



**FACULTAT DE FARMÀCIA
UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**CARACTERITZACIÓ GENÈTICA I FUNCIONAL DE L'OPERÓ
glc, IMPLICAT EN EL METABOLISME DE GLICOLAT I
GLIOXILAT A *Escherichia coli***

MARIA TERESA PELLICER MOYA

Memòria presentada per MARIA TERESA PELLICER MOYA, llicenciada en Farmàcia per la Universitat de Barcelona, per optar al grau de Doctor en Farmàcia.

Aquesta Tesi Doctoral ha estat realitzada sota la direcció de la Dra Laura Baldomà Llavínés i del Dr Juan Aguilar Píera, al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona.



Maria Teresa PELLICER MOYA

Dra Laura BALDOMÀ LLAVINÉS

Dr Juan AGUILAR PIERA

Barcelona, Abril del 1998

Stephen Jay Gould

"This is truly the age of bacteria: as it was in the beginning, is now and ever shall be"

A la meua família

Voldria agrair aquí l'ajuda que m'han ofert totes les persones que, directament o indirecta, han col.laborat en la realització d'aquesta Tesi.

A la Dra Roser Cussó Fresquet, Directora del Departament de Ciències Fisiològiques Humanes i de la Nutrició, per haver-me permès treballar en aquest departament.

Al Dr Juan Aguilar Piera, co-director d'aquesta Tesi, per haver-me admès en el seu grup de recerca, per haver confiat en les meves possibilitats i per haver-me aconsellat, guiat, valorat i escoltat en tots els moments en que ho he necessitat.

A la Dra Laura Baldomà Llavínès, co-directora d'aquesta Tesi, en primer lloc per haver fet que les seves classes teòriques de Bioquímica em sabessin a poc i per fascinar-me amb la Biologia Molecular. En segon lloc, per haver-me obert les portes al món de la Bioquímica i Biologia Molecular experimental en aquell ja llunyà mes de Setembre del 1991. Et vull agrair la confiança que has dipositat en mi i la llibertat de la qual he gaudit en la meua experimentació, i el fet que sempre he sabut que hi havia una persona amiga a qui preguntar que sempre estava disposada a respondre.

A tots els membres del grup del "Colis", que no són pocs després de tants anys. A la Dra Pepita Badia Palacin, que a més d'ajudar-me en la meua tasca experimental, ha fet que les hores passades en aquest departament hagin estat inoblidables i irrepetibles. Voldria agrair també especialment a la Núria Obradors la seva amistat i les llargues estones compartides en el laboratori gran, el seu intercanvi d'idees i opinions i la llum que m'ha ofert en moments d'ofuscació. No cal oblidar la Rosa Giménez, a qui també agraeixo el seu serè i pulcre ajut.

Tota la gent que vull anomenar a continuació han de tenir en compte que l'ordre no afecta el producte (en aquest cas la importància) dels factors. Vull recordar a la Isa, a en Juan-Carlos (amb qui vam compartir el primer dia de laboratori), a la Pilar, a l'Eva R., a en Tomás, a la Montse (Montserrat!), a la Carme (amb qui vam compartir experiments i reactius), a l'Eva (Niva la alantoina!), a l'Ester (quina és l'extensió de la inserció?), a la Cèlia (sort a la UPC!), a la Felisa (la molt honorable nova "okupa" de la meua ex-poiata), a en Rafa (el as de la informàtica) i a la Susana (Azur de Puig, ¡cómo no!). Espero no haver-me deixat ningú. Si així fós, no siguen malpensats i atribuiu el descuit a les presses de darrera hora.

També vull anomenar altres persones del departament que m'han fet gaudir en molts moments i que estic orgullosa d'haver tingut la oportunitat de conèixer: la Dra. Pujol, bé la Gemma de sempre (una amistat de les de debò, de les que cal cultivar: gràcies per haver-me ajudat en tot moment), la Toni (ja són molts anys de coneixença), la Montse Arrió, en Mandel (company d'aventura americana), l'Àngela, la Domi, la secre Pilar, etc.

I would also like very much to thank Dr Edmund C. C. Lin for his warm hospitality during my stay in Boston. Whenever I think of a friend, your name comes to my mind. I do not want to forget my American lab fellows: Simon (the English man in Boston), Peter (the Belgian friend from Milano), Dimitris (the Greek man), Albidas (the man who came in from the cold Lithuania) and Holly (the only real American girl). Thank you for making me feel at ease away from home. I need to acknowledge Dolly and Bernie Wax (whose house was my home for four months) and Anka and Luis (with whom I shared fridge, kitchen and bathroom).

Finalment, vull agrair a tots aquells qui, lluny dels laboratoris, m'han recolzat en els moments més difícils i m'han ajudat a veure les coses des d'una altra perspectiva: a en Xavi (el meu company de viatge, que m'ha donat ales per volar i gràcies a qui aquest treball ha arribat a bon port), a qui sap tant d'aquesta Tesi com jo (encara que només sigui per ciència infusa, perquè ha estat assentat dins meu durant l'escriptura d'aquest treball), al pare (pel seu suport incondicional i per haver estat sempre allà quan l'he necessitat), a la Joana (la meua germana, la meua petita amiga, per estar sempre disposada a escoltar-me) i a qui, des de lluny, m'ha enviat de manera invisible el seu ajut.

Gràcies a tots!

PRESENTACIÓ

Fins el present treball es creia que el sistema *glc* estava implicat únicament en la capacitat de creixement a expenses de glicolat com a font externa de carboni i energia. S'ha pogut comprovar, però, que aquest juga un paper molt important en el control de la concentració del metabolit intermediari glioxilat. En el locus *glc*, situat al minut 64.5 del cromosoma d'*Escherichia coli*, s'han localitzat i seqüenciat un total de sis gens. Entre ells es troben els que codifiquen les subunitats de la glicolat oxidasa (*glcD*, *glcE*, *glcF*), l'activador transcripcional dels gens estructurals del sistema (*glcC*), una proteïna de funció encara per determinar (*glcG*) i el possible gen del transport del glicolat (*glcT*).

La glicolat oxidasa (enzim localitzat a la membrana citoplasmàtica que catalitza l'oxidació de glicolat per formar glioxilat) ha resultat ser un enzim heteroligomèric, format per tres subunitats catalítiques: dues subunitats (els productes gènics de *glcD* i *glcE*) semblen formar el nucli catalític de l'enzim, mentre que la tercera (producte gènic de *glcF*) sembla ser una subunitat ferrosulfurada a la qual es transfereixen els electrons provinents de l'oxidació de glicolat a glioxilat. La possible implicació del producte gènic de *glcG* en l'anclatge de les subunitats catalítiques a la membrana citoplasmàtica i el paper del producte gènic de *glcT* en el transport de glicolat i altres molècules estructuralment relacionades no han pogut ser definitivament determinades.

Els gens del locus *glc* estan organitzats en una unitat transcripcional que engloba tots els gens estructurals (*glcDEFGBT*) i que es troba sota el control del producte gènic de *glcC* (GlcC), que es transcriu divergentment als gens estructurals i comparteix amb ells zona promotora. Els gens estructurals del locus *glc* tenen una estructura gènica d'operó: existeix un únic promotor funcional situat en posició 5' del gen *glcD* que regula l'expressió simultània de tots ells (*glcDEFGBT*). L'expressió dels gens estructurals és totalment dependent del regulador específic del sistema, GlcC, que és una proteïna amb funció dual: és activador transcripcional de *glcDEFGBT* i repressor de *glcC*.

L'expressió del promotor de *glcDEFGBT* és induïble per diferents fonts de carboni, principalment glicolat i en menor grau glioxilat (*per se* o per la formació intracel·lular de glicolat en una reacció de reducció catalitzada per l'enzim constitutiu glioxilat reductasa).

Altres molècules estructuralment relacionades amb el glicolat (p.e. D-lactat, glicerat, acetat) són capaces d'induir l'expressió de l'operó *glc*. En creixements en glucosa l'operó *glc* està reprimit, tot i que la seva expressió no és nul·la. La repressió exercida en creixements en glucosa no és reversible per l'addició d'AMP cíclic (cAMP) al medi de cultiu, indicant que aquesta no està mediada pel complex CRP-cAMP (Catabolite Repressor Protein).

S'ha demostrat que existeixen diferents factors de transcripció globals que regulen l'expressió dels gens estructurals del sistema *glc*. D'una banda, s'ha pogut comprovar que l'expressió de *glcDEFGBT* és totalment dependent del factor de transcripció IHF (Integration Host Factor). Tant experiments *in vivo* com *in vitro* han mostrat la completa dependència en IHF per la formació del correcte complex nucleoproteic capaç d'iniciar la transcripció, i l'anàlisi *in silico* de la seqüència del promotor ha permès identificar possibles seqüències consens d'unió d'IHF. D'altra banda, s'ha demostrat que la repressió anaeròbica del locus *glc* està mediada a nivell transcripcional pel sistema de dos components ArcB/ArcA. En el promotor de *glcDEFGBT* s'han pogut localitzar les seqüències consens d'unió del regulador transcripcional ArcA. En relació a l'estudi de la unió d'ArcA als seus promotors diana, s'han dut a terme experiments de mutagènesi dirigida de la seqüència consens per ArcA del promotor d'un altre gen relacionat amb el sistema *glc*: el gen *aldA*. El promotor d'aquest gen mostra una seqüència conservada 10/10 respecte al consens per ArcA. S'ha pogut demostrar, tant *in vivo* com *in vitro*, la validesa d'aquest consens, que havia estat proposat i establert anteriorment en base a estudis *in vitro* de diferents sistemes diana d'ArcA.

Existeix una inducció creuada entre els sistemes *glc* i *ace* (que codifica els enzims del cicle del glioxilat, entre ells la malat sintasa A, isoenzim de malat sintasa G, necessaris pel creixement d'*Escherichia coli* en acetat). Sobre tots dos sistemes, els factors IHF i ArcA exerceixen una regulació del mateix signe. El sistema *glc* està induït en creixements en acetat i s'ha comprovat per l'anàlisi de mutants dels dos sistemes que cadascuna de les dues malat sintases pot suplir la funció de l'altra.

El fet que els enzims glicolat oxidasa i malat sintasa G es sintetitzin conjuntament, l'observació que la seva expressió mai no és completament nul·la i que mutants glicolat oxidasa (que són incapaços de transformar glicolat en glioxilat) sobreexpressen el sistema, pot respondre a un mecanisme de seguretat enfront la toxicitat del glioxilat. Quan es sintetitza glicolat oxidasa es sintetitza malat sintasa G, la qual cosa assegura l'eliminació de l'aldehid tòxic per formació de malat. El glioxilat es forma a nivell intracel·lular per oxidació de glicolat, degradació de purines, creixements en acetat i en hidrolitzat de caseïna. Aquest serà ràpidament metabolitzat per acció de la glioxilat reductasa, dels enzims de la via del D-glicerat, per la malat sintasa G i per la malat sintasa A (Figura 1).

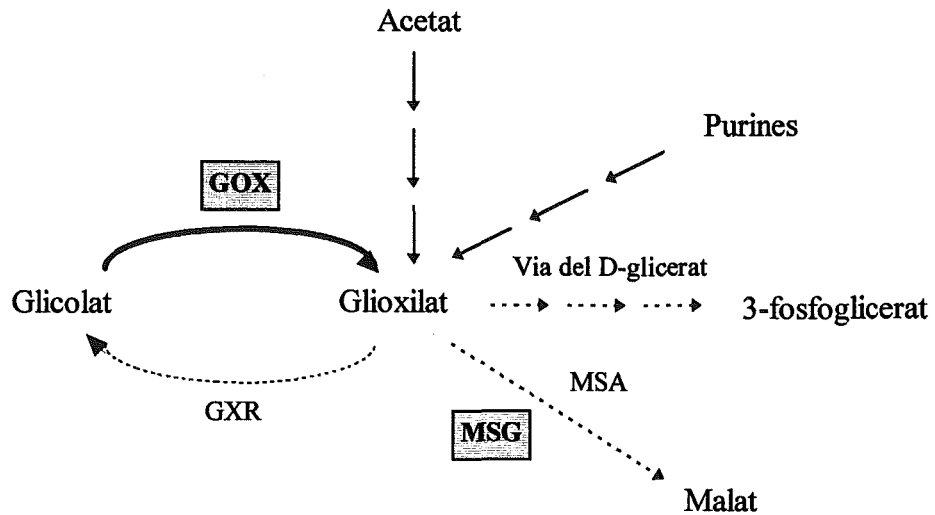


Figura 1. Encreuament metabòlic del glioxilat. Les vies de formació de glioxilat intracel·lular estan indicades amb fletxes de traç continu i les vies que comporten una disminució del glioxilat intern amb traç discontinu. GOX: glicolat oxidasa; GXR: glioxilat reductasa; MSG: malat sintasa G; MSA: malat sintasa A. Els enzims codificats en el locus *glc* estan emmarcats en un rectangle gris. La conversió d'acetat a malat forma part del cicle del glioxilat.

Per tant, la importància del sistema *glc* va més enllà de la capacitat de creixement en presència de glicolat i es situa a nivell de les modulacions en les concentracions de l'intermediari metabòlic glioxilat, ja que codifica enzims que intervenen en la seva formació (glicolat oxidasa) i en el seu metabolisme (malat sintasa G).

ABREVIACIONS

Ap	Ampicil.lina
ArcA	Proteïna repressora anaeròbica
ArcA-P	ArcA fosforilada
ArcA site	Lloc d'unió d'ArcA
ATP	Adenosin-5'-trifosfat
Bisacrilamida	N-N'-metil-bisacrilamida
BSA	Albúmina de sèrum boví
Caa	Hidrolitzat de caseïna
cAMP	Adenosina-5'-monofosfat cíclic
CIAP	Fosfatasa alcalina d'intestí de vedella
Cm	Cloramfenicol
CoA	Coenzim A
codon usage	Freqüència d'utilització de codó
CRA	Activador/repressor per catabolít
CRP	Proteïna receptora de cAMP
Da	Dalton
2,6-DCPIP	2,6-diclorofenolindofenol
DEAE	Dietilaminoetil
DEPC	Dietilpirocarbonat
DMSO	Dimetilsulfòxid
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DNasa	Desoxiribonucleasa
dNTP	Desoxiribonucleòtid
D.O.	Densitat òptica
dsDNA	DNA de doble cadena
DTT	Ditiotreitol
E°	Potencial redox mig
EDTA	Etilendiaminotetracetat
FNR	Fumarat nitrat reductasa
g	Gravetats
GOX	Glicolat oxidasa
GXR	Glioxilat reductasa
IHF	Factor d'integració
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranòsid
kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
Ki	Constant d'inhibició

Km	Constant de Michaelis-Menten
Kn	Kannamicina
LB	Medi de cultiu Luria-Bertrani
mA	Mil.liampers
min	Minut
MSA	Malat sintasa A
mseg	Mil.lisegon
MSG	Malat sintasa G
NAD	Nicotinamida adenina dinucleòtid
NAD(H)	Nicotinamida adenina dinucleòtid (forma reduïda)
nt	Nucleòtid
o/n	Tota la nit ("overnight")
ONPG	<i>o</i> -nitro-fenol-galactopiranòsid
ORF	Marc obert de lectura
pb	Parells de bases
pBS	pBluescript
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PEP	Fosfoenolpiruvat
pfu	Unitats formadores de calves
Pm	Pes molecular
PMS	Fenacina metasulfat
PMSF	Fluorur de fenil-metil-sulfonil
PNK	Polinucleòtid quinasa
qsp	Quantitat suficient per
RNA	Àcid ribonucleic
mRNA	RNA missatger
rRNA	RNA ribosomal
RNasa	Ribonucleasa
tRNA	RNA de transferència
SDS	Dodecil sulfat sòdic
seg	Segon
ssDNA	DNA de cadena senzilla
Tc	Tetraciclina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TMAO	Òxid de trimetilamina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometà
tsp	Punt d'inici de la transcripció
V	Volts
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranòsid

ÍNDEX

I. INTRODUCCIÓ

1. <u>REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA EN PROCARIOTES. CONSIDERACIONS GENERALS I CARACTERÍSTIQUES BÀSIQUES</u>	3
1.1. Models d'organització gènica a procariotes.....	8
2. <u>CONTROL DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA A NIVELL DE L'INICI DE LA TRANSCRIPCIÓ</u>	11
2.1. Elements en <i>cis</i> : seqüències reguladores de la transcripció.....	12
2.2. Elements en <i>trans</i> : repressors i activadors.....	13
3. <u>SISTEMES GLOBAIS DE CONTROL DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA</u>	17
3.1. Activació transcripcional per curvatura del DNA.....	17
3.1.1. El factor IHF.....	18
3.2. Regulació de l'expressió gènica per fonts de carboni: el moduló CRP i el moduló CRA.....	21
3.2.1. El moduló CRP.....	21
3.2.2. El moduló CRA.....	24
3.3. Regulació de l'expressió gènica per disponibilitat d'oxigen.....	28
3.3.1. El moduló FNR.....	29
3.3.2. El moduló ARC.....	31
4. <u>PAPER DELS COMPOSTOS DE DOS CARBONIS EN EL METABOLISME CENTRAL D'<i>Escherichia coli</i></u>	35
4.1. Metabolisme de l'acetat.....	35
4.1.1. Vies metabòliques implicades en la utilització d'acetat com a font de carboni. Cicle dels àcids tricarboxílics (TCA) i cicle del glioxilat.....	35
4.1.2. Organització gènica i regulació de l'operó <i>ace</i>	41
4.2. Metabolisme del glicolat i glioxilat.....	42
4.2.1. Vies metabòliques per la utilització de glicolat i glioxilat a <i>Escherichia coli</i>	44
4.2.2. Organització gènica.....	49
4.2.2.1. Locus <i>gcl</i> . Via del D-glicerat.....	49
4.2.2.2. Locus <i>glc</i>	49

4.3. Característiques diferencials dels isoenzims de malat sintasa a <i>Escherichia coli</i>	49
4.3.1. Diferències genètiques.....	50
4.3.2. Diferències cinètiques i estructurals.....	51

II. MATERIALS

1. <u>SOQUES BACTERIANES</u>	55
2. <u>VECTORS DE CLONATGE</u>	56
2.1. Vectors de clonatge i anàlisi de DNA.....	56
2.2. Vectors per la construcció de fusions de promotor.....	56
2.3. Vectors per l'expressió i purificació de proteïnes.....	57
2.4. Vectors per l'obtenció de fusions en forma de lisògens.....	57
3. <u>OLIGONUCLEÒTIDS</u>	57
4. <u>REACTIUS</u>	58
5. <u>PROGRAMES INFORMÀTICS I BASES DE DADES</u>	58

III. MÈTODES

1. <u>MÈTODES MICROBIOLÒGICS</u>	61
1.1. Cultius bacterians: medis i condicions de creixement.....	61
1.2. Transducció generalitzada amb bacteriòfag P1.....	63
1.2.1. Preparació d'un lisat.....	63
1.2.2. Titulació d'un lisat.....	63
1.2.3. Transducció a genoma.....	64
1.3. Transferència de fusions a genoma mitjançant bacteriòfag λRS45.....	65
1.3.1. Preparació d'un lisat.....	65
1.3.2. Titulació d'un lisat.....	65
1.3.3. Transducció de la fusió des de plasmidi a genoma.....	66

1.4. Obtenció de mutants.....	67
1.4.1. Mutagènesi química amb etilmetanosulfonat (EMS).....	67
1.4.2. Mutagènesi dirigida.....	67
1.4.2.1. Per inserció d'un casset CAT.....	67
1.4.2.2. Mitjançant el kit Sculpture™.....	68
1.5. Obtenció de cèl.lules competents.....	69
1.5.1. Mètodes químics.....	69
1.5.1.1. Mitjançant TFB.....	69
1.5.1.2. Mitjançant CaCl ₂	70
1.5.2. Mètodes físics: electroporació.....	70
2. <u>ANÀLISI I PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES</u>	71
2.1. Obtenció d'extractes cel.lulars i de la fracció de membrana.....	71
2.2. Determinació d'activitats enzimàtiques.....	71
2.2.1. Malat sintasa.....	71
2.2.2. Glicolat oxidasa.....	72
2.2.3. Glioxilat reductasa.....	73
2.2.4. Aldehid deshidrogenasa.....	73
2.2.5. β-Galactosidasa.....	73
2.3. Quantificació de proteïnes: mètode de Lowry.....	74
2.4. Purificació de la malat sintasa G d' <i>Escherichia coli</i>	74
2.5. Purificació d'AraC d' <i>Escherichia coli</i>	75
2.6. Expressió de gens en maxicèl.lules.....	78
2.7. Separació electroforètica de proteïnes en gels de poliàcrilamida (PAGE).....	79
2.8. Detecció de proteïnes en gel.....	80
2.8.1. Tinció amb Coomassie Brilliant Blue.....	80
2.8.2. Fluorografia de proteïnes marcades amb ³⁵ S-metionina.....	81
2.9. Quantificació immunològica de la malat sintasa G d' <i>Escherichia coli</i>	81
2.9.1. Obtenció d'anticossos Anti-malat sintasa G.....	81
2.9.2. Quantificació per electroimmunodifusió segons Laurell.....	82
3. <u>PREPARACIÓ I ANÀLISI DE DNA</u>	83
3.1. Obtenció de DNA plasmídic.....	83
3.1.1. Mètode de lisi alcalina.....	83
3.1.2. Mètode de lisi per ebullició.....	84
3.2. Ressolució i purificació de fragments de DNA.....	85
3.2.1. Separació de fragments de DNA en gels d'agarosa.....	85
3.2.2. Purificació de fragments de DNA a partir de gels d'agarosa.....	85
3.2.3. Separació de fragments de DNA en gels de poliàcrilamida.....	86
3.2.4. Purificació de fragments de DNA a partir de gels de poliàcrilamida.....	86
3.3. Manipulació enzimàtica de DNA.....	87

3.3.1. Endonucleases de restricció.....	87
3.3.2. Marcatge radiactiu de fragments de DNA.....	87
3.3.2.1. Marcatge homogeni de fragments de DNA: “random primed”.....	87
3.3.2.2. Marcatge 5’ terminal mitjançant polinucleòtid kinasa del bacteriòfag T4 (T4 PNK).....	88
3.3.3. Modificació enzimàtica de DNA.....	88
3.3.3.1. Defosforilació de DNA: fosfatasa alcalina d’intestí de vedella (CIAP).....	88
3.3.3.2. Construcció de delecions unidireccionals sistemàtiques: Exonucleasa III i Nucleasa S1.....	88
3.3.3.3. Exonucleasa específica de ssDNA: Nucleasa S1.....	89
3.3.3.4. Nucleasa inespecífica: DNasa I.....	89
3.3.3.5. DNA lligasa de bacteriòfag T4.....	89
3.3.4. Obtenció de DNA de cadena senzilla (ssDNA).....	89
3.4. Construcció de molècules híbrides de DNA.....	90
3.4.1. Subclonatge de fragments de DNA.....	90
3.4.2. Transformació de cèl.lules competents amb DNA plasmídic.....	91
3.4.2.1. Transformació de cèl.lules competents obtingudes per mètodes químics.....	91
3.4.2.2. Transformació de cèl.lules competents obtingudes per mètodes físics.....	91
3.4.3. Selecció de plasmidis recombinants.....	91
3.5. Seqüenciació de DNA. Mètode de Sanger.....	91
3.5.1. Amb subtrats marcats: ³⁵ S-αdATP.....	92
3.5.2. Amb primers marcats: ³² P-γATP.....	93
3.6. Tècnica de PCR (Polymerase Chain Reaction).....	93
3.6.1. Obtenció de fragments de DNA pel seu posterior subclonatge.....	93
3.6.2. Selecció de clons recombinants.....	94
3.6.3. Obtenció de fragments de DNA usats com a sondes.....	94
3.6.4. Obtenció de mutants. “Loose PCR”.....	94
4. <u>CARACTERITZACIÓ DE PROMOTORS</u>	95
4.1. Tècnica de fusió de promotors al gen marcador <i>lacZ</i>	95
4.1.1. Obtenció de fusions en vector multicòpia.....	95
4.1.2. Transferència de fusions de plasmidi a genoma.....	95
4.2. Assajos de retardació en gel (“gel shifts”).....	96
4.2.1. Preparació de la fracció proteica.....	96
4.2.1.1. Obtenció d’extractes crus de proteïna total.....	96
4.2.1.2. Obtenció de proteïna purificada Hys ₆ -Arca.....	97
4.2.2. Preparació del fragment marcat utilitzat com a sonda.....	98
4.2.3. Preparació del gel de poliacrilamida.....	98
4.2.3.1. Condicions de binding amb extractes crus totals.....	98
4.2.3.2. Condicions de binding amb Hys ₆ -Arca purificada.....	99
4.2.4. Reacció d’unió de la proteïna al DNA marcat.....	99

4.2.4.1. Condicions de binding amb extractes crus totals.....	99
4.2.4.2. Condicions de binding amb Hys ₆ -ArcA purificada.....	100
4.2.5. Electroforesi de les mescles de reacció.....	101
4.2.5.1. Per mescles de reacció d'extractes crus.....	101
4.2.5.2. Per mescles de reacció de Hys ₆ -ArcA.....	101
4.3. Assaig de protecció a la DNasa I ("footprinting").....	102
4.3.1. Marcatge del fragment de DNA.....	102
4.3.2. Digestió amb la DNasa I.....	103
4.3.3. Electroforesi de les mescles de digestió.....	104
5. <u>PREPARACIÓ I ANÀLISI D'RNA</u>	105
5.1. Preparació d'RNA total.....	105
5.2. Anàlisi d'RNA per "Northern blot".....	105
5.3. Determinació de l'inici de transcripció per "Primer Extention".....	107

IV. RESULTATS

1. <u>SEQÜENCIACIÓ DE LA REGIÓ CROMOSÒMICA QUE CONTÉ EL SISTEMA GÈNIC <i>glc</i></u>	111
1.1. Localització del(s) gen(s) que codifica(quen) la glicolat oxidasa dins el locus <i>glc</i>	111
1.2. Estratègia de seqüenciació.....	113
1.3. Anàlisi computacional de la seqüència aminoacídica derivada dels diferents marcs oberts de lectura identificats.....	117
1.3.1. Característiques de <i>glcC</i>	117
1.3.2. Característiques de <i>glcD</i> i <i>glcE</i>	118
1.3.3. Característiques de <i>glcF</i>	120
1.3.4. Característiques de <i>glcG</i>	121
1.3.5. Característiques de <i>glcT</i>	122
2. <u>ANÀLISI ESTRUCTURAL I FUNCIONAL DELS GENS DEL SISTEMA <i>glc</i></u>	124
2.1. Expressió dels gens en maxicèl.lules.....	124
2.2. Localització subcel.lular de les subunitats de l'enzim glicolat oxidasa.....	126
2.3. Anàlisi funcional del productes gènics del locus <i>glc</i> per disrupció dels gens del sistema.....	127
3. <u>ORGANITZACIÓ GÈNICA DEL LOCUS <i>glc</i></u>	131
3.1. Anàlisi de l'organització transcripcional mitjançant Northern Blot.....	131

3.2. Anàlisi de l'organització transcripcional mitjançant fusions de promotor al gen <i>lacZ</i> . Identificació de promotors funcionals.....	133
3.3. Identificació de l'inici de transcripció de les dues unitats transcripcionals del sistema <i>glc</i>	135
3.4. Anàlisi funcional del promotor de l'operó <i>glc</i> per deleccions de l'extrem 5'.....	137
4. <u>FACTORS TRANSCRIPCIONALS QUE REGULEN L'EXPRESSION DEL SISTEMA GÈNIC <i>glc</i></u>	139
4.1. Factors de transcripció específics del sistema <i>glc</i> . Paper de la proteïna GlcC.....	139
4.1.1. Expressió en mutants <i>glcC</i>	140
4.1.2. Efecte dosi de la proteïna GlcC sobre l'expressió de $\Phi(glcD-lacZ)$	141
4.1.3. Estudis de retardació de la mobilitat electroforètica amb extractes crus de la soca salvatge i de mutants <i>glcC</i>	142
4.2. Factors de transcripció globals que regulen l'expressió del sistema <i>glc</i>	144
4.2.1. Activació transcripcional per curvatura del DNA. Paper de la proteïna IHF.....	144
4.2.1.1. Expressió en mutants IHF.....	144
4.2.1.2. Estudis de retardació de la mobilitat electroforètica amb extractes crus de la soca salvatge i de mutants IHF.....	145
4.2.1.3. Localització de la possible caixa d'unió d'IHF al promotor de <i>glcD</i>	147
4.2.2. Repressió catabòlica.....	147
4.2.3. Regulació aeròbica/anaeròbica del sistema <i>glc</i>	148
4.2.3.1. Expressió dels promotor de <i>glcD</i> i <i>glcC</i> en condicions d'anaerobiosi.....	149
4.2.3.2. Expressió del sistema <i>glc</i> en mutants <i>arcA</i>	151
4.2.3.3. Estudis d'unió de la proteïna ArcA al promotor de <i>glcD</i>	152
4.2.3.3.1. Estudis de retardació de la mobilitat electroforètica del promotor de <i>glcD</i> amb proteïna Hys ₆ -ArcA purificada.....	152
4.2.3.3.2. Localització de les caixes d'unió a ArcA-P en el promotor de <i>glcD</i>	153
5. <u>VALIDACIÓ DE LA SEQÜÈNCIA CONSENS D'ArcA-P USANT COM A MODEL EL PROMOTOR D'<i>aldA</i></u>	155
5.1. Estudi de la retardació de la mobilitat electroforètica del promotor salvatge amb proteïna Hys ₆ -ArcA purificada.....	156
5.2. Localització de les caixes d'unió a ArcA-P en el promotor d' <i>aldA</i>	158
5.3. Obtenció de mutants en la caixa ArcA-P situada en la regió -10 del promotor d' <i>aldA</i> mitjançant mutagènesi dirigida.....	160
5.4. Anàlisi dels mutants en la caixa ArcA-P (ArcA site I) del promotor d' <i>aldA</i>	162
5.4.1. Anàlisi mitjançant fusions de promotor al gen <i>lacZ</i>	162
5.4.2. Estudis de retardació de la mobilitat electroforètica.....	163
5.4.3. Estudis de protecció a la DNasa I.....	164

6. <u>EXPRESSIÓ DEL SISTEMA <i>glc</i> EN FUNCIÓ DE MODULACIONS DEL METABOLISME CENTRAL CONFLUENT EN L'INTERMEDIARI GLIOXILAT</u>	165
6.1. Inducció creuada dels sistemes <i>glc</i> i <i>ace</i>	165
6.1.1. Anàlisi genètica.....	165
6.1.2. Anàlisi enzimàtica.....	167
6.1.3. Expressió del sistema <i>glc</i> per acetat mitjançant fusions transcripcionals.....	169
6.2. Efecte de diferents fonts de carboni sobre l'expressió de l'operó <i>glc</i>	171
6.3. Efecte de mutacions en els gens estructurals del sistema <i>glc</i> sobre el patró d'expressió de l'operó <i>glcDEFGBT</i>	173

V. DISCUSSIÓ

1. <u>LA GLICOLAT OXIDASA D'<i>Escherichia coli</i> ÉS UN ENZIM HETEROLIGOMÈRIC LLIGAT A LA MEMBRANA CITOPLASMÀTICA</u>	177
2. <u>EL LOCUS <i>glc</i> TÉ UNA ESTRUCTURA GÈNICA D'OPERÓ</u>	185
3. <u>L'EXPRESSIÓ DELS GENS ESTRUCTURALS <i>glcDEFGBT</i> ÉS TOTALMENT DEPENDENT DELS FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ GlcC i IHF</u>	187
3.1. Paper de GlcC en la transcripció de <i>glcDEFGBT</i>	187
3.2. Paper de GlcC en la transcripció de <i>glcC</i>	192
3.3. Paper d'IHF en la transcripció de <i>glcDEFGBT</i>	193
4. <u>LA REPRESSIÓ ANAERÒBICA DE L'OPERÓ <i>glcDEFGBT</i> ESTÀ MEDIADA PEL SISTEMA DE DOS COMPONENTS ArcB/ArcA</u>	197
5. <u>LA MUTAGÈNESI DIRIGIDA DE LA SEQÜÈNCIA D'UNIÓ D'<i>ArcA</i> AL PROMOTOR D'<i>aldA</i> CONFIRMA LA FUNCIONALITAT DE LA SEQÜÈNCIA CONSENS PROPOSADA PER LYNCH I LIN</u>	200
6. <u>IMPORTÀNCIA DEL SISTEMA GÈNIC <i>glc</i> EN EL MANTENIMENT DELS NIVELLS INTRACEL·LULARS DE GLIOXILAT</u>	204

6.1. L'estructura d'operó dels gens estructurals del sistema *glc* facilita el control dels nivells intracel.lulars de glioxilat.....204

6.2. Importància de la inducció creuada dels sistemes *glc* i *ace*.....206

6.3. L'expressió de *glcDEFGBT* depèn del fluxe de carbonis.....209

6.4. Formació endògena de glicolat.....212

VI. CONCLUSIONS.....217

VII. BIBLIOGRAFIA.....221

INTRODUCCIÓ

I. INTRODUCCIÓ

1. REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA EN PROCARIOTES. CONSIDERACIONS GENERALS I CARACTERÍSTIQUES BÀSIQUES

Les primeres formes de vida van sorgir en el nostre planeta poc després de l'aparició de l'aigua líquida sobre la Terra. Durant 3000 milions d'anys les úniques formes de vida existents eren microbianes, bàsicament eubacteris i arqueobacteris, ja que gràcies a la seva versatilitat bioquímica eren capaços d'adaptar-se a les extremes i canviants condicions de l'ambient terraquí. L'exclusivitat de les formes de vida microbianes era conseqüència, entre d'altres coses, de la supervivència inclús en condicions d'absència de nutrients per entrada en l'anomenada fase estacionària i la subsistència utilitzant materials endògens com a nutrients (Nyström *et al*, 1996). Precisament és aquesta increïble capacitat d'adaptació al medi que les envolta el que ha permès que continuïn existint i proliferant avui dia, en ambients tant variats que van des dels llacs salats i les salines (p.e. *Halococcus* o *Halobacterium*), les arrels de plantes (p.e. *Agrobacterium*) fins a les aigües corrents urbanes i al tracte intestinal de mamífers (p.e. *Escherichia*). Aquests diferents ambients no són estàtics i els bacteris han de ser capaços de sentir i respondre als canvis per poder sobreviure.

