

Grup: Bioquímica i Biologia Molecular de Microorganismes

Proteïnes bacterianes implicades en la comunicació de la microbiota i l'epiteli intestinal: assignació de noves funcions a la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa de *E. coli*



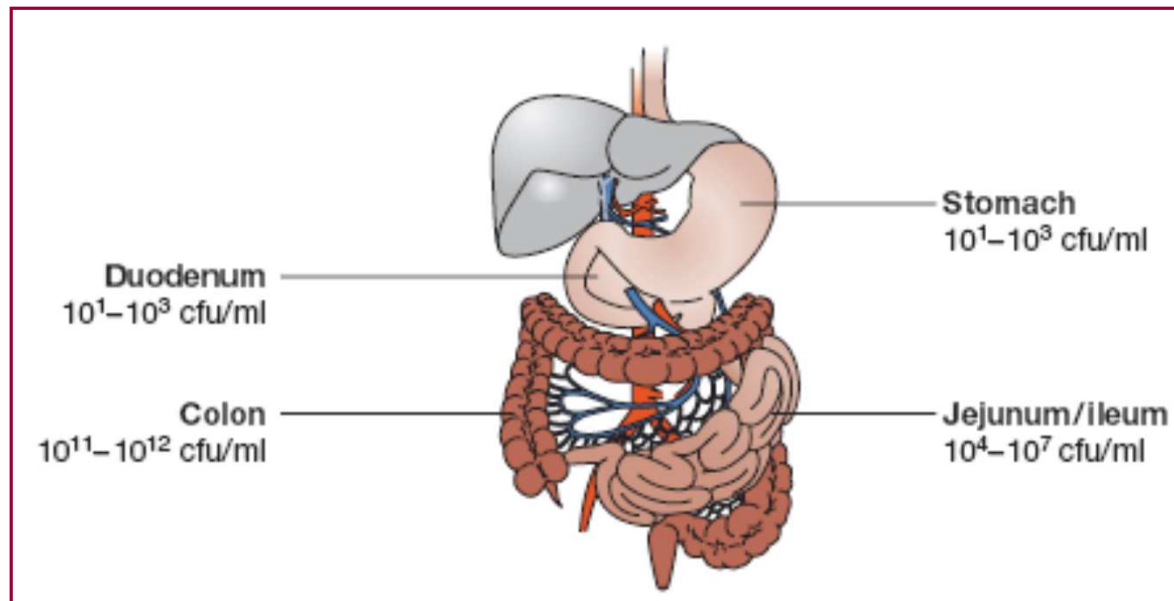
I = B + U B

Pepita Badia

Seminari de recerca Novembre 2013

Microbiota intestinal

- Al voltant de 1000 espècies microbianes colonitzen el tracte gastrointestinal = 1.5 kg
- Dotació gènica que excedeix la dotació gènica de l'hoste.
- Enorme capacitat metabòlica.
- És considerat un òrgan que contribueix a diferents processos de l'hoste

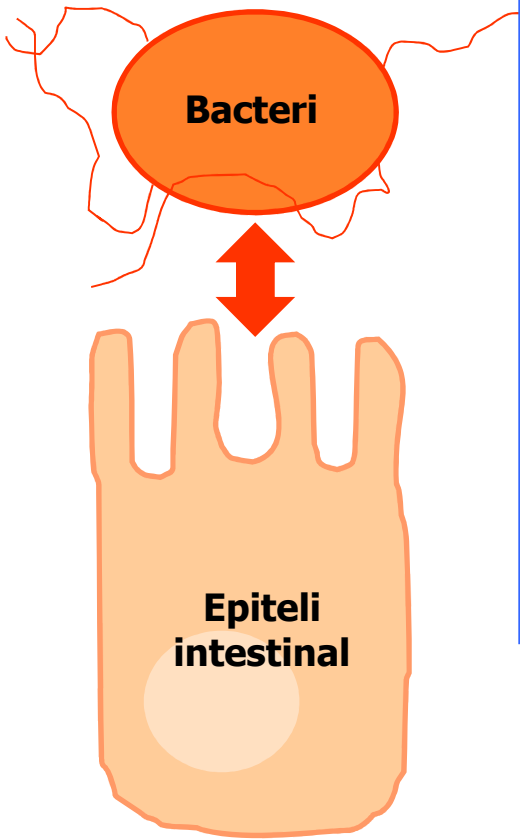


O'Hara & Shanahan (2006) *EMBO reports*, 7:688-693

Jia et al (2008) *Nature Rev*, 7:123-129

Funcions de la microbiota

O'Hara & Shanahan (2006) *EMBO reports*, 7:688-693



Funcions de la microbiota			
Protective functions	Structural functions	Metabolic functions	
Pathogen displacement Nutrient competition Receptor competition Production of anti-microbial factors e.g., bacteriocins, lactic acids	Barrier fortification Induction of IgA Apical tightening of tight junctions Immune system development	Control IEC differentiation and proliferation Metabolize dietary carcinogens Synthesize vitamins e.g., biotin, folate	Ferment non-digestible dietary residue and endogenous epithelial-derived mucus Ion absorption Salvage of energy
<p>Commensal bacteria</p>	<p>IgA</p>	<p>Short-chain fatty acids</p> <p>Mg²⁺ Ca²⁺ Fe²⁺</p> <p>Vitamin K Biotin Folate</p>	

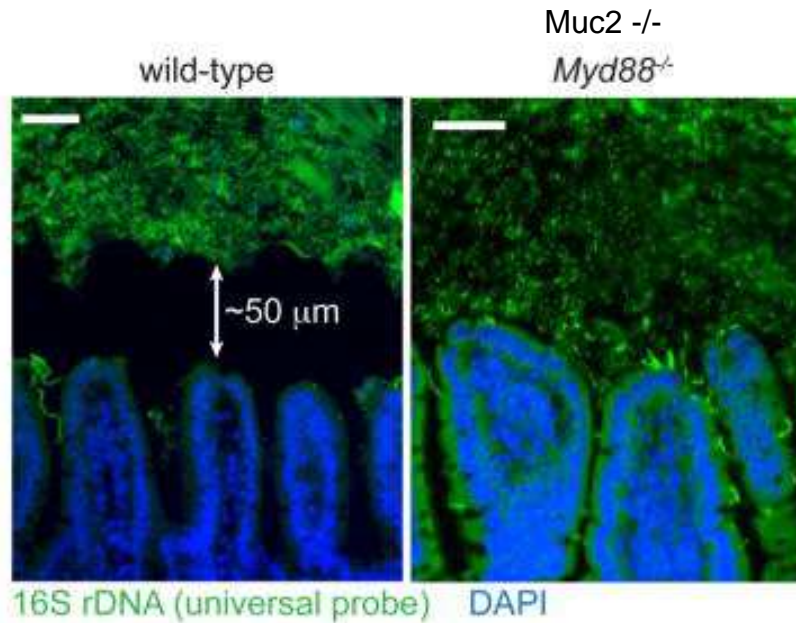
Microbiota normal / Probiòtics
Lactobacillus,
Bifidobacterium,
E.coli Nissle 1917
 ↓
BENEFICI

Composició de la microbiota alterada / Patògens
 ↓
MALALTIA

Recerca desenvolupada pel grup

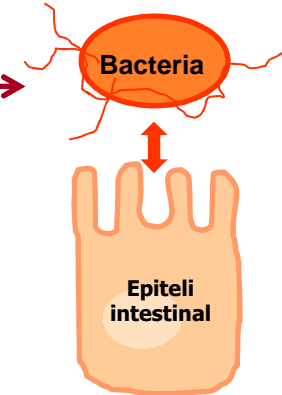
Epiteli intestinal

- Superfície d'interacció amb els bacteris



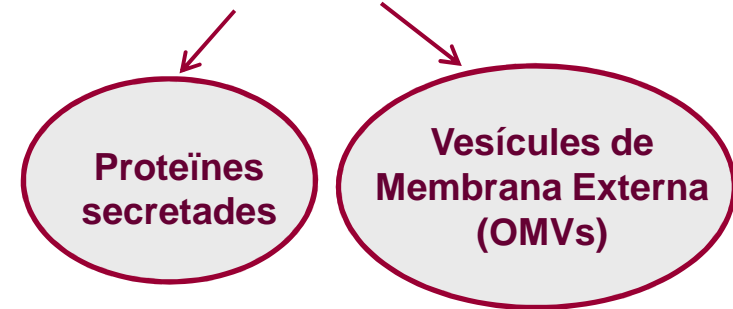
- Johansson et al. (2008) PNAS 105: 15064-9
- Vaishanava et al. (2011) Science 334:255-258

Modifica el patró
d'expressió
d'alguns dels gens



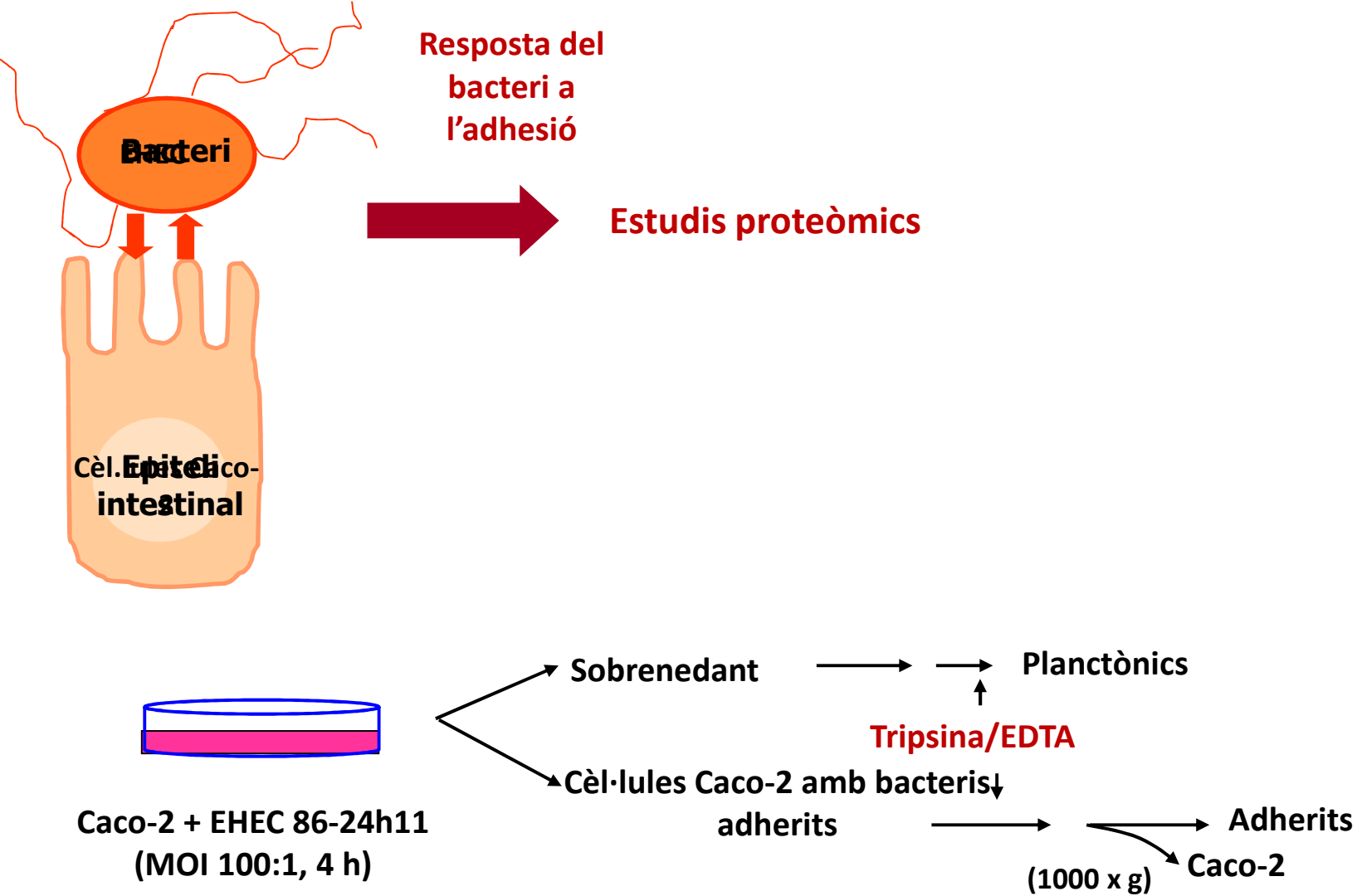
Diàleg intercel·lular

Factors secretats per bacteris



Escherichia coli: soques patògenes, comensals i probiòtiques

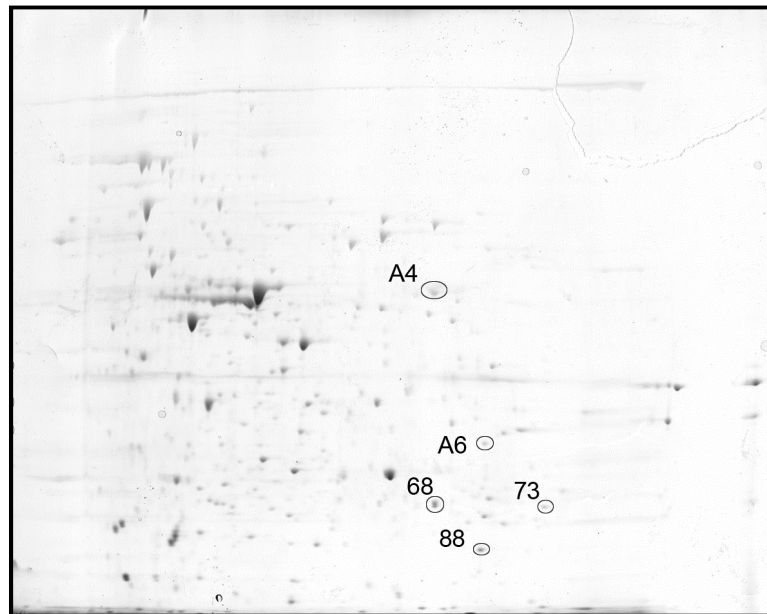
Resposta del bacteri a l'adhesió



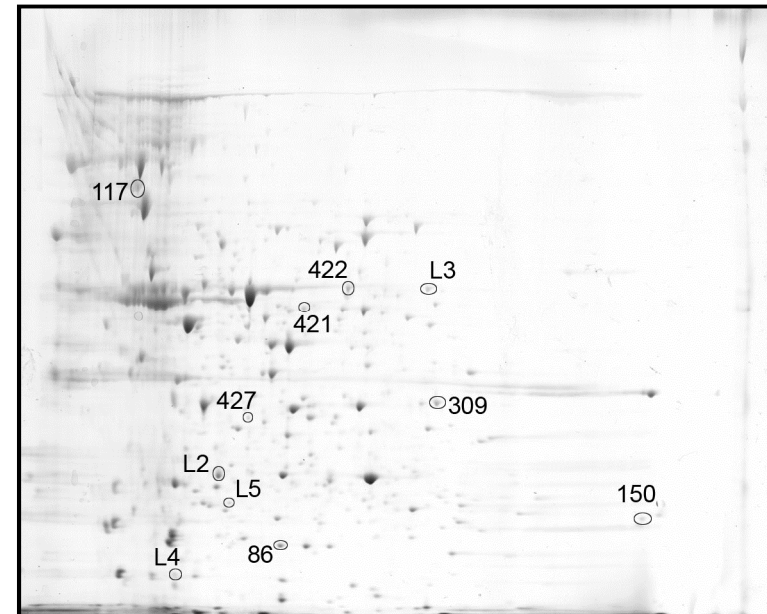
Estudi proteòmic de l'adhesió d'EHEC a cèl·lules Caco-2

