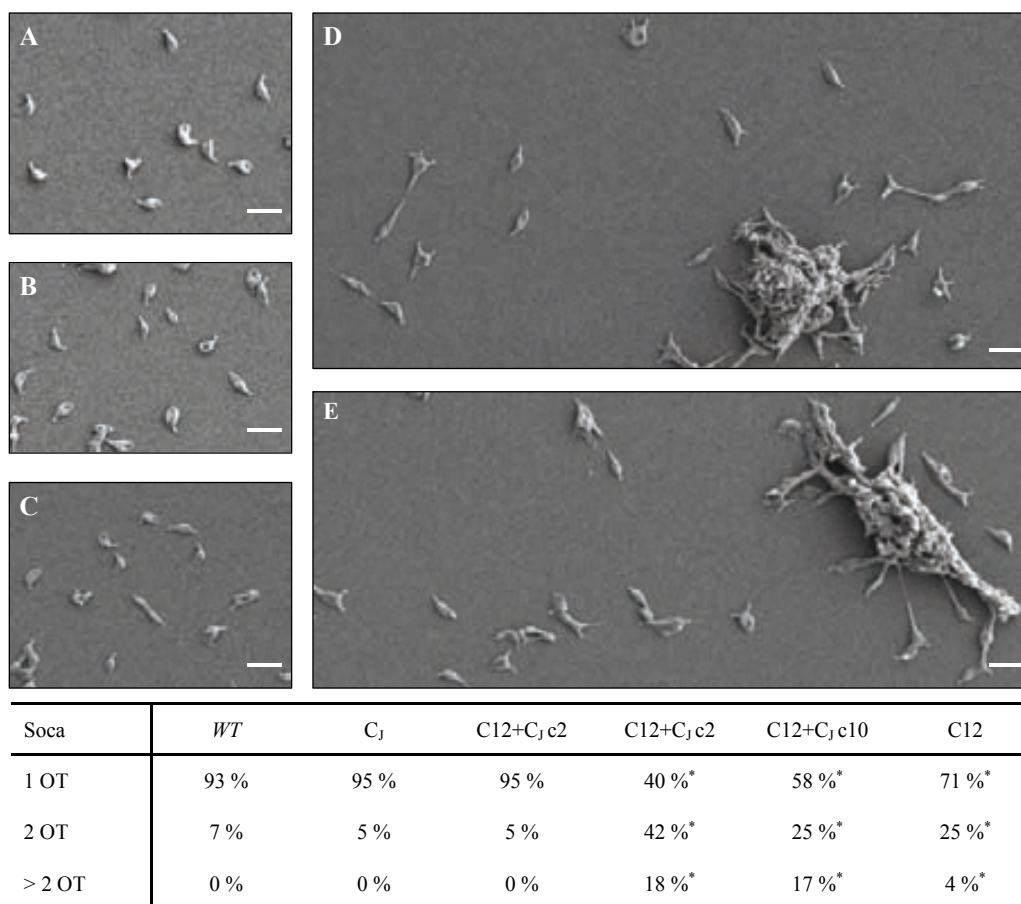
**Figura III.11.** Perfil proteic de la soca salvatge (*WT*), la soca parental C12 i les soques C12 amb la proteïna MG200 (*C12+200*), amb la quimera CJ (*C12+CJ*) o amb la quimera CJGF (*C12+CJGF*) de *M. genitalium*. Els números indiquen el clon mostrat. **(A)** SDS-PAGE 7.5 %. Les fletxes indiquen les bandes corresponents a proteïnes de l'OT. **(B)** Anàlisi per Western blot amb els anticossos anti-MG200, anti-P140, anti-P110 i anti-MG219.

### II.4. Estudi de la morfologia de les cèl·lules per microscòpia de rastreig

La Morfologia cel·lular de les soques C12 i derivades es va analitzar per microscòpia electrònica de rastreig (Figura III.12). Per l'anàlisi es van créixer cèl·lules de cadascuna de les soques d'estudi en "cubres" de vidre rodons durant 16 h en condicions estàndard de cultiu. Les cèl·lules es van fixar amb

una solució de glutaraldehid al 1 % i es va procedir amb el protocol de deshidratació i metalització, descrit a l'apartat de materials i mètodes. L'observació es va realitzar amb el microscopi electrònic de rastreig Zeiss Merlin.

En l'anàlisi de la soca C12 es van poder observar un elevat nombre d'agregats cel·lulars o cenòcits gegants (Daubenmire, 1936). En quant a les cèl·lules individuals que s'han pogut observar de la soca C12, com ja s'havia descrit amb anterioritat<sup>5</sup> (Pich *et al.*, 2009), s'observa un elevat percentatge d'individus que presenten és d'una OT (29 % MOT) en comparació amb la soca salvatge, on s'ha determinat que només el 7 % de la població de cèl·lules individuals estudiada presentava dues OT. Cal dir, que en el cas de la soca salvatge és possible trobar cèl·lules amb dues OT en individus en procés de divisió cel·lular, però és rar trobar cèl·lules amb més de dues OT, a diferència de la soca C12 on s'han trobat individus amb tres i fins a 4 OT.



**Figura III.12.** Micrografies per microscòpia electrònica de rastreig de la soca salvatge (A) i dels mutants C<sub>J</sub> (B), C12+C<sub>J</sub> clon 2 (C), C12+C<sub>J</sub> clon 2 (D) i de la soca parental C12 (E). Barres d'augment, 1 μm. OT, organela terminal. A la taula, l'asterisc senyala els valors estadísticament diferents als valors de la soca salvatge (p < 0,0001).

Les cèl·lules de les soques derivades de C12 que expressen la proteïna MG200 o la quimera C<sub>J</sub> presenten la mateixa morfologia cel·lular que les cèl·lules de la soca salvatge i no s'observen diferències significatives en quant a la presència d'agregats o cèl·lules MTO. En canvi, en el cas de la soca C12 que expressa la quimera C<sub>JGF</sub> s'observa un fenotip similar al de la soca parental C12, perquè s'observa una elevada presència d'agregats o cenòcits i cèl·lules amb reminiscències de cues, derivades segurament del procés de divisió. En l'anàlisi de les cèl·lules individuals dels dos clons C12+ C<sub>JGF</sub> s'ha observat un

<sup>5</sup> Els valors presentat són els obtinguts en l'anàlisi que es va realitzar en aquest treball. S'han comparat amb els valors publicats per Pich *et al.*, 2009 i no són estadísticament diferents (p > 0,5).

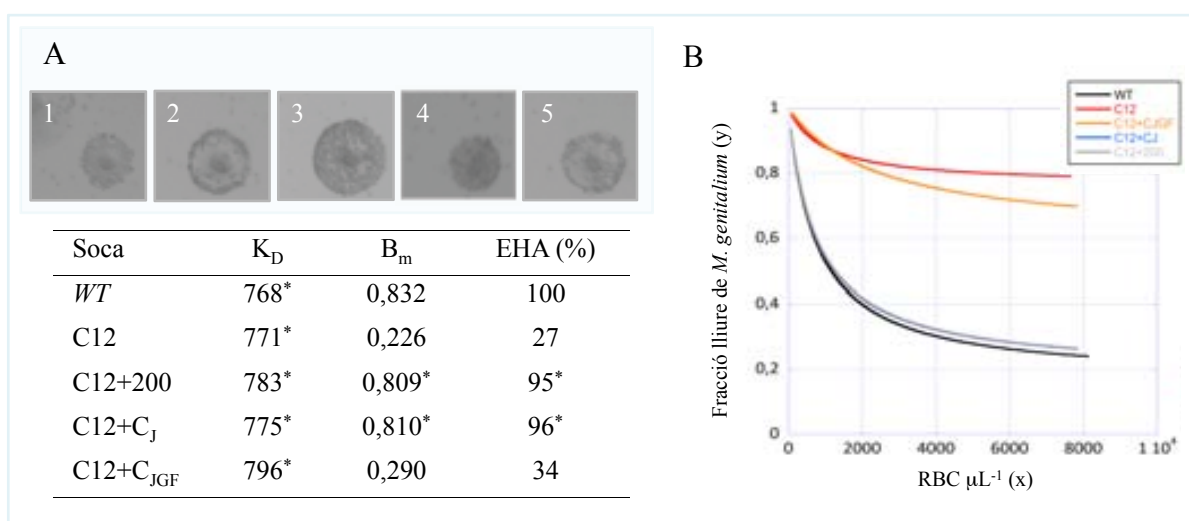


augment significatiu d'individus amb més d'una OT. En el cas del clon 2 fins al 60 % dels individus analitzats eren MOT, essent que terç d'aquest presentaven més de dues OT. En el cas del clon 10, aquests valors són una mica més moderats, però tot i així tenim un 42 % d'individus MOT. Val a dir, que el reduït nombre de cèl·lules individuals observades, fa que aquests percentatges es basin en la quantificació de menys de 100 individus.

## II.5. Estudi de la capacitat d'Hemadsorció

Mitjançant un assaig d'HA qualitativa es va analitzar la capacitat d'unió d'eritròcits de les colònies de les soques derivades de la soca C12 (Figura III.13.A). En tots els casos es va determinar que eren HA positives, com la soca parental. Ara bé, en el cas de la soca C12 o dels clons analitzats de la soca C12 amb la quimera C<sub>JGF</sub> es pot observar com les colònies uneixen eritròcits, però no queden completament cobertes per aquests, a diferència del que s'observa en el cas de la soca salvatge. Aquest fenomen, ja es va observar amb els mutants C2 i C12 (Pich, Burgos, Ferrer-Navarro, *et al.*, 2006), però donat que la unió d'eritròcits era positiva es van considerar soques amb competitivitat en adherència.

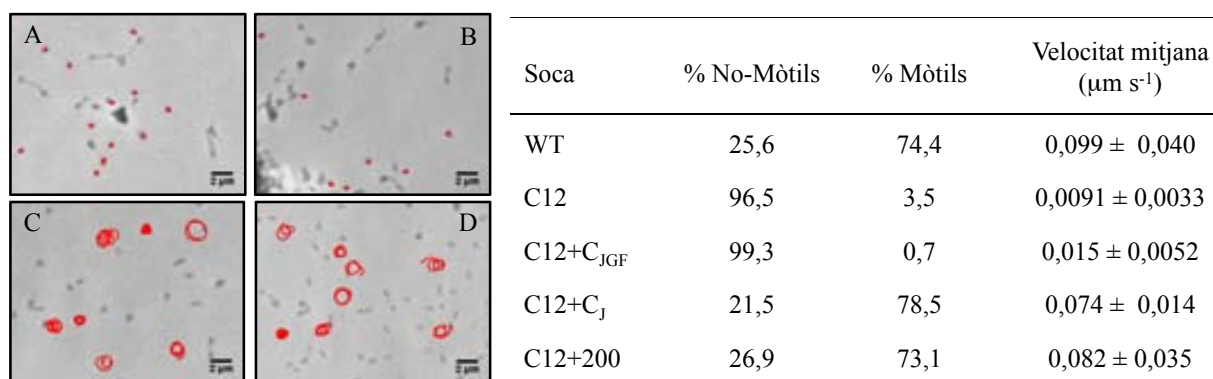
Donades les diferències morfològiques de les soques C12 i derivades que es van observar per SEM, es va decidir quantificar la capacitat d'HA pel mètode de citometria (Figura III.13.B). Com s'esperava, en el cas de les soques derivades de la C12 amb la proteïna MG200 o la quimera C<sub>J</sub> no presenten diferències en eficiència d'HA respecte la soca salvatge ( $K_D$  i  $B_m$  semblants en els tres casos). Ara bé, tant en l'anàlisi de la soca C12 com en el cas de la soca C12 amb la quimera C<sub>JGF</sub> es van determinar eficiències d'HA inferiors al 40 %. El valor estimat de la constant  $K_D$  d'aquestes dues soques mutants no és estadísticament diferent a la de la soca salvatge. En canvi, el valor de la constant  $B_m$  estimada en aquests dos casos és molt inferior al de la soca salvatge, suggerint que aquesta reducció de la capacitat d'adherència estaria relacionada amb la presència d'agregats en les motres analitzades.



**Figura III.13. (A)** Assaig d'HA qualitativa en colònies de la soca salvatge (1) i de les soques mutants C12 (2), C12+200 (3), C12+C<sub>J</sub> (4) i 200+C<sub>JGF</sub> (5) de *M. genitalium* amb hRBC. **(B)** Representació gràfica de l'HA quantitativa amb una concentració inicial de micoplasmes constant i concentracions creixents de hRBC. A la taula s'han especificat els valors  $K_D$  i  $B_m$  de cada soca analitzada, així com l'eficiència d'HA (EAH). L'asterisc senyala els valors que no són estadísticament diferents als obtinguts en l'anàlisi de la soca salvatge ( $p$ -valor < 0,05).

## II.6. Microcinematografies

La motilitat exhibida per les cèl·lules individuals d'un dels clons de cadascuna de les soques d'estudi en aquesta segona part del capítol, es va analitzar mitjançant microcinematografies.



**Figura III.14.** Estudis microcinematogràfics. Representació esquemàtica dels *tracks* enregistrats en la soca parental C12 (Pich, Burgos, Ferrer-Navarro, *et al.*, 2006) (A) i de la soca C12 amb la quimera C<sub>JGF</sub> (B), la soca C12 amb la proteïna MG200 (C) i la soca C12 amb la quimera C<sub>J</sub> (D). Es pot apreciar que en els casos A i B les cèl·lules no es desplacen, els *tracks* es redueixen a punts.

Es van analitzar 500 cèl·lules individuals per determinar el percentatge de cèl·lules mòtils i un mínim de 200 cèl·lules mòtils per determinar la velocitat mitjana exhibida per les cèl·lules individuals de cadascuna de les soques d'estudi. En els resultats obtinguts (Figura III.14), es va poder determinar que la motilitat del mutant C12 només es va poder restaurar amb la reintroducció de la versió salvatge de la proteïna MG200 o la quimera C<sub>J</sub>. En ambdós casos els mutants recuperen el percentatge de cèl·lules mòtils i una velocitat mitjana molt propera a la de la soca salvatge, però estadísticament diferent ( $p$ -valor  $< 0,05$ ). En el cas del mutant C12 amb la quimera C<sub>JGF</sub> no s'observen diferències respecte la soca parental C12. En aquests dos casos, de forma similar al que s'ha vist en l'apartat anterior, s'observen molts agregats de cèl·lules en les cinematografies i és difícil estudiar les cèl·lules individuals. No obstant, les diferències de comportament amb la soca salvatge són clarament significatives.

## Discussió

La proteïna MG200 és un element important de la maquinària de motilitat de *M. genitalium*. La interrupció del locus MG\_200 per la inserció de transposó dona lloc a mutants adherents, però amb un fenotip no mòtil (soques C2 i C12) (Pich, Burgos, Ferrer-Navarro, *et al.*, 2006). És per això que, fins ara, s'ha defensat que aquesta proteïna no està implicada en la capacitat de citadherència del micoplasma. En contrast amb aquests resultats, s'ha descrit que la pèrdua de la proteïna TopJ de *M. pneumoniae*, considerada ortòloga de la proteïna MG200, provoca la pèrdua de la capacitat d'adherència de la cèl·lula (Cloward and Krause, 2009). La generació d'un nou anticòs policlonal contra la regió amino-terminal de la proteïna MG200 ha permès realitzar una anàlisi per Western blot amb què s'ha demostrat la presència de fragments amino-terminals de la proteïna en les soques mutants C2 i C12, fins ara considerades defectives totals en MG200. Això, en primer lloc posa en evidència que l'anticòs policlonal contra la proteïna MG200 de què es disposava fins ara, només reconeix la regió carboxi-terminal de la proteïna. Ara bé, el que és interessant és que aquest resultat posava en evidència que les diferències de fenotip observades entre els defectius de TopJ de *M. pneumoniae* i els defectius de MG200 de *M. genitalium* era conseqüència de l'expressió de fragment truncats de la proteïna MG200 a *M. genitalium* i posava en relleu la possible implicació de la proteïna MG200 en la citadherència del micoplasma.

Els fragments amino-terminals de la proteïna MG200 que expressen els mutants C2 i C12 tenen en comú el domini J i una la regió G/F, que hem descrit en aquest treball. Donades les característiques fenotípiques d'aquestes dues soques mutants, aquests dominis de la proteïna haurien de ser els responsables de la seva capacitat adherent. Aquests dominis estan relacionats amb les proteïnes J, que estan estretament

relacionades amb les xaperones DnaK (Walsh *et al.*, 2004). Concretament, s'ha descrit que els dominis J interaccionen amb la DnaK, de forma que es modifica la conformació de la subunitat catalítica estimulada la seva activitat ATPasa afavorint la hidròlisi de l'ATP i, per altra banda, afavoreixen la unió del substrat a la subunitat d'unió de la DnaK (Suh *et al.*, 1999). Les regions G/F associades de les proteïnes J estan menys caracteritzades funcionalment. S'havien considerat regions *linker* entre el domini J i la resta de dominis de les proteïnes J, vinculats amb la unió a substrat, generalment són pèptids desplegats (Szabo *et al.*, 1996). No obstant, s'ha comprovat que aquestes regions podrien tenir un paper més específic com a reguladors auxiliars de l'activació del domini d'unió a substrat de la DnaK, atorgant especificitat de substrat a la reacció (Wall *et al.*, 1995; Yan and Craig, 1999). També s'ha vist que podrien unir pèptids plegats total o parcialment (Perales-Calvo *et al.*, 2010).

Es ben coneguda l'estreta vinculació d'aquests dominis amb les funcions de les proteïnes xaperones, però no és tant clara la funció que tindran aquests dominis en una proteïna relacionada amb la motilitat de *M. genitalium*. Per determinar de quina forma intervenen aquests dominis en l'adherència del micoplasma en aquest treball s'han estudiat els efectes de la deleció o substitució d'aquests dominis sobre la funció global de la proteïna MG200.

En primer lloc, s'ha comprovat que la deleció del domini J de la proteïna, provoca la desestabilització i pèrdua de tota la proteïna MG200 i la conseqüent disminució dels nivells de proteïna MG219 (Pich, Burgos, Ferrer-Navarro, *et al.*, 2006; Calisto *et al.*, 2012). D'altra banda, s'ha comprovat que la substitució dels dominis amino-terminal de la proteïna MG200, per dominis homòlegs de la proteïna MG019, no afecta l'estabilitat de la proteïna i permet mantenir els nivells d'expressió de la proteïna MG219. D'aquesta forma es posa de manifest que és essencial la presència d'un domini J per l'estabilitat de la pròpia proteïna MG200. Això suggereix que podria tenir un paper d'auto xaperona, però no sembla molt probable, donat que en el cas de TopJ, la inactivació del triplet catalític HPD del domini J (Cheetham and Caplan, 1998) no provoca la desestabilització de la pròpia proteïna (Cloward and Krause, 2009).

El fenotip exhibit pels mutants  $\Delta J$  de *M. genitalium* era clarament no adherent. L'anàlisi del perfil proteic d'aquest mutants demostrava que era la conseqüència de la pèrdua de les adhesines P110 i P140, essencials per la capacitat d'adherència (Burgos *et al.*, 2006). Ara bé, el que va ser sorprenent és que només un 30% dels clons aïllats en la transformació de *M. genitalium* amb el vector pBAJ haguessin incorporat la deleció de la regió codificant pel domini J de la proteïna MG200 en el genoma i, més sorprenent encara, la constatació de que tots els mutants  $\Delta J$  obtinguts presentin recombinació en l'operó de les adhesines, de forma que se suprimeix l'expressió d'aquestes proteïnes, de forma similar als mutants espontanis CI i CII (Burgos *et al.*, 2006). Cal afegir que s'ha observat que els cultius d'aquests mutants  $\Delta J$  creixen significativament més lentament que la soca salvatge, tot i que no s'ha determinat encara el temps de duplicació. Si bé és cert que el nombre de clons aïllats en la transformació no és prou elevat per fer una bona estadística, les xifres obtingudes suggereixen que la deleció del domini J de la proteïna MG200 té un impacte en l'estabilitat de les adhesines, que probablement les fa tòxiques, de forma que s'afavoreix la selecció dels clons que han produït recombinació en l'operó MgPa, suprimint així l'expressió d'aquestes proteïnes.

La relació entre la proteïna MG200 i l'estabilitat de les adhesines es va analitzar també en les soques mutants  $C_J$  i  $C_{JGF}$ . En l'estudi de la soca  $C_J$  no es trobar cap alteració en els nivells d'expressió de les proteïnes relacionades amb la formació de l'organela terminal. El nivell d'expressió de les adhesines era normal, respecte la soca salvatge i, de fet, es va observar un petit augment del 5% en la capacitat d'HA de la soca  $C_J$ , que podria indicar que l'afinitat dels dos dominis J per la proteïna DnaK és lleugerament diferent. D'altra banda, es va trobar una disminució del 10% en la velocitat mitjana de les cèl·lules mòtils

d'aquesta soca mutant, però no mostrava una variació del percentatge de cèl·lules mòtils. Això podria ser degut a una petita disminució del nivell d'expressió de la proteïna quimèrica en la soca mutant. No obstant, es pot concloure que el mutant C<sub>J</sub> no mostra cap diferència fenotípica significativament diferent a la soca salvatge i, per tant, que la substitució del domini J de la proteïna MG200 pel domini ortòleg de la proteïna MG019 en la quimera C<sub>J</sub> no altera la funció global de la proteïna MG200. A diferència de la quimera C<sub>J</sub>, la substitució de la proteïna MG200 per la quimera C<sub>JGF</sub> a *M. genitalium* provoca un fenotip equivalent a l'observat amb la deleció del domini J de la proteïna. Els dos clons analitzats de la soca C<sub>JGF</sub>, expressen la quimera de forma estable, però presenten la pèrdua de les dues adhesines P140 i P110 i, en tots dos casos, es va demostrar que aquesta pèrdua estava causada per la introducció d'un *frameshift* en el gen *mg191* degut a la recombinació de l'operó MgPa i la MgPaI IV.

La presència de la recombinació en l'operó MgPa omnipresent en els mutants ΔJ i també C<sub>JGF</sub>, no permet afirmar que la proteïna MG200 sigui la responsable de la pèrdua de les adhesines. No obstant, el fet que tots els clons aïllats en aquest treball, que són defectius en proteïna MG200, degut a la deleció del seu domini J, o que tenen modificada la regió G/F d'aquesta mateixa proteïna, presentin aquesta modificació en l'operó de les adhesines, suggereix que és un procés regulat i que està desencadenat per la pèrdua de l'activitat del domini amino-terminal de la proteïna MG200. I en conjunt, els resultats obtinguts a partir dels mutants ΔJ i de l'estudi de les quimeres, suggereixen que la proteïna MG200 està relacionada amb l'estabilització de les adhesines de *M. genitalium*. No es pot afirmar però que aquesta relació sigui a causa d'una interacció directe entre les proteïnes, però sembla estar vinculada amb la presència d'un domini J i la regió G/F específica de la proteïna MG200. Si acceptem que la recombinació de l'operó MgPa és un fenomen regulat, es pot suggerir que l'estabilitat o l'expressió de les adhesines depèn de que la proteïna MG200 presenti un domini J en el seu extrem amino-terminal seguit de la regió G/F específica de la proteïna MG200.

Com hem recalcat, no s'ha demostrat una interacció directe de proteïna MG200 amb les adhesines. Ara bé, la relació que es proposa entre els dominis amino-terminal de la proteïna MG200 i les adhesines, així ho suggereix. La presència d'un domini J a la proteïna MG200 indica que pot interaccionar amb la proteïna DnaK, tot i que encara no s'ha pogut demostrar empíricament. De fet, la identificació de la xaperona DnaK en la fracció insoluble en TX-100, on es van trobar també la majoria de les proteïnes del citoesquelet de *M. pneumoniae* (Regula *et al.*, 2001), suggeria que aquesta proteïna podria tenir-hi un paper relacionat. Donat que la DnaK és estructuralment homòloga a l'actina (Flaherty *et al.*, 1991), la presència de la DnaK en el "Triton shell" no descarta que aquesta proteïna realment formi part del citoesquelet d'aquests micoplasmes. No obstant, el sistema de xaperones DnaK/DnaJ/GrpE s'ha relacionat amb l'assemblatge de complexos macromoleculars i, per això, es proposava que podria intervenir en la formació de l'organela terminal (Cloward and Krause, 2009). Donat que la proteïna MG200 és l'única de les tres proteïnes J de *M. genitalium* que s'ha localitzat a l'organela terminal, si la DnaK té un paper en la formació d'aquesta, seria lògic pensar que el seu *partner* fos la proteïna MG200. Una altra dada que relacionaria la proteïna MG200 amb l'activitat xaperona és que se sobreexpressa en condicions d'estrès tèrmic (Musatovova *et al.*, 2006). Si la proteïna MG200 participa en alguna funció relacionada amb l'activitat xaperona de la DnaK, de moment no s'ha demostrat, perquè els mutants defectius en proteïna MG200 són també defectius en adhesines i en absència d'aquestes no es forma l'organela terminal (Burgos *et al.*, 2006). D'altra banda, hi ha els mutants C2 i C12, fins ara considerats defectius en MG200, però que hem demostrat que expressen fragments amino-terminal de la proteïna.

Una revisió de l'anàlisi del mutant C12 ha demostrat que el fragment amino-terminal de la proteïna MG200 que expressa aquesta soca és necessari i suficient per mantenir els nivells d'expressió de les adhesines. Aquest fragment de 140 aa és funcional de forma independent a la resta de dominis de la

proteïna i conté únicament el domini J i la regió G/F de la proteïna MG200. És interessant destacar que és equivalent al fragment mínim de proteïna DnaJ capaç d'activar la DnaK a *E. coli*, tot i que amb una eficiència menor respecte la de la proteïna sencera (Wall *et al.*, 1994).

Donat que no s'aprecien defectes d'expressió de les adhesines, la capacitat d'adherència de la soca C12 només havia estat avaluada a nivell qualitatiu. Qualitativament, les diferències entre la soca C12 i la soca salvatge no semblen importants, la soca C12 uneix eritròcits. En canvi, aquí es va fer una avaluació quantitativa de l'HA pel nou mètode del citòmetre. Els resultats obtinguts van ser en primer lloc sorprenents. L'EHA era inferior al 50% de la soca salvatge i aquesta és una diferència molt significativa de la capacitat d'unir eritròcits, que no s'havia constatat qualitativament. Ara bé, en detall es va comprovar que el valor de  $K_D$  no era estadísticament diferent al valor obtingut per la soca salvatge, suggerint que les adhesines estaven correctament plegades. Les diferències eren degudes a la  $B_{max}$  i això era indicatiu d'una mostra heterogènia. És per això que es va revisar la morfologia de les cèl·lules d'aquesta soca mutant. Ara bé, de l'anàlisi que s'ha fet per microscòpia electrònica de rastreig destaquen l'elevat nombre de macroagregats cel·lulars. De fet semblen cenòcits gegants, que serien un indicatiu de que el mutants no s'està dividint bé. Aquesta observació sembla conseqüència d'una mala localització de les adhesines que no permetria la correcta formació d'òrganes terminals i explicaria l'heterogeneïtat de la mostra analitzada per citometria. En canvi, les cèl·lules individuals que es van poder observar en la mostra no presentaven alteracions morfològiques que indiquessin possibles defectes estructurals de organela terminal. Aquest resultat concorda amb el perfil proteic del mutant C12 és molt similar al de la soca salvatge i també amb el fet que la KD determinada en l'anàlisi d'HA no sigui diferent a la de la soca salvatge. Sembla que, tot i ser un procés més lent, les cèl·lules de la soca C12 aconsegueixen dividir-se. En aquest sentit, s'ha descrit que la soca C12 presenta un percentatge major de cèl·lules amb més d'una organela terminal i s'ha suggerit que és conseqüència del fenotip no mòtil del mutant (Pich *et al.*, 2009).