Els bacteris no només responen a canvis en el medi que els envolta sinó també als canvis generats per altres organismes (altres bacteris o organismes superiors). De manera similar als canvis cel·lulars que ocorren en un embrió mamífer, grups de cèl·lules procariotes poden rebre senyals dels altres membres del grup i així coordinar el seu comportament per construir estructures multicel·lulars complexes. La transferència d'informació entre cèl·lules bacterianes determina la diferenciació i la morfogènesi en un ampli ventall de sistemes

bacterians, que van des de la inducció de luminiscència a *Vibrio*, a l' esporulació a *Bacillus* o la formació d'hifes aèries a *Streptomyces*. Els mecanismes de comunicació entre diversos tipus de bacteris són molt variats. Contràriament de la visió dels bacteris com a entitats vives auto-suficients, aquests són uns éssers colonials que usen un complex sistema d'interrelació que els permet l'adaptació al medi i per tant es pot establir que el comportament cooperatiu és prevalent en el món procariòtic (Kaiser i Losick, 1993). De la mateixa manera poden rebre senyals i emetre senyals a eucariotes superiors (Shapiro *et al*, 1993) (Mel i Mekalanos, 1996). Aquesta pauta de comportament complex, demostrada per l'existència de sexe (intercanvi de material genètic per transmissió horitzontal), memòria, capacitat de decisió i comunicació entre ells (Moxon i Higgins, 1997) ha afavorit la selecció i l'evolució bacteriana al llarg d'aquests milions d'anys.

Escherichia coli ha desenvolupat diversos sistemes metabòlics per generar energia i un programa de regulació genètica que li permet seleccionar el sistema més eficient en cada ambient determinat (Iuchi i Lin, 1991). Per tant, en el desenvolupament bacterià hi ha dos objectius que el bacteri intenta aconseguir: una màxima velocitat de creixement amb la mínima despesa energètica possible.

Per dur a terme aquesta adaptació al medi que els envolta, els bacteris han de modificar diferents enzims. Aquests enzims pertanyen a les rutes metabòliques implicades en la utilització del substrat que en aquell moment està disponible (i en cas que existeixi més d'un substrat, el que proporciona un rendiment energètic més favorable) i també als citocroms, oxidases i deshidrogenases necessàries per utilitzar un tipus d'acceptor d'electrons en concret, etc. El bacteri només sintetitzarà les proteïnes que li són imprescindibles per créixer i dividir-se. Aquest fenomen s'ha pogut observar mitjançant la resolució en gels de poliacrilamida bidimensionals de proteïnes d'extractes cel·lulars, obtinguts creixent bacteris en diferents condicions (O'Farrell, 1975).

Els bacteris, lluny de ser uns petits contenidors de reaccions enzimàtiques o simplement tubs d'assaig per dur a terme clonats, contenen els principis fonamentals de recepció de senyals externs, les vies de transducció de senyals i les jerarquies genètiques que han permès la seva evolució i que s'han conservat des d'ells fins als humans (Shapiro *et al*, 1993). La maquinària que hi ha al darrera de la resposta adaptativa bacteriana té els engranatges fonamentals de tots els sistemes sensorials cel·lulars: detecció de l'estímul, amplificació i integració dels impulsos sensorials i producció de les respostes adequades (Parkinson, 1993). Un dels mecanismes de comunicació entre la recepció i la transmissió d'estímuls que s'ha demostrat que existeix en bacteris és el de fosforilació/defosforilació. Aquesta modificació reversible de proteïnes és una estratègia ubíqua en el món procariota.

Una altra característica de la fisiologia bacteriana és l'assimetria en la localització de proteïnes a nivell cel.lular. La cèl.lula bacteriana està organitzada en diferents dominis localitzats específicament en distintes zones. Per exemple, la maquinària de quimiotaxis està localitzada als pols de la cèl.lula i la maquinària per la divisió cel.lular en un pla equatorial a la longitud del bacteri (Shapiro, 1993). És sorprenent que la cèl.lula bacteriana, desprovista d'òrgànuls cel.lulars i massa petita per dependre de la difusió com a mecanisme de recerca de nutrients, localitzi complexos cel.lulars en regions específiques de la cèl.lula. Els arranjaments cel.lulars es duen a terme per canvis en la distribució proteica i també per canvis en la composició enzimàtica.

El canvi en la composició enzimàtica és un procés molt regulat, en el qual intervenen molts factors i proteïnes reguladores i que en global reb el nom regulació de l'expressió gènica. El contingut enzimàtic d'una cèl.lula també pot variar en diferents situacions en funció del recanvi proteic (estabilitat de la proteïnes). La regulació de l'expressió gènica pot dur-se a terme en totes les etapes que estan implicades en la síntesi d'una proteïna, des que el gen que la codifica es comença a transcriure fins que la proteïna és funcional.

Els diferents nivells de regulació de l'expressió gènica són:

- a nivell de l'estructura del DNA (metilacions i superenrollament condicionen la capacitat d'activació d'un gen);
- a nivell transcripcional: control de l'inici i de l'acabament de la transcripció;
- a nivell de l'estabilitat de l'mRNA;
- a nivell traduccional, i
- a nivell post-traduccional.

L'estructura del DNA és un regulador de l'expressió gènica. El fenomen de la metilació és un senyal indicador de l'estat del bacteri dins el seu cicle cel.lular, per tant permet la regulació de l'expressió dels gens implicats en aquest cicle. La metilació de diferents gens d'*Escherichia coli* per la desoxiadenosina metilasa (proteïna codificada pel gen *dam*), que transfereix restes metil a la posició 6 de la desoxiadenosina només quan aquesta forma part de la seqüència GATC, indueix un canvi estructural en el DNA. Aquestes alteracions en l'estructura del DNA provoquen canvis en l'expressió d'alguns gens. La metilació, en la majoria dels gens, provoca un descens de 2 a 5 cops en la seva expressió, a causa de l'alteració estructural de les seves zones promotores, que impedeix l'inici de la transcripció. Encara que

és menys freqüent, s'ha observat que en alguns casos, p.e. els gen *mioC* i *dnaA*, la metilació pot provocar una activació de l'expressió gènica (Cedar, 1988).

La topologia del DNA és també un factor que regula la seva expressió. El superenrollament del DNA *in vivo* no és constant sinó que varia en funció de les condicions de creixement o de la presència de diferents estímuls. La DNA girasa és l'enzim encarregat d'introduir i mantenir el superenrollament del DNA bacterià, mentre que la DNA topoisomerasa I el disminueix. Els gens que controlen el grau de superenrollament estan regulats per aquest mecanisme. Quan el grau de superenrollament disminueix, augmenta l'expressió de *gyrA* i *gyrB* (que codifiquen les dues subunitats de la DNA girasa) i disminueix la de *topA* (que codifica la DNA topoisomerasa I). L'expressió de *gyrA* i *gyrB* disminueix i la de *topA* augmenta en la situació contrària (Pruss i Drlica, 1989).

El nivell de regulació més relevant per la majoria dels gens és el transcripcional, i en concret el control de l'inici de transcripció, ja que és limitant en la síntesi proteica i proporciona un estalvi energètic molt important per la cèl.lula. Un exemple molt estudiat d'aquest fenomen és el de l'operó *lac*, l'expressió del qual és necessària pel creixement d'*Escherichia coli* en lactosa com a única font de carboni i energia. El bacteri disposa de mecanismes de regulació que li permeten activar l'expressió d'aquest operó quan només hi ha lactosa en el medi, però no quan hi ha lactosa i per exemple glucosa. En aquest cas la cèl.lula atura l'expressió de l'operó *lac* fins que no s'esgoti la glucosa (la utilització preferent d'aquest nutrient enfront la lactosa es deu al major rendiment energètic que aporta). En aquest exemple, la regulació de l'expressió gènica es dona a nivell de l'inici de la transcripció. És també un cas en el qual més d'un tipus de regulació ajuda a mantenir un estret control sobre el nombre de molècules d'mRNA sintetitzat.

La regulació de l'expressió de diferents gens també pot estar controlada a nivell de l'acabament de la transcripció. Aquest és el cas de l'operó *trp*, que codifica pels enzims implicats en la biosíntesi del triptòfan, i que a més de tenir controlat el seu inici de transcripció, té un mecanisme de regulació de l'acabament de la transcripció. Aquest mecanisme s'exerceix per la terminació prematura dels transcrits iniciats. Aquest acabament de la transcripció, que succeeix només quan en el medi hi ha triptòfan, reb el nom d'atenuació. Així, només quan el bacteri es trobi en un ambient deficient en triptòfan es posarà en marxa la seva síntesi endògena. Un altre mecanisme de control de l'acabament de la transcripció s'anomena antiterminació, i s'exerceix per modificació dels punt de terminació de la transcripció. Aquesta modificació la duen a terme proteïnes que s'uneixen a la cadena naixent d'mRNA i eviten la terminació independent del factor de terminació de la transcripció rho (ρ) dels gens que regulen. Un exemple de mecanisme d'antiterminació és el que es dona a l'operó *bgl* (Houman *et al*, 1990).

Els procariotes tenen acoblats els mecanismes de replicació, transcripció i traducció de manera que abans que acabi de replicar-se el DNA i de transcriure's tot un gen ja s'està sintetitzant la proteïna derivada (traduint la seqüència de ribonucleòtids a aminoàcids). De totes maneres, l'estabilitat dels mRNAs és també un mecanisme regulador de l'expressió gènica ja que la quantitat d'mRNA determina la capacitat de síntesi proteica. L'estabilitat dels mRNAs està en gran mesura controlada per la regió 5' no traduïda (UTR, *untranslated region*). Existeixen mRNAs amb temps de vida mitja molt llargs (p.e. *ompA*, $t_{1/2} = 17$ min) que disminueixen cinc vegades la seva vida mitja quan es deleta el 85 % de la zona 5' no traduïda. Aquest element estabilitzador augmenta també cinc vegades el temps de vida mitja dels mRNAs als quals es fusiona artificialment (p.e. el $t_{1/2}$ de *bla* és 3.6 min; quan se li fusiona l'element UTR d'*ompA*, el $t_{1/2}$ passa a ser de 17 min) (Hansen *et al*, 1994). L'estabilitat de l'mRNA, que està en gran mesura controlada per l'enzim RNasa E (Cohen i McDowall, 1997), és molt variable depenent de les condicions mediambientals en les quals es trobi el bacteri. Així, en condicions anaeròbiques de creixement, *Escherichia coli* augmenta la vida mitja dels seus mRNAs de manera que la poca energia disponible en aquestes condicions pugui ser destinada al creixement i la duplicació bacteriana i no a transcriure repetidament un gen (Georgellis *et al*, 1993).

La traducció també està regulada en procariotes. El mecanisme de control s'exerceix sobre la zona compresa entre l'extrem 5' i el triplet d'iniciació de la traducció de l'mRNA (normalment ATG en els mRNAs bacterians). En aquesta zona la majoria dels mRNAs tenen una seqüència anomenada seqüència Shine-Dalgarno o d'unió al ribosoma. És complementària a una seqüència situada a l'extrem 3' de l'rRNA 16S. El grau de similitud de la seqüència d'un gen determinat amb la seqüència Shine-Dalgarno consens compromet la velocitat de traducció, i per tant la quantitat de molècules proteiques actives (Gualerzi i Pon, 1990). També existeixen en la zona 5' transcrita no traduïda altres seqüències que modulen la traducció, normalment exercint una disminució de la mateixa; sobre aquestes seqüències actuen diferents molècules que comprometen l'inici de la traducció perquè impedeixen l'accés del ribosoma a la seqüència Shine-Dalgarno. Aquestes molècules efectores són RNAs antisense i proteïnes represores de la traducció.

La regulació de la traducció a nivell de la seva celeritat en la incorporació d'aminoàcids està supeditada a la freqüència en l'ús del codó. Si l'mRNA que ha de ser traduït té triplets que són poc freqüents, és a dir, que els seus respectius tRNAs estan en baixa concentració a la cèl·lula, la seva traducció es veurà retardada respecte a la d'altres mRNAs amb triplets més comuns (Ikemura, 1981). Aquest cas es dona en alguns mRNAs policistrònics que codifiquen les diferents subunitats d'una proteïna multimèrica, però que no mantenen entre elles una relació equimolecular. Aquesta regulació permet que la proporció de subunitats sintetitzades sigui l'adequada i no es sintetitzin polipèptids que després no seran utilitzats en la formació del

complexe proteic actiu. Aquest és el cas de l'operó *atp*, els gens del qual estan expressats de manera diferencial per acomodar-se als requeriments de composició de l'ATPasa translocadora de protons ($\alpha_3\beta_3\gamma_1\epsilon_1a_1b_2c_{10-15}$) (Altendorf *et al*, 1992).

Per últim, existeix un darrer control en l'expressió gènica que inclou tots aquells fenòmens bioquímics que modifiquen la proteïna sintetitzada i la converteixen en una proteïna activa. En aquest punt un dels mecanismes més importants de regulació de l'activitat de les proteïnes és la fosforilació/defosforilació de les mateixes. Durant molts anys s'havia establert la idea que els fenòmens de fosforilació només succeïen en eucariotes. El descobriment de l'existència de proteïnes fosforilables a *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium*, p.e. la isocitrat deshidrogenasa, IDH (Garnak i Reeves, 1979), va demostrar que la fosforilació és un fenomen regulador post-traducciona extès universalment. La fosforilació de proteïnes en procariotes ha estat estudiada sobretot en els residus d'histidina, mentre que la fosforilació en serina, treonina i tirosina ha rebut menys atenció. Tantmateix, la fosforilació en aquests residus s'ha observat en un gran nombre de bacteris, la qual cosa implica que les cèl.lules bacterianes han de tenir activitats quinases similars a les existents en organismes eucariotes (Freestone *et al*, 1995).

De tots els nivells de regulació que s'han citat el més important és el del control de l'inici de la transcripció. D'ara en endavant tots els mecanismes de regulació de l'expressió gènica que es detallaran en aquest treball seran mecanismes que actuen en aquest nivell, és a dir, mecanismes que modulen la unió de l'RNA polimerasa al promotor i la conversió del mateix en una estructura activa que permeti iniciar la transcripció.

1.1. Models d'organització gènica a procariotes

Un gen és per definició la seqüència de DNA que quan s'expressa dóna lloc a un/una polipèptid/proteïna i engloba tant la zona codificant com les zones que regulen l'expressió del mateix. En els gens procariotes la zona reguladora pot estar situada pròxima a 5' de l'inici de transcripció (tsp, "transcription starting point") o bé també estar localitzada a una distància major.

A les seqüències promotores d'un gen s'uneixen les proteïnes reguladores que activen o reprimeixen aquest procés. Les proteïnes són factors de transcripció que de forma autònoma o bé unides a una molècula efectora exerceixen un efecte sobre el promotor d'un gen o d'un

grup de gens. Els factors de transcripció no exerceixen la seva funció de forma continuada, sinó que actuen responnent a estímuls del medi extern en el qual es troba la cèl.lula.

Els factors de transcripció poden ser específics d'un gen o d'un grup de gens que codifiquen proteïnes de funció similar o d'una mateixa ruta metabòlica; també poden tenir un espectre d'actuació molt ampli sobre un nombrós grup de gens amb funcions molt diferents però que es transcriuen tots en unes condicions externes concretes.

Un gen pot estar sotmès a la modulació exercida per un o diversos factors de transcripció. De la mateixa manera, diferents gens poden estar sota el control d'un mateix regulador transcripcional.

En bacteris podem trobar gens que es transcriuen de manera continuada, la regulació dels quals està poc sotmesa a canvis en el medi extern. Aquests gens són els anomenats "housekeeping", és a dir, que són imprescindibles pel creixement bacterià en qualsevol condició. També existeixen altres gens que es transcriuen de manera no conjunta amb cap altre gen i que estan regulats pel seu propi regulador transcripcional específic. Aquests gens disposen d'un tsp i d'un senyal d'acabament de la transcripció que abarca la zona codificant de la proteïna que codifiquen.

És molt freqüent en la cèl.lula bacteriana trobar gens disposats segons el model d'organització gènica anomenat operó. Un operó és un conjunt de gens que estan organitzats en una mateixa unitat de transcripció. Els membres d'un operó comparteixen promotor i tsp i per tant la seva transcripció dona lloc a un mRNA policistrònic que conté tota la informació per la síntesi de les proteïnes codificades per cada gen. L'existència d'operons permet una acció coordinada de gens que codifiquen proteïnes implicades en mecanismes fisiològics relacionats, disminueix la quantitat d'informació genètica i només es requereix un joc de reguladors transcripcionals per controlar la síntesi de diverses proteïnes. Exemples de gens organitzats en forma d'operons són *frdABCD* (Jones i Gunsalus, 1987) i *glpABC* (Cole *et al*, 1988) que codifiquen respectivament les activitats enzimàtiques fumarat reductasa i glicerol-3-fosfat deshidrogenasa anaeròbica d'*Escherichia coli*.

En l'organització del genoma procariota també podem trobar casos en els quals diferents gens o diferents operons que tenen funcions metabòliques relacionades estan regulats per un mateix factor de transcripció i efector. Aquest tipus d'organització gènica reb el nom de reguló. Un exemple d'aquesta estructura gènica, que és típica de cèl.lules eucariotes, és el reguló *glp*, relacionat amb la utilització de glicerol-3-fosfat i compostos relacionats com a font de carboni i energia. L'expressió dels quatre operons *glp* està sota el control del regulador específic GlpR (codificat per un altre operó), l'efecte repressor del qual és abolit per l'inductor glicerol-3-fosfat (Lin, 1996).

Un nivell més alt d'organització gènica ve definit pel terme **moduló**. Un moduló és tot aquell conjunt de gens, operons i regulons que estan sotmesos al control transcripcional dut a terme per una proteïna reguladora pleiotròpica comuna de molt ampli espectre (Tuchi i Lin, 1988). Els membres d'un moduló no han de compartir el mateix regulador específic. En general, l'acció del factor de transcripció global d'un moduló prevaleix sobre el regulador específic en el cas que el membre del moduló estigui sota el control dels dos reguladors transcripcionals. Exemples de moduló són el sistema de dos components ArcA/ArcB, que regula l'expressió aeròbica/anaeròbica d'un gran nombre de sistemes, el moduló Fnr, que regula l'expressió anaeròbica d'un nombrós grup de sistemes o el moduló Crp, que regula la repressió catabòlica per glucosa.

Un operó pot estar sotmès a la regulació exercida per més d'un moduló. El reclutament de nombrosos operons i regulons, sota diferents controls específics, en un moduló fa possible integrar l'expressió de gens involucrats en funcions fisiològiques relacionades. A més a més, el fet que un operó pertanyi a més d'un moduló permet exercir el seu control en una gran varietat de condicions ambientals. Aquest fenomen comporta una integració de tots els senyals externs que facilita una economia cel·lular de l'expressió gènica sota condicions ambientals diferents. Aquest és el cas de l'operó *cyoABCDE*, que forma part dels modulons NarL, Fnr, Crp i ArcA (Cotter *et al*, 1990) o de l'operó *sodA* que està sotmès a la regulació dels modulons SoxR, Fur, ArcA i Fnr (Compan i Touati, 1993).

Per últim, cal definir el concepte d'**estimuló**. Un estimuló és un conjunt de gens que responen a un estímul concret, sense importar la seva regulació ni el mecanisme d'inducció sota el qual estan sotmesos. Els estimulons estan definits funcionalment, de manera que no és sorprenent la gran heterogeneïtat dels membres englobats sota un mateix estimuló. Per exemple, quan la temperatura augmenta en el medi extern, s'activa el reguló Htp (RpoH) d'*Escherichia coli* però també molts altres operons no regulats per la subunitat sigma de xoc tèrmic (σ^{32}) s'activen per calor. El reguló Htp i tots els altres operons estimulats per calor formen un estimuló. Un altre exemple d'estimuló es pot observar quan *Escherichia coli* creix en un medi en el qual es restringeix l'aport de fòsfor. Sota aquestes condicions s'activa el reguló PhoB i també més d'un centenar de proteïnes que no estan regulades per regulador global PhoB (Smith i Neidhart, 1983).

2. CONTROL DE L'EXPRESSION GÈNICA A NIVELL DE L'INICI DE LA TRANSCRIPCIÓ

L'inici de la transcripció determina la quantitat de producte gènic existent. Els valors de síntesi d' mRNA varien des d'uns pocs a 1.5×10^4 transcrits per generació. Quins són els principals determinants de la taxa de síntesi d' mRNA en un moment determinat? Com es seleccionen els operons que han de ser transcrits i els que han de quedar silenciosos?

En primer lloc, el fet que determina l'inici de la transcripció és la unió de l'RNA polimerasa al promotor del gen que s'ha de transcriure. Existeixen molts factors, intrínsecs i extrínsecs, que afavoriran o impediran aquesta unió.

L'RNA polimerasa dependent de DNA d'*Escherichia coli* és un enzim multimèric. L'holoenzim està compost per quatre subunitats, $\alpha_2\beta\beta'$, que formen el nucli (o "core") o part catalítica, i una subunitat σ . El "core", que és la maquinària bàsica per la síntesi d' mRNA, és un ensamblatge estable no covalent que es forma ordenadament per dimerització de dues subunitats α , seguida per l'addició successiva de la subunitat β primer i després per la subunitat β' . La subunitat catalítica està localitzada a la subunitat β . La subunitat β' uneix l'enzim de manera inespecífica al DNA. La subunitat α uneix les dues subunitats β i β' en el complex "core".

Mentre que el "core" pot iniciar la transcripció en els extrems, "nicks" (forats) i regions fusionades del DNA, la unió a la subunitat σ és necessària per la iniciació específica en un promotor. El genoma d'*Escherichia coli* codifica almenys sis factors σ , cadascun dels quals dirigeix l'RNA polimerasa a un grup diferent de seqüències promotores (Ishihama, 1993).

Dels sis tipus diferents de subunitats σ a *Escherichia coli*, el que està més estudiat és la subunitat σ^{70} . La majoria dels gens involucrats en les funcions cel·lulars més fonamentals (metabolisme, biosíntesi, etc.) són expressats en fase exponencial de creixement i transcrits mitjançant l'holoenzim $E\sigma^{70}$. La subunitat σ^{70} té un pes molecular de 70000 i està codificada pel gen *rpoD*.

Sota condicions d'estrès altres subunitats σ formen diferents holoenzims. En un xoc tèrmic, s'utilitza la subunitat σ^{32} , que té una massa molecular de 32000 Da i està codificada pel gen *rpoH*. En condicions de xoc tèrmic extrem s'utilitza la subunitat σ^{24} , codificada pel gen *rpoE*. Pels gens regulats per nitrogen trobem la subunitat σ^{54} de 54000 Da, codificada pel gen *rpoN*. Els gens que codifiquen per la formació de flagels estan transcrits la subunitat σ^{28} de

28000 Da (codificada pel gen *rpoF*) i finalment els gens específicament implicats en la fase estacionària i en la resposta a l'estrès oxidatiu són transcrits per la subunitat σ^{38} de 38000 Da codificada pel gen *rpoS*.

És evident que la funcionalitat i reconeixement de l'enzim a diferents promotors està mediat per l'existència de diverses subunitats σ . Existeixen promotors que són reconeguts per alguna subunitat σ sense necessitat de cap altre factor proteic accessori (encara que aquest fet no és general per la majoria de gens d'*Escherichia coli*). Un cop l'holoenzim està situat sobre el promotor, la transcripció comença i no s'atura fins que existeixi un senyal de parada de la mateixa.

2.1. Elements en cis: seqüències reguladores de la transcripció

Els elements en *cis* bàsics en els promotors dels gens transcrits per $E\sigma^{70}$ són: i) un hexàmer localitzat a la posició -10 respecte el tsp que té una seqüència consens TATAAT, ii) un altre hexàmer situat a la posició -35, amb una seqüència consens TTGACA, iii) una seqüència rica en dA+dT anomenada UP (upstream element) d'aproximadament 20 pb de longitud localitzada immediatament a 5' de l'hexàmer -35 (Ross *et al*, 1993). La capacitat de transcripció, en la majoria de promotors, és directament proporcional a la similitud que tenen amb els consens dels tres elements en *cis*. Podem trobar promotors que tinguin tots tres elements, dos elements o un element que difereixi del consens. La suma de tots ells donarà com a resultat promotors de diferent nivell de transcripció.

El reconeixement dels dos hexàmers -10 i -35 és dut a terme per la subunitat σ^{70} (aquesta subunitat té 613 residus aminoacídics) (Dombrosky *et al*, 1992) i l'element UP és reconegut per la subunitat α (que té una longitud de 329 aminoàcids) (Ross *et al*, 1993).

Els dos hexàmers situats a -10 i -35 respecte el tsp estan separats per un espai de 17 +/- 1 pb. Aquesta separació, que té una seqüència aleatòria, és crítica per l'activació o repressió d'un promotor. Per exemple, el promotor feble constitutiu de *soxS* inclou seqüències -10 i -35 molt pròximes al consens, però separades per 19 pb (Hidalgo i Demple, 1994). Aquesta inusual distància entre els dos elements provoca el baix nivell de transcripció del promotor. Quan es modifica aquesta distància entre elements reguladors, s'observa un increment molt notori de la taxa de transcripció.

Les propietats intrínseques contingudes en la seqüència de bases d'un promotor no només són importants per permetre la unió més o menys eficaç de l'holoenzim d'RNA

polimerasa o de proteïnes reguladores, sinó que tenen importància en la regulació de la transcripció *per se*. El plegament en forma d'agulla o forquilla del DNA és un element integral de la topologia dels promotors, i sembla ser un element regulador de gran importància en el control de l'expressió gènica. En l'anàlisi de tots els passos del procés de transcripció s'ha pogut observar la participació de seqüències de DNA curvades, ja sigui per un efecte de l'RNA polimerasa (Kuhnke *et al*, 1987), per l'efecte d'una proteïna remodeladora de l'estructura del DNA (Introducció 3.1.) o bé per l'estructura intrínscament curvada (Pérez-Martín *et al*, 1994).

2.2. Elements en *trans*: repressors i activadors

L'RNA polimerasa rarament actua per sí sola en la transcripció i normalment no és suficient per activar la transcripció d'un promotor. Requereix altres proteïnes que l'ajudin a posicionar-se sobre el promotor per poder reconèixer l'inici de transcripció i a controlar el nombre de còpies d'RNA per unitat de temps que s'han de produir en resposta als canvis de desenvolupament o ambientals (Werner i Burley, 1997). Aquestes proteïnes són factors de transcripció que modulen l'acció de l'RNA polimerasa. No actuen de forma contínua, sinó que la seva funció varia d'acord amb les variacions existents en el medi extern, de manera que la transcripció s'adeqüi a les necessitats imposades per l'exterior de la cèl.lula. Poden dur a terme la seva acció unides a un efector (compostos extracel.lulars o metabolits interns) o bé soles.

Les proteïnes reguladores de la transcripció són factors proteics que s'uneixen al DNA. Acostumen a estar codificades per gens independents que tenen el seu propi promotor. Els nivells dels seus transcrits monocistrònics són generalment baixos (Prag *et al*, 1997). Normalment són proteïnes de baix pes molecular. S'ha proposat que el petit tamany de les proteïnes reguladores és un mecanisme de seguretat per evitar introduir errors en la síntesi de la proteïna, i assegurar així la seva correcte funció. L'inconvenient del petit tamany en referència a les unions a llarga distància que han de fer en el promotor es veu superat per la formació d'homodímers, que són la forma activa de molts factors de transcripció.

En la seva estructura proteica és característic trobar un domini amb estructura d'hèlix-volta-hèlix (HTH, helix-turn-helix) amb el qual contacten el DNA. Aquest motiu (dues hèlix α separades per una volta de cadena polipeptídica) permet la unió al DNA: la primera hèlix α s'alinea amb el sòlc gran del DNA establint contactes específics per reconeixement de les bases nitrogenades que estan exposades en ell. La segona hèlix es col.loca transversalment al sòlc gran i hi interacciona de manera independent a la seqüència de nucleòtids.

A més del domini d'unió a DNA, es troben un o més dominis responsables de la unió a un o diversos efectors. És típic dels factors de transcripció actuar com a dímers. La capacitat de dimerització també està continguda en un altre domini proteic, que sovint és el mateix domini d'unió a l'efector. La dimerització del factor de transcripció acostuma a ser causada per un canvi conformacional en la proteïna, producte de la unió de l'efector al seu domini d'unió. El diferent estat de monòmer o dímer fa variar la capacitat d'unió de la proteïna al DNA. En el cas que la proteïna no es dimeritzi, la capacitat d'unió al DNA està modificada per la unió a l'efector (que es forma en resposta a un estímul resultant d'un canvi extern o intern a la cèl.lula).

Les proteïnes reguladores de la transcripció es poden classificar en funció de l'efecte que produeixen sobre un promotor. Així trobem repressors, que duen a terme un control negatiu sobre la transcripció (reprimeixen) i activadors, que exerceixen un control positiu (activen). També existeixen reguladors que tenen una dualitat de funció; en uns casos actuen com a activadors i en altres com a repressors. Bàsicament l'estructura de tots tres grups és similar, però varia la distribució intramolecular dels dominis d'unió a DNA, domini regulador o d'unió a l'efector i domini de dimerització. S'agrupen en diferents famílies en funció de la seva similitud estructural i del seu mecanisme d'acció. Evolutivament, sembla que els dos grups, repressors i activadors, han tingut un origen diferent (Prag *et al*, 1997).

En l'anàlisi de 30 repressors d'*Escherichia coli* pertanyents a diferents famílies es pot observar que, amb l'excepció de 2 casos, la resta tenen tots el domini d'unió al DNA a l'extrem N-terminal. L'anàlisi de 44 activadors i reguladors duals revela que 21 d'ells tenen el motiu hèlix-volta-hèlix a l'extrem N-terminal. En la resta, existeix un grup que té el motiu a l'extrem C-terminal i un altre grup en el qual es localitzen dos motius HTH al mateix extrem, però no se sap quin és el funcional.

S'ha proposat que aquesta organització de les proteïnes reguladores és resultat de la diferent naturalesa i funció dels reguladors primitius i reflecteix l'evolució que van sofrir. Sembla que l'atzar no ha estat qui ha dissenyat aquesta disposició dels motius HTH en les proteïnes reguladores. Es postula que el repressor primitiu estava constituït per un motiu HTH suficient per bloquejar l'acció de l'RNA polimerasa. Les fusions entre aquests repressors originaris i un motiu proteic capaç d'unir-se a un efector, dotat de la capacitat de donar resposta a les condicions externes canviants, van permetre a la cèl.lula adaptar-se millor al medi que les rodejava. L'addició del domini regulador a l'extrem C-terminal va permetre mantenir intacte el motiu HTH i permetre que aquest continués unint-se als seus promotors. El requisit per l'aparició d'aquest segon repressor més evolucionat era que la fusió entre ambdós dominis es fes en fase. L'evolució posterior dels dos dominis dels reguladors transcripcionals seria independent. Per exemple, el domini d'unió a l'inductor del repressor LacI és homòlog a

proteïnes periplàsmiques bacterianes que participen en el transport de sucres (Mowbray i Cole, 1992).

L'evolució posterior dels repressors possiblement va produir-se per duplicació gènica i acumulació de mutacions, donant lloc als actuals activadors transcripcionals amb el motiu HTH a l'extrem N-terminal. S'ha suggerit que l'origen dels activadors amb el motiu HTH a l'extrem C-terminal són uns petits activadors ancestrals que no posseïen aquest domini. La seva funció era la d'estimular la isomerització de l'RNA polimerasa i ajudar així a la formació del complex actiu en la transcripció. S'ha observat que alguns activadors de promotors σ^{54} , quan se'ls delectona el motiu HTH, poden continuar activant la transcripció (Berger *et al*, 1995). Per tant, la funció del domini regulador és donar una alta especificitat al procés d'activació.

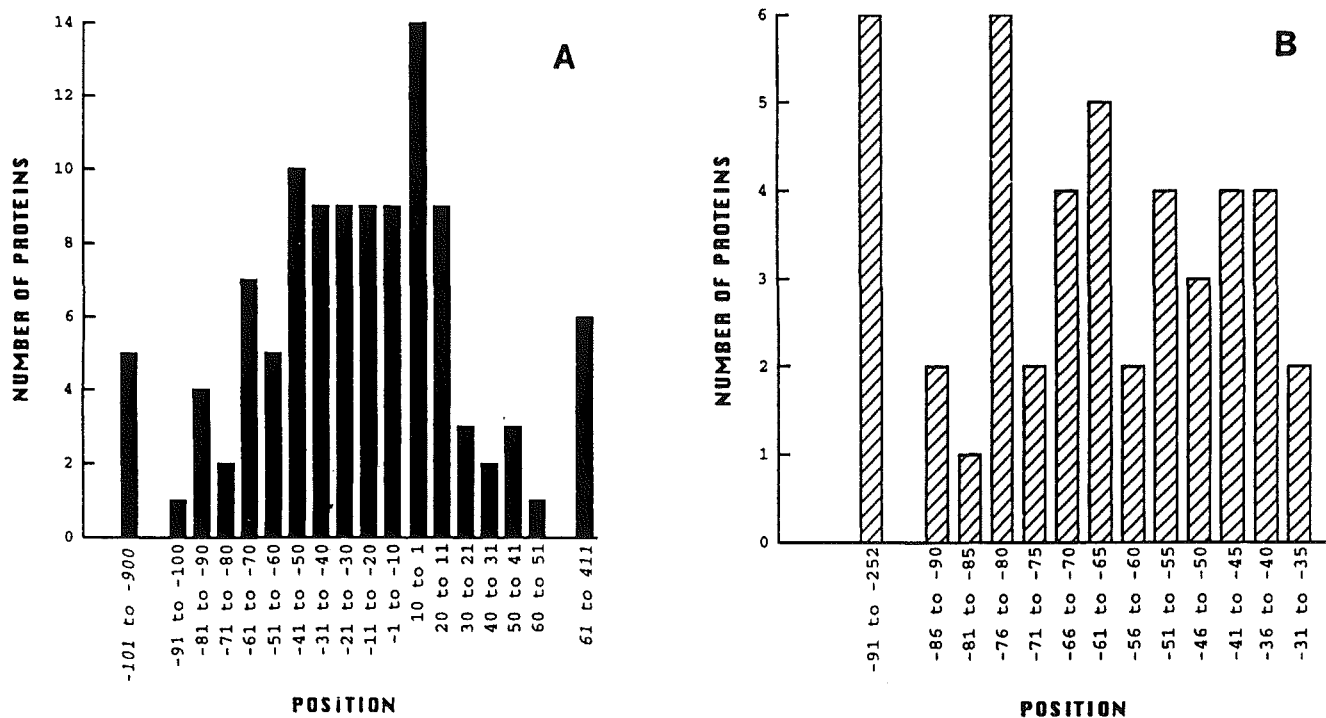


Figura 1. Distribució dels factors transcripcionals al llarg de la zona promotora. A) Distribució dels repressors. B) Distribució dels activadors (Gralla i Collado-Vides, 1996).