Anàlisi 2D

Bacteris adherits



Bacteris planctònics



MM
(kDa)

124

80

49

35

28

pH 3

10

3

10

(Programa d'anàlisi: Image Master 2D V. 4.01)

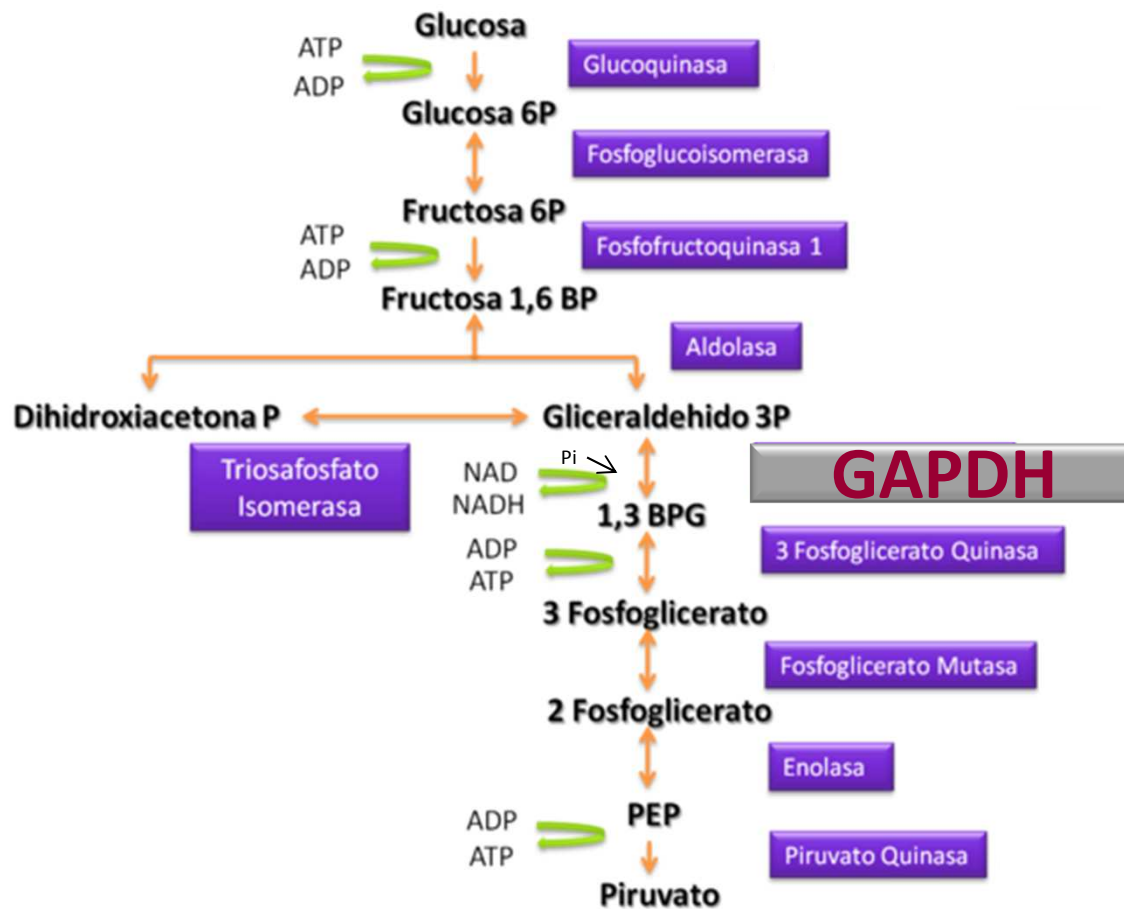
Identificació de proteïnes per espectrometria de masses

Resposta del bacteri a l'adhesió

Estudi proteòmic de l'adhesió d'EHEC a cèl·lules Caco-2

EXPRESSIÓ	Taca	Proteïna	Núm. accés	pI	MM (KDa)	Peptids/%	Loc.	Env.
INCREMENTADA	A4	Serina hidroximetiltransferasa	Q8XA55	6,46	45,48	3/6%	C	+
	A6	Gliceraldehid-3-P-deshidrogenasa	P0A9B4	5,73	35,41	13/59%	C	+
	73	Proteïna periplasmàtica d'unió a glutamina	Q83R44	8,44	21,17	7/45%	P	+
	88	Factor reciclador ribosòmic	P0A807	5,75	20,58	5/35%	C	+
	68	Proteïna periplasmàtica d'unió a molibdat	P37329	6,38	24,9	11/69%	P	-
DISMINUÏDA	L2	Proteasa de membrana externa OmpT	P58603	5,55	33,44	5/21%	ME	+
	L3	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa	P65765	8,39	47,25	5/19%	P	-
	150	Piruvat quinasa	P0AD62	8,88	21,89	8/49%		+
	117	Enzim I del sistema PEP-fosfotransferasa	Q7A974	4,73	55,4	11/41%	C	+
	86	Superòxid dismutasa	P0AGD2	5,58	21,18	10/91%	P	+
	309	Aspartat transcarbamoilasa	Q47556	6,13	34,3	13/45%		+
	421	Tirosina t-RNA sintetasa	P0AGK0	5,59	47,76	10/40%	C	+
	422	Adenil succinat liasa	P0AB89	5,68	51,65	10/30%		+
	L5	Proteïna de control respiratori aeròbic ArcA	P0A9Q3	5,21	27,39	5/30%	C	+
	427	Proteïna hipotètica ECs3302	Q8XBI9	5,34	33,3	4/24%		-
L4	Proteïna hipotètica ECs3375	Q7ABM9	5,07	22,18	9/57%		-	

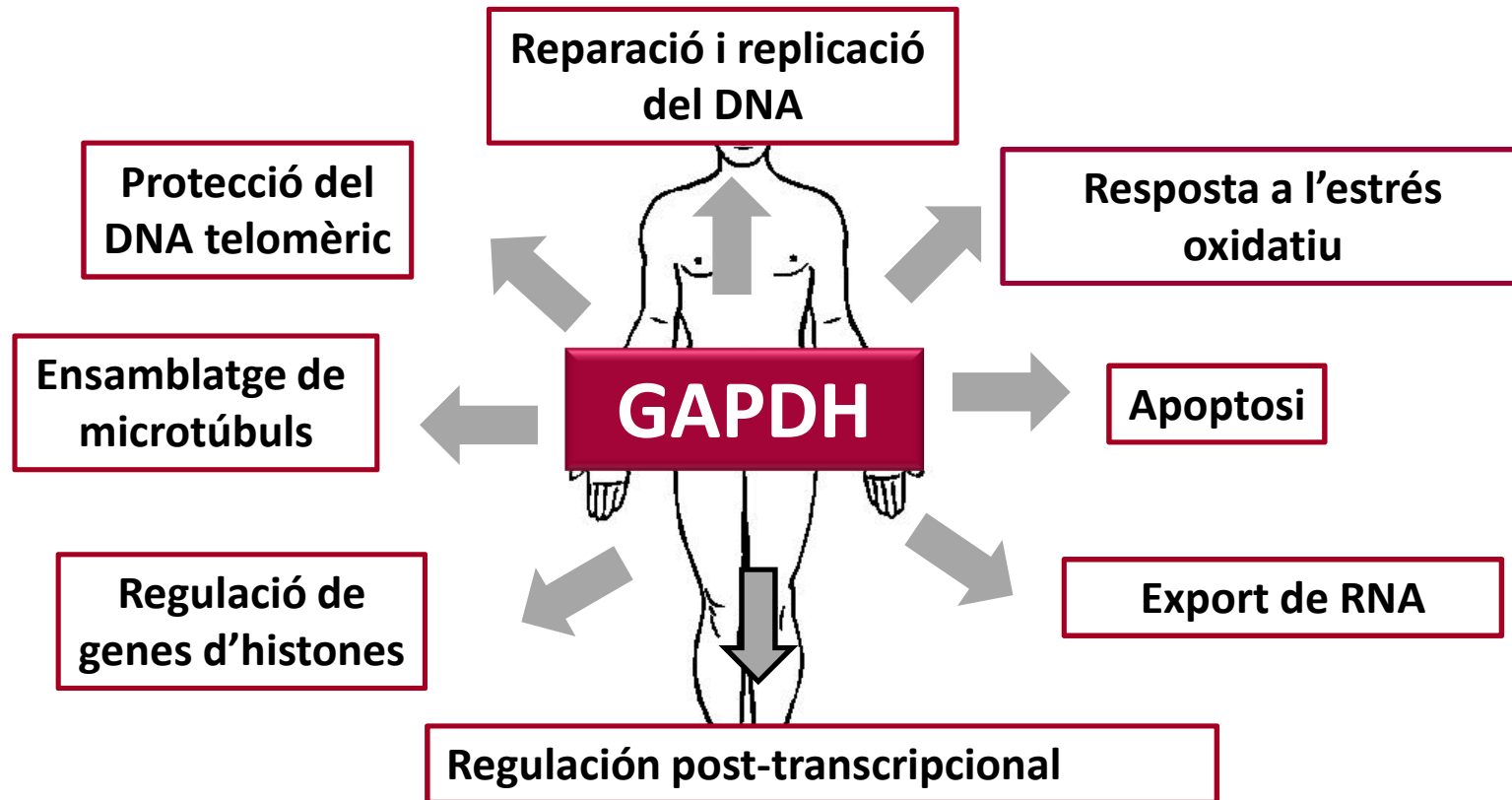
GAPDH



MULTIFUNCIONAL

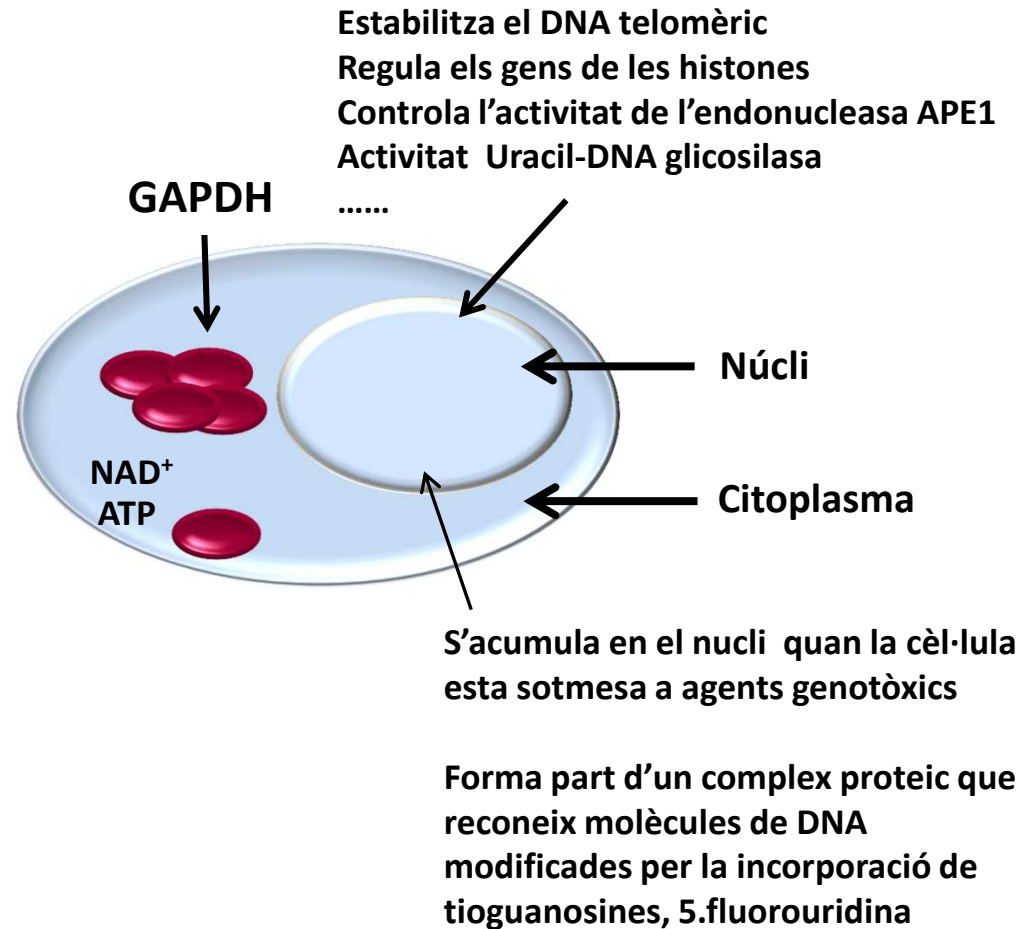
- Humans
- Microorganismes patògens
- Probiòtics