Els dominis J no només intervenen en el plegament de proteïnes natives, sinó que participen en funcions més complexes com l'estabilitat l'assemblatge i la regulació de complexos macromoleculars. Per exemple, la interacció de les proteïnes J amb fragments hidrofòbics de les proteïnes ajuda a prevenir l'agregació i permet la formació de complexos (Lemmon, 2001; Hartl and Hayer-Hartl, 2002; Liu *et al.*, 2007). El fenotip heterogeni de la soca C12, suggereix que la proteïna MG200 podria estar implicada, no en el plegament pròpiament de les adhesines, sinó en la translocació d'aquestes a la membrana. Aquest seria un procés depenent de la DnaK i, evidentment, també requeriria la GrpE, però cal dir que aquesta proteïna també s'ha pogut localitzar a l'organela terminal de *M. genitalium* (Martínez Mariscal, 2013).

La possible participació de la proteïna MG200 en la translocació de les adhesines estaria en acord amb els estudis sobre la proteïna TopJ de *M. pneumoniae*. Els mutants defectius en TopJ de *M. pneumoniae*, no perden l'adhesina P1 (Cloward and Krause, 2009), a diferència del que hem observat a *M. genitalium*, on la supressió de l'expressió de proteïna MG200 sembla anar acompanyada de la pèrdua de les adhesines. A *M. pneumoniae* s'ha proposat que la proteïna TopJ, associada amb la proteïna HMW1, participaria en la translocació de la P1 a l'organela terminal on interaccionaria amb la DnaK per facilitar el seu correcte plegament i/o translocació a la membrana on assoliria la conformació funcional (Cloward and Krause, 2011).

Teories apart, s'ha demostrat l'estreta relació entre la regió amino-terminal de la proteïna MG200 i l'estabilitat de les adhesines de *M. genitalium* i, per tant, de forma indirecte la proteïna MG200 està relacionada amb la capacitat d'adherència d'aquest microorganisme. No obstant, amb els resultats obtinguts fins al moment semblava interessant que les dues funcions associades a la proteïna MG200 es podien assignar a regions separades de la proteïna. Per una banda, els dominis de MG200 que fins ara s'han relacionat amb la motilitat es concentren a la regió carboxi-terminal de la proteïna (Pich, Burgos,

Ferrer-Navarro, *et al.*, 2006; Calisto *et al.*, 2012). D'altra banda, el domini J i la regió G/F, que acabem de relacionar amb l'estabilitat de les adhesines, es troben a la regió amino-terminal de la proteïna MG200.

El fragment que conté el domini J i la regió G/F de la proteïna MG200 és estable i funcional de forma independent a la regió carboxi-terminal. En canvi, s'ha demostrat que l'estabilitat de la regió carboxi-terminal depèn de la presència del domini J. No obstant, això no demostrava que el domini J i la regió G/F de la proteïna MG200 estiguessin implicats en la motilitat del micoplasma i, al mateix temps, tampoc es podia descartar. Gràcies a les propietats de les quimeres C<sub>J</sub> i C<sub>JGF</sub>, s'ha pogut aprofundir en el rol dels dominis amino-terminal en la motilitat de *M. genitalium*. Aprofitant que la soca C12 és adherent però no mòtil, s'ha estudiat la capacitat de les quimeres per restablir la motilitat de la soca.

La soca mutant C12 va es va transformar amb transposons que portaven o bé una còpia del gen que codifica per la quimera C<sub>J</sub> o per la quimera C<sub>JGF</sub> o, com a control, es va reintroduir també una còpia del gen *mg200* salvatge. La reintroducció d'aquestes proteïnes a la soca C12 va permetre la restauració de l'expressió de la proteïna MG219, que estava disminuïda en la soca parental, confirmant un cop més que l'estabilitat d'aquesta proteïna depèn de la regió carboxi-terminal de la proteïna MG200 (Pich, Burgos, Ferrer-Navarro, *et al.*, 2006; Calisto *et al.*, 2012) i que, al mateix temps, és independent dels dominis amino-terminal de la mateixa. De fet, el perfil proteic global del mutant C12 un cop reintroduïda una de les 3 versions de la proteïna MG200 era indistingible entre ells o de la soca salvatge. Cal destacar que en tots els casos s'observen nivells normals de les adhesines, com s'havia descrit en el cas del mutant C12 (Pich, Burgos, Ferrer-Navarro, *et al.*, 2006). Tot i així, es va analitzar l'efecte de la reintroducció de les quimeres o la versió salvatge de la proteïna MG200 en el fenotip de la soca parental. En el cas de la quimera C<sub>J</sub> i de la proteïna MG200 salvatge, es va comprovar que permetien complementar tots els aspectes del fenotip de la soca C12, recuperant la capacitat d'HA a nivells de la soca salvatge i, també, en l'estudi morfològic de les cèl·lules va mostrar com es reduïa la presència d'agregats cel·lulars en les mostres analitzades i les cèl·lules individuals majoritàriament presentaven una única organela terminal, com en el cas de la soca salvatge. En contrast, la soca C12 no va complementar cap dels aspectes del seu fenotip amb la quimera C<sub>JGF</sub>. De fet, en l'anàlisi morfològic es van trobar un elevat nombre de cèncocits i de cossos cel·lulars units per filaments a aquests agregats. A més a més, entre el reduït nombre de cèl·lules aïllades que es van poder analitzar, es va trobar un percentatge sorprenentment elevat de individus que presentaven més de dues organelles terminals. Es confirma que la quimera C<sub>JGF</sub> no és capaç de suplir les funcions de la proteïna MG200, específicament relacionades amb l'estabilitat de les adhesines i, donada l'asseveració d'alguns aspectes del fenotip, suggereix que estaria interferint en la capacitat del fragment truncat de proteïna MG200 present en la soca parental per estabilitzar les adhesines, possiblement per competició en la interacció amb la DnaK.

Aquests resultats concorden perfectament amb els resultats obtinguts en l'anàlisi de la motilitat que es va fer d'aquests mutants. La reintroducció de la proteïna MG200 o com de la quimera C<sub>J</sub>, permet restaurar la motilitat de la soca parental. Aquest resultat confirma que la quimera C<sub>J</sub> restaura tota l'activitat de la proteïna MG200. En canvi, cal destacar que la quimera C<sub>JGF</sub> no va permetre la restauració de la motilitat de la soca parental.

La introducció per transposó de la quimera C<sub>JGF</sub> en la soca C12, dona lloc a un mutant que expressa dos fragments independents de la proteïna MG200. Per una banda, presenta l'expressió del fragment amino-terminal de 140 aa present en la soca parental, que permet estabilitzar les adhesines donant lloc a un fenotip adherent. D'altra banda, l'expressió de la quimera C<sub>JGF</sub>, tot i que s'ha demostrat que no permetria estabilitzar les adhesines, sí permet estabilitzar els dominis carboxi-terminal de la proteïna MG200, relacionats amb la maquinària de motilitat. El fet que la quimera C<sub>JGF</sub> no restauri la motilitat de la soca parental, a diferència del que s'ha observat al reintroduir la quimera C<sub>J</sub>, suggereix que la regió G/F de la

proteïna MG200 és necessària no només per l'estabilitat de les adhesines, sinó també per la motilitat del micoplasma.

Tots els resultats en conjunt demostren que la proteïna MG200 està implicada en la motilitat de *M. genitalium*, però també té un important paper en la citadherència del micoplasma, perquè és necessària per l'estabilitat de les adhesines.

Les funcions d'adherència i motilitat de *M. genitalium* estan estretament relacionades, però amb aquests resultats hem demostrat que les maquinàries involucrades en aquestes funcions, estan físicament lligades a través de, com a mínim, una proteïna, la proteïna MG200. I en aquest escenari la regió G/F d'aquesta proteïna s'erigeix com a regió essencial per connectar aquestes dues maquinàries i, al mateix temps, se suggereix la necessitat de la participació de la xaperona DnaK en aquestes funcions.





## Resum

*Mycoplasma genitalium* és un patògen emergent de transmissió sexual. Aquest microorganisme sense paret cel·lular conté un dels genoma més petit que es coneix entre els organismes autoreplicatius i això el converteix en un model atractiu de cèl·lula mínima. Tot i l'aparent simplicitat, *M. genitalium* presenta un complex citoesquelet intern que polaritza la cèl·lula i li atorga la característica forma de pera, deguda a la formació d'un apèndix a un extrem de la mateixa. Aquest apèndix es coneix com organela terminal (OT) i està implicat en processos clau de la seva vida parasitària. L'OT té un paper central en la motilitat per lliscament del micoplasma. Aquest mecanisme únic i encara poc caracteritzat està relacionat amb molts aspectes de la seva biologia, amb especial rellevància en la patogènesi. L'objectiu general d'aquest treball és aprofundir en la comprensió d'aquest mecanisme mitjançant l'estudi de la contribució específica de diferents dominis de proteïnes prèviament relacionats amb l'OT o la motilitat.

## Capítol I

L'OT s'organitza al voltant del citoesquelet intern. La proteïna MG218 és un dels elements principals del citoesquelet i té un paper central en la formació de l'OT. Recentment, s'ha identificat una nova proteïna que comparteix la seqüència C-terminal de MG218. Aquesta proteïna (MG218-s) és producte d'una traducció interna del gen MG218 però el seu inici de traducció exacte encara no està definit. Per entendre millor la funció d'aquesta proteïna, en el primer capítol, s'ha dissenyat una nova estratègia per introduir mutacions puntuals en el genoma de *M. genitalium*. Mitjançant aquesta estratègia s'ha pogut identificar la *Met* inicial de la proteïna MG218-s que encara es desconeixia. S'ha determinat també l'inici de transcripció i la regió promotora associada a l'expressió d'aquesta proteïna. Finalment, mitjançant la mutació simultània de la caixa -10 del promotor i el codó ATG d'inici de traducció de la proteïna MG218-s ha permès suprimir l'expressió de la proteïna, mantenint l'expressió de la proteïna MG218. En la caracterització d'aquest mutant com a model de mutant defectiu en MG218-s, s'ha trobat que l'absència de la proteïna MG218-s no afecta l'estabilitat dels elements de l'OT ni la capacitat de citadherència de les cèl·lules, però presenta una alteració en el comportament de la motilitat del micoplasma.

El segon i tercer capítol se centren en l'estudi de la proteïna MG200, que és un element important de la maquinària de la motilitat.

## Capítol II

Les proteïnes MG200 i MG386 són els primers elements que s'han relacionat exclusivament amb la motilitat de *M. genitalium*. Aquestes proteïnes comparteixen diferents característiques, essent destacable la presència d'un domini ric en glicina i residus aromàtics (caixa EAGR), que es troba exclusivament en micoplasmes, aparentment sempre en proteïnes relacionades amb la motilitat i/o l'arquitectura de l'OT, com la MG312. L'anàlisi de l'estructura cristal·lina del domini de la caixa EAGR de MG200 suggereix un rol en interaccions proteïna-proteïna, on aquest domini podria servir de plataforma per interaccions macromoleculares. Ara bé, no s'han descrit defectes estructurals en l'OT de cèl·lules mutants amb deleccions en proteïnes que contenen caixes EAGR. Per comprendre millor el paper d'aquest domini, en el segon capítol s'analitza el fenotip de mutants que expressen la proteïna MG200 $\Delta$ E, que té deleccionat

específicament el domini de la caixa EAGR. El fenotip deficient en motilitat, amb paràmetres de motilitat entremitjos entre la soca parental C12 i la soca salvatge, clarament indica un rol específic del domini de la caixa EAGR de la proteïna MG200 en la motilitat de *M. genitalium*. El paral·lelisme d'aquests resultat amb els descrits prèviament per els mutants de *M. genitalium* que tenen una petita deleció en la regió N-terminal de la proteïna MG312 que inclou una caixa EAGR suggereixen que les caixes EAGR d'aquestes dues proteïnes compartrien la seva implicació en la maquinària de motilitat, tot i que no serien essencials per sí soles.

### Capítol III

És interessant que la MG200 és una proteïna multidomini amb homologia amb co-xaperones Hsp40. La interrupció del locus MG\_200 per la inserció de transposó dona lloc a mutants adherents amb un fenotip no mòtil. Una anàlisi recent d'aquests mutants ha evidenciat la presència d'un fragment amino-terminal de MG200, que conté un domini J i una regió rica en glicina i fenilalanina característics de les proteïnes DnaJ. En el tercer capítol, s'ha estudiat la funció d'aquests dominis amino-terminal de MG200 a partir de l'estudi dels efectes de la deleció o substitució d'aquests dominis sobre la funció global de la proteïna MG200. Els resultats obtinguts demostren que la proteïna MG200 està implicada en la motilitat de *M. genitalium*, però també té un important paper en la citadherència del micoplasma, perquè és necessària per l'estabilitat de les adhesines. I en aquest escenari la regió G/F d'aquesta proteïna s'erigeix com a regió essencial per connectar aquestes dues maquinàries.

## Conclusions

### Capítol I

- Per primer cop s'han generat mutants de *M. genitalium* que incorporen mutacions puntuals en el seu genoma, fent servir una nova estratègia basada en el reemplaçament gènic.
- S'han determinat l'origen de transcripció i l'origen de traducció del gen *mg218-s*, que codifica per una proteïna de 23 kDa, identificada recentment que té un 100 % d'identitat amb l'extrem amino-terminal de la proteïna MG218.
- La mutació simultània de la regió -10 del promotor del gen *mg218-s* i del codó ATG codificant per la Met1615 de la proteïna MG218-s ha permès generar la soca mutant MD-P3, que expressa la proteïna MG218 *full-length*, però és defectiva en proteïna MG218-s.
- La soca defectiva en proteïna MG218-s presenta un fenotip similar al que s'ha descrit prèviament per la soca  $\Delta$ 217. Les cèl·lules d'aquesta soca presenten un increment de l'angle de curvatura de l'OT respecte el cos cel·lular i els patrons de moviment que exhibeixen presenten un increment de patrons erràtic i també del diàmetre mitjana dels moviments circulars.
- La proteïna MG218-s no està relacionada amb la citadherència de *M. genitalium*.
- L'absència de la proteïna MG218-s, no desestabilitza cap de les proteïnes del citoesquelet, però afavoreix la desestructuració de la base de l'eix electrodens de l'OT de *M. genitalium* i, indirectament, afecte patrons de moviment del micoplasma.
- La proteïna MG218-s o intervé en l'estabilitat dels fragments amino-terminals de la proteïna MG218.
- El promotor associat a l'expressió del gen *mg218-s* permet l'expressió dels dos gens que trobem *downstream*, que són el *mg491* i el *mg219*.

### Capítol II

- S'ha generat un mutant de *M. genitalium* que expressa una versió modificada de la proteïna MG200 a la que s'ha deletat el domini de la caixa EAGR. Aquest mutant s'ha obtingut reintroduint per transposició una versió modificada del gen *mg200*, que permet l'expressió de la proteïna MG200 $\Delta$ E, en una soca defectiva en proteïna MG200.
- Els nivells d'expressió de la proteïna truncada són comparables als de la proteïna salvatge i totes dues mostren la mateixa localització subcel·lular.
- L'expressió de la proteïna MG200 $\Delta$ E en els mutants  $\Delta$ E permet restablir els nivells d'expressió de la proteïna MG219 que s'havien perdut en la soca parental, descartant que el domini deletat de la proteïna tingui un paper en l'estabilitat de dita proteïna.
- No s'ha pogut determinar si la deleció del domini de la caixa EAGR provoca modificacions estructurals en la proteïna MG200, però s'ha comprovat que la proteïna MG200 $\Delta$ E manté moltes de les funcionalitats de la proteïna salvatge, com hem esmentat en els dos punts anteriors.
- El domini de la caixa EAGR no està implicat en la citadherència del micoplasma.
- Els mutants  $\Delta$ E presenten deficiències importants de motilitat, però el fenotip és més lleu a l'observat en la soca parental C12.
- La supressió de les caixes EAGR de les proteïnes MG312 i MG200 dóna lloc a cèl·lules de micoplasma amb desavantatges mòtils similars, suggerint que les caixes EAGR tenen un paper rellevant i específic en la motilitat.

### Capítol III

- Les soques C2 i C12 de *M. genitalium* expressen fragments truncats, amino-terminals de la proteïna MG200.
- L'estabilitat de la proteïna MG200 depèn de la presència d'un domini J en el seu extrem amino-terminal.
- La proteïna MG200 està involucrada en la motilitat de *M. genitalium*, però també en l'estabilitat de les adhesines principals de *M. genitalium*, les proteïnes P140 i P110.
- L'estudi de les proteïnes quimèriques C<sub>J</sub> i C<sub>JGF</sub> ha permès determinar que el domini J de la proteïna MG019 pot suplir les funcions del domini J de la proteïna MG200, però en canvi la regió G/F de la proteïna MG200 és essencial per l'estabilitat de les adhesines P140 i P110 i no pot ser substituït per la regió G/F de la proteïna MG019.
- Un domini J seguit de la regió G/F de la proteïna MG200 és essencial per l'estabilitat de les proteïnes P140 i P110. I, s'ha comprovat que el fragment de 140 aa de l'extrem amino-terminal de la proteïna MG200, que inclou el domini J i la regió G/F de la proteïna, és suficient per conferir estabilitat a les proteïnes P140 i P110, com hem comprovat amb el mutant C12.
- L'expressió de les proteïnes quimèriques C<sub>J</sub> i C<sub>JGF</sub> en la soca C12 permet restablir els nivells d'expressió de la proteïna MG219.
- La motilitat de la soca C12 només es restableix amb la reintroducció de la proteïna MG200 salvatge o la quimera C<sub>J</sub>. La quimera C<sub>JGF</sub> no permet restaurar la motilitat de la soca C12.
- La regió G/F de la proteïna MG200 és essencial per l'estabilitat de les adhesines i també per la motilitat del micoplasma.

# Materials i Mètodes

## 1. Material biològic

### 1.1. Descripció de soques, vectors i encebadors

#### Soques d'*E. coli*

XL1-Blue	Soca de clonatge i expressió, deficient en recombinació. Té una elevada eficiència de transformació. La presència del factor F <sup>+</sup> permet l' $\alpha$ -complementació, la infecció pel fag M13 i la superproducció el repressor lac ( <i>lacI<sup>q</sup></i> ). Genotip: <i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac<sup>-</sup> F<sup>+</sup>[proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZ<math>\Delta</math>M15 Tn10(<i>tet<sup>r</sup></i>)]</i>
BL21(DE3)	Soca usada per obtenir nivells elevats d'expressió de gens clonats en vectors d'expressió que contenen el promotor del fag T7. La T7-RNA polimerasa del fag es troba en el fag $\lambda$ DE3, que està integrat en el cromosoma de BL21. El gen d'aquesta polimerasa està sota control del promotor <i>lacUV5</i> , induïble per IPTG. Presenta delecions en els gens de les proteases <i>lon</i> i <i>ompT</i> , per minimitzar la degradació de les proteïnes durant la seva expressió i purificació. Es sensible a ampicil·lina. Genotip: F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>), dcm, gal, (<math>\lambda</math>clts857 <i>ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7gene1</i>)</i>

#### Soques de *M. genitalium*

G37	Aïllat natural de <i>M. genitalium</i> a partir d'un cas clínic d'uretritis (Tully <i>et al.</i> , 1981). Soca salvatge utilitzada en aquest treball (WT). Origen: ATCC 33530
C6	G37 amb un transposó inserit al gen <i>mg218</i> . Resistent a tetraciclina. Origen: (Pich <i>et al.</i> , 2008)
$\Delta$ 218	G37 amb el gen <i>mg218</i> delecionat per doble recombinació homòloga. Resistent a tetraciclina. Origen: (Pich <i>et al.</i> , 2008)
C12	G37 amb transposó inserit al gen <i>mg200</i> . Resistent a tetraciclina. Origen: (Pich, Burgos, Ferrer-Navarro, <i>et al.</i> , 2006)
$\Delta$ 191	G37 amb el gen <i>mg191</i> delecionat per doble recombinació homòloga. Resistent a tetraciclina. Origen: (Burgos <i>et al.</i> , 2006)
CI i CII	Mutants espontanis de classe I i II de <i>M. genitalium</i> amb deficiències en adhesió cel·lular cedits pel Dr. J. B. Baseman. (Mernaugh <i>et al.</i> , 1993)
$\Delta$ 217	G37 amb el gen <i>mg217</i> delecionat per doble recombinació homòloga. Resistent a tetraciclina. Origen: (Burgos <i>et al.</i> , 2008)
$\Delta$ ftsZ	G37 amb el gen <i>mg224</i> delecionat per doble recombinació homòloga. Resistent a tetraciclina. Origen: (Lluch-Senar <i>et al.</i> , 2010)
$\Delta$ 218 <sub>Ct</sub>	G37 amb el gen <i>mg218</i> truncat per doble recombinació homòloga. Resistent a gentamicina. Origen: aquest treball
$\Delta$ 218 <sub>Ct</sub> <i>tetM</i>	G37 amb el gen <i>mg218</i> truncat per doble recombinació homòloga. Resistent a tetraciclina. Origen: aquest treball
MD-1; MD-2; MD-3; MD-4; MD-35; MD-P; MD-P3	Soques de G37 amb mutacions puntuals en la seqüència del gen <i>mg218</i> . Resistent a tetraciclina. Origen: aquest treball
MD-P3+218-s (D1; D2; D3)	Mutants MD-P3 amb un minitransposó portador d'una còpia del gen salvatge <i>mg218-s</i> amb el seu promotor propi. Resistents a tetraciclina i cloramfenicol. Origen: aquest treball
MD-P3+F218sCh	Mutants MD-P3 que expressa la proteïna de fusió 218-s::Ch. Resistents a tetraciclina i cloramfenicol. Origen: aquest treball

$\Delta 218_{C_t}+218-s$ (B5, B7 i B9)	Mutants $\Delta 218_{C_t}tetM$ amb un minitransposó portador d'una còpia del gen <i>mg218-s</i> salvatge amb el seu promotor propi. Resistent a tetraciclina i cloramfenicol. Origen: aquest treball
$\Delta 218+218-s$ (A1, A3 i A8)	Mutants $\Delta mg218$ amb un minitransposó portador d'una còpia del gen <i>mg218-s</i> salvatge amb el seu promotor propi. Resistent a tetraciclina i cloramfenicol. Origen: aquest treball
$\Delta E$	Mutant C12 amb un minitransposó portador d'una còpia del gen <i>mg200</i> modificat per suprimir el fragment codificant pel domini que conté la caixa EAGR delecionat. El gen està associat al promotor del gen original, <i>mg200</i> . Resistent a tetraciclina i cloramfenicol. Origen: aquest treball
$\Delta J$	G37 amb el fragment codificant pel domini J de l'extrem amino-terminal de la proteïna MG200 delecionat del gen <i>mg200</i> per doble recombinació homòloga. Resistent a tetraciclina. Origen: aquest treball
$C_J$	G37 al que s'ha substituït per doble recombinació homòloga el gen <i>mg200</i> per una gen que codifica la quimera $C_J$ . Resistent a tetraciclina. Origen: aquest treball
$C_{JGF}$	G37 al que s'ha substituït per doble recombinació homòloga el gen <i>mg200</i> per una gen que codifica la quimera $C_{JGF}$ . Resistent a tetraciclina. Origen: aquest treball
C12+200	Mutants C12 amb un minitransposó portador d'una còpia del gen salvatge <i>mg200</i> salvatge amb el seu promotor propi. Resistent a tetraciclina i cloramfenicol. Origen: aquest treball
C12+ $C_J$	Mutants C12 amb un transposó portador del gen codificant per la quimera $C_J$ amb el promotor del gen <i>mg200</i> . Resistent a tetraciclina i cloramfenicol. Origen: aquest treball
C12+ $C_{JGF}$	Mutants C12 amb un transposó portador del gen codificant per la quimera $C_{JGF}$ amb el promotor del gen <i>mg200</i> . Resistent a tetraciclina i cloramfenicol. Origen: aquest treball
F438GFP	G37 amb el gen <i>mg438</i> fusionat al gen codificant per mCherry en el seu extrem 3'. Resistent a tetraciclina. Origen: aquest treball
F110Ch	G37 amb el gen <i>mg192</i> fusionat al gen codificant per eGFP en el seu extrem 3'. Resistent a tetraciclina. Origen: aquest treball
FCatCh	G37 que expressa de forma constitutiva la fusió Cat::Cherry. Resistent a cloramfenicol. Origen: aquest treball
FCatCh-F110YFP	G37 que expressa de forma constitutiva la fusió Cat::Cherry i té el gen <i>mg192</i> fusionat al gen codificant per eGFP en el seu extrem 3'. Resistent a tetraciclina i cloramfenicol. Origen: aquest treball