Els promotors rarament contenen seqüències d'unió allunyades del *tsp* sense tenir-ne alguna addicional de més pròxima. La localització de la zona reguladora en un promotor està directament relacionada amb la seva funció. Els activadors i repressors es diferencien per la zona del promotor a la qual s'uneixen (Figura 1). Existeix una zona exclusiva de repressió (Gralla i Collado-Vides, 1996) en direcció 3' a la posició -30. En aquesta zona no s'ha trobat unió de pràcticament cap activador (existeixen poques excepcions, p.e. la proteïna SoxR que

activa la transcripció de *soxS*, unint-se entre la zona -10 i -35 (Hidalgo i Demple, 1994)) i generalment es considera que si un factor de transcripció s'uneix a aquesta zona serà un repressor. Aquesta zona "prohibida" pels activadors té una explicació en el mecanisme d'acció dels mateixos. Els activadors transcripcionals actuen mitjançant els contactes que s'estableixen entre la subunitat α de l'RNA polimerasa i l'activador. En concret és amb l'extrem C-terminal de la polimerasa que l'activador estableix contacte (Busby i Ebright, 1994). Aquesta subunitat de l'RNA polimerasa està situada a prop de la posició -35 o a unes poques bases en direcció 5'. Per tant la zona d'exclusió pels activadors a 3' de la posició -30 és resultat de la dificultat d'establir les interaccions correctes si l'activador es troba en aquesta zona d'exclusió. Alguns activadors poden establir més d'un contacte amb l'RNA polimerasa. L'existència d'aquests múltiples contactes té un efecte sinèrgic sobre la transcripció. El nivell de transcripció assolit amb dos contactes d'un activador sobre l'RNA polimerasa és superior a la suma de l'efecte de tots dos contactes per separat (Ptashne i Gann, 1997) (Dove *et al*, 1997).

La regió del promotor en la qual es poden trobar activadors transcripcionals està compresa en la majoria dels casos entre les posicions -80 i -30, sense existir una clara zona de preferència. Per cada activador, però, existeix una zona específica, que és la que permet optimitzar els contactes amb l'RNA polimerasa. La distància entre l'activador i la polimerasa dependrà del tamany de la proteïna i de la cara del DNA a la qual hagi de situar-se per poder establir contactes productius.

És un fenomen evident que la localització de la seqüència d'unió d'un regulador és crítica per la seva funció. Un activador pot comportar-se com a repressor si la seva seqüència d'unió es mou a la zona exclusiva per repressors. Aquest fenomen s'observa molt en el cas d'activadors de gens estructurals que són alhora repressors del seu propi promotor. Aquesta és una estratègia per mantenir els nivells de reguladors transcripcionals dins uns límits. És més complex que un repressor pugui actuar com a activador, ja que aquest fenomen no només comporta un canvi en la localització de la seqüència d'unió sinó que requereix un canvi conformacional en la proteïna que permeti establir contactes adients entre el factor de transcripció i la polimerasa.

Habitualment sobre un promotor no només actua un tipus de regulador transcripcional sinó que la seva expressió és el producte dels efectes de diferents factors. El correcte ensamblatge dels diferents factors de transcripció per poder arribar a tenir una estructura que activi la transcripció requereix moltes vegades la presència de factors que modifiquin l'estructura del DNA per aconseguir una correcte distribució tridimensional de tots els factors de transcripció que es tradueixi en la formació de contactes correctes entre ells. Aquests factors que modifiquen l'estructura del DNA (Introducció 3.1.) permeten curvar el DNA de manera que l'ensamblatge de totes les proteïnes reguladores en un complex d'ordre superior sigui

factible, l'estructura formada sigui estable i la transcripció pugui existir. Per aquest motiu, en la seqüència de promotors que estan regulats per diversos factors de transcripció es troben zones que són compatibles amb estructures curvades. Les zones riques en dA+dT són de fàcil plegament, sobretot els anomenats "poly-A runs" o zones riques en més de cinc dA seguides. Per tant, la curvatura del DNA és un factor no específic molt important en la regulació de la transcripció en procariotes (Harrington, 1992).

3. SISTEMES GLOBAIS DE CONTROL DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA

3.1. Activació transcripcional per curvatura del DNA

Els models estructurals de regulació de la transcripció tenen un ampli espectre de variabilitat. Existeixen sistemes gènics que només requereixen una o dues proteïnes actuant sobre 30-50 pb de DNA, encara que aquest simple model no és el més freqüent. Són molt més habituals els sistemes en els quals diverses proteïnes actuen sobre seqüències de DNA molt més llargues (Nash, 1996). En aquest tipus d'organització es pot observar com, a més de l'RNA polimerasa i els factors de transcripció específics o pleiotròpics, la transcripció requereix d'uns factors addicionals. Aquests factors addicionals són, entre d'altres, les proteïnes HU (Tsunehiro i Adhya, 1997), IHF, H-NS (Spurio *et al*, 1997) i FIS (Yuan *et al*, 1991) (Finkel i Johnson, 1992). S'anomenen de manera general "proteïnes similars a les histones" ("histonelike proteins") i es caracteritzen per ser petites, bàsiques, relativament abundants i per tenir la capacitat de provocar canvis en la curvatura del DNA al qual s'uneixen (Goosen i van der Putte, 1995). Tot i que són bastant similars existeixen diferències entre elles. Una d'aquestes diferències és el fet que mentre HU i H-NS s'uneixen al DNA de forma inespecífica, sense reconèixer una seqüència concreta, IHF i FIS són proteïnes d'unió específiques.

Una de les funcions atribuïdes a aquest conjunt de proteïnes és la d'empaquetar el cromosoma bacterià (d'1 mm de longitud) per fer possible que pugui cabre a l'interior d'una cèl·lula que només té unes micres de diàmetre. A més d'aquesta funció, similar a la de les histones en organismes eucariotes (empaquetament dels cromosomes en una primera estructura compactada o nucleosoma), a les "histonelike proteins" també se'ls atribueixen altres funcions com són les de ser reguladors transcripcionals d'alguns sistemes procariotes, intervenir en la integració i escissió del fag λ , controlar la replicació depenent d'*oriC* de minicromosomes,

transposició del bacteriòfag Mu, etc. Totes aquestes accions són molt variades i prenen part en un ampli espectre de funcions fisiològiques. El que tenen en comú totes aquestes funcions cel·lulars és que per exercir-les aquestes proteïnes han d'unir-se d'alguna manera al DNA, provocant en ell uns canvis topològics que són en darrer terme els veritables responsables del canvi de funció que elles comporten.

S'ha comprovat que la introducció sintètica de seqüències de DNA curvades en els promotors de diferents gens activa la transcripció dels mateixos (Bracco *et al*, 1989). Aquesta observació implica que la curvatura del DNA és un fet molt important en l'activació de la transcripció.

En aquest apartat només seran comentades en profunditat les característiques del factor IHF, ja que juga un paper transcendental en la regulació del sistema *glc*, la regulació transcripcional del qual és un dels majors propòsits d'aquest treball. El paper de les altres "histonelike proteins" no serà comentat.

3.1.1. El factor IHF

IHF (integration host factor) és una proteïna d'unió a DNA que reconeix una seqüència específica i que participa en una gran varietat de processos cel·lulars. IHF és necessària en varis sistemes de recombinació específica de lloc, afecta l'expressió de diferents gens, facilita la replicació d'alguns plasmidis i la mobilitat de diferents elements transponibles dins el cromosoma bacterià, ajuda a l'encapsidació d'alguns bacteriòfags, controla la replicació en *oriC*, etc. (Friedman, 1988).

IHF va ser descobert com a factor necessari per la integració del fag λ *in vitro*. El paper d'aquesta proteïna en el cicle vital dels paràsits d'*Escherichia coli* (fag λ i Mu) va ser descobert abans que el rol que duu a terme en el propi cicle del bacteri. Proteïnes molt similars de funcions paral·leles s'han descobert en diversos bacteris gram-negatius. En el cas d'IHF de *Pseudomonas putida*, s'ha pogut observar que mutacions en alguna de les seves dues subunitats es poden complementar amb les subunitats d'*E. coli*, suggerint la formació d'heterodímers de les subunitats de les dues espècies (Calb *et al*, 1996).

Les condicions de creixement determinen l'abundància d'IHF a *Escherichia coli*. Durant el creixement en fase exponencial, existeixen de 0.5 a 1 ng d'IHF per μg de proteïna cel·lular, que corresponen a uns 3500 dímers o a una concentració intramolecular de 6 μM .

Quan la cèl.lula entra en fase estacionària, es multiplica la quantitat present 5 vegades (Nash, 1996).

La purificació de la proteïna IHF d'*Escherichia coli* va permetre observar que es tracta d'una proteïna d'aproximadament 22000 Da de massa molecular, composta per dues subunitats similars però no idèntiques. Les dues subunitats d'IHF es denominen α (Pm=11350) i β (Pm=10650) i tenen un 25% d'identitat en la seva seqüència d'aminoàcids. La primera està codificada pel gen *himA*, situat al minut 38 del cromosoma d'*Escherichia coli* i la β la codifica el gen *hip*, també anomenat *himD*, localitzat al minut 21. Les subunitats d'IHF individuals no són capaces de dur a terme la funció de la proteïna de forma adequada, ja que formen homodímers molt poc estables.

IHF s'uneix a zones úniques del DNA sense necessitat de cofactors extres ni altres proteïnes auxiliars. Aquesta unió té una constant d'afinitat entre 1-20 nM. IHF s'uneix específicament als seus DNAs diana amb una afinitat 10^3 - 10^4 vegades major que a àcids nucleics no específics. Existeix poca o nul.la cooperativitat en la unió d'IHF als seus llocs d'unio.

Hi ha promotors procariotes que per poder regular la transcripció han de formar complexos macromoleculars en els quals participen proteïnes que han d'interaccionar amb d'altres, tot i estar allunyades per desenes o centenars de pb. El contacte físic entre els diferents factors de transcripció d'aquesta estructura macromolecular és impossible a no ser que el DNA es curvi i les approximi. Quan IHF s'uneix a una regió del DNA, hi provoca un gir o curvatura d'un angle de 140° o més, convertint l'estructura linial del DNA en una estructura curvada que recorda una agulla o una forquilla ("hairpin").

Una molècula d'IHF s'uneix a una regió de DNA d'aproximadament 40 pb. Es localitza una seqüència consens de 9-13 pb asimètrica en una meitat d'aquesta regió. Inclús aquestes 9 posicions més conservades estan subjectes a variació, indicant la flexibilitat del reconeximent de bases per part d'IHF. La seqüència consens per IHF és:

WATCAANNNTTR (W=A ó T; R=A ó G)

És important assenyalar que la regió flanquejant d'aquesta seqüència consens és molt important a l'hora de formar unions estables entre IHF i el DNA (Zulianello *et al*, 1995), ja que s'han trobat regions de DNA que tenen seqüències molt semblants a la seqüència consens però a les quals IHF s'uneix de forma dèbil i inestable. El fet que IHF provoqui una tant gran curvatura en el DNA requereix que les regions colindants a la zona d'unio de la proteïna

tinguin flexibilitat intrínscica. És freqüent la localització d'una regió rica en dA+dT a l'extrem 5' de la seqüència d'unió a IHF. Experiments de fusió d'una regió rica en dA+dT a una seqüència consens per IHF que no té aquesta zona de forma natural han demostrat que l'afinitat de la proteïna pel seu lloc d'unió augmenta, suggerint un paper important de la regió fusionada en l'estabilitat de la unió d'IHF i el DNA.

Recentment s'ha aconseguit cristal·litzar el complexe IHF-DNA (Rice *et al*, 1996). En l'anàlisi d'aquest complexe es pot observar el mecanisme molecular a través del qual IHF provoca la curvatura del DNA al qual s'uneix. IHF reconeix el seu lloc d'unió mitjançant contactes amb el sòlc petit del DNA: les dues subunitats formen un cos compacte que abraça el DNA. La zona rica en dA+dT que freqüentment es troba prop del consens per IHF adopta una conformació tridimensional que permet al dímer IHF intercalar-se perfectament en el sòlc petit format. La distorsió que acompanya l'acció d'IHF (formació d'un sòlc petit molt estret) provoca la formació d'un sòlc gran de DNA molt ample, que permet que els diferents factors de transcripció que hagin d'interaccionar amb el promotor vegin afavorida la seva unió.

La funció d'IHF en la regulació de la transcripció és precisament la de permetre que aquests factors situats a distància puguin contactar físicament a causa de la gran distorsió que provoca sobre l'arquitectura del DNA. Existeixen exemples en els quals el lloc d'unió d'IHF està situat entre el lloc d'unió a l'RNA polimerasa i el(s) lloc(s) d'unió del(s) activadors(s) (Schröder *et al*, 1993). En aquests casos IHF per sí mateix no afecta la formació d'un complexe tancat ni la unió de la proteïna activadora. En aquests casos IHF actua únicament facilitant la formació del llaç necessari per posar en contacte la subunitat α de l'RNA polimerasa i la proteïna activadora. Aquest paper estructural d'IHF ha estat confirmat per la substitució del lloc d'unió a IHF amb seqüències de DNA intrínscament curvades (Pérez-Martín *et al*, 1994a).

IHF també pot actuar com a un regulador negatiu de la transcripció d'alguns operons tant *in vivo* com *in vitro*. En alguns casos actua com a repressor perquè s'uneix al promotor de l'operó que regula en la zona propera a les posicions -10 i -35, impedit la unió de la subunitat σ de la RNA polimerasa (Ditto *et al*, 1994). Aquest efecte inhibidor de la transcripció també es pot exercir indirectament a través de la modulació de la proteïna reguladora, ja sigui perquè IHF tingui el seu lloc d'unió que se solapa amb el lloc d'unió de la proteïna reguladora o bé perquè impedeix la funció activadora de la mateixa. A IHF també se li ha assignat un paper com a factor que augmenta l'especificitat de la unió de factors de transcripció als seus promotors específics, ja que és un supressor de l'activació transcripcional produïda per reguladors heteròlegs (Pérez-Martín i de Lorenzo, 1995).

També s'han estudiat exemples de promotors sobre els quals IHF exerceix una funció activadora en absència de qualsevol altre factor de transcripció. Aquest efecte es deu a

l'acostament de regions de DNA distants al promotor fins a l'RNA polimerasa (Pagel i Hatfield, 1991), i no a interaccions proteïna-proteïna entre IHF i l'RNA polimerasa.

A principis de la dècada dels 90 s'havia proposat un model d'activació de la transcripció mediat només per IHF que consistia en la interacció directe entre IHF i la subunitat α de l'RNA polimerasa. Aquest model ha estat descartat ja que les interaccions específiques entre IHF i l'RNA polimerasa no són necessàries per activar la transcripció (Parekh i Hatfield, 1996).

No ha sigut fins fa poc que ha quedat demostrada la cooperativitat *in vitro* entre la unió d'una proteïna reguladora i IHF als seus respectius llocs d'unió (Jovanovic i Model, 1997). La unió del regulador PspF a la regió promotora de *psp* estimula la unió d'IHF, i la unió d'IHF també estimula la unió de PspF al seu promotor. D'aquesta manera, el paper d'IHF passa de ser merament estructural a ser un activador de la unió de diferents factors de transcripció a les seves zones d'unió en els promotors que regulen.

3.2. Regulació de l'expressió gènica per fonts de carboni: el moduló CRP i el moduló CRA

Una de les característiques d'*Escherichia coli* i en general dels bacteris, tal i com a estat comentat al principi de la introducció, és la de ser capaç de créixer en múltiples compostos carbonats els quals pot usar com a font de carboni i energia. També s'ha subratllat el fet que aquest bacteri gram-negatiu, en cas de disposar de diferents nutrients, utilitzarà aquell que li dongui un major rendiment energètic. En aquest cas, el bacteri inhibeix l'expressió dels operons implicats en el metabolisme d'altres fonts de carboni que no siguin necessàries per poder créixer en aquelles condicions determinades.

3.2.1. El moduló CRP

Quan *Escherichia coli* creix en presència d'una font de carboni ràpidament metabolitzable, p.e. glucosa, les vies catabòliques necessàries per la utilització d'altres compostos estan inhibides. La presència d'altres fonts de carboni menys energètiques o que

tenen un catabolisme menys directe no activa la síntesi dels enzims necessaris pel seu metabolisme, ja que la presència de glucosa ho impedeix. Només quan la glucosa s'exhaureix del medi aquests enzims començaran a ser sintetitzats. La regulació de la seva síntesi s'exerceix a nivell transcripcional.

Els efectors moleculars que medien aquest control són un factor de transcripció, proteïna coneguda amb el nom de CAP (catabolite activator protein) o CRP (cyclic AMP receptor protein), i l'efector cAMP. CRP és una proteïna que pot unir-se al cAMP, i és unida a aquesta molècula cíclica com s'uneix al promotor dels seus operons diana i activa la seva transcripció. El reconeixement del cAMP com a l'efector de CRP es va dur a terme observant que els efectes repressors de la glucosa sobre l'expressió de gens catabòlics eren contrarrestats per l'addició de cAMP al medi. En presència de glucosa, els nivells intracel·lulars de cAMP són baixos i per tant CRP no activa la transcripció. En la depleció de glucosa els nivells del nucleòtid cíclic augmenten. D'aquesta manera, un nivell intracel·lular elevat de cAMP comporta la unió de cAMP a CRP i s'activa la transcripció de molts promotors entre els quals es troben gens que són necessaris per la utilització de fonts de carboni alternatives a la glucosa com són lactosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, fucosa, etc.

La glucosa sembla tenir també un paper inhibidor en la síntesi de CRP. D'aquesta manera, l'efecte repressor d'aquest sucre s'exerceix tant a nivell de la concentració de factor de transcripció com d'efector (Ishizuka *et al*, 1994).

Els gens implicats en la repressió catabòlica per glucosa són *crp* que codifica la proteïna CRP i *cya* que codifica l'adenilat ciclase, enzim que sintetitza cAMP. Les mutacions en ambdós loci impedeixen aquest control de la transcripció. Les mutacions en *cya* poden ser contrarrestades per addició de cAMP en el medi.

L'activació gènica mediada per CAP requereix que la proteïna s'uneixi a cAMP. Aquesta unió provoca un canvi conformacional en el factor de transcripció, que passa de ser inactiu a tenir una conformació activa, capaç d'unir-se al DNA. La unió del complex cAMP-CAP al promotor dels membres del seu moduló activa la transcripció del mateixos.

El moduló CAP inclou un gran nombre d'operons. Tot i que en un primer moment es van determinar només sistemes implicats en el metabolisme de sucres, avui dia és conegut que també estan regulats per CAP molts altres tipus de gens, implicats en molt diverses funcions (Busby i Kolb, 1996). Entre ells trobem el gen *cat* (que codifica la cloramfenicol acetil transferasa), l'operó *cyoABCDE* (que codifica la citocrom *o* oxidasa), *pac* (que codifica la penicilina acilasa), *putA* (metabolisme de prolina), etc.

En molts operons del moduló CAP trobem que existeixen altres tipus de regulacions de l'expressió gènica a nivell de la transcripció. CAP actua en molts casos juntament amb els activadors o repressors específics de cada sistema. Mentre que CAP actua en resposta a un senyal extern global (nivells extracel·lulars de glucosa que es tradueixen en nivells intracel·lulars de cAMP), els reguladors específics responen a la presència del propi efector del sistema. Aquest és el cas de l'operó *lac*, en el qual CAP respon a nivells de glucosa en el medi i el repressor LacI respon als nivells de lactosa extracel·lular a través dels nivells intracel·lulars d'al·lactosa, que és la molècula efectora. Existeixen exemples de regulació mitjançada per CAP en els quals l'efecte és exercit sobre l'expressió del gen regulador específic del sistema en qüestió, sense intervenir directament sobre el promotor del sistema. Un exemple és l'operó *melAB*, que codifica pel metabolisme i transport de la melibiosa. La seva expressió és totalment depenent de l'activador MelR i melibiosa. L'expressió del *melR* està regulada per cAMP-CAP. Així, *melR* només s'expressa quan les concentracions de cAMP són elevades, activant doncs la transcripció dels gens estructurals per l'absència de glucosa i la presència de melibiosa (Webster *et al*, 1988).

La proteïna CAP és un monòmer de 210 residus aminoacídics. Quan s'uneix a cAMP, es produeix un canvi de conformació que provoca la dimerització de la proteïna. Així el complexe cAMP-CAP és un homodímer amb capacitat d'unió al DNA. L'activació induïda en diferents promotors està mediada per les interaccions proteïna-proteïna que es produeixen entre el complexe cAMP-CAP i l'extrem C-terminal de la subunitat α de l'RNA polimerasa (Igarashi i Ishihama, 1991).

Al llarg de la cadena aminoacídica es detecten dos dominis diferenciats: un domini d'unió a cAMP (situat a l'extrem N-terminal) i un d'unió al DNA (a l'extrem C-terminal, on es detecta un motiu d'hèlix-volta-hèlix).

El complexe cAMP-CAP s'uneix específicament a regions promotores que contenen la seqüència consens:

aaaTGTGAtntanaTCACAtt

Els motius TGTGA i TCACA són els més conservats en diferents promotors (Ebright *et al*, 1989). La capacitat d'unió als promotors disminueix a mesura que la seqüència difereix del consens. En aquests casos, es necessiten concentracions superiors de cAMP per aconseguir la unió del complexe cAMP-CAP al DNA. Les regions colindants al consens també influeixen la unió al DNA. Així, seqüències riques en dA+dT afavoreixen la unió ja que permeten que el DNA es plegui amb més facilitat i estabilitzen les unions entre el complexe i el DNA.

CAP pot actuar com a repressor transcripcional. Pot actuar com a repressor per sí mateix o bé ser un co-repressor de sistemes que estan regulats per un repressor específic. Un exemple del primer cas és la repressió exercida per CAP sobre *cya* (Mori i Aiba, 1985) i un exemple del segon mecanisme de repressió és la unió cooperativa de CAP i CytR al promotor *cytRP* (involucrat en el transport i biosíntesi de nucleòsids) (Gerlach *et al.*, 1990).

La distribució de les seqüències consens per CRP en els diferents membres del seu moduló varia molt. Podem trobar-les situades pròximes a les caixes -10 i -35, i també en posicions 5' més llunyanes al tsp o bé a 3' del mateix. El consens en el promotor de *cat* (codifica l'enzim cloramfenicol acetil transferasa) es troba centrat a la posició -44.5; en el d'*araE* (transportador d'arabinosa) a la posició -94.5 i en el promotor de *cir* (que codifica el receptor sideròfor I de la colicina) a la posició +118.5. En tots 3 casos CAP actua com a activador transcripcional. Quan actua com a repressor, la distribució de les seqüències consens també és molt dispersa (Busby i Kolb, 1996).

En funció de la posició de la caixa d'unió a CRP, els promotors només depenents de l'acció de CRP-cAMP es classifiquen en :

-Promotors de Classe I: la caixa d'unió a CRP està situada pròxima a 5' del lloc d'unió de l'RNA polimerasa. L'activació de la transcripció està mediada per interaccions proteïna-proteïna entre una subunitat de CRP i l'extrem C-terminal de la subunitat α de l'RNA polimerasa. Aquestes interaccions proteïques incrementen l'afinitat de la polimerasa pel promotor i per tant incrementen la taxa de transcripció. Un exemple d'aquest tipus de promotors és el de l'operó *lac*.

-Promotors de Classe II: la caixa d'unió a CRP està centrada en la posició -42 i per tant se sobreposa amb l'hexàmer -35. Les interaccions que s'estableixen són entre l'RNA polimerasa i les dues subunitats del dímer CRP. En aquest tipus de promotor s'estableixen interaccions proteïques molt complexes. Un exemple d'aquest tipus de promotor és el del promotor *galP1*.

3.2.2. El moduló CRA

El moduló CAP, que constitueix un model de repressió catabòlica dependent de cAMP (Introducció 3.2.1.), ha estat extensament estudiat i la seva implicació en la regulació de nombrosos processos cel·lulars està ben definida. S'ha pogut observar, però, com la repressió catabòlica pot ocórrer en absència de cAMP (aquest fenomen es pot observar en mutants *cya*

on el gen *crp* conté mutacions que confereixen independència de cAMP a CAP (Harman *et al*, 1986)). Això suggereix l'existència d'altres factors que tenen també un paper en la repressió catabòlica, encara que de manera independent a la concentració intracel·lular de cAMP.

Un d'aquests mecanismes de regulació per catabolít està mediat per la proteïna anomenada CRA (catabolite repressor/activator). CRA és un factor de transcripció que regula l'expressió de molts gens implicats en el metabolisme de fonts de carboni a *Escherichia coli*.

La proteïna CRA va ser inicialment anomenada FruR perquè la primera funció que se li va atribuir va ser la d'activar la transcripció de l'operó *fruBKA* en resposta a la concentració de fructosa en el medi. Alguns autors continuen usant la nomenclatura antiga FruR, tot i que la importància de la seva funció pleiotròpica en regular la direcció del fluxe metabòlic de compostos carbonats aconsella l'ús de la nomenclatura CRA (Saier, 1996).

Estudis en mutants del regulador FruR van permetre observar que aquests mutants perdien la capacitat de créixer en una sèrie de substrats gluconeogènics com a úniques fonts de carboni, p.e. acetat, piruvat, succinat, etc. La incapacitat de créixer en aquests compostos és causada per la manca de síntesi d'alguns enzims gluconeogènics. En aquests mutants la utilització de substàncies glicolítiques es veu afavorida. Estudis de la relació d'aquest fenomen amb les concentracions de cAMP van demostrar que la inhibició del creixement en resposta a la deficiència de FruR era independent de cAMP (Chin *et al*, 1987).

CRA controla la síntesi de nombrosos enzims de manera sistemàtica: reprimeix la transcripció dels gen que codifiquen enzims implicats en la fermentació de sucres (p.e. enzims clau de la glicòlisi, de la via d'Entner-Doudoroff, diferents enzims que inicien el catabolisme de sucres) i activa la transcripció dels enzims que permeten l'oxidació de substrats (p.e. enzims clau de la gluconeogènesi, del cicle de Krebs, del cicle del glioxilat, de la cadena de transport electrònic).

CRA és una proteïna de 334 residus aminoacídics. És una proteïna d'unió al DNA pertanyent a la família de reguladors LacI-GalR (Weickert i Adhya, 1992). Conté dos dominis funcionals: un domini d'unió al DNA a l'extrem N-terminal on s'observa una estructura d'hèlix-volta-hèlix i un domini a l'extrem C-terminal que mostra capacitat d'unió als efectors i interacció entre les subunitats (Scarabel *et al*, 1995). CRA s'uneix al DNA en forma d'homotetràmer. Quan en el citosol existeixen els efectors fructosa-1-fosfat (F-1-P) o fructosa-1,6-bisfosfat (F-1,6-BP), aquests s'uneixen a CRA, amb afinitats diferents, i provoquen un canvi estructural en el tetràmer que provoca la pèrdua de la capacitat d'unió al DNA. En presència d'un o ambdós efectors, els promotors activats per CRA es desactiven i els que estan reprimits per CRA es desreprimeixen.

La seqüència d'unió de CRA al DNA té un consens que demostra que el factor de transcripció s'uneix al DNA de forma asimètrica (Nègre *et al*, 1996). La seqüència consens és:

TGCTGAATC / GATTCAA

Estudis *in vitro* d'unió de CRA als diferents membres del seu moduló demostren que la capacitat d'unió depèn de la similitud del promotor respecte la seqüència consens. Aquesta observació també s'aprecia *in vivo* amb fusions dels diferents promotors al gen *lacZ*.

Tantmateix, s'ha pogut observar que promotors on no existeix una seqüència consens per la unió de CRA poden estar regulats per aquest factor proteic. Per exemple, la implicació de CRA sobre l'expressió de *cydAB* queda demostrada en mutants *cra*. En aquest cas *cydAB* és regulat per l'acció cooperativa entre CRA i Fnr (Ramseier *et al*, 1996)

La unió de CRA al promotor és revertida per la inclusió de concentracions micromolars de F-1-P o milimolars de F-1,6-BP. Per tant, en presència d'aquestes molècules efectores els operons sota control negatiu de CRA estan desreprimits i els operons sota control positiu no estan activats (Figura 2) (Saier i Ramseier, 1996).

Després d'haver-se definit la seqüència consens per la unió de CRA als promotors, es va fer una recerca en el banc de dades de seqüències d'*Escherichia coli* per tal d'identificar quants operons la contenien en el seu promotor. De tots els operons trobats, onze van ser analitzats. Només en cinc operons es va poder observar un binding *in vitro* de CRA al seu promotor. Precisament aquests operons capaços d'unir CRA estan implicats en el metabolisme de fonts de carboni. El sis restants, tot i tenir una seqüència similar al consens per CRA, no van mostrar cap afinitat pel mateix (Ramseier *et al*, 1995). Aquest fet reafirma la implicació de CRA en la regulació pleiotròpica de la major part de fonts de carboni utilitzades per *Escherichia coli*.

Els membres del moduló CRA són, entre altres *gapB* (gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa), *pykF* (piruvat quinasa I), *edd-eda* (codifiquen pels enzims de la via d'Entner-Doudoroff, 6-fosfogluconat deshidratasa i 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconat aldolasa respectivament), *mtlADR* (operó maltosa), tots ells reprimits per CRA i *pckA* (PEP carboxiquinasa), *aceBAK* (operó acetat) i *ppsA* (fosfoenolpiruvat sintasa), activats per CRA. L'acció reguladora de CRA depèn de la posició relativa de la seqüència consens respecte al promotor. Així, quan aquesta es troba en posició propera a les posicions -10 i -35 (a 3' d'elles) actua com a repressor, i quan està situat en posicions més a 5' actua com a activador (Figura 2).

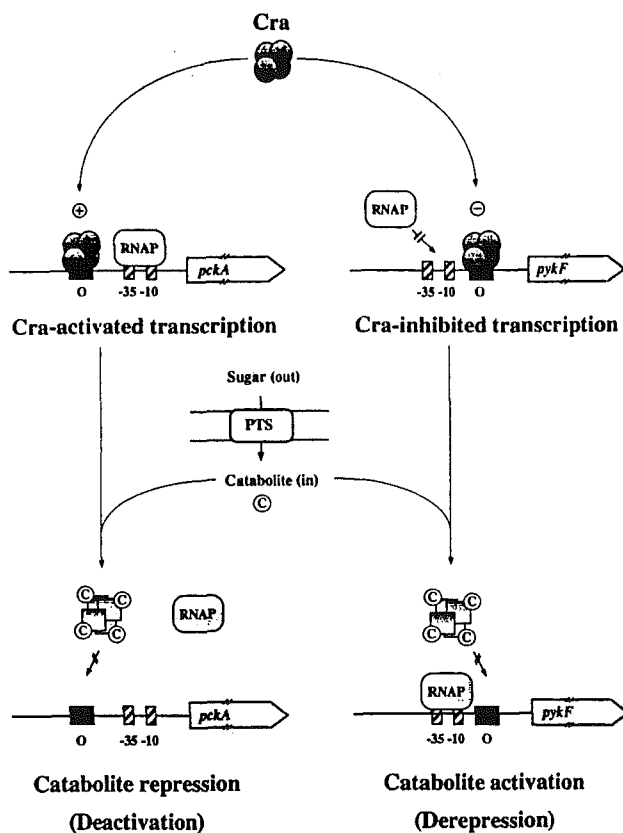


Figura 2. Model de regulació de la transcripció mediat per CRA. Models de repressió catabòlica mediada per CRA (esquerra) i d'activació catabòlica (dreta). o: seqüència operadora (Saier i Ramseier, 1996).

CRA és capaç d'activar l'expressió gènica a distàncies considerables del *tsp*, possiblement gràcies a un plegament en el DNA, que permet que contacti amb l'RNA polimerasa. En el cas del gen *pckA* (PEP carboxiquinasa), hi ha dues caixes d'unió a CRA situades a 284 pb i 145 pb en direcció 5' al *tsp*. Aquesta distància és comparable a la de l'operó *ace*, on la caixa per CRA es troba a 170 pb del *tsp* en direcció 5'.

Tots els gens que estan sotmesos a activació per CRA pertanyen al cicle de Krebs, al cicle del glioxilat, a la gluconeogènesi o a la cadena de transport electrònic. Sembla clar, doncs, que CRA funciona modulant la direcció del fluxe de carbonis en les diferents rutes metabòliques, afavorint la degradació anaeròbica de sucres o la degradació aeròbica de compostos carbonats acoblada amb la biosíntesi de sucres, depenent de les condicions fisiològiques.

3.3. Regulació de l'expressió gènica per disponibilitat d'oxigen

Durant el curs de l'evolució, *Escherichia coli* i altres bacteris van anar adquirint la capacitat de créixer en ambients en els quals havien de fermentar, en d'altres en els quals respiraven de forma anaeròbica, i finalment després de l'aparició de les plantes verdes sobre la Terra, van adquirir la capacitat de respirar usant l'oxigen com a acceptor final dels electrons en la cadena respiratòria. Cadascuna d'aquestes formes d'obtenció d'energia es duu a terme de manera que s'obtingui en cada moment el màxim d'energia. La maximització en l'obtenció d'ATP és el regulador principal en l'elecció del tipus de creixement. El rendiment energètic per consum d'un mol de glucosa durant la respiració aeròbica, la respiració anaeròbica per nitrat, la respiració anaeròbica per fumarat i la fermentació és de $\Delta G = -2830$ kJ/mol, $\Delta G = -858$ kJ/mol, $\Delta G = -550$ kJ/mol i $\Delta G = -218$ kJ/mol respectivament. Així, en la regulació jerarquitzada de la transducció d'energia, el transport d'electrons és preferit a la fosforilació a nivell de substrat. Dins la respiració, són preferits aquells acceptors finals d'electrons que tenen un potencial redox més positiu. L'acceptor final d'electrons que proporciona un major E° és l'oxigen molecular. Durant la respiració anaeròbica, el nitrat és preferit com acceptor final d'electrons al nitrit, i aquest al DMSO (dimetilsulfòxid), que alhora és preferent davant fumarat.

