







**Facultat de Biologia**

**Departament de Microbiologia**

**Les famílies de proteïnes Hha/YmoA i H-NS: regulació global de l'expressió gènica a *Escherichia coli* i paper en la conjugació plasmídica.**

Programa de Doctorat: Microbiologia Ambiental i Biotecnologia (2001-2003).

Conformitat de la directora de tesi,

Memòria presentada per la Núria Forns Fradera per optar al títol de Doctor per la Universitat de Barcelona.

Dra. Cristina Madrid Xufré

Núria Forns Fradera

**Barcelona, abril 2006**





UNIVERSITAT DE BARCELONA

U

B

**Facultat de Biologia**

**Departament de Microbiologia**

**Les famílies de proteïnes Hha/YmoA i H-NS: regulació global de  
l'expressió gènica a *Escherichia coli* i paper en la conjugació plasmídica.**

**Núria Forns Fradera**

**Tesi Doctoral**

**Barcelona, abril 2006**



En aquests moments, després de la realització d'aquesta memòria, només em queda agrair a tota la gent que m'ha ajudat tant científicament com personalment en aquesta etapa d'aprenentatge. Primer de tot agrair a la Cristina Madrid el fet d'haver dirigit la meva tesi i sobretot haver-me ensenyat des del primer dia totes les tècniques i com desenvolupar-me dins un laboratori. He tingut una gran sort ja que a més de ser una gran científica també és una gran persona amb la que he pogut comptar sempre. Agraeixo la oportunitat que em va donar l'Antonio Juárez d'entrar en el seu grup d'investigació i d'haver estat també un guia en la meva tesi, sempre pensant una mica més enllà.

Faig una menció especial a la Josefina Martínez que em va ajudar en l'experiment de l'activitat  $\alpha$ -glucosidasa per fluorimetria, i que sempre va ser una companyia molt agradable. També agrair al José M<sup>a</sup> Nieto els seus bons consells.

Han estat més de cinc anys passats al departament de Microbiologia que els recordaré sempre amb molta estima i com una època molt bona de la meva vida, per tot el que he après però sobretot per la gent que en forma part: tant la gent del meu laboratori com per la gent de la resta del departament.

Recordaré sempre a la gent que ha passat pel lab. 4 i que ja no hi són: la Paytu (que sempre es pot comptar amb ella), la Eva, la Eli, la Sonia R. (la millor companya de poiata de sempre i amiga). Com no nombrar als meus últims companys de laboratori: el Jorge (tot i tenir molt morro, es fa estimar), la Sonia A. (callada però molt maca), l'Aitziber (xerraire però sap escoltar), el Carles i les últimes adquisicions del grup, el Juanda i la Laura. "Bueno", i no m'oblidaré de la Rosa i el Nacho, que diria que sempre han estat amb mi al laboratori: a la Rosa, que a més d'agrar-li tota la feina que em va treure de sobre amb les RTs de R27, també agrair-li que hagi estat sempre l'alegria del laboratori; i al Nacho que sempre es pot comptar amb ell (per xerrar una estona com per la feina del lab.), a part d'haver rigut molt amb les seves historietes de la vida. He passat moments molt agradables amb tots vosaltes.

Guardaré també molts bons records de la resta de gent del departament que han fet més amenes les hores de feina i sobretot pels sopars i les farres que s'han organitzat. Al laboratori del Guerrero, la Laura i el Javi, que tot i estar sols s'han espavilat molt bé. Al laboratori 2 sempre amb molta gent: Marga, Núria, Marta les més veteranes; Oscar i Cristian inseparables (almenys fins que no va arribar la Laura a la vida del Cristian) i que ara són per mi més que companys, són amics. El Pere, que tot i ser tot un personatge, és molt bona persona. La Cristina, tot un exemple de noia a seguir, la Yulia, i tots els nous: Arnau, Nicolía, Noelia.

Al laboratori 5, que abans estava menys poblat i que sempre els havia vist com uns grans científics, sobretot pel Marc, el Jordi, el Quim i el Jorge. Ara les noies li han donat més alegria: la Lida, la Míriam i la Núria. A més, no cal dir que al lab 5 hi tinc els companys d'excursions: Marc, Quim (amb la Marta) i Jordi.