### Vectors

pBluscript II SK <sup>+</sup>	Fagèmid comercial utilitzat com a vector general de clonatge. Aquest vector conté el origen de replicació ColE1 d'E. coli i el del bacteriòfag F1 així com els promotors T3 i T7. També conté el gen de resistència a ampicil·lina i una regió de clonatge múltiple que interromp el gen <i>lacZ'</i> . Origen: <i>Stratagene</i>
pBE	Plasmidi utilitzat com a vector de clonatge de fragments de DNA amplificats per PCR. És un plasmidi derivat de pBluscript II SK <sup>+</sup> al que s'ha substituït el MCS per una única diana <i>EcoRV</i> . Origen: (Pich, Burgos, Planell, <i>et al.</i> , 2006)
pBB540	Plasmidi utilitzat per amplificar la seqüència codificant pel gen de resistència a cloramfenicol, <i>cat</i> ( <i>chloramphenicol acetyltransferase</i> ). Origen: (Tomoyasu <i>et al.</i> , 2001)
p $\Delta mg218$	Vector derivat de pBluscript II SK <sup>+</sup> , dissenyat per delecionat el gen <i>mg218</i> per reemplaçament gènic a <i>M. genitalium</i> . Conté el gen de resistència a tetraciclina <i>tetM438</i> . Origen: (Pich <i>et al.</i> , 2008)
p $\Delta mg218_{C_t}Gm^R$	Vector derivat de pBluscript II SK <sup>+</sup> , dissenyat per delecionat un fragment d'aproximadament 1 kb de l'extrem 3' del gen <i>mg218</i> per reemplaçament gènic a <i>M. genitalium</i> . Conté el gen <i>aac(6')-aph(2'')</i> de resistència a gentamicina, tobramicina i

	kanamicina. Origen: aquest estudi
pΔmg218 <sub>Ct</sub> tetM438	Vector derivat de pBluscript II SK <sup>+</sup> , dissenyat per delecionar un fragment d'aproximadament 1 kb de l'extrem 3' del gen <i>mg218</i> per reemplaçament gènic a <i>M. genitalium</i> . Conté el gen de resistència a tetraciclina <i>tetM438</i> . Origen: aquest estudi
pBE.218 <sub>Ct</sub>	Vector derivat del vector pBE, que conté un fragment de x kb de l'extrem 3' del gen <i>mg218</i> amplificat per PCR a partir de DNA genòmic de <i>M. genitalium</i> , clonat en la diana de restricció <i>EcoRV</i> del vector. Es va fer servir com a motlle de les PCR mutagèniques amb que es van generar les mutacions puntuals en la seqüència del gen <i>mg218</i> . Origen: aquest estudi
pB218 <sub>Ct</sub> tetM438	Vector derivat de pBluscript II SK <sup>+</sup> , dissenyat per delecionar el gen <i>mg218</i> per reemplaçament gènic a <i>M. genitalium</i> . Conté el gen de resistència a tetraciclina <i>tetM438</i> . Origen: aquest estudi
pBBD200	Vector derivat del vector pBE, que conté un fragment amplificat per PCR, a partir de DNA genòmic de <i>M. genitalium</i> , que correspon a la regió promotora del gen <i>mg200</i> juntament amb un fragment de 600 pb de l'extrem 5' del mateix gen, clonat en la diana de restricció <i>EcoRV</i> del vector. Origen: aquest estudi
pBAJ	Vector derivat de pBluscript II SK <sup>+</sup> , dissenyat per delecionar la regió codificant pel domini J del gen <i>mg200</i> per reemplaçament gènic a <i>M. genitalium</i> . Conté el gen de resistència a tetraciclina <i>tetM438</i> . Origen: aquest estudi
pBC <sub>J</sub>	Vector derivat de pBluscript II SK <sup>+</sup> , dissenyat per substituir la regió codificant pel domini J del gen <i>mg200</i> per la regió codificant pel domini J del gen <i>mg019</i> , per reemplaçament gènic a <i>M. genitalium</i> . Conté el gen de resistència a tetraciclina <i>tetM438</i> . Origen: aquest estudi
pBC <sub>JGF</sub>	Vector derivat de pBluscript II SK <sup>+</sup> , dissenyat per substituir la regió codificant pel domini J i la regió G/F del gen <i>mg200</i> per la regió codificant pel domini J i la regió G/F del gen <i>mg019</i> , per reemplaçament gènic a <i>M. genitalium</i> . Conté el gen de resistència a tetraciclina <i>tetM438</i> . Origen: aquest estudi
pMTnGm	Vector derivat del vector pBluscript II SK <sup>+</sup> que conté un minitransposó modificat basat en el transposó Tn4001 que prové de <i>Staphylococcus aureus</i> . Aquest transposó és funcional a <i>M. genitalium</i> i permet obtenir insercions estables al genoma. El transposó Tn4001 original incorpora el gen de resistència <i>aac(6<sup>'</sup>)-aph(2<sup>'</sup>)</i> que confereix resistència a gentamicina a <i>M. genitalium</i> . Origen: (Pich, Burgos, Planell, <i>et al.</i> , 2006)
pMTntetM438	Vector similar al vector pMTnGm, però en aquest cas ha estat substituït pel gen de selecció modificat <i>tetM438</i> , que confereix resistència a tetraciclina a <i>M. genitalium</i> . Origen: (Pich, Burgos, Planell, <i>et al.</i> , 2006)
pMTn <sub>cat</sub>	Vector similar al vector pMTntetM438. En aquest cas s'ha substituït el gen de selecció pel gen de resistència a cloramfenicol amb el promotor del gen <i>mg438</i> de <i>M. genitalium</i> , <i>catM438</i> . Origen: aquest treball
pMTn <sub>cat</sub> 218s	Vector derivat de pMTn <sub>cat</sub> , que conté el gen <i>mg218-s</i> juntament amb la seva regió promotora pròpia. Origen: aquest treball
pMTn <sub>cat</sub> F218sCh	Vector derivat de pMTn <sub>cat</sub> , que conté el gen <i>mg218-s</i> fusionat al gen codificant per la proteïna fluorescent mCherry, juntament amb la seva regió promotora original del gen <i>mg218-s</i> . Origen: aquest treball
pMTn <sub>cat</sub> 200	Vector derivat de pMTn <sub>cat</sub> , que conté el gen <i>mg200</i> juntament amb la seva regió promotora pròpia. Origen: aquest treball
pMTn <sub>cat</sub> 200ΔE	Vector derivat de pMTn <sub>cat</sub> 200, però en aquest cas s'ha delecionat la regió codificant pel domini que conté la caixa EAGR en el gen <i>mg200</i> . Origen: aquest treball
pMTn <sub>cat</sub> C <sub>J</sub>	Vector derivat de pMTn <sub>cat</sub> 200, però en aquest cas s'ha substituït la regió codificant pel domini J del gen <i>mg200</i> per la regió codificant pel domini J del gen <i>mg019</i> . Origen: aquest treball
pMTn <sub>cat</sub> C <sub>JGF</sub>	Vector derivat de pMTn <sub>cat</sub> 200, però en aquest cas s'ha substituït la regió codificant pel

	domini J i la regió G/F del gen <i>mg200</i> per la regió codificant pel domini J i la regió G/F del gen <i>mg019</i> . Origen: aquest treball
pET-21a(+)	Vector d'expressió que permet clonar el gen de la proteïna d'interès sota control del promotor de la T7 RNA polimerasa i de l'operador <i>lac</i> . Permet incorporar una cua de sis histidines (6xHis) a l'extrem carboxi-terminal de la proteïna, que facilita la posterior purificació de la proteïna. El marcador de selecció és un gen de resistència a ampicil·lina. ( <i>Novagen</i> ).
pET-21d(+)	Vector d'expressió que permet clonar el gen de la proteïna d'interès sota control del promotor de la T7 RNA polimerasa i de l'operador <i>lac</i> . Permet incorporar una cua de sis histidines (6xHis) a l'extrem carboxi-terminal de la proteïna, que facilita la posterior purificació de la proteïna. El marcador de selecció és un gen de resistència a ampicil·lina. ( <i>Novagen</i> ).
pET21a.J3GF	Vector derivat de pET-21a(+), que conté un fragment 5' del gen <i>mg200</i> de 360 pb, que permet expressar el fragment corresponent al domini J i la regió G/F de la proteïna MG200, fusionat a una cua de 6xHis. Origen: aquest treball
pET21d.J2GF	Vector derivat de pET-21d(+), que conté un fragment 5' del gen <i>mg019</i> de 360 pb, que permet expressar el fragment corresponent al domini J i la regió G/F de la proteïna MG019, fusionat a una cua de 6xHis. Origen: aquest treball
pET21.218-s	Vector derivat de pET-21a(+), que conté el gen <i>mg218-s</i> , que permet expressar la proteïna MG218-s fusionada a una cua de 6xHis. Origen: aquest treball

Els plasmidis o vectors es conserven a -20 °C aïllats i en dissolució en TE. També es poden conservar en forma d'*stocks* de les soques portadores.

#### Encebadors utilitzats

Utilitzats per seqüenciar els fragments de DNA amplificats per PCR i clonats en un pBE	
Fup-17	5'-GTAAACGACGGCCAGT
Rup-17	5'-GGAAACAGCTATGACCATG
Utilitzats per seqüenciar els punts d'inserció i els fragments inserits per minitransposó en el genoma de <i>M. genitalium</i>	
TetUp	5'-TTCCTGCATCAACATGAG
TetDown	5'-GTCGTCCAAATAGTCGGA
CmUp	5'-CAACGGTGGTATATCCAG
CmDown	5'-ATGAATTACAACAGTACTG
Utilitzats en seqüenciació dirigida de genoma	
SeqMutDir	5'-AGCCAACAACTTAACAT
seqGFP (438)	5'-GTTCTTTAACAGTGATTCGTG
5Mg190	5'-ATGAAAAAAGGATCAATAACTGAAGC
SeqMgpa4	5'-ACAACGTTTTACTACCGGACCTAAC
SeqMgpa8	5'-ATTCCCACAACCTCCATTCCAAATC
SeqMgpa4.1	5'-TAAAGCTGATAGTAGTAGTAGTAG
SeqMgpa6.1	5'-ATCAAGCTTCAATCCGCTTAAAGG
Seq MgPa7.2 Fw	5'-TTGAGAACCAGTTGGGGTATAAGG
Seq MgPa Rev 9.1	5'-TCCACCGCACTCTCAGCAGCTGTG
Seq MgPa 9.2 Fw	5'-TTGATGAGATCATCAATACCCCTG
Utilitzats en clonatge	
5'upstP28(XbaI)	5'-GATTCTAGA GTAACCTCCATTTCCCTTTCCA
3'upstP28(EcoRI)	5'-GATGAATTCctaAATCGTTTCTATCTTCTTATTTAG
3'p28(EcoRI)	5'-GATGAATTCCTTTATTTACTTGCTGCTTTTTG
M-5CmM438	5'-CAATTGTAGTATTTAGAATTAATAAAGTATGGAGAAAAAATCACTG
BamHI-3Cm	5'-GGATCCTTACGCCCCGCCCTG



SallI-5pMG527	5'-GAT <b>GTCGAC</b> GAAACCCAAACTTTTCGATTC
EcoRV-3MG527	5'-GAT <b>GATATC</b> CTTTATTTACTTGCTGC
5-Tn527Cm	5'-CAATTGTAGTATTTAGAATTA
3-Tn527Cm	5'-TTTACTTGCTGCTTTTTG
5P-linkCh	5'-Ph-AACAATAACAACAATAATAATAACAGCAAGGGCGAGGAG
3P-EcoRICh	5'-GAATTCTTACTTGTACAGCTCGTC
5p.mg200-XbaI	5'- <b>TCTAGAA</b> ACTATCACCCCTTGCCAG
3KOEAGR1-recomb	5'- <i>CTGATACCTCACTGGTTTC</i> CAGGTTTTTTGGAGAACCAG
5KOEAGR1-recomb	5'- <i>CTGGTCTCCAAAAACCTGAA</i> ACCAGTGAGGTATCAG
3NotI200	5'- <b>GCGGCCGC</b> CTAACTAATGGGTTCTTG
5BE200-XbaI	5'- <b>TCTAGAA</b> ATACAACCAGGATTAGAAG
3BamBE199	5'- <b>GGATC</b> CTAAGAATCAATCAGAGTAAG
5p.mg200-EcoRI	5'- <b>GAATT</b> CAACTATCACCCCTTGCCAG
3mg200Nter-ApaI	5'- <b>GGGCCCA</b> ATGTTGTCAAACAAAAGATC
3KODnaJ3-Ph	5'-Ph-CATTAAGAATCAATCAGAG
5KODnaJ3-Ph	5'-Ph-GTTGATGGTGAACCTGCT
3BE199-recombJ2	5'- <i>CTTTACCAGCAGCCATTA</i> AGAATCAATCAGAGTAAG
5J2-recombpromotor	5'- <i>CTTACTCTGATTGATTCTTA</i> ATGGCTGCTGGTAAAAG
3J2recomb	5'- <i>AGCAGGTTCACCATCA</i> ACCCCTTCATGACCAAACCTG
5-200DJ3recomb	5'- <i>CAGTTTGGTCATGAAGGGG</i> TTGATGGTGAACCTGCT
3J2GFrecomb	5'- <i>GTTCTTGCTTAGGTTTTTT</i> ATTAATAAATGAAATCAAATGGTG
5-200DJ3GFrecomb	5'- <i>CACCATTGATTTCATTTTA</i> ATAAAAAACCTAAGCAAGAAC
5-tetMBamHI	5'-GCTACT <b>GGATC</b> CTAGTATTTAGAATTAATAAAGTAT
3-tetMEcoRI	5'-GCTACT <b>GAATTC</b> cTAAGTTATTTTATTGAACATATA
BamHI-5BD	5'- <b>GGATC</b> CTCAAAAACCTTAATTCTTTC
XbaI-3BD	5'- <b>TCTAG</b> ATTATCAACTATTAGAAAAAC
5PstCmM	5'- <b>CTGCAG</b> TAGTATTTAGAATTAATAAAG
SallI-3Cm	5'- <b>GTCGAC</b> CGCCCCGCCCTG
5SalCh	5'- <b>GTCGAC</b> AGCAAGGGCGAGGAG
3BamCh	5'- <b>GGATC</b> CTTACTTGTACAGCTCGTC
5NdednaJ3GF	5'- <b>CATAT</b> GGCTGAACAGAAACGTG
3XhodnaJ3GF	5'- <b>CTCGAG</b> GGAGAACCAGTGGTAAC
5NcoI019	5'- <b>ATGCTA</b> cCCATGGGGGCTGCTGGTAAAAGGGAT
3XhoJ2GF	5'-ATGCTAC <b>CTCGAG</b> ATTAATAAATGAAATCAAATGGTG
5Nde527	5'- <b>CATAT</b> GGCCTTTCCGTATCTG
3Xho527	5'- <b>CTCGAG</b> TTTAGAGGCTGCTTTTTGTG

---

 Utilitzats en PCR mutagèniques

mutdir1a	5'-Ph- GATAAGGAG <b>CTAC</b> GGGTGTTG
mutdir1b	5'-Ph-ATGGAGTTGGCGTTTAATC
mutdir2a	5'-Ph-GGTTGATAG <b>ACTAAA</b> ATTAGCAG
mutdir2b	5'-Ph-AAGCGCAACACCCGCATC
mutdir3a	5'-Ph-GTAATGAT <b>CTAGC</b> CTTTCCTTAC
mutdir3b	5'-Ph-CGTTAATTTTAAATAACGGTG
mutdir4a	5'-Ph-GTAATGAT <b>TCAGC</b> CTTTCCTTAC
mutdir5a	5'-Ph-ACTATATCCTCAACAAAAG
mutdir5b-2	5'-Ph-CAGGGGT <b>ATAGG</b> TAAGGAAAG
mutdirPa	5'-Ph- <b>CGTCT</b> TAAACGGTAATGAT
mutdirPb	5'-Ph-AAATAACGGTGGGAAGAAG

---

 Utilitzats en PCR de diagnòtic

5-dgnKOp28	5'-CTTATTCCAACAACAATTC
3-dgnKOp28	5'-GCACTTGCTTCTTGATTATC

R1p140	5'-GGTAAAGTTCCAGTAGAAGTAG
R4p140	5'-AATACTAGTTTCTTCTTTTAGACC
R5p110	5'-AGTAAGAATGTTACTGCTTACAC
R6p110	5'-AGTTATAGTTTAAACCTAACGCAT

Utilitzats en *primer extension*

Fam-primextp28	5'-6Fam-GTTGTCTACGCAATTC
Fam-281	5'-6Fam-GCATTGACTTTTAATCAAAG

Les regions dels encebadors marcades en negreta corresponen a dianes de restricció introduïdes per facilitar el clonatge dels fragments de PCR resultants: *Apa*I (GGGCC); *Bam*HI (GGATCC); *Eco*RI (GAATTC); *Eco*RV (GATATC); *Hind*III (AAGCTT); *Mfe*I (CAATTG); *Nde*I (CATATG); *Not*I (GCGGCCG); *Pst*I (CTGCAG); *Sall*(GTTCGAC); *Xba*I (TCTAGA); *Xho*I (CTCGAG). El fragment de 22 pb subratllat correspon a la seqüència del promotor del gen *mg438* de *M. genitalium*. En cursiva s'ha destacat les seqüències complementàries en els encebadors recombinants. En negreta i cursiva s'han ressaltat les bases mutagèniques dels encebadors mutagènics. En negreta, cursiva i subratllat s'ha ressaltat la seqüència RBS utilitzada. I en minúscula trobem els pb que s'afegeixen a la seqüència amb l'encebador. Les modificacions 5' dels encebadors estan indicades com a Ph per les fosforilacions, 6Fam per fluoresceïna (6-Carboxifluoresceïn Phosphoramidite).

## 1.2. Medis de cultiu i suplement utilitzats

### Cultiu de soques d'*E. coli*

Medi LB (Luria-Bertani), tant líquid com sòlid. És un medi ric d'ús comú pel creixement de soques d'*E. coli*, sobretot en forma sòlida. Composició per 1 litre: 10 g de Bactotripton (Scharlau microbiology), 5 g d'extracte de llevat (Scharlau microbiology), 10 g de NaCl (Fluka) i H<sub>2</sub>O destil·lada fins 1 l. En cas de desitjar el medi sòlid, s'afegeixen 15 g d'agar. S'autoclava 15 min a 121 °C.

Els cultius en medi sòlid s'han realitzat per obtenir colònies aïllades a partir d'una transformació, seleccionades per resistència a ampicil·lina, introduïda en el vector utilitzat per la transformació. Les plaques s'incuben a 37 °C, o/n, amb la placa invertida.

Medi 2YT (líquid) és un medi més ric que el LB. Composició per 1 L: 16 g de Bactotripton, 10 g d'extracte de llevat, 5 g de NaCl i H<sub>2</sub>O destil·lada fins 1 L. S'autoclava 15 min a 121 °C.

Els cultius en medi líquid s'han realitzat a 37 °C amb agitació forta (250 rpm), respectant una proporció màxima de 1:5 entre el volum de cultiu i la capacitat màxima del flascó, per assegurar una aportació suficient d'oxigen. En el cas de XL1Blue els cultius s'incuben o/n, fins assolir fase estacionària. Per l'obtenció de preinòculs en el cas de BL21(DE3) s'incuben durant 4-5 h (veure més endavant).

### Antibiòtics i suplement utilitzats:

- Ampicil·lina (ROCHE). Es prepara a una concentració de 200 mg mL<sup>-1</sup> en H<sub>2</sub>O MilliQ i posteriorment esterilitzada per filtració amb un filtre de 0,22 µm (Millipore). Es conserva en alíquotes de 1 mL a -20 °C. La concentració de treball ha estat de 100 µg mL<sup>-1</sup>.

- Cloramfenicol (ROCHE). Utilitzat durant l'elaboració de competents pel mètode de l'inouè. Es prepara a una concentració de 34 mg mL<sup>-1</sup> en etanol 70% i es conserva en alíquotes a -20 °C. Donat que aquest antibiòtic és fotosensible, s'ha d'evitar l'exposició a la llum. La solució es conserva a -20 °C en alíquotes d'1 mL. La concentració de treball ha estat de 10 µg mL<sup>-1</sup>.

- IPITG (Fluka), utilitzat per induir l'expressió de gens situats sota el control del promotor del gen *lacZ*. La solució *stock* es prepara a una concentració 1 M en H<sub>2</sub>O MilliQ estèril i es conserva en alíquotes de 1 mL a -20 °C.

- Xgal (*Fluka*), utilitzat per la detecció de plasmidis recombinants. La solució *stock* es prepara a una concentració de 50 mg mL<sup>-1</sup> en dimetilformamida i es conserva en alíquotes a -20 °C. La concentració de treball és de 0,05 mg mL<sup>-1</sup>.

### **Cultiu de soques de *M. genitalium***

Medi SP4 (*Spiroplasma Medium 4*) És un medi ric recomanat pel creixement de la majoria de *Mollicutes*. La preparació es realitza en dues etapes. Composició per 500 mL:

En primer lloc es prepara una solució base: 1,75 g de PPLO (*Difco*), 5,00 g de Triptona (*Difco*), 2,65 g de Bactopeptona (*Difco*) i 2,50 g de Glucosa (*Sigma-Aldrich*) i aigua destil·lada fins 312 mL. S'ajusta el pH a 7,8 amb NaOH 2 M i s'autoclava la solució 15 min a 120 °C. Un cop refredada la solució base, s'afegeixen els complements: 50,0 mL de Yestolate 2%, 6,0 mL de Roig de fenol 0,1% (pH 7,0), 17,5 mL d'extracte de llevat, 25,0 mL de CMRL 10x (*LifeTechnologies*), 85,0 mL de sèrum de boví fetal, 1,71 mL de Glutamina 29,2 mg mL<sup>-1</sup> (*Sigma-Aldrich*) i 250 µL d'ampicil·lina 200 mg mL<sup>-1</sup>. Finalment, es torna a ajustar el pH del medi final entre 7,6 i 7,8 amb NaOH 2 M.

Per preparar medi SP4 sòlid s'afegeix a la solució base Agar noble (*Difco*) a una concentració final del 0,8%. La base s'autoclava i després es manté en un bany a 56 °C durant 1 h. Posteriorment, s'hi afegeixen els complements prèviament escalfats a 56 °C i es dispensa en plaques de Petri de 55 mm de diàmetre en volums d'entre 5 mL. Les plaques es conserven a 4 °C durant un temps inferior a una setmana.

### Preparació dels complements i antibiòtics utilitzats:

- Yestolate 2% (*Difco*) Autoclavat

- Roig de fenol 0,1% (pH 7,0) Autoclavat

- Extracte de llevat 25% p/v. 250 g de llevat fresc i fins 1 L d'aigua destil·lada i la barreja s'autoclava a 115 °C durant 10 min. La suspensió es refreda en gel picat i se centrifuga a 380 g durant 10 min a 4 °C. Posteriorment, es recupera el sobrenedant i aquest es torna a autoclavar a 115 °C durant 10 min. Finalment, l'extracte de llevat es conserva a -20 °C en alíquotes de 20 mL.

- Sèrum boví fetal (FBS) (*LifeTechnologies*). Al escalfar-lo a 56 °C durant 30 min per inactivar el sistema del complement abans de fer-lo servir. Es guarda en alíquotes de 45 mL a -20 °C.

- Ampicil·lina 200 mg mL<sup>-1</sup> (*Roche*). Utilitzada per prevenir la contaminació dels cultius de *M. genitalium* amb altres soques bacterianes. La concentració de treball és de 100 µg mL<sup>-1</sup>.

- Gentamicina 50 mg mL<sup>-1</sup> (*LifeTechnologies*). Utilitzada per seleccionar cèl·lules de *M. genitalium* portadores del gen *aac(6')-aph(2'')* de resistència a gentamicina, tobramicina i kanamicina del Tn4001 (Lyon *et al.*, 1984). La solució mare es conserva a 4 °C. La concentració de treball és de 100 µg mL<sup>-1</sup>.

- Tetraciclina (*Fluka*). Utilitzada per seleccionar cèl·lules de *M. genitalium* portadores del gen de resistència a tetraciclina *tetM438* (Pich, Burgos, Planell, *et al.*, 2006). El marcador *tetM438* deriva del gen de resistència a tetraciclina *tetM* del Tn916 (Franke and Clewell, 1981). Es prepara a una concentració de 5 mg mL<sup>-1</sup> en etanol absolut i es conserva en alíquotes de 1 mL a -20 °C. La concentració de treball és de 2 µg mL<sup>-1</sup>.

- Cloramfenicol 34 mg mL<sup>-1</sup> en etanol 70% (*Roche*). Utilitzada per seleccionar cèl·lules de *M. genitalium* portadores del gen de resistència a cloramfenicol *catM438* (aquest treball). La concentració de treball és de 17 µg mL<sup>-1</sup>.

### 1.3. Condicions de cultiu

#### Cultiu de soques d'*E. coli*

Els cultius d'*E. coli* en medi líquid es duen a terme en tubs estèrils i s'inoculen en una cabina de flux laminar (Telsar, model AV-100). Com a inòcul s'utilitza una colònia aïllada provinent d'una placa de cultiu en medi sòlid o entre 2 i 10  $\mu\text{L}$  d'un *stock* de treball. Per inocular cultius de gran volum es duen a terme precultius crescuts fins a una  $A_{600} \sim 1$ . Posteriorment, els cultius s'incuben a 37 °C i 250 rpm durant tota una nit en un incubador d'aire amb agitació orbital (Braun, model Centromat H).

Els cultius d'*E. coli* en medi sòlid es duen a terme en plaques de LB i s'inoculen en una cabina de flux laminar (Telsar, model AV-100). Com a inòcul s'utilitzen entre 100 i 200  $\mu\text{L}$  d'una suspensió cel·lular que s'estén per tota la superfície de cultiu mitjançant una nansa de *Digralsky*. Posteriorment, les plaques s'incuben invertides a 37 °C durant tota la nit en una estufa de cultiu (Memmert). Les colònies aïllades es recuperen amb l'ajut d'un *stick* de fusta estèril.

#### Cultiu de les soques de *M. genitalium*

Els cultius de *M. genitalium* en medi sòlid es duen a terme en plaques de SP4 sòlid i s'inoculen en una cabina de flux laminar (Telsar, model BIO-II-A). Com a inòcul s'utilitzen entre 10 i 200  $\mu\text{L}$  d'una suspensió cel·lular que es deixa adsorbir a la superfície el medi sòlid durant uns 15 min. Posteriorment, les plaques s'incuben invertides a 37°C en una atmosfera al 5% de  $\text{CO}_2$ . Les colònies triguen entre 7 i 15 dies en aparèixer. Les colònies es visualitzen mitjançant una lupa estereoscòpica (Wild Heerbrugg Leitz Plan) i es recuperen mitjançant una punta d'un *stick* de fusta de punta fina estèril.

Els cultius de *M. genitalium* en medi líquid es duen a terme en flascons o en plaques de cultiu cel·lular (TPP) i s'inoculen en una cabina de flux laminar (Telsar, model BIO-II-A). La propagació de colònies aïllades, recuperades d'una placa de cultiu amb medi SP4 sòlid, es realitza en volums de 200  $\mu\text{L}$  en plaques de cultiu cel·lular de 96 pous (TPP). A partir d'un *stock* de treball, s'inoculen entre 20 i 100  $\mu\text{L}$  en volums de 5, 15 o 30 mL en flascons de cultiu cel·lular (TPP) de 25  $\text{cm}^2$ , 75  $\text{cm}^2$  o 150  $\text{cm}^2$ , respectivament. Els cultius s'incuben a 37 °C en una atmosfera de  $\text{CO}_2$  al 5% (Estufes de cultiu Jouan, models EG 110 IR i 160-150). Les soques adherents de *M. genitalium* es desenganxen de la superfície de cultiu cel·lular mitjançant un rascador (TPP). Les soques no adherents es recuperen del flascó de cultiu amb una pipeta i se centrifuguen a 4000 xg durant 25 min a 4 °C.

### 1.4. Conservació de soques

#### Conservació de soques d'*E. coli*

Es poden conservar colònies en plaques de Petri per l'ús diari a 4 °C durant 30 dies. Per la conservació de les soques durant períodes llargs, es preparen *stocks* en medi de cultiu i 15% de glicerol estèril i es guarden a -80 °C.

#### Conservació de soques de *M. genitalium*

Els *stocks* de treball de les soques de *M. genitalium* es preparen a partir d'un cultiu líquid de 5 mL en medi SP4. Un cop que el cultiu ha crescut, es retira el medi SP4 envellit i les cèl·lules es recuperen en 5 mL de medi SP4 fresc. Els *stocks* de treball es conserven a -80 °C en alíquotes de 100  $\mu\text{L}$ .

Els *stocks* màster de les soques mutants de *M. genitalium* aïllades per primer cop a partir d'una colònia picada en placa es preparen a partir d'un cultiu líquid de 5 mL en medi SP4, que un cop crescut, es retira el medi envellit i les cèl·lules es recuperen en 1 mL de medi SP4 fresc i es conserven a -80 °C.

Per preservar les soques de micoplasma no és necessari afegir glicerol ni cap altre crioprotector, ja que el medi SP4 conté un elevat percentatge de sèrum.

### 1.5. Mesura de la densitat òptica d'un cultiu

L'absorbància a 600 nm d'un cultiu d'*E. coli* és una mesura indirecte del creixement. Per assegurar la linealitat cal diluir la mostra en el mateix medi de cultiu, per tal que  $A_{600} \leq 0,5$  O.D.

### 1.6. Protocols de transformació de soques bacterians utilitzats en aquest estudi

#### Transformació de soques d'*E. coli*

Tant l'obtenció de cèl·lules competents d'*E. coli* pel mètode de l'inouè com la transformació d'aquestes cèl·lules mitjançant el procediment per *shock* tèrmic, s'ha dut a terme segons els protocols descrits al "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Sambrook *et al.*, 2001).

#### Transformació de soques de *M. genitalium* per electroporació

El protocol d'electroporació que s'ha utilitzat en aquest treball està basat en el protocol descrit per (Hedreyda *et al.*, 1993) per a la transformació de *M. pneumoniae*. Aquest protocol va ser adaptat amb èxit per (Reddy *et al.*, 1996) per a la transformació de *M. genitalium* i ha estat lleugerament modificat en el nostre laboratori. Breument:

- 1) S'inicia un cultiu de *M. genitalium* de 15 mL a partir d'un *stock* de treball.
- 2) Al tercer dia de cultiu, es retiren 10 mL del medi SP4 envellit i es recuperen les cèl·lules del flascó amb l'ajut d'un *scraper* (TPP), en els 5 mL de medi restants.
- 3) Es disgreguen les cèl·lules fent travessar la suspensió de cèl·lules recuperada a través d'un filtre de baixa retenció de proteïnes amb un porus de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore).
- 4) La suspensió cel·lular filtrada s'inocula en un flascó de cultiu de 150  $\text{cm}^2$  amb 20 mL de medi SP4 fresc.
- 5) Al dia següent, es retira el medi del flascó de cultiu i rentem les cèl·lules tres vegades amb abundant tampó d'electroporació (8mM HEPES; 272 mM sucrosa, pH 7,4).
- 6) Novament, es rasca suaument la superfície del flascó amb un *scraper* per recuperar les cèl·lules en un volum de 1 mL de tampó d'electroporació (títol aproximat de  $10^9$  cfu  $\text{mL}^{-1}$ ).
- 7) En una cubeta d'electroporació de 2 mm de separació entre elèctrodes (BTX), afegim 100  $\mu\text{l}$  de la suspensió cel·lular en tampó d'electroporació que s'acaba de preparar.
- 10) S'afegeix a la cubeta el DNA plasmídic també, en el mínim volum possible (concentració  $\sim 1$   $\mu\text{g}$   $\mu\text{l}^{-1}$ ). En el cas d'utilitzar un minitransposó en la transformació s'utilitzaran 10  $\mu\text{g}$  de DNA plasmídic i 30  $\mu\text{g}$  en el cas de realitzar una transformació per recombinació homòloga.
- 11) La cubeta amb la barreja es manté en gel picat durant 15 min.
- 12) A continuació es realitza el xoc elèctric, introduint la cubeta a l'equip d'electroporació (ECM 630 BTX) i accionant el disparador de corrent. El xoc elèctric es programa a 2,5 kV de voltatge, 250  $\Omega$  de resistència i 25 mF de capacítància.
- 13) la cubeta amb la barreja es torna a mantenir en gel picat durant 15 min més.
- 14) Després s'afegeix 900  $\mu\text{l}$  de medi SP4, lentament per minimitzar el xoc osmòtic, i es transfereix el contingut en un *microtub* de 1,5 mL.
- 15) La suspensió cel·lular s'incuba a 37  $^{\circ}\text{C}$  durant 2-3 h per tal que s'expressi el gen de resistència a l'antibiòtic.
- 16) Finalment, es dispensa la suspensió cel·lular en volums de 200  $\mu\text{L}$  en plaques de medi SP4 sòlid. Aquest protocol general pot variar lleugerament en funció de la soca de partida. Especialment, si partim de soques de *M. genitalium* que tenen deficiències d'adherència, el cultiu de partida s'incubarà durant 4

dies i després es procedirà a la recuperació i rentat de les cèl·lules per centrifugació a 4000 xg durant 25 min. La disgregació de les cèl·lules en aquest cas es realitza fent passar la suspensió cel·lular a través d'una agulla de 0,5 µm de diàmetre, 6 cops.