Durant el creixement aeròbic, *Escherichia coli* sintetitza almenys dos tipus de citocrom oxidases (citocrom oxidasa *o*, codificada per *cyoABCDE*, i citocrom oxidasa *d*, codificada per *cydAB*) amb diferents afinitats per l'oxigen i diferents velocitats de reacció. Durant les condicions de respiració anaeròbiques es sintetitzen com a mínim cinc oxidoreductases terminals per cadascun dels acceptors finals d'electrons alternatius nitrat, nitrit, DMSO, TMAO (òxid de trimetilamina) i fumarat. Cadascuna d'aquestes oxidoreductases és capaç d'acoblar l'oxidació del NADH amb els diferents acceptors d'electrons a través del conjunt de quinones cel·lulars (p.e. ubiquinona o menaquinona).

Quan *Escherichia coli* usa el nitrat com a acceptor final d'electrons es sintetitzen dues nitrat reductases: una majoritària codificada per *narGHJI* i una minoritària codificada per *narZYWW* (Stewart, 1988). Quan respira a expenses de DMSO o TMAO es sintetitza la DMSO/TMAO reductasa, codificada per l'operó *dmsABC*, que és un enzim d'àmplia especificitat de substrat. El DMSO és un producte d'oxidació de sulfurs metilats en entorns marins i d'aigües salvatges. El TMAO és un agent osmoregulador d'un variat grup de peixos marins. *Escherichia coli* possiblement s'ha adaptat a utilitzar aquests dos darrers acceptors d'electrons en l'intestí humà per contacte amb la nostra alimentació. En usar el fumarat, *Escherichia coli* sintetitza una fumarat reductasa codificada per *frdABCD*, que catalitza la reducció de fumarat a succinat (Gunsalus, 1992).

La síntesi dels enzims implicats en vies respiratòries està controlada per la presència o absència dels diferents acceptors finals d'electrons. Quan existeix oxigen, els enzims anaeròbics pràcticament no es sintetitzen. El nitrat regula la síntesi de les oxidoreductases anaeròbiques: els nivells de nitrat reductases són alts, mentre que la DMSO/TMAO reductasa i la fumarat reductasa estan reprimides. Únicament quan desapareix el nitrat del medi aquests darrers enzims es sintetitzen. En absència de cap acceptor d'electrons la cèl.lula deixa de respirar i obté energia a través de la fermentació. Aquesta estratègia de control de les proteïnes respiratòries està afavorida pel màxim rendiment energètic possible en cada situació i per la limitació d'espai disponible en la membrana citoplasmàtica.

Quan *Escherichia coli* creix en presència d'oxigen, l'expressió dels enzims necessaris per dur a terme la respiració aeròbica, és a dir, els components de cicle dels àcids tricarboxílics i les oxidases terminals està augmentada. En aquest cas, tots els enzims necessaris per la fermentació i la respiració anaeròbica estan reprimits. Aquest creixement aeròbic reporta un clar avantatge a nivell energètic però també comporta alguns riscos: la producció d'espècies molt reactives com són el radical superoxid ($O_2^{\cdot-}$), el peròxid d'hidrogen (H_2O_2) o el radical hidròxid ($\cdot OH$) (Iuchi i Weiner, 1996). Aquests productes del metabolisme aeròbic malmeten diferents estructures cel.lulars, com són lípids de membrana, proteïnes, DNA, etc. Per aliviar la toxicitat d'aquests compostos danyins la cèl.lula disposa d'enzims protectors, com són la catalasa I (HPI) i la superòxid dismutasa depenent de Mn (SodA). D'aquesta manera, *Escherichia coli* pot créixer i optimitzar el seu rendiment energètic evitant al màxim la toxicitat dels compostos provinents de reaccions colaterals en el metabolisme aeròbic. L'expressió dels enzims "protectors" està òbviamt sota regulació per disponibilitat d'oxigen, ja que no són necessaris quan aquests radicals no es formen, és a dir quan les condicions de creixement comporten una respiració anaeròbica o bé fermentació (Iuchi i Weiner, 1996).

3.3.1. El moduló FNR

En la dècada dels 60, ja s'havia observat que els nivells d'activitat de proteïnes involucrades en el creixement anaeròbic està molt augmentat durant l'anaerobiosi (Gray *et al*, 1966). Aquestes observacions van portar a pensar que possiblement havia d'existir un regulador global que controlés aquest augment d'activitat. Estudis genètics van permetre identificar aquest factor clau en la regulació dels enzims anaeròbics. Aquest factor és la

proteïna Fnr (fumarate nitrate reduction), el gen de la qual (*fnr*) es localitza al min 29 del cromosoma d'*Escherichia coli*.

Fnr és una proteïna de 250 aminoàcids, que guarda una alta similitut en l'estructura terciària amb la proteïna CRP o CAP (Introducció 3.2.1). Igual que la proteïna que regula la repressió catabòlica per glucosa, Fnr és un regulador transcripcional. Tot i que la proteïna purificada és un monòmer, Fnr actiu és un homodímer. S'uneix als promotors que regula mitjançant un domini hèlix-volta-hèlix situat a l'extrem carboxi-terminal de la proteïna (Bell i Busby, 1994).

A l'extrem N-terminal, Fnr conté una zona rica en cisteïnes, on hi ha quatre residus Cys essencials per la seva funció, possiblement per estar implicats en la unió al ferro. El ferro és el metall que pot sentir els canvis en el medi, de manera que modificacions en la valència del mateix fan canviar la funció de Fnr com a regulador transcripcional. Quan el ferro quelat està en forma de Fe^{2+} (ferro reduït, condicions d'anaerobiosi), Fnr és actiu com a regulador transcripcional i activa la transcripció de gens implicats en el metabolisme anaeròbic. En un ambient oxidant, és a dir, en una atmosfera aeròbica, el ferro es troba en forma de Fe^{3+} i Fnr és inactiu i no pot activar la transcripció (Green i Guest, 1993). Els canvis en la valència del metall quelat fan variar l'estructura de la proteïna i per això varia la seva activitat transcripcional.

Fnr s'uneix als promotors dels gens que regula de manera que s'extén sobre una seqüència palindròmica de 22 pb. La seqüència consens d'unió a Fnr és TGAT. La posició d'aquesta seqüència en el promotor és de gran importància per la funció activadora o repressora que Fnr exerceix. Quan la seqüència consens d'unió a Fnr està situada al voltant de la posició -41.5, Fnr actua com a activador de sistemes que han d'estar activats en condicions anaeròbiques. Per contra, no existeix una situació concreta quan actua com a repressor de gens aeròbics, ja que podem trobar les seqüències consens en qualsevol posició (Green i Guest, 1994).

La proteïna Fnr té uns efectes tant globals sobre la transcripció d'un gran nombre de gens que es considera que forma un moduló. Dins dels membres d'aquest moduló trobem, entre d'altres, *arcA* (ArcA), *fhnGHI* (format deshidrogenasa N), *nirBDC* (nitrit reductasa NADH-dependent), *nrdD* (ribonucleòtid reductasa anaeròbica), *glpACB* (glicerol 3-fosfat deshidrogenasa anaeròbica), sobre els quals Fnr actua com a activador transcripcional i *cydAB* (citocrom d oxidasa), *cyoABCDE* (citocrom o oxidasa), *sdhCDAB* (succinat deshidrogenasa) i *sodA* (MnSod) en els quals actua com a repressor.

3.3.2. El moduló ARC

La repressió anaeròbica dels gens que són necessaris pel creixement d'*Escherichia coli* en condicions aeròbiques és duta a terme pel sistema de dos components Arc (Aerobic respiratory control). Aquest sistema està compost per una molècula sensora (ArcB) i una molècula efectora (ArcA). ArcB està codificada pel gen *arcB* (min 69.5) i ArcA pel gen *arcA* (min 0). En els primers estudis, a *arcA* se'l va denominar *dye*, ja que els mutants en aquest gen presenten una sensibilitat a colorants com el blau de toluidina en presència de llum (Iuchi i Lin, 1988).

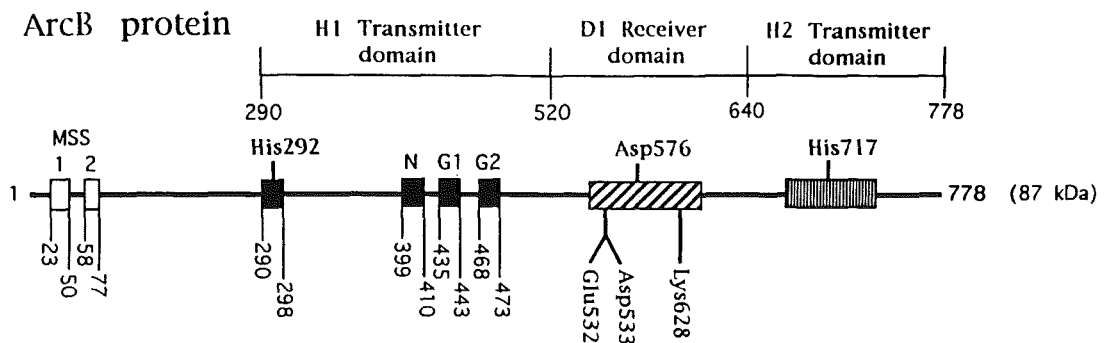


Figura 3. Representació esquemàtica d'ArcB. MSS: segments transmembrana de l'extrem N-terminal (Georgellis *et al*, 1997).

ArcB és una proteïna de membrana de 778 residus aminoacídics i 87 kDa de massa molecular. Té dos possibles dominis transmembrana (des de Phe₂₃ a Val₅₀ i de Ser₅₈ a Val₇₇) separats per aproximadament set residus aminoacídics, que estan exposats al compartiment periplàsmic (Iuchi *et al*, 1990). Està composta per dos dominis transmissors (H1 i H2) separats per un domini receptor (D1). Els residus actius en cada domini són respectivament la His₂₉₂, la His₇₁₇ i l'Asp₅₇₆ (Figura 3). Sota condicions reductores o d'anòxia ArcB s'autofosforila en el residu His₂₉₂. És possiblement algun component de la cadena de transport d'electrons que està en forma reduïda el senyal directe que actua estimulant l'autofosforilació d'ArcB, ja que s'ha demostrat que l'oxigen molecular no és el senyal per l'activació de la quinasa de membrana. Aquesta autofosforilació provoca una activació de la proteïna, que passa el residu fosforil a l'Asp₅₇₆. Seguidament, aquest domini D1 es defosforila i provoca la fosforilació del domini H2 en la posició His₇₁₇ (Georgellis *et al*, 1997). Hi ha indicis que apunten al domini D1 com a l'element regulador de l'activitat quinasa d'ArcB, ja que es creu que té activitat fosfatasa sobre el domini H2.

Aquesta transducció del senyal d'anaerobiosi provoca la fosforilació de l'altre membre del sistema, ArcA. ArcA és una proteïna citosòlica amb 238 residus aminoacídics i una massa molecular de 27 kDa. Està composta per dos dominis: el domini D2 o receptor (on el residu actiu és l'Asp₅₄) i el domini d'unió al DNA on resalta un motiu HTH (Figura 4). L'estructura d'hèlix-volta-hèlix és la zona per on ArcA s'uneix als promotors dels operons que regula. La funció d'ArcA és la de ser un regulador transcripcional. Actua reprimint els operons que no s'han d'expressar anaeròbicament i en menor mesura activant gens anaeròbics.

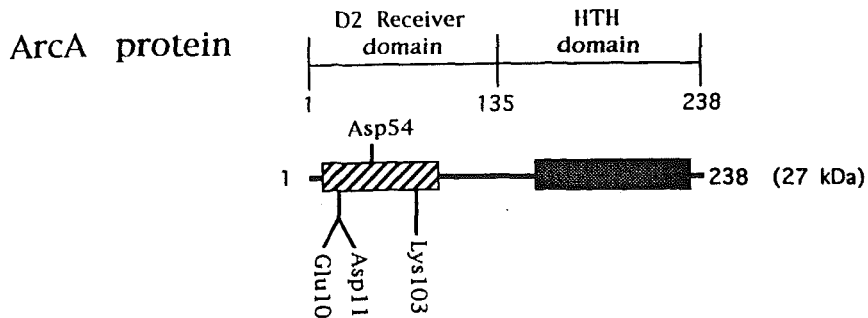


Figura 4. Representació esquemàtica d'ArcA. (Georgellis *et al*, 1997).

Per ser activa com a regulador transcripcional, ArcA ha d'estar fosforilada. La fosforilació ve mediada per diferents mecanismes. El domini H2 d'ArcB transmet el seu grup fosforil al domini D2 d'ArcA en el residu Asp₅₄, que també el pot rebre, encara que en menor mesura, d'H1 (Figura 5). No només ArcB és capaç de fosforilar ArcA, sinó que altres petites molècules poden fer-ho, p.e. l'acetilfosfat (Lukat *et al*, 1992). Aquesta és la raó per la qual existeix en la cèl.lula sempre una petita quantitat de proteïna fosforilada, tot i no estar en condicions d'anaerobiosi. Les mutacions en *arcB* poden ser superades per una sobreexpressió d'*arcA*, ja que la proteïna podrà ser fosforilada per altres donadors de grups fosfat.

L'abundància de la proteïna ArcA es veu molt modificada en funció de la disponibilitat d'oxigen del medi. La transcripció d'*arcA* és quatre vegades superior en condicions anaeròbiques que aeròbiques. Els factors de transcripció que regulen la seva expressió són ArcA i Fnr; ambdós exerceixen un paper activador sobre la transcripció i són necessaris per assolir una completa activació. L'activació d'*arcA* mitjançada per Fnr juga un paper molt important en la coordinació de l'expressió de gens associats amb el metabolisme aeròbic i anaeròbic durant els canvis en l'ambient (Compan i Touati, 1994).

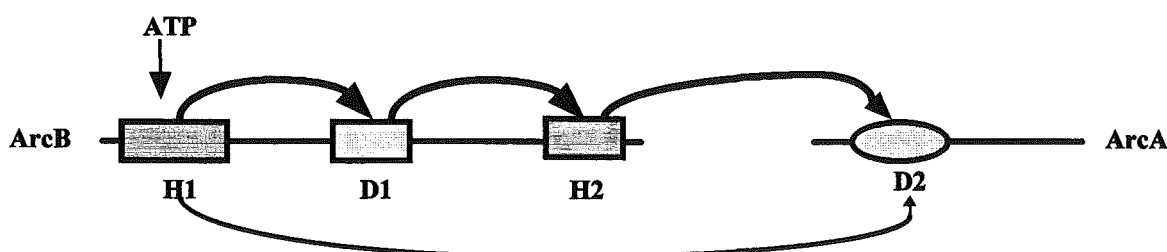


Figura 5. Model de transducció de senyals en el sistema Arc *in vitro*. Les fletxes indiquen la direcció de la transferència del grup fosfat. El gruix de les fletxes mostra la influència relativa de cadascuna d'aquestes vies en la fosforilació d'ArcA.

Els components del moduló Arc són, entre d'altres, *cyoABCDE* (citocrom o oxidasa), *lctD* (L-lactat deshidrogenasa), *aldA* (aldehid deshidrogenasa), *sdhCDAB* (succinat deshidrogenasa) i *sodA* (MnSod) sobre els quals té un efecte repressor de la transcripció, i *arcA* (ArcA), *cydAB* (citocrom d oxidasa), *hyaA-F* (hidrogenasa 1) i *traY* (plasmidi F amb funcions de transferència de DNA) sobre els quals actua com a activador transcripcional. És interessant resaltar el fet que existeixen alguns membres del moduló Arc que també ho són del moduló Fnr. Ambdues regulacions són sinèrgiques, i asseguren l'activació dels gens anaeròbics i la desconexió dels gens aeròbics sota condicions d'anaerobiosi.

ArcA fosforilat, ArcA-P, s'uneix als promotors dels gens que regula de forma específica (Lynch i Lin, 1996). Existeix una seqüència consens d'unió d'ArcA als seus promotors, deduïda de l'estudi de diferents operons del moduló Arc. La seqüència, que té 10 pb i dues posicions flexibles en els seus extrems, és:

WGTTAATTAW (W=A ó T)

Aquesta seqüència ha estat deduïda per aliniament de les seqüències de diferents membres del moduló Arc. Per la validació d'aquesta seqüència proposada com a consens per la unió d'ArcA-P es requereixen estudis de mutagènesi dirigida de la possible caixa i observar després els efectes que les mutacions tenen sobre la capacitat d'unió d'ArcA-P i sobre l'expressió *in vivo* (Lynch i Lin, 1996a).

Les posicions de les caixes ArcA en els promotors dels membres del seu moduló són variables. Quan ArcA actua com a repressor, acostuma a unir-se a les regions -10 i -35, de manera que impedeix la unió de l'RNA polimerasa i per tant la transcripció. També s'uneix a zones pròximes a les zones d'unió d'altres factors de transcripció, p.e. IHF o CRP, de manera que la seva impossibilitat d'unió als promotors és el mecanisme pel qual ArcA reprimeix.

En analitzar la unió d'ArcA a alguns promotors per tècniques de "gel shift", es pot observar com a l'augmentar la concentració proteica es formen complexos amb una més baixa mobilitat electroforètica. Aquest fenomen és causat bé per la presència de múltiples llocs d'unió per ArcA en el promotor, o bé, molt probablement perquè la proteïna pot oligomeritzar un cop està unida a la seva seqüència consens (Drupal i Sawers, 1995). En l'anàlisi d'altres promotors, en els quals existeix més d'una seqüència consens per ArcA, la unió de la proteïna fosforilada a cadascuna de les caixes és independent. No cal la unió a una caixa per ajudar a la unió de les altres, tot i que la capacitat en la unió de la proteïna difereix segons la caixa (Shen i Gunsalus, 1997). La importància relativa de les diferents caixes per ArcA presents en un promotor no es pot deduir de les anàlisi *in vitro*, sinó que requereix una anàlisi *in vivo*.

També en aquest tipus d'anàlisis es pot observar com la capacitat d'unió d'ArcA al DNA es veu incrementada 10 cops per la fosforilació. És possible, doncs, que la fosforilació provoqui un canvi en l'estructura de la proteïna que ajudi a la seva unió al DNA i/o que col.labori en seva oligomerització. Estudis fets amb ArcA purificada semblen demostrar que aquest factor de transcripció s'uneix als promotors en forma de dímer (E. C. C. Lin, comunicació personal).

Els experiments encaminats a elucidar la seqüència exacta del promotor on s'uneix ArcA ("footprintings") permeten observar que no existeix normalment una protecció en forma de caixa definida, sinó que la proteïna sembla tenir unes zones de protecció principal i també una zona de protecció més laxa que s'extén a ambdós extrems de la regió més fortament protegida (Lynch i Lin, 1996a).

El funcionament del moduló Arc està regulat, a més a més de per la composició de l'atmosfera del medi extern, per la concentració intracel.lular de diferents compostos. Així, s'ha observat que la fosforilació del sensor-quinasa ArcB està induïda per piruvat, D-lactat, acetat i NADH, que són compostos que estan elevats en condicions de manca d'un acceptor final d'electrons efectiu. Estudis *in vitro* han demostrat la capacitat de fosforilació d'ArcB en presència d'aquests metabolits (Tuchi, 1988).

Quan la disponibilitat d'oxigen desapareix, la cèl.lula passa a fermentar o bé a respirar anaeròbicament si en el medi existeixen acceptors finals d'electrons alternatius. Quan més d'un acceptor exogen d'electrons és disponible, la cèl.lula usa preferentment el compost amb un

potencial redox més positiu (Iuchi i Lin, 1991). Per exemple, el nitrat ($E'^{\circ} = 433$ mV) és preferit a TMAO ($E'^{\circ} = 130$ mV), i aquest darrer al fumarat ($E'^{\circ} = 30$ mV). En condicions aeròbiques, tot i que existeixi nitrat, la cèl.lula escollirà l'oxigen perquè el seu potencial redox és superior ($E'^{\circ} = 818$ mV) al de cap altre acceptor final. Aquesta selecció dels acceptors exògens permet un major creixement cel.lular per mol de glucosa consumida.

Quan *Escherichia coli* creix utilitzant nitrat, l'efecte repressor mitjançat per ArcA i provocat per la manca d'oxigen és contrarrestat. En aquestes condicions de respiració anaeròbica els operons *sdh* i *lct*, típicament involucrats en el metabolisme aeròbic, estan desreprimits, i així poden ser usats per la cèl.lula per créixer sota aquesta atmosfera anòxica (Iuchi *et al*, 1994). L'efecte supresor de la repressió per Arc es duu a terme perquè el component de la membrana cel.lular que queda reduït en absència d'oxigen (que és el senyal activador de l'autofosforilació d'ArcB), pot passar els electrons al nitrat (que quedarà reduït a nitrit) i així en forma oxidada no és un senyal per la fosforilació d'ArcB. L'utilització de nitrat activa la nitrat reductasa i reprimeix les reductases dels acceptors d'electrons menys favorables energèticament. Aquesta inducció preferent de l'operó de la nitrat reductasa ve mediada per la proteïna reguladora NarL. Alhora, la repressió de les altres reductases ve mediada per una proteïna regulada amb l'anterior anomenada NarP (Iuchi i Lin, 1987).

4. PAPER DELS COMPOSTOS DE DOS CARBONIS EN EL METABOLISME CENTRAL D'*Escherichia coli*

4.1. Metabolisme de l'acetat

4.1.1. Vies metabòliques implicades en la utilització d'acetat com a font de carboni. Cicle dels àcids tricarboxílics (TCA) i cicle del glioxilat

L'acetat pot ser utilitzat com a única font de carboni i energia per part de diferents bacteris, entre ells *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp* i *Salmonella typhimurium*. L'acetat és considerat un substrat de baix nivell (en referència a la poca energia que s'aconsegueix en la

seva utilització), i molts altres compostos són utilitzats preferentment en un medi que contingui acetat i un altre compost del tipus de la glucosa, fructosa, glicerol, lactat o àcids del cicle de Krebs.

L'entrada d'acetat en forma d'acetil-CoA al metabolisme central comporta dues conseqüències:

i) d'una banda, la generació d'energia a partir d'acetil-CoA requereix tant el cicle dels àcids tricarboxílics (TCA) com la cadena respiratòria per obtenir energia oxidant el NADH obtingut. Per tant, l'acetil-CoA serveix com a font de carboni i energia quan la cèl.lula es troba en un ambient aeròbic o quan existeixen acceptors finals d'electrons alternatius a l'oxigen com són nitrat o òxid de trimetilamina (en absència d'un acceptor final d'electrons, l'acetil-CoA és convertit en una mescla d'àcid acètic i etanol),

ii) el catabolisme de l'acetil-CoA via cicle dels TCA desprèn carbonis en forma de CO_2 i per tant es requereix una via anapleròtica per reomplir els intermediaris del cicle de Krebs. La via anapleròtica emprada quan l'acetat és la font de carboni pel creixement cel.lular és el cicle del glioxilat, també anomenat "glyoxylate bypass".

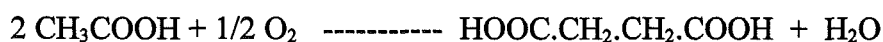
Els experiments pioners en l'estudi de la utilització de compostos de dos carbonis per part de bacteris daten dels anys 50. En aquella dècada es van estudiar les vies de síntesi de constituents cel.lulars a partir de compostos C_2 . Es va poder observar que soques de *Pseudomonas sp* creixent en presència d'acetat marcat radioactivament amb ^{14}C incorporaven el carboni marcat molt ràpidament. Aquest microorganisme utilitza el cicle dels TCA per metabolitzar l'acetat, i els intermediaris d'aquest cicle apareixien marcats radioactivament molt depressa. Després de 3 seg, citrat, malat fumarat i succinat, i alguns dels aminoàcids formats directament a partir del cicle dels TCA (glutamat i aspartat), havien incorporat ^{14}C . La distribució de la radioactivitat incorporada entre els compostos marcats i la variació de la distribució en funció del temps suggerien la incorporació dels carbonis de l'acetat tant a nivell de citrat com a nivell d'un compost dicarboxílic de quatre àtoms de carboni (C_4) (Kornberg i Krebs, 1957). L'observació en extractes crus de *Pseudomonas sp* que l'acetil-CoA en presència d'oxalacetat era transformat a citrat (per l'enzim citrat sintasa), i el fet que també aquest acetil-CoA podia transformar-se en malat per condensació amb glioxilat (per l'activitat enzimàtica malat sintasa), i per tant reomplir el cicle dels TCA, va conduir al descobriment parcial del cicle del glioxilat. Ja es coneixia que en *Pseudomonas sp*, *Penicillium chrysogenum* i *Escherichia coli* existia una activitat enzimàtica anomenada isocitrat liasa (antigament anomenada isocitritasa), capaç de trencar l'isocitrat per donar glioxilat i succinat. Aquesta activitat enzimàtica, junt amb la malat sintasa, formen el cicle del glioxilat. L'observació inicial de la formació d'un compost dicarboxílic de C_4 corresponia al succinat producte de la reacció catalitzada per la isocitrat liasa.

La incubació d'extractes cel.lulars amb isocitrat produeix quantitats iguals de glioxilat i succinat. En presència d'acetat, CoA i ATP, el glioxilat desapareix i es forma malat. Les quantitats d'isocitrat usades són aproximadament iguals a les quantitats de succinat i malat més glioxilat formades. És evident que l'acció combinada de l'isocitrat liasa i la malat sintasa poden reemplaçar les etapes del cicle dels TCA en les quals es forma malat a partir d'isocitrat. L'existència del cicle del glioxilat implica que hi ha dues variants del cicle dels TCA:

i) utilització de tots els passos del cicle dels TCA per oxidar completament l'acetat, tenint un rendiment net de:



ii) utilització de les reaccions del cicle dels TCA excepte les que comporten descarboxilacions, que són substituïdes pel cicle del glioxilat. Aquesta via condueix a un rendiment net de:



La formació de succinat permet que aquest sigui utilitzat en la formació dels esquelets carbonats de diferents aminoàcids. D'aquesta manera, el cicle del glioxilat és un pas en la formació de constituents cel.lulars a partir d'acetat.

El cicle del glioxilat és present en la majoria de plantes (és especialment important en les seves llavors) i microorganismes però no es dona en animals superiors. L'objectiu primordial del cicle és el de permetre a aquests organismes la utilització d'acetat i àcids grassos, en forma d'acetyl-CoA, com a úniques fonts de carboni i energia i sobretot per la síntesi neta de glucosa. Això és possible ja que les etapes del cicle dels TCA en les quals es perden dos àtoms de carboni en forma de CO_2 són obviades pel cicle del glioxilat. A cada volta del cicle s'incorporen dues molècules d'acetyl-CoA i es forma una molècula de succinat, que s'usa sobretot amb finalitats biosintètiques i gluconeogèniques.

En les plantes superiors i microorganismes poden actuar simultàniament el cicle dels TCA i cicle del glioxilat: el primer proporciona energia mitjançant fosforilació oxidativa i el segon aporta a la cèl.lula succinat, que serà utilitzat com a precursor biosintètic. Segons les condicions intracel.lulars i les necessitats energètiques, la importància relativa de les dues vies es pot modificar (LaPorte *et al*, 1985). Aquesta modificació s'exerceix sobre l'enzim isocitrat deshidrogenasa.

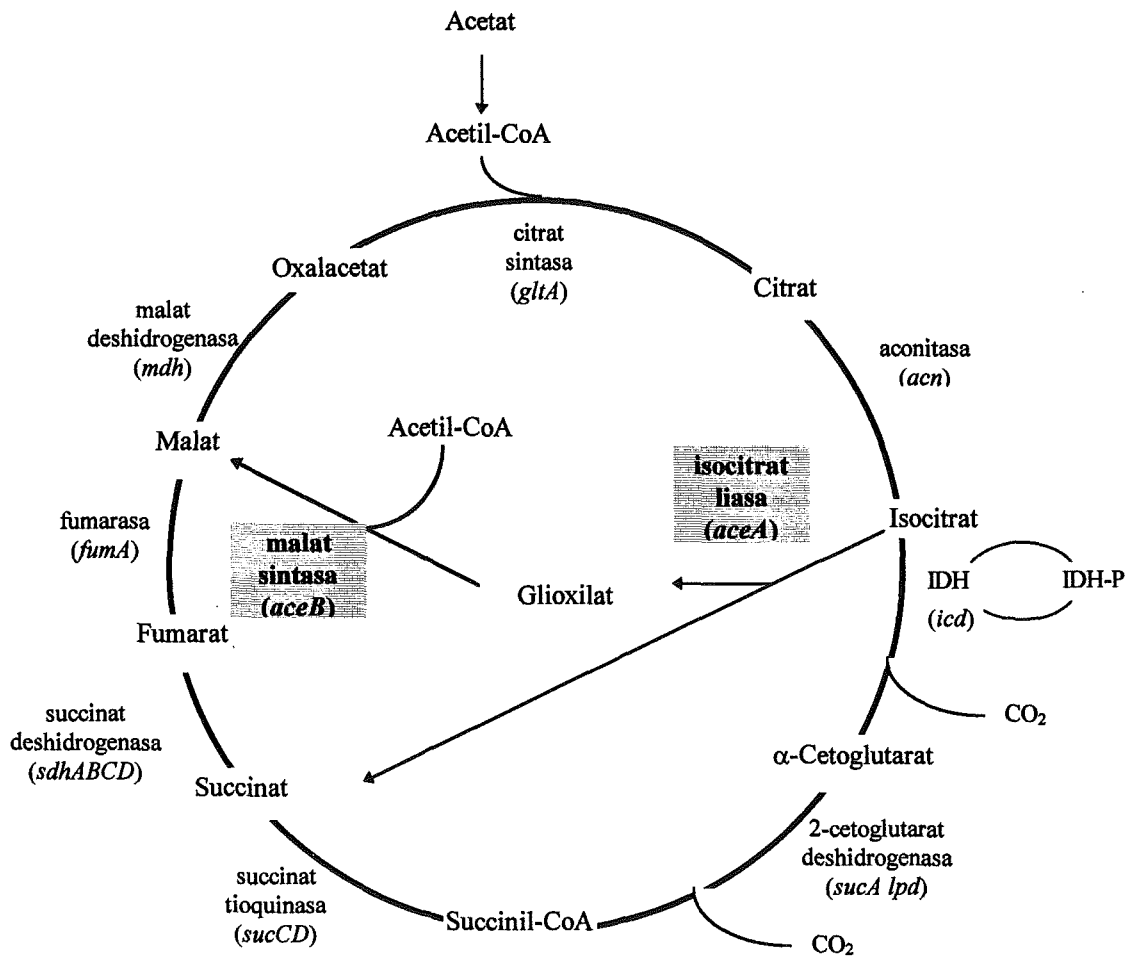


Figura 6. El cicle dels àcids tricarboxílics (TCA) i el cicle del glioxilat. El cicle del glioxilat es compon dels enzims isocitrat liasa i malat sintasa (resaltats en quadre gris). IDH i IDH-P indiquen les formes defosforilada i fosforilada, respectivament, de l'enzim isocitrat deshidrogenasa.

La isocitrat deshidrogenasa, tercer enzim del cicle dels àcids tricarboxílics, catalitza la reacció de descarboxilació oxidativa de l'isocitrat per convertir-lo en α -cetoglutarat. És un enzim dimèric codificat pel gen *icd*. Està regulat per fosforilació/defosforilació; la seva regulació juga un paper clau en la partició dels carbonis entre el cicle dels TCA i el cicle del glioxilat ja que controla el fluxe d'isocitrat a través de les dues vies.

Quan *Escherichia coli* passa de créixer en acetat a una altra font de carboni preferida l'activitat d'IDH augmenta. Està comprovat que aquesta activació no és un efecte que s'exerceixi sobre la transcripció, ja que l'activació és visible en presència d'inhibidors de la

síntesi proteica. Durant el creixement en acetat, el 75% de l'enzim s'inactiva, ja està en forma fosforilada, que és la seva forma inactiva. D'aquesta manera, el cicle dels TCA s'alenteix i l'isocitrat és forçat a passar a través del cicle del glioxilat. L'enzim que catalitza la fosforilació i defosforilació d'IDH és l'IDH quinasa/fosfatasa, codificada pel gen *aceK* (pertanyent a l'operó *aceBAK*). Les dues activitats, la quinasa i la fosfatasa, estan codificades en la mateixa proteïna, i comparteixen el mateix centre actiu. El mecanisme d'acció de la quinasa es basa en la unió de l'isocitrat a una serina del centre actiu a través d'una unió per pont d'hidrogen. Quan l'IDH està fosforilada, precisament en aquest residu actiu de serina, existeix repulsió electrostàtica entre l'isocitrat i el grup fosfat, i no es pot dur a terme la catàlisi (Hurley *et al*, 1990). L'activitat fosfatasa es produeix per la reacció inversa que requereix la hidròlisi d'una molècula d'ATP.

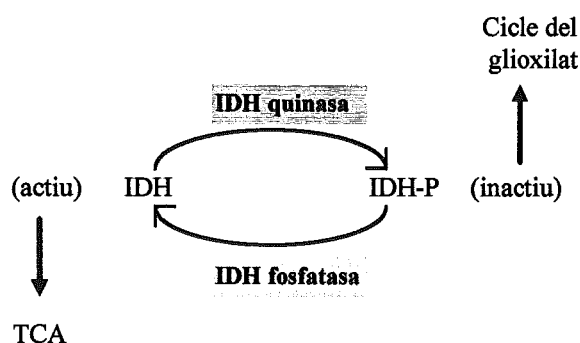


Figura 7. Cicle de fosforilació de la isocitrat deshidrogenasa. Regulació de l'enzim i vies activades segons la seva conformació.

