



Facultad de Biología

Departamento de Microbiología

**La Familia de proteínas Hha-YmoA: estudios estructurales y papel regulador en
*Yersinia enterocolitica***

Programa de Doctorado: Microbiología Ambiental y Biotecnología (2001-2003).

Conformidad del director de tesis

Memoria presentada por J.
Ignacio Pons Ximénez para optar
al título de Doctor por la
Universidad de Barcelona

Dr. Antonio Juárez Giménez

J. Ignacio Pons Ximénez

Barcelona, 2006

3.- RESULTADOS

3.1.- ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE LA PROTEÍNA Hha

3.1.1.- ANTECEDENTES

Tal y como se ha referido en la introducción (apartado 1.3.1.3.), la proteína Hha forma un complejo con la proteína H-NS para modular la expresión génica. Por tanto, un aspecto importante de nuestro proyecto de investigación persigue entender mejor la estructura de dicho complejo y los dominios de ambas proteínas que intervienen en esta interacción. En colaboración con el grupo de investigación del Dr. Miquel Pons, con experiencia en el análisis estructural de proteínas mediante Resonancia Magnética Nuclear, se planteó abordar esta problemática. Un paso previo a la realización de estos estudios fue la obtención de proteína Hha y H-NS con una concentración y pureza suficientes para la realización de su análisis por RMN. Uno de los objetivos iniciales de este trabajo fue establecer las condiciones que permiten obtener tales preparaciones de proteína Hha y H-NS.

3.1.2.- PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA Hha

La realización de estudios estructurales sobre una proteína requiere un primer paso de producción de esa proteína en cantidades suficientes y en estado soluble y puro. Pero frecuentemente la sobreexpresión en *E. coli* de proteínas, incluso propias, conlleva la formación de agregados proteicos insolubles, denominados cuerpos de inclusión. Existen diversas estrategias para aumentar la solubilidad de la proteína sobreexpresada, como son el aumento de la osmolaridad del medio de cultivo o la disminución de la temperatura de incubación tras la inducción con IPTG (Shirano y Shibata, 1990; Blackwell y Horgan, 1991; Huang *et al.*, 1998; Schlicke y Brakmann, 2005). Por ese motivo, en un primer momento, todos nuestros esfuerzos se decantaron hacia la optimización de un proceso de producción de proteína Hha funcional.

3.1.2.1.- Sobreproducción basada en el sistema de expresión pET3b

Una primera aproximación consistió en utilizar el plásmido pET3bHisHha, que presenta clonado el gen *hha* precedido por una secuencia que codifica un aminoácido metionina y 6 aminoácidos histidina bajo el control del promotor de la ARN polimerasa del fago T7 (Studier *et al.*, 1990). La proteína recombinante HisHha no presenta pérdida de funcionalidad en relación a la proteína nativa de *E. coli* (Nieto *et al.*, 2000; Nieto *et al.*, 2002). El plásmido pET3bHisHha fue introducido mediante transformación (apartado 2.4.1.1.) en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3), que presenta el gen que codifica la ARN polimerasa del fago T7 bajo el control de un promotor inducible por IPTG, pero esta transformación sólo resultó eficaz utilizando CaCl₂ 200 mM y en presencia en la cepa hospedadora del plásmido pLysE, que otorga resistencia a cloranfenicol y expresa el gen que codifica la lisozima del fago T7. La presencia de la lisozima provoca una notable disminución de la viabilidad y reducción de la tasa de crecimiento en la cepa que la produce, impidiendo realizar modificaciones en las condiciones de cultivo (temperatura y osmolaridad). Una vez obtenidas las células transformantes BL21 (DE3) (pLysE) (pET3bHisHha), se establecieron los parámetros con los que se conseguía una mayor eficiencia en la producción de proteína:

-Incubación del cultivo a 37° C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 1,0: la inducción de la expresión de proteína conlleva que gran parte de la energía celular se destine a esta producción, ralentizando en gran medida el crecimiento del cultivo, por lo que interesó que la inducción se llevase a cabo con el mayor número de células posible. Además, una temperatura de incubación de 30° C en lugar de 37° C provocaba una disminución significativa de la tasa de crecimiento de la cepa.

-Inducción de la expresión con IPTG a una concentración 0,5 mM: concentraciones superiores de IPTG no mejoraron el rendimiento del sistema.

-Incubación del cultivo inducido a 37° C durante 3 horas: tiempos de incubación superiores no mejoraron el rendimiento del sistema. Además, la reducida viabilidad de las células no permitió la incubación del cultivo a temperaturas inferiores tras la inducción.

Una vez establecidos estos parámetros, se obtuvieron extractos proteicos mediante disrupción celular por ultrasonidos (apartado 2.7.1.1.) de cultivos inducidos

con IPTG durante 3 horas, y se analizaron las fracciones solubles e insolubles por SDS-PAGE, comprobando que la mayor parte de la proteína sobreexpresada se encontraba en la fracción insoluble formando cuerpos de inclusión, tal y como se muestra en la figura 3.1.1.A. A continuación, se aplicó el protocolo de solubilización de cuerpos de inclusión (apartado 2.7.5.3.) y las fracciones obtenidas fueron analizadas mediante SDS-PAGE, observando que el tratamiento permitía la solubilización de una gran cantidad de proteína (figura 3.1.1.B.).

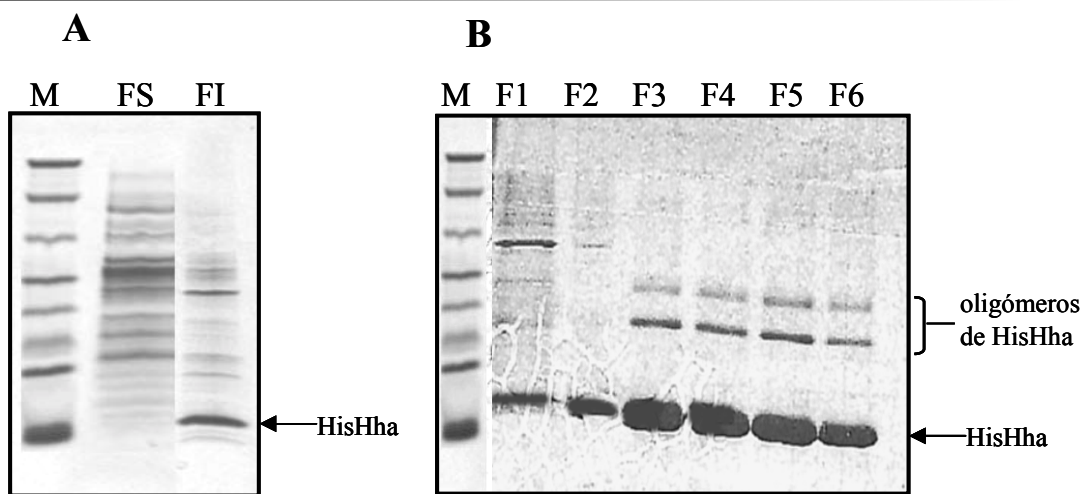


Figura 3.1.1. Fraccionamiento celular de un cultivo de la cepa BL21 (DE3) (pLysE) (pET3bHisHha) inducido con IPTG durante 3 horas a 37° C (A), y solubilización de cuerpos de inclusión a partir de un litro del mismo cultivo (B). Análisis de las fracciones por SDS-PAGE y tinción con Coomassie; M, Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range de Bio-Rad; FS, fracción soluble; FI, fracción insoluble. F1, proteína desnaturalizada no unida a la resina de níquel; F2, proteína renaturalizada no unida a la resina de níquel; F3-F6, proteína renaturalizada unida a la resina de níquel y eluída por incremento de la concentración de imidazol.

Una vez obtenida la proteína HisHha renaturalizada, se realizaron estudios de funcionalidad basados en su capacidad de retener la proteína H-NS en una matriz de agarosa con níquel. Para ello, se puso en contacto el volumen equivalente a 200 μ g de proteína HisHha purificada con un extracto celular (en 20 ml de tampón A) de un cultivo en medio LB (1 l) de la cepa de *E. coli* 5K. A la mezcla se le añadió 1 ml de resina de níquel y se incubó en agitación durante 2 horas a 4° C, permitiendo así la unión de la proteína HisHha a la resina e indirectamente la unión de la proteína H-NS

del cultivo. Se realizaron varios lavados de la resina con tampón A y finalmente dos lavados con tampón A 200 mM imidazol.

Las fracciones obtenidas fueron analizadas mediante inmunodetección de proteínas transferidas a membrana utilizando anticuerpos anti H-NS (apartado 2.7.6., apartado 2.7.7., figura 3.1.2.). Las fracciones F2 y F3, que corresponden a la proteína HisHha retenida por la resina de níquel, no incluían a la proteína H-NS, caso que sí sucede si la proteína Hha es funcional, lo que confirma que el proceso de renaturalización no devolvía su funcionalidad original a la proteína Hha.

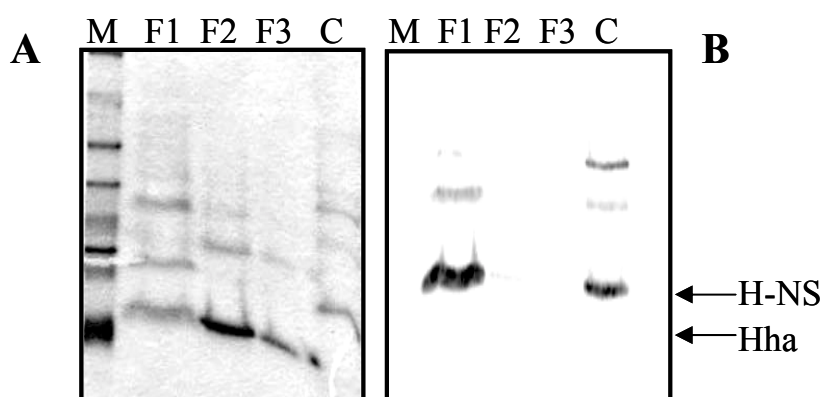


Figura 3.1.2. Estudio de la funcionalidad de la proteína HisHha solubilizada a partir de cuerpos de inclusión. Fracciones analizadas por SDS-PAGE y tinción con Coomassie (A) e inmunodetección utilizando anticuerpos anti H-NS (B). M, Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range de Bio-Rad; F1, fracción no unida a la resina de níquel; F2, F3, 1^{er} y 2^o lavado respectivamente con tampón A 200 mM imidazol; C, proteína H-NS purificada.

Por este motivo, se abandonó la solubilización *in vitro* como mecanismo para obtener gran cantidad de proteína Hha soluble y pura y se optó por la utilización de nuevas estrategias.

3.1.2.2.- Sobreexpresión del tándem proteico Hha / H-NS

Debido a la estrecha interrelación funcional entre las proteínas Hha y H-NS y considerando la posibilidad de que la solubilidad de la proteína HisHha sobreexpresada pudiera estar afectada por la relación entre su concentración citoplasmática y su

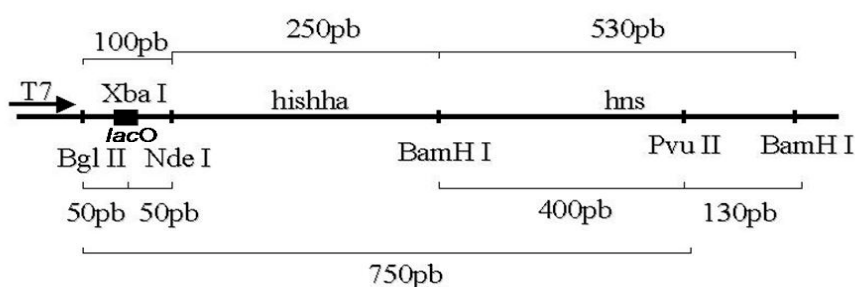
heteroligomerización con la proteína H-NS, se decidió realizar la coexpresión conjunta de ambas proteínas con la esperanza que ésta diera lugar a un incremento en la solubilidad de la proteína Hha y que, por tanto, la sobreexpresión en tándem de ambas proteínas pudiera ser una buena estrategia para obtener gran cantidad de proteína Hha soluble y pura.

3.1.2.2.1.- Construcción del vector para la expresión en tándem de las proteínas Hha y H-NS

El gen *hns* de la cepa de *E. coli* 5K se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos HNSBPROX y HNSBDIST (tabla 3.1.1.), que generan dianas para el enzima de restricción *Bam*HI y permiten su posterior clonación en esa misma diana posicionada al final de la pauta de lectura del gen *hha* del plásmido pET3bHisHha. La temperatura de hibridación utilizada en la reacción de PCR fue de 50° C y el tiempo de extensión de 30 segundos. La ligación fue introducida mediante transformación en la cepa de *E. coli* 5K y los transformantes obtenidos analizados para comprobar la presencia del inserto y, en caso afirmativo, determinar su correcta orientación mediante restricción doble con los enzimas *Bgl*III y *Pvu*II. En el plásmido resultante, denominado pET3bHisHhaHNS (figura 3.1.3.), el codón inicial (metionina) del gen *hns* se encuentra posicionado 73 pares de bases a 3' del codón final (arginina) del gen *hha*, y ambos genes se encuentran bajo el control del promotor del ARN polimerasa del fago T7 como una unidad bicistrónica. Además, se generó una repetición de secuencias operadoras *lacO* obtenida por hibridación de los oligonucleótidos LACOF y LACOR (apartado 2.5.4., tabla 3.1.1.), introducida en la diana *Xba*I del plásmido pET3bHisHhaHNS situada a 3' del promotor de la ARN polimerasa del fago T7, y que permitió disminuir la expresión basal del sistema en ausencia del inductor IPTG y en presencia de la proteína represora LacI. El plásmido resultante fue denominado pET3bHisHhaHNS*lacO*.

Tabla 3.1.1. Oligonucleótidos utilizados en el estudio de la expresión en tándem. Las dianas de restricción se indican en sombreado.

Oligonucleótido	Secuencia 5'—3'	Diana de Restricción
HNSBPROX	GAATTTAAGGATCCATTATTACC	<i>Bam</i> HI
HNSBDIST	CCGGACAATAAAGGATCCCGC	<i>Bam</i> HI
LACOF	CTAGAATTGTGAGCGGATAACAATT	—
LACOR	TAGAATTGTTATCCGCTCACAATT	—
HNSNPROX	GAGATTACTCATATGAGCG	<i>Nde</i> I

**Figura 3.1.3.** Esquema de la construcción para la expresión en tándem de las proteínas Hha y H-NS en el vector pET3b. La flecha indica la localización del promotor de la ARN polimerasa del fago T7.

3.1.2.2.2.- Selección de una cepa hospedadora para el vector de expresión en tándem de las proteínas Hha y H-NS

La reducida viabilidad de la cepa hospedadora BL21 (DE3) (pLysE) debida a la síntesis de la lisozima del fago T7 hizo necesaria la búsqueda de una nueva cepa más estable que aceptase el plásmido para la expresión del tándem proteico y permitiese modificaciones tanto en la temperatura de incubación como en la osmolaridad del medio de cultivo. La cepa BL21 (DE3) (pLysS) también expresa la lisozima del fago T7 pero en menor grado, lo que hace que sea una cepa algo más robusta que la anteriormente utilizada. Para aumentar más la estabilidad y robustez del sistema, se introdujo mediante conjugación (apartado 2.4.2.) en la cepa hospedadora el factor F'*lacI*^q, procedente de la

cepa de *E. coli* XL1-blue y que codifica la proteína represora LacI. Esta proteína se une de forma específica a secuencias operadoras *lacO* introducidas en el vector de expresión, disminuyendo de esta forma la expresión basal de las proteínas Hha y H-NS en ausencia del inductor IPTG. Esta disminución de la expresión basal aumenta ligeramente la viabilidad celular y la tasa de crecimiento de la cepa diseñada para la expresión. Las colonias conjugantes se seleccionaron mediante los marcadores de los plásmidos pLysS y F'*lacI*^q y coloración rojiza en medio de cultivo McConkey: la cepa XL1-Blue no presenta los enzimas necesarios para la utilización de la lactosa como fuente de carbono y energía, por lo que su crecimiento en medio McConkey da lugar a colonias blancas, mientras que la cepa BL21 (DE3) (pLysS) sí es capaz de utilizar la lactosa, generando el metabolismo de este azúcar una disminución del pH y un viraje del indicador de pH presente en el medio a rojo. De esta forma se obtuvo la cepa BL21 (DE3) (pLysS) (F'*lacI*^q), que fue transformada con el plásmido pET3bHisHhaHNS*lacO*.

3.1.2.2.3.- Incremento de la solubilidad de la proteína HisHha como resultado de la expresión en tándem

Seguidamente, se realizaron experimentos de fraccionamiento celular mediante disrupción por ultrasonidos de cultivos inducidos con IPTG durante 3 horas a 37° C de la cepa BL21 (DE3) (pLysS) (F'*lacI*^q) (pET3bHisHhaHNS*lacO*), comprobando que la expresión en tándem de las proteínas HisHha y H-NS aumentan de forma notable la solubilidad de la proteína HisHha en relación a su expresión de forma independiente (figura 3.1.4.). Esta disminución en la formación de cuerpos de inclusión también queda patente en la observación directa de las células mediante microscopía electrónica, tal y como se muestra en la figura 3.1.5.

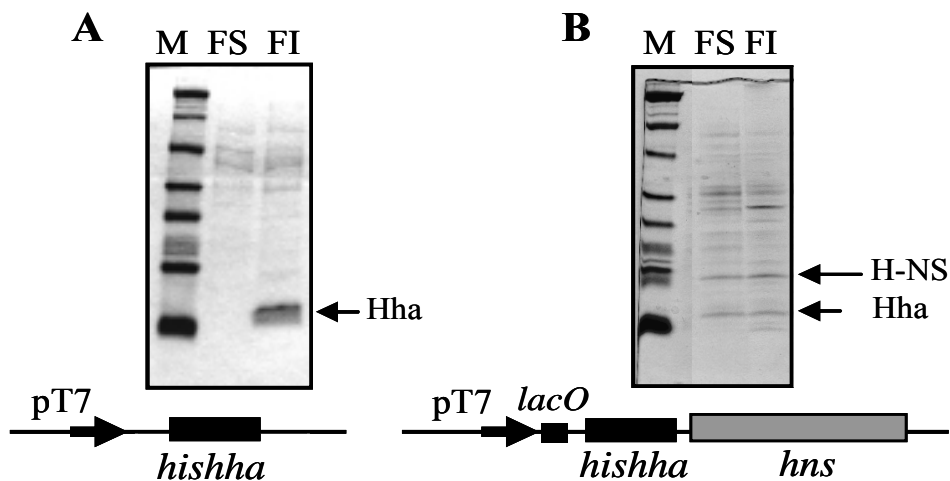


Figura 3.1.4. Efecto en la solubilidad de la proteína HisHha cuando se expresa en tándem junto a la proteína H-NS (**B**) en relación a la expresión independiente de la proteína HisHha (**A**). Análisis de las fracciones solubles (FS) e insolubles (FI) por SDS-PAGE y tinción con Coomassie. M, Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range de Bio-Rad.