## 2. Mètodes de DNA recombinant

### 2.1. Extracció de DNA plasmídic

Les extraccions de DNA plasmídic a petita escala s'han dut a terme amb el *kit* comercial “Fast Plasmid Miniprep Kit” (Eppendorf), seguint les indicacions del fabricant, o mitjançant el protocol de lisi alcalina descrit al *Molecular Cloning: A laboratory Manual* (Sambrook et al., 2001), partint de 3 mL de cultiu.

Les extraccions de DNA plasmídic a mitjana escala s'han dut a terme amb el *kit* comercial “GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit” (Sigma-Aldrich), seguint les indicacions del fabricant, o mitjançant el protocol descrit al “*Molecular Cloning: A laboratory Manual*” (Sambrook et al., 2001), però per millorar la qualitat de l'extracció en comptes de precipitar amb etanol absolut, s'ha procedit a la purificació mitjançant les columnetes del *Kit* comercial “e.Z.N.A.® Gel Extraction Kit” (Omega bio-tek), partint de 50 mL de cultiu.

### 2.2. Extracció de DNA genòmic de les soques de *M. genitalium*

Les extraccions de DNA genòmic de les soques de *M. genitalium* s'han dut a terme amb el *kit* comercial “e.Z.N.A.® Bacterial DNA Kit” (Omega bio-tek), seguint les indicacions del fabricant, o mitjançant el protocol que es detalla a continuació.

Per l'extracció de DNA genòmic de *M. genitalium*, partim d'un cultiu de 15 mL crescut fins a la fase exponencial tardana:

- 1) Es renten les cèl·lules tres vegades amb PBS. En el mateix flascó de cultiu si la soca és adherent o mitjançant la centrifugació del cultiu a 15.000 g durant 15 min si la soca té deficiències d'adherència.
- 2) Es lisen les cèl·lules en 1 mL de solució I (0,1 M Tris-HCl pH 8,0; 0,5 M NaCl; 10 mM EDTA).
- 3) S'afegeixen 50 µl d'SDS al 20% , s'agita suaument i es deixa incubant a TA durant 10 min.
- 4) S'afegeix proteïnasa K a una concentració final de 50 µg mL<sup>-1</sup> i s'incuba la mostra en un bany a 55 °C, durant 1 h.
- 5) Es realitzen tres tractaments amb fenol-cloroform-alcohol isoamílic 25:24:1, barrejant suaument la mescla per inversió.
- 6) Després de cada tractament, es centrifuga la mostra a 13.000 rpm durant 10 min i es recupera la fase superior, pipetejant amb una punta retallada.
- 7) A continuació, es precipita el DNA amb 2,5 volums d'etanol absolut.
- 8) Es centrifuga la mostra novament a 13.000 rpm durant 10 min i es retira el sobrenedant.
- 9) El pellet obtingut es renta dues vegades amb 1 mL d'etanol al 70% i es centrifuga la mostra a 13.000 rpm durant 10 min després de cada rentat.
- 10) Cal assecar el pellet durant 15 min en una campana de buit.
- 13) Finalment, s'afegeixen 200 µl de TE amb RNasa, per resuspendre el *pelet* de DNA genòmic.

### 2.3. Quantificació de DNA

La quantificació de les mostres de DNA s'ha dut a terme mitjançant mètodes espectrofotomètrics utilitzant un aparell Cary 400 Bio i seguint el protocol descrit al “*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*” (Sambrook et al., 2001) o mitjançant un “*NanoDrop 1000 Spectrophotometer*”, seguint les instruccions del fabricant (*Thermo Scientific*).

Les mostres de DNA utilitzades durant els processos de clonatge i altres mostres de DNA que no eren completament pures es van quantificar mitjançant electroforesi en gel d'agarosa.

#### **2.4. Seqüenciació de DNA**

Les reaccions de seqüenciació s'han realitzat mitjançant el *kit* comercial “*Big Dye 3.0 Terminator Kit*” (*Applied Biosystems*), seguint les indicacions del fabricant. Posteriorment, les mostres van ser analitzades utilitzant un aparell “*ABI 3100 Genetic Analyzer*” (*Applied Biosystems*). Tot el procés es va dur a terme en el Servei de Genòmica i Bioinformàtica de la UAB.

#### **2.5. Digestió de fragments de DNA**

Les digestions de DNA amb enzims de restricció (*Roche* o *Fermentas*) s'han dut a terme seguint indicacions del fabricant per a cada enzim.

#### **2.6. Lligació de fragments de DNA**

Les lligacions de fragments de DNA s'han fet amb la *T4 DNA lligasa* de *ROCHE*, seguint les indicacions del fabricant.

#### **2.7. Electroforesi de DNA en gels d'agarosa**

L'electroforesi de fragments de DNA s'ha realitzat en gels d'agarosa al 0,8% p/v i TAE<sub>x1</sub> (Tris-acetat 40 mM, EDTA 1 mM; pH 8). S'ha utilitzat agarosa de baixa electroendosmosi *SeaKem LE Agarose* (*CAMBREX*). Els gels s'han corregut a un voltatge de 60-70 V en electroforesi preparatives i de 70-90 V en electroforesi analítiques durant 1-2 h, en cubetes d'electroforesi de *BioRad*, model *Mini-Subcell*. El tampó TAE<sub>x50</sub> i el tampó de càrrega de DNA 10x s'han preparat segons el protocol descrit al “*Molecular Cloning: A laboratory Manual*” (Sambrook *et al.*, 2001). Per estimar la mida dels fragments de DNA s'ha utilitzat el marcador comercial *1 kb Plus DNA Ladder* (*LifeTechnologies*). La tinció s'ha realitzat submergint el gel en BrEt 0,5 µg mL<sup>-1</sup> en el mateix tampó d'electroforesi durant 15-20 min. El BrEt s'intercala en el DNA i permet detectar les bandes de DNA del gel quan s'il·lumina amb llum UV. Els gels es van fotografiar immediatament amb el *Gel Doc XR* (*BioRad*) i el software *Quantity one 4.6*.

#### **2.8. Purificació de fragments de DNA dels gels d'agarosa**

La purificació dels fragments de DNA dels gels d'agarosa s'ha realitzat mitjançant *kits* comercials seguint les instruccions del fabricant. Els *kits* utilitzats han estat: “*NucleoSpin<sup>®</sup> Extract IP*” (*Macherey-Nagel*) o “*E.Z.N.A.<sup>®</sup> Gel Extraction Kit*” (*Omega bio-tek*). Les purificacions s'han realitzat seguint les indicacions del fabricant. Només en el cas de purificació de seqüències de DNA riques en AT, com és el cas del genoma de *M. genitalium*, s'ha evitat fondre el retall d'agarosa a 55-65 °C i s'ha fet a TA, per no disminuir l'eficiència del procés de purificació.

#### **2.9. Amplificació de fragments de DNA per PCR**

L'amplificació de fragments de DNA per clonatge s'ha dut a terme per PCR (MJmini de *BioRad*), utilitzant la DNA polimerasa Phusion<sup>™</sup> (*FINNZYMES*) d'alta processivitat i amb activitat correctora de proves. Per l'amplificació de fragments de DNA en PCR diagnòstic s'ha utilitzat també la polimerasa GoTaq<sup>®</sup> de *Promega bio-tek*. Els enzims s'ha utilitzat seguint les indicacions del fabricant

#### **2.10. Marcatge no radioactiu de fragments de DNA per PCR**

Els fragments de DNA es van marcar mitjançant mètodes no radioactius utilitzant l'anàleg de nucleòtids dioxigenina-11-dUTP (*Roche*). Per dur a terme la reacció de marcatge s'ha utilitzat el *kit* comercial “*DIG DNA Labelling & Detection Nonradioactive Kit*” (*Roche*), seguint les indicacions del fabricant.

El marcatge també s'ha pogut realitzar per PCR fent servir la Taq DNA polimerassa modificada de *Biotoools*, que accepta nucleòtids marcats. En aquest cas, per fer la reacció de marcatge cal fer servir una barreja de dTTP marcat amb digoxigenina i sense marcar en una proporció 1:2.

### 2.11. Transferència de tipus Southern

La transferència de tipus Southern és una tècnica d'ús habitual per analitzar la presència d'una seqüència de DNA determinada en un gel d'agarosa. En aquest treball, el DNA ha estat transferit per capil·laritat a membranes de niló en condicions alcalines. La transferència i la preparació de les solucions de desnaturalització i neutralització s'han dut a terme segons els protocols descrits al "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Sambrook et al., 2001). La incubació de la membrana amb la sonda s'ha realitzat en un forn d'hibridació (*Amersham Pharmacia Biotech*) a 42 °C durant tota una nit. La detecció i la preparació de les solucions d'hibridació i de rentat s'han dut a terme segons el protocol descrit al manual "*DIG labelling manual*" (*Roche*). Per a la detecció, s'han utilitzat els compostos cromogènics NTB i BCIP (*BioRad*), prèvia incubació de la membra amb un anticòs anti-DIG conjugat a fosfatasa alcalina (*Roche*).

## 3. Construcció dels diferents plasmidis desenvolupats en aquest estudi

### pΔmg218<sub>Ct</sub>Gm<sup>R</sup>

Per la construcció d'aquest vector, es va amplificar per PCR un fragment d'aproximadament 725 pb de dins del gen *mg218* a partir de DNA genòmic de *M. genitalium*, amb els encebadors 5'upstP28(*Xba*I) i 3'upstP28(*Eco*RI), que flanquejaria pel cantó 5' el fragment 3' del gen *mg218* que es volia delecionar del genoma. És important destacar que l'encebador 3'upstP28(*Eco*RI) introdueix un codó STOP, que permetrà acabar la traducció del gen *mg218* en el punt en que s'ha truncat el gen. El fragment de PCR es va clonar en un pBE digerit amb *Eco*RV i, posteriorment, es va escindir del vector resultant mitjançant digestió enzimàtica amb *Xba*I i *Eco*RI. D'altra banda es va escindir per digestió enzimàtica amb *Eco*RI i *Bam*HI un fragment de 2,5 kb del vector pMTnGm, que conté el gen *aac*(6')-*aph*(2'') de resistència a gentamicina (Dybvig and Voelker, 1996);(Dhandayuthapani *et al.*, 1999). Els dos fragments es van clonar en el vector pΔmg218, digerit amb *Xba*I i *Bam*HI, de forma que es van substituir els fragments corresponents al braç d'homologia esquerre i al gen de selecció del vector original, obtenint el vector pΔmg218<sub>Ct</sub>Gm<sup>R</sup>.

### pΔmg218<sub>Ct</sub>tetM438

En aquest cas es va clonar el fragment *tetM438* digerit *Eco*RI i *Bam*HI en el vector pΔmg218<sub>Ct</sub>Gm<sup>R</sup> digerit també amb *Eco*RI i *Bam*HI, per tal de substituir el gen de selecció del vector de partida.

### pBE.218<sub>Ct</sub>

Per la construcció d'aquest vector, es va amplificar per PCR un fragment d'aproximadament 1,4 kb de l'extrem 3' del gen *mg218* a partir de DNA genòmic de *M. genitalium*, amb els encebadors 5'upstP28(*Xba*I) i 3'p28(*Eco*RI). El fragment de PCR es va clonar en un pBE digerit amb *Eco*RV, resultant en el vector pBE.218<sub>Ct</sub>. Aquest vector es va fer servir com a motlle de les PCR mutagèniques amb que es van introduir mutacions puntuals en la seqüència del gen *mg218*.

Les PCR mutagèniques es van fer per PCR inversa fent servir el vector pBE.218<sub>Ct</sub> com a motlle i un parell d'encebadors fosforilats en l'extrem 5'. Aquest encebadors estan orientats de forma oposada a una PCR convencional i tots hibriden de forma contigua. D'aquesta forma s'aconsegueix amplificar la totalitat del fragment que queda linealitzat, obert en el punt d'hibridació dels encebadors. Un cop linealitzat el motlle, els encebadors hibriden en els extrems del fragment i tenim una amplificació com en



les PCR convencionals. Els encebadors contenen les encebadors mutacions desitjades, que s'incorporaran a la seva seqüència del fragment durant la PCR. Finalment, es lliguen els dos extrems del fragment amplificat, gràcies als seus extrems 5' fosforilats, incorporats amb els encebadors, mitjançant una reacció de lligació amb T4 DNA lligasa.

Parella d'encebadors	Mutacions introduïdes en la seqüència de la proteïna MG218
mutdir1a i mutdir1b	MD-1 ( <i>Met1565Leu</i> )
mutdir2a i mutdir2b	MD-2 ( <i>Met1574Leu</i> )
mutdir3a i mutdir3b	MD-3 ( <i>Met1615Leu</i> )
mutdir3a i mutdir4a	MD-4 ( <i>Met1615Ser</i> )
mutdir5a i mutdir5b-2	MD-5 ( <i>Leu1620Leu</i> )
mutdirPa i mutdirPb	MD-P ( <i>Lys1609Arg</i> i <i>Ile1610Leu</i> )

### pB218<sub>Ct</sub>tetM438

Com a procediment general els diferents vectors pB218<sub>Ct</sub>tetM438, es van construir a partir dels vectors pBE.218<sub>Ct</sub>, cadascun contenint diferents mutacions en la seqüència del gen *mg218*. Aquests es van digerir amb *Xba*I i *Eco*RI, per escindir els diferents fragments corresponent a la seqüència 3' del gen *mg218* amb les mutacions puntuals pertinents generades sobre la seqüència, i es van clonar en el vector pΔ*mg218*, digerit amb *Xba*I i *Eco*RI, de forma que es va substituir el fragments corresponent al braç d'homologia esquerre del vector original, obtenint els diversos vectors pB218<sub>Ct</sub>tetM438.

### pBAJ

Aquest vector es va dissenyar per delecionar la regió 5' del gen *mg200*, codificant pel domini J de la proteïna MG200, en el genoma de *M. genitalium* per doble recombinació. En primer lloc es van amplificar per PCR, a partir de DNA genòmic de *M. genitalium*, les dues regions que flanquejarien la regió a delecionar, que anomenarem braç d'homologia esquerre o dret. Per una banda, per obtenir el braç d'homologia esquerre, es va amplificar per PCR un fragment d'aproximadament 1 kb amb els encebadors 5BE200-*Xba*I i 3BamBE199, que incorporen les dianes de restricció *Xba*I i *Bam*HI en els extrems del fragment. El producte de PCR en va clonar en un pBE digerit amb *Eco*RV i, posteriorment, es va escindir per digestió enzimàtica amb *Xba*I i *Bam*HI. D'altra banda, per l'obtenció del braç d'homologia dret, que contindrà la deleció del fragment desitjat, es va amplificar la regió promotora del gen *mg200* juntament amb un fragment de 600 pb de l'extrem 5' del mateix gen, que abasta des del domini J fins a la regió APR, mitjançant els encebadors 5p.*mg200*-*Eco*RI i 3*mg200*Nter-*Apa*I, que incorporen les dianes *Eco*RI i *Apa*I en els extrems del fragment. El fragment resultant, d'aproximadament 1Kb, es va clonar en un pBE digerit amb *Eco*RV, obtenint el vector pBBD200. Aquest vector es va fer servir per delecionar per PCR invertida la regió 5' del gen *mg200* que codifica pel domini J de la proteïna MG200, que són 224 pb. Per això, es va amplificar el vector pBBD200 amb els encebadors 3KODnaJ3-Ph i 5KODnaJ3-Ph, fosforilats en el seu extrem 5'. Aquests encebadors estan dissenyats per hibridar flanquejant la regió que es vol delecionar, de forma que s'amplifica la totalitat del vector, excepte aquest fragment, i s'obté el vector linealitzat obert pel punt en que s'ha delecionat el fragment desitjat. El producte de PCR resultant es va recircularitzar gràcies als seus extrems 5' fosforilats, incorporats amb els encebadors, mitjançant una reacció de lligació amb T4 DNA lligasa i, posteriorment, es va tornar a digerir amb *Eco*RI i *Apa*I, per escindir el fragment corresponent al braç d'homologia dret que s'acabava de preparar. Finalment, els fragments corresponents al braç d'homologia esquerre i dret digerits amb els enzims *Xba*I i *Bam*HI i *Eco*RI i *Apa*I, respectivament, es van clonar juntament amb el gen de selecció *tetM438* digerit *Eco*RI i *Bam*HI en un pBluscript II SK<sup>+</sup>, digerit amb *Xba*I i *Apa*I, obtenint el vector pBAJ. Cal destacar que en aquesta construcció, el gen de resistència a tetraciclina està orientat en *antisense* respecte al gen *mg200*.

**pBC<sub>J</sub>**

Per la construcció d'aquest vector es va partir del vector pBBD200, al que es va substituir la regió 5' del gen *mg200*, que codifica pel domini J de la proteïna MG200, pel fragment 5' del gen *mg019*, corresponent al domini J de la proteïna MG019. La substitució es va realitzar mitjançant PCR recombinant. En primer lloc, es va amplificar tot el vector pBBD200, excepte el fragment que es vol substituir, mitjançant els encebadors 3BE199-recombJ2 i 5-200DJ3recomb. D'aquesta forma, s'obté el vector linealitzat i obert pel punt que s'ha deletat la regió 5' del gen *mg200* que pretén substituir. A part, s'amplifica un fragment de 240 pb de la regió 5' del gen *mg019*, amb els encebadors 5J2-recombpromotor i 3J2recomb. Finalment, en una nova PCR, s'uneixen el fragment del gen *mg019* amb el vector linealitzat, gràcies a les regions complementàries incorporades als extrems dels dos fragments a través dels encebadors utilitzats. D'aquesta forma es recupera el vector recircularitzat i amb la regió d'interès substituïda. Aquest vector resultant es va digerir amb *EcoRI* i *ApaI*, alliberant l'insert que es va clonar en el vector pBAJ, digerit també amb *EcoRI* i *ApaI*, substituint d'aquesta forma el braç d'homologia dret original, obtenint el nou vector pBC<sub>J</sub>.

**pBC<sub>JGF</sub>**

Per la construcció del vector pBC<sub>JGF</sub> es va seguir la mateixa estratègia que en la construcció del vector pBC<sub>J</sub>, però substituint la regió que codifica pel domini J i també la regió G/F. En aquest cas, es van fer servir els encebadors 3BE199-recombJ2GF i 5-200DJ3GFrecomb, per amplificar el vector pBBD200 deletant la regió 5' del gen *mg200* que codifica pel domini J i la regió G/F de la proteïna MG200. A part, es va amplificar un fragment de 360 pb de la regió 5' del gen *mg019*, amb els encebadors 5J2GF-recombpromotor i 3J2recomb. I, finalment, es van unir per PCR els dos fragments aprofitant les regions complementàries incorporades amb els encebadors utilitzats. El vector circular resultant es va digerir amb *EcoRI* i *ApaI*, per alliberar l'insert que es va clonar en el vector pBAJ, digerit també amb *EcoRI* i *ApaI*. Així es va substituir el braç d'homologia dret del vector de partida, obtenint el nou vector pBC<sub>JGF</sub>.

**pMTncat**

La seqüència codificant pel gen de resistència a cloramfenicol (*cat*, *chloramphenicol acetyltransferase*) es va amplificar per PCR a partir del vector pBB540 (Tomoyasu *et al.*, 2001) fent servir els encebadors M-5CmM438 i BamHI-3Cm, que incorporen les dianes de restricció *MfeI* i *BamHI* en els seus extrems 5' respectivament. A més a més, l'encebador M-5CmM438 porta també 22 nt corresponents a la regió promotora del gen *mg438* de *M. genitalium*, per tal de fusionar aquest promotor a la seqüència codificant del gen *cat*. El fragment de PCR resultant, *catM438*, es va clonar en un pBE digerit amb *EcoRV* i, posteriorment, el fragment es va escindir del vector resultant mitjançant digestió enzimàtica amb *MfeI* i *BamHI* per ser clonat en el vector pMTntetM, digerit prèviament també amb *EcoRI* i *BamHI*. Aquest procediment substitueix el gen de resistència a tetraciclina present en el vector de partida pel gen de resistència a cloramfenicol i es destrueix la diana de clonatge de l'extrem 5' del gen *catM438*, ja que s'uneixen *EcoRI* i *MfeI*.

**pMTncat218s**

A partir del genoma de *M. genitalium* es va amplificar per PCR un fragment de 600 pb que comprèn la regió promotora pròpia, que s'ha pogut aproximar en aquest treball, i el gen *mg218s*, mitjançant els encebadors SallI-5pMG527 i EcoRV-3MG527. El producte de PCR es va digerir amb *SallI* i *EcoRV* i es va clonar en el vector pMTncat, digerit amb *SallI* i *EcoRV*, obtenint el vector pMTncat218s.

**pMTncatF218sCh**

El gen codificant per la proteïna mCherry es va amplificar per PCR a partir del vector Cherry-LacRep (Dundr *et al.*, 2007), fent servir els encebadors 5P-linkCh i 3P-EcoRICh. A més a més, en aquesta PCR s'aconsegueix modificar l'extrem 5' del gen, que es substitueix els dos codons inicials del gen per una seqüència codificant per 6 Asn. El fragment resultant té l'extrem 5' fosforilat i una diana de restricció *EcoRI* a l'extrem 3', introduïts amb els encebadors utilitzats. D'altra banda, en el vector pMTncat218-s cal suprimir el codó stop del final del gen *mg218-s* i reconstituir la diana de clonatge *MfeI* present a l'extrem 5' del gen *catM438*, que permetria el clonatge de l'insert. Per això, es va amplificar per PCR el vector pMTncat218-s amb els encebadors 5-Tn527Cm i 3-Tn527Cm que introduïen les modificacions que acabem d'anomenar i a més el vector queda linealitzat, obert pel lloc on calia clonar el gen *mCherry*. El fragment corresponent al gen *mCherry* es va digerir amb *EcoRI* i es va clonar en el vector linealitzat pMTncat218-s digerit amb *MfeI*.

### **pMTncat200**

Mitjançant una PCR convencional a partir del genoma de *M. genitalium* es va amplificar un fragment de 2 kb que comprenia la regió promotora pròpia i el gen *mg200* (Musatovova *et al.*, 2006), mitjançant els encebadors 5p.mg200-XbaI i 3NotI200. El producte de PCR es va clonar en el vector pBE digerit amb *EcoRV* i, posteriorment, el fragment es va escindir del vector resultant mitjançant digestió enzimàtica amb *XbaI* i *NotI* per ser clonat en el vector pMTncat, digerit amb *XbaI* i *NotI*, obtenint el vector pMTncat200.

### **pMTncat200ΔE**

Per PCR recombinant es va amplificar el gen *mg200* de *M. genitalium*, deleccionant la regió que codifica pel domini de la caixa EAGR de la proteïna MG200. En primer lloc, a partir del genoma de *M. genitalium* es van amplificar per PCR dos fragments del gen *mg200*. Per una banda, es va amplificar un fragment de 482 pb que comprenia la regió promotora pròpia (Musatovova *et al.*, 2006) i els 369 pb de l'extrem 5' del gen *mg200*, mitjançant els encebadors 5p.mg200-XbaI i 3KOEAGR1-recomb. Per l'altra banda, es va amplificar un fragment de 1185 pb corresponents a l'extrem 3' del gen *mg200*, fent servir els encebadors 5KOEAGR1-recomb i 3NotI200. En un segon pas, es van fusionar els dos fragments en un sol producte de PCR gràcies a les regions complementàries dels dos fragments, introduïdes amb els encebadors 3KOEAGR1-recomb i 5KOEAGR1-recomb, i fent servir els encebadors 5p.mg200-XbaI i 3NotI200, que incorporaven les dianes de restricció *XbaI* i *NotI* a l'extrem 5' i 3' del fragment, respectivament. El producte final de PCR es va clonar en el vector pBE digerit amb *EcoRV* i, posteriorment, el fragment es va escindir del vector resultant mitjançant digestió enzimàtica amb *XbaI* i *NotI* per ser clonat en el vector pMTncat, digerit prèviament també amb *XbaI* i *NotI*, obtenint el vector pMTncat200ΔE.

### **pMTncatC<sub>J</sub>**

Per PCR recombinant es va construir un fragment que contenia el promotor del gen *mg200* fusionat al gen codificant per la proteïna quimèrica C<sub>J</sub>, que està format per l'extrem 5' del gen *mg019* i l'extrem 3' del gen *mg200* de *M. genitalium*. En primer lloc, es van amplificar per PCR dos fragments per separat. Per una banda, a partir del vector pBC<sub>J</sub> es va amplificar per PCR un fragment de 354 pb corresponent a la regió promotora el gen *mg200* i l'extrem 5' del gen *mg019*, que comprèn la regió codificant pel domini J de la proteïna MG019, mitjançant els encebadors 5p.mg200-XbaI i 3J2recomb. Per l'altra banda, es va amplificar un fragment de 1566 pb corresponent al gen *mg200* sense la seva regió 5' codificant pel domini J i la regió G/F, fent servir els encebadors 5-200DJ3recomb i 3NotI200. En un segon pas, es van fusionar els dos fragments en un sol producte de PCR gràcies a les regions complementàries presents en els dos fragments, que s'han introduït amb els encebadors 3J2recomb i 5-200DJ3recomb, i fent servir els encebadors 5p.mg200-XbaI i 3NotI200, que incorporaven les dianes de restricció *XbaI* i *NotI* a l'extrem 5' i 3' del fragment, respectivament. El producte de PCR es va clonar en el vector pBE digerit amb *EcoRV* i,

posteriorment, el fragment es va escindir del vector resultant mitjançant digestió enzimàtica amb *XbaI* i *NotI* per ser clonat en el vector pMTncat, digerit amb *XbaI* i *NotI*, obtenint el vector pMTncatC<sub>J</sub>.

#### **pMTncatC<sub>JGF</sub>**

Com en el cas anterior, per PCR recombinant es va construir un fragment que contenia el promotor del gen *mg200* fusionat al gen codificant per la proteïna quimèrica C<sub>JGF</sub>, format un fragment de l'extrem 5' del gen *mg019* i un fragment de l'extrem 3' del gen *mg200* de *M. genitalium*. En primer lloc, es van amplificar per PCR dos fragments per separat. Per una banda, a partir del vector pBC<sub>JGF</sub> es va amplificar per PCR un fragment de 474 pb corresponent a la regió promotora el gen *mg200* i l'extrem 5' del gen *mg019*, que comprèn la regió codificant pels dominis J i la regió G/F de la proteïna MG019, mitjançant els encebadors 5p.mg200-XbaI i 3J2GFrecomb. Per l'altra banda, es va amplificar un fragment de 1446 pb corresponent al gen *mg200* sense la seva regió 5' codificant pel domini J i la regió G/F, fent servir els encebadors 5-200DJ3GFrecomb i 3NotI200. En un segon pas, es van fusionar els dos fragments en un sol producte de PCR gràcies a les regions complementàries introduïdes pels encebadors 3J2GFrecomb i 5-200DJ3GFrecomb, i fent servir els encebadors 5p.mg200-XbaI i 3NotI200. Novament, el producte de PCR es va clonar en el vector pBE digerit amb *EcoRV* i, posteriorment, el fragment es va escindir del vector resultant mitjançant digestió enzimàtica amb *XbaI* i *NotI* per ser clonat en el vector pMTncat, digerit amb *XbaI* i *NotI*, resultant en el vector pMTncatC<sub>JGF</sub>.