Una de les funcions del cicle de fosforilació de la IDH és la de regular el punt de ramificació entre el cicle del glioxilat i el cicle dels TCA durant el creixement en fase estacionària en acetat. La fosforilació de la isocitrat deshidrogenasa desvia part de l'isocitrat del cicle de Krebs cap al cicle del glioxilat. Això succeeix perquè la inhibició de l'enzim comporta un acúmul d'isocitrat que activa el primer enzim del cicle del glioxilat, la isocitrat liasa (Figura 7).

Una altra funció del cicle de fosforilació de la IDH és la de controlar el cicle del glioxilat durant la transició en la utilització de diferents fonts de carboni. L'addició de glucosa o glicerol en un medi fa innecessari el cicle del glioxilat. En aquestes condicions, la cèl·lula inhibeix el cicle a causa de la defosforilació i conseqüent activació de la IDH, que converteix l'isocitrat a través del cicle de Krebs. El descens en la concentració d'isocitrat provoca un descens proporcional en l'activitat isocitrat liasa (LaPorte *et al*, 1984).

La defosforilació de la IDH observada quan s'addiciona a un medi amb acetat una font de carboni preferible es deu, al menys en una part, als nivells de piruvat que augmenten molt després de l'addició de glucosa.

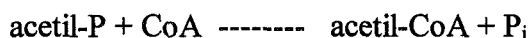
El balanç energètic cel.lular també intervé en la regulació de la fosforilació/defosforilació de la IDH. L'AMP és un efector cel.lular que activa l'activitat IDH fosfatasa i inhibeix la IDH quinasa. Un increment en els nivells d'AMP, que és un senyal de depleció d'energia cel.lular, provoca l'entrada de més molècules d'isocitrat cap al cicle de Krebs, ja que la IDH està activada (Cronan i LaPorte, 1996).

És clar, doncs, que *Escherichia coli* és capaç d'adaptar el cicle del glioxilat tant a les condicions dels medi que l'envolta com a les necessitats cel.lulars internes d'energia i de precursors biosintètics.

L'acetat, abans de ser introduït en el metabolisme central, és convertit a Acetil-CoA.

Existeixen dos mecanismes a través dels quals l'acetat és convertit a acetil-CoA:

1) L'acció seqüencial de l'acetat quinasa (*ackA*) i la fosfotransacetilasa (*pta*) que catalitzen, respectivament, les següents reaccions:



Els nivells d'ambdues proteïnes varia molt poc en diferents fonts de carboni. Les condicions aeròbiques i anaeròbiques tampoc semblen afectar-les. Durant el creixement aeròbic, mutants *ackA* i *pta* mostren dificultat per créixer en acetat com a única font de carboni i energia. Quan creixen en presència de glucosa, aquests mutants són incapaçs d'incorporar acetat marcat radiactivament. Quan el creixement es fa en presència de glicerol, sí que existeix incorporació de radiactivitat provinent d'acetat. Aquests resultats indiquen la presència d'un segon sistema de transformació d'acetat en acetil-CoA present en cèl.lules crescudes en glicerol però inexistent en cultius en presència de glucosa (Brown *et al.*, 1977).

2) A *Escherichia coli* existeix una acetil-CoA sintetasa (*acs*) induïble que permet incorporar acetat marcat radiactivament en els mutants *ackA* i *pta*. La reacció que catalitza és:



L'expressió d'aquest enzim és regulada per repressió catabòlica per glucosa. En la soca salvatge tant actuen l'acetat quinasa i la fosfotransacetilasa com l'acetil-CoA, en funció de la font de carboni que existeixi en el medi, ja que els primers no són reprimits per glucosa però sí els segons.

4.1.2. Organització gènica i regulació de l'operó *ace*

Els dos enzims que formen el cycle del glioxilat són la isocitrat liasa i la malat sintasa A. La isocitrat liasa està codificada pel gen *aceA*. A *Escherichia coli* existeix una única isocitrat liasa, que és induïda tant per creixements en acetat com en glicolat (Zarembiski *et al*, 1991). Aquest enzim és un homotetràmer de Pm 188000. Cadascuna de les quatre subunitats té un Pm de 48000. És un enzim dependent de magnesi i inactivat per metalls pesats. La malat sintasa A (denominada així per diferenciar-la de l'isoenzim malat sintasa G, induïda per creixements en glicolat i glioxilat), està codificada pel gen *aceB*. És una proteïna monomèrica de 61000 Da de massa molecular, i està induïda per creixements en acetat (LaPorte *et al*, 1984).

Existeix un altre gen estructural que forma part de l'operó *ace*, que tot i que no forma part del cycle del glioxilat, regula l'activitat d'aquest cycle controlant l'activitat enzimàtica de l'enzim isocitrat deshidrogenasa (IDH) del cycle dels TCA (Introducció 4.1.1.). Aquest gen, *aceK*, codifica la isocitrat deshidrogenasa quinasa/fosfatasa, proteïna amb un Pm de 66000 (Cortay *et al*, 1988).

El sistema *ace*, situat al min 91 del cromosoma d'*Escherichia coli*, està estructurat en forma d'operó (Figura 8). Tots els gens estructurals comparteixen un únic promotor per davant del gen *aceB* que dona lloc a un transcrit policistrònic. La proteïna reguladora del sistema és el repressor IclR, codificat pel gen *iclR*, està situada a continuació del gen *aceK*.

L'operó *ace* està reprimat en condicions anaeròbiques pel sistema de regulació de dos components ArcB/ArcA (Iuchi i Lin, 1988). També està reprimat per la presència de fonts de carboni alternatives com són glucosa, piruvat, glicerol, etc. (Kornberg, 1967). L'expressió d'*aceBAK* està afectada pel factor IHF, que augmenta la seva transcripció cinc vegades. El factor CRA també estimula l'activació d'aquest operó (Ramseier *et al*, 1993). A més del repressor específic IclR, el sistema *ace* està regulat per la proteïna FadR, regulador transcripcional del reguló *fad*, implicat en la utilització d'àcids grassos a *Escherichia coli*.

Tot i que els gens de l'operó *ace* s'expressen a partir del mateix promotor, els nivells cel·lulars relatius de malat sintasa A:isocitrat liasa:IDH quinasa/fosfatasa són 0.3:1:0.003. La diferència en els nivells de malat sintasa A i isocitrat liasa és un efecte de la diferent eficiència de

traducció. Les diferències entre isocitrat liasa i IDH quinasa/fosfatasa són provocades per una traducció ineficient i per una terminació prematura de la transcripció (Ghung *et al*, 1993).

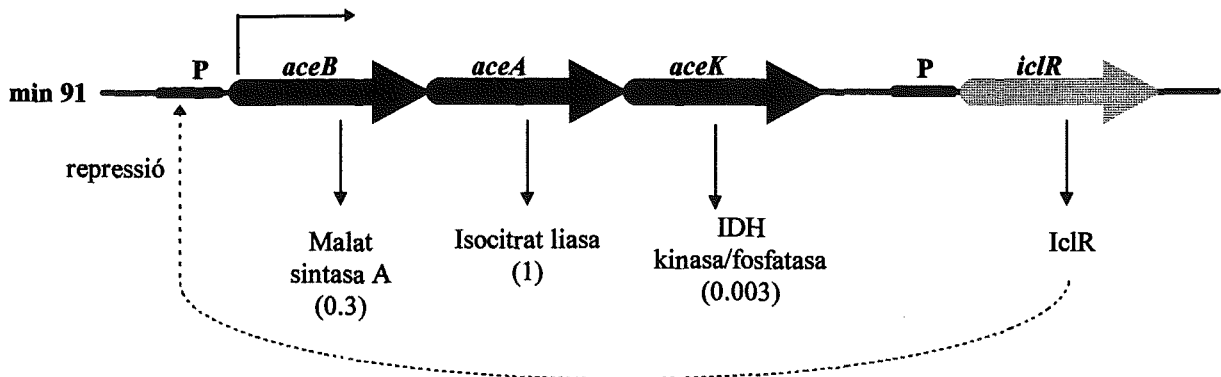


Figura 8. Organització gènica de l'operó *ace*. Sota de les proteïnes es mostra l'abundància relativa en la cèl.lula.

4.2. Metabolisme del glicolat i glioxilat

El glicolat i el seu producte d'oxidació, el glioxilat, són compostos de dos àtoms de carboni àmpliament difosos en la naturalesa. El glicolat és component important del raïm immadur, de la canya de sucre i de la remolatxa. És produït per algues i d'altres organismes fototrofs i cromatotrofs, acumulant-se a la superfície de llacs i aigües marines (Edenborn i Lichfield, 1985) (Friedrich *et al*, 1991) (Friedrich i Schink, 1991).

El glicolat és també un important intermediari en nombrosos processos industrials. Pot sintetitzar-se químicament (Seip *et al*, 1993) i el seu reduït cost fa que sigui molt utilitzat com a àcid orgànic en un llarg nombre de processos. Es detecta com a intermediari de la degradació anaeròbica de cloracetat (Egli *et al*, 1989) i com a subproducte en el tractament d'aigües residuals que continguin 2-metoxietanol (Tanaka *et al*, 1986).

D'altra banda el glicolat i el glioxilat són intermediaris de processos de biodegradació de compostos pol.lucionants com són l'etilenglicol i el polietilenglicol, molt usats en la producció de detergents.

Escherichia coli tipus salvatge és incapaç de créixer a expenses d'etilenglicol, però s'han aconseguit mutants capaços d'utilitzar aquest compost com a única font de carboni i energia (Boronat *et al*, 1983). Aquests mutants poden créixer a expenses de l'etilenglicol perquè disposen dels enzims necessaris per l'oxidació de l'L-1,2-propandiol i del glicolat. Exceptuant el sistema de transport, els primers passos de l'oxidació de l'L-1,2-propandiol i de l'etilenglicol estan catalitzats pels mateixos enzims, tot i que donen lloc a dos productes diferents: L-lactat i glicolat respectivament.

El glicolat i el glioxilat també són intermediaris en la metabolització de diferents fonts de carboni. *Escherichia coli* utilitza l'L-fucosa mitjançant un sèrie d'enzims induïbles: la fucosa permeasa (Heath i Lin, 1977), la fucosa isomerasa (Green i Cohen, 1956), la fuculosa quinasa (Heath i Ghalambor, 1962) i la fuculosa-1-fosfat aldolasa (Ghalambor i Heath, 1962). Els productes de la reacció catalitzada per l'últim enzim són la dihidroxicetona fosfat, que s'introdueix en el metabolisme general, i l'L-lactaldehid. L'L-ramnosa és metabolitzada a *Escherichia coli* a través d'una via paral·lela a la descrita per l'L-fucosa, però específica d'aquest sucre i els seus intermediaris. Els enzims específics del metabolisme d'L-ramnosa són: ramnosa permeasa (García-Martín *et al*, 1992), ramnosa isomerasa (Takagi i Sawada, 1964), ramnulosa quinasa (Takagi i Sawada, 1964a) i ramnulosa-1-fosfat aldolasa (Sawada i Takagi, 1964). Aquest últim enzim sintetitza dihidroxicetona fosfat i L-lactaldehid. Per tant, la via de l'L-fucosa i de l'L-ramnosa convergeixen en la formació d'L-lactaldehid i dihidroxicetona fosfat, per la qual cosa el posterior metabolisme d'aquests compostos és comú per tots dos sucres. Aeròbicament, l'L-lactaldehid és oxidat a L-lactat per l'enzim aldehid deshidrogenasa (Sridhara i Wu, 1969) i aquest darrer es transforma en piruvat per una lactat deshidrogenasa induïble (Cocks *et al*, 1974). Anaeròbicament, l'L-lactaldehid és reduït a L-1,2-propandiol per acció d'un enzim induïble, la propandiol òxid-reductasa (POR) i posteriorment excretat al medi (Cocks *et al*, 1974).

S'han aïllat mutants d'*Escherichia coli* capaços utilitzar la D-arabinosa com a única font de carboni i energia a través dels enzims de la via de l'L-fucosa (Zhu i Lin, 1986) (Bartkus i Mortlock, 1986). Les successives reaccions enzimàtiques donen lloc a dihidroxicetona fosfat, que és introduïda en el metabolisme general, i en aquest cas glicolaldehid, el qual és oxidat a glicolat per l'enzim aldehid deshidrogenasa (Baldomà i Aguilar, 1987). Aquest glicolat és posteriorment metabolitzat a través de la seva oxidació a glioxilat per la via del D-glicerat. El glioxilat és també un intermediari generat directament en la metabolització de diversos compostos, com són l'acetat (Introducció 4.1.) o la degradació de bases púriques (Vogels i Van der Drift, 1976).

L'enzim aldehid deshidrogenasa va ser per primera vegada purificat i parcialment caracteritzat per Sridhara i Wu (1969). En un principi es va anomenar lactaldehid

deshidrogenasa per la seva alta afinitat per l'L-lactaldehid, però posteriorment es va observar que era capaç d'oxidar un gran nombre d'aldehids, entre ells l'L-lactaldehid provinent del metabolisme d'L-fucosa, L-ramnosa i propandiol i el glicolaldehid format en la degradació d'etilenglicol, D-arabinosa i L-lixosa (Baldomà i Aguilar, 1987). La caracterització bioquímica i genètica d'aquest enzim s'ha dut a terme en el nostre laboratori.

La síntesi de l'enzim és induïble per la presència en el medi de ramnosa, L-fucosa, D-arabinosa o d'aminoàcids com el glutamat (Quintillà *et al*, 1991). La seva expressió és nul·la en condicions anaeròbiques (Baldomà i Aguilar, 1988). L'enzim ha estat purificat, i s'ha demostrat que és un homotetràmer de 220000 Da. Cada subunitat té una massa molecular de 55000 Da. L'enzim és capaç d'oxidar diversos α -hidroxialdehids com són L-lactaldehid, L-gliceraldehid, glicolaldehid, etc.

El gen que codifica aquest enzim ha estat clonat i seqüenciat (Hidalgo *et al*, 1991). S'ha anomenat *aldA* i s'ha localitzat en el min 31.2 del cromosoma d'*Escherichia coli* (Chen *et al*, 1987). El gen *aldA* té una estructura gènica d'operó. L'expressió de l'operó *aldA* està sota el control de diferents reguladors transcripcionals (Limon *et al*, 1997). Està regulada per un activador específic del sistema (encara per determinar), per CRP-cAMP i per IHF. S'ha comprovat que l'expressió d'*aldA* està sota el control del sistema de dos components Arc. Mentre que en condicions anaeròbiques la transcripció de l'operó és el 10 % de la que existeix en presència d'oxigen, mutants *arcA* mostren anaeròbicament els mateixos nivells d'expressió que la soca salvatge, indicant la directa participació del sistema Arc en la repressió del sistema en condicions anaeròbiques (Limon *et al*, 1997).

4.2.1. Vies metabòliques per la utilització de glicolat i glioxilat a *Escherichia coli*

El primer pas en el metabolisme de glicolat és la seva oxidació a glioxilat, reacció catalitzada per l'enzim glicolat oxidasa (GOX). La glicolat oxidasa és un enzim induïble per creixements en glicolat i, en menor grau, en glioxilat (Lord, 1972). La glicolat oxidasa és un enzim associat a la membrana citoplasmàtica. Una part de l'enzim sembla estar integrada a la membrana i una altra part està en la seva superfície, ja que el tractament de la fracció de membrana amb un anticòs específic només fa disminuir en un 58 % la seva activitat. L'activitat es perd completament, però, quan l'anticòs s'afegeix a la fracció de membrana prèviament solubilitzada (Sallal i Nimer, 1989).

A *Escherichia coli* existeix una activitat enzimàtica anomenada glioxilat reductasa (GXR), que redueix el glioxilat a glicolat. Aquest enzim és constitutiu en la cèl·lula: els nivells

d'activitat no es veuen modificats per creixements en glicolat o glioxilat. És un enzim citosòlic que utilitza com a cofactor el poder reductor del NADPH (Ornston i Ornston, 1969). Això implica que sempre que existeixi glioxilat en el citosol, podrà existir glicolat gràcies a l'acció de la glioxilat reductasa.

El glioxilat format per acció de la glicolat oxidasa és llavors metabolitzat per dues vies diferents, una de les quals es dirigeix cap a la ruta de la glicòlisi (via del D-glicerat) i l'altra cap al cicle de Krebs (formació de malat).

D'una banda, el glioxilat és transformat en malat per acció de l'enzim malat sintasa G (MSG), que a diferència de la malat sintasa A (*aceB*), és induïda per creixements en glicolat i glioxilat (Vanderwinkel i DeVlieghere, 1968). Aquest isoenzim de malat sintasa catalitza la mateixa reacció que la de l'isoenzim A en el cicle del glioxilat: el glioxilat reacciona amb l'acetil-CoA per formar malat i es desprèn una molècula de CoA. El malat format en aquesta reacció és introduït en el cicle de Krebs.

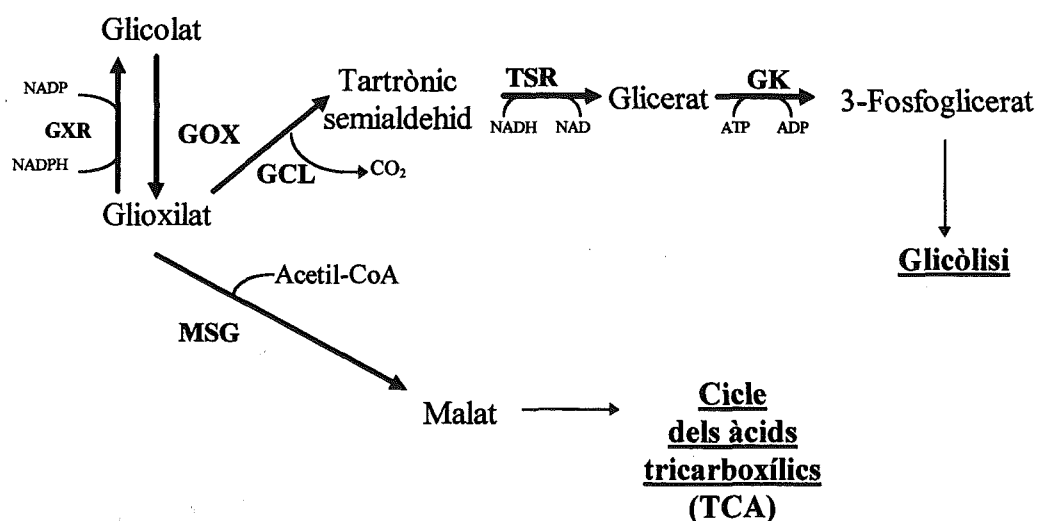


Figura 9. Vies metabòliques del glicolat i glioxilat a *Escherichia coli*.

D'altra banda, el glioxilat es metabolitza a través de la via del D-glicerat. El primer enzim de la via és la glioxilat carbolligasa (GCL). Catalitza la condensació de dues molècules de glioxilat per donar una molècula de tartrònic semialdehid i una de CO₂. La glioxilat carbolligasa està codificada pel gen *gcl*, localitzat al min 12 del cromosoma d'*Escherichia coli*, i és induïble per glioxilat, però no per glicolat. És una proteïna de 593 residus aminoacídics

amb un pes molecular de 64738. Conté un lloc d'unió per una quinona i també un domini d'unió al FAD. La tiamina pirofosfat-Mg²⁺ és el cofactor emprat per a dur a terme la descarboxilació. Aquest enzim pertany a la família de proteïnes acetohidroxiàcids sintases i piruvat oxidases (Chang *et al*, 1993).

El tartrònic semialdehid format en la primera reacció de la via del D-glicerat és reduït per l'enzim tartrònic semialdehid reductasa (TSR), usant NADH o NADPH com a cofactors. Com a producte de la reacció s'obté D-glicerat. No hi ha referències bibliogràfiques sobre la localització gènica del gen corresponent.

Per últim, el D-glicerat és transformat en 3-fosfoglicerat en una reacció de fosforilació catalitzada per la glicerat quinasa (GK). El destí del 3-fosfoglicerat format és l'entrada en la glicòlisi i la posterior oxidació fins a piruvat i acetil-CoA.

Tot i que és conegut que el cicle del TCA és la ruta principal de l'oxidació d'acetat (Introducció 4.1.1.), l'oxidació completa de compostos més oxidats que l'acetat no està del tot clara. Existeixen dues teories que proposen camins diferents per la total oxidació del glicolat i el glioxilat:

1) Els estudis sobre el metabolisme de glicolat a *Pseudomonas sp* van fer-se a principis de la dècada del 60. Kornberg i Gotto (1961) van proposar una teoria que està sustentada en diverses observacions. En aquests estudis es podia observar com la incorporació de glicolat marcat radioactivament en el carboni 2 (2-¹⁴C-glicolat) en la cèl.lula es detectava en forma de malat, fosfoglicerat, glicina, citrat i glutamat. En les mostres dels primers moments de l'experiment la proporció de radioactivitat incorporada es distribuïa de la següent manera: malat 28 %; fosfoglicerat, 25 %; glutamat: 15 %; citrat: 14 %; glicina: 13 % i aspartat: 4 %. Aquestes proporcions canviaven amb el temps. Després de dos minuts, el 40 % de la radioactivitat es trobava incorporada en forma de glutamat; fosfoglicerat: 13 %; glicina: 6 %; malat: 17 %; citrat 10 % i aspartat 8 %. Les tres corbes amb el pendent més negatiu eren les corresponents al fosfoglicerat, a la glicina i al malat. Aquests tres compostos passaven a tenir en total el 65 % de la radioactivitat a tenir-ne el 35 % en 2 minuts. D'aquests resultats van concloure que el glicolat entra a les vies metabòliques actives a *Pseudomonas sp* en llocs pròxims a glioxilat (o glicina), fosfoglicerat i malat.

L'observació que mutants de *Pseudomonas sp* en la citrat sintasa (*gltA*), que per tant tenen tallada la via d'entrada al cicle dels TCA, creixien en glicolat amb la mateixa eficiència que la soca salvatge implicava que el cicle de Krebs no tenia un paper essencial en el metabolisme de glicolat (Kornberg i Gotto, 1961). Quan aquests mutants creixien en glioxilat (compost més oxidat que el glicolat), el seu creixement s'enlentia si també eren mutants de malat sintasa G. D'aquesta observació es va deduir que la malat sintasa G havia de tenir un

paper fonamental en la degradació del glioxilat. Van proposar el nom de via dels àcids dicarboxílics a la ruta que es posava en marxa en aquests creixements (Figura 10). Segons aquests autors, la malat sintasa G inicia l'oxidació del glioxilat formant malat. El malat és llavors oxidat, via oxalacetat i piruvat, per formar acetil-CoA. La via del D-glicerat seria en aquesta hipòtesi una reacció anapleròtica per reomplir el cycle dels àcids dicarboxílics per aportació de 3-fosfoenolpiruvat. Segons aquesta hipòtesi, la utilització de glicolat i glioxilat és un exemple de metabolisme en el qual la importància del cycle de Krebs queda en un segon pla.

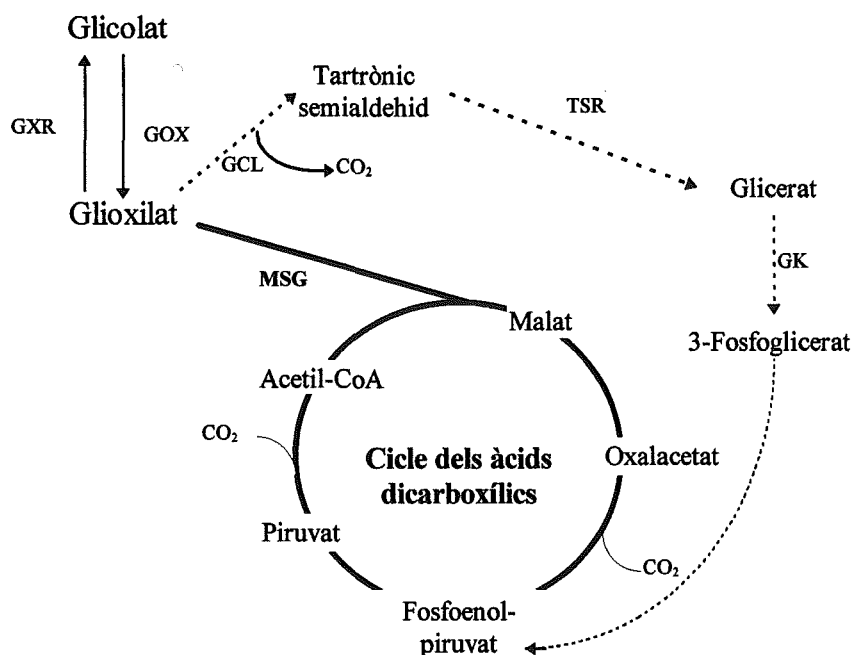


Figura 10. Cycle dels àcids dicarboxílics. En línies contínues es mostra la via principal de degradació del glioxilat a *Pseudomonas sp* i en línies discontinues es mostren les reaccions anapleròtiques segons estan descrites per Kornberg i Gotto (1961). GXR: glioxilat reductasa; GOX: glicolat oxidasa; GCL: glioxilat carbolligasa; TSR: tartrònic semialdehid reductasa; GK: glicerat quinasa; MSG: malat sintasa G.

2) L'altra teoria que explica l'oxidació completa de glicolat i glioxilat a *Escherichia coli* va ser proposada inicialment per Hansen i Hayashi (1961) i confirmada posteriorment per Ornston i Ornston (1969). Segons aquests autors, la malat sintasa G actua com a ruta anapleròtica per formar malat i la via del D-glicerat actua com a via oxidativa que aporta acetil-CoA al cycle de Krebs.

Les observacions en les quals basaven la seva teoria eren que mutants de glioxilat carbolligasa són incapaçs de créixer tant en glicolat com en glioxilat, indicant el paper principal de la via del D-glicerat en l'oxidació d'aquests dos compostos (Figura 11).

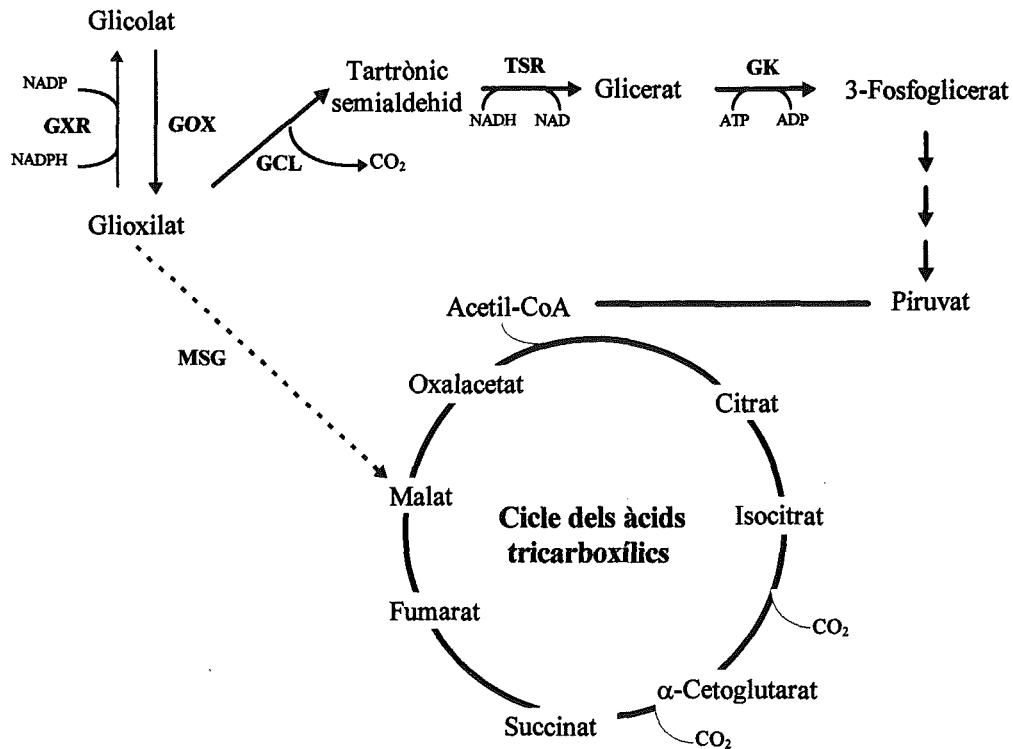


Figura 11. Utilització de glicolat i glioxilat mitjançant la via del D-glicerat i el cicle dels TCA. Es pot veure la via del D-glicerat, la ruta anapleròtica duta a terme per la malat sintasa G, el cicle dels TCA i també la connexió amb la formació d'intermediaris metabòlics centrals. En línies contínues es mostren les vies principals i en discontinúes la ruta anapleròtica, segons Ornston i Ornston (1969). GXR: glioxilat reductasa; GOX: glicolat oxidasa; GCL: glioxilat carbolligasa; TSR: tartrònic semialdehid reductasa; GK: glicerat quinasa; MSG: malat sintasa G.

També van observar que mutants de malat sintasa G podien créixer tant en glicolat com en glioxilat, indicant el paper secundari de la malat sintasa G, que catalitza una ruta anapleròtica. La glioxilat carbolligasa era essencial inclús quan funcionava la malat sintasa G, ja que al generar 3-fosfoglicerat que entrava en la glicòlisi, es sintetitzava l'acetil-CoA necessari per la formació de malat per part de la malat sintasa G. Per tant, en aquesta hipòtesi, en contra de la de Kornberg i Gotto (1961), l'MSG és una ruta anapleròtica i la via principal de degradació del glioxilat és la via del D-glicerat i el cicle de Krebs.

4.2.2. Organització gènica

4.2.2.1. Locus *gcl*. Via del D-glicerat

El locus *gcl* està localitzat en el minut 12 del cromosoma d'*Escherichia coli*. Codifica la glioxilat carbolligasa (*gcl*) i un ORF anomenat *orf258* de funció desconeguda (Chang *et al*, 1993). En el nostre laboratori s'estan duent estudis sobre l'organització d'aquest locus. Sembla que també s'hi troben localitzats els gens que codifiquen la tartrònic semialdehid reductasa i la glicerat quinasa. Els estudis realitzats indiquen que existeix un únic promotor comú a tots els gens estructurals de la via del D-glicerat, situat en posició 5' de la glioxilat carbolligasa.

4.2.2.2. Locus *glc*

El locus *glc* està localitzat en el minut 64.5 del cromosoma d'*Escherichia coli*. Codifica les activitats malat sintasa G i glicolat oxidasa (Molina *et al*, 1994). El gen de la malat sintasa G (*glcB*) ha estat seqüenciat i el seu producte gènic identificat com una proteïna de 723 residus aminoacídics, amb un Pm de 82000.

El clon pLB10, derivat del fag λ 1G7 de la genoteca de Kohara (Kohara *et al*, 1987), que té un insert *Hind*III d'11.5 kb, conté la regió cromosòmica del locus *glc* suficient per codificar els enzims glicolat oxidasa i malat sintasa G (Molina *et al*, 1994). Un cop localitzat el gen *glcB*, quedava per localitzar el(s) gen(s) que codifica(quen) la glicolat oxidasa així com identificar el regulador del sistema. Aquesta localització i l'estudi de la genètica molecular i regulació del locus *glc* és l'objectiu d'aquesta tesi.

4.3. Característiques diferencials dels isoenzims de malat sintasa a *Escherichia coli*

En les vies metabòliques implicades en l'oxidació dels compostos de dos carboni glicolat i acetat existeix una reacció enzimàtica idèntica catalitzada per l'activitat malat sintasa. Aquesta activitat consisteix en una acetilació d'una molècula de glioxilat (el donador del grup

acetil és l'acetil-CoA) per formar malat. L'activitat malat sintasa duta a terme en els dos casos està catalitzada per dos isoenzims: la malat sintasa A, pertanyent al cicle del glioxilat i la malat sintasa G, implicada en el creixement cel·lular en glicolat. L'existència dels dos isoenzims està demostrada gràcies a diferents estudis fisiològics i enzimàtics (Falmagne *et al*, 1965) (Vanderwinkel i DeVlieghere, 1968). Una de les evidències més clares de l'existència de dos isoenzims de malat sintasa és l'observació que una soca constitutiva del cicle del glioxilat (té una mutació *glu* que fa que isocitrat liasa i malat sintasa A s'expressin constitutivament) quan es fa créixer en glicolat presenta una activitat malat sintasa suplementària igual a la que apareix a la soca no mutada. Aquest fet evidencia que a part de l'MSA existeix una malat sintasa diferent induïble per glicolat (MSG).

4.3.1. Diferències genètiques

En els estudis pioners sobre la genètica de la malat sintasa A (MSA) i la malat sintasa G (MSG) es va poder observar com la transducció de mutacions afectant a ambdós isoenzims amb diferents marcadors genètics era diferent i la conjugació es donava a minuts diferent (Vanderwinkel i DeVlieghere, 1968). Aquest fet ja va demostrar que les dues activitats estaven codificades per gens diferents i distants en el cromosoma d'*Escherichia coli*. En creixements en acetat l'MSA constitueix el 60% de l'activitat malat sintasa total i el 40 % restant correspon a MSG. Per contra, en creixements en glicolat, pràcticament tota l'activitat és donada per l'isoenzim G.

Estudis recents han permès establir la localització i la genètica de les dues malat sintases. L'MSA forma part de l'operó *ace* (min 91 del cromosoma d'*Escherichia coli*) juntament amb els gens que codifiquen la isocitrat liasa i la isocitrat deshidrogenasa quinasa/fosfatasa. L'MSA està codificada pel gen *aceB*, que té un tamany de 1478 pb. La proteïna MSA derivada del transcrit policistronic codifica un marc obert de lectura de 533 aminoàcids amb un pes molecular de 61000. Existeix un repressor anomenat IclR, codificat en el mateix locus que els gens estructurals, que reprimeix la seva expressió. La repressió és mediada per unió de la proteïna reguladora en la zona entre -10 i -35 del promotor. La unió d'aquest repressor és revertida per la presència de fosfoenolpiruvat, que és l'efector que en unir-se a IclR impedeix la unió d'aquest al promotor.