Crec que el laboratori 6 és el que no conserva cap de les persones que hi havia quan vaig entrar al departament, però de totes en tindré un gran record: Susana, Glòria, Cristina, i sobretot Santi (company de l'hora de dinar, que es pot dir que quasi el considero del meu lab.) i el Xavi A. També recordar a tots els nous: Mari, Lluís, Unai, Núria i Cristina que he tingut la ocasió de coneixe'ls millor sobretot en el sopars de departament i potser els impulsors de la moda del alcoholímetre...

Tot i no haver-hi tingut tanta relació, també recordaré de manera especial a tots els de la fase 2, sobretot a la Natàlia, Rocío, Ale, Néstor, Carles, Sílvia, Pili Eli i Cristina. Em sembla que em deixo algú..... no?

Agrair també als meus pares haver-me motivat a estudiar i sobretot haver-me deixat escollir el meu camí. Un record a les meves germanes, amb qui he pogut comptar sempre, també pel Joan Carles i per l'Adrià (l'alegria de la família). Mercè, gràcies per aquesta tapa tan guapa que m'has fet.

Ara me'n recordo de qui m'havia oblidat, del Xavi. Per tu tenia un motiu més (i molt important) per anar a treballar cada dia. Gràcies per haver-ho donat tot per mi.



# ÍNDIX

<b>1. INTRODUCCIÓ</b> .....	1
<b>1.1 Factors ambientals i moduladors globals de l'expressió gènica</b> .....	3
1.1.1 Regulació de l'expressió gènica a nivell transcripcional.....	4
1.1.1.1 Els factors sigma.....	4
1.1.1.2 Els factors de transcripció.....	7
1.1.1.3 El superenrotllament del DNA .....	10
<b>1.2 La Família de Proteïnes H-NS</b> .....	14
1.2.1 La Proteïna H-NS .....	14
1.2.1.1 Característiques generals .....	14
1.2.1.2 Dominis estructurals de la proteïna H-NS .....	16
1.2.1.2.1 Domini N-terminal: domini d'oligomerització.....	17
1.2.1.2.2 Domini C-terminal: domini d'unió al DNA .....	21
1.2.1.3 Modulació de l'expressió gènica per H-NS.....	22
1.2.2 La proteïna StpA: Paràloga de H-NS.....	26
1.2.3 H-NS interacció amb altres proteïnes .....	28
<b>1.3 La Família de Proteïnes Hha/ymoA</b> .....	29
1.3.1 Les Proteïnes HhaA i YmoA .....	30
1.3.2 Regulació de l'expressió d'hemolisina per Hha .....	32
1.3.3 Interacció de la proteïna Hha amb la proteïna H-NS per modular l'expressió gènica.....	34
1.3.4 Altres proteïnes de la família Hha/YmoA .....	37
<b>1.4 Paper de les famílies de proteïnes Hha/ymoA i H-NS en la regulació de la     conjugació dels plàsmids</b> .....	40
<b>1.5 Els plàsmids</b> .....	43
1.5.1 Replicació, nombre de còpies, segregació i incompatibilitat .....	43
1.5.1.1 Replicació i control del nombre de còpies plasmídiques.....	44
1.5.1.2 Segregació dels plàsmids en la divisió cel·lular .....	46
1.5.1.3 El fenomen de la incompatibilitat.....	48
1.5.2 Altres gens plasmídics .....	49
<b>1.6 La conjugació bacteriana</b> .....	51
1.6.1 La conjugació en els bacteris Gram-negatius .....	54

1.6.1.1 El complex Mpf com a part del sistema de secreció tipus IV (T4SS).....	55
1.6.1.1.1 Components del complex Mpf .....	57
1.6.1.2 Processament del DNA i el relaxosoma en la conjugació bacteriana .....	63
1.6.1.3 La proteïna d'acoblament: unió entre el relaxosoma i el complex Mpf.....	65
1.6.1.4 Evolució dels plàsmids i significat ecològic .....	67
1.6.2 La transferència de determinants de resistència a antibiòtics a bacteris patògens mitjançant la conjugació.....	68
1.6.3 El plàsmid R27: prototip dels plàsmids del grup IncHI1 .....	70
1.6.3.1 Propietats generals de la seqüència del plàsmid.....	70
1.6.3.2 Els elements transposables .....	72
1.6.3.3 Les regions de replicació .....	72
1.6.3.4 Les regions de segregació.....	73
1.6.3.5 Les regions de transferència: Tra1 i Tra2.....	73
1.6.3.5.1 La regió Tra1 .....	74
1.6.3.5.2 La regió Tra2 .....	77
1.6.3.6 Conjugació sensible a la temperatura .....	78
<b>1.7 Objectius del treball .....</b>	<b>81</b>
<b>2. MATERIALS I MÈTODES .....</b>	<b>83</b>
<b>2.1 Soques bacterianes, bacteriòfags i plàsmids .....</b>	<b>85</b>
2.2 Medis de cultiu i antibiòtics .....	87
2.2.1 Medis de cultiu .....	87
2.2.2 Antibiòtics .....	90
<b>2.3 Mètodes microbiològics.....</b>	<b>92</b>
2.3.1 Esterilització.....	92
2.3.2 Manteniment de microorganismes .....	92
<b>2.4 Mètodes de transferència genètica .....</b>	<b>92</b>
2.4.1 Transformació bacteriana .....	92
2.4.1.1 Transformació de cèl·lules competents obtingudes mitjançant tractament amb CaCl <sub>2</sub> .....	93
2.4.1.2 Electroporació.....	93
2.4.2 Curat de plàsmids .....	94
2.4.3 Conjugació.....	95
2.4.3.1 Conjugació en medi líquid.....	95