GAPDH proteïna multifuncional en humans



Multifuncionalitat de proteïnes

- Localització subcel·lular
- Estat d'oligomerització
- Concentració intracel·lular de substrats, cofactors o lligands
- Interaccions amb altres proteïnes
- Modificacions post-traduccionals



Funcions extracel·lulars de GAPDH en microorganismes

- **MICROORGANISMES PATÒGENS**

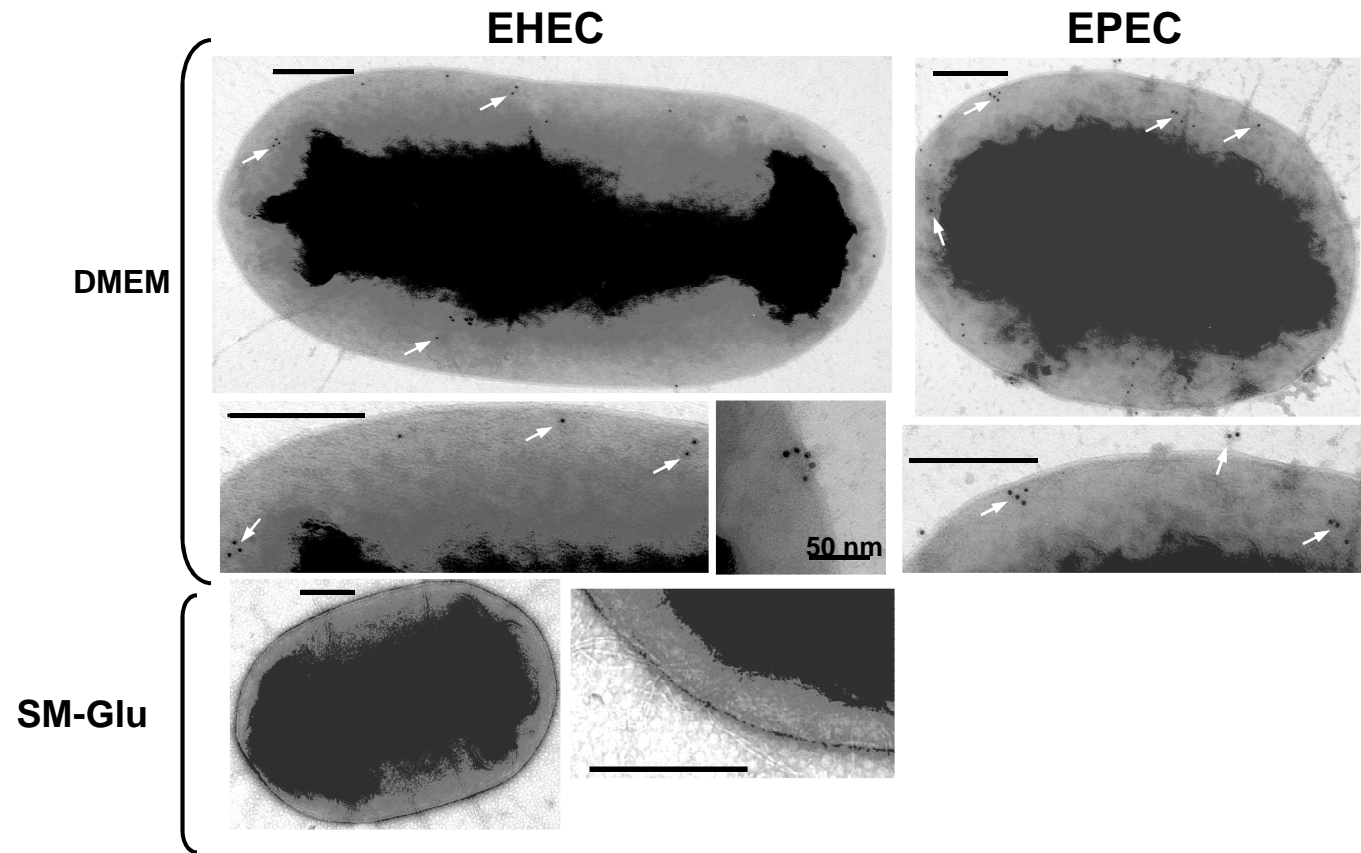
- ✓ Participa en processos d'adhesió i virulència
- ✓ Interacciona amb proteïnes de l'hoste:
 - Fibrinogen
 - Plasminogen
 - Proteïnes del citoesquelet
 - Proteïnes del sistema immune (C5a)

- **PROBIÒTICS**

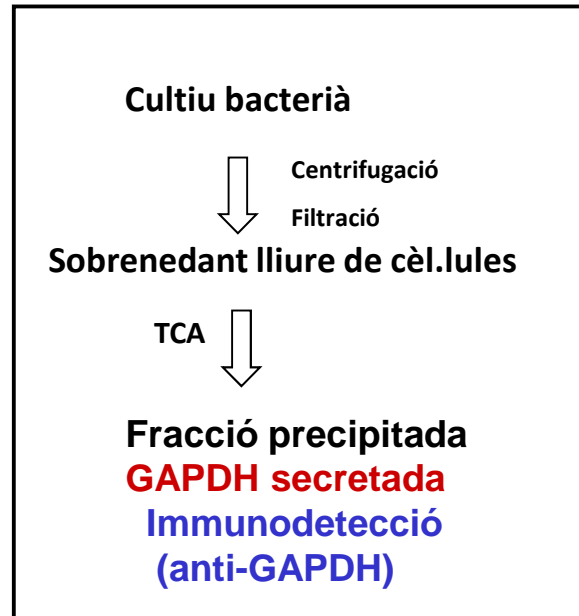
- ✓ Interacciona amb la mucina del colon
- ✓ Facilita la colonització

Localització de GAPDH a la superfície de EHEC i EPEC

- Immunodetecció per microscòpia de transmissió electrònica després d'incubar bacteris sencers amb anticossos anti-GAPDH seguit d'anticòs secundari marcat amb or col·loidal

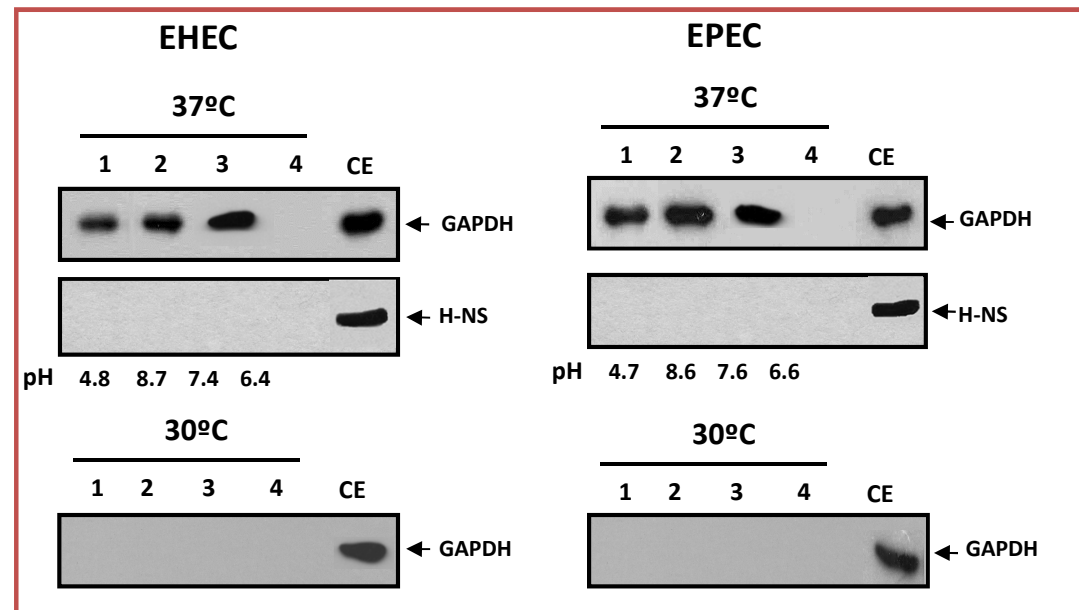


Secreció de GAPDH a *E.coli*



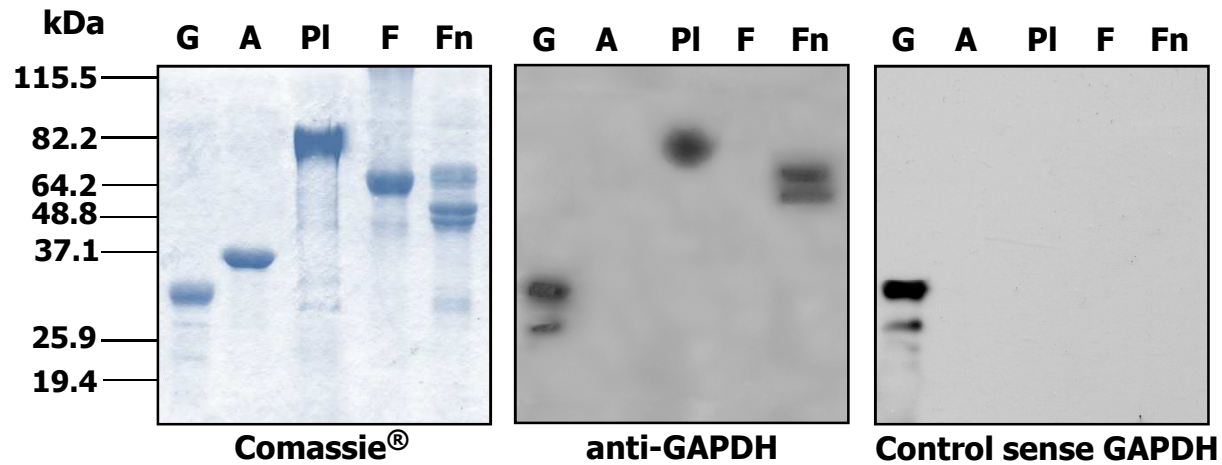
Medi de cultiu

1. DMEM
2. Ham's F-12
3. LB
4. SM-Glu

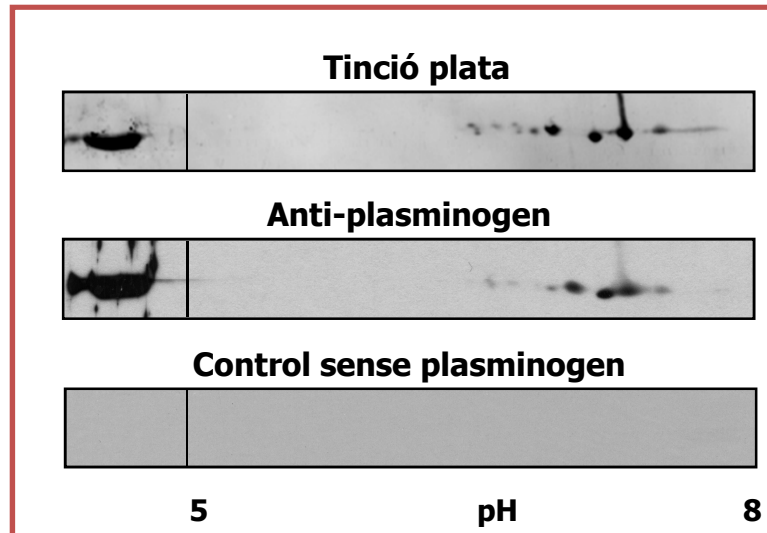


Interacció de GAPDH amb proteïnes de l'hoste

La GAPDH interacciona amb proteïnes de la matriu extracel·lular plasminogen i fibrinogen