Els gen que codifica la malat sintasa G (*glcB*) forma part del locus *glc* juntament amb el(s) gen(s) que codifica(quen) l'activitat glicolat oxidasa (Molina *et al*, 1994). *glcB* té un tamany de 2262 pb i dona lloc a una proteïna de 723 aminoàcids, amb una massa molecular

calculada de 82000 Da. L'expressió de l'MSG està induïda per creixements en glicolat, en glioxilat i també, encara que en menor grau, en acetat. Els nivells assolits en creixements en acetat permeten que mutants en el gen *aceB* (MSA) creixin en acetat (Vanderwinkel i DeVlieghere, 1968). La regulació a nivell molecular de l'MSG i del altres membres del seu sistema són motiu d'estudi en aquesta tesi.

4.3.2. Diferències cinètiques i estructurals

A part de la diferent localització cromosòmica dels dos isoenzims de malat sintasa i del seu diferent patró d'expressió, existeixen diferències cinètiques i estructurals entre ells.

En extractes crus d'*Escherichia coli* l'MSG és més termoestable que l'MSA. A 53 °C l'MSG presenta un temps de vida mitja de 60 min, mentre que l'MSA el té de 14 min. Les cinètiques d'inactivació són, per totes dues, d'ordre I (Falmagne *et al*, 1965).

Els dos isoenzims es comporten de manera diferent en una cromatografia d'intercanvi aniònic en DEAE-cel.lulosa. Quan s'aplica un extracte cru a aquest tipus de columna amb un tampó Tris-HCl 5 mM (pH 8.0) i MgCl₂ 1 mM les dues proteïnes queden retingudes. Es poden eluir de la columna amb un gradient lineal de MgCl₂. L'MSG elueix a 40 mM MgCl₂ i l'MSA a 56 mM MgCl₂.

Taula 1. Temps de vida mitja de la malat sintasa G i la malat sintasa A a diferents temperatures i en diferents condicions.

T ^a incubació (°C)	Temps de vida mitja (min)	
	MSG	MSA
49°	59	18.5
55°	10.5	1.6
55° + glicolat 10 mM	49	70.0
55° + oxalat 10 mM		22.0
61°	1.0	--
61° + oxalat 10 mM	120.0	0.5

Les fraccions eluïdes de la columna de DEAE-cel.lulosa permeten corroborar les observacions respecte a l'estabilitat tèrmica fetes en extractes crus: l'MSA és més termolàbil que l'MSG.

Les constants de Michaelis-Menten de les dues malat sintases són diferents. La Km pel glioxilat de l'MSG és 4.92×10^5 i per l'MSA 8.2×10^5 . Les constants d'inhibició d'MSG pel glicolat i l'oxalat són, respectivament 1.99×10^5 i 1.13×10^5 . Per l'MSA, aquestes Ki són 2.54×10^5 pel glicolat i 1.88×10^5 per l'oxalat.

Les diferències estructurals entre MSA i MSG són molt grans. El seus pesos moleculars són força diferents: 61000 l'MSA i 82000 l'MSG. L'MSA té un pes molecular molt comú al d'altres malat sintases de diferents organismes: p.e. la malat sintasa 1 de *Saccharomyces cerevisiae* i la malat sintasa de *Brassica napus* tenen pesos moleculars de 60500 i 61700.

La comparació de les seqüències aminoacídiques de diferents malat sintases amb MSG mostra que aquestes no tenen una similitud significativa però que tenen diferents fragments conservats (Molina *et al*, 1994). La comparació d'MSA i MSG dona una similitud del 30 %, inferior al 55 % de similitud descrit entre diferents malat sintases de plantes, fongs i bacteris (Hikida *et al*, 1991). L'apilament de seqüències de vàries malat sintases amb MSG mostra que les zones de més alta similitud es troben localitzades a l'extrem N-terminal i també a l'extrem C-terminal, i que la zona central és molt menys semblant. De les nou caixes conservades descrites per diferents malat sintases (Hikida *et al*, 1991), MSG té tres caixes molt conservades (caixes 1, 2 i 9) i quatre parcialment conservades; dues caixes no es localitzen a MSG (caixes 7 i 8). La seqüència consens de les tres caixes conservades és EIT (caixa 1), ALNA (caixa 2) i LMDXAT (caixa 9). Possiblement aquestes tres caixes estan implicades en la formació del centre actiu o bé en funcions reguladores.

MSG conté una Cys₄₉₆ que es troba conservada en posicions equivalents en totes les malat sintases. Aquest aminoàcid conservat en tots els isoenzims mostra la importància dels grups sulfidrils en el mecanisme catalític de la malat sintasa (Durchslag i Zipper, 1988). Un segon residu de cisteïna, situat a prop de l'extrem C-terminal d'MSG (Cys₆₁₇), està conservat en malat sintases de llevats; en malat sintases de plantes aquest residu conservat és una serina.

MATERIALS

II. MATERIALS

1. SOQUES BACTERIANES

Totes les soques bacterianes utilitzades en aquest treball són *Escherichia coli*. En la Taula que es mostra a continuació es detallen totes les soques utilitzades per a dur a terme aquest treball així com les contruïdes en la realització del mateix. En la Taula es mostra el nom de les soques, les seves característiques més rellevants i el seu origen.

SOCA	GENOTIP RELEVANT	REFERÈNCIA
XLIBlue	<i>recA1 lac endA1 gyr A96 thi hsdR17 supE44 relA1</i> (F' <i>proAB lacI lacZ</i> Δ <i>M15</i> Tn10)	Stratagene
MC4100	<i>araD</i> Δ <i>lac rpsL flbB deoC ptsF rbsR</i>	Casadaban, 1976
JC7623	<i>arg thi thr leu pro his strA recB21 recC22 sbcB15</i>	Wackernagel, 1973
TE2680	F λ IN(<i>rrnD-rrnE</i>)1 Δ(<i>lac</i>)X74 <i>rpsL galK2 recD1903::Tn10d-Tet</i> <i>trpDC700::putPA1303::[Kan^r-Cam^r-lac]</i>	Elliot, 1992
RYC1000	<i>araD139</i> Δ(<i>lac</i> POZYA) U169 <i>rpsL (str) thi mot recA59</i>	Cedida per Martí Aldea
HN1491	K37 <i>himA::cat</i> ; IHF	Granston i Nash, 1993
K2704	k37 <i>himD3::cat</i> ; IHF	Mozola i Friedman, 1985
ECL493	<i>aldA trg2::Tn10</i>	Chen <i>et al</i> , 1987
ECL618	<i>arcA2 zjj::Tn10</i>	Iuchi <i>et al</i> , 1989
TG1	K12, Δ(<i>lac-pro</i>), <i>supE, thi, hsdD5/F' traD36, proAB, lacIq, lacZAM15</i>	Amersham
M15	F <i>lac ara gal mtl</i>	Qiagen
JA120	<i>thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tinA21 supE44 recA1 srlA::Tn10</i>	Badía <i>et al</i> , 1989
JA151	Δ(<i>speC-glc</i>) <i>aceB recA::cat</i>	Molina <i>et al</i> , 1994
JA154	MC4100 <i>glcC::cat</i>	Aquest treball
JA155	MC4100 <i>glcD::cat</i>	Aquest treball
JA156	MC4100 <i>glcE::cat</i>	Aquest treball

JA157	MC4100 <i>glcF::cat</i>	Aquest treball
JA158	MC4100 <i>glcG(NruI)::cat</i>	Aquest treball
JA159	MC4100 <i>glcB::cat</i>	Aquest treball
TP01	MC4100 <i>glcG(AgeI)::cat</i>	Aquest treball
TP02	MC4100 <i>glcT::cat</i>	Aquest treball
JA162	MC4100 <i>himA::cat</i>	Aquest treball
JA163	MC4100 <i>himD3::cat</i>	Aquest treball
JA164	MC4100 <i>arcA2</i>	Aquest treball
DV21A05	<i>lacZ43 l- relA1 Δ(speC-glc)63 spoT1 ppc2 thil aceB6</i>	Vanderwinkel i DeVlieghere, 1968
DV21A01	<i>lacZ43 l- relA1 Δ(speC-glc)63 spoT1 ppc2 thil aceA</i>	Vanderwinkel i DeVlieghere, 1968
JA165	<i>aceA</i>	Aquest treball
JA166	<i>aceB</i>	Aquest treball
JA167	<i>aceA glcB</i>	Aquest treball
JA168	<i>aceB glcB</i>	Aquest treball

2. VECTORS DE CLONATGE

2.1. Vectors de clonatge i anàlisi de DNA

Els fragments de DNA que van ser sotmesos a subclonatge majoritàriament van ser clonats en el sistema de vectors pBluescript (Stratagene), i en algunes ocasions en el vector pBR322. La utilització prioritària del vector pBluescript és conseqüència de la facilitat de selecció de les colònies recombinants en plaques d'LB suplementades amb Ap, Tc, X-Gal i IPTG, i per la fàcil replicació del plasmidi, que és d'alt nombre de còpies. L'ús del vector pBR322 es donava quan la clonació anava dirigida a obtenir plasmidis recombinants per mutar dirigidament un gen per inserció d'un casset que confereix resistència a cloramfenicol (Mètodes 1.4.2.1.). Per dur a terme la seqüenciació sistemàtica de la zona del locus *glc* que codifica els gens necessaris per complementar l'activitat glicolat oxidasa en el mutant JA151, tots els clons van ser construïts en el vector pBluescript, que permet la producció de deleccions sistemàtiques del fragment que es vol seqüenciar.

2.2. Vectors per la construcció de fusions de promotor

Per la construcció de fusions de promotor es van usar els vectors pRS550 i pRS551, pertanyents a la família de vectors pRS, descrita per Simons *et al* (1987). Els vectors pRS confereixen resistència a Ap i Kn. Aquests vectors tenen un petit polylinker compost per dues dianes de restricció: *EcoRI* i *BamHI*, flanquejat per seqüències terminadores de la transcripció a l'extrem 5' i per segments de l'operó *lac* a l'extrem 3'. El clonatge

del fragment de DNA del qual es vol analitzar la funció com a promotor de la transcripció s'estudia quan el plasmidi recombinant s'integra en el genoma de la soca salvatge en forma d'una única còpia.

2.3. Vectors per l'expressió i purificació de proteïnes

El vector utilitzat per l'expressió i purificació de la proteïna ArcA d'*Escherichia coli* és pQE30 (Qiagen). Aquest vector conté:

- 1) un element promotor optimitzat que consisteix en el promotor del fag T5 d'*Escherichia coli* i dues seqüències operadores *lac*;
- 2) una seqüència Shine-Dalgarno dissenyada per l'òptim reconeixement i unió del ribosoma;
- 3) una seqüència d'afinitat composta per sis histidines (6XHys) que permet el marcatge de la proteïna que es vol seleccionar perquè pugui ser purificada en una columna d'afinitat de níquel (Ni-NTA). Quan s'utilitza el vector pQE30 la cua queda col·locada a l'extrem N-terminal;
- 4) un polylinker que permet clonar en fase la proteïna amb la cua de 6XHys;
- 5) codons de parada de la traducció en tots els marcs de lectura; i
- 6) el terminador transcripcional "t_o" del fag λ i la regió de replicació i el gen de la β -lactamasa del plasmidi pBR322.

L'expressió d'aquest plasmidi a l'interior de la soca M15 està regulada per un altre plasmidi, el pREP4. Aquest plasmidi té clonat el repressor *lacI* i té resistència a Kn. Aquest s'expressa fàcilment i impedeix l'expressió de pQE30, ja que s'uneix a les dues seqüències *lac* existents en el seu promotor. L'activació de pQE30 s'aconsegueix afegint IPTG en el medi de cultiu.

2.4. Vectors per l'obtenció de fusions en forma de lisògens

Es va usar el fag λ RS45 per la transferència del promotor del gen *aldA* des de la soca MC4100, transformada amb el plasmidi de fusió de promotors pRS550 en forma de multicòpia, a la soca RYC1000, on la fusió queda integrada en forma de lisogen unicòpia.

3. OLIGONUCLEÒTIDS

Els oligonucleòtids o primers usats en aquest treball van ser dissenyats de manera que acomplissin els requisits que la tècnica en la qual s'empraven aconsellés. En tots els experiments els primers van ser dissenyats 100% homòlegs a l'àcid nucleic al qual s'havien d'hibridar. En alguns casos es van afegir cues a l'extrem 5' dels mateixos. Normalment l'addició d'aquestes seqüències extres, que contenen dianes de restricció per diferents endonucleases, tenia com a finalitat facilitar els posterior subclonatge del producte resultant de manera dirigida (es detallen específicament en els mètodes on van ser dissenyats d'aquesta manera).

4. REACTIUS

Els reactius usats en aquest treball van ser adquirits de la màxima puresa requerida en cadascun dels mètodes en els quals es van utilitzar. La conservació i manipulació dels mateixos es va dur a terme seguint les instruccions d'ús del fabricant (temperatura, humitat, efecte de la llum, etc.) i les mesures de precaució i seguretat que cada reactiu requerís. En cas que fós necessari, els reactius eren preparats extemporàniament i les restes dels mateixos no eren en cap cas reutilitzades.

5. PROGRAMES INFORMÀTICS I BASES DE DADES

Les anàlisis de les seqüències de DNA i proteïnes es van dur a terme amb el paquet de programes bioinformàtics de Genetics Computer Group de la Universitat de Wisconsin (USA), que permeten realitzar comparació entre seqüències de DNA o de proteïnes, alinear-les, buscar motius característics, conèixer el seu perfil d'hidrofobicitat, etc. La base de dades que va usar-se principalment va ser EMBL/GenBank per l'anàlisi de seqüències de DNA i Swiss-Prot per l'anàlisi de seqüències aminoacídiques.

MÈTODES

III. MÈTODES

1. MÈTODES MICROBIOLÒGICS

1.1. Cultius bacterians: medis i condicions de creixement

Els creixements bacterians van ser realitzats en diferents medis de cultiu i en diferents condicions de temperatura i d'aireació segons la soca utilitzada i l'experiment que es volia dur a terme.

Els medis d'ús rutinari en el laboratori i les seves aplicacions van ser els que es detallen a continuació. Es descriuen els medis líquids, que eren transformats en medi sòlids per l'addició d'1.5% (p/v) d'agar als mateixos i repartits en plaques de Petri. El creixement bacterià va ser seguit per la lectura de la densitat òptica (D.O.) a diferents longituds d'ona en funció del medi de cultiu.

Els cultius líquids aeròbics es van fer créixer en matrassos d'Erlenmeyer, de manera que el volum mig no superés el 10% del volum del recipient, a la temperatura desitjada en continua agitació en un agitador orbital a 250 rpm. Els cultius aeròbics en placa de Petri es feien créixer en un incubador termostatitzat a la temperatura desitjada.

En el cas dels cultius líquids anaeròbics, els creixements es duïen a terme en tubs d'assaig amb tap de rosca omplerts per complet de medi, tancats i segellats amb ParafilmTM i sense agitació. Les plaques de Petri es feien créixer de forma anaeròbica a l'interior d'un recipient dissenyat amb aquesta finalitat i utilitzant el sistema anaeròbic GasPackTM (BBL). El recipient segellat era introduït en un incubador termostatitzat a la temperatura desitjada.

Quan el cultiu estava format per cèl.lules transformades amb plasmidis multicòpia, s'addicionaven els antibiòtics pertinents a les següents concentracions:

Ampicil.lina	(Ap):	100 µg/ml
Tetraciclina	(Tc):	12.5 µg/ml
Kanamicina	(Kn):	25 µg/ml
Cloramfenicol	(Cm):	30 µg/ml

Aquestes concentracions d'antibiòtics eren reduïdes a la meitat en el cas que la resistència al mateix estigués codificada en el genoma de la cèl.lula (en forma d'unicòpia).

LB (Luria-Bertrani Broth)

BactoTryptona	1 %
Extracte de llevat	0.5 %
NaCl	0.5 %

El medi LB és un medi de cultiu ric o complet, que conté tots els nutrients necessaris per poder fer créixer la majoria de soques d'*E.coli*. En aquest cas, no cal addicionar cap requeriment nutricional a aquest medi, sinó únicament els antibiòtics necessaris. El seguiment del creixement bacterià es va dur a terme per mesura de la densitat òptica (D.O.) a una longitud d'ona de 600 nm.

Les plaques utilitzades per la selecció de plasmidis recombinants del vector de clonatge pBluescript estaven constituïdes per medi LB al qual s'afegien IPTG (1 mM), X-Gal (40 mg/ml dissolta en N-N'-dimetilformamida), ampicil.lina i tetraciclina. Les colònies recombinants eren les de color blanc.

Les plaques de selecció pels clons de fusió recombinants amb els plasmidis pRS550 o pRS551 estaven constituïdes per LB al qual s'addicionava X-Gal, kanamicina i ampicil.lina. Les colònies recombinants eren les de color blau.

2XTY

BactoTryptona	1.6 %
Extracte de llevat	1 %
NaCl	0.5 %

El medi 2XTY és encara més ric que el medi LB, tot i que no és d'us tant rutinari. En aquest treball aquest medi únicament va usar-se per obtenir ssDNA i per fer créixer la soca transformada a partir de la qual es va purificar la proteïna Hys₆-ArcA.

Medi mínim mineral (SM) pH 7.0

NaH ₂ PO ₄	34 mM
K ₂ HPO ₄	64 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 mM
FeSO ₄	0.001 mM
MgSO ₄	0.3 mM
CaCl ₂	0.01 mM

Ajustar a pH 7.0 amb HCl.

El seguiment dels cultius en medi mínim es duia a terme seguint la D.O. a 420 nm de longitud d'ona.

Al medi mínim s'afegien les diferents fonts de carboni de manera que aquestes estiguessin a una concentració final de 60 mM carboni (120 mM en el cas de cultius anaeròbics). L'hidrolitzat de caseïna s'utilitzava a una concentració del 0.5 % ó de l'1 % en funció de l'experiment que es duia a terme.

En cas que la soca bacteriana presentés auxotrofia per algun aminoàcid i/o vitamina, aquests eren afegits al medi mínim a les concentracions descrites per Davis *et al* (1980). En creixements anaeròbics les concentracions d'aminoàcids i vitamines eren el doble que en els cultius aeròbics.

1.2. Transducció generalitzada amb bacteriòfag P1

Es va utilitzar com a pauta per la transducció generalitzada amb bacteriòfag P1 el manual escrit per Miller (1972).

1.2.1. Preparació d'un lisat

L'obtenció d'un lisat es va dur a terme per creixement de la soca donadora junt amb el fag P1 salvatge, en presència de Ca^{2+} , catió que permet l'adsorció del fag a la paret bacteriana i posterior penetració del mateix dins la soca hoste. Després de la lisi bacteriana, la progènie de fags resultant va ser recollida per centrifugació i separada així de les restes cel·lulars. Aquest conjunt de fags constitueixen el lisat P1 de la soca donadora.

Procediment

1. Inocular la soca donadora en matrassos amb 10 ml de medi LB suplementat amb CaCl_2 5mM.
2. Addicionar diferents volums de solució de fag P1 de concentració aprox. 10^9 pfu/ml. Incubar a 37°C en contínua agitació.
3. Quan han transcorregut de 5 a 6 hores, escollir el cultiu que ha lisat completament. Addicionar-li unes gotes de cloroform i continuar mantenint-lo en agitació durant 30 min més a 37°C .
4. Centrifugar el cultiu a 12000 g durant 15 min a 4°C . Recollir el sobrenedant en un tub estèril, afegir-li unes gotes de cloroform i guardar-lo a 4°C . Aquest serà el lisat P1.

1.2.2. Titulació d'un lisat

El títol òptim d'un lisat és de com a mínim 10^9 pfu/ml. La titulació es va obtenir mitjançant el recompte de les calves de lisi obtingudes en una placa d'LB suplementada amb Ca^{2+} , en la qual es va sembrar una mescla de lisat i d'un cultiu de la soca receptora.

Procediment

1. Realitzar un preinòcul de la soca receptora en medi LB suplementat amb CaCl_2 5mM. Incubar en agitació o/n a 37 °C.
2. Fer diferents dilucions del lisat a titular (10^{-3} - 10^{-8}) en medi LB suplementat amb CaCl_2 5mM.
3. Preparar tubs estèrils que continguin 200 μl de la soca receptora i afegir a cada tub 100 μl de cada dilució del fag.
4. Incubar 30 min a 37°C.
5. Addicionar als tubs 3 ml d'agar tou suplementat amb CaCl_2 5mM i atemperat a 50°C. Extendre la mescla sobre plaques d'LB contenint CaCl_2 5 mM.
6. Deixar solidificar a temperatura ambient durant 15 min. Incubar 12 hores a 37°C.
7. Determinar la titulació del fag per recompte de les calves de lisi, tenint en compte el factor de dilució.

Agar tou

LB

 CaCl_2 5mM

Agar 0.75%

1.2.3. Transducció a genoma

La transducció es va realitzar posant en contacte la soca receptora amb un lisat P1 de títol adequat en presència del catió Ca^{2+} . Es deixen en contacte durant 30 min a 37°C i seguidament s'atura la infecció per addició de citrat, un agent quelant dels cations Ca^{2+} . D'aquesta manera s'afavoreix la lisogènia (incorporació del material genètic fàgic al genoma bacterià) i s'impedeix la lisi bacteriana.

Procediment

1. Fer un inòcul de la soca receptora en 2 ml d'LB suplementat amb CaCl_2 5mM. Incubar a 37°C fins que el cultiu arribi a la fase de creixement exponencial.
2. Preparar tubs estèrils en els quals s'afegeixen cèl.lules receptores i fag P1 en una proporció de volum 2:1.
3. Incubar sense agitació durant 30 min a 37°C.
4. Afegir citrat sòdic 20 mM.
5. Sembrar el resultat de la lisogènia en plaques de selecció suplementades amb citrat sòdic 20 mM.
6. Purificar en aquestes mateixes plaques de selecció els lisògens obtinguts.

1.3. Transferència de fusions a genoma mitjançant bacteriòfag λ RS45

Es va utilitzar com a pauta per la transducció mitjançant el bacteriòfag λ RS45 el manual escrit per Miller (1972).

Per a la construcció de fusions d'operó del promotor del gen *aldA* al gen marcador *lacZ* en el genoma de la soca salvatge MC4100, així com la dels mutants del mateix promotor, es va utilitzar el mètode descrit per Simons *et al* (1987). En primer lloc es va realitzar *in vitro* una construcció en la qual el promotor es trobava clonat en el vector de fusió pRS550. Els plasmidis recombinants es van utilitzar per transformar la soca MC4100. Des d'aquí la fusió fou recuperada mitjançant un fag de la família λ RS (λ RS45 en aquest cas), que posteriorment s'usà per infectar la soca RYC1000, on la fusió del promotor es trobava com a única còpia integrada en el genoma. Posteriorment, per tenir la fusió en la nostra soca salvatge, es va obtenir un lisat P1 de les soques RYC1000 que contenen els diferents promotors, i aquest es va utilitzar per infectar la soca MC4100.

1.3.1. Preparació d'un lisat

L'obtenció d'un lisat es va dur a terme per creixement de la soca donadora junt amb el fag λ RS45, en presència de Mg^{2+} , catió que permet l'adsorció del fag a la paret bacteriana i posterior penetració del mateix dins la soca hoste. Després de la lisi bacteriana, la progènie de fags resultant va ser recollida per centrifugació i separada així de les restes cel·lulars. Aquest conjunt de fags constitueixen el lisat λ RS de la soca donadora.

Procediment

1. Inocular la soca donadora (MC4100 transformada amb el plasmidi de fusió recombinant) en matrassos amb 10 ml de medi LB suplementat amb $MgSO_4$ 10mM.
2. Addicionar diferents volums de solució de fag λ RS de concentració aprox. 10^9 pfu/ml. Incubar a 37°C en contínua agitació.
3. Quan han transcorregut 5-6 hores, escollir el cultiu que ha lisat completament. Addicionar-li unes gotes de cloroform i continuar mantenint-lo en agitació durant 30 min més a 37°C.
4. Centrifugar el cultiu a 12000 g durant 15 min a 4°C. Recollir el sobrenedant en un tub estèril, afegir-li unes gotes de cloroform i guardar-lo a 4°C. Aquest serà el lisat λ RS .

1.3.2. Titulació d'un lisat

El títol òptim d'un lisat és de com a mínim 10^9 pfu/ml. La titulació es va obtenir mitjançant el recompte de les calves de lisi obtingudes en una placa de LB suplementada amb Mg^{2+} , en la qual es va sembrar una mescla de lisat i cultiu de la soca receptora.

Procediment

1. Realitzar un preinòcul de la soca receptora en medi mínim LB suplementat amb MgSO_4 10mM. Incubar en agitació o/n a 37 °C.
2. Fer diferents dilucions del lisat a titular (10^{-3} - 10^{-8}) en tampó λ dil.
3. Preparar tubs estèrils que continguin 100 μl de la soca receptora crescuda a saturació i afegir a cada tub 100 μl de cada dilució del fag.
4. Incubar 20 min a 37°C.
5. Addicionar als tubs 3 ml d'agar tou suplementat amb MgSO_4 10mM i atemperat a 50°C. Extendre la mescla sobre plaques d'LB contenint MgSO_4 10 mM.
6. Deixar solidificar a temperatura ambient durant 15 min. Incubar 12 hores a 37°C.
7. Determinar el títol del fag per recompte de les calves de lisi, tenint en compte el factor de dilució.

Tampó λ dil

MgSO_4	10 mM
Tris-HCl, pH 8.0	10 mM

Agar tou

LB	
MgSO_4	10 mM
Agar	0.75%

1.3.3. Transducció de la fusió des de plasmidi a genoma

La transducció es va realitzar posant en contacte la soca receptora amb un lisat λ RS de títol adequat en presència del catió Mg^{2+} . Es deixen en contacte durant 30 min a 37°C i seguidament s'atura la infecció per addició de citrat, un agent quelant dels cations Mg^{2+} . D'aquesta manera s'afavoreix la lisogènia (incorporació del material genètic fàgic al genoma bacterià) i s'impedeix la lisi bacteriana.

Procediment

1. Fer un inòcul de la soca receptora en 2 ml d'LB suplementat amb MgSO_4 10mM. Incubar a 37°C fins que el cultiu arribi a la fase de creixement exponencial.
2. Preparar tubs estèrils en els quals s'afegeixen cèl.lules receptores i fag λ RS en una proporció de volum 2:1.
3. Incubar sense agitació durant 30 min a 37°C.
4. Afegir citrat sòdic 20 mM.
5. Sembrar el resultat de la lisogènia en plaques de selecció suplementades amb citrat sòdic 20 mM.

6. Purificar en aquestes mateixes plaques de selecció els lisògens obtinguts (tres purificacions).
7. Un cop purificats, s'utilitzen aquests lisògens com a soques donadores per l'obtenció d'un lisat P1.
8. Amb aquest lisat P1 s'infecta la soca salvatge MC4100, que ara tindrà la fusió del promotor en qüestió integrada en forma d'unicòpia al seu genoma.

1.4. Obtenció de mutants

1.4.1. Mutagènesi química amb etilmetanosulfonat (EMS)

Les mutacions puntuals es van realitzar en medi líquid amb EMS. El procediment consistia en fer créixer 10 ml de les cèl.lules de la soca sobre la qual es volia realitzar la mutagènesi fins a la fase exponencial. Les cèl.lules van ser rentades dues vegades amb medi mínim mineral SM i 2 ml de les mateixes van posar-se en contacte amb 30 µl d'EMS. La mescla es va deixar en agitació durant 2 hores a 37°C. Posteriorment es va diluir la mostra 100 vegades i es va fer créixer en LB fins a arribar a la fase exponencial. Finalment es sembren dilucions de la mutagènesi en plaques d'LB (200-400 colònies/placa), i després es duu a terme "replica plating" emprant el medi sòlid adequat per poder aïllar els mutants desitjats.

1.4.2. Mutagènesi dirigida

En contra del que succeeix quan es duu a terme una mutagènesi amb EMS, en la qual les mutacions queden repartides a l'atzar al llarg de tot el genoma, hi ha casos en els quals interessa la mutagènesi específica d'algun gen.

1.4.2.1. Per inserció d'un casset CAT

Aquest mètode consisteix en la mutagènesi per inserció dirigida d'un fragment de DNA que codifica l'enzim cloramfenicol acetil transferasa, que confereix resistència a cloramfenicol. Aquest fragment de DNA, provinent del plasmidi pCAT19 (Fuqua, 1992) té un tamany de 1035 pb i va ser anomenat CAT. El fragment CAT està limitat per un polylinker que té varies dianes de restricció i que permet la clonació del mateix usant la diana que més convingui. El casset CAT s'inserta en el gen que es vol mutar, el qual ha d'estar clonat en un plasmidi, i després de ser linialitzat és introduït en la soca JC7623 per transformació i el gen mutat integrat en el genoma d'aquesta soca per recombinació homòloga (Winans *et al*, 1985).

Procediment

1. Purificar el fragment CAT a partir del plasmidi pCAT19 per digestió amb l'endonucleasa de restricció més convenient.

2. Digerir el plasmidi recombinant que conté el gen que volem mutar amb un enzim de restricció pel qual existeixi només una diana única en tot el plasmidi i concretament en la zona codificant del gen en qüestió.

3. Lligar el casset CAT amb el plasmidi recombinant linial, i transformar la lligació en la soca XLIBLue. Seleccionar els transformants en plaques d'LB-Ap-Cm.

4. Escollir un clon que hagi insertat el casset, obtenir-ne el seu DNA plasmídic i linialitzar-lo amb un enzim de restricció que talli pel vector de clonatge i deixi almenys 500 pb en un dels extrems del casset per tal de permetre la recombinació homòloga.

5. Transformar la soca JC7623 amb aquest DNA linial i seleccionar les colònies que siguin Cm^r i Ap^s, la qual cosa és indicativa de la inserció del casset en el genoma.

6. Comprovar la correcta recombinació i per tant la mutació per inserció del gen desitjat mitjançant transducció generalitzada amb bacteriòfag P1 i/o PCR.

7. Obtenir el lisat P1 d'aquestes soques i utilitzar-lo per infectar la soca salvatge MC4100 o qualsevol altra soca en el fons genètic de la qual es vulgui analitzar l'efecte de la mutació. Analitzar el fenotip de la soca derivada que té mutat el gen en qüestió així com dur a terme totes les anàlisis bioquímiques i genètiques pertinents.

1.4.2.1. Mitjançant el kit Sculpture™

Aquest mètode permet obtenir mutants puntuals d'un gen que prèviament es tingui clonat en un vector de clonatge M13 o fagèmid, és a dir, que permeti l'obtenció de DNA de cadena senzilla (ssDNA). Amb aquest mètode es poden obtenir mutants per inserció o deleció de varis parells de bases del DNA. El kit Sculpture™ (Amersham Life Sciences, Inc.) va utilitzar-se en aquest treball únicament per obtenir mutants del promotor del sistema *aldA* en les caixes d'unió de la proteïna ArcA-P. Per obtenir aquests mutants es va partir del clon pBTKSald1 que conté clonat tot el promotor del gen *aldA* en el vector de clonatge fagèmid pBluescript II (Stratagene).

El principi de la tècnica és el següent: el DNA que es vol mutar s'hibrida, com a ssDNA, amb un oligonucleòtid dissenyat per introduir la mutació desitjada. Aquest primer ja unit s'extén sobre el DNA motllo usant una DNA polimerasa (Klenow o T7 polimerasa nativa) en presència de T4 DNA lligasa per tal de formar un heterodúplex circular tancat. Aquest heterodúplex mutant és purificat del motllo de cadena senzilla no polimeritzat mitjançant la T5 exonucleasa. La T5 exonucleasa té activitat exonucleasa sobre ssDNA i dsDNA i també té activitat endonucleasa sobre ssDNA. Pot així tallar i digerir el motllo de ssDNA que ocasionaria un background de molècules no mutades i també al dsDNA que no s'ha lligat del tot. No obstant això, l'heterodúplex circular tancat no és substrat d'aquesta nucleasa i queda intacte després de l'acció de la mateixa.

En la reacció d'extensió amb les DNA polimerases s'incorporen dCTP α S en la cadena mutant. L'anàleg de base té un àtom de sofre substituïnt un oxigen en el fosfat alfa. Aquest fet permet la destrucció selectiva de la cadena no mutant, proporcionant una més alta eficiència de mutagènesi. L'endonucleasa de restricció *NciI* és usada per digerir l'heterodúplex de DNA; aquesta pot reconèixer la diana de restricció però no pot digerir els enllaços tiofosfat formats en la cadena mutant i per tant aquesta queda fora de l'abast de la

digestió de l'enzim. D'aquesta manera, el resultat de la digestió amb *NciI* és que la cadena de DNA no mutada queda foradada o "nicked" (qualsevol diana *NciI* dins l'insert queda protegida; per això és necessari dissenyar un oligonucleòtid sense dianes *NciI*). Posteriorment l'enzim exonucleasa III s'usa per digerir la cadena de DNA "nicked" no mutada. Aquesta digestió no ha de ser total, sinó que un fragment d'aproximadament 800 pb del vector serveix com a primer per la repolimerització.

L'homodúplex mutant es genera usant DNA polimerasa I i T4 DNA lligasa.

Procediment

De forma ràpida, el procediment consisteix en els següents passos:

1. Obtenció del ssDNA del plasmidi que conté clonat el DNA que es vol mutar, i comprovar la cadena de DNA que s'ha recuperat per seqüenciació del mateix (mètode de Sanger per DNA de cadena senzilla).
2. Disseny de l'oligonucleòtid que contingui la(es) mutació(ons) que es volen introduir en el DNA (i que no tingui cap diana *NciI* en la seva seqüència).
3. Hibridació de l'oligonucleòtid amb el ssDNA motllo.
4. Extensió i lligació de la cadena mutant.
5. Extracció del ssDNA no mutat.
6. "Nicking" la cadena no mutada.
7. Digestió de la cadena no mutada.
8. Repolimerització del DNA parcialment digerit.
9. Transformar la soca TG1, feta competent per electroporació, amb la mostra repolimeritzada. Seleccionar els transformants en plaques d'LB-Ap.
10. Obtenir el DNA plasmídic de les colònies transformades i analitzar mitjançant seqüenciació la correcta introducció de la(es) mutació(ns) desitjada(es).

En aquest punt es pot procedir a subclonar l'insert mutat, en cas que es tracti d'un promotor, a un vector de fusió de promotors (tipus pRS) i posteriorment insertar-lo en el genoma en forma d'unicòpia mitjançant un bacteriòfag P1 o un fag λ RS (Mètodes 1.2. i 1.3.).