#### **pET21a.J3GF**

A partir del genoma de *M. genitalium* es va amplificar per PCR el fragment de 360 pb del gen *mg200* codificant pel domini J i la regió G/F de la proteïna MG200, mitjançant els encebadors 5NdednaJ3GF i 3XhodnaJ3GF. El producte de PCR es va digerir amb *NdeI* i *XhoI* i es va clonar en el vector pET-21a(+), digerit amb *NdeI* i *XhoI*, obtenint el vector pET21.J3GF, que permetria expressar el fragment J3GF amb una cua de 6xHis en el seu extrem carboxi-terminal, que facilitaria la purificació del fragment.

#### **pET21d.J2GF**

A partir del genoma de *M. genitalium* es va amplificar per PCR el fragment de 360 pb del gen *mg200* codificant pel domini J i la regió G/F de la proteïna MG200, mitjançant els encebadors 5NcoI019 i 3XhoJ2GF. El producte de PCR es va digerir amb *NcoI* i *XhoI* i es va clonar en el vector pET-21d(+), digerit amb *NcoI* i *XhoI*, obtenint el vector pET21d.J2GF, que permetria expressar el fragment J2GF amb una cua de 6xHis en el seu extrem carboxi-terminal, que facilitaria la purificació del fragment.

#### **pET21.218-s**

A partir del genoma de *M. genitalium* es va amplificar per PCR la seqüència codificant per la proteïna MG218-s, sense el codó Stop final, mitjançant els encebadors 5Nde527 i 3Xho527. El producte de PCR es va digerir amb *NdeI* i *XhoI* i es va clonar en el vector pET-21a(+), digerit amb *NdeI* i *XhoI*, obtenint el vector pET21.218-s, que permetria expressar a proteïna MG218-s amb una cua de 6xHis en el seu extrem carboxi-terminal, que facilitaria la purificació de la mateixa.

## **4. Tècniques de manipulació de RNA i assaig per primer extension**

L'extracció de RNA total es va extreure a partir de cultius de *M. genitalium* en fase exponencial utilitzant el kit comercial "RNAqueous" (LifeTechnologies) i a continuació la mostra de RNA total es va tractar amb Turbo DNasa (Life Technologies), seguint les instruccions del fabricant.

Les reaccions de retrotranscripció es van realitzar fent servir el kit comercial "SuperScript First-Strand Synthesis" (Invitrogen) seguint les indicacions del fabricant. No obstant, per l'assaig de primer extension

les reaccions de retrotranscripció s'han fet a partir de 20 µg de RNA total i s'han utilitzat encebadors amb l'extrem 5' marcat amb fluoresceïna (6Fam), especificats a la taula d'encebadors. El cDNA marcat amb 6(Fam) es va tractar amb dues unitat de RNasa H durant 20 min a 37 °C i es va precipitar amb etanol absolut. Posteriorment la mostra es resuspèn en 10 µL de formamida i es barreja amb 0.5 µl de marcador de pes molecular ROX (*Applied Biosystems*). La mida del cDNA es determina per electroforesis capil·lar amb el sistema ABI 3130XL (*Applied Biosystems*) i s'ha realitzat al servei de genòmica i bioinformàtica de la UAB. La mida dels fragment s'ha analitzat fent servir el software PeakScanner v1.0 (*Applied Biosystems*). Les anàlisi es van realitzar per duplicat i en presència d'un control positiu.

## 5. Tècniques d'anàlisi de proteïnes

### 5.1. Extracció de mostres de proteïna total

L'obtenció dels extractes de proteïna total dels bacteris objecte d'estudi es va dur a terme tractant les cèl·lules en PBS amb la solució de lisi corresponent al tampó de mostres de proteïna per PAGE. El tampó de mostres de proteïna per PAGE es va preparar segons les indicacions del "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*" (Sambrook et al., 2001).

### 5.2. Quantificació de mostres de proteïna

Els extractes de proteïna es van quantificar amb el *kit* comercial "*Pierce BCA Protein Assay kit*" (*Thermo Scientific*), seguint les indicacions del fabricant.

### 5.3. Electroforesi discontinua en gels de poliacrilamida (SDS-PAGE)

L'electroforesi discontinua en gels de poliacrilamida-SDS és una metodologia que permet l'anàlisi de mostres complexes de proteïna. El mètode es basa en un suport físic constituït per fibres de monòmers d'acrilamida entrecruats amb bisacrilamida que polimeritzen en dissolució en presència de radicals lliures. Aquests radicals són aportats per persulfat amònic i queden estabilitzats per TEMED. En l'electroforesi discontinua es polimeritzen dos tipus de gels d'acrilamida: el gel superior o apilador i el gel inferior o separador. D'aquesta manera, amb el gel apilador s'aconsegueix concentrar tota la mostra en un front petit sobre el gel separador augmentant la resolució de la separació de les proteïnes en ordre decreixent de PM. El SDS és un detergent que desnaturalitza les proteïnes i s'uneix en una proporció constant de 1,4 g SDS/g proteïna, apantallant la càrrega pròpia i aconseguint que migrin de manera proporcional al seu pes molecular. Els tamps de mostres poden tenir agents reductors per reduir els ponts disulfur, que farien variar la mobilitat de les proteïnes.

La preparació del gel SDS-PAGE i les solucions necessàries (tampó d'electrodes, tampó de càrrega de proteïnes) s'ha fet seguint el protocol estàndard descrit al *Molecular Cloning: A laboratory Manual* (Sambrook et al., 2001). S'ha utilitzat el *kit* d'electroforesi *Mini-Protean* (*BioRad*). Els gels d'acrilamida s'han fet al 3% pel gel apilador i en percentatges entre 7,5 i 15% pel gel separador, fent servir la solució al 40% d'acrilamida:N-N'-bimetilen acrilamida (37,5:1) (*Bio-Rad*). En cada gel s'ha inclòs una mostra de marcador de pes molecular comercial: 5 µL de *BenchMark<sup>TM</sup> Protein Ladder* (*LifeTechnologies*) o en el cas de necessitar un marcador pretenyit s'han afegit 10 µL de *BenchMark<sup>TM</sup> Pre-stained Protein Ladder* (*LifeTechnologies*) o 5 µL *Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Dual Xtra Standards* (*Bio-Rad*). Els gels s'han corregut a 10-15 mA, fins que el Blau de bromofenol, present a les mostres, surt del gel.

### 5.4. Tinció amb Blau de Comassie dels gels d'electroforesi

Aquest és un mètode de tinció quantitatiu i específic per proteïnes. El límit inferior de detecció és de 0,3-1 µg per banda. Un cop finalitzada la cursa electroforètica, el gel es submergeix en Comassie Brilliant

Blue R (*Sigma-Aldrich*) al 0,1% p/v dissolt en àcid acètic, metanol i aigua (2:5:5), en agitació suau durant 15-30 min. Després, cal destenyir en àcid acètic 10% v/v, fent varis canvis fins que el fons del gel es torni transparent i les bandes blaves. A continuació els gels es fotografien amb el *GS-800 Calibrated Densitometer (BioRad)* i el software *Quantity one 4.6 (BioRad)*.

### 5.5. Transferència de tipus Western (Western-blot)

L'electrotransferència de proteïnes a un filtre de nitrocel·lulosa (NC) i la posterior detecció mitjançant anticossos és una tècnica ràpida i sensible per l'anàlisi i la caracterització de proteïnes. Consisteix en separar les proteïnes per SDS-PAGE, transferir-les a un filtre de NC i fer la detecció selectiva de les proteïnes d'interès mitjançant l'ús d'anticossos (Ac) específics.

La preparació del gel SDS-PAGE, la transferència i la preparació de les solucions necessàries s'han fet seguint els protocols estàndards descrits al *Molecular Cloning: A laboratory Manual (Sambrook et al., 2001)*. Per la transferència s'ha utilitzat el kit d'electrotransferència *Mini Trans-Blot de BioRad*. Per poder identificar la mida de les bandes detectades a la NC s'ha fet servir un marcador pretenyit comercial. La transferència es realitza a un voltatge de 100 V durant 1 h.

Per la detecció de proteïnes concretes sobre la NC s'utilitzen anticossos primaris obtinguts en ratolí o conill. Pel revelat la membrana s'utilitzen anticossos secundaris (dil 1/5000) contra la regió constant dels anticossos de ratolí o conill, utilitzats en el pas previ, que estan conjugats o bé amb fosfatasa alcalina (PA) o amb peroxidasa (HRP). D'aquesta forma, es visualitzen les bandes d'interès en la membrana NC mitjançant una reacció colorimètrica amb PA en presència dels compostos cromogènics NBT i BCIP (*BioRad*) o per reacció de bioluminescència amb HRP en presència d'un substrat específic (*BioRad*). En tots dos casos seguint les instruccions de la casa comercial.

Anticòs primari	Dilució de treball	Origen
Monoclonal de ratolí anti-MG218	1:500	(Pich <i>et al.</i> , 2008)
Policlonal de ratolí anti-MG218 <sub>ct</sub>	1:2000	(Pich <i>et al.</i> , 2008)
Policlonal de ratolí anti-MG200	1:5000	(Pich, 2008)
Policlonal de ratolí anti-J3GF	1:2000	Aquest treball
Policlonal de ratolí anti-MG217	1:1000	(Burgos <i>et al.</i> , 2008)
Monoclonal de ratolí anti-MG217 E38	1:500	(Burgos <i>et al.</i> , 2008)
Policlonal de ratolí anti-MG219	1:1000	(González-González, en preparació)
Policlonal de ratolí anti-MG318	1:1000	(González-González, en preparació)
Policlonal de conill anti-p41	1:500	(Krause <i>et al.</i> , 1997)*
Policlonal de conill anti-HMW1	1:5000	(Stevens and Krause, 1991)*
Policlonal de conill anti-HMW3	1:5000	(Stevens and Krause, 1992)*
Monoclonal de ratolí anti-P140	1:1000	(Dhandayuthapani <i>et al.</i> , 1999)**
Policlonal de conill anti-P110	1:1000	(Dhandayuthapani <i>et al.</i> , 1999)**
Policlonal de conill anti-mCherry	1:500	Comercial antibodies-online GmbH

\* subministrat pel Dr. Duncan Krause (UGA), anticòs preparat a partir de proteïna de *M. pneumoniae*

\*\*subministrat pel Dr. Joel Baseman (UTHSCSA)

### 5.6. Expressió i purificació del fragment J3GF de la proteïna MG200 a *E. coli*

Per l'expressió del fragment J3GF de la proteïna MG200, es va aïllar una colònia individual de cèl·lules de BL21(DE3) portadores del plasmidi pET21a.J3GF. Partint d'aquesta colònia es va iniciar un cultiu de 10 mL a 37 °C controlant que l' $A_{600}$  no fos superior a 1 unitat. A continuació, 5 mL del cultiu anterior van ser utilitzats per inocular un cultiu de 500 mL que va ser incubat a 37°C. Quan l' $A_{600}$  va arribar a 0,55 unitats, es va posar el cultiu en gel picat durant 15 min i es va induir l'expressió de la proteïna amb IPTG 1 mM a 16 °C o/n; aquestes condicions de cultiu permeten augmentar la quantitat de proteïna MG200

present a la fracció soluble quan es lisen les cèl·lules. A continuació, es va centrifugar el cultiu a 5.000 xg durant 15 min a 4 °C i el *pellet* recuperat es va ressuspendre en 40 mL de tampó d'unió (5 mM imidazol; 500 mM NaCl; 20 mM tampó fosfat pH 7,9) fins aconseguir una suspensió cel·lular homogènia. La suspensió es va sonicar amb un sonicador *BRANSON Digital Sonifier* (3x2 min a 32 W), fins aconseguir lliurar totalment les cèl·lules. La mostra va ser centrifugada a 39.000 xg durant 25 min a 4 °C i el sobrenedant va ser passat per un filtre de baixa retenció de proteïnes amb porus de 0,22 µm (Millipore). La proteïna recombinant es va purificar mitjançant una columna d'afinitat per níquel, gràcies a la cua d'histidines afegida en un dels extrems de la proteïna, que és capaç d'unir metalls divalents i, per tant, amb gran afinitat pel níquel. Aquesta afinitat es deu als anells imidazol de la cadena lateral de les histidines. Els tampons utilitzats contenen concentracions creixents d'imidazol. Poc a poc es van eluint les proteïnes amb afinitat creixent pel níquel, per competència amb l'imidazol. Finalment, s'elueix la proteïna recombinant, que té la cua d'histidines, amb imidazol a 1 M. Pel procés de purificació es va utilitzar un cromatògraf *Äkta prime* (Amersham Pharmacia Biotech), seguint el protocol *His-Bind™ Buffer Kit Protocols* descrit al manual del pET (Novagen). Es va fer servir 1 mL de reïna empaquetada (*Chelating Sepharose™ Fast Flow*, GE Healthcare) i l'eluit es va recollir en un tampó d'elució (1 M imidazol; 500 mM NaCl; 20 mM tampó fosfat pH 7,9).

Al final del procés, una mostra de la fracció recuperada de la columna d'afinitat corresponent al pic d'elució, va ser analitzada per SDS-PAGE. Es va observar una banda majoritària de 10 kDa corresponent al fragment J3GF de la proteïna MG200.

### **5.7. Diàlisi del fragment J3GF de la proteïna MG200 a *E. coli***

El fragment J3GF purificat, tal i com hem explicat en l'apartat anterior, va ser dialitzat per substituir el tampó d'elució emprat en la purificació per tampó PBS. La mostra de proteïna purificada dipositada en una membrana de diàlisi SpectraPor 3 (Spectrumlabs.com) es va submergir en un 1 L de PBS (*Roche*), en agitació i a 4 °C durant tota una nit. La mostra es va quantificar i congelar en al·lotes de 100 µg mL<sup>-1</sup>.

### **5.8. Obtenció d'anticossos policlonals contra el fragment J3GF de la proteïna MG200**

Els anticossos policlonals contra el fragment J3GF de proteïna MG200 es van obtenir immunitzant un ratolí BALB/c amb 3 punxades intraperitoneals amb 50 µg de proteïna J3GF dialitzada amb 15 dies de diferència entre punxada.

## **6. Tècniques utilitzades per la caracterització de les soques de *M. genitalium***

### **6.1. Hemadsorció (HA)**

#### **6.1.1. Assaig HA Qualitativa**

Per dur a terme l'assaig d'HA qualitativa, es parteix d'un cultiu fresc de la soca d'estudi. Es recuperen les cèl·lules i es disgreguen passant la suspensió cel·lular recuperada a través d'un filtre de baixa retenció de proteïnes amb porus de 0,45 µm (*Millipore*). Després es preparen diferents dilucions de les cèl·lules i es cultiven en plaques de medi sòlid SP4. Quan les colònies són visibles (8-10 dies), s'afegeixen 2 mL d'una suspensió cel·lular d'eritròcits humans (hRBC) diluïts en PBS estèril 1:50 i s'incuba durant 2 h a 37 °C sense agitació. Passat aquest temps, es realitzen tres rentats amb PBS per eliminar l'excés de hRBC que no s'han adherit a les colònies de micoplasma i s'observen amb una lupa estereoscòpica Leica MZFLIII. Les imatges es van prendre mitjançant una càmera digital Leica DC500 connectada a la lupa.

### 6.1.2. Assaig HA Quantitativa per citometria

L'assaig d'HA quantitativa es va realitzar seguint el protocol descrit pels autors a “*Quantitative Assessment of Mycoplasma Hemadsorption Activity by Flow Cytometry*” (García-Morales *et al.*, 2014). Aquest nou mètode aprofita la citometria de flux per mesurar ràpidament i amb precisió l'activitat d'HA dels micoplasmes en presència de SYBR Green I, un fluorocrom que tenyeix els àcids nucleics, de forma que permet resoldre els hRBC i les cèl·lules de micoplasma per la seva mida i fluorescència. Els autors proposen interpretar la capacitat d'unió d'eritròcits de les cèl·lules de *M. genitalium* com un interacció proteïna-proteïna, de forma que seguiria una cinètica de tipus Langmuir, que s'ajustaria a un model matemàtic definit per l'expressió:

$$y = 1 - \frac{B_m x}{K_D + x},$$

on  $y$  és la fracció lliure de micoplasmes (en tant per u) i  $x$  la concentració d'eritròcits. Així, la cinètica es pot definir amb dos paràmetres: la constant de dissociació  $K_D$  (hRBC  $\mu\text{L}^{-1}$ ) i la capacitat màxima d'unió  $B_m$  (tant per u).

Els paràmetres  $K_D$  i  $B_m$  per cadascuna de les soques de *M. genitalium* es van determinar a partir de l'ajust de les dades experimentals al model anterior per regressió no lineal fent servir els programes Maple 17 de Maplesoft™ i també el programa R (*The R Project for Statistical Computing*) de *The R Foundation for Statistical Computing*<sup>1</sup>, obtenint els mateixos resultats amb tots dos programes.

Per poder comparar les cinètiques d'unió a eritròcits de les diferents soques mutants de *M. genitalium* amb la soca salvatge es va desenvolupar un nou mètode<sup>2</sup> basat en la següent variació del model matemàtic:

$$y = 1 - \frac{(B_m + b_m z)x}{K_D + k_D z + x},$$

on  $x$  i  $y$  coincideixen amb les dades experimentals de les dues soques a comparar i s'introdueix una tercera variable  $z$  per discriminar els dos grups. S'assignen els valors  $z=0$  per la soca salvatge i  $z=1$  per la soca mutant. Mitjançant regressió no lineal s'ajusten les dades a aquest nou model obtenint els valors de 4 paràmetres:  $K_D$  i  $B_m$  i els nous  $k_D$  (hRBC  $\mu\text{L}^{-1}$ ) i  $b_m$  (tant per u). Finalment, es determina si els paràmetres  $k_D$  i  $b_m$  són estadísticament significativament diferents a zero, fent servir el programa R que executa el test de Wald, amb un nivell de significació del 5%. Que algun d'aquests dos paràmetres sigui significativament diferent de zero, ens porta a la conclusió que totes dues soques tenen un comportament significativament diferent entre elles, en quant a la unió d'eritròcits.

### 6.2. Estudis microcinematogràfics

Per realitzar els estudis microcinematogràfics, s'inicien diversos cultius amb inòculs a diferents concentracions de les soques d'estudi en plaques de cultiu cel·lular MATTEK de 35 mm amb fons de vidre (*Mattek Cooperación, PA*) o en cambres de cultiu cel·lular  $\mu$ -Slide 8 well (*ibidi*) amb fons de plàstic i s'incuben a 37 °C i 5% CO<sub>2</sub> durant una nit. A continuació, es retira el medi per afegir medi SP4 fresc sobre les cèl·lules adherides. El moviment de les cèl·lules es monitoritza a 37 °C i 5% de CO<sub>2</sub> amb un microscopi Nikon Eclipse TE 2000-E i es capturen imatges a intervals de 2 s durant 2 min amb una càmera Nikon Digital Sight DS-SMC controlada pel programa NIS-Elements BR.

<sup>1</sup> <http://www.r-project.org/>

<sup>2</sup> Per la determinació del mètode estadístic per la comparació de corbes vull agrair el consell i assessorament del Dr. Pere Puig del Departament de Matemàtiques de la UAB.



Per l'obtenció dels paràmetres de motilitat, només es van considerar les preparacions que contenien un nombre similar de cèl·lules. La freqüència de cèl·lules mòtils es va determinar examinant el moviment d'aproximadament 500 cèl·lules de cada soca analitzada. El nombre de cèl·lules amb períodes de repòs es van comptabilitzar tenint en compte les cèl·lules que realitzaven al menys una parada de més de 5 s durant el temps d'observació del moviment. La determinació de la velocitat exhibida per la soca d'estudi es va determinar a partir de la mitjana de les velocitats exhibides per un mínim de 200 cèl·lules individuals, que es van mesurar fent servir el programa *ImageJ* amb el complement *MTrackJ*. El perfil dels *tracks* descrits per cadascuna de les cèl·lules mòtils analitzades es va analitzar visualment, classificant-los en circulars o erràtics. El diàmetre dels *tracks* circulars descrits per 50 individus de cada soca d'anàlisi es va mesurar amb *ImageJ* i el complement *MtrackJ*, que permet dibuixar els *tracks*. La significació estadística de les diferències entre la velocitat de les soques d'estudi i la soca salvatge es va determinar aplicant un test per ANOVA/*Tukey's range test* amb un p-valor < 0.05. De la mateixa forma es va comparar el diàmetre dels *tracks* circulars. L'anàlisi estadístic s'ha realitzat amb el programa IBM SPSS *Statistics* 19 o *KaleidaGraph* 4.01. Per a cada soca mutant s'ha determinat si el percentatge de cèl·lules mòtils que descriuen *tracks* circulars i erràtics és el mateix que en la soca salvatge G37 que s'ha utilitzat com a població control. L'anàlisi estadística s'ha realitzat aplicant un test "khi quadrat" d'homogeneïtat amb un nivell de significació del 5%.

### 6.3. Localització de proteïnes per microscòpia de fluorescència

#### 6.3.1. Detecció de proteïnes de fusió fluorescentes

La localització subcel·lular de proteïnes a *M. genitalium* es pot realitzar mitjançant l'obtenció de soques modificades genèticament per expressar la proteïna d'interès fusionada amb una proteïna fluorescent, com per exemple la proteïna mCherry. En el primer capítol d'aquest treball, s'ha dissenyat la proteïna de fusió MG218-s::Ch per determinar la localització subcel·lular de la proteïna MG218-s, però l'anàlisi no es va poder realitzar exitosament degut a la degradació de la proteïna de fusió. No obstant, el protocol que caldria realitzar es descriu breument a continuació. En una cambra de cultiu cel·lular *μ-Slide 8 well (ibidi)* es creixen cèl·lules de la soca fluorescent durant una nit en condicions estàndard de cultiu. A continuació, es retira el medi SP4, i es fixen les cèl·lules adherides amb una solució de 2% de PFA en medi SP4:PBS 1:1 durant 10 min. La preparació es renta amb PBS i es torna a cobrir amb solució de fixació de 2% de PFA en PBS durant 1h més. Finalment es fan dos rentats amb PBS i es cobreix la preparació amb PBS. Es pot afegir Hoechst 33342 (*LifeTechnologies*)  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  per marcar el DNA de les cèl·lules, perquè pot difondre a través de la membrana i penetrar les cèl·lules. La unió de Hoechst 33342 dsDNA emet fluorescència blava. L'observació de les mostres es realitza amb un microscopi de fluorescència Nikon Eclipse TE 2000-E i es capturen imatges amb una càmera Nikon Digital Sight DS-SMC controlada pel programa NIS-Elements BR. Cal tenir en compte que en cada cas es fa en paral·lel una preparació amb la soca salvatge que servirà de control negatiu de la fluorescència.

#### 6.3.2. Immunofluorescència

La localització subcel·lular de la proteïna MG200 i derivades a *M. genitalium* es va analitzar mitjançant un assaig d'immunofluorescència.

Per això, s'han cultivat cèl·lules de *M. genitalium*, de la soca d'interès en cada cas, sobre cobreobjectes de vidre, introduït en una placa de cultiu, durant un mínim de 2 h a 37 °C per afavorir l'adherència de les cèl·lules al vidre. Després es retira el medi i les cèl·lules unides als cobreobjectes es fixen amb 2 mL de solució al 2% de paraformaldehid (p/v) en PBS:SP4 (1:1) durant 10 min a temperatura ambient. Els cobreobjectes es renten amb PBS i es tornen a submergir en 2 mL de solució de fixació al 2,0% de paraformaldehid (p/v) en PBS durant 1 h a temperatura ambient (TA). Les cèl·lules es renten tres vegades

amb PBS i es cobreixen amb solució de bloqueig permeabilitzant, que conté 0,05% de Triton X-100 (v/v) i 5% de llet desnatada (p/v) en PBS i, a continuació, s'incuba durant la nit a 4 °C. Després, s'incuba la mostra amb un anticòs policlonal de ratolí anti-MG200 diluït 1:5000 en solució de bloqueig i permeabilització durant 60 min a TA. La mostra es renta tres vegades amb solució de rentat (0,05% de Triton X-100 en PBS) abans d'incubar-la amb un anticòs de cabra anti-ratolí marcat amb Alexa Fluor 555 (*Molecular sondes*) diluït 1:1000 en solució de bloqueig i permeabilització durant 60 min a TA en la foscor. Finalment, la mostra es renta tres vegades amb PBS i el cobreobjectes es col·loca sobre un suport d'acer inoxidable i es deixa cobert en solució de PBS.

Les mostres es van examinar amb un microscopi Nikon Eclipse TE 2000-E. Es van capturar imatges de contrast de fase i epifluorescència TRITC amb una càmera Nikon Digital Sight DS-SMC controlada pel programa NIS-Elements BR. En l'anàlisi es van realitzar tres controls negatius de la fluorescència: una mostra es va tractar sense anticossos, i les altres dues es van realitzar en absència d'un dels dos anticossos per descartar inespecificitats.

#### **6.4. Microscòpia electrònica de transmissió**

Per analitzar el citoesquelet de l'organela terminal de *M. genitalium* es preparen mostres de cèl·lules crescudes sobre reixetes de coure, recobertes en carboni preparades per l'ús en microscopis electrònics de transmissió. En aquest cas, en una placa de petri de 35 mm de diàmetre s'afegeixen 2 mL de medi SP4 i s'hi submergeixen les reixetes de coure, amb cura i penetrant la superfície del líquid de forma obliqua per evitar que la força de la tensió superficial pugui trencar la pel·lícula de carboni que recobreix la reixeta i de forma que al dipositar-se al fons de la placa, el carboni quedi a la cara superior de la reixeta. A continuació s'inocula el micoplasma en el medi i s'incuba durant una nit a 37 °C i 5% CO<sub>2</sub>. L'elevada concentració de sèrum del medi permetrà que el micoplasma s'adhereixi sobre la pel·lícula de carboni que absorbeix el sèrum. Per poder observar la ultraestructura al descobert se sotmeten les cèl·lules a un breu tractament de lisi. Per això, cal recuperar la reixeta de dins la placa de petri i assecat el medi restant amb paper absorbent. Després es submergeix amb cura en una placa de petri que conté 2 mL de PBS i es manté durant 1 min per rentar les restes de medi. Se seca de nou la reixeta i es submergeix en una gota de 120 µL de solució de lisi (0,5 M de KCl i 0,5 % de Triton X-100 en 20mM de TEA, pH 7,5). A continuació, es fan tres rentats en PBS, secant la mostra entre rentats i es tenyeix amb una solució al 1% d'acetat d'uranil. Finalment, les preparacions es van observar en un microscopi electrònic de transmissió Hitachi H-7000 i es van capturar imatges amb una càmera CCD GATAN ES500W *Erlangshen*, en el servei de microscòpia de la UAB.

#### **6.5. Microscòpia electrònica de rastreig**

Per l'anàlisi dels mutants per microscòpia electrònica de transmissió, es van realitzar cultius de 2 mL de les soques d'interès en cambres de cultiu cel·lular de permanox (*Nunc*). A les 16 h, es va retirar el medi de cultiu, es van rentar les cèl·lules amb PBS i es van fixar amb una solució de glutaraldehyd a l'1% en PBS durant 1 h. Posteriorment, les cèl·lules es van rentar amb PBS i es van deshidratar submergint-les de manera seqüencial en etanol al 25, 50, 75 i 100% durant un període de 10 min amb cada solució. Immediatament, les mostres es van assecat mitjançant un punt crític (K850 Critical point drier) i es van metal·litzar amb or. Finalment, les preparacions es van observar en un microscopi electrònic de rastreig Hitachi S-570 en el servei de microscòpia de la UAB.