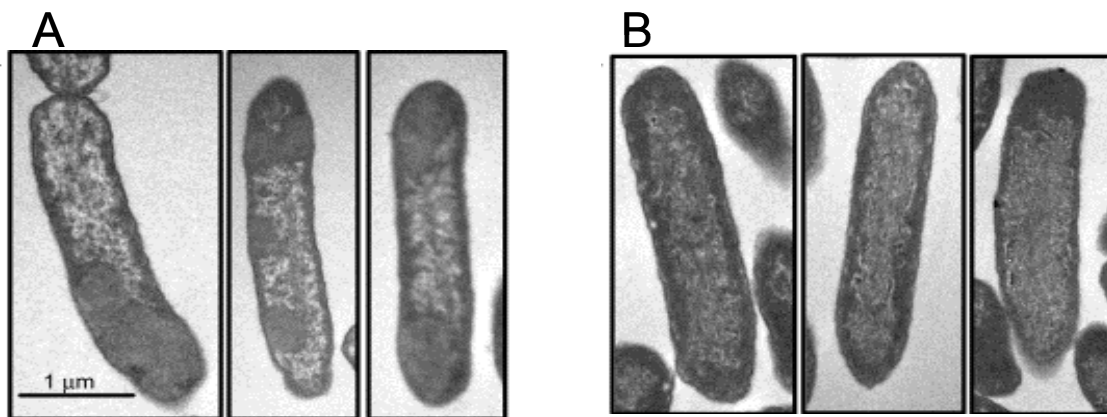


Figura 3.1.5. Micrografías de cultivos inducidos con IPTG durante 3 horas a 37° C, obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión. **A**, BL21 (DE3) (pLysE) (pET3bHisHha); **B**, BL21 (DE3) (pLysE) (pET3bHisHhaHNS). Las zonas opacas polares que se observan mayoritariamente en las células que sólo sobreexpresan Hha, se corresponden muy probablemente con los cuerpos de inclusión. Esta localización polar de cuerpos de inclusión, ya ha sido descrita en otros experimentos de sobreexpresión de proteínas (Sriubolmas *et al.*, 1997).

Estos resultados muestran cómo la expresión en tándem aumenta la solubilidad de HisHha pero no permiten confirmar si este aumento en la solubilidad viene determinado por la capacidad de interacción entre ambas proteínas o por un efecto

intrínseco de la coexpresión. Para comprobar si este aumento en la solubilidad venía determinado por la interacción entre Hha y H-NS, se decidió analizar cómo afectaría a la solubilidad de la proteína Hha sobreexpresada la presencia de una mutación que afectase la capacidad de dicha proteína de interactuar con la proteína H-NS. Para ello se utilizaron los plásmidos pET3bHisHha-11 y pET3bHisHha-42, que son idénticos al plásmido pET3bHisHha excepto en que presentan una sustitución en una única base nucleotídica del gen *hha* (CAC por CGC en *hha*-11 y ATA por ATG en *hha*-42), lo que da lugar a un cambio aminoacídico en la secuencia proteica (histidina en posición 50 en lugar de arginina en HisHha-11 e isoleucina en posición 13 en lugar de metionina en HisHha-42). Mientras que la proteína HisHha-11 ha perdido la capacidad de unirse a H-NS, HisHha-42 mantiene esta capacidad intacta (Nieto *et al.*, 2002; Rodríguez, 2005). La sobreexpresión de forma independiente de estas proteínas mutantes también provocó su acumulación en agregados insolubles, tal como se muestra en la figura 3.1.6.

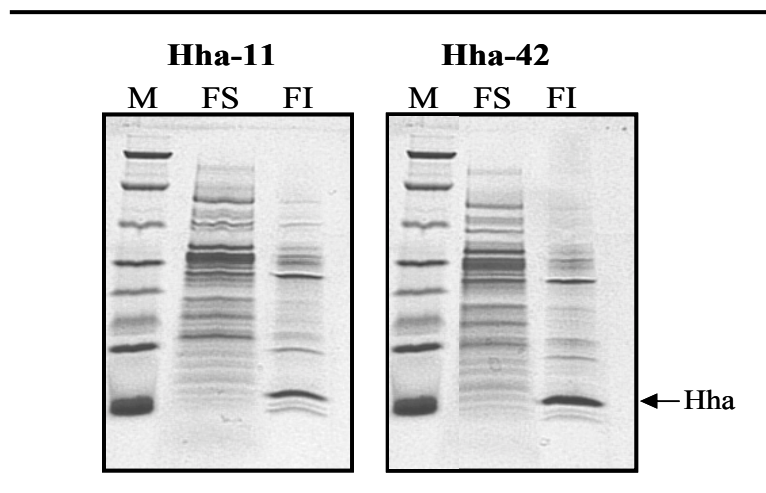


Figura 3.1.6. Solubilidad de las proteínas Hha-11 y Hha-42. Fraccionamiento celular de cultivos inducidos con IPTG durante 3 horas a 37° C. Análisis de las fracciones solubles (FS) e insolubles (FI) por SDS-PAGE y tinción con Coomassie. La cepa utilizada para la expresión de proteínas fue BL21 (DE3) (pLysE) y el vector pET3b; M, Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range de Bio-Rad. La flecha indica la posición de las proteínas HisHha mutantes.

Para la expresión en tándem de las proteínas HisHha-11 e HisHha-42 con la proteína H-NS, se construyeron los plásmidos pET3bHisHhaHNS-11 y

pET3bHisHhaHNS-42. Tanto la construcción de estos plásmidos para la expresión en tándem como la comprobación de la presencia del inserto y su correcta orientación, se llevó a cabo de forma idéntica a la realizada con el plásmido pET3bHisHhaHNS (apartado 3.1.2.2.1.).

Estos dos vectores obtenidos para la expresión en tándem fueron introducidos mediante transformación en la cepa hospedadora BL21 (DE3) (pLysE) y se realizaron experimentos de inducción de la expresión proteica y fraccionamiento celular. Los resultados de esta expresión en tándem de las proteínas mutantes HisHha-11 / HisHha-42 y H-NS se muestran en la figura 3.1.7.

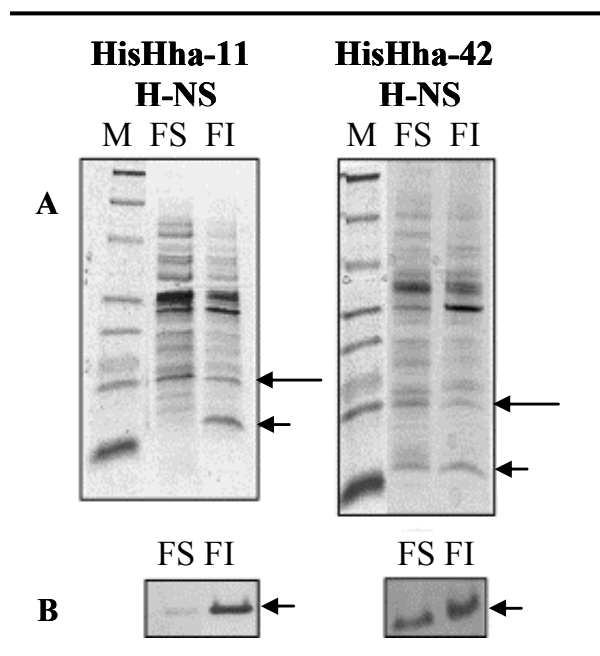


Figura 3.1.7. Solubilidad de las proteínas mutantes HisHha-11 e HisHha-42 cuando se coexpresan con H-NS. Fraccionamiento celular de cultivos inducidos durante 3 horas a 37° C y análisis de las fracciones solubles (FS) e insolubles (FI) por SDS-PAGE y tinción con Coomassie (A) e inmunodetección con anticuerpos específicos contra Hha (B). La cepa hospedadora utilizada para la sobreexpresión proteica fue BL21 (DE3) (pLysE) y los plásmidos utilizados fueron las construcciones derivadas del pET3b. M, Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range de Bio-Rad. Flecha corta, distintas formas de la proteína HisHha; Flecha larga, proteína H-NS.

Mientras que la sobreexpresión del tándem proteico HisHha-11 / H-NS no aumenta la solubilidad de la proteína HisHha-11, la sobreexpresión conjunta de las proteínas HisHha-42 y H-NS sí aumenta la solubilidad de la proteína HisHha-42 de forma equivalente a la observada con la proteína HisHha. Estos resultados confirman la hipótesis de que el aumento de la solubilidad de la proteína HisHha cuando se sobreexpresa conjuntamente con la proteína H-NS viene determinado por la capacidad de interacción entre ambas proteínas. Este aumento de la solubilidad de la proteína HisHha podría ser explicado por una mayor frecuencia de interacción entre ambas

proteínas cuando la proteína H-NS es también sobreexpresada, disminuyendo la cantidad de formas monoméricas de la proteína HisHha libres, las cuales agregarían.

Finalmente, también decidimos comprobar cuál era el grado de solubilidad de la proteína H-NS cuando se sobreexpresa de forma independiente. Para ello se utilizó el plásmido pET3bHNS, que contiene clonado el gen *hns* entre las dianas de restricción *NdeI* y *BamHI* del plásmido pET3b, obtenido mediante amplificación por PCR con los oligonucleótidos HNSNPROX (Tabla 3.1.1.) y HNSBDIST, y utilizando como molde el gen *hns* de la cepa 5K de *E. coli*. El plásmido pET3bHNS fue introducido mediante transformación en la cepa BL21 (DE3) (pLysS) y se realizaron experimentos de inducción de la expresión proteica y fraccionamiento celular (figura 3.1.8.).

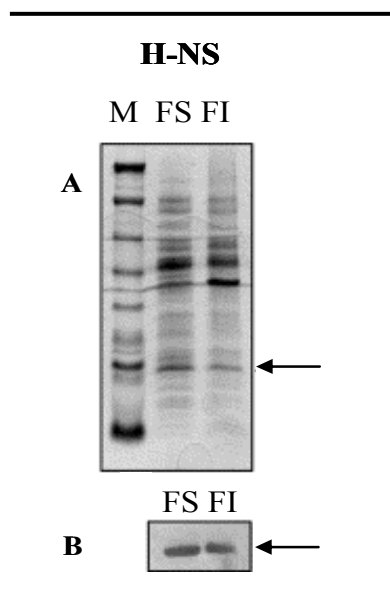


Figura 3.1.8. Solubilidad de la proteína H-NS sobreexpresada de forma única. Fraccionamiento celular de cultivos inducidos durante 3 horas a 37° C y análisis de las fracciones solubles (FS) e insolubles (FI) por SDS-PAGE mediante tinción con Coomassie (**A**) e inmunodetección con anticuerpos específicos contra H-NS (**B**). La cepa hospedadora utilizada para la sobreexpresión proteica fue BL21 (DE3) (pLysE) y el plásmido utilizado pET3bHNS. M, Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range de Bio-Rad. La flecha indica la posición de la proteína H-NS

Al contrario de lo que sucede con la proteína Hha, la sobreexpresión única de H-NS proporciona una significativa cantidad de proteína en la fracción soluble, fracción que no se ve aumentada en la sobreexpresión en tándem con Hha.

A continuación, disponiendo del sistema BL21 (DE3) (pLysS) ($F^{\prime}lacI^q$) (pET3bHisHhaHNSlacO), decidimos comprobar si la disminución de temperatura de incubación tras la inducción o el aumento de la osmolaridad del medio de cultivo mejoraban el rendimiento del sistema. La osmolaridad se aumentó añadiendo sorbitol a

una concentración final de 1M y el agente osmoprotector betaína 2,5 mM. Ni la reducción de la temperatura tras la inducción a 16° C ni el aumento de la osmolaridad del medio de cultivo mejoraron el rendimiento del sistema.

Teniendo en cuenta que la proteína Hha interacciona con H-NS, la estrategia de sobreexpresar en tándem las proteínas Hha y H-NS presenta un problema: ambas proteínas copurifican, lo que nos impide obtener fracciones de proteína Hha pura. La disociación de esta interacción se consiguió mediante lavados de la resina de níquel que contenía las proteínas HisHha y H-NS con concentraciones crecientes de KCl (apartado 2.7.5.5.), obteniendo de esta forma proteína Hha pura (figura 3.1.9.).

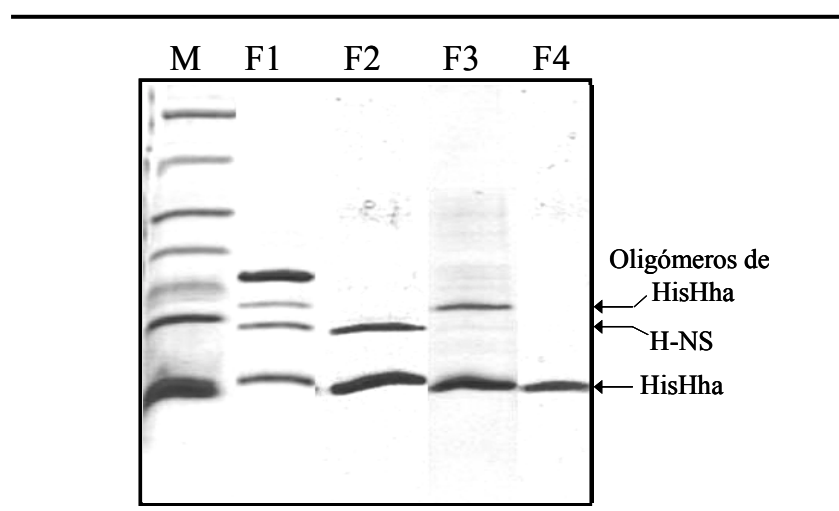


Figura 3.1.9. Purificación mediante agarosa de níquel de proteína obtenida con la cepa BL21 (DE3) (pLysS) F' *lacI*^q (pET3bHisHhaHNS*lacO*). Análisis de las fracciones por SDS-PAGE y tinción con Coomassie. M, Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range de Bio-Rad; F1, elución de la proteína unida a la resina (tampón A 500 mM imidazol); F2, fracción F1 tratada con DTT 20 mM para eliminar puentes disulfuro entre cisteínas de distintos monómeros; F3, elución de proteína unida a la resina (tampón A 500 mM imidazol) previamente lavada con tampón A 2 M KCl; F4, fracción F3 tratada con DTT 20 mM.

3.1.2.3.- Utilización del vector de expresión pET15b

En paralelo a la realización de los estudios referidos anteriormente basados en la utilización de un vector pET3b y una cepa hospedadora que requiere la presencia de un plásmido que codifica la lisozima del fago T7, Yee y colaboradores (2002) reportaron la

purificación de la proteína Hha y la determinación de su estructura terciaria por RMN. Para ello utilizaron el vector de expresión pET15bHisHha'. Este vector expresa la secuencia MGSS(H)₆SSGRENLYFQGH(Hha)GS, que presenta una diana para la proteasa TEV (Tobacco Etch Virus, EXXYXQS/G) entre la cola de 6 aminoácidos histidina y la secuencia aminoacídica de Hha. A diferencia del vector pET3b, el vector pET15b contiene el gen *lacI*, que codifica la proteína represora de la expresión LacI, y la secuencia operadora *lac* que precede a la secuencia promotora de la ARN polimerasa del fago T7.

Se decidió utilizar este vector como sistema alternativo para la expresión de la proteína HisHha' y la realización estudios de funcionalidad. La proteína HisHha' obtenida mediante este sistema de expresión presenta una funcionalidad (capacidad de retención de la proteína H-NS en una matriz de níquel-agarosa) reducida en relación a la proteína HisHha utilizada en los estudios previos, tal y como se muestra en la figura 3.1.10.

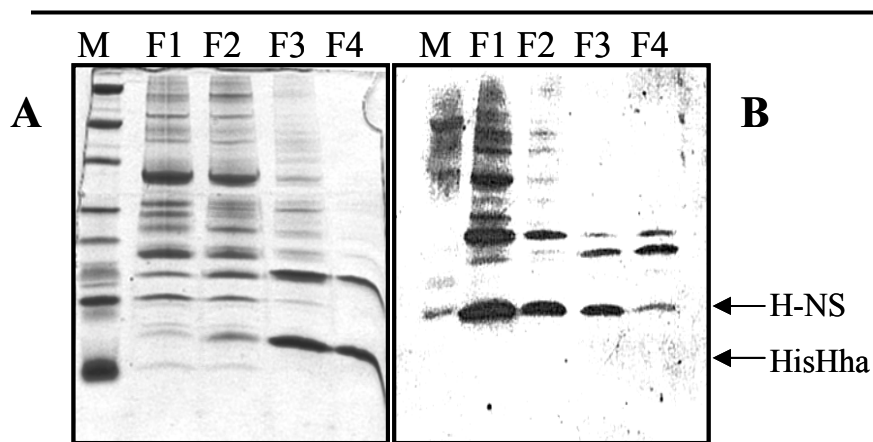


Figura 3.1.10. Purificación de la proteína HisHha' en la cepa BL21 (DE3) (pET15bHisHha') tras 3 horas de inducción con IPTG a 37° C. Fracciones analizadas por SDS-PAGE y tinción con Coomassie (A) e inmunodetección con anticuerpos anti H-NS (B). M, Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range de Bio-Rad; F1-F2, lavados de la resina con tampón A 20 mM imidazol; F3-F4, elución de la proteína HisHha' mediante lavados de la resina con tampón A 500 mM imidazol. La mayor parte de la proteína H-NS se encuentra en los lavados previos a la elución de la proteína HisHha'.

3.1.2.3.1.- Construcción del vector pET15bHisHha

A pesar de que los estudios con el vector pET15bHisHha' proporcionaron proteína Hha de funcionalidad reducida, se decidió seguir utilizando el vector pET15b como sistema de expresión de la proteína Hha debido a que con este vector no es necesaria la presencia de plásmidos del tipo pLys en la cepa hospedadora utilizada para la expresión. La lisozima del fago T7 codificada en plásmidos del tipo pLys es un inhibidor natural de la ARN polimerasa del fago T7, lo que permite disminuir la expresión dependiente del promotor del fago T7 en ausencia del inductor IPTG y, por tanto, reducir el posible efecto tóxico de la expresión en condiciones basales (Studier, 1991). Como ya se ha comentado en el apartado anterior, la presencia en el plásmido pET15b de un sistema propio de represión de la expresión en ausencia del inductor IPTG, hizo innecesaria la utilización de plásmidos pLys en el sistema de expresión (Dubendorff y Studier, 1991). La posibilidad de utilizar la cepa BL21 (DE3) como hospedadora, permite obtener un sistema de sobreexpresión mucho más estable en relación a la viabilidad celular, que tolera cambios en la temperatura de incubación y en la composición del medio de cultivo, así como su mantenimiento durante cortos periodos de tiempo (4-5 días) a 4° C antes de su utilización. Para confirmar que la reducida funcionalidad de la proteína HisHha' venía determinada por su propia estructura y no era un efecto debido a la utilización de este nuevo sistema de expresión, se decidió clonar la secuencia original *hishha* en el plásmido pET15b, para comprobar cual era su comportamiento en relación a su capacidad de unirse a H-NS.

La construcción del vector pET15bHisHha se llevó a cabo mediante restricción doble *Pst*I / *Xba*I de los plásmidos pET3bHisHha y pET15bHisHha' y posterior ligación de la banda vector de pET15b (4.530 pb) y la banda que contiene clonado *hishha* (1.430 pb). La ligación fue transformada en la cepa de *E. coli* 5K y la comprobación de transformantes mediante restricción doble *Bgl*II / *Bam*HI: esta restricción genera una banda de 380 pb en los plásmidos pET3bHisHha y pET15bHisHha, mientras que el tamaño en pET15bHisHha' es de 420 pb.

Se realizó un sencillo experimento de fraccionamiento celular de un cultivo inducido con IPTG durante toda la noche a 16° C. El análisis por SDS-PAGE puso de manifiesto un notable aumento en la solubilidad de la proteína HisHha sobreexpresada a baja temperatura (figura 3.1.11.).