1.5. Obtenció de cèl·lules competents

1.5.1. Mètodes químics

1.5.1.1. Mitjançant TFB

Aquest mètode consisteix a permeabilitzar la membrana cel·lular de la soca que es vol fer competent per la presència de diferents cations divalents així com per la presència de DMSO i DTT. El mètode

va estar descrit per Hanahan (1994) i breument consisteix a posar en contacte cèl.lules crecudes en medi ric LB fins a una D.O. de 0.5, mesurada a 550 nm, amb la solució de TFB (transformation buffer) i de DMSO i DTT.

Les cèl.lules resultants tenen una eficiència de transformació mitja dins els mètodes d'obtenció de cèl.lules competents. Les cèl.lules competents han de ser usades en el moment de la seva obtenció (o com a màxim 24 hores després, sempre que es mantinguin en gel a 4°C). Aquest mètode va usar-se rutinàriament sobretot en el cas de soques que no eren freqüentment fetes competents i per tant de les quals no es disposava d'un stock permanent congelat.

Tampó TFB

K-MES 10 mM, pH 6.2

KCl 100 mM

MnCl₂ 45 mM

CaCl₂ 10 mM

Esterilitzar per filtració i guardar a 4°C.

Solució de DMSO/DTT:

Acetat potàssic 10 mM, pH 7.5

DTT 1 M

DMSO 90 %

Esterilitzar per filtració i guardar aliquotat a -20°C.

1.5.1.2. Mitjançant CaCl₂

Aquest mètode químic d'obtenció de cèl.lules competents té una alta eficiència de transformació de DNA. Es basa en permeabilitzar la paret de la soca que es vol fer competent mitjançant ions Ca²⁺. El mètode és descrit per Ausubel *et al* (1987), i permet la conservació de les cèl.lules a -80°C per la seva posterior utilització. Per aquest mètode es tenien stocks de cèl.lules de la soca XLIBLue (la que més ha estat usada en aquest treball per seleccionar molècules híbrides de DNA).

1.5.2. Mètodes físics: electroporació

Aquest mètode consisteix en fer competents les cèl.lules per una descàrrega elèctrica curta i d'alt voltatge, en presència del DNA que es vol transformar. Les cèl.lules que es fan competents per aquest mètode han d'estar preparades i aliquotades en una solució al 10 % de glicerol i conservades a -80°C, segons és descrit per Zabarovsky i Winberg (1990). Aquest és el mètode que dona una més alta eficiència de transformació. L'electroporador emprat en aquest treball és un E.coli Pulser (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA), i la descàrrega elèctrica es podueix a 1.8 kV durant proximalment 3.4 msec.

2. ANÀLISI I PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES

2.1. Obtenció d'extractes cel.lulars i de la fracció de membrana

Els extractes cel.lulars van ser preparats segons Sridhara i Wu (1969). Les cèl.lules eren recollides per centrifugació al final de la fase exponencial de creixement i resuspeses en una solució de Tris-HCl pH 7.4, en un volum igual a quatre vegades el pes humit del pellet cel.lular. Per a obtenir l'extracte cel.lular, es sotmetia la suspensió cel.lular a ultrasons d'una amplitud d'ona de 12-14 microns, durant un temps de 30 seg per ml de suspensió. En aquest treball, el sonicador usat va ser un sonicador MSE de 150 W. Després de la descàrrega d'ultrasons, la mescla era sotmesa a centrifugació a 12000 g durant 30 min a 4°C. La fracció sobrenedant constitueix l'extracte cel.lular i correspon a l'espai periplàsmic i al citosol.

L'obtenció de la fracció de membranes es va fer seguint el protocol descrit per Sallal *et al* (1989). Els cultius eren recollits a la fase exponencial de creixement per centrifugació a 2500 x g durant 15 min. El pellet era ressuspès en 30 ml de tampó fosfat potàssic 10 mM, pH 8.0. Les cèl.lules eren trencades amb ultrasons, i el contingut resultant de la sonicació va ser diluït dos cops amb el mateix tampó fosfat contenint sacarosa 0.4 M. Totes les centrifugacions que es van realitzar a partir d'aquest punt eren atemperades a 4°C. L'extracte cel.lular es centrifugava a 12000 x g durant 15 min. El sobrenedant es tornava a centrifugar a 226000 x g durant 1 h a una ultracentrífuga Beckman. El precipitat, que contenia les membranes plasmàtiques, era ressuspès i rentat de nou per centrifugació a 226000 x g durant 60 min.

2.2. Determinació d'activitats enzimàtiques

Les determinacions de les activitats enzimàtiques van ser realitzades mitjançant mètodes espectrofotomètrics i colorimètrics. Les absorbàncies eren registrades en un espectrofotòmetre termostatitzat de doble feix Shimadzu UV 240.

2.2.1. Malat sintasa

Es poden realitzar dues mesures correponents a l'activitat malat sintasa: una mesura total que inclou l'activitat dels dos isoenzims A i G, i la mesura de l'activitat MSG després de la inactivació tèrmica de l'MSA (Vanderwinkel i DeVlieghere, 1968).

La valoració de l'activitat malat sintasa es va dur a terme pel mètode colorimètric descrit per Ornston i Ornston (1969). Aquest mètode permet quantificar el CoA alliberat a partir d'acetil-CoA en presència de glioxilat a 25°C. Un increment de 4.53 unitats d'absorbància mesurada a 412 nm corresponen a la formació

d'1 μmol de CoA per cubeta. Una unitat d'activitat malat sintasa és la quantitat d'enzim necessari per consumir 1 μmol de glioxilat durant 1 minut.

La inactivació de l'MSA es duia a terme posant l'extracte cel.lular a 61°C durant 20 min en presència de Tris-HCl 50 mM, d'oxalat càlcic 10 mM i de MgCl₂ 20mM. Tot seguit, s'afegia CaCl₂ 15 mM per fer precipitar l'oxalat, es centrifugava 5 minuts i es recuperava el sobrenedant, que contenia l'activitat MSG però no l'MSA.

L'activitat enzimàtica de la malat sintasa es determinava posant en contacte l'extracte cel.lular o la fracció sobrenedant de la inactivació tèrmica amb 0.5 ml d'una mescla de reacció consistent en:

Tris-HCl, pH 7.4	100mM
MgCl ₂	10 mM
Acetil-CoA	0.40 mM
Glioxilat sòdic	1.25 mM

La reacció s'aturava al cap de 3 min per l'addició d'1 ml d'urea 6 M. El color es desenvolupava durant 10 min a temperatura ambient per l'addició de 50 μl del reactiu d'Ellmann (5-5'-ditiobis-(2-nitrobenzoic)). Posteriorment es llegia l'absorbància a 412 nm i es calculaven les unitats d'activitat.

2.2.2. Glicolat oxidasa

La determinació de l'activitat glicolat oxidasa (GOX) es realitzava en la fracció de proteïna obtinguda per precipitació amb sulfat amònic al 30% de saturació ja que en els extractes cel.lulars existeix una elevada quantitat d'oxidases, deshidrogenases i oxidoreductases que emmascaren la determinació. Per això s'addicionaven, mitjançant agitació, 0.43 ml de sulfat amònic saturat per ml d'extracte cel.lular, i es mantenia en gel durant 30 min. El precipitat format es recollia per centrifugació a 13000 g durant 30 min a 4°C, i es ressuspenia amb una solució de fosfats 10 mM pH 7.0, fins a un volum final que fós la meitat del volum d'extracte cel.lular de partida.

La determinació de l'activitat GOX es realitzava segons el mètode descrit per Furuya i Hayashi (1963). Aquest mètode es basa en la reducció del DCPIP, paral.lela a l'oxidació del glicolat per acció de l'enzim GOX. La reducció del colorant es segueix espectrofotomètricament com un descens en l'absorbància a 600 nm.

La mescla de reacció contenia, en un volum final d'1 ml, els següents components:

Fosfat sòdic, pH 7.0	100 mM
Glicolat sòdic	10 mM
PMS	10 mM
2,6-DCPIP	0.012 %

La reacció es duia a terme en un espectrefotòmetre Shimadzu de doble feix, atemperat a 30°C. Un descens de 16.1 unitats, a pH 7.0 i 600 nm, equival a l'oxidació d'1 µmol de glicolat en la mescla de reacció.

2.2.3. Glioxilat reductasa

L'activitat enzimàtica glioxilat reductasa (GXR) va ser determinada en extractes crus per la mesura de l'oxidació del NADPH en presència de glioxilat. Les mescles de reacció, en un volum final d'1ml, contenien:

Fosfat potàssic, pH 7.0	100 mM
Glioxilat sòdic	1mM
NADPH	0.2 mM

La mesura de la variació en l'absorbància es duia a terme a 340 nm, i la reacció es realitzava en un volum final d'1 ml.

Es mesurava la variació d'absorbància a 340 nm. Sota aquestes condicions d'assaig, un canvi de 6.22 unitats d'absorbància a 340 nm correspon a la reducció d'1 µmol de glioxilat per cubeta.

2.2.4. Aldehid deshidrogenasa

L'activitat aldehid deshidrogenasa s'assaja espectrefotomètricament a 25°C. Es mesura l'increment d'absorbància a 340 nm per formació de NADH en la reacció d'oxidació catalitzada per l'enzim. A causa de la major disponibilitat, s'utilitza com a substrat de la reacció glicolaldehid. Les mescles de reacció, en un volum final d'1 ml contenien:

Glicina-NaOH, pH 9.5	100 mM
Glicolaldehid	1mM
NAD	2.5 mM

Una unitat d'activitat aldehid deshidrogenasa és la quantitat d'enzim necessària per produir 1 µmol de NADH per minut.

2.2.5. β-Galactosidasa

L'activitat β-galactosidasa es va determinar segons el mètode descrit per Miller (1972). El mètode es basa en l'increment d'absorbància a 420 nm produït per l'acció de la β-galactosidasa del cultiu que s'analitza sobre el substrat ONPG. De 10-100 µl de cultiu són portats a un volum final d'1 ml amb tampó Z, i les cèl.lules són permeabilitzades per l'addició de 15 µl de cloroform i 15 µl d'SDS 0.1 % amb vigorosa agitació. Després d'estar en repòs durant 15 min a temperatura ambient, s'addiciona al medi 200 µl d'ONPG 4 mg/ml, es deixa

desenvolupar la reacció a 30°C fins a un màxim de 30 min. La reacció s'atura per l'addició de 500 µl de carbonat sòdic 1 M. La mescla de reacció s'ha de centrifugar durant 5 min a 12000 g per tal de treure del medi els "debris" o restes cel.lulars provinents de la permeabilització del cultiu i que poden donar lloc a petites modificacions en el càlcul de les activitats. Els resultats obtinguts en aquest treball són conseqüència de dur a terme els assajos per duplicat o triplicat, i són la mitja dels mateixos sempre que aquests no difereixin més d'un 10 % de la mitjana dels valors.

L'activitat enzimàtica es calcula per la següent fórmula matemàtica:

$$U_{\text{Miller}} = \frac{1000 \times (OD_{420} - (1.75 \times OD_{550}))}{t \times V \times OD_{600}}$$

OD₄₂₀: absorbància a 420 nm; OD₅₅₀: absorbància a 550 nm; OD₆₀₀: absorbància a 600 nm;

t: temps en minuts; V: volum de cultiu assajat en ml.

Tampó Z

Na₂HPO₄ 60 mM

NAH₂PO₄ 40 mM

KCl 10 mM

MgSO₄ 1 mM

2-mercaptoetanol 50 mM

Ajustar a pH 7.0.

2.3. Quantificació de proteïnes: mètode de Lowry

La concentració de proteïna en els extractes cel.lular i en els diferents passos de purificació de diferents proteïnes va ser determinada segons el mètode descrit per Lowry *et al* (1951). Per elaborar la recta de calibració es van usar concentracions conegudes de BSA (albúmina sèrica bobina) entre 20 µg/ml i 200 µg/ml abarçant així el rang de concentracions òptim per aquest mètode. Les determinacions es van fer per duplicat i a partir de diferents dilucions de la mostra problema es va obtenir un valor de concentració que era la mitja dels valors obtinguts, sempre que aquests no es diferenciïn en més del 10 % del seu valor.

2.4. Purificació de la malat sintasa G d'*Escherichia coli*

L'MSG va ser purificada a partir dels extractes cel.lulars de la soca MC4100 crescuda en succinat 5mM en presència de glicolat 30 mM com a inductor, i també a partir de la soca JA151 transformada amb el plasmidi pIM4. En aquest darrer cas, els dos primers passos de la purificació eren suficients per obtenir la proteïna homogènia. El procés global de la purificació, dut a terme a 4°C, va consistir en una cromatografia en

DEAE-Sepharose, una inactivació tèrmica en presència d'oxalat i una cromatografia en columna d'hidroxiapatita (Molina *et al*, 1994).

L'extracte cru de la soca MC4100 o de la soca JA151 transformada amb el plasmidi pIM4 va ser dialitzat enfront d'un tampó (tampó A), consistent en Tris-HCl 10mM pH 8.0 i MgCl₂ 1 mM, i llavors aplicat a una columna de DEAE-Sepharose (Pharmacia) prèviament equilibrada amb tampó A. La columna va ser rentada amb el tampó A. En aquestes condicions l'MSG queda retinguda. L'elució de la proteïna es va dur a terme mitjançant un gradient linial (1-100 mM) de MgCl₂ en Tris-HCl 10 mM pH 8.0. Les fraccions més actives van ser recollides i diluïdes fins una concentració de 2.5 mg/ml amb tampó B, consistent en Tris-HCl 50 mM pH 8.0 i MgCl₂ 10 mM. Per tal d'impedir la inactivació de l'MSG durant la inactivació tèrmica es va addicionar oxalat a una concentració final de 10 mM. Després de la incubació de la mostra a 61°C durant 20 min, es va addicionar CaCl₂ 15 mM per precipitar l'oxalat, que es va eliminar per centrifugació a 20000 g durant 15 min. L'activitat MSG, recollida en el sobrenedant, es va dialitzar contra el tampó A i posteriorment es va aplicar a una columna d'hidroxiapatita (Bio-Gel HTP, BioRad) equilibrada amb el mateix tampó. La columna va ser rentada amb el tampó A contenint una concentració de 400 mM MgCl₂. L'activitat MSG va quedar retinguda, i va ser eluïda amb un gradient linial de MgCl₂ (400-1500 mM) amb tampó A. Es van recollir les fraccions actives d'MSG, es van dialitzar contra tampó A per eliminar l'excés de MgCl₂, i es van concentrar per ultrafiltració. Es va comprovar la puresa de les diferents fraccions recollides en una electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS.

Tampó A

Tris-HCl, pH 8.0	10 mM
MgCl ₂	1 mM

Tampó B

Tris-HCl, pH 8.0	50 mM
MgCl ₂	10 mM

2.5. Purificació de la proteïna Arca d'*Escherichia coli*

La purificació d'aquesta proteïna, i tots els experiments que amb ella es descriuran més endavant, van dur-se a terme al Laboratori del Professor E. C. C. Lin al Department of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School, Boston, USA, sota la supervisió del Professor Edmund C. C. Lin i del Dr. A. Simon Lynch.

El mètode de purificació seguit va ser el que havia estat descrit per Lynch i Lin (1996a). Aquest mètode es basa en el fet que la proteïna en qüestió s'expressa unida a una cua de sis histidines en el seu extrem N-terminal, fet que no modifica la seva funció *in vivo* ni la seva activitat *in vitro*, tal i com ha estat demostrat per altres proteïnes purificades de forma anàloga (Deretic *et al*, 1992). És per aquest motiu que la proteïna

purificada és pròpiament una Hys₆-ArcA. Per simplificar el text, d'ara en endavant en els experiments en els quals s'usi Hys₆-ArcA, es referirà simplement com a ArcA.

Per purificar ArcA es va usar el sistema anomenat "The QIAexpressionist" (Qiagen Inc., Chatsworth, CA) (1992), que es basa en la capacitat de la resina de Ni-NTA per unir-se a proteïnes que tinguin una cua d'afinitat consistent en simplement sis residus consecutius d'histidina. El níquel present a la resina és capaç de formar enllaços de coordinació molt estables amb el conjunt de les sis histidines, enllaços que únicament podran ser trencats per una disminució del pH del medi (els residus d'histidina es protonen i es dissocien de la resina) o bé per competició amb imidazol, que s'uneix a la resina i desplaça el complex histidínic. Aquest fet permet purificar proteïnes que estan presents en un percentatge inferior a l'1 % i que poden arribar a un 95 % d'homogeneïtat en només un pas de purificació. La proteïna recombinant pot ser purificada sota condicions naturants o denaturants. En aquest cas, la purificació va ser duta a terme sota condicions denaturants, i es va obtenir una mostra amb una puresa del 99 %.

Per purificar ArcA es va partir de la soca M15 transformada amb el plasmidi pREP4 i el plasmidi pQE30ArcA. El plasmidi pREP4 té clonat el gen regulador *lacI*, la qual cosa assegura un control estricte de l'expressió de la proteïna que es vol expressar i purificar, ja que el seu gen es troba sota el control del repressor codificat per *lacI*. D'aquesta manera, l'expressió dels vectors pQE és ràpidament induïda per l'addició d'IPTG en el medi de cultiu, que inactiva el repressor i deixa lliure el promotor perquè pugui iniciar-se la transcripció del gen clonat.

Procediment

És important tenir en compte que tots els tampons i les solucions usades en aquesta purificació van ser preparats amb H₂O_{mQ}, ja que les impureses iòniques de l'aigua poden afectar les propietats d'unió del níquel.

1. Inocular 50 ml de medi 2XTY que conté 100 µg/ml d'Ap i 25 µg/ml de Kn amb una colònia de la soca M15 transformada amb els plasmidis pREP4 i pQEArcA. Créixer a 37°C tota la nit amb agitació vigorosa.
2. Inocular 10 ml d'aquest cultiu no induït en 500 ml de medi 2XTY. Créixer a 37°C amb agitació vigorosa fins que el cultiu a gran escala assoleixi una OD₆₀₀ de 0.7-0.9. Retirar una aliquota d'aquest cultiu (1 ml).
3. Addicionar IPTG a una concentració final de 2mM, i fer créixer el cultiu durant exactament 5 hores.
4. Recollir el cultiu per centrifugació a 4000 x g durant 10 min (tarar prèviament els tubs), i guardar el pellet humit a -70°C.

En aquest punt és convenient assegurar-se que la inducció de l'expressió per addició d'IPTG ha estat correcta. Per aquest motiu es duu a terme una separació electroforètica de les mostres (la induïda per IPTG i la no induïda, de la qual haurem separat una aliquota abans de l'addició d'IPTG) i posteriorment revelat per Coomassie Blue per comprovar sobre el gel que la nostra proteïna s'ha induït.

5. Descongelar les cèl.lules i ressuspèndre-les en Buffer A (5 ml/g de pellet). Agitar-les durant 1 h a temperatura ambient.

6. Centrifugar el lisat a 10000 x g durant 15 min a 4°C. Recollir el sobrenedant.
7. Addicionar 8 ml de la resina Ni-NTA al 50 %, prèviament equilibrada amb Buffer A. Agitar durant 45 min a temperatura ambient, i tot seguit addicionar la mescla a una columna de 1.6 cm de diàmetre.
8. Rentar la columna amb 10 volums de Buffer A i 5 volums de Buffer B.
9. Rentar la columna amb el Buffer C fins que la $DO_{280} < 0.01$.
10. Eluir la proteïna recombinant amb 10-20 ml de Buffer D, seguit de 10-20 ml de Buffer E. Recollir fraccions de 3 ml de cada elució, i analitzar-les en una electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS.

Buffer A

Guanidina-HCl	6 M
NaH ₂ PO ₄	0.1 M
Tris	0.01 M
Ajustar a pH 8.0 amb NaOH	

Buffer B

Urea	8 M
NaH ₂ PO ₄	0.1 M
Tris	0.01 M
Ajustar a pH 8.0 amb NaOH	

Buffer C

Urea	8 M
NaH ₂ PO ₄	0.1 M
Tris	0.01 M
Ajustar a pH 6.3 amb HCl	

Buffer D

Urea	8 M
NaH ₂ PO ₄	0.1 M
Tris	0.01 M
Ajustar a pH 5.9 amb HCl	

Buffer E

Urea	8 M
NaH ₂ PO ₄	0.1 M
Tris	0.01 M
Ajustar a pH 4.5 amb HCl	

2.6. Expressió de gens en maxicèl.lules

Quan *Escherichia coli* és sotmesa a una radiació amb llum ultravioleta el seu DNA es veu seriosament malmès, tant per la formació de dímers de timina com per la degradació extensiva del DNA genòmic per acció de les endonucleases intracel.lulars. El bacteri posseeix diferents mecanismes que li permeten reparar els danys ocasionats sobre el seu material genètic. Però si la soca que reb la radiació ultravioleta és *recA*, la cèl.lula no pot reparar les mutacions que ha sofert. Les maxicèl.lules, cèl.lules *recA* irradiades, no poden dur a terme la síntesi proteica ja que tenen el seu DNA cromosòmic danyat. Però si aquestes cèl.lules estan transformades amb un plasmidi multicòpia, alguna d'aquestes molècules de DNA extracromosòmic podrà escapar de la irradiació, ja que són molècules més petites que el DNA genòmic i estan superenrotllades, i quedarà lliure de mutacions. D'aquesta manera, els plasmidis poden servir com a motllo de la transcripció i les proteïnes que ells codifiquen poden ser marcades de forma selectiva per addició d'aminoàcids radiactius.

La soca utilitzada en aquest treball per realitzar l'expressió dels gens del sistema *glc* en maxicèl.lules va ser la JA120, prèviament transformada amb diferents plasmidis recombinants derivats del vector pBluescript (i també amb el vector pBluescript per tenir un control de les proteïnes que per sí sol codifica).

Procediment

El mètode que es detalla a continuació va ser descrit per Stoker *et al* (1984).

1. Inocular la soca JA120 transformada amb els plasmidis que interessin en 10 ml d'hidrolitzat de caseïna a l'1 %.
2. Reinocular el cultiu diluïnt 20 vegades en el mateix medi, i deixar créixer a 37 °C fins arribar a una absorbància de 0.5 a 430 nm.
3. Transferir 10 ml del cultiu a una placa de Petri i irradiar amb una làmpada de llum ultravioleta a 254 nm a una dosi de 40 Jm⁻² amb suau agitació de manera que cap cèl.lula no escapi a la irradiació.
4. Transferir 5 ml del cultiu irradiat a un matràs d'Erlenmeyer estèril ben tapat amb paper d'alumini i amb paper negre per evitar fenòmens de fotorreactivació. Incubar 1 h a 37°C amb agitació.
5. Afegir D-cicloserina a una concentració final de 100 µg/ml i incubar 16-20 h a 37 °C en constant agitació.
6. Transferir 1 ml del cultiu a un tub eppendorf i recollir les cèl.lules per centrifugació a 13000 g durant 2 min. Desprejar el sobrenedant.
7. Ressupndre el pellet cel.lular en 0.5 ml de medi mineral mínim SM i tornar a centrifugar les cèl.lules.
8. Repetir el pas 7.
9. Ressuspendre el pellet en 0.5 ml de medi mineral SM que contingui 100 µg/ml de D-cicloserina.
10. Addicionar 3 µl d'una mescla d'aminoàcids preparada segons es descriu al final d'aquest apartat.

11. Incubar durant a 37°C durant 1 h.
12. Addicionar 25 µCi de ³⁵S-metionina i incubar a 37°C durant 1 hora amb agitació intermitent.
13. Afegir 10 µl d'una solució de metionina (8mg/ml) i incubar 5 min més.
14. Recollir les cèl.lules per centrifugació a 13000 g durant 2 min. Despreciar el sobrenedant.
15. Ressuspendre el sediment cel.lular en medi mineral SM i afegir 50 µl de tampó de mostra per electroforesis en gels de poliacrilamida (Mètodes 2.7). Escalfar les mostres a 70°C durant 3 min.
16. Aplicar 25 µl de la mostra resultant en un gel de poliacrilamida-SDS. Guardar la resta a -20°C.
17. Després de l'electroforesi, sotmetre el gel a una fluorografia (Mètodes 2.8.2.) per poder detectar les proteïnes marcades.

Composició de la mescla d'aminoàcids usada en el punt 10:

D,L-Alanina	409 µM	L-Leucina	160 µM
L-Arginina	175 µM	L-Lisina	346 µM
L-Asparragina	38 µM	L-Fenilalanina	76 µM
L-Aspàrtic	38 µM	L-Prolina	325 µM
L-Cisteïna	122 µM	L-Serina	532 µM
L-Glutàmic	113 µM	L-Treonina	252 µM
L-Glutamina	2 mM	L-Triptòfan	69 µM
Glicina	273 µM	L-Tirosina	73 µM
L-Histidina	73 µM	L-Valina	188 µM
L-Isoleucina	88 µM		

2.7. Separació electroforètica de proteïnes en gels de poliacrilamida (PAGE)

L'electroforesi en gels de poliacrilamida en presència d' SDS (Laemli, 1970) és una tècnica bàsica per separar proteïnes en funció del seu pes molecular. Les proteïnes carregades negativament per la presència en el medi del detergent aniónic SDS (dodecil sulfat sòdic) migren en un camp elèctric cap a l'ànode. Les mostres proteiques són també tractades amb agents reductors com el DTT (ditiotreitòl) o el β-mercaptoetanol, que eliminen les interaccions no covalents i el ponts disulfur formats per les proteïnes que es sotmeten a electroforesi.

En aquest treball els gels de poliacrilamida-SDS s'han usat a un percentatge entre 7.5-14 % (acrilamida:bisacrilamida, 37.5:1). La composició de les solucions usades en aquesta tècnica es mostra a continuació.

Tampó gel apilador (4X)

Tris-HCl, pH 8.8	0.5 M
SDS	0.4 %

Tampó gel separador (4X)

Tris-HCl, pH 6.8	1.5 M
SDS	0.4 %

Agents polimeritzants

Persulfat amònic 10 %	125 µl/10 ml gel
TEMED	7.5 µl/10 ml gel

Tampó de mostres per proteïnes (4X)

Tris-HCl, pH 6.8	0.5 M
SDS	20 %
Glicerol	40 %
Blau de bromofenol	0.008 %
β-mercaptoetanol	9.6 M

Tampó d'electroforesi

Tris-HCl, pH 8.8	30 mM
Glicina	0.192 M
SDS	0.1 %

2.8. Detecció de proteïnes en gel**2.8.1. Tinció amb Coomassie Brilliant Blue**

Per tal de poder visualitzar les bandes proteïques separades en les electroforesis en gels de poliacrilamida-SDS, aquests eren submergits en una solució de Coomassie Brilliant Blue, colorant que permet detectar específicament bandes proteïques de l'ordre de 2-5 µg de proteïna. Posteriorment es procedeix al rentat del gel en solució B, i per últim es fixen les bandes en la solució C.

Solució de Coomassie Brilliant Blue

Coomassie Brilliant Blue	0.1 %
Àcid acètic glacial	10 ml
Metanol	50 ml
H ₂ O destil.lada	50 ml

Solució B

Àcid acètic glacial	10 ml
Metanol	50 ml
H ₂ O destil.lada	50 ml

Solució C

Àcid acètic glacial	10 ml
Metanol	10 ml
H ₂ O destil.lada	180 ml

2.8.2. Fluorografia de proteïnes marcades amb ³⁵S-metionina

La fluorografia va ser la tècnica emprada per detectar els productes d'expressió dels gens clonats del sistema *glc*. Aquests productes d'expressió queden marcats radiactivament per la incorporació de ³⁵S-metionina. Posteriorment a l'electroforesi d'aquests productes, el gel resultant es tenyeix i destenyeix de la manera que s'ha explicat anteriorment (Mètodes 2.8.1.). A continuació es renta amb abundant H₂O destil.lada per eliminar la resta de dissolvents. Llavors el gel és submergit en una solució de salicilat sòdic 1M pH 5.7, i es manté en agitació durant 30 min. A continuació, el gel es col.loca sobre paper Whatmann 3M i s'asseca al buid a 80°C durant 1h 30 min, per poder així posar-lo en contacte amb una pel.lícula autoradiogràfica on quedaran impressionades les bandes proteiques que han incorporat radiactivitat.

2.9. Quantificació immunològica de la malat sintasa G d'*Escherichia coli***2.9.1. Obtenció d'anticossos Anti-malat sintasa G**

Per dur a terme la quantificació específica de l'MSG es va utilitzar un sèrum anti-MSG de conills albins (raça Nova Zelanda) que van ser immunitzats per injecció de la proteïna purificada homogènia.

Procediment

1. Diluïr 200 µg de la proteïna purificada en 1000 µl d'una solució isotònica (0.9 % NaCl) i juntar la solució resultant amb 1000 µl d'adjuvant de Freund complet. Emulsionar la mescla en un tub de vidre tipus Corex^R estèril amb una xeringa i una agulla de diàmetre petit. L'emulsió es produeix a causa de la pressió exercida sobre els components de la mostra a mesura que es desplacen a través de l'agulla.
2. Injectar via subcutània els 2 ml de mescla emulsionada a un conill.
3. Passades tres setmanes, administrar la primera dosi de record. Consisteix en la injecció de 200 µg de proteïna purificada en solució isotònica i emulsionada amb adjuvant incomplet de Freund. L'administració es duu a terme de la mateixa manera que en la primera injecció.
4. Després de 20 dies, administrar la segona dosi de record. És idèntica a la primera dosi de record.
5. Tres setmanes després de la segona dosi de record, s'extreuen 50 ml de sang del conill per punció cardíaca.
6. Incubar la sang extreta a 37°C durant 1 hora. Centrifugar-la a 3000 g durant 30 min i recollir el sobrenedant, que és el sèrum a partir del qual s'obté la fracció γ-globulina.
7. Afegir molt lentament el volum necessari d'una solució de sulfat amònic al 90 % sobre el sèrum fins a arribar a una concentració del 35 % en sulfat amònic. Aquest procés s'ha de dur a terme a una temperatura de 0-4°C en suau agitació.
8. Deixar agitant durant 60 min i posteriorment centrifugar a 10000 g durant 30 min a 4°C.
9. Ressuspendre el precipitat en la meitat del volum inicial d'una solució Tris-HCl 50 mM pH 7.5 i NaCl 0.15 mM.
10. Dialitzar la mostra per tal d'eliminar el sulfat amònic present.
11. Guardar la fracció γ-globulina a -20°C en alíquotes de 0.5 ml.

2.9.2. Quantificació per electroimmunodifusió segons Laurell

Aquesta tècnica (Laurell, 1966) permet detectar d'una forma molt senzilla la reacció antígen-anticòs que apareix com un arc de precipitació a mesura que transcorre l'electroforesi. L'alçada de l'arc és proporcional a la quantitat d'antigen, en aquest cas MSG present en l'extracte cru. Per poder obtenir aquesta linialitat, s'estableix quina és la concentració de la fracció γ-globulina que proporciona una recta patró amb una relació linial entre la concentració d'MSG purificada i l'alçada de l'arc d'immunoprecipitat. Posteriorment s'estableix quina és la concentració de proteïna total de l'extracte cru que permeti detectar diferents concentracions d'MSG en els diferents extractes crus analitzats.

L'electroimmunodifusió de les mostres es duu a terme sobre unes plaques de 5 ml de volum i 1 mm de gruix formades per una matriu d'agarosa a l'1 % (p/v) en un tampó de Tris-borat, pH 8.6. L'agarosa es dissol en aquest tampó per escalfament, i un cop atemperada a 55 °C, s'afegeix la concentració adequada de fracció γ-globulina, que en el nostre cas és de l'1.3 %. En un extrem de la placa, es perfora l'agarosa per formar els pous

de sembra. Allà s'hi aplicaran els µg de proteïna adequats prèviament determinats dels extractes crus, en un volum final de 10 µl (en cas de ser necessària una dilució dels extractes, dur-la a terme en solució salina).

L'electroforesi es realitza amb els pous situats al càtode, a 5mA per placa durant 3-4 hores. El tampó de l'electroforesi no cobreix la placa, sinó que està en contacte amb el gel a través d'unes esponges de cel.lulosa. Un cop finalitzada l'electroforesi, es retira el gel de la placa i es submergeix durant 24 hores en solució salina. Posteriorment es realitzen dos rentats amb H₂O destil.lada i es revel.len els arcs d'immunoprecipitat per tinció amb Coomassie Brilliant Blue.

Tampó del gel

Tris-HCl	225 Mm
Borat	125 mM
Ajustar a pH 8.6	

Tampó d'electroforesi

Tris-HCl	125 mM
Glicina	150mM
Ajustar a pH 8.6	

3. PREPARACIÓ I ANÀLISI DE DNA

Bàsicament tots els protocols seguits en la preparació i anàlisi de DNA estan descrits en els manuals d'Ausubel *et al* (1991) i Sambrook *et al* (1989). Els primers volums, actualitzats per les revisions periòdiques que publiquen, han estat els manuals de laboratori utilitzats en aquest treball.

3.1. Obtenció de DNA plasmídic

3.1.1. Mètode de lisi alcalina

Aquest mètode va ser descrit originàriament per Birnboim i Doly (1979). Posteriorment va ser modificat per Holmes i Quigley (1981). Es basa en la degradació de la paret bacteriana per l'acció del lisozim, seguida d'una lisi alcalina i una precipitació selectiva del DNA genòmic bacterià i de proteïnes desnaturalitzades per l'acció d'una solució concentrada d'acetat potàssic a pH àcid. El DNA plasmídic és purificat després mitjançant extraccions fenol-coroform i precipitat amb etanol. L'RNA és degradat per acció de l'RNasaA.

Els plasmidis obtinguts d'aquesta manera estan majoritàriament en format circular "supercoiled" i són susceptibles a ser sotmesos a manipulacions enzimàtiques sense necessitat de posteriors purificacions.

Solució de liozima

Tris-HCl, pH 8.0	25 mM
EDTA	10 mM
Glucosa	50 mM
Liozim	5 mg/ml

Preparació extemporània.