A partir de les imatges de microscòpia electrònica de rastreig, s'ha mesurat l'angle de curvatura de l'OT respecte el cos cel·lular d'un mínim de 200 cèl·lules individual de la soca salvatge i de la soca mutant MD-P3 amb *ImageJ*. La significació estadística de les diferències entre els angles de curvatura de l'OT respecte el cos cel·lular de les soques d'estudi i la soca salvatge es va determinar aplicant un test per

ANOVA/*Tukey's range test* amb un p-valor  $< 0.05$ . De la mateixa forma es va comparar el diàmetre dels *tracks* circulars. L'anàlisi estadístic s'ha realitzat amb el programa IBM SPSS *Statistics* 19 o KaleidaGraph 4.01.

S'han fet recomptes de les cèl·lules individuals que presenten una, dues o més de dues OT a partir de les imatges obtingudes de mostres de la soca salvatge i de les soques mutants C<sub>J</sub>, C12 i C12 que expressen les proteïnes quimèriques C<sub>J</sub> i C<sub>JGF</sub> tractades de la mateixa manera i en paral·lel. En cada cas s'han analitzat un mínim de 150 individus (300 de la soca salvatge, 400 de la soca C<sub>J</sub> i 160 de la soca C12), excepte en el cas dels dos clons de C12+ C<sub>JGF</sub>, que donat l'elevat grau d'agregació de les mostres, només s'han pogut analitzar 55-65 cèl·lules individuals. Per a cada soca mutant s'ha determinat si el percentatge de cèl·lules amb una dues o més OT és el mateix que en la soca salvatge G37 que s'ha utilitzat com a població control. L'anàlisi estadística s'ha realitzat aplicant un test "*khi* quadrat" d'homogeneïtat amb un nivell de significació del 5%.



## Bibliografia

- Adan-Kubo, J., Uenoyama, A., Arata, T., and Miyata, M. (2006) Morphology of isolated Gli349, a leg protein responsible for *Mycoplasma mobile* gliding via glass binding, revealed by rotary shadowing electron microscopy. *J Bacteriol* **188**: 2821–8.
- Algire, M. a, Lartigue, C., Thomas, D.W., Assad-Garcia, N., Glass, J.I., and Merryman, C. (2009) New selectable marker for manipulating the simple genomes of *Mycoplasma* species. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 4429–32.
- Alvarez, R.A., Blaylock, M.W., and Baseman, J.B. (2003) Surface localized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Mycoplasma genitalium* binds mucin. *Mol Microbiol* **48**: 1417–1425.
- Anagrius, C., Loré, B., and Jensen, J.S. (2005) *Mycoplasma genitalium*: prevalence, clinical significance, and transmission. *Sex Transm Infect* **81**: 458–62.
- Balish, M.F., Hahn, T., Popham, P.L., and Krause, D.C. (2001) Stability of *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence-accessory protein HMW1 correlates with its association with the triton shell. *J Bacteriol* **183**: 3680–8.
- Balish, M.F., and Krause, D.C. (2002) Cytoadherence and the Cytoskeleton The cytoskeleton. In *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. Razin, S., and Herrmann, R. (eds). Kluwer Academic Publishers, pp. 491–518.
- Balish, M.F., Ross, S.M., Fisseha, M., and Krause, D.C. (2003) Deletion analysis identifies key functional domains of the cytoadherence-associated protein HMW2 of *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol* **50**: 1507–1516.
- Balish, M.F., Santurri, R.T., Ricci, A.M., Lee, K.K., and Krause, D.C. (2003) Localization of *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence-associated protein HMW2 by fusion with green fluorescent protein: implications for attachment organelle structure. *Mol Microbiol* **47**: 49–60.
- Baseman, J.B., Banai, M., and Kahane, I. (1982) Sialic acid residues mediate *Mycoplasma pneumoniae* attachment to human and sheep erythrocytes. *Infect Immun* **38**: 389–91.
- Baseman, J.B., Cole, R.M., Krause, D.C., and Leith, D.K. (1982) Molecular basis for cytoadsorption of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* **151**: 1514–22.
- Baseman, J.B., Lange, M., Criscimagna, N.L., Giron, J. a, and Thomas, C. a (1995) Interplay between mycoplasmas and host target cells. *Microb Pathog* **19**: 105–16.
- Baseman, J.B., and Tully, J.G. (1997) *Mycoplasmas*: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. *Emerg Infect Dis* **3**: 21–32.
- Bébéar, C. (2012) Editorial commentary: infections due to macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*: now what? *Clin Infect Dis* **55**: 1650–1.
- Beck, B.D., Arscott, P.G., and Jacobson, A. (1978) Novel properties of bacterial elongation factor Tu. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 1250–4.
- Bergemann, a D., Whitley, J.C., and Finch, L.R. (1989) Homology of mycoplasma plasmid pADB201 and staphylococcal plasmid pE194. *J Bacteriol* **171**: 593–5.
- Bhugra, B., Voelker, L.L., Zou, N., Yu, H., and Dybvig, K. (1995) Mechanism of antigenic variation in *Mycoplasma pulmonis*: interwoven, site-specific DNA inversions. *Mol Microbiol* **18**: 703–14.
- Biberfeld, G., and Biberfeld, P. (1970) Ultrastructural features of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* **102**: 855–61.
- Boonmee, A., Ruppert, T., and Herrmann, R. (2009) The gene *mpn310* (*hmw2*) from *Mycoplasma pneumoniae* encodes two proteins, HMW2 and HMW2-s, which differ in size but use the same reading frame. *FEMS Microbiol Lett* **290**: 174–81.
- Bredt, W. (1968) Motility and multiplication of *Mycoplasma pneumoniae*. A phase contrast study. *Pathol Microbiol (Basel)* **32**: 321–6.
- Bredt, W. (1973) MOTILITY OF MYCOPLASMAS. *Ann N Y Acad Sci* **225**: 246–250.
- Bukau, B., and Horwich, A.L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**: 351–366
- Burgos, R. (2009) Paper de les Proteïnes P110, P140, MG312 i MG217 en l'Estructura i Funció de l'Organela Terminal de *Mycoplasma genitalium*.

- Burgos, R., Pich, O.Q., Ferrer-Navarro, M., Baseman, J.B., Querol, E., and Piñol, J. (2006) Mycoplasma genitalium P140 and P110 cytoadhesins are reciprocally stabilized and required for cell adhesion and terminal-organelle development. *J Bacteriol* **188**: 8627–37.
- Burgos, R., Pich, O.Q., Querol, E., and Piñol, J. (2007) Functional analysis of the Mycoplasma genitalium MG312 protein reveals a specific requirement of the MG312 N-terminal domain for gliding motility. *J Bacteriol* **189**: 7014–23.
- Burgos, R., Pich, O.Q., Querol, E., and Piñol, J. (2008) Deletion of the Mycoplasma genitalium MG\_217 gene modifies cell gliding behaviour by altering terminal organelle curvature. *Mol Microbiol* **69**: 1029–40.
- Burgos, R., Wood, G.E., Young, L., Glass, J.I., and Totten, P.A. (2012) RecA mediates MgpB and MgpC phase and antigenic variation in Mycoplasma genitalium, but plays a minor role in DNA repair. *Mol Microbiol* **85**: 669–83.
- Byrne, M.E., Rouch, D.A., and Skurray, R.A. (1989) Nucleotide sequence analysis of IS256 from the Staphylococcus aureus gentamicin-tobramycin-kanamycin-resistance transposon Tn4001. *Gene* **81**: 361–7.
- Calisto, B.M., Broto, A., Martinelli, L., Querol, E., Piñol, J., and Fita, I. (2012) The EAGR box structure: a motif involved in mycoplasma motility. *Mol Microbiol* **86**: 382–93.
- Cao, J., Kapke, P.A., and Minion, F.C. (1994) Transformation of Mycoplasma gallisepticum with Tn916, Tn4001, and integrative plasmid vectors. *J Bacteriol* **176**: 4459–62.
- Cazanave, C., Manhart, L.E., and Bébéar, C. (2012) Mycoplasma genitalium, an emerging sexually transmitted pathogen. *Med Mal Infect* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22975074>. Accessed September 17, 2012.
- Cello, J., Paul, A. V., and Wimmer, E. (2002) Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template. *Science* **297**: 1016–8.
- Chambaud, I., Heilig, R., Ferris, S., Barbe, V., Samson, D., Galisson, F., *et al.* (2001) The complete genome sequence of the murine respiratory pathogen Mycoplasma pulmonis. *Nucleic Acids Res* **29**: 2145–53.
- Chang, H.-Y., Jordan, J.L., and Krause, D.C. (2011) Domain analysis of protein P30 in Mycoplasma pneumoniae cytoadherence and gliding motility. *J Bacteriol* **193**: 1726–33.
- Cheetham, M.E., and Caplan, A.J. (1998) Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress Chaperones* **3**: 28–36.
- Chen, T.R. (1976) Microscopic demonstration of mycoplasma contamination in cell cultures and cell culture media. *Tissue Cult Assoc Man* **1**: 229–232.
- Chopra-Dewasthaly, R., Marendra, M., Rosengarten, R., Jechlinger, W., and Citti, C. (2005) Construction of the first shuttle vectors for gene cloning and homologous recombination in Mycoplasma agalactiae. *FEMS Microbiol Lett* **253**: 89–94.
- Citti, C., and Blanchard, A. (2013) Mycoplasmas and their host: emerging and re-emerging minimal pathogens. *Trends Microbiol* **21**(4): 196–203.
- Citti, C., Nouvel, L.-X., and Baranowski, E. (2010) Phase and antigenic variation in mycoplasmas. *Future Microbiol* **5**: 1073–85.
- Citti, C., and Wise, K.S. (1995) Mycoplasma hyorhinitis vlp gene transcription: critical role in phase variation and expression of surface lipoproteins. *Mol Microbiol* **18**: 649–60.
- Cloward, J.M., and Krause, D.C. (2009) Mycoplasma pneumoniae J-domain protein required for terminal organelle function. *Mol Microbiol* **71**: 1296–307.
- Cloward, J.M., and Krause, D.C. (2010) Functional domain analysis of the Mycoplasma pneumoniae co-chaperone TopJ. *Mol Microbiol* **77**: 158–69.
- Cloward, J.M., and Krause, D.C. (2011) Loss of co-chaperone TopJ impacts adhesin P1 presentation and terminal organelle maturation in Mycoplasma pneumoniae. *Mol Microbiol* **81**: 528–39.
- Cohan, F.M. (2010) Synthetic biology: now that we're creators, what should we create? *Curr Biol* **20**: R675–7.
- Cordova, C.M.M.C.M.M., Lartigue, C., Sirand-Pugnet, P., Renaudin, J., Cunha, R.A.F., and Blanchard, A. (2002) Identification of the origin of replication of the Mycoplasma pulmonis chromosome and its use in oriC replicative plasmids. *J Bacteriol* **184**: 5426–35.

- Cordwell, S.J., Basseal, D.J., Pollack, J.D., and Humphery-Smith, I. (1997) Malate/lactate dehydrogenase in mollicutes: evidence for a multienzyme protein. *Gene* **195**: 113–120.
- Dallo, S.F., and Baseman, J.B. (2000) Intracellular DNA replication and long-term survival of pathogenic mycoplasmas. *Microb Pathog* **29**: 301–309.
- Dallo, S.F., Chavoya, A., Su, C.-J., and Baseman, J.B. (1989) DNA and protein sequence homologies between the adhesins of *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Immun* **57**: 1059–65.
- Dallo, S.F., Kannan, T.R., Blaylock, M.W., and Baseman, J.B. (2002) Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol* **46**: 1041–51.
- Dallo, S.F., Lazzell, A.L., Chavoya, A., Reddy, S.P., and Baseman, J.B. (1996) Biofunctional domains of the *Mycoplasma* These include : Biofunctional Domains of the *Mycoplasma pneumoniae*. **64**.
- Das, K., la Garza, G. De, Maffi, S., Saikolappan, S., and Dhandayuthapani, S. (2012) Methionine sulfoxide reductase A (MsrA) deficient *Mycoplasma genitalium* shows decreased interactions with host cells. *PLoS One* **7**: e36247.  
<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0036247>. Accessed May 7, 2012.
- Daubermire, R.F. (1936) The use of terms coenocyte and syncytium in biology. *Science* **84**: 533.
- Dayhoff, M.O., Schwartz, R.M., and Orcutt, B.C. (1978) A Model of Evolutionary Change in Proteins. In *Atlas of protein sequence and structure*. pp. 345–352.
- Deguchi, T., Yasuda, M., and Maeda, S. (2009) [Non-chlamydial non-gonococcal urethritis]. *Nihon Rinsho* **67**: 167–71.
- Dhandayuthapani, S., Blaylock, M.W., Bebear, C.M., Rasmussen, W.G., and Baseman, J.B. (2001) Peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a virulence determinant in *Mycoplasma genitalium*. *J Bacteriol* **183**: 5645–50.
- Dhandayuthapani, S., Rasmussen, W.G., and Baseman, J.B. (1999) Disruption of gene mg218 of *Mycoplasma genitalium* through homologous recombination leads to an adherence-deficient phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 5227–32.
- Dirksen, L.B., Proft, T., Hilbert, H., Plagens, H., Herrmann, R., and Krause, D.C. (1996) Sequence analysis and characterization of the hmw gene cluster of *Mycoplasma pneumoniae*. *Gene* **171**: 19–25.
- Drexler, H.G., and Uphoff, C.C. (2002) *Mycoplasma* contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology* **39**: 75–90.
- Dundr, M., Ospina, J.K., Sung, M.-H., John, S., Upender, M., Ried, T., *et al.* (2007) Actin-dependent intranuclear repositioning of an active gene locus in vivo. *J Cell Biol* **179**: 1095–103.
- Dybvig, K., and Voelker, L.L. (1996) Molecular biology of mycoplasmas. *Annu Rev Microbiol* **50**: 25–57.
- Dybvig, K., and Woodard, A. (1992) Construction of recA mutants of *Acholeplasma laidlawii* by insertional inactivation with a homologous DNA fragment. *Plasmid* **28**: 262–6.
- Editoril The Lancet (2010) Synthetic cell created in a laboratory. *Lancet* **375**: 1940.
- Ellis, J.C., and Brown, J.W. (2003) Genes within genes within bacteria. *Trends Biochem Sci* **28**: 521–3.
- Falk, L., Fredlund, H., and Jensen, J.S. (2003) Tetracycline treatment does not eradicate *Mycoplasma genitalium*. *Sex Transm Infect* **79**: 318–319.
- Feltens, R., Gossringer, M., Willkomm, D.K., Urlaub, H., and Hartmann, R.K. (2003) An unusual mechanism of bacterial gene expression revealed for the RNase P protein of *Thermus* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 5724–9.
- Fisseha, M., Göhlmann, H.W.H., Herrmann, R., and Krause, D.C. (1999) Identification and Complementation of Frameshift Mutations Associated with Loss of Cytadherence in *Mycoplasma pneumoniae* Identification and Complementation of Frameshift Mutations Associated with Loss of Cytadherence in *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* **181**: 4404–4410.
- Flaherty, K.M., McKay, D.B., Kabsch, W., and Holmes, K.C. (1991) Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 5041–5.
- Franke, A.E., and Clewell, D.B. (1981) Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of “conjugal” transfer in the absence of a conjugative plasmid. *J Bacteriol* **145**: 494–502.

- Fraser, C.M., Gocayne, J.D., White, O., Adams, M.D., Clayton, R.A., Fleischmann, R.D., *et al.* (1995) The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science (80- )* **270**: 397.
- García-Morales, L., González-González, L., Costa, M., Querol, E., and Piñol, J. (2014) Quantitative assessment of *Mycoplasma* hemadsorption activity by flow cytometry. *PLoS One* **9**: e87500.
- Genevaux, P., Schwager, F., Georgopoulos, C., and Kelley, W.L. (2002) Scanning mutagenesis identifies amino acid residues essential for the in vivo activity of the *Escherichia coli* DnaJ (Hsp40) J-domain. *Genetics* **162**: 1045–53.
- Gibson, D.G., Benders, G.A., Andrews-pfannkoch, C., Denisova, E. a, Baden-Tillson, H., Zaveri, J., *et al.* (2008) Complete Chemical Synthesis, Assembly, and Cloning of a *Mycoplasma genitalium* Genome. *Genome* **319**: 1215–20.
- Gibson, D.G., Glass, J.I., Lartigue, C., Noskov, V.N., Chuang, R.-Y., Algire, M.A., *et al.* (2010) Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* **329**: 52–6.
- Glass, J.I., Assad-Garcia, N., Alperovich, N., Yooseph, S., Lewis, M.R., Maruf, M., *et al.* (2006) Essential genes of a minimal bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 425–30.
- Gobel, U., Göbel, U., Speth, V., and Brecht, W. (1981) Filamentous structures in adherent *Mycoplasma pneumoniae* cells treated with nonionic detergents. *J Cell Biol* **91**: 537–543.
- Güell, M., Noort, V. van, Yus, E., Chen, W.-H., Leigh-Bell, J., Michalodimitrakis, K., *et al.* (2009) Transcriptome complexity in a genome-reduced bacterium. *Science (80- )* **326**: 1268.
- Güell, M., Yus, E., Lluch-Senar, M., and Serrano, L. (2011) Bacterial transcriptomics: what is beyond the RNA hori-z-ome? *Nat Rev Microbiol* **9**: 658–69.
- Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295**: 1852–8.
- Hasselbring, B.M., Jordan, J.L., and Krause, D.C. (2005) Mutant analysis reveals a specific requirement for protein P30 in *Mycoplasma pneumoniae* gliding motility. *J Bacteriol* **187**: 6281–6289.
- Hasselbring, B.M., Jordan, J.L., Krause, R.W., and Krause, D.C. (2006) Terminal organelle development in the cell wall-less bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 16478–83.
- Hasselbring, B.M., and Krause, D.C. (2007a) Cytoskeletal protein P41 is required to anchor the terminal organelle of the wall-less prokaryote *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol* **63**: 44–53.
- Hasselbring, B.M., and Krause, D.C. (2007b) Proteins P24 and P41 function in the regulation of terminal-organelle development and gliding motility in *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* **189**: 7442–9.
- Hatchel, J.M., and Balish, M.F. (2008) Attachment organelle ultrastructure correlates with phylogeny, not gliding motility properties, in *Mycoplasma pneumoniae* relatives. *Microbiology* **154**: 286–95.
- Hedreyda, C.T., Lee, K.K., and Krause, D.C. (1993) Transformation of *Mycoplasma pneumoniae* with Tn4001 by electroporation. *Plasmid* **30**: 170–5.
- Hegermann, J., Herrmann, R., and Mayer, F. (2002) Cytoskeletal elements in the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Naturwissenschaften* **89**: 453–8.
- Henderson, G.P., and Jensen, G.J. (2006) Three-dimensional structure of *Mycoplasma pneumoniae*'s attachment organelle and a model for its role in gliding motility. *Mol Microbiol* **60**: 376–85.
- Hennessy, F., Nicoll, W.S., Zimmermann, R., Cheetham, M.E., and Blatch, G.L. (2005) Not all J domains are created equal: Implications for the specificity of Hsp40 – Hsp70 interactions. *Protein Sci* **14**: 1697–1709.
- Herbst-Kralovetz, M.M., Quayle, A.J., Ficarra, M., Greene, S., Rose, W.A., Chesson, R., *et al.* (2008) Quantification and comparison of toll-like receptor expression and responsiveness in primary and immortalized human female lower genital tract epithelia. *Am J Reprod Immunol* **59**: 212–24.
- Himmelreich, R., Hilbert, H., Plagens, H., Pirkl, E., Li, B., and Herrmann, R. (1996) Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. **24**: 4420–49.
- Himmelreich, R., Plagens, H., Hilbert, H., Reiner, B., and Herrmann, R. (1997) Comparative analysis of the genomes of the bacteria *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *Nucleic Acids Res* **25**: 701–12.
- Hodinka, R.L., Davis, C.H., Choong, J., and Wyrick, P.B. (1988) Ultrastructural study of endocytosis of *Chlamydia trachomatis* by McCoy cells. *Infect Immun* **56**: 1456–63.
- Huang, K., Flanagan, J.M., and Prestegard, J.H. (1999) The influence of C-terminal extension on the structure of the “J-domain” in *E. coli* DnaJ. *Protein Sci* **8**: 203–14.



- Hutchison III, C.A., Peterson, Scott N., Gill, S.R., Cline, R.T., White, O., Fraser, C.M., *et al.* (1999) Global transposon mutagenesis and a minimal Mycoplasma genome. *Science* **286**: 2165–9.
- Ishihara, S., Yasuda, M., Ito, S., Maeda, S., and Deguchi, T. (2004) Mycoplasma genitalium urethritis in men. *Int J Antimicrob Agents* **24 Suppl 1**: S23–7.
- Iverson-Cabral, S.L., Astete, S.G., Cohen, C.R., Rocha, E.P.C., and Totten, P.A. (2006) Intrastrain heterogeneity of the mgpB gene in Mycoplasma genitalium is extensive in vitro and in vivo and suggests that variation is generated via recombination with repetitive chromosomal sequences. *Infect Immun* **74**: 3715–26.
- Iverson-Cabral, S.L., Astete, S.G., Cohen, C.R., and Totten, P.A. (2007) mgpB and mgpC sequence diversity in Mycoplasma genitalium is generated by segmental reciprocal recombination with repetitive chromosomal sequences. *Mol Microbiol* **66**: 55–73.
- Jacobs, E. (2012) Mycoplasma pneumoniae: now in the focus of clinicians and epidemiologists. *Eurosurveillance* **17**.
- Jaffe, J.D., Stange-Thomann, N., Smith, C., DeCaprio, D., Fisher, S., Butler, J., *et al.* (2004) The complete genome and proteome of Mycoplasma mobile. *Genome Res* **14**: 1447–61.
- Janis, C., Lartigue, C., Frey, J., Wróblewski, H., Thiaucourt, F., Blanchard, A., and Sirand-Pugnet, P. (2005) Versatile Use of oriC Plasmids for Functional Genomics of Mycoplasma capricolum subsp. capricolum. *Appl Environ Microbiol* **71**: 2888–2893.
- Jarrell, K.F., and McBride, M.J. (2008) The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat Rev Microbiol* **6**: 466–76.
- Jensen, J.S. (2004) Mycoplasma genitalium: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **18**: 1–11.
- Jensen, J.S. (2006) Mycoplasma genitalium infections. *Danish Med bulletin* **53**: 1–27.
- Jensen, J.S., Blom, J., and Lind, K. (1994) Intracellular location of Mycoplasma genitalium in cultured Vero cells as demonstrated by electron microscopy. *Int J Exp Pathol* **75**: 91–8.
- Jernberg, E., Moghaddam, A., and Moi, H. (2008) Azithromycin and moxifloxacin for microbiological cure of Mycoplasma genitalium infection: an open study. *Int J STD AIDS* **19**: 676–9.
- Johnson, J.L., and Craig, E.A. (2001) An essential role for the substrate-binding region of Hsp40s in Saccharomyces cerevisiae. *J Cell Biol* **152**: 851–856.
- Jordan, J.L., Chang, H.-Y., Balish, M.F., Holt, L.S., Bose, S.R., Hasselbring, B.M., *et al.* (2007) Protein P200 is dispensable for Mycoplasma pneumoniae hemadsorption but not gliding motility or colonization of differentiated bronchial epithelium. *Infect Immun* **75**: 518–22.
- Kannan, T.R., and Baseman, J.B. (2000) Hemolytic and hemoxidative activities in Mycoplasma penetrans. *Infect Immun* **68**: 6419–22.
- Kannan, T.R., and Baseman, J.B. (2006) ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin of Mycoplasma pneumoniae represents unique virulence determinant among bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 6724–9.
- Karr, J.R., Sanghvi, J.C., Macklin, D.N., Gutschow, M. V, Jacobs, J.M., Bolival, B., *et al.* (2012) A Whole-Cell Computational Model Predicts Phenotype from Genotype. *Cell* **150**: 389–401.
- Kasai, T., Nakane, D., Ishida, H., Ando, H., Kiso, M., and Miyata, M. (2013) Role of binding in Mycoplasma mobile and Mycoplasma pneumoniae gliding analyzed through inhibition by synthesized sialylated compounds. *J Bacteriol* **195**: 429–35.
- Kenri, T., Seto, S., Horino, A., Sasaki, Y., Sasaki, T., and Miyata, M. (2004) Use of fluorescent-protein tagging to determine the subcellular localization of Mycoplasma pneumoniae proteins encoded by the cytoadherence regulatory locus. *J Bacteriol* **186**: 6944–6955.
- King, K.W., and Dybvig, K. (1992) Nucleotide sequence of Mycoplasma mycoides subspecies Mycoides plasmid pKMK1. *Plasmid* **28**: 86–91.
- Kinosita, Y., Nakane, D., Sugawa, M., Masaike, T., Mizutani, K., Miyata, M., and Nishizaka, T. (2014) Unitary step of gliding machinery in Mycoplasma mobile. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 8601–6.
- Kirchhoff, H., Rosengarten, R., Lotz, W., Fischer, M., and Lopatta, D. (1984) Flask-shaped mycoplasmas: properties and pathogenicity for man and animals. *Isr J Med Sci* **20**: 848–53.
- Kodumal, S.J., Patel, K.G., Reid, R., Menzella, H.G., Welch, M., and Santi, D. V (2004) Total synthesis of long DNA sequences: synthesis of a contiguous 32-kb polyketide synthase gene cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 15573–8.

- Koonin, E. V (2002) How many genes can make a cell: the minimal-gene-set concept. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 99–116.
- Krause, D.C. (1996) Mycoplasma pneumoniae cytoadherence: unravelling the tie that binds. *Mol Microbiol* 20: 247–253.
- Krause, D.C. (1998) Mycoplasma pneumoniae cytoadherence: organization and assembly of the attachment organelle. *Trends Microbiol* 6: 780–782.
- Krause, D.C., and Balish, M.F. (2001) Structure, function, and assembly of the terminal organelle of Mycoplasma pneumoniae. *FEMS Microbiol Lett* 198: 1–7.
- Krause, D.C., and Balish, M.F. (2004) Cellular engineering in a minimal microbe: structure and assembly of the terminal organelle of Mycoplasma pneumoniae. *Mol Microbiol* 51: 917–924.
- Krause, D.C., and Baseman, J.B. (1982) Mycoplasma pneumoniae proteins that selectively bind to host cells. *Infect Immun* 37: 382–6.
- Krause, D.C., Leith, D.K., Wilson, R.M., and Baseman, J.B. (1982) Identification of Mycoplasma pneumoniae proteins associated with hemadsorption and virulence. *Infect Immun* 35: 809–17.
- Krause, D.C., Proft, T., Hedreyda, C.T., Hilbert, H., Plagens, H., and Herrmann, R. (1997) Transposon mutagenesis reinforces the correlation between Mycoplasma pneumoniae cytoskeletal protein HMW2 and cytoadherence. *J Bacteriol* 179: 2668–77.
- Krishnakumar, R., Assad-Garcia, N., Benders, G.A., Phan, Q., Montague, M.G., and Glass, J.I. (2010) Targeted chromosomal knockouts in Mycoplasma pneumoniae. *Appl Environ Microbiol* 76: 5297–9.
- Kühner, S., Noort, V. van, Betts, M.J., Leo-Macias, A., Rode, M., Yamada, T., et al. (2009) Proteome organization in a genome-reduced bacterium. *Science (80- )* 1235: 1235–40.
- Lartigue, C., Glass, J.I., Alperovich, N., Pieper, R., Parmar, P.P., Hutchison III, C.A., et al. (2007) Genome transplantation in bacteria: changing one species to another. *Science* 317: 632–8.
- Layh-Schmitt, G., and Harkenthal, M. (1999) The 40- and 90-kDa membrane proteins (ORF6 gene product) of Mycoplasma pneumoniae are responsible for the tip structure formation and P1 (adhesin) association with the Triton shell. *FEMS Microbiol Lett* 174: 143–149.
- Lemaitre, C., Barré, A., Citti, C., Tardy, F., Thiaucourt, F., Sirand-Pugnet, P., and Thébault, P. (2011) A novel substitution matrix fitted to the compositional bias in Mollicutes improves the prediction of homologous relationships. *BMC Bioinformatics* 12: 457.
- Lemmon, S.K. (2001) Clathrin uncoating: Auxilin comes to life. *Curr Biol* 11: R49–52.
- Liberek, K., Marszałek, J., Ang, D., Georgopoulos, C., and Zylicz, M. (1991) Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 2874–8.
- Liu, C., Willmund, F., Golecki, J.R., Cacace, S., Hess, B., Markert, C., and Schroda, M. (2007) The chloroplast HSP70B-CDJ2-CGE1 chaperones catalyze assembly and disassembly of VIPP1 oligomers in Chlamydomonas. *Plant J* 50: 265–77.
- Lluch-Senar, M., Querol, E., and Piñol, J. (2010) Cell division in a minimal bacterium in the absence of ftsZ. *Mol Microbiol* 78: 278–89.
- Lluch-senar, M., Vallmitjana, M., Querol, E., and Piñol, J. (2007) A new promoterless reporter vector reveals antisense transcription in Mycoplasma genitalium. *Microbiology* 153.
- Lo S-C. Mycoplasmas and AIDS. In: Maniloff J, McElhaney RN, Finch LR, Baseman JB, editors. Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis. Washington (DC): American Society for Microbiology, 1992:525-45.
- Locht, C., and Antoine, R. (1995) A proposed mechanism of ADP-ribosylation catalyzed by the pertussis toxin S1 subunit. *Biochimie* 77: 333–40.
- Lyon, B.R., May, J.W., and Skurray, R.A. (1984) Tn4001: a gentamicin and kanamycin resistance transposon in Staphylococcus aureus. *Mol Gen Genet* 193: 554–6.
- Ma, L., Jensen, J.S., Myers, L., Burnett, J., Welch, M., Jia, Q., and Martin, D.H. (2007) Mycoplasma genitalium: an efficient strategy to generate genetic variation from a minimal genome. *Mol Microbiol* 66: 220–36.
- Macklin, D.N., Ruggero, N. a, and Covert, M.W. (2014) The future of whole-cell modeling. *Curr Opin Biotechnol* 28: 111–115.