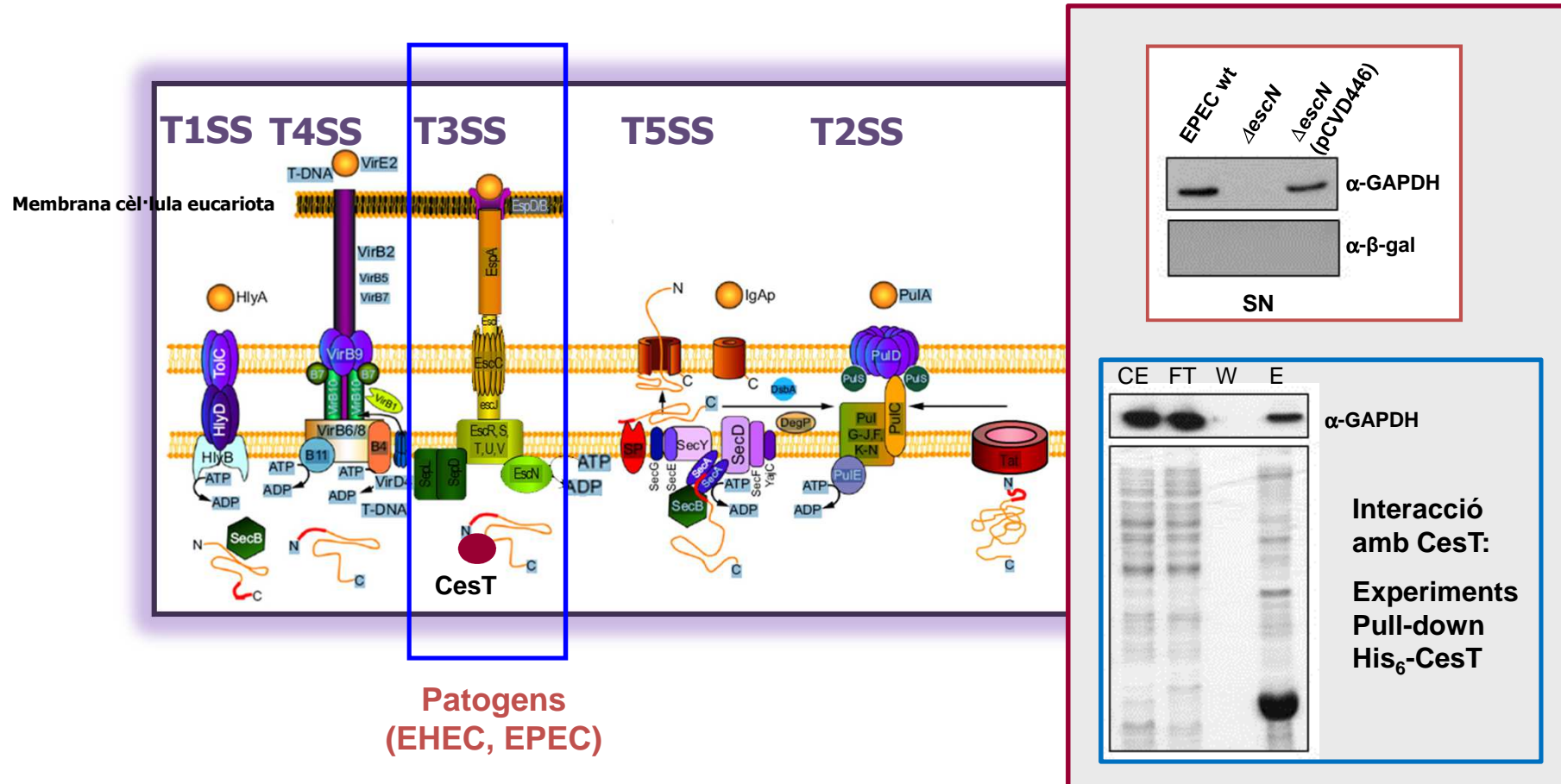


FAR-WESTERN



Sistemes de secreció de proteïnes

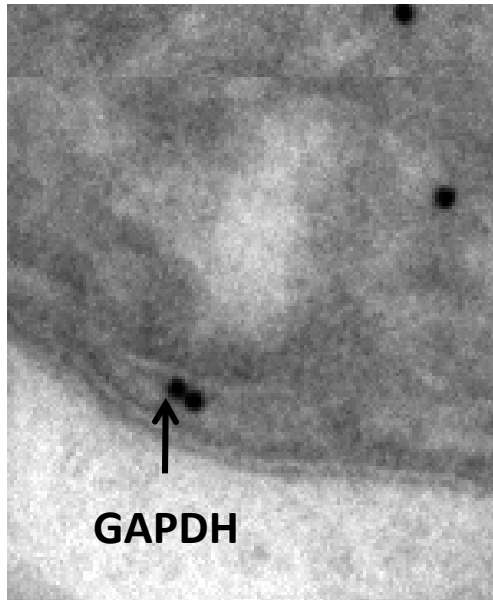
GAPDH es secretada a través del T3SS en EPEC



La secreció de proteïnes a través del T3SS depèn de xaperones

CesT: xaperona que interacciona amb múltiples efectors del T3SS i els dirigeix cap al aparell de secreció

Funcions de GAPDH intracel·lular



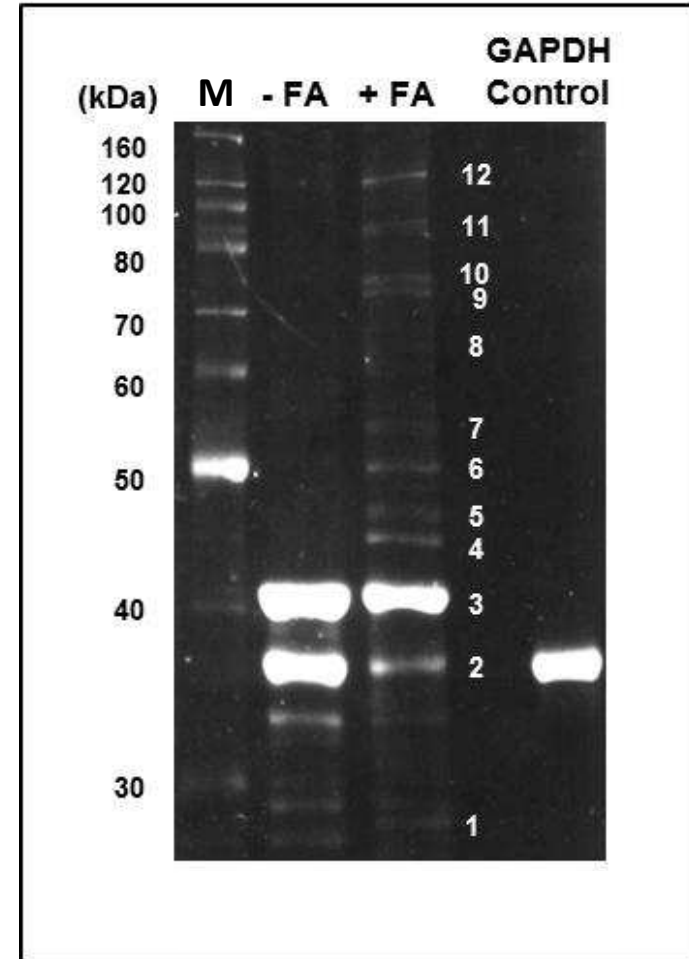
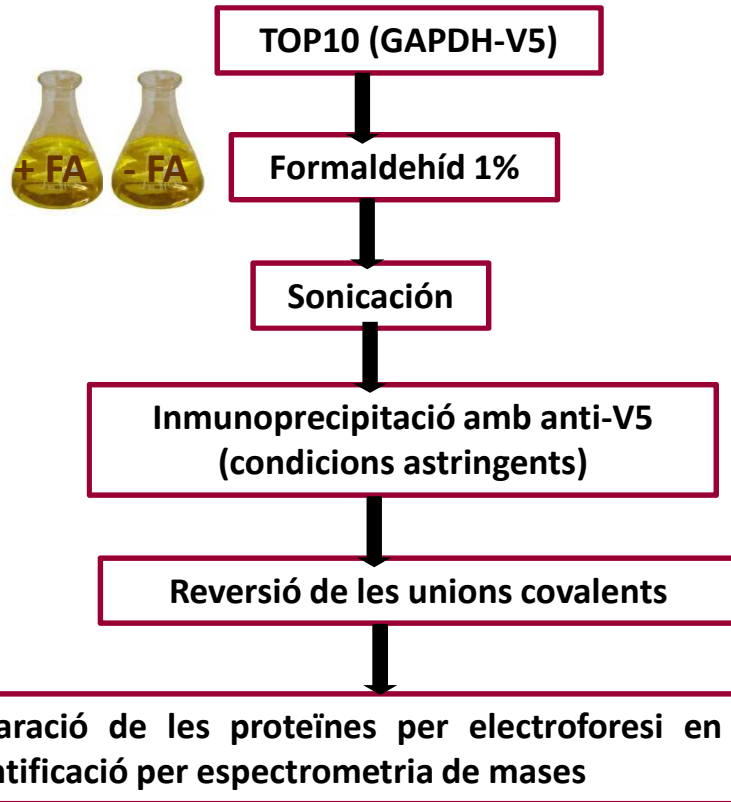
- ***Streptococcus pyogenes***

Increment en els nivells intracel·lulars de GAPDH comport:

- ↑ Metabolisme lipídic
- ↓ Aminoàcids i Carbohidrats
- ↓ Virulència

Identificació de proteïnes que interaccionen amb GAPDH

IDENTIFICACIÓ DE LES PROTEÏNES QUE INTERACCIONEN AMB GAPDH-V5 MITJANÇANT
CROSS-LINKING IN VIVO AMB FORMALDEHÍD SEGUIT D'INMUNOPRECIPITACIÓ

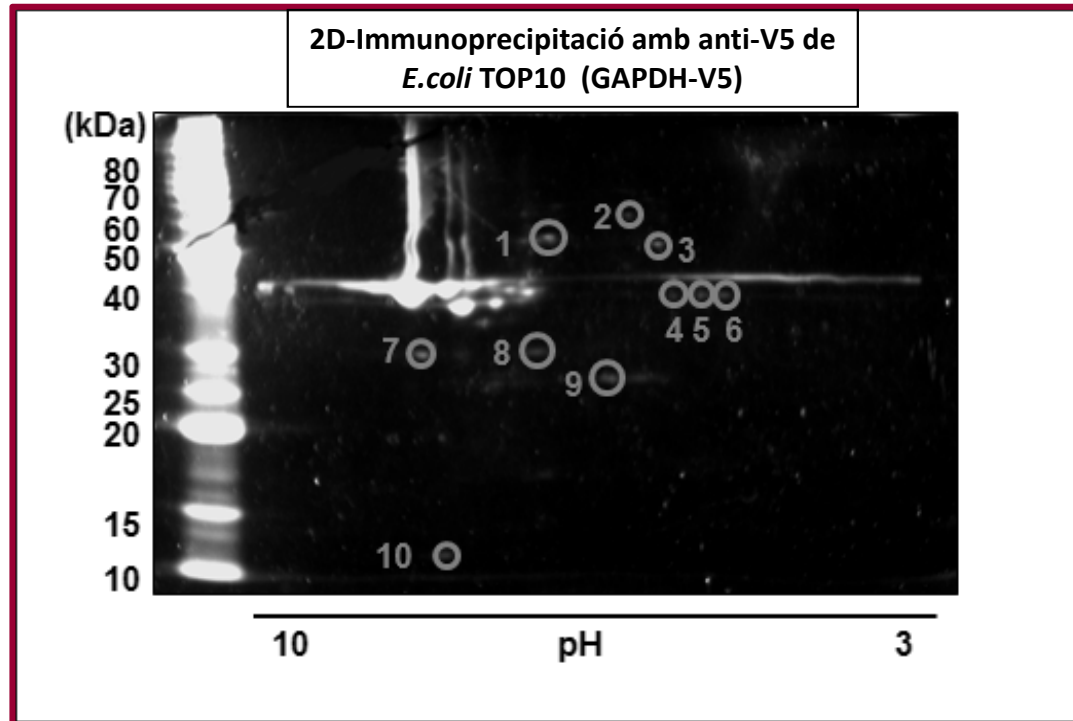


Identificació de proteïnes que interaccionen amb GAPDH

Banda	Proteïna	kDa	Score	Péptidos	Función	Localización subcelular
1	<i>D-ribose binding protein</i>	28.5	236	5	Transporte	Periplasma
1	Gph	27.4	70	3	Enzima Metabólica	Citoplasma
2	GAPDH	36.1	447	11	Enzima metabólica	Citoplasma
2	OmpC	40.4	91	3	Porina	Mem. externa
3	GAPDH-V5	--	347	12	Prot. Recombinante	--
4	EF-Tu	43.3	503	14	Síntesis de proteïnas	Citoplasma
5	Enolasa	45.6	238	5	Enzima metabólica	Citoplasma
6	Triptofanasa	53.1	183	5	Enzima metabólica	Citoplasma
6	Subunidad β - ATP sintasa	50.3	98	3	Síntesis de ATP	Asociada a membrana plasmática
7	Aldehído deshidrogenasa A	52.4	284	6	Enzima metabólica	Citoplasma
7	<i>Trigger factor</i>	49.0	115	4	Chaperona	Citoplasma
7	Piruvato quinasa	51.6	97	3	Enzima metabólica	Citoplasma
7(*)	Dihidrolipoil deshidrogenasa	50.7	42	2	Enzima metabólica	Citoplasma
7(*)	Subunidad α -ATP sintasa	55.2	49	2	Síntesis de ATP	Asociada a membrana plasmática
8/12	No identificadas	--	--	--	--	--
9	DnaK	69.1	510	10	Chaperona	Citoplasma
10	Transcetolasa	72.4	105	5	Enzima metabólica	Citoplasma
11	Aconitasa	94.0	135	3	Enzima metabólica	Citoplasma

Identificació de proteïnes que interaccionen amb GAPDH

ABSENCIA DE *CROSS-LINKING*

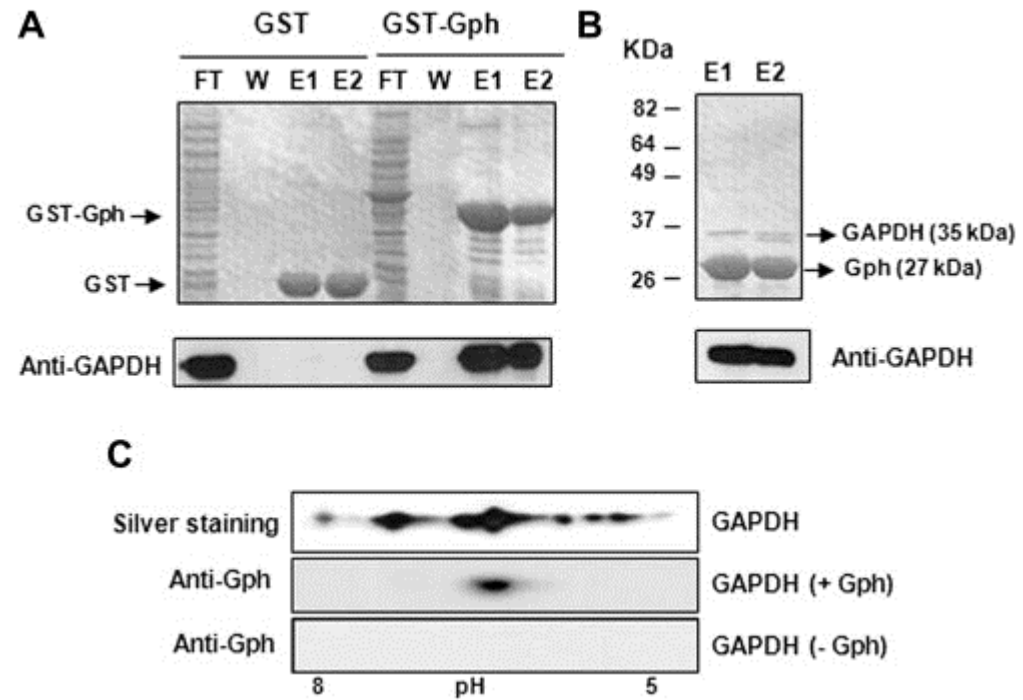
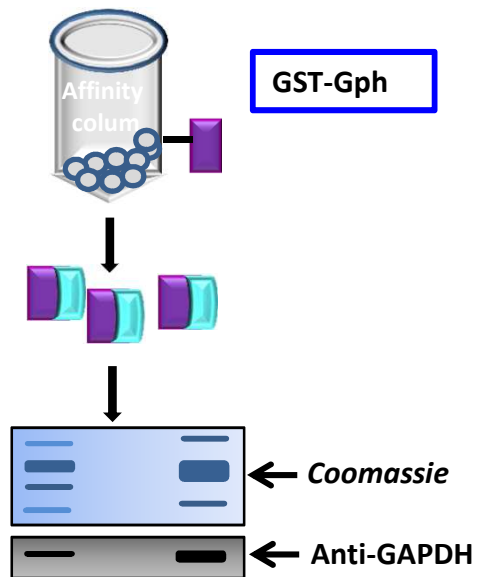