2.4.3.1	Conjugació en medi sòlid .....	95
2.4.4	Transducció generalitzada .....	96
2.4.4.1	Obtenció de lisats de P1 <i>vir</i> .....	96
2.4.4.2	Titulació dels lisats de P1 <i>vir</i> .....	97
2.4.4.3	Transducció amb P1 <i>vir</i> .....	97
<b>2.5</b>	<b>Tècniques de mutagènesi</b> .....	<b>98</b>
2.5.1	Mutagènesi amb mini-Tn5.....	98
2.5.2	Inactivació de gens cromosòmics utilitzant fragments de PCR.....	99
2.5.2.1	Generació del fragment de PCR .....	99
2.5.2.2	Transformació a la soca d' <i>E. coli</i> pKD46 .....	100
2.5.2.3	Eliminació de la resistència a l'antibiòtic .....	102
<b>2.6</b>	<b>Tècniques experimentals amb DNA</b> .....	<b>102</b>
2.6.1	Aïllament de DNA plasmídic .....	102
2.6.1.1	Obtenció de preparacions de DNA plasmídic pel mètode de la lisi alcalina	102
2.6.1.2	Tractament del DNA amb RNasa A .....	103
2.6.1.3	Desproteïnitació amb fenol:cloroform.....	104
2.6.1.4	Aïllament de DNA plasmídic amb “kits” .....	104
2.6.1.5	Aïllament de DNA plasmídic: protocol ràpid per a “screening” de DNA plasmídic.....	104
2.6.2	Obtenció de DNA total .....	105
2.6.3	Ús d'enzims de restricció, lligació i modificació .....	106
2.6.4	Amplificació de fragments de DNA mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR).....	107
2.6.5	Seqüenciació .....	108
2.6.6	Electroforesi de DNA en gels d'agarosa .....	109
2.6.6.1	Preparació del gel i tampons d'electroforesi .....	110
2.6.6.2	Preparació de les mostres.....	110
2.6.6.3	Marcadors de tamany molecular.....	110
2.6.6.4	L'electroforesi.....	111
2.6.6.5	Tinció del DNA amb Bromur d'etidi.....	111
2.6.7	Aïllament de bandes de DNA a partir de gels d'agarosa: electroelució.....	112
2.6.8	Estudi de la interacció DNA-Proteïna: assaigs de retard en gel .....	112
2.6.9	Hibridació de DNA: “Southern blot” .....	114
2.6.9.1	Transferència de DNA a membranes.....	114