- Maier, T., Schmidt, A., Güell, M., Kühner, S., Gavin, A.-C., Aebersold, R., and Serrano, L. (2011) Quantification of mRNA and protein and integration with protein turnover in a bacterium. *Mol Syst Biol* **7**: 1–12.
- Manhart, L.E., Golden, M.R., and Marrazzo, J.M. (2007) Expanding the spectrum of pathogens in urethritis: implications for presumptive therapy? *Clin Infect Dis* **45**: 872–4.
- Manhart, L.E., Holmes, K.K., Hughes, J.P., Houston, L.S., and Totten, P.A. (2007) Mycoplasma genitalium among young adults in the United States: an emerging sexually transmitted infection. *Am J Public Health* **97**: 1118–25.
- Martínez Mariscal, A.M. (2013) Identificació i localització de proteïnes integrants de l'organela terminal de Mycoplasma genitalium mitjançant fusions fluorescents.
- Mayer, M.P., and Bukau, B. (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* **62**: 670–84.
- Mayer, M.P., Schröder, H., Rüdiger, S., Paal, K., Laufen, T., and Bukau, B. (2000) Multistep mechanism of substrate binding determines chaperone activity of Hsp70. *Nat Struct Biol* **7**: 586–593.
- McBride, M.J. (2001) Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annu Rev Microbiol* **55**: 49–75.
- McGowin, C.L., and Anderson-Smits, C. (2011) Mycoplasma genitalium: An Emerging Cause of Sexually Transmitted Disease in Women. *PLoS Pathog* **7**: e1001324.
- McGowin, C.L., Ma, L., Martin, D.H., and Pyles, R.B. (2009) Mycoplasma genitalium-encoded MG309 activates NF-kappaB via Toll-like receptors 2 and 6 to elicit proinflammatory cytokine secretion from human genital epithelial cells. *Infect Immun* **77**: 1175–81.
- McGowin, C.L., Popov, V.L., and Pyles, R.B. (2009) Intracellular Mycoplasma genitalium infection of human vaginal and cervical epithelial cells elicits distinct patterns of inflammatory cytokine secretion and provides a possible survival niche against macrophage-mediated killing. *BMC Microbiol* **9**: 139.
- McGowin, C.L., Spagnuolo, R.A., and Pyles, R.B. (2010) Mycoplasma genitalium rapidly disseminates to the upper reproductive tracts and knees of female mice following vaginal inoculation. *Infect Immun* **78**: 726–36.
- McMacken, R., and Karzai, a W. (1996) A bipartite signaling mechanism involved in DnaJ-mediated activation of the Escherichia coli DnaK protein. *J Biol Chem* **271**: 11236–46.
- Meng, K.E., and Pfister, R.M. (1980) Intracellular structures of Mycoplasma pneumoniae revealed after membrane removal. *J Bacteriol* **144**: 390–9.
- Mernaugh, G.R., Dallo, S.F., Holt, S.C., and Baseman, J.B. (1993) Properties of adhering and nonadhering populations of Mycoplasma genitalium. *Clin Infect Dis* **17 Suppl 1**: S69–78.
- Miyata, M. (2008) Centipede and inchworm models to explain Mycoplasma gliding. *Trends Microbiol* **16**: 6–12.
- Miyata, M. (2010) Unique centipede mechanism of Mycoplasma gliding. *Annu Rev Microbiol* **64**: 519–37.
- Miyata, M., and Ogaki, H. (2006) Cytoskeleton of mollicutes. *J Mol Microbiol Biotechnol* **11**: 256–64.
- Miyata, M., and Seto, S. (1999) Cell reproduction cycle of mycoplasma. *Biochimie* **81**: 873–8.
- Miyata, M., and Uenoyama, A. (2002) Movement on the cell surface of the gliding bacterium, Mycoplasma mobile, is limited to its head-like structure. *FEMS Microbiol Lett* **215**: 285–9.
- Musatovova, O., Dhandayuthapani, S., and Baseman, J.B. (2003) Transcriptional starts for cytoadherence-related operons of Mycoplasma genitalium. *FEMS Microbiol Lett* **229**: 73–81.
- Musatovova, O., Dhandayuthapani, S., and Baseman, J.B. (2006) Transcriptional heat shock response in the smallest known self-replicating cell, Mycoplasma genitalium. *J Bacteriol* **188**: 2845–2855.
- Nagai, R., and Miyata, M. (2006) Gliding motility of Mycoplasma mobile can occur by repeated binding to N-acetylneuraminylactose (sialyllactose) fixed on solid surfaces. *J Bacteriol* **188**: 6469–75.
- Nakane, D., and Miyata, M. (2007) Cytoskeletal “jellyfish” structure of Mycoplasma mobile. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 19518–23.
- Nakane, D., and Miyata, M. (2009) Cytoskeletal asymmetrical dumbbell structure of a gliding mycoplasma, Mycoplasma gallisepticum, revealed by negative-staining electron microscopy. *J Bacteriol* **191**: 3256–64.

- Namiki, K., Goodison, S., Porvasnik, S., Allan, R.W., Iczkowski, K. a, Urbanek, C., *et al.* (2009) Persistent exposure to Mycoplasma induces malignant transformation of human prostate cells. *PLoS One* **4**: e6872.
- Napierala Mavedzenge, S., and Weiss, H.A. (2009) Association of Mycoplasma genitalium and HIV infection: a systematic review and meta-analysis. *AIDS* **23**: 611–20.
- Nascimento, N.C. do, Santos, A.P. Dos, Chu, Y., Guimaraes, A., Baird, A.N., Weil, A.B., and Messick, J.B. (2014) Microscopy and genomic analysis of Mycoplasma parvum strain Indiana. *Vet Res* **45**: 86.
- Ohtani, N., and Miyata, M. (2007) Identification of a novel nucleoside triphosphatase from Mycoplasma mobile: a prime candidate motor for gliding motility. *Biochem J* **403**: 71–7
- Papazisi, L., Gorton, T.S., Kutish, G., Markham, P.F., Browning, G.F., Nguyen, D.K., *et al.* (2003) The complete genome sequence of the avian pathogen Mycoplasma gallisepticum strain R(low). *Microbiology* **149**: 2307–16.
- Párraga Niño, N., Colomé Calls, N., Canals, F., Querol, E., and Ferrer Navarro, M. (2012) A Comprehensive Proteome of Mycoplasma genitalium. *J Proteome Res* **11**(6): 3305-3316.
- Pellecchia, M., Szyperski, T., Wall, D., Georgopoulos, C., and Wüthrich, K. (1996) NMR structure of the J-domain and the Gly/Phe-rich region of the Escherichia coli DnaJ chaperone. *J Mol Biol* **260**: 236–50.
- Perales-Calvo, J., Muga, A., and Moro, F. (2010) Role of DnaJ G/F-rich domain in conformational recognition and binding of protein substrates. *J Biol Chem* **285**: 34231–9.
- Pereyre, S., Sirand-Pugnet, P., Beven, L., Charron, A., Renaudin, H., Barré, A., *et al.* (2009) Life on arginine for Mycoplasma hominis: clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas. *PLoS Genet* **5**: e1000677.
- Peterson, S.N., Hu, P.-C., Bott, K.F., and Hutchison III, C.A. (1993) A survey of the Mycoplasma genitalium genome by using random sequencing. *J Bacteriol* **175**: 7918–30.
- Pich, O.Q. (2008) Aïllament i caracterització de mutants de Mycoplasma genitalium deficients en motilitat.
- Pich, O.Q., Burgos, R., Ferrer-Navarro, M., Querol, E., and Piñol, J. (2006) Mycoplasma genitalium mg200 and mg386 genes are involved in gliding motility but not in cytdherence. *Mol Microbiol* **60**: 1509–19.
- Pich, O.Q., Burgos, R., Ferrer-Navarro, M., Querol, E., and Piñol, J. (2008) Role of Mycoplasma genitalium MG218 and MG317 cytoskeletal proteins in terminal organelle organization, gliding motility and cytdherence. *Microbiology* **154**: 3188–98.
- Pich, O.Q., Burgos, R., Planell, R., Querol, E., and Piñol, J. (2006) Comparative analysis of antibiotic resistance gene markers in Mycoplasma genitalium: application to studies of the minimal gene complement. *Microbiology* **152**: 519–27.
- Pich, O.Q., Burgos, R., Querol, E., and Piñol, J. (2009) P110 and P140 cytdherence-related proteins are negative effectors of terminal organelle duplication in Mycoplasma genitalium. *PLoS One* **4**: e7452.
- Pilo, P., Vilei, E.M., Peterhans, E., Bonvin-Klotz, L., Stoffel, M.H., Dobbelaere, D., and Frey, J. (2005) A metabolic enzyme as a primary virulence factor of Mycoplasma mycoides subsp. mycoides small colony. *J Bacteriol* **187**: 6824–31.
- Pollack, J.D., Williams, M. V, and McElhaney, R.N. (1997) The comparative metabolism of the mollicutes (Mycoplasmas): the utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function in the smallest free-living cells. *Crit Rev Microbiol* **23**: 269–354.
- Popham, P.L., Hahn, T.-W., Krebs, K.A., and Krause, D.C. (1997) Loss of HMW1 and HMW3 in noncytdhering mutants of Mycoplasma pneumoniae occurs post-translationally. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 13979–13984.
- Pour-El, I., Adams, C., and Minion, F.C. (2002) Construction of mini-Tn4001tet and its use in Mycoplasma gallisepticum. *Plasmid* **47**: 129–37.
- Proft, T., and Herrmann, R. (1994) Identification and characterization of hitherto unknown Mycoplasma pneumoniae proteins. *Mol Microbiol* **13**: 337–348.
- Proft, T., Hilbert, H., Layh-Schmitt, G., and Herrmann, R. (1995) The proline-rich P65 protein of Mycoplasma pneumoniae is a component of the Triton X-100-insoluble fraction and exhibits size polymorphism in the strains M129 and FH. *J Bacteriol* **177**: 3370–8.

- Proft, T., Hilbert, H., Plagens, H., and Herrmann, R. (1996) The P200 protein of *Mycoplasma pneumoniae* shows common features with the cytodherence-associated proteins HMW1 and HMW3. *Gene* **171**: 79–82.
- Quayle, A.J. (2002) The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. *J Reprod Immunol* **57**: 61–79.
- Rancurel, C., Khosravi, M., Dunker, A.K., Romero, P.R., and Karlin, D. (2009) Overlapping genes produce proteins with unusual sequence properties and offer insight into de novo protein creation. *J Virol* **83**: 10719–36.
- Razin, S. (1985) Molecular biology and genetics of mycoplasmas (Mollicutes). *Microbiol Rev* **49**: 419–55.
- Razin, S. (1992) Peculiar properties of mycoplasmas: the smallest self-replicating prokaryotes. *FEMS Microbiol Lett* **100**: 423–31.
- Razin, S., Yogeve, D., and Naot, Y. (1998) Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1094–156.
- Reddy, S.P., Rasmussen, W.G., and Baseman, J.B. (1996) Isolation and characterization of transposon Tn4001-generated, cytodherence-deficient transformants of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **15**: 199–211.
- Regula, J.T., Boguth, G., Görg, A., Hegermann, J., Mayer, F., Frank, R., and Herrmann, R. (2001) Defining the mycoplasma “cytoskeleton”: the protein composition of the Triton X-100 insoluble fraction of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae* determined by 2-D gel electrophoresis and mass spectrometry. *Microbiology* **147**: 1045–57.
- Relich, R.F., and Balish, M.F. (2011) Insights into the function of *Mycoplasma pneumoniae* protein P30 from orthologous gene replacement. *Microbiology* **157**: 2862–70.
- Renaudin, H., Tully, J.G., and Bebear, C. (1992) In vitro susceptibilities of *Mycoplasma genitalium* to antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **36**: 870–2.
- Renaudin, J., Marais, A., Verdin, E., Duret, S., Foissac, X., Laigret, F., and Bové, J.M. (1995) Integrative and free *Spiroplasma citri* oriC plasmids: expression of the *Spiroplasma phoeniceum* spiralin in *Spiroplasma citri*. *J Bacteriol* **177**: 2870–2877.
- Sambrook, J. and Russell, D. 2001. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press New York, 3rd edition
- Sanghvi, J.C., Regot, S., Carrasco, S., Karr, J.R., Gutschow, M. V, Bolival, B., and Covert, M.W. (2013) Accelerated discovery via a whole-cell model. *Nat Methods* **10**(12):1192-5.
- Sasaki, Y., Ishikawa, J., Yamashita, A., Oshima, K., Kenri, T., Furuya, K., *et al.* (2002) The complete genomic sequence of *Mycoplasma penetrans*, an intracellular bacterial pathogen in humans. *Nucleic Acids Res* **30**: 5293–300.
- Sato, C., Manaka, S., Nakane, D., Nishiyama, H., Suga, M., Nishizaka, T., *et al.* (2012) Rapid imaging of mycoplasma in solution using Atmospheric Scanning Electron Microscopy (ASEM). *Biochem Biophys Res Commun* **417**: 1213–1218.
- Schmid, D., Baici, A., Gehring, H., and Christen, P. (1994) Kinetics of molecular chaperone action. *Science (80- )* **263**: 971–973.
- Schmidl, S.R., Gronau, K., Hames, C., Busse, J., Becher, D., Hecker, M., and Stülke, J. (2010) The stability of cytodherence proteins in *Mycoplasma pneumoniae* requires activity of the protein kinase PrkC. *Infect Immun* **78**: 184–92.
- Schmidl, S.R., Gronau, K., Pietack, N., Hecker, M., Becher, D., and Stülke, J. (2010) The phosphoproteome of the minimal bacterium *Mycoplasma pneumoniae*: analysis of the complete known Ser/Thr kinome suggests the existence of novel kinases. *Mol Cell Proteomics* **9**: 1228–42.
- Serrano, L. (2007) Synthetic biology: promises and challenges. *Physiol Rev* **3**: 158.
- Seto, S., Kenri, T., Tomiyama, T., and Miyata, M. (2005) Involvement of P1 adhesin in gliding motility of *Mycoplasma pneumoniae* as revealed by the inhibitory effects of antibody under optimized gliding conditions. *J Bacteriol* **187**: 1875–1877.
- Seto, S., Layh-Schmitt, G., Kenri, T., and Miyata, M. (2001) Visualization of the attachment organelle and cytodherence proteins of *Mycoplasma pneumoniae* by immunofluorescence microscopy. *J Bacteriol* **183**: 1621–30.

- Seto, S., and Miyata, M. (2003) Attachment Organelle Formation Represented by Localization of Cytadherence Proteins and Formation of the Electron-Dense Core in Wild-Type and Mutant Strains of *Mycoplasma pneumoniae* Attachment Organelle Formation Represented by Localization of Cytadherenc. *J Bacteriol* **185**: 1082–1091.
- Seto, S., Uenoyama, A., and Miyata, M. (2005) Identification of a 521-kilodalton protein (Gli521) involved in force generation or force transmission for *Mycoplasma mobile* gliding. *J Bacteriol* **187**: 3502–10.
- Seybert, A., Herrmann, R., and Frangakis, A.S. (2006) Structural analysis of *Mycoplasma pneumoniae* by cryo-electron tomography. *J Struct Biol* **156**: 342–54.
- Shen, X., Gumulak, J., Yu, H., French, C.T., Zou, N., and Dybvig, K. (2000) Gene rearrangements in the *vsa* locus of *Mycoplasma pulmonis*. *J Bacteriol* **182**: 2900–8.
- Shlomo Rottem, N.S.K. and J.D.K., Rottem, S., Kosower, N.S., and Kornspan, J.D. (2012) Contamination of Tissue Cultures by Mycoplasmas. In *Biomedical tissue culture*. Ceccherini-Nelli, L. (ed.). InTech, pp. 35–58.
- Smith, H.O., Hutchison III, C.A., Pfannkoch, C., and Venter, J.C. (2003) Generating a synthetic genome by whole genome assembly: X174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *PNAS* **100**: 15440–15445.
- Stevens, M.K., and Krause, D.C. (1990) Disulfide-linked protein associated with *Mycoplasma pneumoniae* cytheadherence phase variation. *Infect Immun* **58**: 3430–3.
- Stevens, M.K., and Krause, D.C. (1992) *Mycoplasma pneumoniae* cytheadherence phase-variable protein HMW3 is a component of the attachment organelle. *J Bacteriol* **174**: 4265–74.
- Su, H.-C., Hutchison, C.A., Giddings, M.C., and Hutchison III, C.A. (2007) Mapping phosphoproteins in *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. *BMC Microbiol* **7**: 63.
- Suh, W.C., Lu, C.Z., and Gross, C. a (1999) Structural features required for the interaction of the Hsp70 molecular chaperone DnaK with its cochaperone DnaJ. *J Biol Chem* **274**: 30534–9.
- Svenstrup, H.F., Jensen, J.S., Gevaert, K., Birkelund, S., and Christiansen, G. (2006) Identification and characterization of immunogenic proteins of *mycoplasma genitalium*. *Clin Vaccine Immunol* **13**: 913–22.
- Szabo, a, Korszun, R., Hartl, F.U., and Flanagan, J. (1996) A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates. *EMBO J* **15**: 408–17.
- Szabo, A., Langer, T., Schröder, H., Flanagan, J., Bukau, B., and Hartl, F.U. (1994) The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the *Escherichia coli* Hsp70 system DnaK, DnaJ, and GrpE. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 10345–10349.
- Szyperki, T., Pellecchia, M., Wall, D., Georgopoulos, C., and Wuthrich, K. (1994) NMR structure determination of the *Escherichia coli* DnaJ molecular chaperone: secondary structure and backbone fold of the N-terminal region (residues 2-108) containing the highly conserved J domain. *Proc Natl Acad Sci* **91**: 11343–11347.
- Taylor-Robinson, D. (1996) Mycoplasmas in rheumatoid arthritis and other human arthritides. *j clin Pathol* **49**: 781–782.
- Taylor-Robinson, D. (2002) *Mycoplasma genitalium* - an up-date. *Int J STD AIDS* **13**: 145–151.
- Taylor-Robinson, D., and Jensen, J.S. (2011) *Mycoplasma genitalium*: from Chrysalis to multicolored butterfly. *Clin Microbiol Rev* **24**: 498–514.
- Tomoyasu, T., Mogk, A., Langen, H., Goloubinoff, P., and Bukau, B. (2001) Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the *Escherichia coli* cytosol. *Mol Microbiol* **40**: 397–413.
- Trachtenberg, S. (1998) Mollicutes-wall-less bacteria with internal cytoskeletons. *J Struct Biol* **124**: 244–56.
- Tsai, S., Wear, D.J., Shih, J.W., and Lo, S.C. (1995) Mycoplasmas and oncogenesis: persistent infection and multistage malignant transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 10197–201.
- Tully, J.G. (1993) Current status of the mollicute flora of humans. *Clin Infect Dis* **17 Suppl 1**: S2–9.
- Tully, J.G., Rose, D.L., Whitcomb, R.F., and Wenzel, R.P. (1979) Enhanced isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from throat washings with a newly-modified culture medium. *J Infect Dis* **139**: 478–82.
- Tully, J.G., Taylor-Robinson, D., Cole, R.M., and Rose, D.L. (1981) A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. *Lancet* **1**: 1288–1291.

- Tulum, I., Yabe, M., Uenoyama, A., and Miyata, M. (2014) Localization of P42 and F(1)-ATPase  $\alpha$ -subunit homolog of the gliding machinery in *Mycoplasma mobile* revealed by newly developed gene manipulation and fluorescent protein tagging. *J Bacteriol* **196**: 1815–24.
- Ueno, P.M., Timenetsky, J., Centonze, V.E., Wewer, J.J., Cagle, M., Stein, M. a, *et al.* (2008) Interaction of *Mycoplasma genitalium* with host cells: evidence for nuclear localization. *Microbiology* **154**: 3033–41.
- Uenoyama, A., Kusumoto, A., and Miyata, M. (2004) Identification of a 349-kilodalton protein (Gli349) responsible for cytoadherence and glass binding during gliding of *Mycoplasma mobile*. *J Bacteriol* **186**: 1537–45.
- Uenoyama, A., and Miyata, M. (2005) Identification of a 123-kilodalton protein (Gli123) involved in machinery for gliding motility of *Mycoplasma mobile*. *J Bacteriol* **187**: 5578–5584.
- Uenoyama, A., Seto, S., Nakane, D., and Miyata, M. (2009) Regions on Gli349 and Gli521 protein molecules directly involved in movements of *Mycoplasma mobile* gliding machinery, suggested by use of inhibitory antibodies and mutants. *J Bacteriol* **191**: 1982–5.
- Veerassamy, S., Smith, A., and Tillier, E.R.M. (2003) A transition probability model for amino acid substitutions from blocks. *J Comput Biol* **10**: 997–1010.
- Voelker, L.L., and Dybvig, K. (1996) Gene transfer in *Mycoplasma arthritidis*: transformation, conjugal transfer of Tn916, and evidence for a restriction system recognizing AGCT. *J Bacteriol* **178**: 6078–81.
- Waldo 3rd, R.H., Popham, P.L., Romero-Arroyo, C.E., Mothershed, E.A., Lee, K.K., and Krause, D.C. (1999) Transcriptional analysis of the hmw gene cluster of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* **181**: 4978–85.
- Wall, D., Zylicz, M., and Georgopoulos, C. (1994) The NH<sub>2</sub>-terminal 108 amino acids of the *Escherichia coli* DnaJ protein stimulate the ATPase activity of DnaK and are sufficient for lambda replication. *J Biol Chem* **269**: 5446–5451.
- Wall, D., Zylicz, M., and Georgopoulos, C. (1995) The conserved G/F Motif of the DnaJ Chaperone Is Necessary for the Activation of the Substrate Binding Properties of the DnaK Chaperone. *J Biol Chem* **270**: 2139–2144.
- Walsh, P., Bursac, D., Law, Y.C., Cyr, D., and Lithgow, T. (2004) The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO Rep* **5**: 567–71.
- Weiner III, J., Herrmann, R., and Browning, G.F. (2000) Transcription in *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* **28**: 4488–4496.
- Willby, M.J., Balish, M.F., Ross, S.M., Lee, K.K., Jordan, J.L., and Krause, D.C. (2004) HMW1 is required for stability and localization of HMW2 to the attachment organelle of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* **186**: 8221–8228.
- Wodke, J. a H., Puchalka, J., Lluch-Senar, M., Marcos, J., Yus, E., Godinho, M., *et al.* (2013) Dissecting the energy metabolism in *Mycoplasma pneumoniae* through genome-scale metabolic modeling. *Mol Syst Biol* **9**.
- Woese, C.R., Maniloff, J., and Zablen, L.B. (1980) Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 494–8.
- Wu, H.N., Kawaguchi, C., Nakane, D., and Miyata, M. (2012) “Mycoplasmal antigen modulation,” a novel surface variation suggested for a lipoprotein specifically localized on *Mycoplasma mobile*. *Curr Microbiol* **64**: 433–40.
- Yan, W., and Craig, E. a (1999) The glycine-phenylalanine-rich region determines the specificity of the yeast Hsp40 Sis1. *Mol Cell Biol* **19**: 7751–8.
- Yus, E., Güell, M., Vivancos, A.P., Chen, W.-H., Lluch-Senar, M., Delgado, J., *et al.* (2012) Transcription start site associated RNAs in bacteria. *Mol Syst Biol* **8**: 1–7.
- Yus, E., Maier, T., Michalodimitrakis, K., Noort, V. van, Yamada, T., Chen, W.-H., *et al.* (2009) Impact of genome reduction on bacterial metabolism and its regulation. *Science (80- )* **326**: 1263–8.
- Zhang, Q., and Wise, K.S. (1996) Molecular basis of size and antigenic variation of a *Mycoplasma hominis* adhesin encoded by divergent vaa genes. *Infect Immun* **64**: 2737–44.





## Agraïments

Tota l'aventura que representa fer una tesi i que està, finalment, arribant a la seva fi, amb els nervis i l'estrès imprescindibles, va començar a partir d'un e-mail. Sí, i en aquest cas, un e-mail que vaig rebre jo de part del Dr. Querol. Era febrer i època d'exàmens, jo estava acabant bioquímica i havia mostrat interès en anar a veure el seu grup, per, possiblement, fer unes pràctiques. En aquell moment estava molt atabalada així que havia posposat la idea fins a l'inici del nou semestre. Quina sorpresa quan vaig obrir el correu i em vaig trobar un e-mail preguntant si encara estava interessada i si podia passar a parlar amb ell. Sorpresa, perquè jo mai li vaig donar el meu nom ni contacte! No obstant, és així com em vaig entrevistar amb ell i aquell mateix estiu vaig començar la meva aventura amb els molek@s.

D'això ja fa molt de temps, més del que voldria (segurament). El que va començar sent unes pràctiques, després va enllaçar amb una beca de col·laboració, el màster i finalment: la tesi. He d'agrair a l'Enrique l'oportunitat de treballar tots aquest anys en aquest grup i a en Jaume per la guia i supervisió de tota la feina que hem fet en aquests anys. A tots molek@s amb qui he tingut la sort de treballar, els agraeixo el suport i l'ajuda. Però el millor ha estat els moments compartits plens de riures i de safareig. Sentir el recolzament en els moments durs de "bajon" i també l'alegria dels bons moments. Durant tots aquests anys he viscut mudances i congressos, dijous de tapes i "soparets", fondís i "espaguetades" (per sort em vaig lliurar dels cops de síndrome, jajaja)... i tot molt ben acompanyada amb tots vosaltres i amb la resta d'amics i amigues que he conegut estant aquí.

En aquesta aventura, també he tingut l'oportunitat de fer dues estades a la UTMB de Galveston a Texas, on he viscut una gran experiència i he conegut també a un grup de gent que em van ajudar moltíssim tant professionalment com personalment, estan tant lluny de casa. He d'agrair al Dr. Pyles que em convidés i acollís al seu laboratori. Allà vaig aprendre a treballar d'una altra manera i a enfocar els problemes des d'un altre punt de vista.. menys micoplasmil.. :p També vull agrair especialment l'ajuda de la Janet, el Barry i l'Aaron.