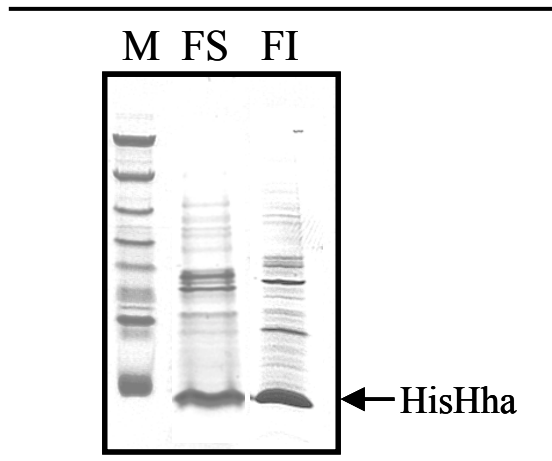


Figura 3.1.11. Solubilidad de la proteína HisHha a partir de un cultivo de la cepa BL21 (DE3) (pET15bHisHha) inducido con IPTG a 16° C durante toda la noche. Análisis de las fracciones solubles (FS) e insolubles (FI) por SDS-PAGE y tinción con Coomassie. M, Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range de Bio-Rad.

En función de estos resultados, se procedió a la purificación de la proteína HisHha a partir de 1 l de cultivo inducido con IPTG durante toda la noche a 16° C, obteniendo fracciones que, tras un tratamiento con el agente reductor DTT, confirmaron su capacidad de retención de la proteína H-NS (figura 3.1.12.). Por tanto, el sistema BL21 (DE3) (pET15bHisHha) es también una alternativa para obtener proteína Hha pura.

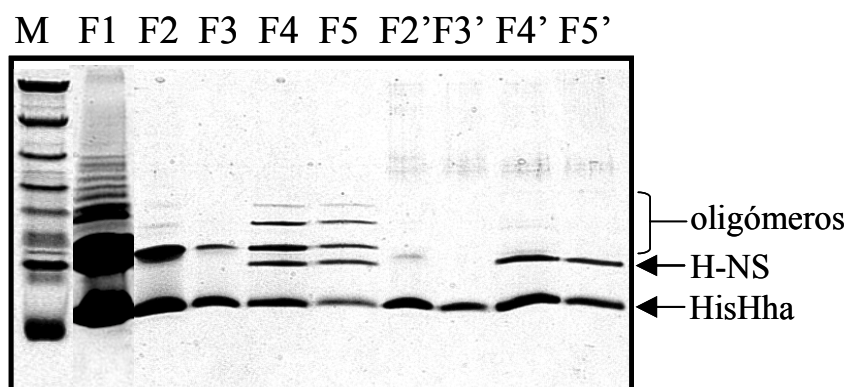


Figura 3.1.12. Purificación de la proteína HisHha por columna de afinidad a partir de 1 l de cultivo de la cepa BL21 (DE3) (pET15bHisHha) inducido con IPTG a 16° C durante toda la noche. Fracciones analizadas por SDS-PAGE y tinción con Coomassie. M, Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range de Bio-Rad; F1, fracción obtenida en la purificación de la proteína HisHha; F2, dilución 1/20 de la fracción F1; F3, dilución 1/100 de la fracción F1; F4 y F5, fracciones posteriores obtenidas en la purificación de la proteína HisHha; F2'-F5', fracciones F2-F5 tratadas con DTT 20mM.

3.1.2.3.2.- Construcción del vector pET15bHNSHis-64

Como ya se había comentado en el apartado 3.1.1., un aspecto relevante de la proteína Hha viene determinado por su interacción con la proteína H-NS. Por ese motivo, se planteó el estudio por RMN de la interacción entre ambas proteínas, estudios que requieren también la producción de proteína H-NS. Esta proteína presenta una gran capacidad de oligomerizar (Schöder y Wagner, 2002) y la formación de oligómeros dificulta en gran medida la realización de estudios estructurales por RMN. Por ese motivo, basándonos en los trabajos de Esposito y colaboradores (2002), se decidió construir una forma truncada de la proteína H-NS que comprende los residuos 1-64 (H-NS₆₄) y que no presenta alterada ni su funcionalidad ni su capacidad de dimerizar, pero sí su capacidad de oligomerizar. Esta proteína truncada es un mejor sustrato que la proteína H-NS original para la realización de estudios por RMN que nos permitan averiguar que residuos aminoacídicos de la proteína Hha están implicados en la interacción con la proteína H-NS.

Se diseñaron los oligonucleótidos HNSNCOPROX y 164HISBAM (tabla 3.1.2.), que permiten amplificar *hns*₆₄ utilizando como molde el gen *hns* de la cepa de *E. coli* 5K y que generan dianas de restricción *Nco*I / *Bam*HI respectivamente y una cola de 6 aminoácidos histidina en el extremo C-terminal de la proteína. La temperatura de hibridación utilizada fue de 56° C y el tiempo de extensión de 30 segundos. El fragmento obtenido se digirió con los enzimas de restricción *Nco*I / *Bam*HI, se ligó con el vector obtenido de idéntica digestión a partir del plásmido pET15bHisHha, y se transformó en la cepa de *E. coli* 5K. La comprobación de la construcción pET15bHNSHis-64 se realizó mediante restricción *Nru*I, cuya diana está presente en la secuencia *hns*₆₄*his* pero no en *hishha*, y posterior secuenciación.

Tabla 3.1.2. Oligonucleótidos utilizados para amplificar *hns*₆₄*his*. Las dianas de restricción se indican en sombreado. La secuencia que codifica 6 aminoácidos histidina aparece subrayada.

Oligonucleótido	Secuencia 5' — 3'	Diana de restricción
HNSNCOPROX	GATTACTA ^{CCATGGG} GCGAAGC	<i>Nco</i> I
164HISBAM	CG ^{GGATCC} TATTAATGGTGATGGTGAT GGTGCAGCATTTCGCGA	<i>Bam</i> HI

El análisis mediante electroforesis de las fracciones obtenidas en experimentos de inducción de la expresión génica con IPTG a 37° C y fraccionamiento celular por ultrasonidos nos permitió comprobar la sobreexpresión de H-NS₆₄His y la no alteración de la solubilidad con respecto a la proteína nativa (figura 3.1.13.). Por tanto, el plásmido pET15bHNSHis-64 fue utilizado de forma rutinaria para obtener proteína H-NS₆₄His purificada.

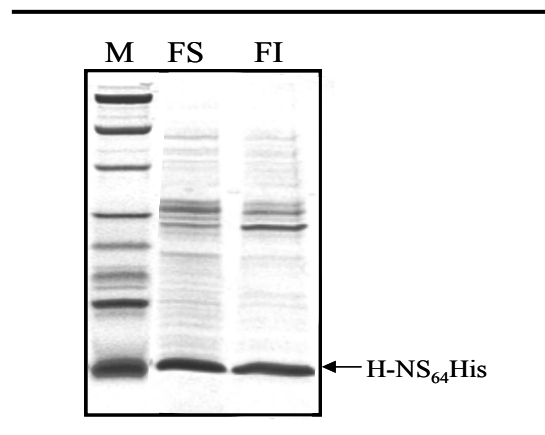


Figura 3.1.13. Solubilidad de la proteína H-NS₆₄His. Análisis de las fracciones soluble (FS) e insolubles (FI) por SDS-PAGE y tinción con Coomassie de un cultivo de la cepa BL21 (DE3) pET15bHNSHis64 inducido con IPTG durante 3 horas a 37° C. M, Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range de Bio-Rad.

3.1.3.- CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES EN LA CISTEÍNA EN POSICIÓN 18

La disponibilidad de proteína Hha soluble permitió realizar estudios de RMN que pusieron de manifiesto cuáles eran las regiones de la proteína Hha que interaccionan con la proteína H-NS. Los resultados obtenidos mostraron como no sólo los residuos aminoacídicos superficiales de Hha, que podrían entrar en contacto directo con H-NS₆₄, se ven alterados en esta interacción sino que también sufren modificaciones residuos aminoacídicos internos de la estructura tridimensional de Hha (García *et al.*, 2005). Estos resultados sugieren que la interacción entre ambas proteínas provoca un importante reordenamiento conformacional de Hha, que pasaría de una forma “cerrada” en la molécula aislada, a una forma “abierta” que se estabiliza por la interacción con la proteína H-NS₆₄. Este cambio conformacional afectaría al empaquetamiento de las hélices α que estructuran la proteína Hha.

En la figura 3.1.14. se muestra la estructura secundaria de la proteína Hha, así como el grado de exposición en la superficie de la proteína de los distintos residuos aminoacídicos. Aunque el aminoácido cisteína en posición 18 no es uno de los residuos más afectados en los estudios por RMN, se pensó que podría tener una gran importancia en el equilibrio conformacional de Hha en su interacción con H-NS, debido a que se encuentra en una zona de conexión entre dos dominios hélice α . Por este motivo, se planteó la mutagénesis de este aminoácido con el objetivo de perturbar la estructura de Hha y comprobar cómo esta modificación afecta a su capacidad de interaccionar con H-NS. De allí que se decidiese mutagenizar esta cisteína (C, 121 Daltons) por los aminoácidos de menor tamaño serina (S, 105 Da) y alanina (A, 89 Da), y por una isoleucina (I, 131 Da) de mayor tamaño que hipotéticamente generaría una apertura en el vértice que comunica las estructuras en hélice α .



Figura 3.1.14. Análisis estructural de la proteína Hha. **1**, localización de los 4 dominios hélice α ; **2**, secuencia aminoacídica de la proteína Hha; **3**, grado de exposición en la superficie de la proteína de cada uno de los residuos aminoacídicos que la conforman: rojo (< 5%), amarillo (5-20%) y azul (> 20%). Con una flecha se indica el aminoácido cisteína en posición 18. Extraído de García y colaboradores (2005).

3.1.3.1.- Mutagénesis del aminoácido cisteína en posición 18

La mutagénesis de la cisteína se llevó a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa utilizando como cebadores oligonucleótidos mutagénicos, procedimiento descrito en el apartado 2.5.3.2.

Se diseñaron parejas de oligonucleótidos complementarios para cada una de las mutaciones: MHHACI1 y MHHACI2 para la sustitución del aminoácido cisteína por una isoleucina, MHHACS1 y MHHACS2 para la sustitución por una serina, MHHACA1 y MHHACA2 para la sustitución por una alanina (tabla 3.1.3.). La temperatura de hibridación utilizada en todos los casos fue de 55° C.

Esta mutagénesis se realizó sobre (i) el plásmido pUBM22, un vector pBR322 que presenta clonado el gen *hha* en la diana de restricción *EcoRV* y que permite comprobar el fenotipo asociado a las distintas proteínas Hha mutantes, y (ii) el vector de expresión pET15bHisHha (apartado 3.1.2.3.1.), permitiendo realizar estudios de funcionalidad (capacidad de retención de la proteína H-NS en una matriz de agarosa) de las distintas formas de Hha. Todas las construcciones fueron comprobadas mediante secuenciación.

Tabla 3.1.3. Oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis de *hha*. El codón modificado se indica en sombreado. TGC codifica cisteína (forma salvaje); ATC, isoleucina; AGC, serina; GCC, alanina.

Oligonucleótido	Secuencia 5' — 3'
MHHACI1	TGCGTTTACGTCGTATCCAGACAATTGACACGC
MHHACI2	GCGTGTCAATTGTCTGGATACGACGTAZZCGCA
MHHACS1	TGCGTTTACGTCGTAGCCAGACAATTGACACGC
MHHACS2	GCGTGTCAATTGTCTGGCTACGACGTAZZCGCA
MHHACA1	TGCGTTTACGTCGTGCCAGACAATTGACACGC
MHHACA2	GCGTGTCAATTGTCTGGGCACGACGTAZZCGCA

3.1.3.2.- Efecto de las mutaciones en la cisteína 18 de Hha sobre el crecimiento de *E. coli*

En la obtención de las distintas formas mutantes del gen *hha* clonado en el plásmido pUBM22 se utilizó un tiempo de extensión en el ciclo de amplificación de 5 minutos y 30 segundos. Los plásmidos pUBM22C18I, pUBM22C18S y pUBM22C18A, que presentan respectivamente las sustituciones de la cisteína en posición 18 por una isoleucina, una serina y una alanina, fueron introducidos mediante transformación en la cepa de *E. coli* 5K. En primer lugar, se analizó cómo afectaba al crecimiento la presencia de estos vectores. Se realizaron crecimientos en medio LB, medio LB sin sal y en medio LB de elevada osmolaridad (0,5 M NaCl). En la figura 3.1.15. se muestran las curvas de crecimiento obtenidas, en las que observa cómo la sustitución de la cisteína 18 por una isoleucina disminuye la tasa de crecimiento celular en condiciones de baja osmolaridad.

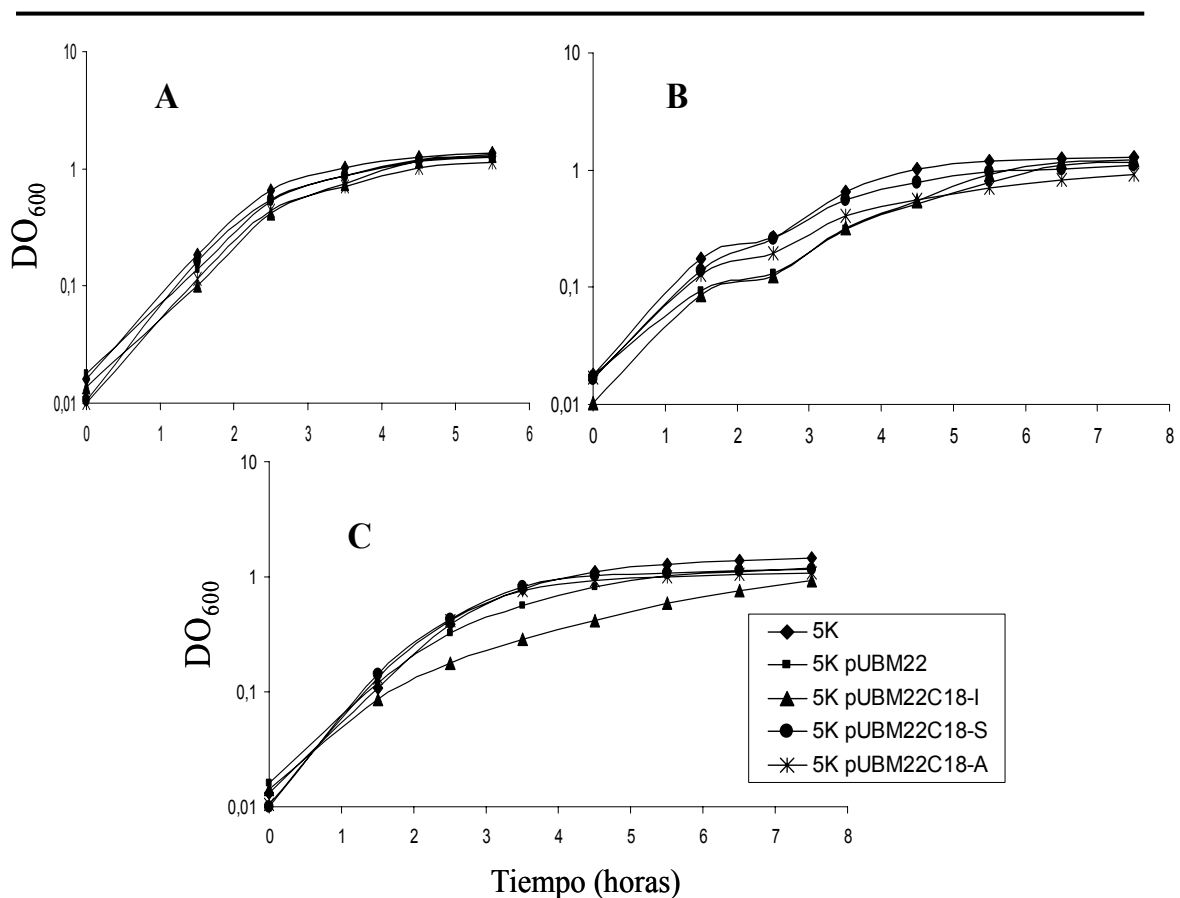


Figura 3.1.15. Curvas de crecimiento de la cepa de *E. coli* 5K con los plásmidos que contienen la forma salvaje y las distintas mutaciones de *hha*. El control 5K (pBR322) se ha omitido de las gráficas una vez comprobada que la presencia del plásmido no altera significativamente el crecimiento de la cepa en ninguna de las condiciones. La temperatura de incubación utilizada fue de 37° C. **A**, crecimiento en medio LB; **B**, crecimiento en medio LB 0,5 M NaCl; **C**, crecimiento en medio LB 0 M NaCl.

Una vez observado este efecto de la sustitución de la cisteína en posición 18 por una isoleucina (HhaC18I) en condiciones de baja osmolaridad del medio de cultivo, se pensó que sería interesante comprobar que ocurría si se sustituía el gen *hha* mutante por una copia del gen *ydgT*. YdgT es una proteína paróloga de Hha que se encuentra en el genoma de *E. coli* y con la que presenta un 38 % de identidad y un 67 % de similitud a nivel de secuencia aminoacídica (apartado 1.3.1.4.). YdgT se encuentra sobreexpresada en mutantes *hha*, atenúa el efecto de esta mutación en la expresión del operón *hly* y, de igual forma que Hha, es capaz de unirse de forma estable a proteínas de la familia H-NS (Paytubi *et al.*, 2004). El interés que presenta la sustitución del gen *hha* mutante por una copia del gen *ydgT* radica en que, en el alineamiento de secuencias aminoacídicas

(figura 3.1.16.), la proteína YdgT presenta una isoleucina en posición 18 en lugar de la cisteína presente en las proteínas Hha e YmoA, lo que corresponde a una proteína natural que ya presenta la sustitución sometida a estudio.

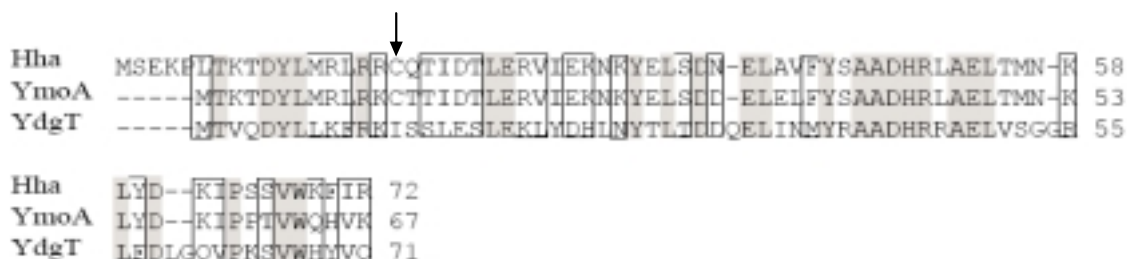


Figura 3.1.16. Comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas Hha de *E. coli* (P2387), YmoA de *Y. enterocolitica* (P27720) e YdgT de *E. coli* (P76179). Extraído de Paytubi (2004). La cisteína en posición 18 mutagenizada en Hha, se indica con una flecha. En esa posición, comparando secuencias aminoacídicas alineadas, YdgT presenta un aminoácido isoleucina.