2.6.9.2 Hibridació de DNA.....	114
2.6.9.3 Detecció immunològica de la digoxigenina .....	115
<b>2.7 Tècniques experimentals amb RNA .....</b>	<b>116</b>
2.7.1 Extracció de RNA cel·lular total.....	116
2.7.1.1 Extracció de RNA mitjançant fenol acídic calent .....	116
2.7.1.2 Extracció de RNA mitjançant “kits” .....	117
2.7.1.3 Quantificació espectrofotomètrica del RNA .....	117
2.7.2 Electroforesi de RNA en gels d’agarosa i tinció amb bromur d’etidi .....	118
2.7.3 Anàlisi semi-quantitatiu dels RNA per RT-PCR.....	118
2.7.3.1 Digestió amb DNasa I .....	118
2.7.3.2 RT-PCR .....	119
2.7.4 Anàlisi de l’expressió gènica mitjançant microxips .....	120
2.7.4.1 Fabricació dels microxips.....	120
2.7.4.1.1 Síntesi de les sondes i preparació dels microxips.....	120
2.7.4.1.2 Xips comercials .....	124
2.7.4.2 Marcatge del RNA.....	124
2.7.4.3 Hibridació del RNA.....	126
2.7.4.3.1 Hibridació manual .....	126
2.7.4.3.2 Hibridació automàtica .....	127
2.7.4.4 Lectura dels microxips .....	129
2.7.4.5 Processament i anàlisi de les dades .....	130
2.7.4.5.1 Selecció i anàlisi de les imatges .....	130
2.7.4.5.2 Control de qualitat .....	131
2.7.4.5.3 Preprocessament de les dades.....	131
2.7.4.5.4 Anàlisi de les dades .....	133
<b>2.8 Tècniques experimentals amb proteïnes .....</b>	<b>136</b>
2.8.1 Obtenció d’extractes .....	136
2.8.1.1 Fraccionament cel·lular .....	136
2.8.1.1.1. Fracció interna .....	136
2.8.1.1.2 Fracció periplasmàtica.....	137
2.8.1.1.3 Fracció citoplasmàtica.....	137
2.8.2 Valoració de la concentració de proteïnes pel mètode de Bradford (microassaig) .....	138
2.8.3 Precipitació de proteïnes per acetona .....	138

2.8.4 Purificació de proteïnes .....	139
2.8.4.1. Inducció de l'expressió de proteïnes.....	139
2.8.4.2 Obtenció d'extractes cel·lulars.....	140
2.8.4.3 Purificació per Ni <sup>2+</sup> -NTA agarosa .....	140
2.8.5 Tècniques d'electroforesi de proteïnes .....	141
2.8.5.1 Gels de poliacrilamida desnaturalitzants .....	141
2.8.5.1.1 Gels de poliacrilamida en Tris-Glicina-SDS .....	141
2.8.5.1.2 Gels de poliacrilamida en Tris-Tricina-SDS .....	144
2.8.5.2 Marcadors de pes molecular .....	145
2.8.5.3 Tinció de gels de proteïnes amb Blau de Coomassie® .....	146
2.8.6 Seqüenciació i identificació de proteïnes .....	146
2.8.6.1 Seqüenciació N-terminal per degradació d'Edman .....	146
2.8.6.1.2 Seqüenciació N-terminal .....	148
2.8.6.1.2 Transferència de la proteïna a membrana PVDF .....	147
2.8.7 Tècniques d'immunodetecció de proteïnes (“Western blot”).....	149
2.8.7.1 Transferència de proteïnes a membrana per sistema semi-sec .....	149
2.8.7.2 Immunodetecció i revelat quimioluminiscent pel sistema ECL™ .....	149
2.8.8 Valoracions d'activitats enzimàtiques .....	151
2.8.8.1 Determinació de l'activitat β-galactosidasa.....	151
2.8.8.2. Valoració d'activitat hemolítica en la fracció externa.....	152
2.8.8.3. Valoració de l'activitat β-glucosidasa en extractes cel·lulars.....	153
<b>2.9 Microscòpia electrònica de transmissió .....</b>	<b>154</b>
<b>3. RESULTATS.....</b>	<b>157</b>
<b>3.1 Regulació de l'expressió de gens pel complex Hha-H-NS .....</b>	<b>159</b>
3.1.1 Regulació de l'operó <i>bgl</i> pel complex Hha-H-NS.....	159
3.1.1.1 Determinació de l'activitat β-glucosidasa per fluorimetria .....	161
3.1.1.2 Valoració de la transcripció de l'operó <i>bgl</i> mitjançant la fusió gènica <i>bglG-lacZ</i> clonada en un plàsmid multicòpia .....	163
3.1.2 Proteïnes regulades pel complex Hha-HNS en diferents condicions d'osmolaritat .....	164
3.1.2.1 Efecte de les mutacions <i>hha</i> i/o <i>hns</i> sobre el creixement en diferents condicions d'osmolaritat.....	165