No voldria oblidar de donar les gràcies a la gent del servei de microscòpia de la UAB i del servei de genòmica, amb qui apart de fer la feina també hem compartit alguna que altra xocolatada.

Si deia que tot comença amb un e-mail... mentia! De fet sempre havia dit que faria un doctorat, és el que té ser filla d'un professor. Ho tenia molt clar! El que no tenia tan clar és el que representa fer-ho. Suposo que per això ara em costa decidir quin serà el proper pas, però sí tinc clar, que sigui quin sigui sempre tindrà el suport i l'ajuda de la família, dels meus pares i dels meus germans i dels avis i dels tiets i cosins i.. uf! Suposo que no s'acaba! I no m'oblido dels amics i amigues. Que també heu estat presents en les dures i les madures, especialment les noies, que ja sabeu qui sou!

I, por último, y no por ello menos importante, este último año me ha ayudado mucho el apoyo y la confianza, los ánimos y el cariño de alguien muy especial ;)

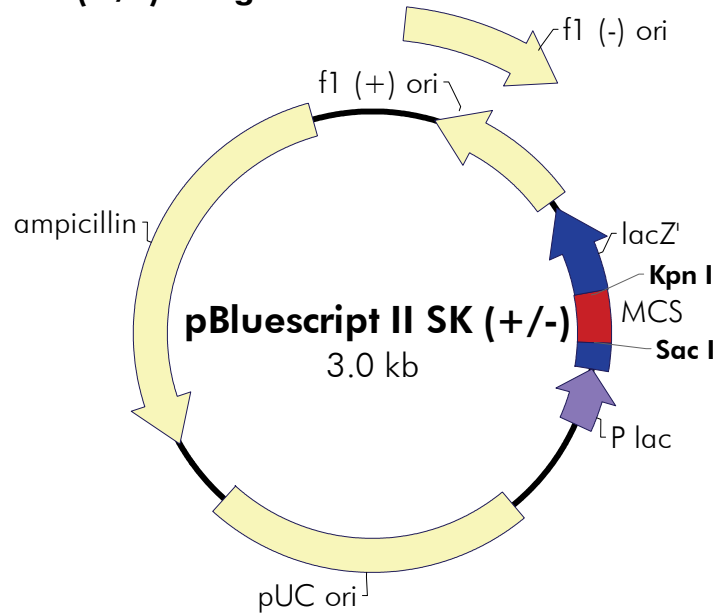
Cuál sería la canción perfecta para este momento?



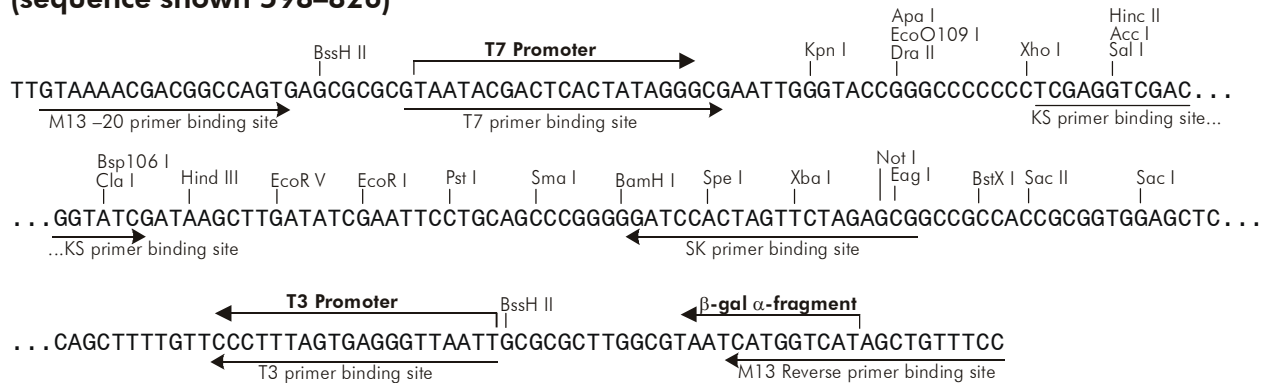
**ANNEX**



## pBluescript II SK (+/-) Phagemids



## pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598–826)



Feature	Nucleotide Position
f1 (+) origin of ss-DNA replication [pBluescript SK (+) only]	135–441
f1 (-) origin of ss-DNA replication [pBluescript SK (-) only]	21–327
$\beta$ -galactosidase $\alpha$ -fragment coding sequence ( <i>lacZ'</i> )	460–816
multiple cloning site	653–760
T7 promoter transcription initiation site	643
T3 promoter transcription initiation site	774
<i>lac</i> promoter	817–938
pUC origin of replication	1158–1825
ampicillin resistance ( <i>bla</i> ) ORF	1976–2833

**FIGURE 1** The pBluescript II SK (+/-) phagemid vectors. The complete sequence and list of restriction sites are available at [www.stratagene.com](http://www.stratagene.com). Genbank® #X52328 [SK(+)] and #X52330 [SK(-)].



## Product details for anti-mCherry antibody

**Please address orders & technical inquiries to:**

antibodies-online GmbH, Schloß-Rahe-Str. 15, D-52074 Aachen  
 Ordering via fax +49 241 95 163 155 or via phone +49 241 95 163 153  
 support@antibodies-online.com  
 Catalog no.: ABIN411533

## Overview

<b>Type</b>	Primary antibodies
<b>Antigen</b>	mCherry
<b>Clonality</b>	Polyclonal
<b>Application</b>	Western Blotting (WB)
<b>Host</b>	Rabbit
<b>Quantity</b>	100 µg
<b>Catalog no.</b>	ABIN411533

## Additional Information

<b>Characteristics</b>	100 ug affinity purified rabbit anti-mCherry polyclonal antibody. Tested in Western blot analysis. Other applications have not been determined. Recombinant mCherry Red Fluorescent Protein (Cat.# 4993-100) can be used as a positive control.
<b>Antigen</b>	mCherry
<b>Gene ID</b>	262089840
<b>Host</b>	Rabbit
<b>Clonality</b>	Polyclonal
<b>Host</b>	Rabbit
<b>Isotype</b>	IgG
<b>Description</b>	MCherry is the second generation monomeric red fluorescent protein that have improved brightness and photostability. The recombinant mCherry is expressed and purified from transformed E. coli using a method that ensures high purity and maximal fluorescence intensity. mCherry protein is a 28.8 kDa monomer with 256 amino acid.

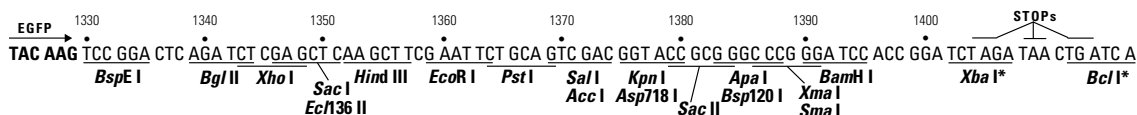
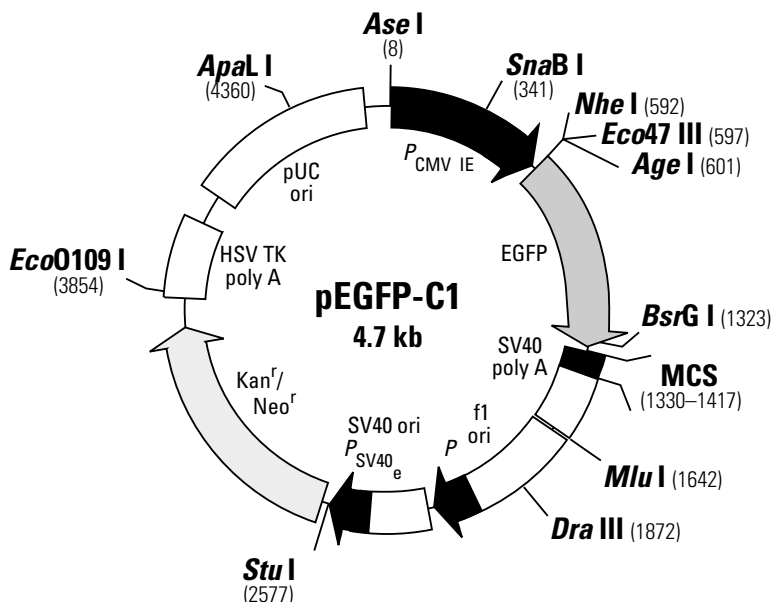


## Application Details

<b>Application</b>	Western Blotting (WB)
<b>Application Notes</b>	Western blotting (0.5-4 µg/ml). However, the optimal conditions should be determined individually. Recombinant mCherry (Cat.#: 4993-100) can be used as a positive control.
<b>Concentration</b>	0.5 mg/ml
<b>Purification</b>	Affinity Purified Antibody
<b>Buffer</b>	100 µg (0.5 mg/ml) affinity purified rabbit anti-mCherry polyclonal antibody in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2, containing 30% glycerol, 0.5% BSA, 0.01% thimerosal.
<b>Storage</b>	Store at -20°C. Shelf life: 12 months. The antibody solution should be gently mixed before use.
<b>Restrictions</b>	For Research Use only

## Publications

<b>Publications</b>	Yu, Götz, in: "PLoS ONE", Vol. 7, Issue 1, pp. e30076, 2012
---------------------	---



**Restriction Map and Multiple Cloning Site (MCS) of pEGFP-C1.** (Unique restriction sites are in bold). The *Xba I* and *Bcl I* sites (\*) are methylated in the DNA provided by CLONTECH. If you wish to digest the vector with these enzymes, you will need to transform the vector into a *dam*<sup>-</sup> host and make fresh DNA.

**Description:**

pEGFP-C1 encodes a red-shifted variant of wild-type GFP (1–3) which has been optimized for brighter fluorescence and higher expression in mammalian cells. (Excitation maximum = 488 nm; emission maximum = 507 nm.) pEGFPmut1 variant (4) which contains the double-amino-acid substitution of Phe-64 to Leu and Ser-65 to Thr. The coding sequence of the EGFP gene contains more than 190 silent base changes which correspond to human codon-usage preferences (5). Sequences flanking EGFP have been converted to a Kozak consensus translation initiation site (6) to further increase the translation efficiency in eukaryotic cells. The MCS in pEGFP-C1 is between the EGFP coding sequences and the SV40 poly A. Genes cloned into the MCS will be expressed as fusions to the C-terminus of EGFP if they are in the same reading frame as EGFP and there are no intervening stop codons. SV40 polyadenylation signals downstream of the EGFP gene direct proper processing of the 3' end of the EGFP mRNA. The vector backbone also contains an SV40 origin for replication in mammalian cells expressing the SV40 T-antigen. A neomycin resistance cassette (*Neo*<sup>r</sup>), consisting of the SV40 early promoter, the neomycin/kanamycin resistance gene of Tn5, and polyadenylation signals from the Herpes simplex virus thymidine kinase (HSV TK) gene, allows stably transfected eukaryotic cells to be selected using G418. A bacterial promoter upstream of this cassette expresses kanamycin resistance in *E. coli*. The pEGFP-C1 backbone also provides a pUC origin of replication for propagation in *E. coli* and an f1 origin for single-stranded DNA production.



**Use:**

Fusions to the C terminus of EGFP retain the fluorescent properties of the native protein allowing the localization of the fusion protein *in vivo*. The target gene should be cloned into pEGFP-C1 so that it is in frame with the EGFP coding sequences, with no intervening in-frame stop codons. The recombinant EGFP vector can be transfected into mammalian cells using any standard transfection method. If required, stable transformants can be selected using G418 (7). pEGFP-C1 can also be used simply to express EGFP in a cell line of interest (e.g., as a transfection marker).

**Location of features**

- Human cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter: 1–589  
Enhancer region: 59–465; TATA box: 554–560  
Transcription start point: 583  
C→G mutation to remove *Sac* I site: 569
- Enhanced green fluorescent protein gene  
Kozak consensus translation initiation site: 606–616  
Start codon (ATG): 613–615; Stop codon: 1408–1410  
Insertion of Val at position 2: 616–618  
GFPmut1 chromophore mutations (Phe-64 to Leu; Ser-65 to Thr): 805–810  
His-231 to Leu mutation (A→T): 1307  
Last amino acid in wild-type GFP: 1327–1329
- MCS: 1330–1417
- SV40 early mRNA polyadenylation signal  
Polyadenylation signals: 1550–1555 & 1579–1584; mRNA 3' ends: 1588 & 1600
- f1 single-strand DNA origin: 1647–2102 (Packages the noncoding strand of EGFP.)
- Bacterial promoter for expression of Kan<sup>r</sup> gene  
–35 region: 2164–2169; –10 region: 2187–2192  
Transcription start point: 2199
- SV40 origin of replication: 2443–2578
- SV40 early promoter  
Enhancer (72-bp tandem repeats): 2276–2347 & 2348–2419  
21-bp repeats: 2423–2443, 2444–2464, & 2466–2486  
Early promoter element: 2499–2505  
Major transcription start points: 2495, 2533, 2539 & 2544
- Kanamycin/neomycin resistance gene  
Neomycin phosphotransferase coding sequences:  
Start codon (ATG): 2627–2629; stop codon: 3419–3421  
G→A mutation to remove *Pst* I site: 2809  
C→A (Arg to Ser) mutation to remove *Bss*H II site: 3155
- Herpes simplex virus (HSV) thymidine kinase (TK) polyadenylation signal  
Polyadenylation signals: 3657–3662 & 3670–3675
- pUC plasmid replication origin: 4006–4649

**Primer Locations:**

- EGFP-N Sequencing Primer (#6479-1): 679–658
- EGFP-C Sequencing Primer (#6478-1): 1266–1287

**Propagation in *E. coli***

- Suitable host strains: DH5 $\alpha$ , HB101, and other general purpose strains. Single-stranded DNA production requires a host containing an F plasmid such as JM109 or XL1-Blue.
- Selectable marker: plasmid confers resistance to kanamycin (30  $\mu$ g/ml) to *E. coli* hosts.
- *E. coli* replication origin: pUC
- Copy number:  $\approx$ 500
- Plasmid incompatibility group: pMB1/ColE1

**References:**

1. Prasher, D. C., *et al.* (1992) *Gene* **111**:229–233.
2. Chalfie, M., *et al.* (1994) *Science* **263**:802–805.
3. Inouye, S. & Tsuji, F. I. (1994) *FEBS Letters* **341**:277–280.
4. Cormack, B., *et al.* (1996) *Gene* **173**:33–38.
5. Haas, J., *et al.* (1996) *Curr. Biol.* **6**:315–324.
6. Kozak, M. (1987) *Nucleic Acids Res.* **15**:8125–8148.
7. Gorman, C. (1985) In *DNA Cloning: A Practical Approach, Vol. II*, Ed. Glover, D. M. (IRL Press, Oxford, UK) pp. 143–190.

**Note:** The attached sequence file has been compiled from information in the sequence databases, published literature, and other sources, together with partial sequences obtained by CLONTECH. This vector has not been completely sequenced.

# pET-21a-d(+) Vectors

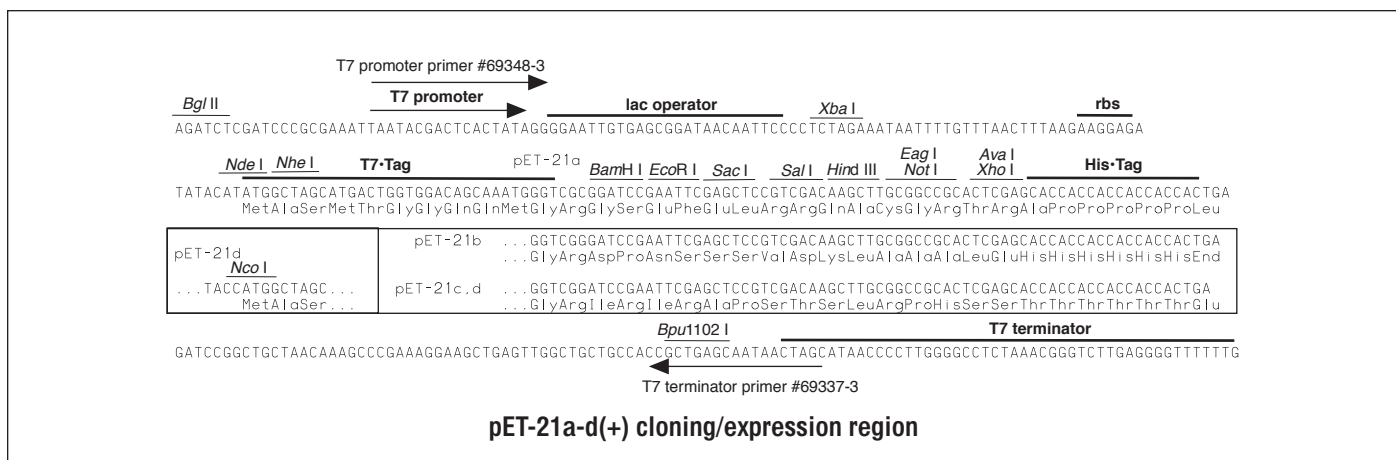
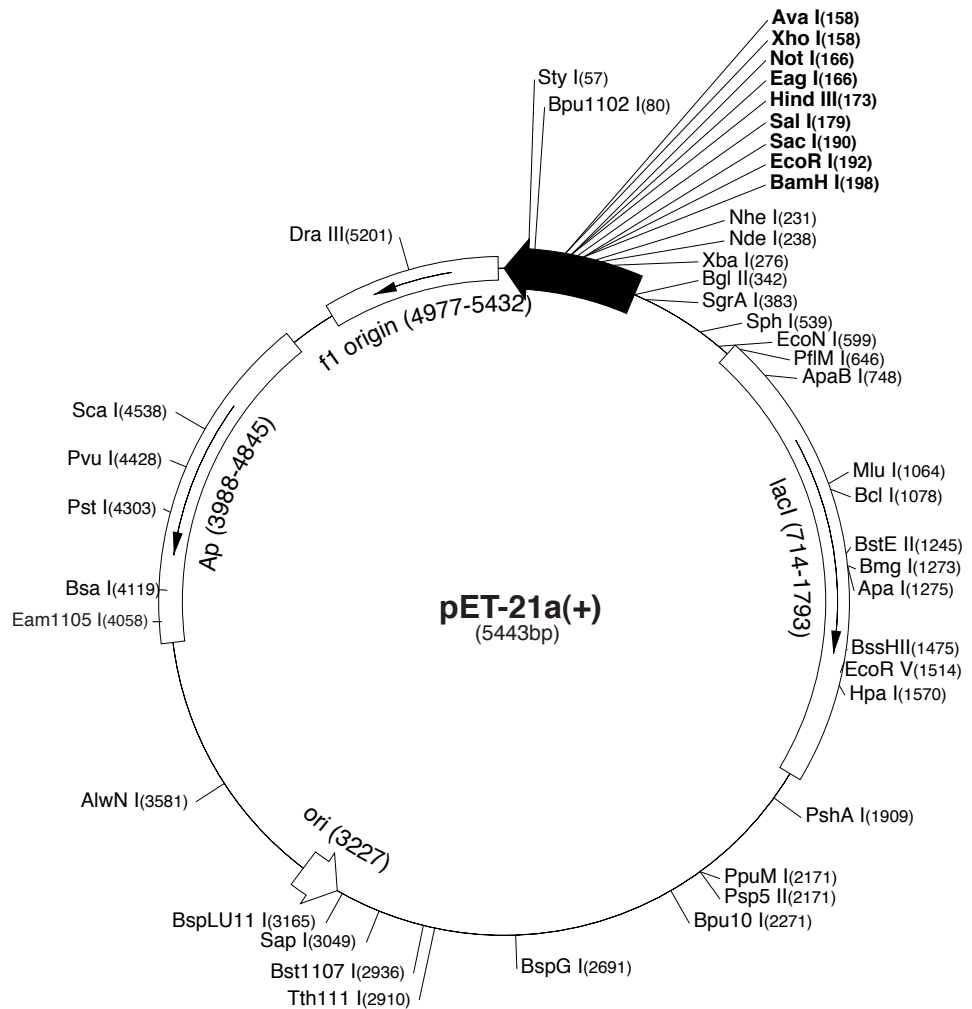
	Cat. No.
pET-21a DNA	69740-3
pET-21b DNA	69741-3
pET-21c DNA	69742-3
pET-21d DNA	69743-3

**pET-21a(+) sequence landmarks**

T7 promoter	311-327
T7 transcription start	310
T7•Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites	
( <i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I)	158-203
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lac</i> I coding sequence	714-1793
pBR322 origin	3227
<i>bla</i> coding sequence	3988-4845
f1 origin	4977-5432

The maps for pET-21b(+), pET-21c(+) and pET-21d(+) are the same as pET-21a(+) (shown) with the following exceptions: pET-21b(+) is a 5442bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-21c(+) is a 5441bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-21d(+) is a 5440bp plasmid; the *Bam*H I site is in the same reading frame as in pET-21c(+). An *Nco* I site is substituted for the *Nde* I site with a net 1bp deletion at position 238 of pET-21c(+). As a result, *Nco* I cuts pET21d(+) at 234, and *Nhe* I cuts at 229. For the rest of the sites, subtract 3bp from each site beyond position 239 in pET-21a(+). *Nde* I does not cut pET-21d(+). Note also that *Sty* I is not unique in pET-21d(+).

The pET-21a-d(+) vectors carry an N-terminal T7•Tag® sequence plus an optional C-terminal His•Tag® sequence. These vectors differ from pET-24a-d(+) only by their selectable marker (ampicillin vs. kanamycin resistance). Unique sites are shown on the circle map. Note that the sequence is numbered by the pBR322 convention, so the T7 expression region is reversed on the circular map. The cloning/expression region of the coding strand transcribed by T7 RNA polymerase is shown below. The f1 origin is oriented so that infection with helper phage will produce virions containing single-stranded DNA that corresponds to the coding strand. Therefore, single-stranded sequencing should be performed using the T7 terminator primer (Cat. No. 69337-3).



# pET-21a(+) Restriction Sites

Enzyme	# Sites	Locations	Enzyme	# Sites	Locations	Enzyme	# Sites	Locations
AccI	2	180 2935	BstXI	3	866 995 1118	Psp1406I	6	726 2094 2490 4284 4657
AccIII	8	831 1559 1890 2674 2815	BstYI	12				4986
		3117 4357 5041	Cac8I	39		PstI	1	4303
Acil	81		CjeI	26		PvuI	1	4428
AfIII	2	1064 3165	CjePI	20		PvuII	3	1664 1757 2756
AluI	25		CviJI	86		RcaI	3	462 3885 4893
AlwI	16		CviRI	24		RsaI	3	1211 2971 4538
Alw21I	9	159 190 564 1048 2159	DdeI	11		SacI	1	190
		2983 3483 4644 4729	DpnI	27		Sall	1	179
Alw44I	4	1044 2979 3479 4725	DraI	3	3924 3943 4635	SapI	1	3049
AlwNI	1	3581	DraIII	1	5201	Sau96I	18	
ApaI	1	1275	DrdI	3	2858 3273 5156	Sau3AI	27	
ApaBI	1	748	DrdII	2	787 5206	Scal	1	4538
ApoI	4	192 1339 5003 5014	DsaI	2	501 2137	ScrFI	19	
AvaI	1	158	EaeI	5	166 372 504 1738 4446	SfaNI	20	
Avall	7	1616 1992 2080 2171 2450	EagI	1	166	Sfcl	5	310 3430 3621 4299 5420
		4196 4418	Eam1105I	1	4058	SgrAI	1	383
BamHI	1	198	EarI	3	682 3049 4853	SphI	1	539
BanI	9	386 407 521 984 1703	Ecil	4	841 3239 3385 4213	SspI	2	4862 4993
		1833 1959 4006 5238	Eco47III	3	469 1970 2419	StyI	1	57
BanII	5	190 448 462 1275 5276	Eco57I	2	3713 4725	TaqI	13	
BbsI	4	1210 1549 1923 2283	EcoNI	1	599	TaqII	9	972 1190 1863 3067 4406
BbvI	26		EcoO109I	3	53 497 2171			4591 4744 4761 5105
BccI	21		EcoRI	1	192	TfiI	5	1743 2045 2215 2719 3140
Bce83I	7	21 1878 2048 3256 3554	EcoRII	7	787 1102 1642 1699 3191	Thal	35	
		3795 4663			3312 3325	TseI	26	
BceffI	5	583 924 1551 3667 5227	EcoRV	1	1514	Tsp45I	8	1245 2073 2604 2817 2912
BcgI	11		FauI	17				4314 4525 5374
BclI	1	1078	FokI	10	1110 1119 2384 2446 2524	Tsp509I	16	
Bfal	8	70 232 277 2179 3660			2710 2851 4024 4205 4492	Tth1111I	1	2910
		3913 4248 5352	FspI	2	2146 4280	Tth111II	6	903 1596 2626 3755 3762
BglI	2	2128 4178	GdIII	5	166 372 504 1738 4446			3794
BglIII	1	342	HaeI	5	792 2113 3180 3191 3643	UbaII	20	
BmgI	1	1273	HaeII	14		VspI	4	325 1749 1808 4230
Bpml	5	902 1391 2025 2692 4128	HaeIII	24		XbaI	1	276
Bpu10I	1	2271	Hgal	12		XcmI	3	920 1436 1454
Bpu1102I	1	80	HgiEI	2	662 3751	XhoI	1	158
BsaI	1	4119	HhaI	45		XmnI	2	2723 4657
BsaAI	2	2917 5201	Hin4I	3	963 4057 4131			
BsaBI	3	341 347 2362	HincII	2	181 1570			
BsaHI	6	387 408 522 1021 1704	HindIII	1	173			
		4595	HinfI	14				
BsaJI	6	57 501 507 1699 2137	HpaI	1	1570			
		3325	HphI	16				
BsaWI	7	2 1383 1886 2354 3371	MaeII	15				
		3518 4349	MaeIII	18				
BsaXI	2	1723 5149	MbolI	14				
Bsbl	2	2881 5108	MluI	1	1064			
BscGI	13		MmeI	3	3380 3564 5178			
BsgI	3	915 1115 2325	MnlI	26				
Bsil	2	3338 4722	MseI	28				
BsiEI	6	169 1849 3081 3505 4428	MslI	9	1116 1404 1434 2152 2347			
		4577			2738 4310 4469 4828			
BsII	20		MspI	31				
BsmAI	7	761 1166 1292 1679 2806	MspA1I	9	84 1094 1664 1757 2756			
		4119 4895			2875 3507 3752 4693			
BsmBI	2	1679 2806	MwoI	38				
BsmFI	4	525 2066 2436 5416	NarI	4	387 408 522 1704			
BsoFI	46		NciI	12				
Bsp24I	12		NdeI	1	238			
Bsp1286I	13		NgoAIV	4	374 1962 2122 5302			
BspEI	2	2 2354	NheI	1	231			
BspGI	1	2691	NlaIII	25				
BspLU11I	1	3165	NlaIV	25				
BspI	26		NottI	1	166			
BsrBI	4	297 3098 4899 5345	NspI	4	539 2510 2802 3169			
BsrDI	4	1111 1477 4119 4293	Pfl1108I	2	1951 4076			
BsrFI	7	374 383 750 1962 2122	PfIMI	1	646			
		4138 5302	PleI	9	325 613 700 1496 3059			
					3544 4047 5136 5144			
BssHII	1	1475	PshAI	1	1909			
Bst1107I	1	2936	Psp5II	1	2171			
BstEII	1	1245						

Enzymes that do not cut pET-21a(+):

AatII	AflII	AgeI	AscI	AvrII
BaeI	BseRI	BsmI	BspMI	BsrGI
Bsu36I	Clal	FseI	KpnI	MscI
MunI	NcoI	NruI	NsiI	NspV
Pacl	PmeI	PmlI	RleAI	RspII
SacII	SexAI	SfiI	SglI	SmaI
SnaBI	SpeI	SrfI	Sse8387I	StuI
SunI	Swal			