Identificació de proteïnes que interaccionen amb GAPDH

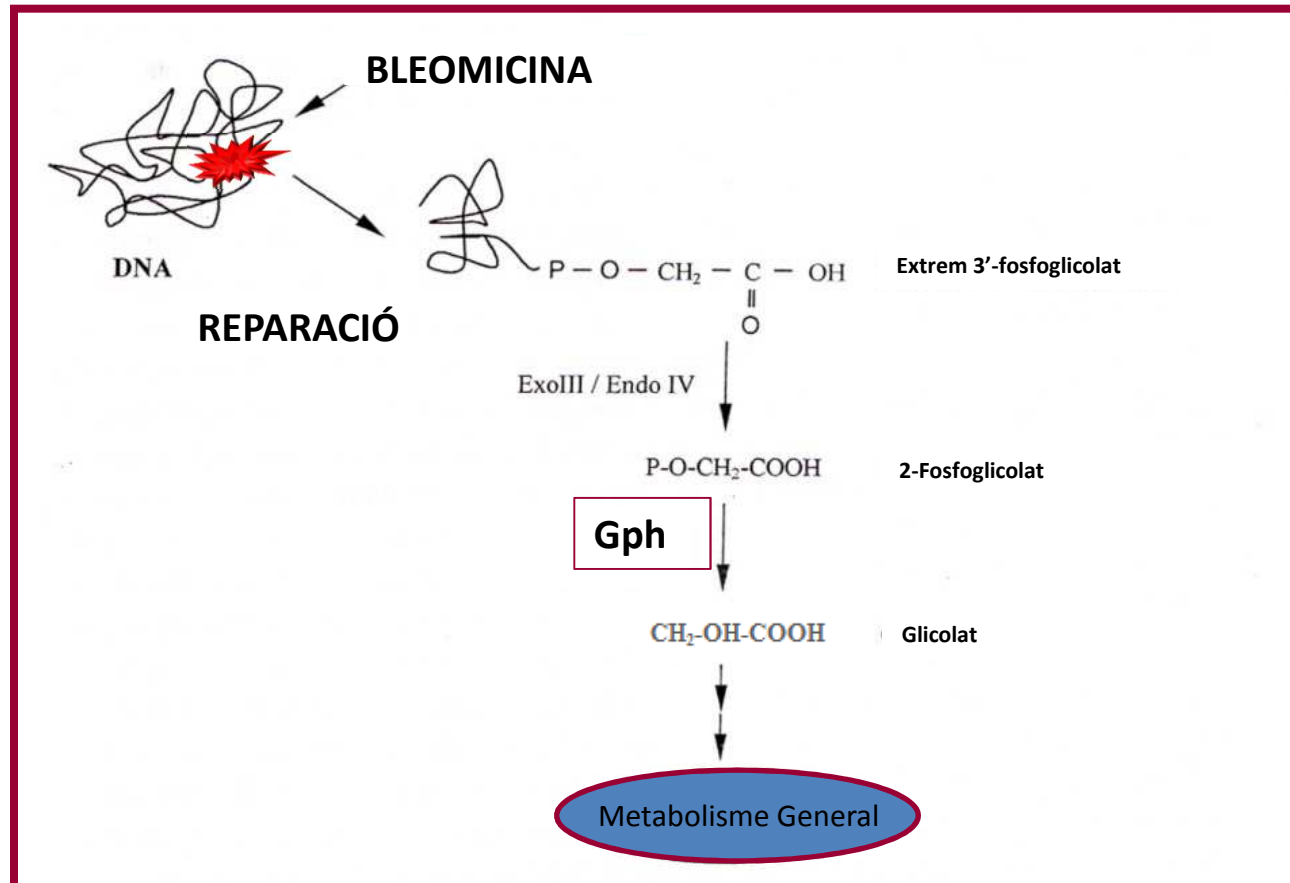
Amb absència de *cross-linking*

Banda	Proteïna	kDa	pI	Score	Péptidos	Función	Localización
1	Subunidad α -ATP sintasa	55.2	6.13	608.6	29	Síntesis de ATP	Asociada a membrana plasmática
1	Antranilato sintasa componente II	56.8	6.52	74.04	10	Biosíntesis de Triptófano	Citoplasma
1	<i>Arabinose import ATP binding protein</i>	55.0	6.38	59.09	10	Transporte de L-Arabinosa	Citoplasma
1	<i>Ribose import</i>	55.0	6.14	50.91	11	Transporte de D-Ribosa	Citoplasma
1	Dihidrolipoil deshidrogenasa	50.7	6.15	49.10	11	Componente E3 de la Piruvato DH	Citoplasma
2	No identificada	--	--	--	--	--	--
3	Subunidad β -ATP sintasa	50.3	5.01	1150	40	Síntesis de ATP	Asociada a membrana plasmática
4	OmpF	39.3	4.96	156.9	19	Porina	Membrana
5	OmpC	40.3	4.82	445.0	31	Porina	Membrana
5	GAPDH	35.5	7.11	154.0	19	Enzima metabólica	Citoplasma
6	GAPDH	35.5	7.11	629.1	29	Enzima metabólica	Citoplasma
7/9/10	GAPDH proteólisis	--	--	--	--	Enzima metabólica	Citoplasma
8	D-tagatose -1.6-bisfosfoaldolasa-subunidad GatY	30.8	6.34	259.5	21	Enzima metabólica	Citoplasma

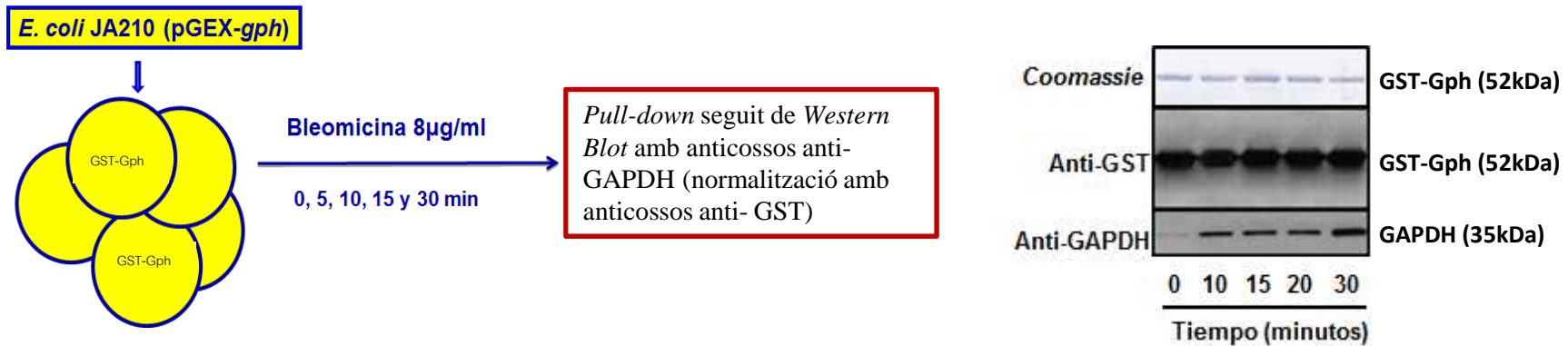
Interacció de GAPDH i Gph



Interacció de GAPDH amb fosfoglicolat fosfatasa (Gph)

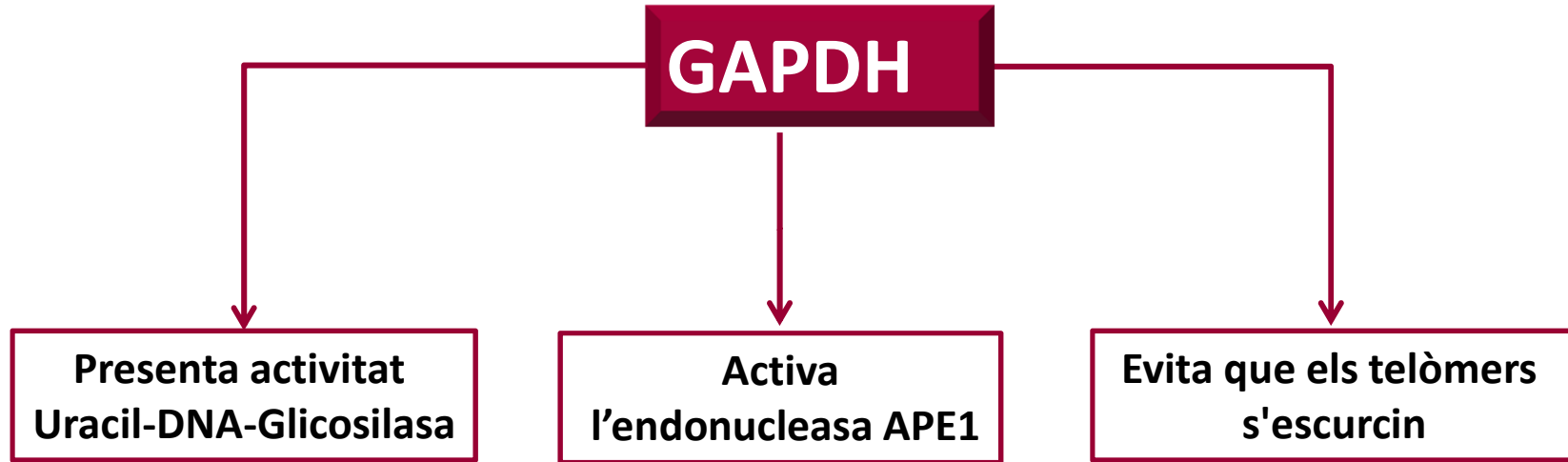


Interacció GAPDH-Gph en cèl·lules tractades amb Bleomicina



Aquests resultats suggereixen la participació de GAPDH en processos de reparació del DNA.

GAPDH en processos de reparació de DNA en humans

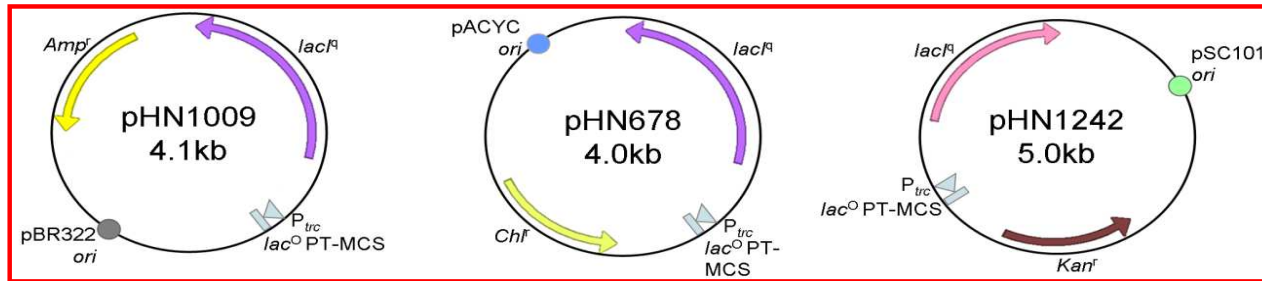
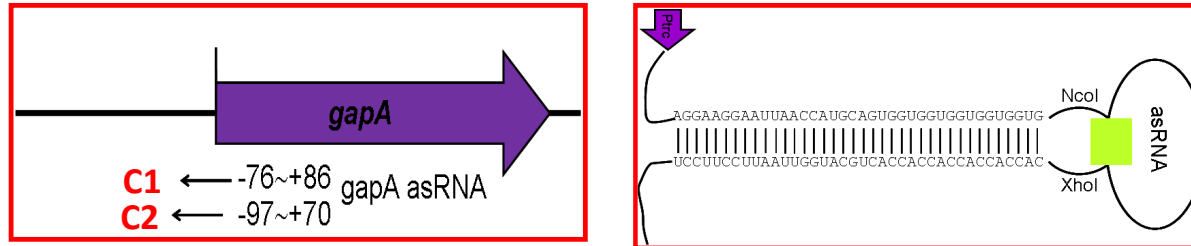


¿Podria GAPDH estar participant en processos de reparació del DNA en *E. coli*?