3.1.2.2 Anàlisi del patró de proteïnes per electroforesi en gels d'acrilamida desnaturalitzants .....	167
3.1.2.3 Efecte de les mutacions <i>hha</i> i <i>hns</i> sobre l'expressió del gen <i>htrA</i> ( <i>degP</i> )....	169
3.1.2.3.1 Valoració de l'activitat $\beta$ -galactosidasa d'una fusió <i>degP-lacZ</i> clonada en un plàsmid multicòpia .....	170
3.1.2.3.4 Anàlisi de la transcripció del gen <i>htrA</i> per RT-PCR .....	171
3.1.2.4 Unió de la proteïna H-NS a les regions promotores dels gens <i>htrA</i> i <i>rpoE</i> ..	173
<b>3.2 Paper de les proteïnes Hha i H-NS cromosòmiques i plasmídiques en la conjugació del plàsmid R27 .....</b>	<b>176</b>
3.2.1 Termosensibilitat de la conjugació de R27 .....	177
3.2.2 Regulació de la conjugació per les proteïnes Hha i H-NS codificades al cromosoma .....	178
3.2.3 Obtenció del plàsmids mutants per a la <i>orf182</i> , per la <i>orf164</i> i pel doble mutant <i>orf182 orf164</i> .....	180
3.2.3.1. Obtenció del plàsmid R27mutant per la <i>orf182</i> .....	180
3.2.3.2 Obtenció del plàsmid R27 mutant per a la <i>orf164</i> i del plàsmid R27 doble mutant per la <i>orf182</i> i la <i>orf164</i> .....	183
3.2.4 Efecte de la les mutacions <i>orf164</i> i <i>orf182</i> sobre la termoregulació de la conjugació del plàsmid R27 .....	185
3.2.5 Estudi de la transcripció dels gens de les regions Tra1 i Tra2 de R27 mitjançant microxips .....	187
3.2.5.1 Disseny experimental i experiments.....	188
3.2.5.2 Anàlisi de les imatges .....	190
3.2.5.3 Preprocessat: filtratge i normalització .....	192
3.2.5.4 Gens expressats diferencialment .....	197
3.2.6 Estudi de la transcripció de gens de les regions Tra1 i Tra2 de R27 mitjançant RT-PCR .....	201
3.2.7 Assaigs de retard en gel d'H-NS amb gens de les regions Tra1 i Tra2 de R27 .	204
3.2.8 Assaigs de retard en gel d'H-NS i d'Hha amb la regió <i>oriT</i> de R27 .....	209
3.2.9 Complementació de les mutacions <i>hha</i> i <i>hns</i> cromosòmiques per les seves còpies plasmídiques: <i>orf164</i> i <i>orf182</i> .....	215
3.2.10 Observació dels pilis conjugatius de soques hoste de R27 per Microscòpia Electrònica de Transmissió.....	211
3.2.11 Interacció de His-Hha amb la ORF164 .....	218

<b>3.3 Anàlisi transcriptòmic de l'efecte de les mutacions <i>hns</i> i <i>hha ydgT</i> en el patró d'expressió gènica a <i>E. coli</i></b> .....	221
3.3.1 Disseny experimental.....	222
3.3.2 Anàlisi de les imatges .....	223
3.3.3 Preprocessat: filtratge i normalització .....	225
3.3.4 Gens expressats diferencialment.....	227
<b>4. DISCUSSIÓ</b> .....	261
<b>4.1 Proteïnes regulades pel complex Hha/H-NS</b> .....	263
4.1.1. Regulació de l'operó <i>bgl</i> .....	263
4.1.2 Identificació d'altres proteïnes regulades pel complex Hha-H-NS.....	264
4.1.2.1 HdeA.....	265
4.1.2.2 HtrA .....	266
<b>4.2 Regulació de la conjugació del plàsmid R27</b> .....	268
4.2.1 Les proteïnes Hha i H-NS estan implicades en la termoregulació de la conjugació de R27 .....	268
4.2.2 Implicació de les proteïnes plasmídiques en la regulació de funcions cel·lulars.....	274
<b>4.3 Regulació global de l'expressió gènica a mutants <i>hns</i> i <i>hha ydgT</i></b> .....	275
<b>5. CONCLUSIONS</b> .....	281
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	285
<b>ANNEX 1</b> .....	351
A. Imatges obtingudes després d'escanejar cadascun dels microxips.....	354
B. Correlacions entre els microxips.....	375
C. Diagnòstics inicials .....	379
D. Resultats de l'eliminació del soroll de fons .....	398
E. Gens expressats diferencialment .....	480
<b>ANNEX 2</b> .....	427
A. Imatges seleccionades per cadascun dels microxips.....	430
B. Diagnòstics inicials .....	442
C. Resultats de l'eliminació del soroll de fons .....	455

D. Resultats de la normalització .....	467
E. Resultats de la normalització .....	408
F. Gens expressats diferencialment .....	417
<b>PUBLICACIONS</b> .....	527