La construcción del plásmido pBRYdgT se realizó mediante restricción doble *EcoRI* y *BamHI* de los plásmidos pBR322 y pUCYdgT. Este último es un vector multicopia pUC19 que contiene clonado el gen *ydgT* junto a su región promotora entre las dianas de restricción *EcoRI* y *BamHI*. El producto de la ligación de la banda vector del plásmido pBR322 y la banda que contiene el gen *ydgT* obtenida a partir del plásmido pUCYdgT fue introducida mediante transformación en la cepa de *E. coli* 5K, y se realizaron curvas de crecimiento en condiciones de baja osmolaridad del medio de cultivo (figura 3.1.17.), comprobando que la proteína YdgT no provoca el mismo efecto que HhaC18I en la cepa 5K.

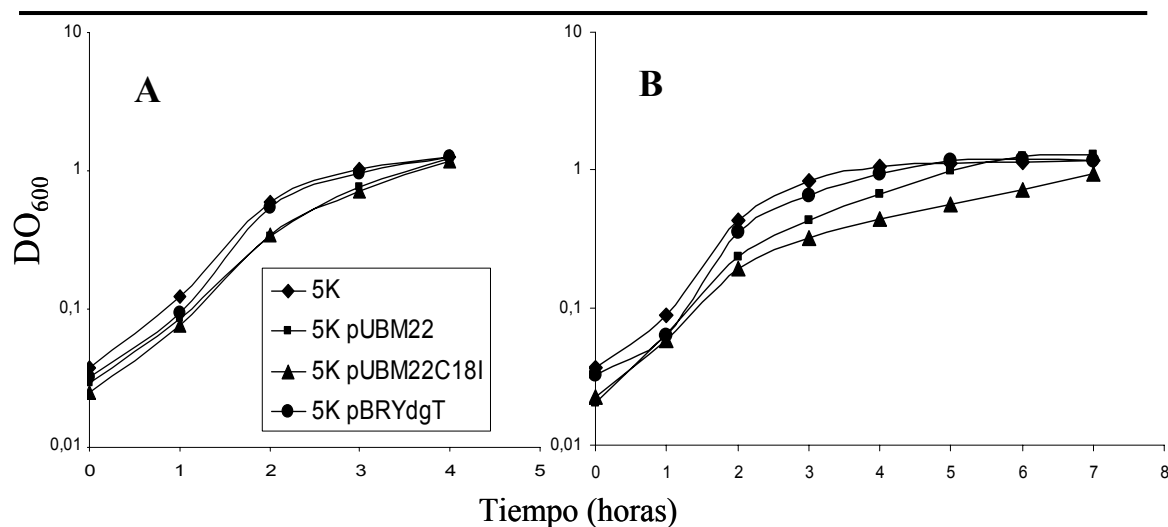


Figura 3.1.17. Curvas de crecimiento de la cepa de *E. coli* 5K conteniendo los plásmidos pUBM22C18I y pBRYdgT. La temperatura de incubación utilizada fue de 37° C. **A**, crecimiento en medio LB; **B**, crecimiento en medio LB 0 M NaCl.

3.1.3.3.- Complementación de la mutación *hha* por las proteínas HhaC18I, HhaC18S y HhaC18A

Tal y como se ha mencionado en el apartado 1.3.1.2., los mutantes *hha* de *E. coli* presentan desregulada la expresión del operón *hly*. Para comprobar si las distintas proteínas mutantes eran capaces de complementar el efecto de la mutación *hha*, se introdujeron mediante transformación los plásmidos que presentan la forma salvaje y las distintas formas mutantes del gen *hha* en la cepa Hha-3. La cepa Hha-3 es un mutante *hha* obtenido a partir de la cepa 5K de *E. coli* mediante inserción en el gen de un transposón que presenta el gen que codifica resistencia al antibiótico kanamicina. A continuación, se introdujo mediante transformación el plásmido pANN202-312 en las cepas Hha-3 y sus derivadas conteniendo los plásmidos con la forma salvaje y las distintas formas mutantes del gen *hha*. El plásmido pANN202-312 presenta clonado el operón *hlyCABD* en un vector pACYC184. Estrías en medio agar-sangre (apartado 2.2.1.) de las cepas obtenidas pusieron de manifiesto que, mientras que la presencia de los plásmidos pUBM22C18S y pUBM22C18A provocaba una reducción del halo de hemólisis comparable a la obtenida con el plásmido pUBM22, la presencia del plásmido

pUBM22C18I no daba lugar a una reducción significativa del halo de hemólisis en relación a la cepa Hha-3 pANN202-312.

Con el fin de cuantificar el efecto de la presencia de los distintos plásmidos que contienen las copias mutantes del gen *hha* sobre la expresión del operón *hly*, se utilizó una fusión génica *hlyC::lacZ*. El plásmido pCB26, que presenta una fusión traduccional del gen *lacZ* en el gen *hlyC* del plásmido pANN202-312, fue introducido mediante transformación en las cepas Hha-3 y sus derivadas que contienen los plásmidos con la forma salvaje y las distintas formas mutantes del gen *hha*. El resultado de la valoración de la actividad β -galactosidasa (apartado 2.7.8.1.) en las distintas cepas se muestra en la figura 3.1.18. En la gráfica se puede observar como, mientras que en la complementación de la mutación *hha* con las proteínas HhaC18A y HhaC18S se produce una represión de la expresión del operón *hly* de forma similar a la obtenida con la proteína Hha nativa, en la complementación con la proteína HhaC18I la expresión del operón *hly* se muestra significativamente elevada, lo que indica que esta proteína no es capaz de complementar la ausencia de proteína Hha en la cepa Hha-3.

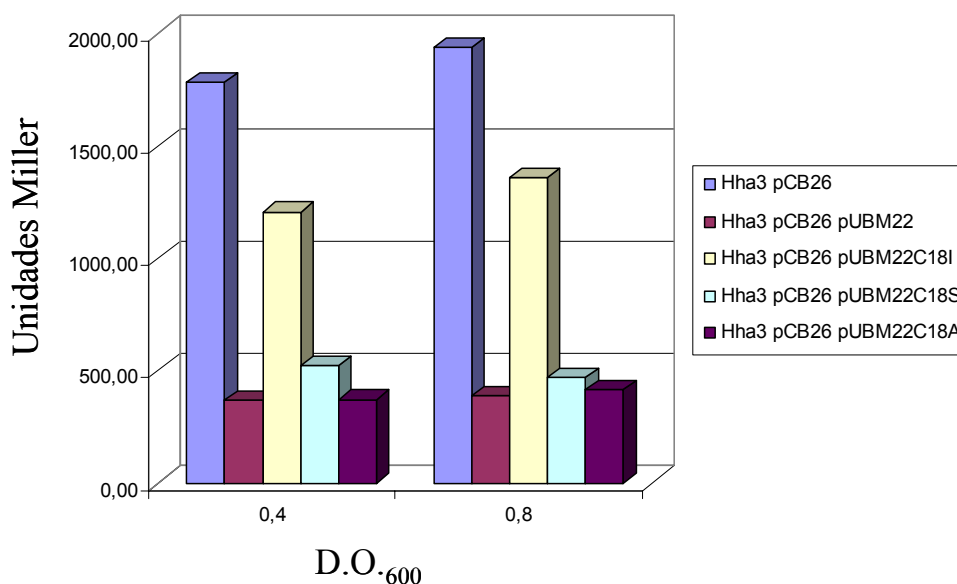


Figura 3.1.18. Cuantificación de la expresión del operón *hly* mediante determinación de la actividad β -galactosidasa de las cepas Hha-3 (pCB26) y sus derivadas que contienen los plásmidos pUBM22, pUBM22C18I, pUBM22C18A y pUBM22C18S.

3.1.3.4.- Efecto de las mutaciones en la cisteína 18 de Hha sobre la capacidad de unión con H-NS

Si la cisteína en posición 18 juega un importante papel la estructura de la proteína Hha, se planteó como hipótesis que la mutación en este residuo pudiese afectar a su interacción con H-NS. De hecho, la proteína YdgT que, como ya se había comentado, presenta de forma natural la sustitución de esta cisteína por una isoleucina, muestra una interacción con H-NS más resistente a la fuerza iónica del medio que la que presenta la proteína Hha (Paytubi *et al.*, 2004). Para analizar el efecto de la mutación en la cisteína en posición 18 en la interacción con H-NS, se obtuvieron las distintas formas mutantes en el sistema pET15b. Para ello, se realizó la mutagénesis sobre el plásmido pET15bHisHha (apartado 3.1.3.1.), utilizando un tiempo de extensión en el ciclo de amplificación de 6 minutos y 30 segundos. Se generaron de esta forma los vectores de expresión pET15bHisHhaC18I, pET15bHisHhaC18S y pET15bHisHhaC18A, que presentan respectivamente las sustituciones de la cisteína en posición 18 por una isoleucina, una serina y una alanina. Las distintas construcciones fueron introducidas mediante transformación en la cepa BL21 (DE3), incubadas a 37° C e inducidas con IPTG durante toda la noche a 16° C. Se realizaron experimentos de purificación de la proteína Hha y análisis de su interacción con H-NS. Las fracciones obtenidas fueron analizadas en SDS-PAGE mediante tinción con Coomassie e inmunodetección con anticuerpos anti H-NS (figura 3.1.19.). Los extractos que contenían la proteína Hha unida a la resina fueron lavados con concentraciones crecientes de KCl (0,5, 1 y 2 M), con el fin de comprobar la resistencia del complejo Hha-H-NS a la fuerza iónica del medio.

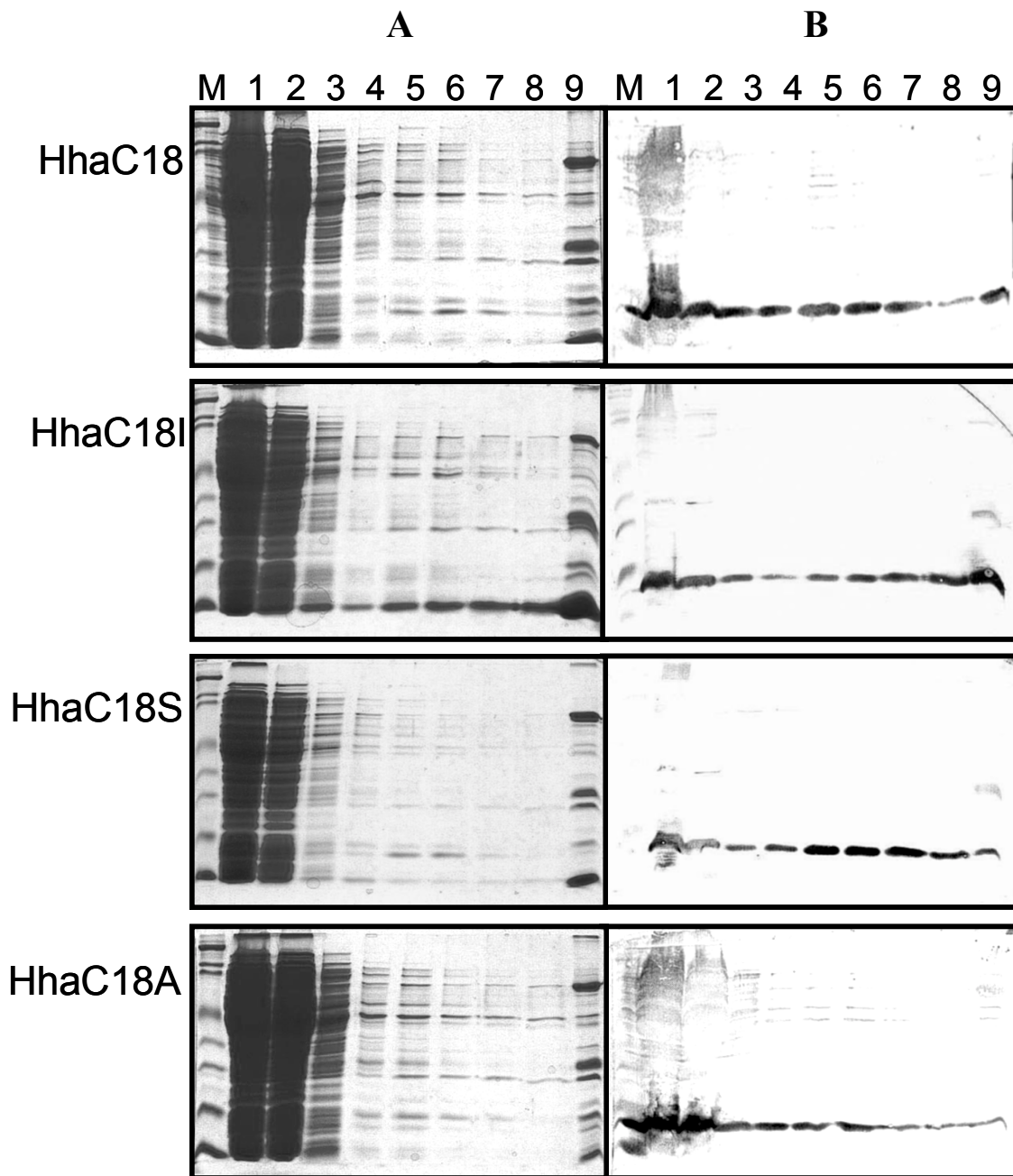


Figura 3.1.19. Experimento de inducción con IPTG y purificación de HisHha (HhaC18) y las distintas formas mutantes (HhaC18I, HhaC18S y HhaC18A). Análisis de las fracciones por SDS-PAGE y tinción con Coomassie (A) e inmunodetección con anticuerpos anti H-NS (B). M, Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range de Bio-Rad; 1, fracción soluble total; 2-4, lavados de la resina con tampón A; 5-6, lavados con tampón A 0,5 M KCl; 7, lavado con tampón A 1 M KCl; 8, lavado con tampón A 2 M KCl; 9, lavado con tampón A 0,5 M imidazol. HhaC18, HisHha nativa; HhaC18I, HisHha con isoleucina en posición 18; HhaC18S, HisHha con serina en posición 18; HhaC18A, HisHha con alanina en posición 18.

Estos resultados muestran cómo la proteína HisHhaC18I, de la misma forma que la proteína YdgT, presenta una interacción con H-NS más estable (más resistente a lavados con elevadas concentraciones de KCl) que la proteína HisHha no mutagenizada. El comportamiento de HisHhaC18S es, en cuanto a su capacidad de retener H-NS, similar a la de la forma original de HisHha mientras que la forma HisHhaC18A, es la que presenta una interacción más débil, ya que se disocia más fácilmente de H-NS en presencia de elevadas concentraciones de KCl. Como se puede comprobar, existe una relación entre la capacidad de interacción con H-NS de las distintas formas de Hha y el tamaño del aminoácido en posición 18.

3.2.- PAPEL REGULADOR DE LAS PROTEÍNAS H-NS E YmoA EN *Y. enterocolitica*

3.2.1.- ANTECEDENTES

El descubrimiento de la interacción entre las proteínas YmoA y H-NS (Nieto *et al.*, 2002) hizo que se plantease la posibilidad que esta última pudiera tener un papel regulador importante en *Y. enterocolitica*. Curiosamente, hasta ese momento no se había descrito la proteína H-NS en el género *Yersinia*. Con el fin de comprobar el hipotético papel regulador de la proteína H-NS en este género, se decidió obtener un mutante *hns* en *Y. enterocolitica*. Para ello, se utilizó un plásmido derivado de pUTmini-Tn5Kml como sistema mutagénico (De Lorenzo *et al.*, 1990). Este plásmido, denominado pUTHns-Sm (figura 3.2.1.A), presenta una copia no funcional del gen *hns* por inserción de un casete que codifica resistencia al antibiótico estreptomina, el gen *sacB* que otorga letalidad en presencia de sacarosa y el gen que otorga resistencia al antibiótico cloranfenicol. Además, es suicida en ausencia de la proteína *λpir*, de manera que su mantenimiento únicamente es posible si se integra en el cromosoma bacteriano mediante recombinación homóloga. El plásmido pUTHns-Sm fue introducido en la cepa de *Y. enterocolitica* W22703 en la que, por recombinación homóloga (figura 3.2.1.B.1), se obtuvo una cepa merodiploide que contiene una copia salvaje y una mutante del gen *hns*, a la que se denominó W22703SR18 (Rodríguez, 2005). Diferentes intentos de obtener mutantes *hns* seleccionando la excisión del plásmido (clones resistentes a la sacarosa y estreptomina, y sensibles al cloranfenicol, figura 3.2.1.B.2) no tuvieron éxito, lo que sugirió que el gen *hns* es esencial en *Y. enterocolitica* (Rodríguez, 2005). Estos mismos resultados fueron planteados por otro grupo de investigación en *Y. pseudotuberculosis* (Heroven *et al.*, 2004).

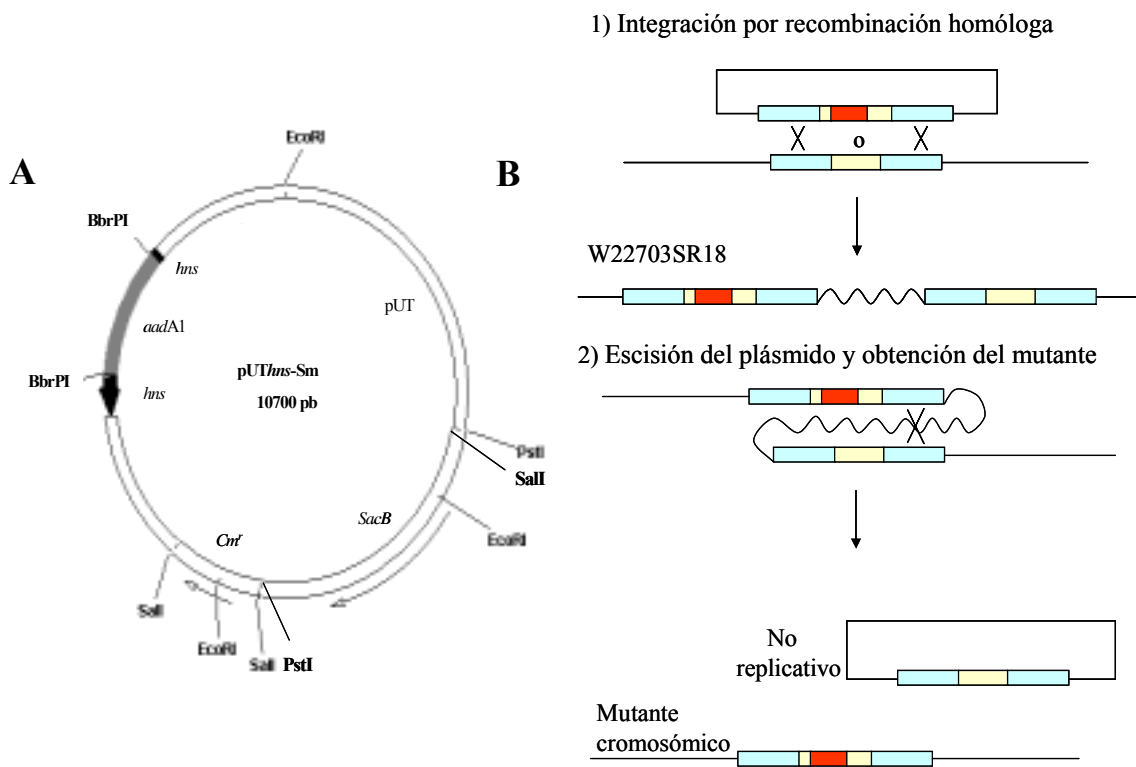


Figura 3.2.1. Estructura del plásmido pUTHns-Sm (A) y reemplazamiento alélico en dos pasos (B) para la obtención de un mutante cromosómico *hns* en *Y. enterocolitica* (Rodríguez, 2005).