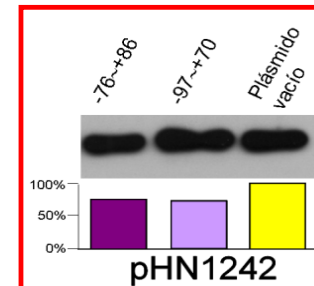
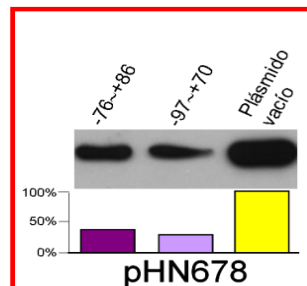
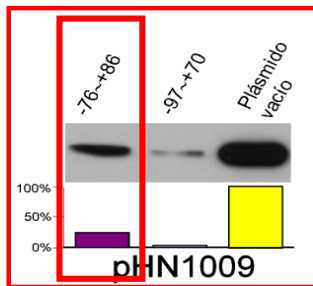
Estudis funcionals:

- Mutació $\Delta gapA$
- Silenciament condicional de *gapA* (asRNA)

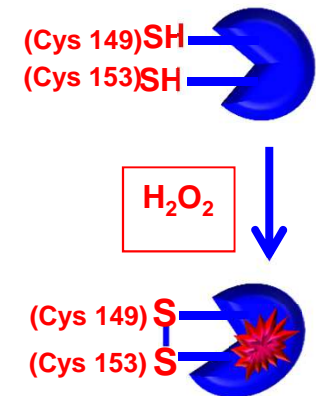
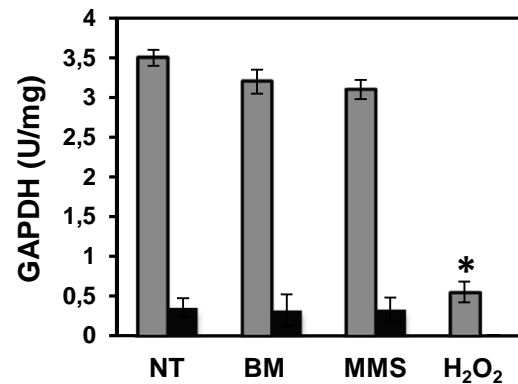
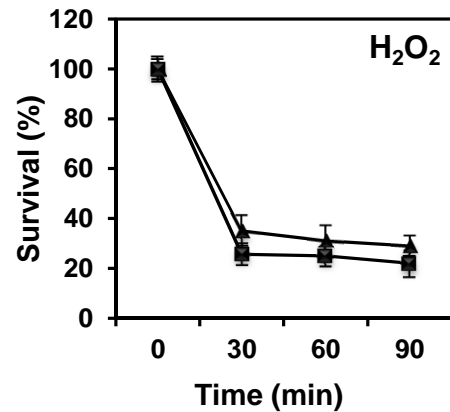
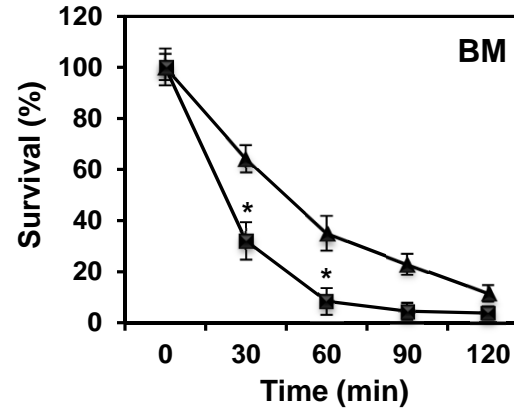
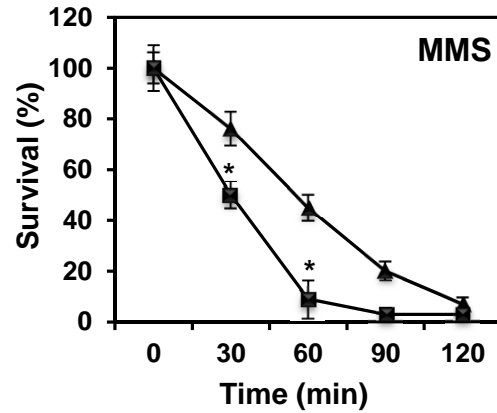
Obtenció d'RNA antisentit pel gen *gapA*



Medio
LB

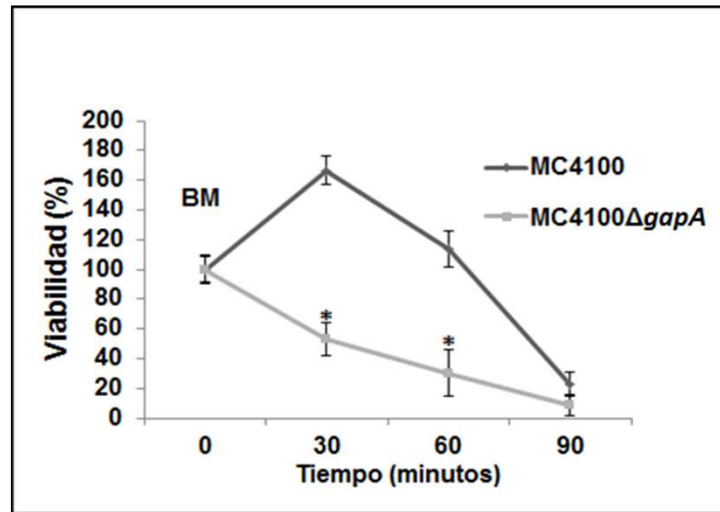
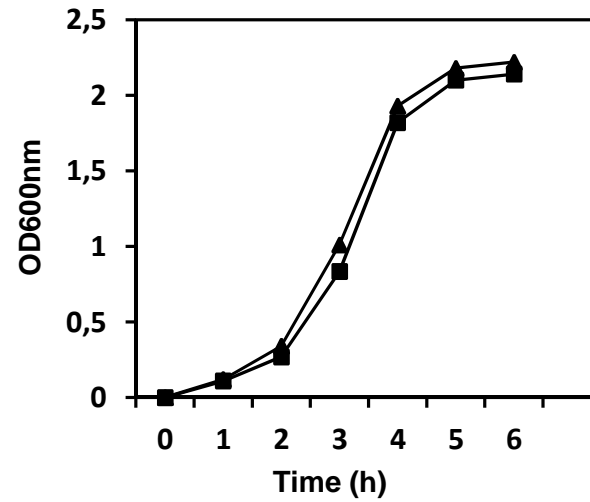


Resposta de cèl·lules silenciades from agents genotòxics (BM, MMS, H₂O₂)



Aquest resultat demostren també la implicació de GAPDH en processos de reparació del DNA *in vivo*, e indiquen que aquesta funció depen de l'estat reduït de la Cys catalítica

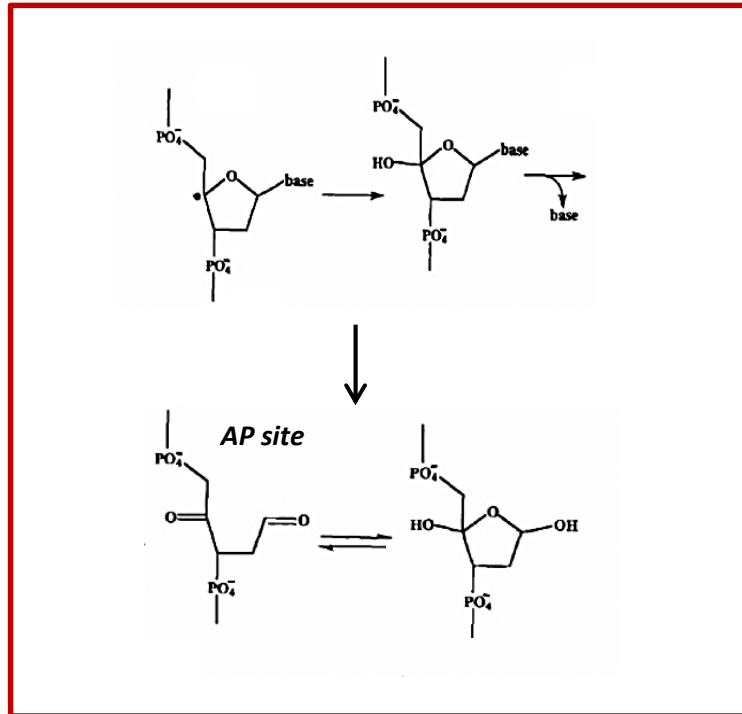
Efecte de la deficiència de GAPDH en la supervivència de cèl·lules exposades a BM



Determinació dels centres abàsics generats espontaneament en el DNA

Determinació en mutants *gapA*

Medi SM-CAA 0.5% + Glicerol 20mM a 0.5 D.O



Povirk, 1996. *Mutat Res.* 355(1-2):71-89.

Centres abàsics/100.000pb

MC4100	MC4100 Δ <i>gapA</i>
8.5 \pm 0.4	12.8 \pm 0.8

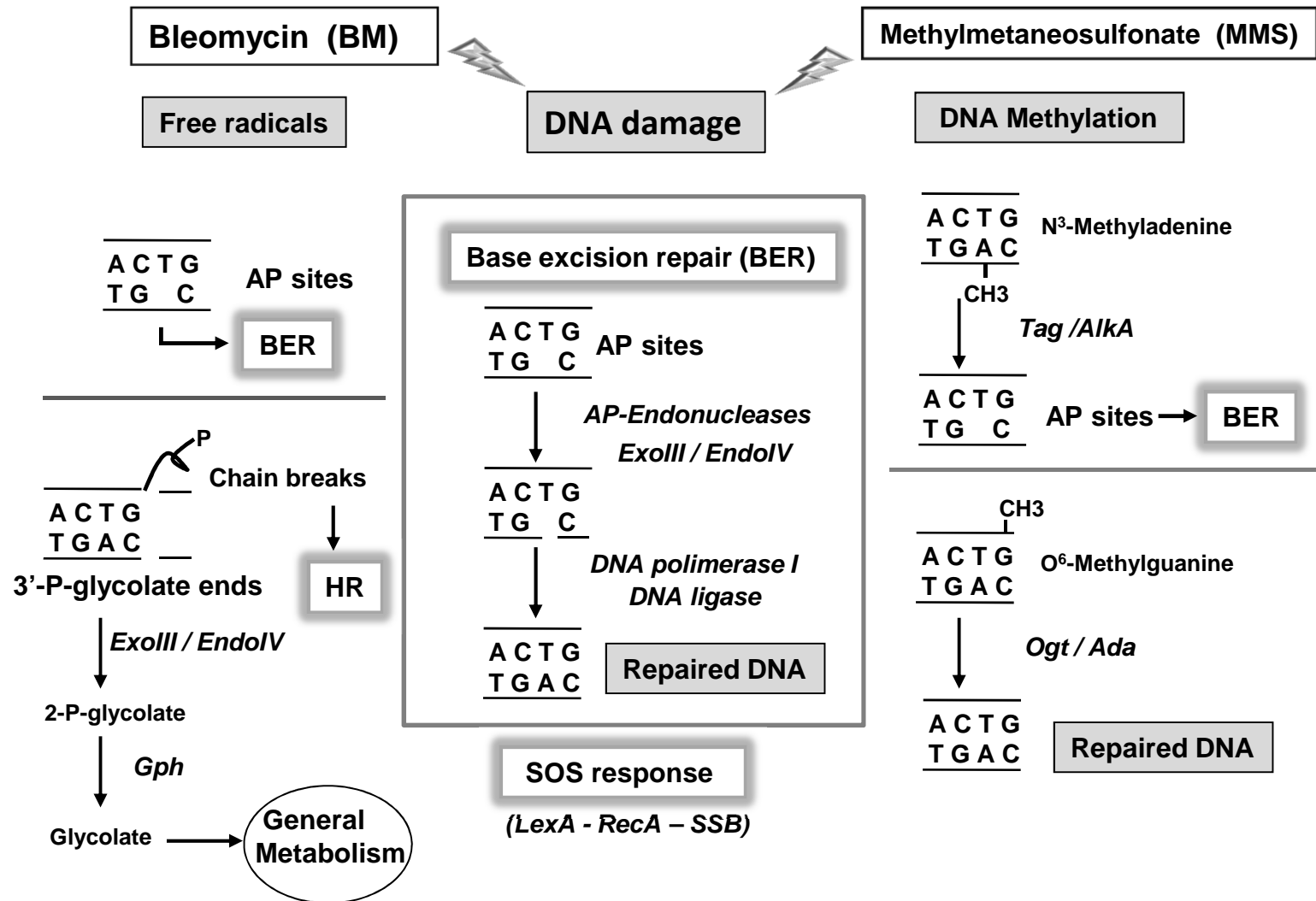
- El mutant *knockout gapA* presenta en el seu genoma un major nombre de centres AP espontànies que la soca parental (1.5x).

μ mol ATP / μ g proteïna

MC4100	MC4100 Δ <i>gapA</i>
7.44 \pm 0.55	8.97 \pm 0.23

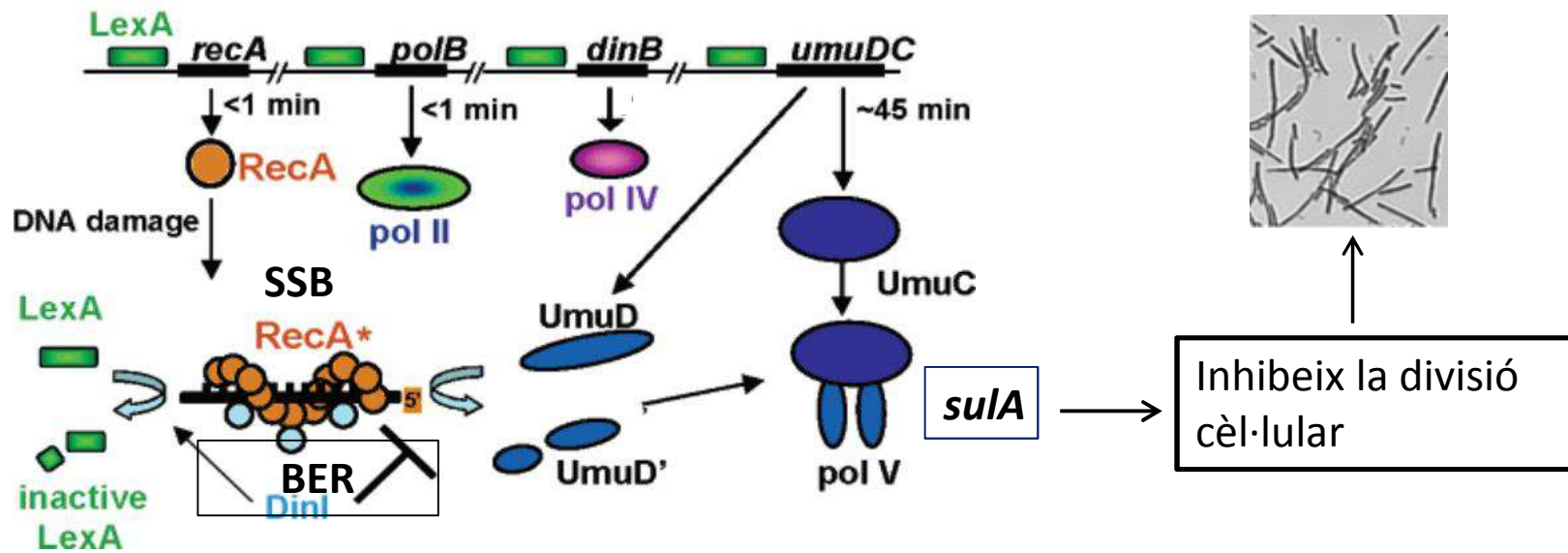
- La menor capacitat de reparació de centres AP en el mutant Δ *gapA* no va associada a una menor disponibilitat d'ATP en les condicions i medis de cultiu assajats.