Con este escenario, una estrategia alternativa para intentar obtener mutantes cromosómicos del gen *hns* consistió en complementar en *trans* la mutación mediante un plásmido portador de un gen de la familia H-NS que expresase una proteína funcionalmente equivalente. Este requisito lo cumple el plásmido R27 del grupo de incompatibilidad IncHI, que codifica una proteína de la familia H-NS (Forns *et al.*, 2005a), o el plásmido pBRStpA, que expresa la proteína StpA de *E. coli*. La proteína StpA es paróloga a la proteína H-NS, con la que presenta un 67 % de similitud a nivel de secuencia aminoacídica (figura 3.2.2). Además, cuando se encuentra sobreexpresada, la proteína StpA es capaz de complementar algunos de los fenotipos de un mutante *hns* (Shi y Bennett, 1994). Mientras que *E. coli* presenta tanto el gen *hns* como *stpA*, éste último no está presente en *Y. enterocolitica*.

La transformación de la cepa merodiploide W22703SR18 con el plásmido pBRStpA permitió obtener un mutante *hns* de *Y. enterocolitica* (cepa W22703H), por lo que se planteó como objetivo de este trabajo conocer mejor este sistema.

```

HNS 1 MSEALKIILNNIRTLRAQARECTLETLEEMLEKLEVVVNERREEESAAAAEVEERTRKIQQYREMLIADGI 70
StpA 1 MSVMLQSLNNIRTLRAMAREFSIDVLEEMLEKFRVVTKERREEEQQRELAERQEKISTWLELMKADGI 70

HNS 71 DPNELLSLAAVKSGTKAKRAQRPAYSYVDENGETKTWTGQGRTEAVIKKAMDEQKSLDDFLIKQ 137
StpA 71 NPEELLSNSSAAAPRACKKRQPRPAKYKFTDVENGETKTWTGQGRTEKPIAQALAE-GKSLDDFLI-- 134

```

Figura 3.2.2. Comparación de las secuencias aminoacídicas de las proteínas H-NS y StpA de *E. coli*. Con sombreado negro se remarcan los aminoácidos idénticos y en gris los similares.

3.2.2.- EFECTO DE LA PRESENCIA DEL PLÁSMIDO pBRStpA SOBRE LA FISIOLOGÍA DE *Y. enterocolitica*

3.2.2.1.- Efecto de la presencia del plásmido pBRStpA sobre el crecimiento de *Y. enterocolitica* W22703 en medio LB a 30° C

En primer lugar, se procedió a analizar la cinética de crecimiento de la cepa W22703H (pBRStpA) en comparación con la cepa salvaje W22703. Como controles en el estudio de esta cinética de crecimiento se utilizaron la cepa salvaje portadora bien del plásmido pBR322 o del plásmido pBRStpA (figura 3.2.3.).

Tal y como era esperable, el mutante *hns* presenta una tasa de crecimiento inferior a la de la cepa salvaje. Por otra parte, pudo ponerse de manifiesto que la presencia del vector pBR322 no afecta el crecimiento de la cepa W22703 en las condiciones utilizadas. En cambio, se produjo un resultado inesperado al introducir el plásmido pBRStpA en la cepa W22703, ya que la presencia del mismo también provocó una significativa alteración de la tasa de crecimiento (figura 3.2.3.).

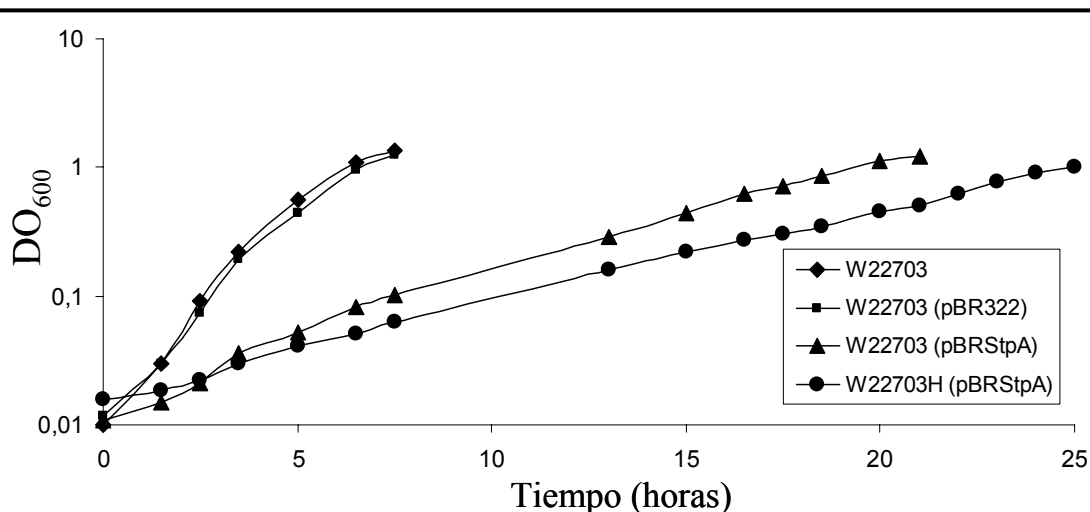


Figura 3.2.3. Crecimiento en medio LB a 30° C de las distintas cepas derivadas de W22703.

3.2.2.2.- Efecto de la presencia del plásmido pBRStpA sobre el crecimiento de *Y. enterocolitica* W22703 en distintas condiciones de cultivo

Ante este sorprendente efecto de la presencia del gen *stpA* sobre el crecimiento de la cepa salvaje W22703 en medio LB a 30° C, decidimos comprobar si dicho efecto se mantenía en otras condiciones de cultivo.

3.2.2.2.1.- Crecimiento en medio rico a diferentes temperaturas

Se analizó en primer lugar si el efecto de la presencia del gen *stpA* clonado en un pBR322 era dependiente de la temperatura de crecimiento. Como alternativa al crecimiento a 30° C, se realizaron curvas de crecimiento a 25° C y 37° C de las cepas W22703, W22703 (pBRStpA) y W22703H (pBRStpA) en medio LB y condiciones aeróbicas (figura 3.2.4.). En los cultivos crecidos a 25° C, el plásmido pBRStpA afectó a la tasa de crecimiento de forma similar a los cultivos crecidos a 30° C. En cambio, a 37° C, el efecto de la presencia del plásmido pBRStpA fue todavía más pronunciado, impidiendo el crecimiento tanto de la cepa parental W22703 como del mutante *hns*.

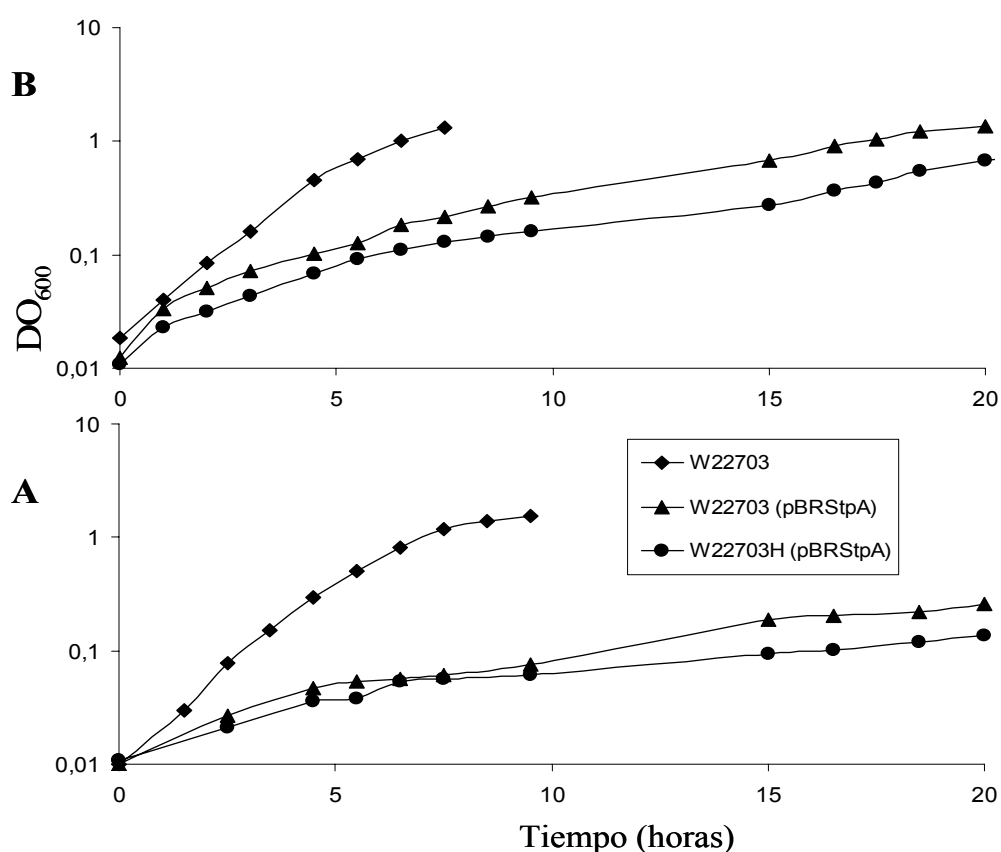


Figura 3.2.4. Crecimiento de las cepas W22703, W22703 (pBRStpA) y W22703H (pBRStpA) en medio LB aeróbicamente a 25° C (A) y 37° C (B).

3.2.2.2.2.- Crecimiento en medio rico en condiciones anaeróbicas

Para comprobar cómo afecta la presencia del gen *stpA* al crecimiento de las cepas W22703 y W22703H en ausencia de oxígeno, se realizó un crecimiento en anaerobiosis utilizando medio LB modificado (apartado 2.2.1.). Una vez inoculados, los viales utilizados en el experimento se incubaron sin agitación a 30° C. Las cepas portadoras del plásmido pBRStpA no crecieron anaeróbicamente en medio LB modificado (figura 3.2.5.).

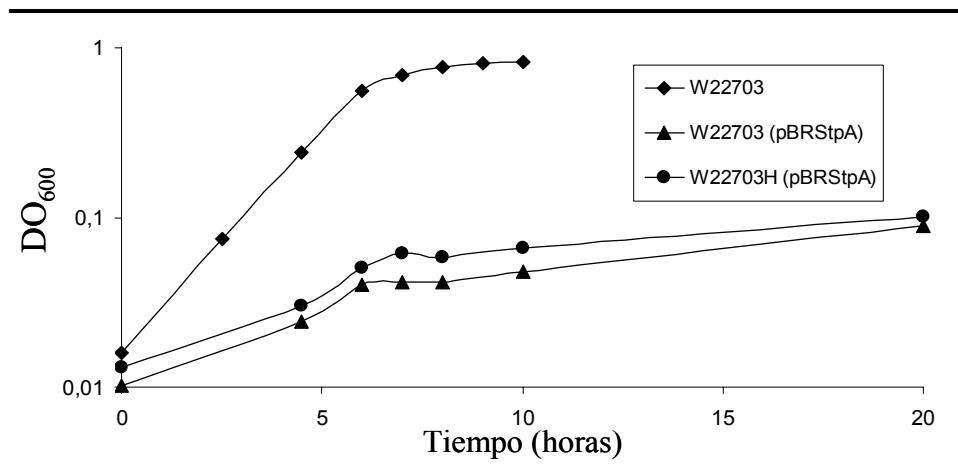


Figura 3.2.5. Crecimiento de las cepas W22703, W22703 (pBRStpA) y W22703H (pBRStpA) en medio LB modificado a 30° C y anaerobiosis.

3.2.2.2.3- Crecimiento en medio mínimo con glucosa

También se comprobó cómo afecta la presencia del gen *stpA* al crecimiento de las cepas W22703 y W22703H en medio mínimo suplementado con glucosa (4 g/l) como única fuente de carbono (figura 3.2.6.). La presencia del plásmido pBRStpA impidió el crecimiento de la cepa W22703H y redujo significativamente el de la cepa salvaje W22703.

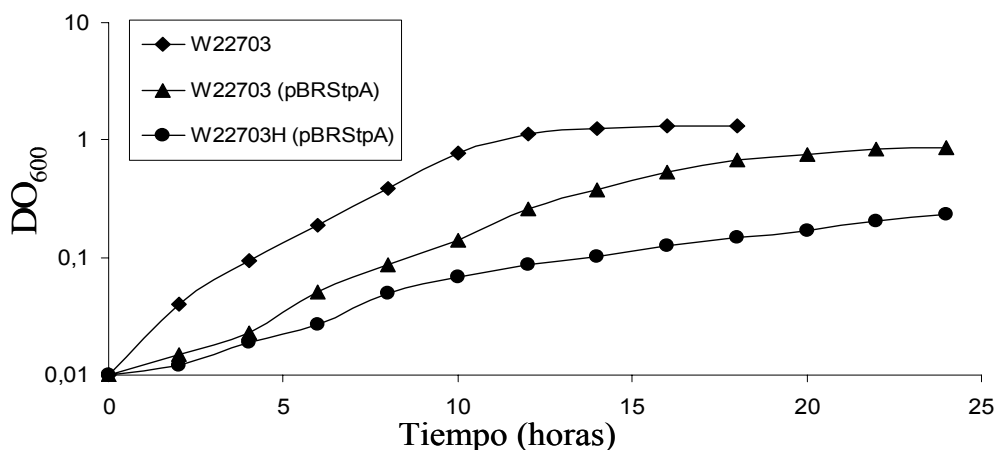


Figura 3.2.6. Crecimiento de las cepas W22703, W22703 (pBRStpA) y W22703H (pBRStpA) en medio mínimo M63 con glucosa a 30° C.

3.2.2.2.4.- Metabolismo de la glucosa por la cepa W22703

Con la intención de intentar mejorar el crecimiento de la cepa de *Y. enterocolitica* W22703 portadora del plásmido pBRStpA, se comprobó cual era el efecto de la adición de glucosa (2 g/l) en el crecimiento en medio LB. Se analizó este efecto en la cepa salvaje W22703 tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas y a distintas temperaturas (25° C y 37° C), comparándola con la cepa de *S. enterica* serovar Typhimurium SV5015 utilizada como control (figura 3.2.7.). A 25° C, la presencia de glucosa no afecta significativamente al crecimiento de *Y. enterocolitica*, ni aeróbica ni anaeróbicamente. En cambio, a 37° C, la presencia de glucosa en condiciones aeróbicas perjudica al crecimiento, mientras que en condiciones anaeróbicas no lo afecta. Estos resultados son totalmente diferentes a los conocidos para diferentes bacterias entéricas, tales como la cepa de *S. enterica* serovar Typhimurium utilizada de control, la cual ve su crecimiento claramente favorecido en condiciones anaeróbicas por la presencia de glucosa. Claramente, la temperatura de crecimiento afecta de forma significativa a *Y. enterocolitica* W22703, hasta el punto de provocar que la presencia de glucosa a 37° C resulte perjudicial para el crecimiento.

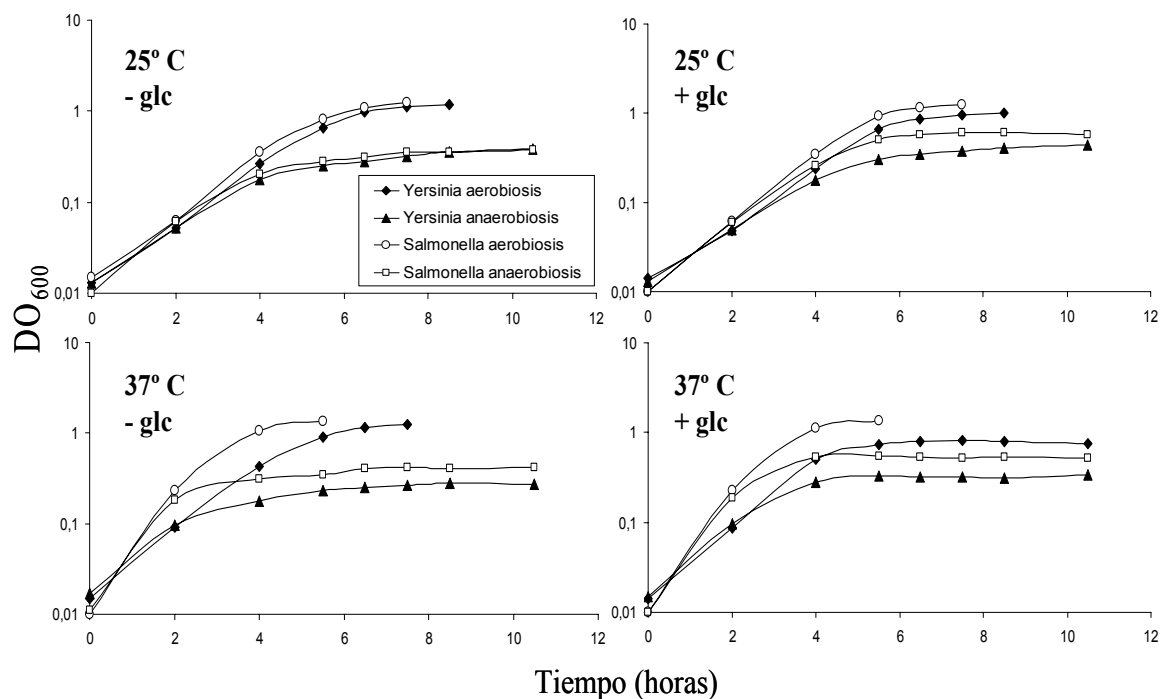


Figura 3.2.7. Crecimiento en medio LB de las cepas W22703 de *Y. enterocolitica* y SV5015 de *S. Typhimurium* en presencia / ausencia de glucosa (glc) y en condiciones aeróbicas / anaeróbicas a 25° C y a 37° C.

3.2.3.- EFECTO DE LA PRESENCIA DEL PLÁSMIDO pBRStpA SOBRE EL CRECIMIENTO DE OTRAS ENTEROBACTERIAS

Hasta la fecha no se había reportado que la presencia del gen *stpA* clonado en un vector afectase significativamente al crecimiento en otras enterobacterias. Con el fin de comprobar este efecto en diferentes especies de la Familia *Enterobacteriaceae*, se introdujo mediante transformación el plásmido pBRStpA en las cepas *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TR5877, *Klebsiella pneumoniae* C3 y *E. coli* 5K. Por un problema de resistencia a antibióticos *Proteus mirabilis* TT170 fue transformado con el plásmido pACYCStpA (Cm^r) en lugar de con el plásmido pBRStpA. La construcción del plásmido pACYC184 se realizó mediante amplificación del gen *stpA* de *E. coli* junto a su secuencia promotora, utilizando los oligonucleótidos STPAH1 y STPAH2 (tabla 3.2.1.), y posterior ligación con el plásmido pACYC184 previamente digerido con el enzima de restricción *Hind*III. La temperatura de hibridación utilizada para la amplificación del gen *stpA* fue de 56° C. En ninguna de las cepas antes mencionadas se observó alteración en la tasa de crecimiento debida a la presencia de una copia en *trans* del gen *stpA*. Asimismo también se intentó comprobar el efecto del gen *stpA* en otros microorganismos pertenecientes al grupo entérico, tales como *Aeromonas hydrophila* A3, *Aeromonas molluscorum* 869N, *A. molluscorum* 848T, *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CECT 846 y *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* CECT 4325. En estos últimos casos no se obtuvieron transformantes con ninguno de los dos plásmidos portadores del gen *stpA*.