Sistemes de reparació del dany al DNA per BM, MMS)



Interacció de GAPDH amb fosfoglicolat fosfatasa (Gph)

RESPUESTA SOS

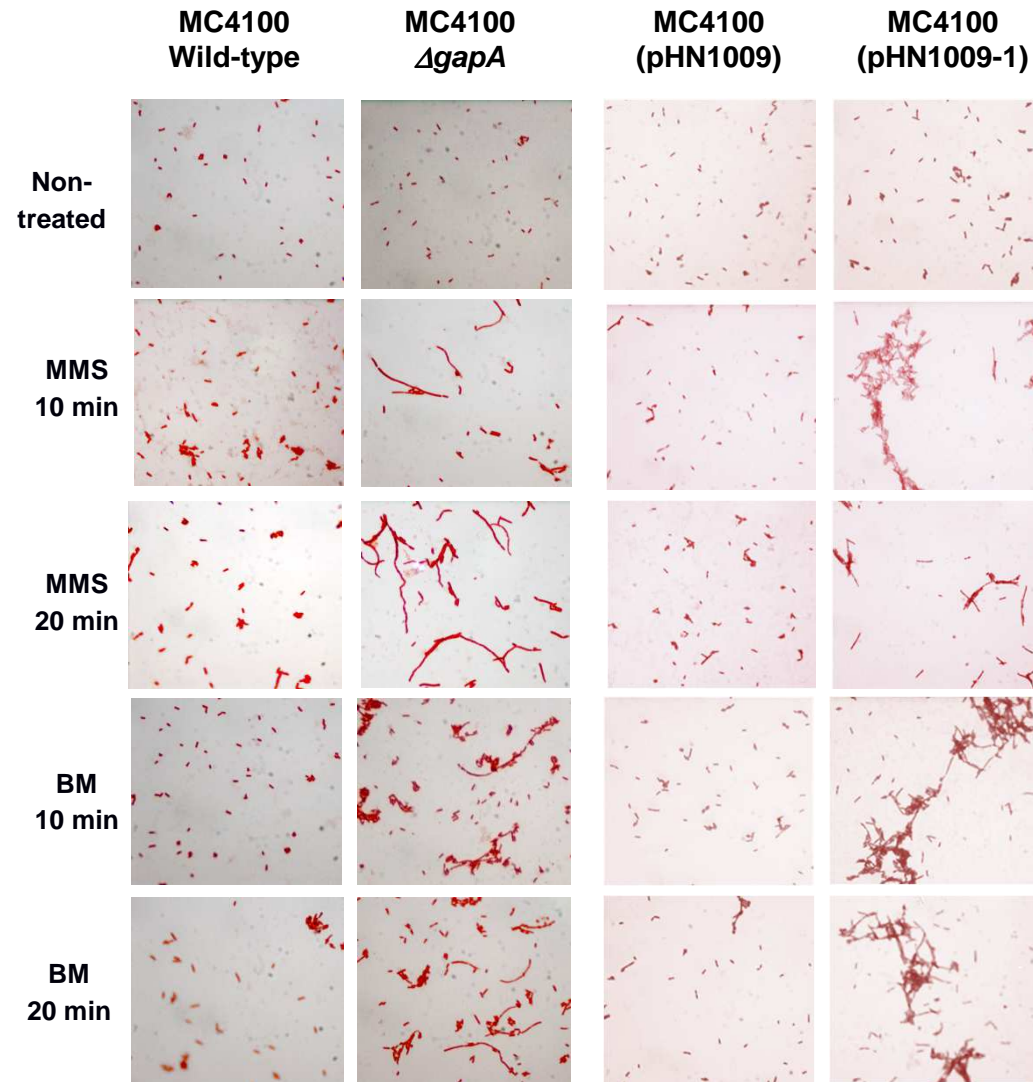


- *xthA*, *nfo*, *nth* (BER)
- *ruvA*, *ruvC* (Respuesta SOS)
- *recF* (Recombinación)

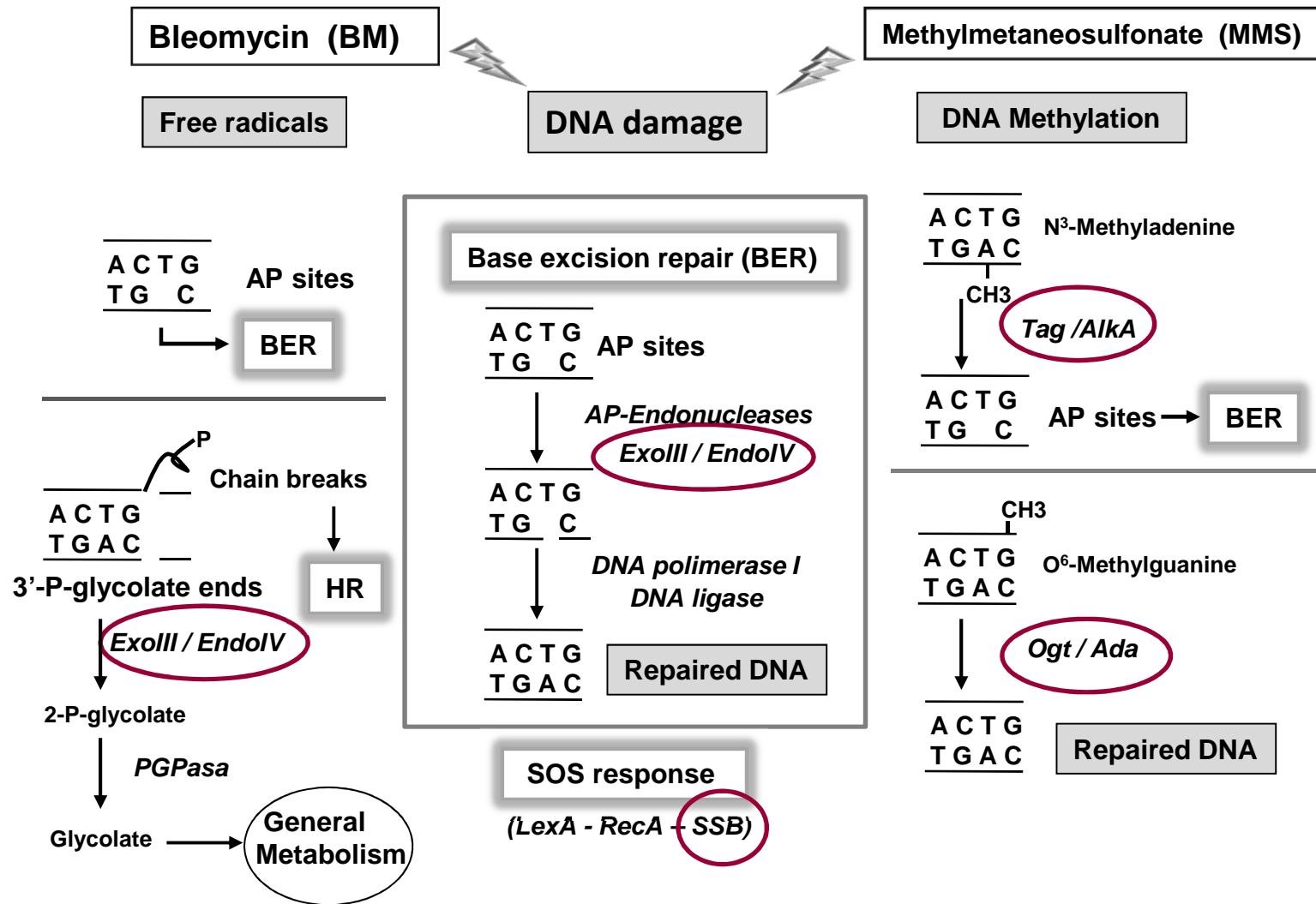
Schlacher et al., 2006. *Angew Chem Int Ed Engl.* 42(26):2946-74.

Sikora et al., 2010. *Mutagenesis.* 25(2):139-47.

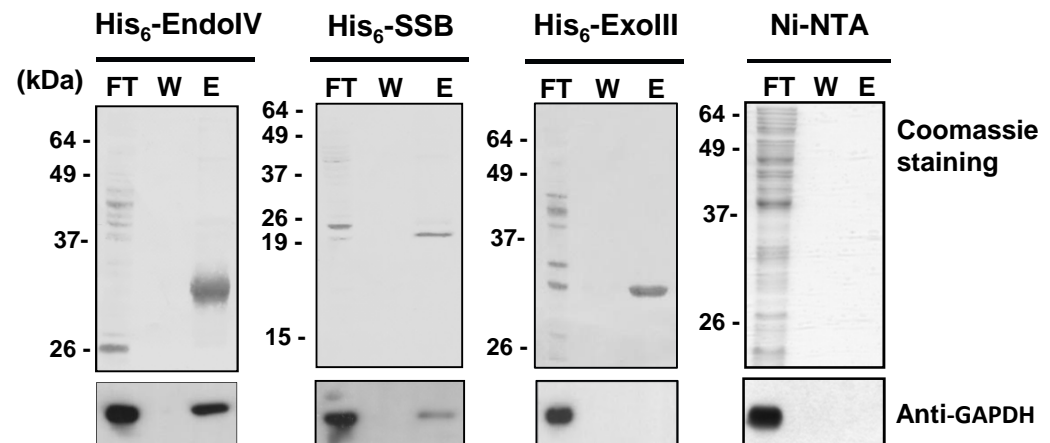
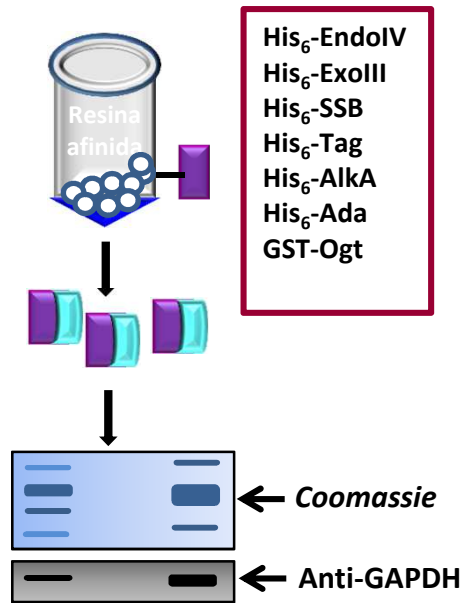
Creixement filamentos de cèl·lules deficientes en GAPDH tractades amb MMS, BM



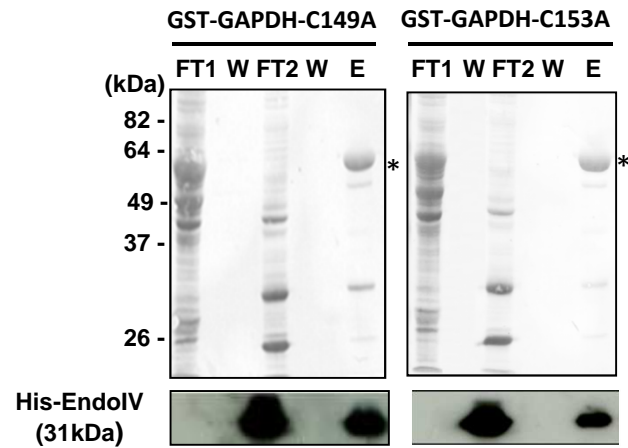
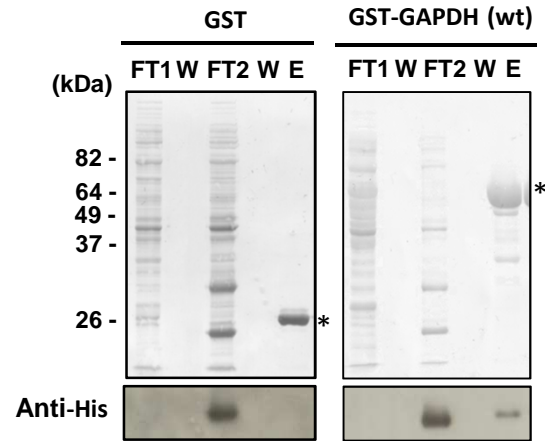
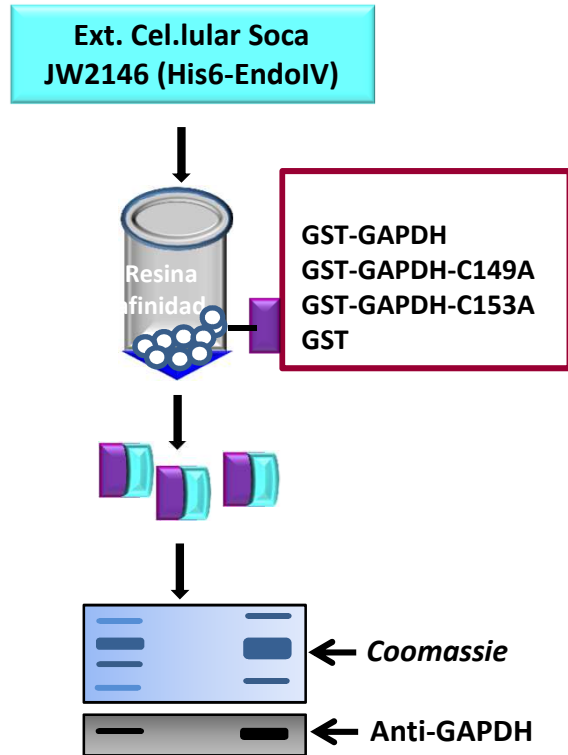
Sistemes de reparació del dany al DNA amb BM, MMS)