Tabla 3.2.1. Oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen *stpA* junto a su secuencia promotora. Las dianas de restricción se indican en sombreado.

Oligonucleótido	Secuencia 5'—3'	Diana de Restricción
STPAH1	GCTAATATAT AAGCTT GAAATTATTC	<i>Hind</i> III
STPAH2	GTGGAACCAAC AAGCTT GAGA	<i>Hind</i> III

3.2.4.- EFECTO DE LA PRESENCIA DEL PLÁSMIDO pBRStpA SOBRE EL PATRÓN DE EXPRESIÓN PROTEICA EN LAS CEPAS W22703 Y W22703H DE *Y. enterocolitica*

Con el fin de obtener información acerca del mecanismo por el que la proteína StpA afecta al crecimiento de la cepa W22703 de *Y. enterocolitica*, se decidió proseguir los estudios analizando el patrón de expresión proteica en las diferentes cepas, primero mediante electroforesis monodimensional y, posteriormente, mediante electroforesis bidimensional.

3.2.4.1.- Análisis del patrón de expresión proteico por SDS-PAGE

Cultivos en medio LB de las cepas W22703, W22703 (pBRStpA) y W22703H (pBRStpA) fueron incubados a 30° C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,6. Se obtuvieron extractos proteicos en tampón Tris-EDTA (Tris-HCl 50mM pH 8,0, EDTA 2mM) mediante disrupción celular por presión (apartado 2.7.1.2). Los extractos fueron analizados por SDS-PAGE (figura 3.2.8.).

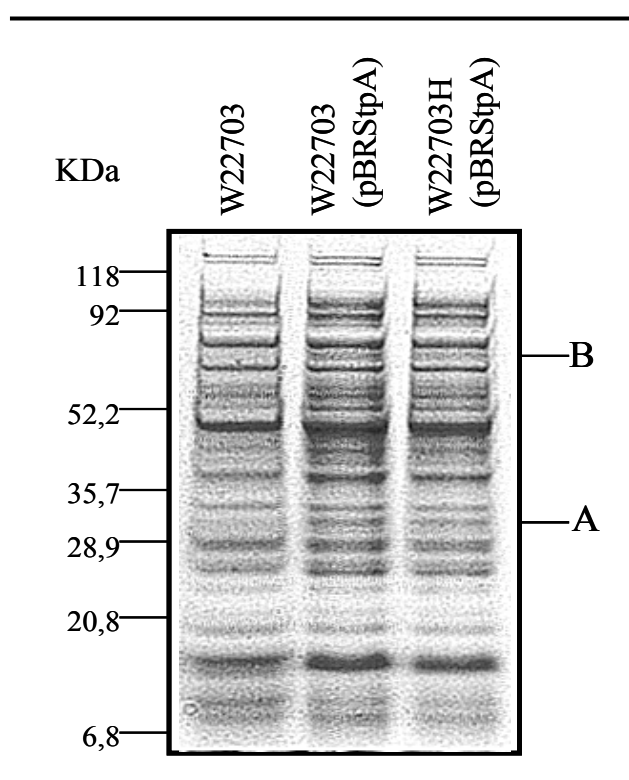


Figura 3.2.8. Análisis en SDS-PAGE de extractos celulares de las cepas objeto de estudio. **A**, proteína YPO3838; **B**, producto del gen *sdhA* (subunidad flavoproteína de la succinato deshidrogenasa).

Al menos dos proteínas presentaban una expresión diferencial en las cepas W22703 (pBRStpA) y W22703H (pBRStpA), encontrándose las mismas sobreexpresadas con respecto a la cepa parental (Fig. 3.2.8.). Con el fin de identificarlas, ambas proteínas fueron eluidas e identificadas mediante Maldi-Tof / Q-Tof (apartado 2.7.4.) como (A) una hipotética proteína YPO3838 y (B) la subunidad flavoproteína de la succinato deshidrogenasa.

3.2.4.2.- Electroforesis bidimensional

La separación y análisis mediante electroforesis bidimensional de las proteínas expresadas en las tres cepas de *Y. enterocolitica* permitió realizar un estudio más exhaustivo sobre el patrón de expresión proteica. Cultivos de las cepas W22703, W22703 (pBRStpA) y W22703H (pBRStpA) fueron incubados en medio LB a 30° C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,6. La obtención de extractos proteicos para geles de dos dimensiones está detallada en el apartado 2.7.1.3., la electroforesis en el apartado 2.7.3.2., y la tinción de proteínas con nitrato de plata en el apartado 2.7.3.4.2.

En la figura 3.2.9. se muestran los geles obtenidos para cada una de las cepas. Para el análisis de imágenes y la comparación entre geles se utilizó el programa ImageMaster v 3.0 de Amersham Biosciences. Las diferencias en el patrón de expresión proteica entre las cepas W22703 y W22703 (pBRStpA) fueron muy importantes, por lo que decidimos centrar nuestro estudio en aquellos “spots” cuya variabilidad de intensidad entre distintos geles era notable, visible sin necesidad de la utilización de programas informáticos. Hay que resaltar que muchas de las diferencias de expresión entre las cepas W22703 y W22703 (pBRStpA) aparecieron también entre la cepa salvaje y la cepa W22703H (pBRStpA). La mayoría de los “spots” identificados, remarcados con cuadrados en la figura 3.2.9.A, corresponden a proteínas cuya expresión se ha visto reducida en las cepas portadoras del plásmido pBRStpA. Únicamente fue identificado un “spot”, remarcado con un círculo en la figura 3.2.9.B, cuya expresión se viese inducida en la cepa W22703 (pBRStpA). Los “spots” remarcados con rombos en la figura 3.2.9.B, corresponden a proteínas cuya expresión es similar en las cepas W22703 y W22703 (pBRStpA), pero se encuentra reducida en la cepa W22703H (pBRStpA).

Finalmente, sólo se identificó un “spot”, marcado con un triángulo en la figura 3.2.9.C, cuya expresión se viese principalmente inducida en la cepa W22703H (pBRStpA).

Todos los “spots” marcados fueron escindidos de los geles y digeridos con tripsina para analizar los espectros obtenidos por Maldi-Tof / Q-Tof. El resultado de la identificación se encuentra detallado en la figura 3.2.9.D.

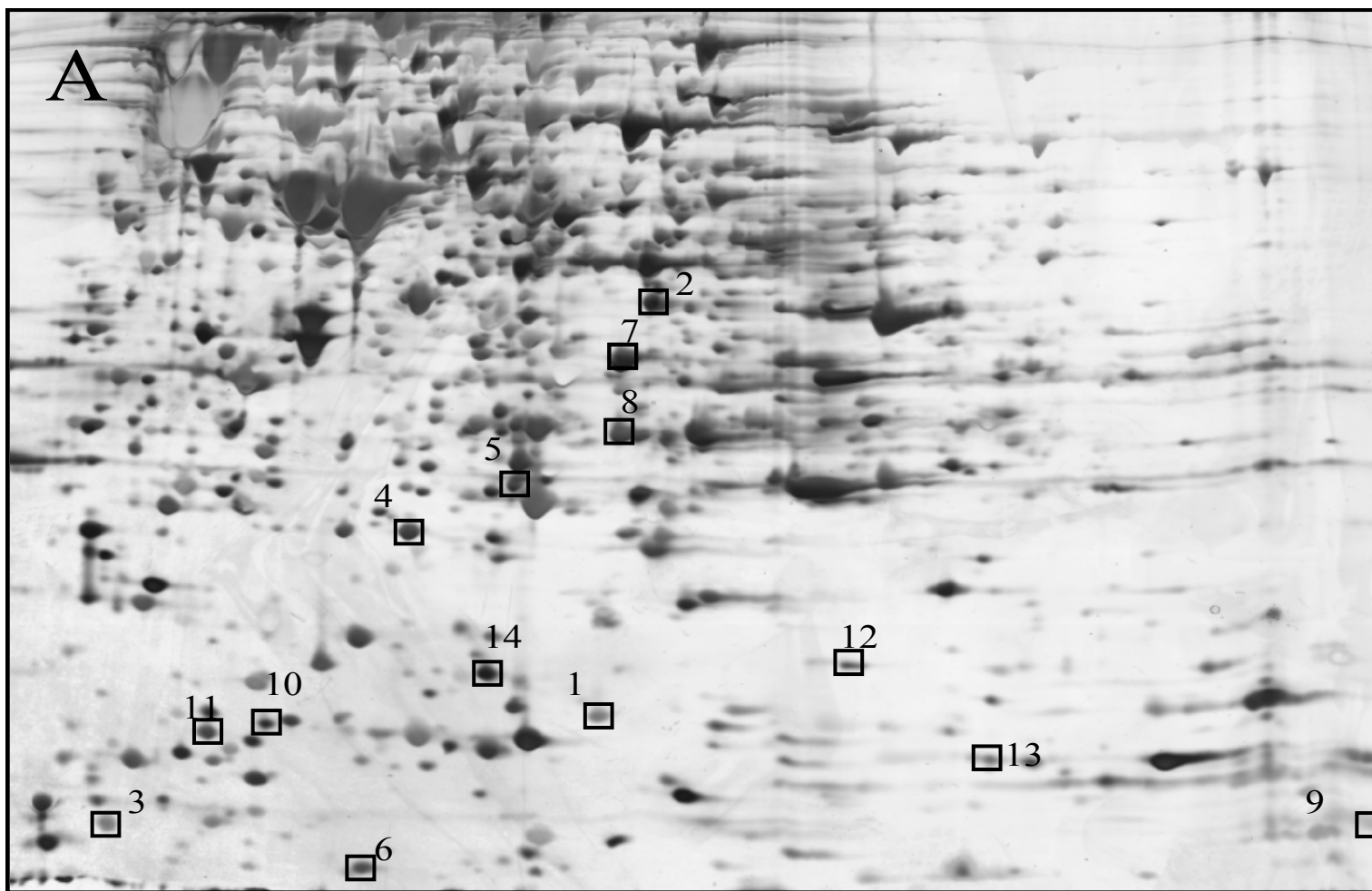


Figura 3.2.9.A. Análisis mediante 2D-PAGE de un extracto proteico obtenido a partir de la cepa W22703.

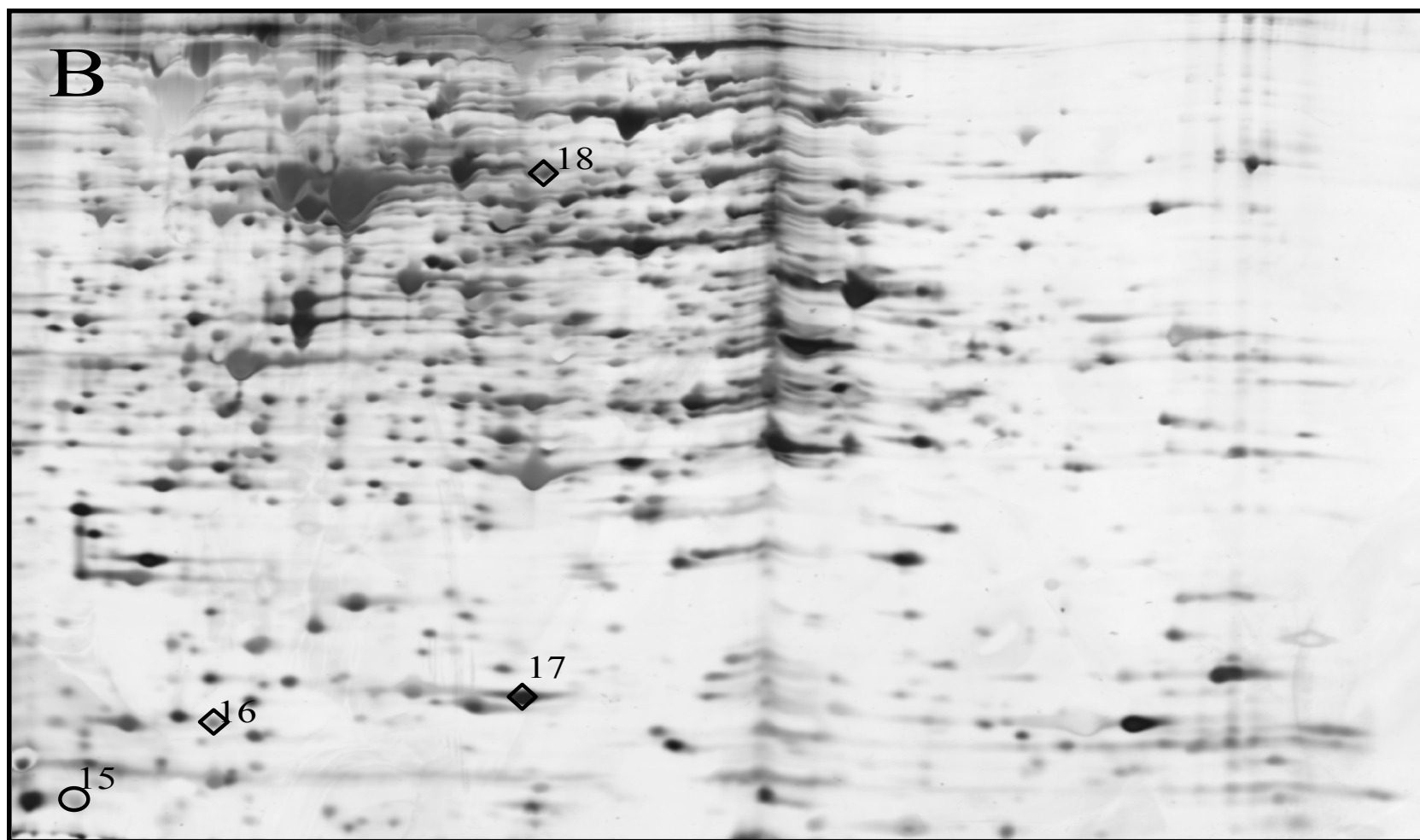


Figura 3.2.9.B. Análisis mediante 2D-PAGE de un extracto proteico obtenido a partir de las cepa W22703 pBRStpA.

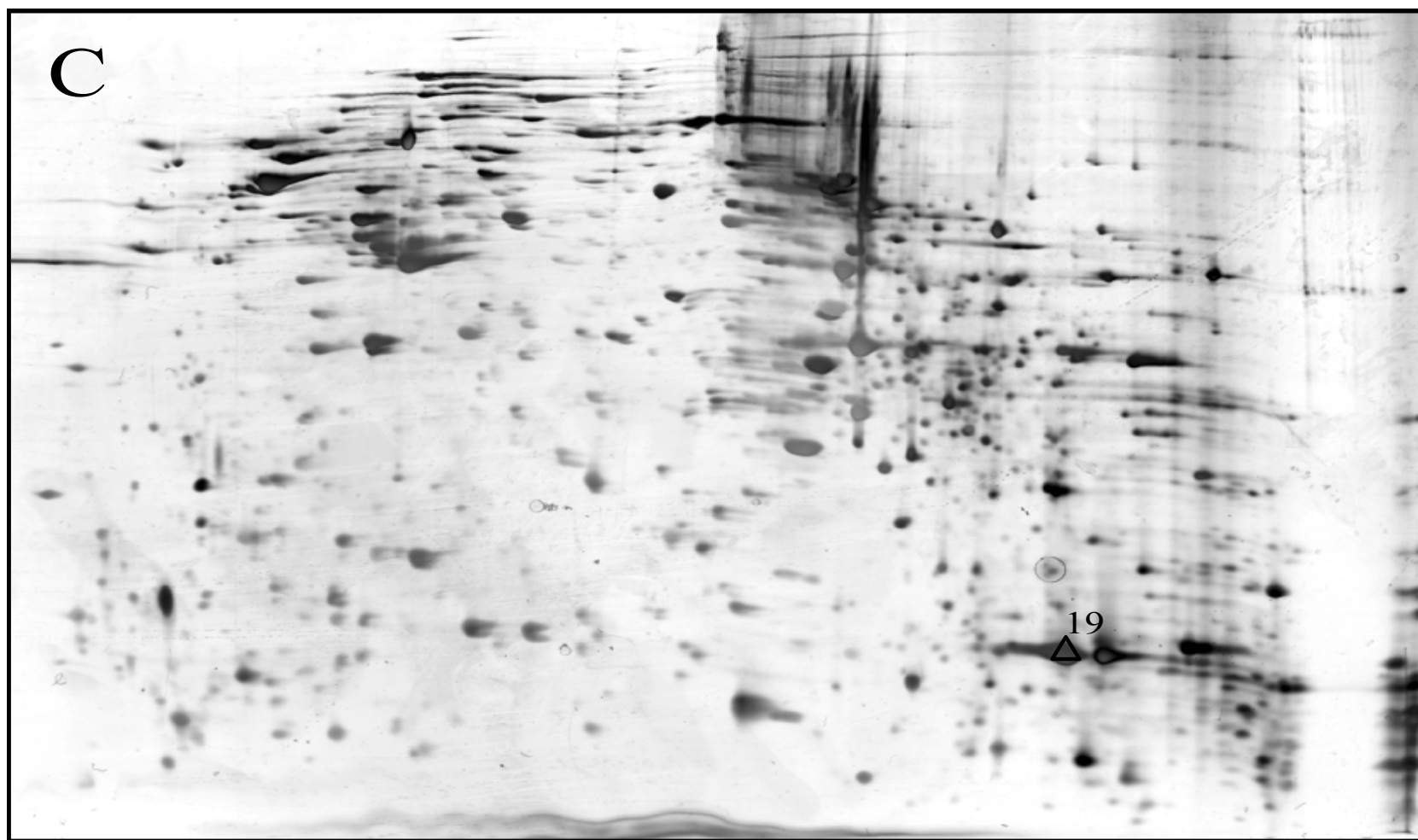


Figura 3.2.9.C. Análisis mediante 2D-PAGE de un extracto proteico obtenido a partir de la cepa W22703H pBRStpA.

1. Adhesina, proteína Ail
 2. UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa, proteína GalF
 3. Hipotética proteína YPO2383
 4. Proteína disulfuro isomerasa I
 5. Orotato fosforibosiltransferasa
 6. Subunidad gamma de la Ureasa
 7. Ribonucleasa pH
 8. Purina-nucleósido fosforilasa
 9. Proteína ribosomal S10
 10. Represor Arginina
 11. Ferritina
 12. Probable proteína de choque frío
 13. Regulador transcripcional RovA
 14. Malato deshidrogenasa
 15. Tioredoxina I
 16. 6,7-dimetil-8-ribitillumazina sintasa
 17. Chaperonina 10KDa
 18. Transportador de grupos hemino
 19. Proteína de unión al ADN StpA
-

Figura 3.2.9.D. “Spots” escindidos de los geles de 2 dimensiones (A, B y C) en los que aparecen remarcados junto a su número de referencia, e identificados mediante Maldi-Tof /Q-Tof.

3.2.4.3.- Relación de proteínas identificadas que muestran un nivel de expresión diferente en las cepas portadoras del plásmido pBRStpA con respecto a la cepa salvaje W22703

La identificación de algunas de las proteínas cuya expresión se ve modificada en presencia del plásmido pBRStpA permitió establecer una hipótesis acerca del motivo de la alteración fisiológica observada en estas cepas. En la tabla 3.2.2. se indica de forma esquemática la función de algunas de estas proteínas. Algunas de ellas están relacionadas, de forma más o menos directa, con la virulencia, como la adhesina Ail, la ferritina o la proteína reguladora RovA, que ha sido la primera proteína referenciada en *Yersinia* cuya expresión se encuentra regulada por H-NS (Heroven *et al.*, 2004). Otras proteínas afectadas están implicadas en el metabolismo celular, ya sea en vías biosintéticas como la orotato fosforibosiltransferasa o la disulfuro isomerasa I, en vías catabólicas como la UTP-glucosa-1-fosfato uridilil transferasa o en vías anfibólicas como los enzimas del ciclo de Krebs succinato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa. Una alteración en enzimas clave del ciclo de Krebs, entre otras modificaciones en otros enzimas, puede justificar las alteraciones fisiológicas que sufre la cepa W22703 cuando expresa la proteína StpA.

Tabla 3.2.2. Proteínas cuya expresión se ve alterada en presencia del plásmido pBRStpA, tanto en la cepa W22703 como en la cepa W22703H.

Proteína	Gen	función
Adhesina Ail	<i>ail</i>	Factor de resistencia al suero y adherencia celular
UTP-glucosa-1-fosfato uridilil transferasa	<i>galF</i>	Metabolismo glucídico
Disulfuro isomerasa I	<i>dsbA</i>	Biosíntesis de Citocromo C
Orotato fosforibosil transferasa	<i>pyrE</i>	Biosíntesis de pirimidinas
Subunidad gamma de Ureasa	<i>ureA</i>	Catabolismo de la urea
ARNasa PH	<i>rph</i>	Actividad ARNasa
Purina nucleósido fosforilasa	<i>deoD</i>	Biosíntesis de purinas
Proteína ribosomal S10	<i>rps10</i>	Subunidad ribosomal
Represor arginina	<i>argR</i>	Regulación de la biosíntesis de arginina
Ferritina	<i>ftnA</i>	Metabolismo del hierro
Probable proteína de choque frío	<i>y1165</i>	Proteína de unión al ADN
Regulador RovA	<i>rovA</i>	Regulador transcripcional
Malato deshidrogenasa	<i>mdh</i>	Enzima del ciclo de Krebs
Tioredoxina I	<i>trxA2</i>	Transportador de electrones
Subunidad flavoproteína de la succinato deshidrogenasa	<i>sdhA</i>	Enzima del ciclo de Krebs

Únicamente cuatro de los “spots” identificados (tabla 3.2.3.) deben la alteración en sus niveles de expresión a la ausencia de la proteína H-NS. La única proteína identificada cuya expresión se indujo en el mutante *hns* en relación a la cepa W22703 (pBRStpA) fue StpA, cuya sobreexpresión ya ha sido descrita en mutantes *hns* de *E. coli* (Sonnenfield *et al.*, 2001).

Tabla 3.2.3. Proteínas cuya expresión se ve alterada por ausencia de la proteína H-NS.

Proteína	Gen	Función
6,7-dimetil-8-ribillumazina sintasa	<i>ribH</i>	Biosíntesis riboflavina
Chaperonina 10KDa	<i>groS</i>	Plegamiento de proteínas
Transportador de grupos hemino	<i>hemS</i>	Transportador de grupos hemino
StpA	<i>stpA</i>	Regulador transcripcional

En paralelo a la obtención de estos resultados fueron publicados dos estudios de transcriptómica realizados sobre el efecto en el patrón de expresión génica de *Yersinia pestis* de la transición de la temperatura de crecimiento de 26° C a 37° C (Han *et al.*, 2004; Motin *et al.*, 2004). Muchas de las proteínas que se identifican en esta memoria como afectadas por la presencia del plásmido pBRStpA corresponden a genes identificados en estos trabajos como afectados por la transición de temperatura de 26° C a 37° C. En la tabla 3.2.4. se indica el efecto de la presencia de pBRStpA observado en nuestros estudios de proteómica, ya sea en un fondo genético *hns*⁺ o *hns*, y el efecto sobre la expresión de esos genes observado en los trabajos mencionados anteriormente.

Tabla 3.2.4. Relación de genes afectados por la presencia del plásmido pBRStpA en las cepas W22703 y W22703H. Se indica la relación de la expresión de dichos genes con la regulación por H-NS o con la transición de 25° C a 37° C en *Y. pestis*.

Proteína	N° de identificación (figura 3.2.8)	Efecto de la presencia de la proteína StpA	Efecto específico de la mutación <i>hns</i> en presencia de StpA	Efectos sobre la expresión previamente referenciados
Adhesina, proteína Ail	1	Represión	-	Inducción a 37° C en <i>Y. pestis</i> (Motin <i>et al.</i> , 2004)
Proteína Galf (UTP-glc-1-fosfato uridilil transferasa)	2	Represión	-	
Hipotética proteína YPO2383	3	Represión	-	
Disulfuro isomerasa I	4	Represión	-	Proteína de intercambio tiol:disulfuro DsbE está reprimida a 37° C en <i>Y. pestis</i> (Han <i>et al.</i> , 2004)
Orotato fosforibosiltransferasa	5	Represión	-	Represión a 37° C en <i>Y. pestis</i> (Han <i>et al.</i> , 2004)
Subunidad gamma de la Ureasa	6	Represión	-	Represión a 37° C en <i>Y. pestis</i> (Han <i>et al.</i> , 2004; Motin <i>et al.</i> , 2004)
ARNasa PH	7	Represión	-	La ribonucleasa BN y ribonucleasa P están reprimidas a 37° C en <i>Y. pestis</i> (Motin <i>et al.</i> , 2004)
Purina nucleosido fosforilasa	8	Represión	-	
Proteína ribosomal S10	9	Represión	-	Varias proteínas ribosomales están reprimidas a 37° C en <i>Y. pestis</i> (Han <i>et al.</i> , 2004; Motin <i>et al.</i> , 2004)
Represor Arginina	10	Represión	-	La vía biosintética de la arginina está inducida a 37° C en <i>Y. pestis</i> (Han <i>et al.</i> , 2004)
Ferritina	11	Represión	-	La bacterioferritina está reprimida a 37° C en <i>Y. pestis</i> (Motin <i>et al.</i> , 2004)
Probable proteína de choque frío	12	Represión	-	
Regulador transcripcional RovA	13	Represión	-	El único gen de <i>Yersinia</i> publicado que es reprimido por H-NS (Heroven <i>et al.</i> , 2004)
Malato deshidrogenasa	14	Represión	-	Represión a 37° C en <i>Y. pestis</i> (Han <i>et al.</i> , 2004)
Tioredoxina 1	15	Inducción	-	
6,7-dimetil-8-ribitillumazina sintasa	16	-	Represión	
Chaperonina 10 kDa	17	-	Represión	Varias chaperoninas están inducidas a 37° C en <i>Y. pestis</i> (Han <i>et al.</i> , 2004; Motin <i>et al.</i> , 2004)
Transportador de grupos hemino	18	-	Represión	
Proteína de unión al ADN StpA	19	-	Inducción	
Succinato deshidrogenasa	*	Inducción	-	Inducida a 37° C en <i>Y. pestis</i> (Motin <i>et al.</i> , 2004)

* identificada en electroforesis monodimensional.

3.2.5.- ANÁLISIS POR RT-PCR DE LA EXPRESIÓN DE GENES CUYOS PRODUCTOS GÉNICOS MUESTRAN UN NIVEL DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN PRESENCIA DEL PLÁSMIDO pBRStpA

Para corroborar los datos obtenidos a nivel proteómico sobre la alteración producida por la presencia del plásmido pBRStpA en *Y. enterocolitica* W22703, se realizaron estudios a nivel transcripcional mediante RT-PCR de algunos de los genes cuya expresión se había visto alterada. En el momento de la realización de este análisis transcripcional, *Y. enterocolitica* solo había sido secuenciada parcialmente, por lo que el diseño de la mayoría de los oligonucleóticos se llevó a cabo a partir de otras especies del género *Yersinia* ya secuenciadas en su totalidad o *E. coli* K12. En la tabla 3.2.5. se indica la secuencia de los oligonucleótidos diseñados para cada gen. Con el fin de comprobar si el diseño de los oligonucleótidos era el adecuado, se realizó una amplificación de los correspondientes genes utilizando como molde la cepa W22703. El resultado de esta amplificación por PCR se muestra en la tabla 3.2.6., en la que se observa que únicamente se obtuvo amplificación por PCR de 4 de los genes para los que habíamos diseñado oligonucleótidos (*ail*, *galF*, *mdh* y el control ARNr 16S). Posteriormente, tampoco se consiguió amplificar por RT-PCR ninguno de los genes con los que no habíamos obtenido amplificación por PCR.

Tabla 3.2.5. Oligonucleótidos diseñados para el análisis por RT-PCR.

Oligont.	Secuencia 5'— 3'	Oligont.	Secuencia 5'— 3'
ribH-5'	TTATCGAAGGTGTTGTTGCT	sdhA-5'	AGCGATTCTGGAACCTCGAA
ribH-3'	CCTTTAATAGCTTTGATTACAT	sdhA-3'	TCGCCATGTTTGTTTCAGCA
ail-5'	AAGACATAACTAACTAGTTCTT	mdh-5'	GATATTGTGCTGATTTCTGC
ail-3'	AAGCGTCAATGACAAAATTTG	mdh-3'	TTCAACAACATTGCTTTCCACC
galF-5'	AAATGAAAGCAGTCATTCCA	trxA2-5'	GAGCGATAAAATTATTCACCT
galF-3'	GTAGTTAGATAATGCCTGTC	trxA2-3'	GATTTGCATCCAAGAACGC
pyrE-5'	GTTTATCGAGTTTGCGCTTA	argR-5'	CAAAGCAAGAAGATCTTATCA
pyrE-3'	ACTTCCTGAATCGCCGAAA	argR-3'	AGCTCTTGTTTCGAATAGCC
deoD-5'	GTTTATTGCAGAACTTTTCTT	YE16S-5'	TGAGTAATGTCTGGGAAACT
deoD-3'	TGCCGTATTTTCCATCACAT	YE16S-3'	TTCTTCTGCGAGTAACGTC

Tabla 3.2.6. Información sobre las secuencias utilizadas para el diseño de oligonucleótidos, así como el resultado de la PCR realizada utilizando como molde la cepa W22703.

Gen	Nº identificación NCBI	Especie	PCR
<i>ribH</i>	1175997	<i>Y. pestis</i> CO92	–
<i>ail</i>	38198183	<i>Y. enterocolitica</i>	+
<i>galF</i>	46019527	<i>Y. enterocolitica</i>	+
<i>pyrE</i>	1145043	<i>Y. pestis</i> KIM	–
<i>deoD</i>	2955453	<i>Y. pseudotuberculosis</i> IP32953	–
<i>sdhA</i>	146199	<i>E. coli</i> K12	–
<i>mdh</i>	276493	<i>Y. pestis</i> biovar Medievalis srt. 91001	+
<i>trxA2</i>	2766241	<i>Y. pestis</i> biovar Medievalis srt. 91001	–
<i>argR</i>	2764879	<i>Y. pestis</i> biovar Medievalis srt. 91001	–
ARNr 16S	967123	<i>Y. enterocolitica</i>	+

Con la finalidad de analizar mediante RT-PCR el nivel de transcripción de los genes *ail*, *galF* y *mdh*, se aisló el ARN celular total (apartado 2.6.1.) de las cepas W22703, W22703 pBRStpA y W22703H pBRStpA en las mismas condiciones de cultivo en las que se habían obtenido los extractos para los geles de dos dimensiones (crecimiento en medio LB a 30° C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,6). Tras el tratamiento con ADNasa I (apartado 2.6.4.1.) y la cuantificación espectrofotométrica del ARN (apartado 2.6.2.), se llevó a cabo el análisis semicuantitativo del ARN mediante RT-PCR (apartado 2.6.4.2.) estableciendo previamente las concentraciones de ARN apropiadas en cada caso que no saturasen la reacción de amplificación; para el gen *ail*, esta cantidad de ARN fue de 0,1 ng, para *galF* y *mdh* 100 ng y para el gen que codifica el ARNr 16S fue de 0,5 ng. Además, se realizó un control de la ausencia de ADN mediante inactivación de la retrotranscriptasa por incubación a 95° C durante 10 minutos, y un control interno por retrotranscripción del gen que codifica el ARNr 16S para comprobar la calidad del ARN. En todos los casos, la temperatura de hibridación utilizada fue de 52° C.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.2.10. Pudo observarse una transcripción diferencial de los genes *ail* y *galF*, cuya expresión se ve reprimida en las cepas portadoras del plásmido pBRStpA en relación a la cepa salvaje W22703,

corroborando de esta forma los resultados obtenidos mediante electroforesis bidimensional. El resultado del análisis por RT-PCR del gen *mdh* no permitió sacar conclusiones por la aparición en la cepa W22703, además de la banda esperada de 518 pares de bases, de una banda inespecífica de un tamaño algo superior a 400 pares de bases.

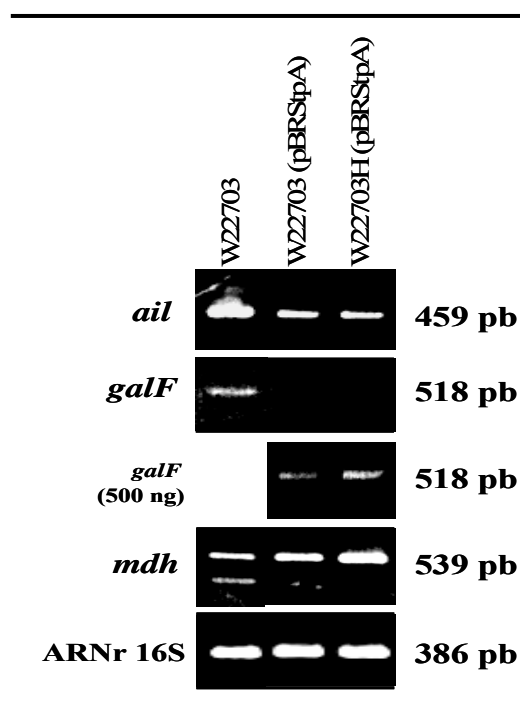


Figura 3.2.10. Resultado del análisis por RT-PCR. La presencia del transcrito del gen *galF* en las cepas portadoras del plásmido pBRStpA se comprobó aumentando la cantidad de ARN molde a 500 ng.

3.2.6.- SELECCIÓN DE MUTANTES *hns* EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

Como ya habíamos mencionado en el apartado 3.2.1., la cepa de *Y. enterocolitica* W22703SR18 es un merodiploide que presenta una copia salvaje y una copia no funcional del gen *hns*, y la obtención a partir de esta cepa de un clon que únicamente presenta el alelo mutante en el cromosoma sólo es posible si previamente se complementa en *trans* la mutación mediante un plásmido portador de un gen de la familia *hns*.

Considerando los datos obtenidos a nivel de expresión proteica en las cepas de *Y. enterocolitica* que contienen el plásmido pBRStpA y si, como hipótesis, consideramos que la presencia de la proteína StpA altera de alguna forma la expresión

de proteínas reguladas por H-NS en *Y. enterocolitica* y que H-NS modula la expresión de enzimas implicados en vías metabólicas centrales y/o biosintéticas, se planteó la posibilidad de diseñar un medio de cultivo en el que se suministrasen factores de crecimiento y diferentes tipos de fuentes de carbono y energía con el fin de suplementar hipotéticos defectos metabólicos y/o biosintéticos causados por la ausencia de proteína H-NS.

Para ello los medios que se plantearon fueron:

- 1) MM-glc-precursos, cuya base era el medio mínimo M63 (apartado 2.2.1.) con glucosa (4 g/l) suplementado con los precursores biosintéticos α -cetoglutarato, oxalacetato y succinato a una concentración de 2 g/l. Como fuente de vitaminas y factores de crecimiento se añadió 1 g/l de extracto de levadura.
- 2) MM-acetato, cuya base era el medio mínimo M63 con fuente de carbono acetato (4 g/l) suplementado con 1 g/l de extracto de levadura.
- 3) BHI

En el primero de los medios se suministra, además de la glucosa, los metabolitos precursores α -cetoglutarato, succinato y oxalacetato. A efectos biosintéticos, la presencia de estos metabolitos podría contrarrestar la existencia de un TCA parcial o totalmente no funcional. En este modelo, la célula podría obtener ATP simplemente por la vía glucolítica, rindiendo parte de los precursores biosintéticos la propia glucólisis e incorporando el resto del medio.

El segundo medio contempla la posibilidad de que el mutante *hns* presente un ciclo del glioxilato funcional.

La tercera aproximación consistió en utilizar un medio muy rico como el BHI (caldo de corazón y cerebro, apartado 2.2.1.).

Cultivos de la cepa W22703SR18 crecidos durante toda la noche a 30° C en los medios referidos anteriormente y suplementados con el antibiótico estreptomycin, sirvieron de inóculo en medio fresco suplementado con el mismo antibiótico. Estos cultivos fueron incubados a 25° C, 30° C y 37° C hasta alcanzar una DO_{600} aproximada de 0,4, momento en que se plaquearon en el mismo medio sólido suplementado con

estreptomycin y sacarosa (5 %) y se incubaron a la misma temperatura en la que se había incubado el cultivo líquido de partida.

A partir de cada colonia obtenida en cada uno de los medios y en cada una de las temperaturas de incubación, se realizaron estrías en presencia / ausencia del antibiótico cloranfenicol. Las colonias que mostraron resistencia a cloranfenicol eran mutantes espontáneos en el gen *sacB*, por lo que, aún con el plásmido integrado en su cromosoma, eran insensibles a la presencia de sacarosa. Esta situación ya ha sido descrita en el caso de genes esenciales (Brown *et al.*, 1995). Las colonias sensibles a cloranfenicol (células en las que se había producido la escisión del plásmido) fueron analizadas por PCR para comprobar la presencia del casete que otorga resistencia a estreptomycin en la única copia de *hns* presente en su genoma. Se utilizaron los oligonucleótidos HNSYER y HNSYEF (tabla 3.2.7.) y una temperatura de hibridación de 54° C. La amplificación con estos oligonucleótidos genera una banda de 486 pares de bases si el molde es la forma salvaje del gen *hns* y una banda de 1.600 pares de bases si lo que se amplifica es la copia mutante que presenta insertado el casete que otorga resistencia a estreptomycin.

Tabla 3.2.7. Oligonucleótidos utilizados para comprobar la mutación *hns*.

Oligonucleótido	Secuencia 5'— 3'
HNSYEF	GCACTCTATTATTATCCAGAC
HNSYER	GCTAATTA ACTATCACGATTAC

Un elevado número de colonias que mostraron sensibilidad a cloranfenicol, para cada uno de los medios y para cada temperatura, fueron analizadas por PCR mostrando todas ellas la presencia única de la copia salvaje del gen *hns*. Todas las colonias analizadas eran mutantes espontáneos resistentes a estreptomycin.

Por tanto, esta aproximación utilizando distintos medios de cultivo tampoco permitió obtener mutantes *hns* cromosómicos.