Interacció de GAPDH amb altres proteïnes



Interacció de GAPDH amb Endo IV



Activitat uracil DNA-glicosilasa de GAPDH

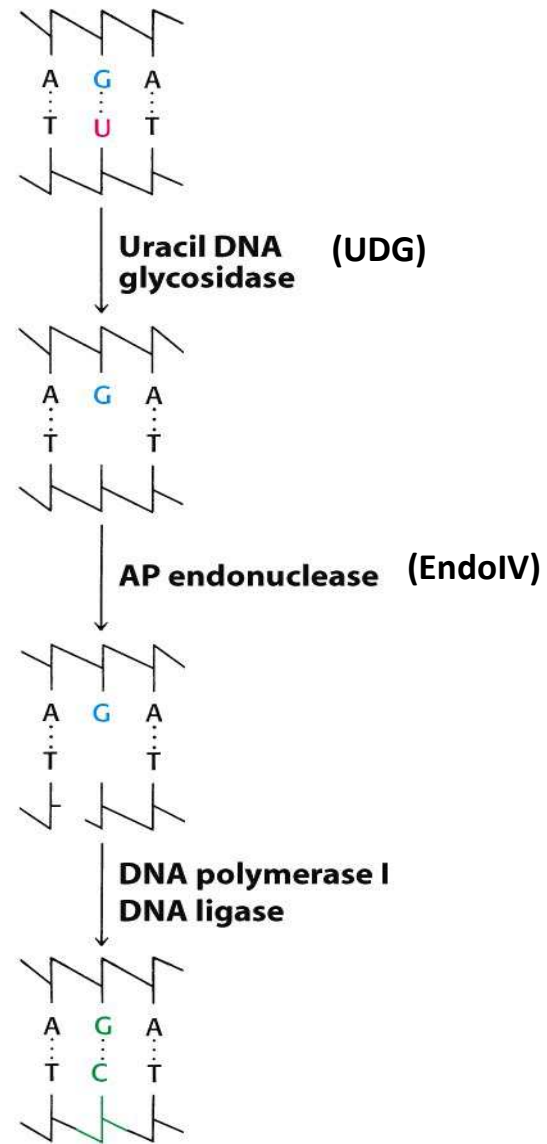
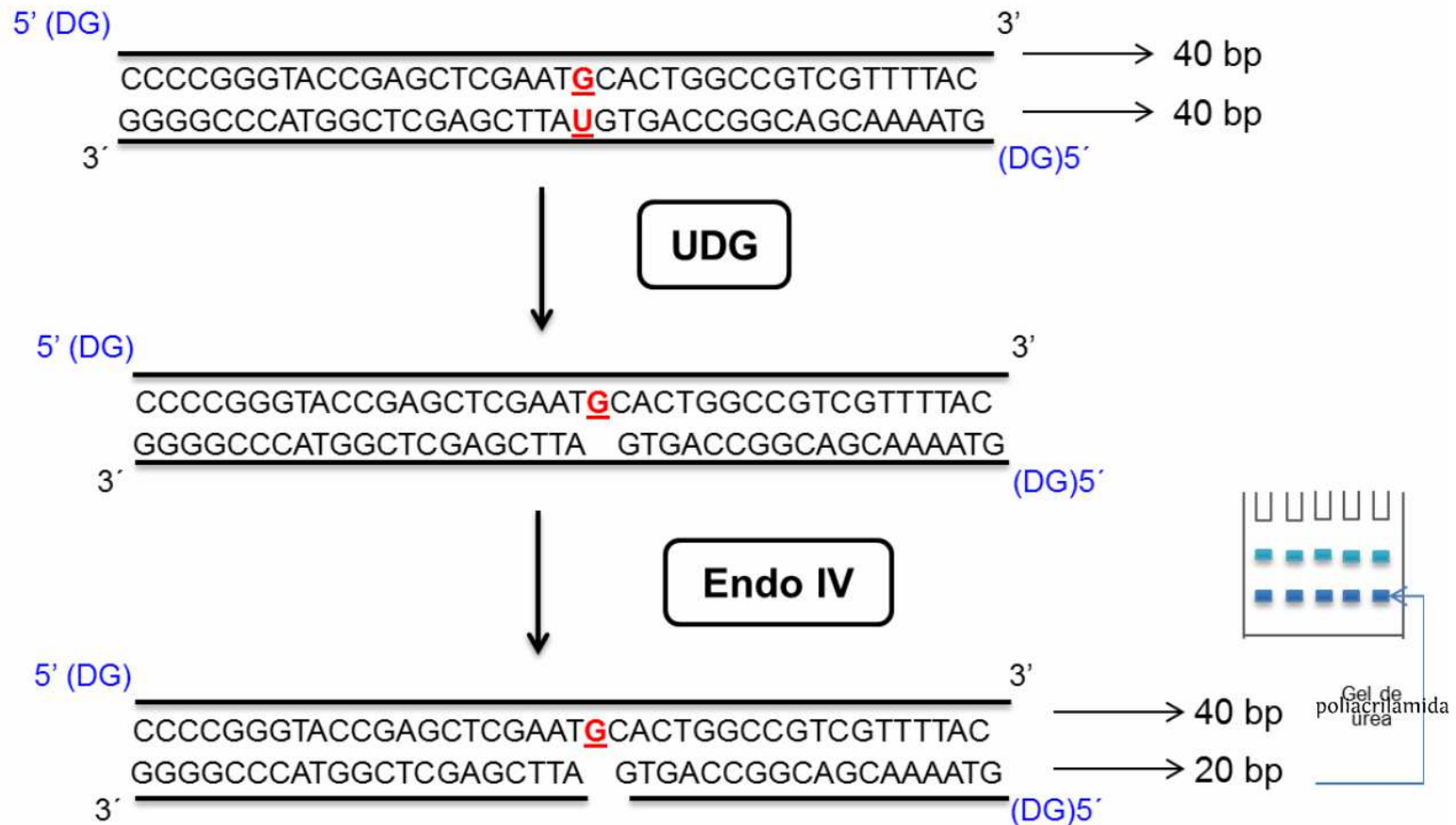


Figure 28.39

Biochemistry, Seventh Edition

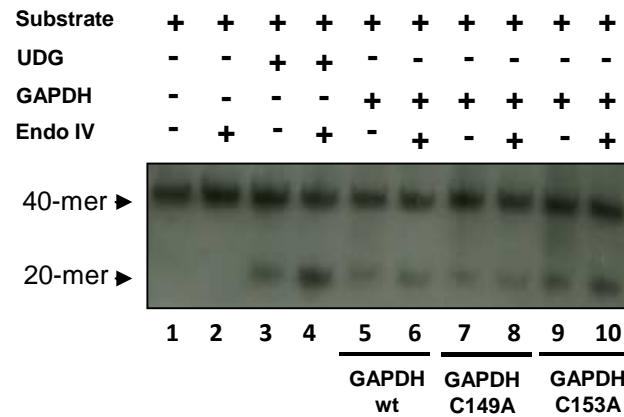
© 2012 W. H. Freeman and Company

Activitat uracil DNA-glicosilasa de GAPDH

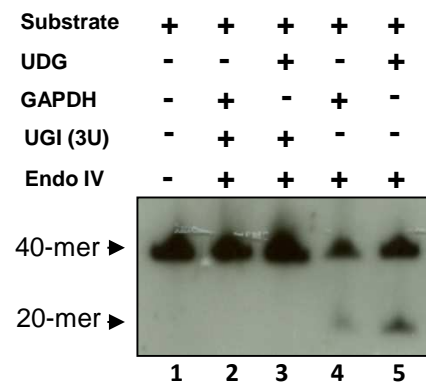


Activitat UDG de GAPDH

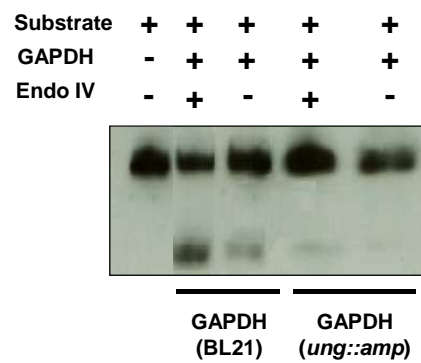
(A)



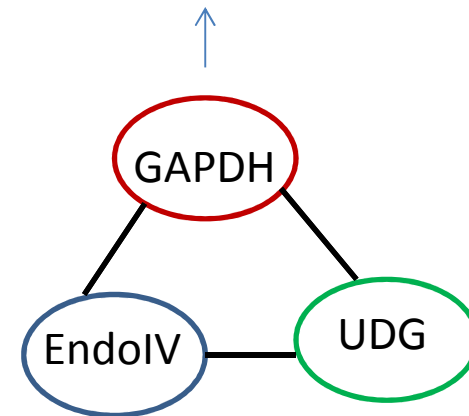
(B)

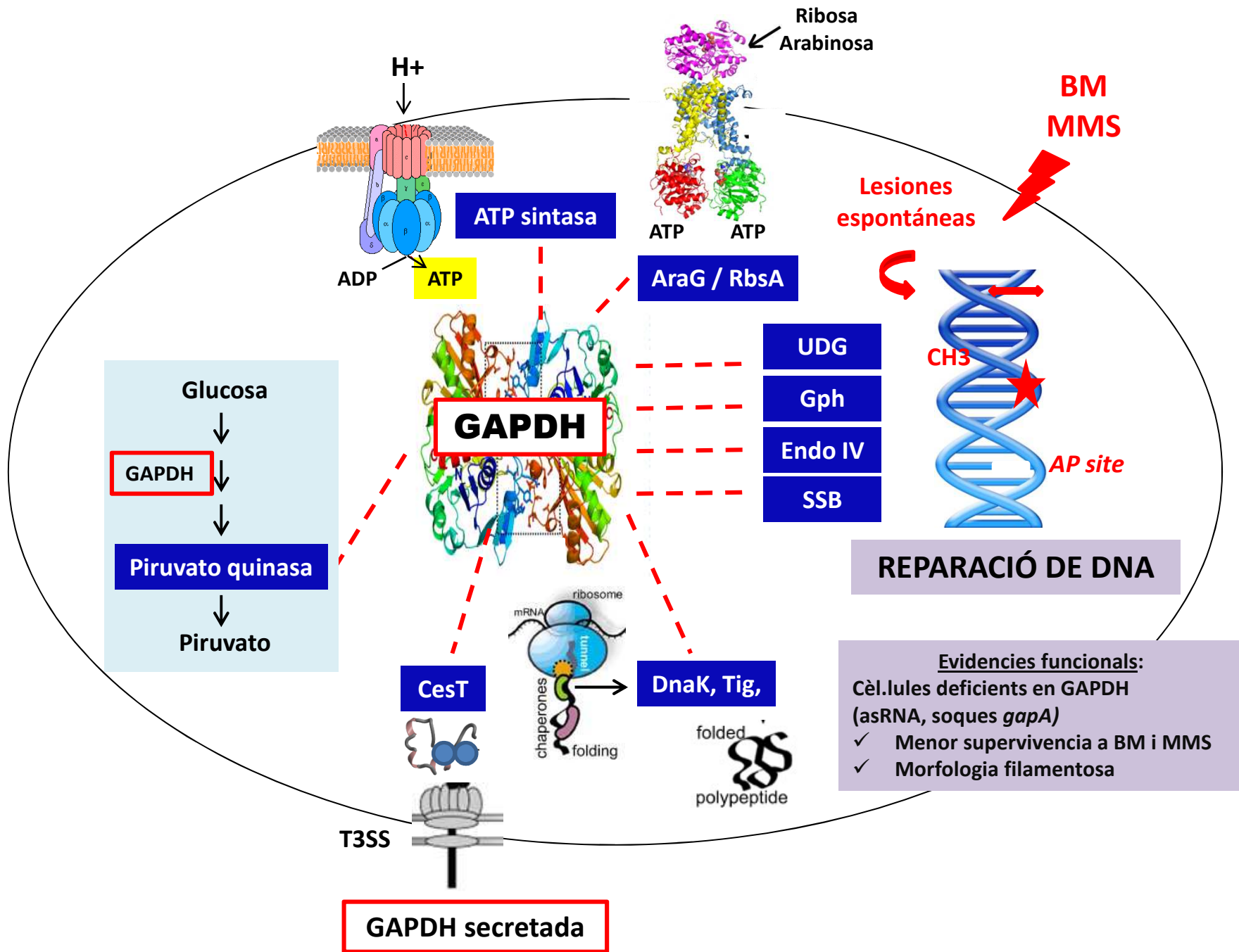


(C)



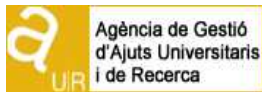
GAPDH no te activitat UDG





Grup: Bioquímica i Biologia Molecular de Microorganismes

Dept. Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Farmàcia



Malaltia Inflamatòria intestinal