3.2.7.- ANÁLISIS DEL MECANISMO POR EL QUE EL PLÁSMIDO pBRStpA ALTERA LA FISIOLOGÍA DE *Y. enterocolitica*

3.2.7.1.- Niveles de expresión de la proteína H-NS a 25° C y 37° C

Muchos de los genes cuya expresión se ve afectada por la expresión de la proteína StpA en la cepa W22703 de *Y. enterocolitica* se corresponden tanto con genes cuya regulación por la proteína H-NS es conocida en bacterias entéricas como con genes cuya expresión se encuentra termorregulada en *Y. pestis*. En un primer momento se hipotetizó que los niveles de H-NS podrían incrementarse cuando se produce una transición en la temperatura de crecimiento de *Yersinia* de 25° C a 37° C y que la expresión ectópica de StpA podría mimetizar el efecto de un incremento en la concentración intracelular de H-NS. Por este motivo, se decidió analizar mediante inmunodetección los niveles en distintas fases del crecimiento de la proteína H-NS en la cepa W22703 crecida a 25° C y 37° C en medio LB. Tal y como se muestra en la figura 3.2.11., los niveles de H-NS no se ven afectados de forma significativa en función de la fase de crecimiento, algo que ya ha sido referenciado en *E. coli* (Free y Dorman, 1995). Tampoco se observa un efecto significativo dependiente de temperatura en los niveles de H-NS, incluso se observa una ligera disminución de estos niveles en cultivos crecidos a 37° C en relación a cultivos crecidos a 25° C, por lo que la alteración producida por la proteína StpA en *Y. enterocolitica* W22703 no puede ser explicada simplemente en base a que la presencia de la misma representase mayores niveles de proteína H-NS.

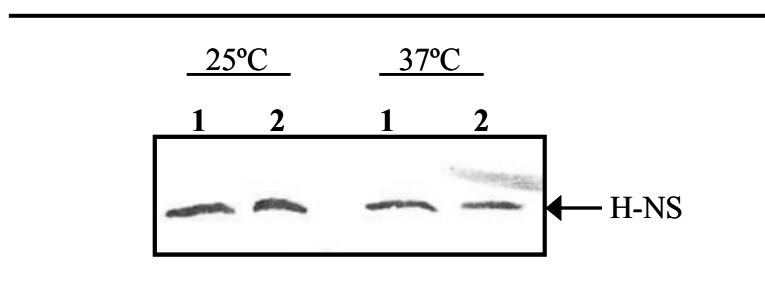


Figura 3.2.11. Inmunodetección de la proteína H-NS en extractos totales obtenidos a partir de cultivos de la cepa W22703 crecidos en medio LB a 25° C y 37° C. 1, cultivos en fase exponencial; 2, cultivos en fase estacionaria temprana.

3.2.7.2.- Niveles de expresión de la proteína YmoA a 25° C y 37° C

Una vez comprobado que los niveles de la proteína H-NS no se ven afectados de manera significativa en la transición de una temperatura de crecimiento de 25° C a 37° C, se decidió analizar de la misma forma los niveles de la proteína YmoA. Tal y como se ha mencionado en el apartado 1.4.3.1., la proteína YmoA juega un importante papel en la termorregulación de la expresión de diferentes factores de virulencia en *Y. enterocolitica* (Cornelis *et al.*, 1991) y es capaz de interaccionar con proteínas de la familia H-NS (Nieto *et al.*, 2002). Para el análisis mediante inmunodetección de los niveles de proteína YmoA de estos extractos, se utilizaron anticuerpos anti Hha, que reconocen también de forma específica la proteína YmoA (Balsalobre *et al.*, 1996). Tal y como se observa en la figura 3.2.12., los niveles de YmoA decrecen ligeramente en el crecimiento realizado a 37° C, resultado que viene corroborado por estudios realizados en *Y. pestis* que muestran la existencia de un proceso de proteólisis dependiente de la temperatura que afecta a la proteína YmoA a 37° C (Jackson *et al.*, 2004).

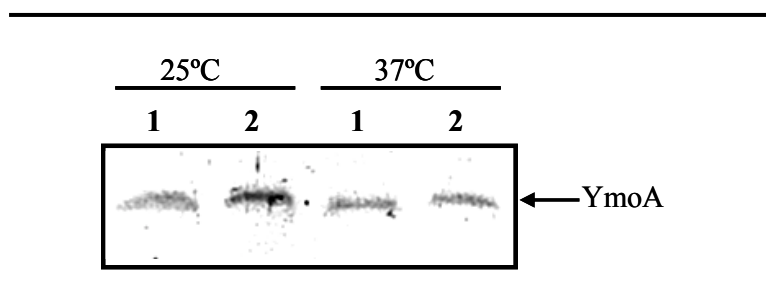


Figura 3.2.12. Inmunodetección de la proteína YmoA en extractos totales obtenidos a partir de cultivos de la cepa W22703 crecidos en medio LB a 25° C y 37° C. 1, fase exponencial; 2, fase estacionaria temprana.

3.2.7.3.- Expresión de los genes *ymoA* y *hns* en presencia del plásmido pBRStpA

El hecho de que los niveles de la proteína H-NS en la cepa W22703 no se ven significativamente afectados ni por la tasa de crecimiento ni por la temperatura de incubación nos llevó a buscar una hipótesis alternativa para explicar el efecto del plásmido pBRStpA en la fisiología de *Y. enterocolitica*. Se consideró la posibilidad de

que la proteína StpA pudiera modificar de alguna forma la expresión tanto del gen *ymoA* como del gen *hns* de *Y. enterocolitica*. La regulación cruzada entre las proteínas H-NS – StpA y H-NS – Hha, es un fenómeno que ya ha sido descrito en *E. coli* (Zhang *et al.*, 1996; Free y Dorman, 1997; Paytubi *et al.*, 2004). Por este motivo, se analizaron mediante RT-PCR los niveles de transcripción de los genes *ymoA* y *hns* en las cepas W22703, W22703 (pBR322) y W22703 (pBRStpA). Para ello, se diseñaron las parejas de oligonucleótidos HNS-YE-RT / HNS-YE-PCR e YMOA-RT / YMOA-PCR (tabla 3.2.8.). El aislamiento del ARN total se realizó a partir de cultivos de estas cepas en medio LB a 30° C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,6. El procedimiento llevado a cabo fue idéntico al descrito en el apartado 3.2.5. y la cantidad de ARN utilizada en la retrotranscripción fue de 0,25 ng para el gen *ymoA* y 0,5 ng para el gen *hns*. La calidad de los aislamientos de ARN fue comprobada mediante retrotranscripción del gen que codifica el ARNr 16S (los oligonucleótidos YE 16S-5' y YE 16S-3' se indican en la tabla 3.2.5.). La temperatura de hibridación utilizada fue de 52° C.

En la figura 3.2.13. se puede comprobar cómo la presencia de StpA reprime de forma muy significativa la expresión de los genes *ymoA* y *hns*.

Tabla 3.2.8. Oligonucleótidos utilizados para el análisis por RT-PCR de los genes *hns* e *ymoA*.

Oligonucleótido	Secuencia 5'— 3'
HNS-YE-RT	AGCGGCTTTAGTAACTGCCA
HNS-YE-PCR	ATGAGCGAAGCGTTAAAGAT
YMOA-RT	ACATGTTGCCATACAGTAGG
YMOA-PCR	AAACTGACTACCTGATGCGT

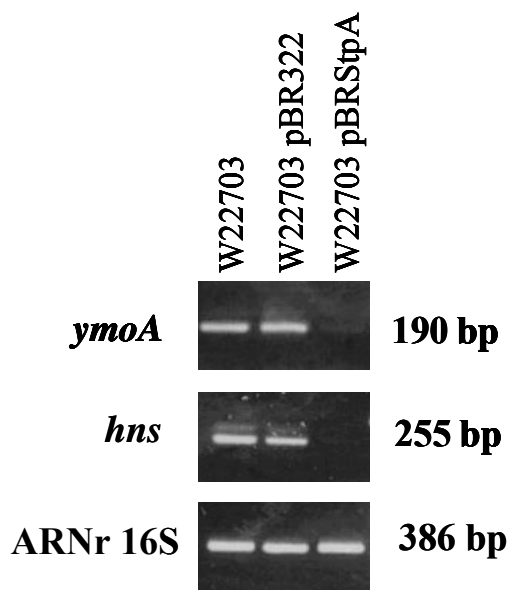


Figura 3.2.13. Resultado del análisis por RT-PCR de los genes *ymoA* y *hns* en las cepas de *Y. enterocolitica* W22703, W22703 (pBR322) y W22703H (pBRStpA).

Para corroborar los datos obtenidos a nivel transcripcional, se analizaron mediante inmunodetección los niveles de la proteína YmoA de las cepas W22703, W22711 (*ymoA*) y W22703 (pBRStpA). La inmunodetección de la proteína H-NS no fue posible debido a que los anticuerpos utilizados a tal efecto también reconocen la proteína StpA. Se obtuvieron extractos proteicos totales mediante disrupción celular por ultrasonidos a partir de cultivos de las cepas mencionadas crecidos en medio LB a 30° C hasta alcanzar una DO_{600} de 0,6. La cepa mutante *ymoA* W22711 de *Y. enterocolitica* se utilizó en este experimento como control negativo. En la figura 3.2.14. se puede comprobar como los niveles de YmoA se reducen de forma significativa cuando el plásmido pBRStpA es introducido en la cepa W22703, lo que ratifica los datos obtenidos mediante análisis por RT-PCR.

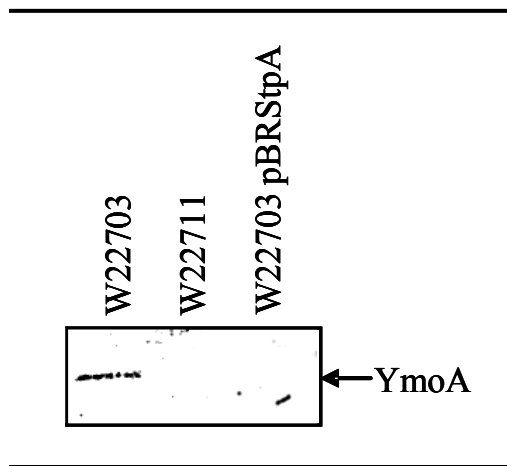


Figura 3.2.14. Inmunodetección de la proteína YmoA en extractos totales obtenidos a partir de crecimientos en medio LB a 30° C de distintas cepas de *Y. enterocolitica*

3.2.7.4.- Efecto de un incremento de la concentración intracelular de la proteína H-NS en la cepa W22703

Los resultados referidos anteriormente sugieren que la represión de la expresión de los genes *ymoA* y *hns* por la proteína StpA puede ser total o en parte responsable de las alteraciones fisiológicas que sufre la cepa W22703 (pBRStpA) y por tanto, adjudican un papel regulador central a las proteínas YmoA y H-NS en *Y. enterocolitica*. Por otro lado, estos datos también sugieren que si se incrementa la concentración de H-NS, se reprime la expresión de *ymoA*. Por este motivo, se decidió comprobar la represión que se produce de la expresión del gen *ymoA* mediante la utilización de un sistema que permite modular la concentración de la proteína H-NS en *Y. enterocolitica*. Para ello, se introdujo mediante conjugación (apartado 2.4.2.) en la cepa W22703 el plásmido pJOB101-Km a partir de la cepa de *E. coli* S17-1. Este plásmido presenta clonado el gen *hns* de *E. coli* bajo un promotor inducible con IPTG. Se realizaron curvas de crecimiento en medio LB a 30° C y 37° C con las cepas W22703 y W22703 (pJOB101-Km), sin inducir e induciendo la expresión de *hns* con 10 μ M y 50 μ M de IPTG. En la figura 3.2.15. se muestran estas curvas de crecimiento, en las que podemos observar cómo el incremento de la concentración del inductor del sistema genera una disminución en la tasa de crecimiento, efecto que se hace más patente a 37° C que a 30° C, de igual forma que sucede en el sistema W22703 (pBRStpA).

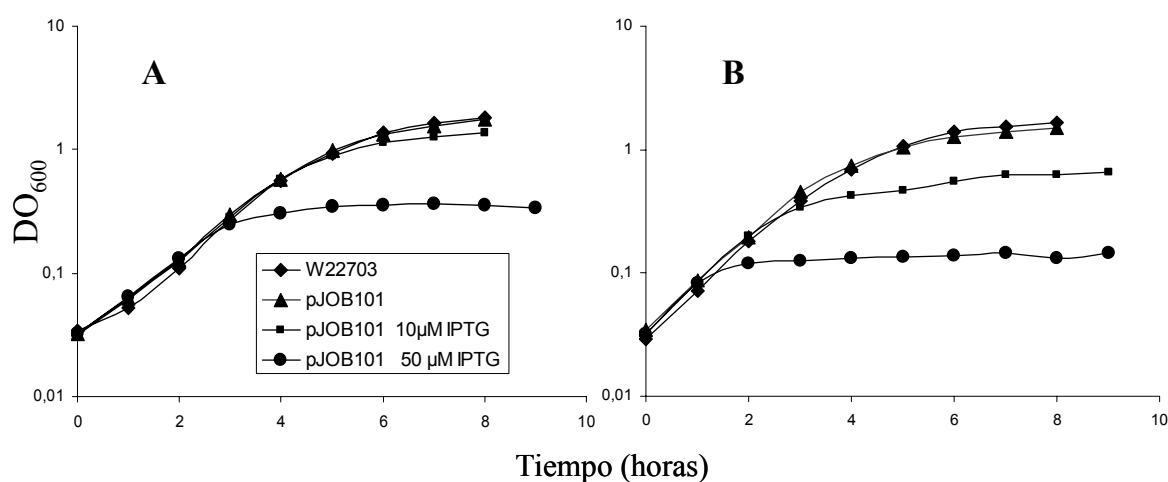


Figura 3.2.15. Crecimiento de las cepas W22703 y W22703 (pJOB101-Km) sin inducir e inducidas con 10 μ M y 50 μ M de IPTG, en medio LB a 30° C (A) y 37° C (B).

Para confirmar que existe una correlación entre la inducción del sistema con IPTG y los niveles de proteína H-NS expresados, se realizó una inmunodetección de H-NS en extractos proteicos totales de las cepas W22703 y W22703 (pJOB101-Km), sin inducir e inducidas con 10 μ M y 50 μ M, crecidas en medio LB a 30° C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,3. Como se puede observar en la figura 3.2.16., se produce un incremento de los niveles de la proteína H-NS en la cepa que contiene el plásmido pJOB101-Km en relación a la cepa parental W22703, incremento que también se produce al aumentar la concentración del inductor IPTG en el cultivo.

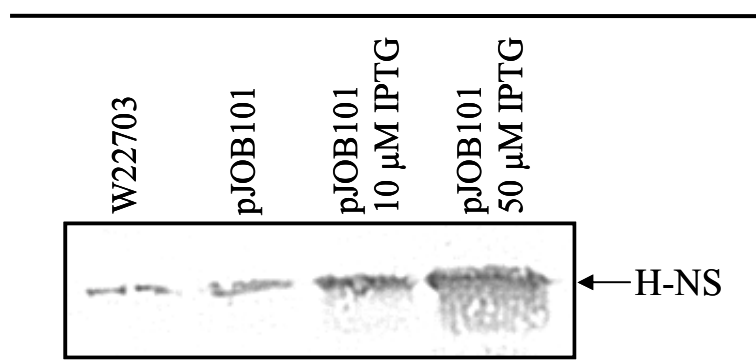


Figura 3.2.16. Inmunodetección en la proteína H-NS en extractos totales obtenidos a partir de crecimientos de las cepas W22703 y W22703 (pJOB101-Km), sin inducir e inducidos con 10 μ M y 50 μ M de IPTG.

A continuación, se determinó si el incremento en la concentración de H-NS afecta a la expresión de gen *ymoA*. Para ello, se realizó un estudio de la transcripción del gen *ymoA* por RT-PCR a partir de aislamientos de ARN total de cultivos de las cepas W22703 y W22703 (pJOB101-Km), sin inducir e inducidos con 10 μM y 50 μM de IPTG, en medio LB a 30° C hasta alcanzar una DO_{600} aproximada de 0,3. Se tomó este valor de DO_{600} para la realización de los aislamientos de ARN debido a que era el valor máximo de crecimiento de la cepa W22703 (pJOB101-Km) inducida con 50 μM de IPTG. El procedimiento utilizado fue idéntico al descrito en el apartado 3.2.5. Los oligonucleótidos YMOA-RT / YMOA-PCR se indican en la tabla 3.2.8. y la cantidad de ARN utilizada para la retrotranscripción del gen *ymoA* fue de 0,5 ng. La calidad de los aislamientos de ARN fue comprobada mediante retrotranscripción del gen que codifica el ARNr 16S (los oligonucleótidos YE 16S-5' y YE 16S-3' se indican en la tabla 3.2.5.). En la figura 3.2.17. se muestra el resultado de la RT-PCR, en la que se observa una correlación entre la disminución de la transcripción del gen *ymoA* y el aumento de la concentración de la proteína H-NS.

Finalmente, decidimos comprobar si la sobreexpresión de la proteína H-NS modifica la expresión de los genes *ail* y *galF*, cuya transcripción ya habíamos comprobado que se veía afectada por la presencia del plásmido pBRStpA (apartado 3.2.5.). Para ello, se utilizaron los mismos aislamientos de ARN con los que se comprobó la transcripción del gen *ymoA* en las cepas W22703 y W22703 (pJOB101-Km), sin inducir e inducidas con 10 μM y 50 μM de IPTG. El procedimiento utilizado fue idéntico al descrito en el apartado 3.2.5., los oligonucleótidos *ail*-5' / *ail*-3' y *galF*-5' / *galF*-3' se indican en la tabla 3.2.5. y la cantidad de ARN utilizada para la retrotranscripción fue de 0,1 ng para el gen *ail* y 25 ng para el gen *galF*. Como se puede observar en la figura 3.2.17., de igual forma que ocurre con el gen *ymoA*, el aumento de la concentración de H-NS resulta en una disminución de la expresión de los genes *ail* y *galF*, lo que nos da a entender que la presencia del plásmido pBRStpA en la cepa W22703 es equivalente a un incremento en los niveles de la proteína H-NS.

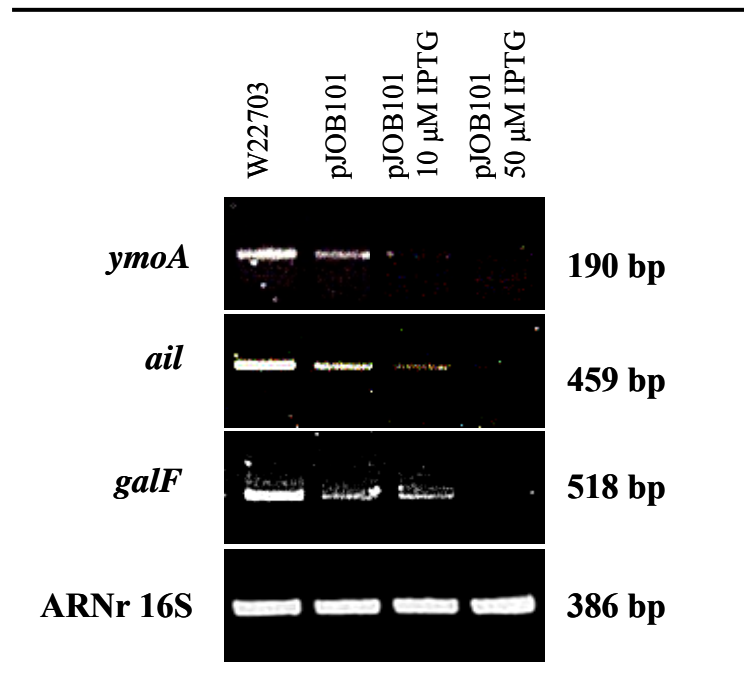


Figura 3.2.17. Resultado del análisis por RT-PCR de los genes *ymoA*, *ail* y *galF* en las cepas de *Y. enterocolitica* W22703 y W22703 (pJOB101-Km), sin inducir e inducidas con 10 μ M y 50 μ M de IPTG.