Solució de lisi

NaOH	0.2 M
SDS	1 %

Solució d'acetat potàssic

Acetat potàssic	3 M
Àcid acètic glacial, pH 4.8	2M

3.1.2. Mètode de lisi per ebullició

El mètode utilitzat en aquest treball és una modificació del mètode descrit per Holmes i Quigley (1981). Aquest és només aplicable a soques que no expressen l'endonucleasa A, ja que aquest enzim no s'inactiva completament en l'ebullició i per tant pot provocar la posterior degradació del DNA plasmídic obtingut d'aquesta manera. Per això aquest mètode només s'usa per soques *endA*, p.e. XLIBLue. El DNA obtingut d'aquesta manera pot ser directament seqüenciat pel mètode de Sanger, prèvia desnaturalització alcalina de les dues cadenes del DNA.

Breument el mètode consisteix a ressopendre les cèl.lules en la solució d'STET, afegir liozim i bullir la suspensió cel.lular durant 40 seg, per tal de desnaturalitzar la fracció proteica i el DNA genòmic. Al sobrenedant s'afegeixen fenol i isopropanol, que fan precipitar el DNA plasmídic.

Solució d'STET

NaCl	0.1 M
Tris-HCl, pH 8.0	10 mM
EDTA, pH 8.0	1 mM
Triton X-100	5 %

Solució de lisozim

Lisozim	10 mg/ml
Tris-HCl, pH 8.0	10 mM

3.2. Ressolució i purificació de fragments de DNA**3.2.1. Separació de fragments de DNA en gels d'agarosa**

L'electroforesi en gels d'agarosa permet la separació analítica i preparativa de fragments de DNA de tamanys compresos entre 0.1-25 kb. La visualització dels fragments s'aconsegueix per la fluorescència que desprenen quan estan en presència de bromur d'etidi i són irradiats amb llum UV. La utilització de bromur d'etidi permet visualitzar fins a 5 ng de DNA. Aquest colorant fluorescent també és capaç de detectar la presència d'RNA.

La resolució en la separació dels fragments de DNA en un gel d'agarosa depèn de la concentració d'aquesta. En aquest treball es van usar gels de percentatges d'agarosa entre 0.8-2.5 %, en funció dels tamanys de banda que es volia ressoldre (la concentració òptima d'agarosa en funció dels tamanys dels fragments a separar era consultada al manual de Sambrook *et al* (1989)).

El gel d'agarosa es prepara mitjançant la fusió de l'agarosa en el tampó d'electroforesi TAE 1X i la posterior addició de bromur d'etidi a una concentració final de 0.5 µg/ml, un cop atemperada la solució.

Les mostres de DNA se sembren amb el tampó de càrrega, que dona a les mostres densitat suficient per poder ser sembrades en els pous del gel, a més d'incorporar un colorant que permet seguir el front de l'electroforesi.

Tampó d'electroforesi

Tris-acetat, pH 8.3	40 mM
EDTA, pH 8.0	1 mM
Bromur d'etidi	0.5 µg/ml

Tampó de càrrega

Glicerol	5 %
Solució saturada de blau de bromofenol	5 %

3.2.2. Purificació de fragments de DNA a partir de gels d'agarosa

Per aquest procediment es va usar el kit comercial QIAEXTM II DNA Extraction (Qiagen Inc., Chatsworth, CA). El mètode consisteix en solubilitzar el fragment d'agarosa que s'ha escindit del gel i que

conté el fragment de DNA que es desitja purificar. La solució d'agarosa es posa en contacte amb una resina de silicagel, a la qual s'adsorbeix el DNA gràcies a l'alta concentració de sals i al pH del medi. Posteriorment, el DNA s'elueix de la resina per una disminució de la concentració salina i per un augment de pH. Per aquest mètode s'han arribat a purificar fragments de 250 pb.

3.2.3. Separació de fragments de DNA en gels de poliacrilamida

Els gels de poliacrilamida, en comparació amb els d'agarosa, tenen una major capacitat de resolució de fragments de DNA de tamanys similars. Per aquest motiu, quan es volia purificar el producte d'una PCR que s'utilitzaria com a sonda de DNA per dur a terme els experiments de "gel shift" i de "footprinting" (Mètodes 4.2.2. i 4.3), el fragment de DNA se separava mitjançant una electroforesi en un gel de poliacrilamida. D'aquesta manera, tots els fragments contaminants de la PCR, que es diferenciaven en molt pocs pb, podien ser eliminats. La diferenciació dels fragments amb tamanys tant semblants no hagués estat possible usant gels d'agarosa.

Per realitzar el gel s'usa el tampó TBE (1X) i una concentració d'acrilamida que depèn dels tamanys dels fragments que es volen purificar (veure Sambrook *et al* (1989)). El tampó de càrrega és el mateix que l'utilitzat en el cas dels gels d'agarosa.

TBE 5X

Tris-HCl, pH 8.0	0.45 M
Àcid bòric	0.45 M
EDTA, pH 8.0	10 mM

Agents polimeritzants

Persulfat amònic 10 %	300µl/40 ml de gel
TEMED	30 µl/40 ml de gel

3.2.4. Purificació de fragments de DNA a partir de gels de poliacrilamida

Després de dur a terme l'electroforesi de les mostres de DNA en gels de poliacrilamida, el gel es tenyeix en una solució de bromur d'etidi, per poder visualitzar les bandes. Llavors es col·loca el gel sobre un transil·luminador UV i es procedeix a l'escissió del tros de gel que conté la banda a purificar. Aquest procés ha de ser el màxim de ràpid per evitar tant com es pugui l'exposició del DNA a la llum UV, ja que aquesta pot provocar trencaments en les molècules del DNA. Es procedeix a dividir la banda escindida en petits fragments d'1-2 mm², de manera que s'augmenta la superfície d'elució del gel. Aquests fragments es posen en contacte amb 450 µl d'una solució d'acetat amònic 2.5 M, i es deixen agitant tota la nit a 37 °C. La mescla es centrifuga a 13000 g durant 15 min. El DNA és d'aquesta manera eluït del gel. La recuperació del mateix es duu a terme

mitjançant la precipitació del sobrenedant amb etanol, evitant en tot moment endur-se els petits fragments d'acrilamida del gel.

Aquest mètode proporciona un rendiment de recuperació del fragment d'aproximadament el 100 %.

3.3. Manipulació enzimàtica del DNA

3.3.1. Endonucleases de restricció

Les endonucleases de restricció són enzims purificats a partir de bacteris o fongs, que es caracteritzen per tenir com a substrat de la seva reacció una doble cadena de DNA. Els enzims són altament específics, i reconeixen seqüències de DNA des de 4 a 6 pb, actuant sobre les mateixes i provocant un trencament dels enllaços fosfodiester de l'esquelet del DNA, i per tant com a resultat donen un DNA trencat. La seva funció fisiològica és la d'actuar com a mecanisme de defensa davant la invasió per part de bacteriòfags.

L'eficàcia de les endonucleases de restricció depèn del pH del medi, de la temperatura, de la força iònica i de la concentració de Mg^{2+} , i aquestes són característiques típiques de cada enzim. L'ús dels enzims de restricció en aquest treball va dur-se a terme seguint les indicacions proporcionades per la casa comercial que els subministra, la qual ja proporciona amb l'enzim el tampó adient en cada cas concret.

L'anàlisi dels productes de la reacció enzimàtica es duu a terme mitjançant electroforesi en gel d'agarosa amb tampó TAE (1X).

3.3.2. Marcatge radioactiu de fragments de DNA

3.3.2.1. Marcatge homogeni de fragments de DNA: "random primed"

Aquesta tècnica, descrita per Feinberg i Vogelstein (1984), permet la síntesi de sondes de DNA marcades homogèniament amb una alta radioactivitat específica. En aquest mètode s'hibriden tots els possibles hexanucleòtids sintètics amb el fragment de DNA que es desitja marcar, prèviament denaturat. Les zones d'hibridació permeten que la Klenow polimerasa, en presència dels quatre desoxinucleòsids trifosfat, elongui la cadena. Un dels desoxinucleòsids trifosfat està marcat radioactivament, de manera que la cadena de nova síntesi queda marcada radioactivament.

La separació de la sonda i dels desoxinucleòsids trifosfat no incorporats es duu a terme mitjançant una cromatografia de gel filtració amb una columna de Sephadex G-50. Aquest va ser el mètode de marcatge de les sondes emprades en els experiments de Northern Blot (Mètodes 5.2). L'isòtop més usat en aquest cas va ser de l' α^{32} -dATP (3000 mCi/mmol).

3.3.2.2. Marcatge 5' terminal mitjançant polinucleòtid kinasa del bacteriòfag T4 (T4

PNK)

La T4 PNK catalitza la transferència del fosfat γ de l'ATP als extrems 5' del DNA i del l'RNA. Aquest enzim té una alta eficiència i va ser el mètode d'elecció pel marcatge d'oligonucleòtids i dels fragments de DNA que es van usar com a sondes en els experiments de "gel shift" i de "footprinting" (Mètodes 4.2. i 4.3.). La separació del fragment marcat i de l'ATP no incorporat es va dur a terme mitjançant una gel filtració en una columna de Sephadex G-50.

L'isòtop d'elecció en aquest cas va ser γ^{32} -ATP (3000mCi/mmol).

3.3.3. Modificació enzimàtica del DNA

3.3.3.1. Defosforilació de DNA: fosfatasa alcalina d'intestí de vedella (CIAP)

La fosfatasa alcalina d'intestí de vedella (CIAP) catalitza la reacció d'hidròlisi dels residus fosfats situats en posició 5' de DNA, RNA, i ribo i desoxiribinucleòsids trifosfat. La CIAP, que requereix Zn^{2+} per dur a terme la catàlisi, és la fosfatasa més usada ja que té una alta activitat específica i a més és fàcilment inactivada tèrmicament (a 70°C durant 15 min).

La fosfatasa va usar-se per defosforilar els extrems cohesius o roms dels vectors de clonatge per tal de reduir la incidència de plasmidis no recombinants en lligacions de DNA no dirigides.

3.3.3.2. Construcció de deleccions unidireccionals sistemàtiques: Exonucleasa III i

Nucleasa S1

L'Exonucleasa III és un enzim que catalitza la hidròlisi d'enllaços fosfodiester en dsDNA. S'aprofita l'activitat exonucleasa específica 5'-3', que elimina nucleòtids a partir d'un extrem 5'OH. Actua específicament sobre DNA de doble cadena amb extrems roms ó 5' protuberants, deixant intactes els extrems 3' protuberants. Aquesta darrera característica fa que l'enzim sigui idoni per dur a terme deleccions sistemàtiques unidireccionals mitjançant la digestió del polylinker del vector, on tenim clonat el fragment que volem deleccionar, amb un enzim de restricció que alliberi extrems 5' i un altre que els deixi 3'. D'aquesta manera només deleccionarem l'insert, i deixarem intactes les parts del plasmidi essencials per la seva funcionalitat. El posterior tractament amb Nucleasa S1, Klenow polimerasa i la lligació amb la T4 DNA lligasa permetran recircularitzar el plasmidi i recuperar-lo mitjançant transformació en la soca adequada.

Per dur a terme aquest mètode es va seguir el protocol "Erase-a-base^R System" (Promega), on s'especificuen tots els passos a seguir i la composició de les solucions.

3.3.3.3. Exonucleasa específica de ssDNA: Nucleasa S1

Aquest enzim actua degradant de manera altament específica DNA i RNA de cadena senzilla. En aquest treball es va usar per aconseguir la degradació de la cadena senzilla de DNA formada per acció de l'Exonucleasa III.

3.3.3.4. Nucleasa inespecífica: DNasa I

La DNasa I és un enzim que degrada dsDNA sense reconeixement de la seqüència de nucleòtids, i que genera 3'-OH oligonucleòtids.

En aquest treball va ser usada per dur a terme els experiments de "footprinting" (Mètodes 4.3).

3.3.3.5. DNA lligasa del bacteriòfag T4

La DNA lligasa catalitza la reacció de formació d'enllaços fosfodiester entre un fragment de dsDNA amb fosfat a l'extrem 5' i una altre fragment amb un hidroxil 3' lliure. Actua tant sobre enllaços protuberants com roms, però és més eficient sobre els extrem protuberants.

Va usar-se per la construcció de molècules híbrides i per la recircularització de fragments de DNA que havien sofert una digestió prèvia amb enzims de restricció.

3.3.4. Obtenció de DNA de cadena senzilla (ssDNA)

Per tal de poder obtenir ssDNA es necessita tenir clonat aquest DNA en un vector de clonatge del tipus M13 o fagèmid. Els inserts clonats en pBluescript poden recuperar-se com a ssDNA. Els vectors pBluescript contenen una zona intergènica de 454 pb del fag F1 que permet que aquests fagèmids siguin recuperats en una soca que tingui l'episoma F'. La recuperació del ssDNA és possible gràcies a l'ajuda d'un "helper phage" (fag ajudant).

Procediment

1. Créixer una soca F', transformada amb el plasmidi convenient, a 37°C tot el dia en 10 ml de medi 2xTY amb l'antibiòtic pertinent.
2. Al vespre reinocular el cultiu en 5 ml del mateix medi de manera que s'obtingui una D.O.₆₀₀ de partida de 0.1 i fer créixer a 37°C en agitació fins assolir una D.O. a 600 nm de 0.5 (aprox. 40 min).
3. Addicionar el "helper phage" a una multiplicitat d'infecció d'entre 10 i 20 i créixer tota la nit.
4. Incubar el cultiu de tota la nit en un bany d'aigua a 70°C durant 15 min.
5. Traspasar alíquotes d'1 ml de cultiu a 5 tubs eppendorf i centrifugar-los a 13000 g durant 5 min. Transferir els sobrenedants a tubs estèrils vigilants molt de no emportar-se'n cap cèl.lula.

6. Extreure el ssDNA del sobrenedant addicionant 50 µl de fenol saturat a cada tub i vortejant durant 20 seg. Deixar a temperatura ambient durant 15 min, tornar a vortejar 20 seg i centrifugar a 13000 g 3 min.

7. Transferir les fases superiors a tubs eppendorfs nets i addionar 100 µl de cloroform, vortejar 20 seg i centrifugar a 13000 g 2 min. Recollir les fases superiors i traspasar-les a tubs nets.

8. Precipitar el ssDNA per addició a cada tub de 10 µl d'acetat sòdic 3M pH 6.0 i 250 µl d'etanol 100%.

9. Ressuspèndre el pellet de cada tub en 50 µl de TE. Ajuntar tots els pellets ressuspesos a un únic tub, i centrifugar-los a 13000 g durant 5 min. Recollir el sobrenedant, deixant enrera qualsevol proteïna precipitada.

10. Mesurar la concentració de ssDNA amb un espectrofotòmetre a 260 nm (1 O.D. és equivalent a 40 µg/ml).

Observació: Per calcular la multiplicitat de "helper phage" i cèl.lules s'ha de tenir en compte que un cultiu amb una D.O.₆₀₀ de 0.5 té 4×10^8 cel/ml, i que per tant s'haurien d'afegir $4-8 \times 10^9$ pfu de "helper phage".

3.4. Construcció de molècules híbrides de DNA

Per la construcció de molècules híbrides de DNA s'incuba el DNA de partida (el vector de clonatge i el fragment que es desitja clonar) amb les endonucleases de restricció i els enzims modificadors adequats per obtenir extrems compatibles entre les dues molècules a lligar. El vector i l'insert es combinen en una proporció 1:2 i es tracten amb T4 DNA lligasa. Posteriorment, la lligació és introduïda en cèl.lules competents de la soca que més convingui en cada cas, els transformants es seleccionen en un medi addient i es procedeix a l'obtenció del DNA plasmídic. La comprovació que la molècula híbrida està ben construïda es duu a terme rutinàriament mitjançant digestions amb enzims de restricció o mitjançant PCR, i en algunes construccions també es comprova per seqüenciació.

3.4.1. Subclonatge de fragments de DNA

Aquesta tècnica es va usar per la seqüenciació, l'obtenció de sondes específiques, la construcció de fusions de promotor o de plasmidis per l'expressió de proteïnes. El protocol seguit varia en cada cas i es va adaptar per aconseguir el major nombre de molècules recombinants i evitar al màxim la recircularització de vectors que donen lloc a transformants no recombinants. En aquest treball s'ha usat com a vector de clonatge principalment el pBluescript, ja que permet la selecció per color de les molècules recombinants, permet la seqüenciació, l'obtenció de ssDNA i com és un vector d'alt nombre de còpies, es replica fàcilment dins la cèl.lula hoste.

3.4.2. Transformació de cèl.lules competents amb DNA plasmídic

3.4.2.1. Transformació de cèl.lules competents obtingudes per mètodes químics

Tant en el cas de les cèl.lules competents obtingudes pel mètode del TFB com pel del CaCl_2 , la transformació amb DNA plasmídic consistia a posar en contacte les cèl.lules i el DNA a 0-4°C (en un recipient amb gel) durant 30 min. Posteriorment la mescla era sotmesa a un xoc tèrmic a 37°C durant 5 min o bé a 42°C durant 3 min. Després d'incubar de nou a 0-4°C durant 2 min, s'addicionava LB líquid (800 μl /200 μl de cèl.) i s'incubaven a 37°C durant 1 hora. Passat aquest temps se sembraven en les plaques de selecció adients.

3.4.2.2. Transformació de cèl.lules competents obtingudes per mètodes físics

En aquest cas el procés de fer les cèl.lules competents i de transformar-les amb DNA plasmídic és simultani. Les cèl.lules preparades en glicerol al 10 % (Mètodes 1.5.2.) es posen en contacte amb el DNA. En aquest cas és molt important tenir el DNA lliure de sals, ja que aquestes disminueixen molt l'eficiència de la transformació. Per aquest motiu és aconsellable precipitar prèviament el DNA i ressuspènre'l en un petit volum d' H_2O mQ.

Un cop 100 μl de cèl.lules estan en contacte amb el DNA, la mescla es traspassa a una cubeta d'electroporació, que ha d'estar prèviament refredada a -20°C. Es produeix la descàrrega elèctrica, a la mescla s'afegeix 1 ml d'LB líquid, i el conjunt es posa en un tub eppendorf, el qual s'incuba en agitació a 37°C durant 1 hora. Passat aquest temps se sembren en les plaques de selecció adients.

3.4.3. Selecció de plasmidis recombinants

La selecció de plasmidis recombinants es va dur a terme segons el mètode de selecció específic per cada vector de clonatge. Així, els plasmidis recombinants en pBluescript es reconeixen pel color blanc de les colònies corresponents en plaques de selecció que contenen Ap, Tc, X-Gal i IPTG. Les colònies recombinants dels plasmidis pRS550/551 es reconeixen pel seu color blau en plaques d'Ap, Kn i X-Gal. En el cas dels plasmidis recombinants derivats del vector de clonatge pBR322, la selecció es feia de manera indirecta analitzant quins d'ells havien perdut la resistència a Tc (sempre que el clonatge de l'insert fraccionés el marc obert de lectura de la resistència a l'antibiòtic). En altres vectors de clonatge, els plasmidis recombinants únicament es poden distingir obtenint-los i analitzant la correcta clonació per digestió amb enzims de restricció o bé per PCR.

3.5. Seqüenciació de DNA. Mètode de Sanger

Els clons analitzats en aquest treball van estar seqüenciats pel mètode de Sanger (1977). Aquest mètode aprofita la capacitat de la T7 polimerasa de reconèixer com a substrats els 2',3'-desoxinucleòtids, impedit d'aquesta manera l'elongació de la cadena que es seqüencia.

El protocol que es va seguir va ser el de dues cases comercials: T7 Sequencing Kit (Pharmacia) i Sequenase™ Version 2.0 DNA Sequencing Kit (USB, Amersham Life Sciences). Aquest darrer únicament va usar-se en els experiments realitzats als USA, ja que la normativa de patents vigent en aquell país només permet la utilització d'aquest segon kit.

El producte seqüenciat és sotmès a una electroforesi en gel d'urea-poliacrilamida. La visualització es dona per autorradiografia.

Gel de seqüència

Tris-HCl, pH 8.0	0.089 M
Àcid bòric	0.089 M
EDTA, pH 8.0	0.002 M
Urea	50 %
Acrilamida	4.75 %
Biscrilamida	0.25 %

Agents polimeritzants

Persulfat amònic	0.1 %
TEMED	0.015 % (v/v)

Tampó d'electroforesi (TBE 1X)

Tris-HCl, pH 8.0	0.089 M
Àcid bòric	0.089 M
EDTA, pH 8.0	0.002 M

Tampó de càrrega

Blau de bromofenol	0.1%
Xylen cianol	0.1%
NaOH 0.1 M:formamida	1:2 v/v

3.5.1. Amb substrats marcats: ³⁵S-α-ATP

En aquest cas la cadena sintetitzada queda marcada radioactivament per la incorporació de dATP marcat amb ³⁵S. Aquest isòtop dona una alta resolució en els gels que s'usen en la seqüenciació.

3.5.2. Amb primers marcats: ^{32}P - γ ATP

Aquest tipus de marcatge només es va usar en els experiments de “footprinting” (Mètodes 4.3), ja que aquests requereixen que les zones de protecció siguin comparades amb les reaccions de seqüència obtingudes amb els mateixos primers que s’han usat en l’amplificació del fragment protegit. A més, l’exposició a una pel·lícula autorradiogràfica no seria adequada tenint en compte la diferent energia de les partícules emeses pels dos isòtops.

Pel marcatge de primers es va utilitzar el següent protocol:

Primer	10 pmol
T4 PNK	5 U
γ^{32} -ATP	30 μCi
T4 PNK Buffer 10X	1/10 volum (V_{final} 5 μl)

S’incuba la mescla a 37°C durant 15 min, s’escalfa a 95°C durant 5 min, es refreda en gel i es guarda a -20°C.

3.6. Tècnica de PCR (Polymerase Chain Reaction)

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) s’usa per amplificar de forma exponencial un segment de dsDNA existent entre dues regions de seqüència coneguda. S’usen dos oligonucleòtids com a primers o cebadors, que són complementaris cadascun d’ells a cadascuna de les dues cadenes del dsDNA. Els primers poden ser 100 % complementaris a la seqüència o també tenir afegides unes cues als seus extrems 5’ que faciliten el posterior subclonatge en diferents vectors de clonatge de forma dirigida. Les reaccions de PCR són molt susceptibles al tipus de DNA motllo usat, a la concentració dels oligonucleòtids, a la concentració de Mg^{2+} , als dNTP usats, etc. Per aquest motiu, cadascuna de les reaccions que es van dur a terme va ser posada a punt, sense existir un protocol general que fós vàlid per totes elles.

3.6.1. Obtenció de fragments de DNA pel seu posterior subclonatge

La tècnica de la PCR aplicada al clonatge de DNA és una eina molt eficaç, sobretot en els casos de clonatge de fragments de pocs pb en vectors de clonatge de tamany molecular elevat. Aquesta tècnica permet obtenir grans quantitats de DNA, independentment del tamany que aquest tingui, i solucionar el problema del poc rendiment en l’obtenció de DNA de baix pes molecular a partir de digestions de fragments més grans.

En aquest cas, per tal d’evitar al màxim la introducció de mutacions en el DNA que s’amplifica per PCR, es va usar com a DNA polimerasa l’enzim anomenat VentTM DNA Polymerase (New England Biolabs), que és una polimerasa termoestable que es caracteritza per tenir una taxa de mutacions 100 vegades inferior que la Taq polimerasa. Amb aquesta mateixa finalitat, es disminuïa a 20 el nombre de cicles de PCR.

Els oligonucleòtids dissenyats pel posterior subclonatge dels fragments obtinguts es van construir de manera que en els seus extrems 5' ambdós tinguessin una diana *Bam*HI i una diana *Eco*RI respectivament. Això permetia que la digestió amb els enzims de restricció *Eco*RI i *Bam*HI del producte de la PCR dongués un DNA amb extrems protuberants aptes per a ser clonats de forma dirigida en qualsevol vector de clonatge que tingués dianes *Eco*RI i *Bam*HI.

Per comprovar que no s'havien introduït mutacions en els clons aïllats i també per verificar la direcció de l'insert respecte el vector, es van seqüenciar els clons obtinguts d'aquesta manera.

3.6.2. Selecció de clons recombinants

La tècnica de la PCR permet seleccionar els clons recombinants, provinents d'una lligació entre un fragment de DNA i un vector de clonatge sense haver de fer digestions amb enzims de restricció. El requisit per a poder analitzar-los és disposar de dos primers del fragment clonat o bé de dos primers pertanyents al polylinker del vector. Quan es disposa de la primera parella de primers, és necessari aïllar el DNA plasmídic del DNA genòmic per a poder usar-lo com a motllo de la PCR, ja que les seqüències a les quals s'hibriden els oligonucleòtids també estan presents en el genoma de la cèl.lula i donarien falsos positius.

En el cas que es disposi d'una parella d'oligonucleòtids complementaris al vector de clonatge, la reacció de PCR pot fer-se directament sobre les cèl.lules que contenen els plasmidi que volem analitzar, sense haver d'obtenir prèviament el DNA extracromosòmic.

L'enzim usat per aquests propòsits va ser la Taq Polimerasa.

3.6.3. Obtenció de fragments de DNA usats com a sondes

Com a DNA motllo d'aquesta reacció es partia d'un clon, el qual ja s'havia comprovat per seqüència que no contenia cap mutació. Els primers eren 100% homòlegs als extrems del fragment que es volia amplificar. En certes ocasions s'addicionava a l'extrem 5' dels primers la seqüència d'una diana de restricció. Això permetia que en els experiments de "footprinting" només un extrem de la sonda prèviament marcada continués radiactiu.

3.6.4. Obtenció de mutants. "Loose PCR"

Per tal d'obtenir mutants a l'atzar d'una seqüència de DNA determinada es pot recórrer a la tècnica de la PCR. Aquesta tècnica es basa en la introducció en la mescla de reacció de la PCR de l'ió Mn^{2+} . El Mg^{2+} és el cofactor necessari perquè la Taq polimerasa funcioni correctament. Quan aquesta es posa en presència d'un altre ió, que competeix amb el Mg^{2+} pel centre actiu de l'enzim, comença a fer errors en la introducció dels dNTPs i per tant crea unes cadenes de DNA amb mutacions. Aquest fenomen s'aprofita per crear un "pool" de fragments mutats, els quals seran subclonats posteriorment en un vector de clonatge.

La selecció dels clons mutats es fa per anàlisi fenotípica d'una soca mutada la qual és transformada amb el DNA plasmídic de diferents clons seleccionats (aquests clons no són analitzats per seqüenciació sinó que només es comprova que siguin recombinants). En aquest treball aquesta tècnica va ser usada per obtenir mutants a l'atzar de la zona promotora del gen *aldA*.

4. CARACTERITZACIÓ DE PROMOTORS

4.1. Tècnica de fusió de promotors al gen marcador *lacZ*

La tècnica de la fusió de promotors al gen *lacZ* es va usar per estudiar la regulació de la transcripció de diferents gens. Aquesta tècnica permet seguir l'expressió dels gens estudiats a través de l'expressió del gen *lacZ*, que codifica l'enzim β -galactosidasa, quantificable per un assaig simple i sensible. Es van obtenir les fusions dels promotors en forma de multicòpia en els vectors de la família pRS (Simons *et al*, 1987) i posteriorment es van passar al genoma de diferents soques Δlac en forma d'una única còpia.

4.1.1. Obtenció de fusions en vector multicòpia

Els vectors usats per a realitzar les fusions de promotor pertanyen a la família pRS. En aquest treball van usar-se els vectors pRS550 i pRS551, que són idèntics i únicament es distingeixen per la orientació del seu petit polylinker. El polylinker d'aquests vectors està compost per dues dianes de restricció: *Bam*HI i *Eco*RI. En aquest treball van usar-se ambdues dianes *Eco*RI i *Bam*HI per tal de dur a terme la clonació dirigida dels diferents fragments promotors. El polylinker està situat en posició 3' de senyals d'acabament de la transcripció, la qual cosa permet disminuir molt el soroll de fons de l'expressió del gen *lacZ*.

Els vectors de clonatge pRS550 i pRS551 tenen un tamany de 12.5 kb i contenen els gens *bla* i *kan* que confereixen respectivament la resistència a Ap i a Kn. Quan els plasmidis recombinants derivats d'aquests vectors són introduïts a genoma, la resistència a Kn es manté mentre que es perd la capacitat de créixer en presència d'Ap.

La clonació i correcte orientació dels diferents fragments promotors analitzats va verificar-se per seqüenciació, usant el primer M13 o Universal, complementari a la zona 5' del gen *lacZ*.

4.1.2. Transferència de fusions de plasmidi a genoma

La transferència de fusions de plasmidi multicòpia a genoma es van dur a terme de dues maneres diferents.

En el cas de l'estudi dels promotors del sistema *glc*, la transferència a genoma es va dur a terme mitjançant la soca TE2680, descrita per Elliot (1992). En aquest cas, el plasmidi de fusió es va linialitzar per digestió (l'enzim ha de tallar el vector però no la zona de clonació; en el nostre cas es va usar sempre l'enzim *XhoI*) i va ser usat posteriorment per transformar la soca TE2680. La soca TE2680 permet la incorporació de DNA en el genoma i en concret permet la recombinació homòloga dels plasmidis pRS en la regió cromosòmica que codifica pels gens de la biosíntesi del triptòfan. En aquesta regió la soca té localitzats el gen que codifica la resistència a Cm. Després de la recombinació homòloga, la resistència a Cm de la soca i la resistència a Ap del plasmidi es perden. Per tant es poden seleccionar les soques recombinants per l'anàlisi fenotípica de les resistències als diferents antibiòtics que es perden i les que es mantenen.

Per tal de transferir aquesta fusió de promotor al genoma de la soca tipus salvatge o de soques mutants relacionades amb el sistema *glc*, es va obtenir un lisat P1 d'aquesta soca, es va titular i es va transduir al fons genètic desitjat, tal i com s'ha descrit anteriorment (Mètodes 1.2.1., 1.2.2. i 1.2.3.). El fons genètic de la soca receptora ha de ser Δlac , de manera que l'activitat β -galactosidasa assajada només sigui conseqüència de l'expressió dirigida pel promotor que s'estudia.

En l'estudi del promotor del gen *aldA* la transferència a genoma es va fer mitjançant el fag λ RS45, tal i com s'ha descrit anteriorment (Mètodes 1.3.1., 1.3.2. i 1.3.3.).

4.2. Assajos de retardació en gel ("gel shifts")

Els assajos de retardació en gel o "gel shifts" permeten analitzar les unions i interaccions entre DNA i proteïnes. Aquestes interaccions tenen una importància fonamental en el control del comportament i del creixement cel.lular.

Aquesta tècnica es basa en el fet que un fragment de DNA veu retardada la seva mobilitat electroforètica quan interacciona amb una proteïna que li és afi. Quan es treballa amb extractes cel.lulars com a font proteica, la retardació observada en un gel pot ser causada no només per una proteïna sinó per un complex multiproteic, la composició del qual és difícil d'analitzar sinó es disposa de mutants en les proteïnes implicades en la regulació del promotor que s'estudia en concret. Per aquest motiu, és un gran avantatge poder disposar de proteïna purificada i de mutants per dur a terme amb ella els experiments de retardació en gel.

4.2.1. Preparació de la fracció proteica

4.2.1.1. Obtenció d'extractes crus de proteïna total

Es parteix de cultius crescuts a 37°C fins al final de la fase exponencial en diferents fonts de carboni. El cultiu es recull per centrifugació i es ressuspèn en 500 μ l de tampó de lisi. La disrupció de les cèl.lules s'obté per sonicació i l'extracte cru derivat es guarda a -80°C a una concentració final de glicerol del

30%. La concentració proteica dels extractes crus es va determinar pel mètode de Lowry (Mètodes 2.3.). La caducitat d'aquests extractes crus oscil·la entre 1-2 mesos.

Tampó de lisi

Fosfat potàssic, pH 7.4	0.1 M
KCl	50 mM
EDTA, pH 8.0	1 mM
Glicerol	10 %
DTT	1 mM
PMSF	160 µg/ml

4.2.1.2. Obtenció de proteïna purificada Hys₆-ArcA

La purificació de la proteïna Hys₆-ArcA va dur-se a terme segons es descriu anteriorment (Mètodes 2.5.). Per dur a terme els assajos de retardació en gel la proteïna era prèviament tractada. Està demostrat que la capacitat d'unió al DNA de diferents proteïnes reguladores, entre elles ArcA, es veu dràsticament incrementada si la proteïna està fosforilada (Drapal i Sawers, 1995; Lynch i Lin, 1996a). Per aquest motiu la proteïna era sotmesa a fosforilació amb carbamoïl fosfat, a 30°C durant 1 hora. La proteïna no fosforilada usada en aquest treball també era sotmesa a la mateixa reacció però en absència de carbamoïl fosfat.

La fosforilació, que és extemporània, es duia a terme de la següent manera:

Proteïna fosforilada

Hys ₆ -ArcA 0.5 mg/ml	20 µl
5XPBuffer	20 µl
Carbamoïl fosfat 0.5 M	10 µl
H ₂ Omq	50 µl

Proteïna no fosforilada

Hys ₆ -ArcA 0.5 mg/ml	20 µl
5XPBuffer	20 µl
H ₂ Omq	60 µl

5XPBuffer

Tris-HCl pH 7.0	100 mM
MgCl ₂	10 mM
KCl	125 mM

4.2.2. Preparació del fragment marcat utilitzat com a sonda

El fragment utilitzat per dur a terme els assajos de retardació en gel s'obtenia per una reacció de PCR, tal i com es descriu anteriorment (Mètodes 3.6.3.). La purificació del mateix es duia a terme mitjançant gel de poliacrilamida que després de l'electroforesi era tenyit amb bromur d'etidi. El DNA era eluït per immersió en una solució d'acetat amònic 2.5 M a 37°C o/n (Mètodes 3.2.3. i 3.2.4.). Un cop purificat, el fragment era marcat radioactivament amb la T4 PNK (Mètodes 3.3.2.2.).

El marcatge es realitzava de la següent manera:

Mescla de marcatge

Sonda de DNA	1 µg
T4 PNK	20 U
γ^{32} -ATP 10 mCi/ml	20 µCi
T4 PNK 10X Buffer	qsp 1X
H ₂ Omq	qsp 40 µl

La mescla s'incubava a 37°C durant 30 min. Llavors s'addicionaven 20 U més de T4 PNK i es continuava la incubació durant 30 min més. La separació del DNA marcat de l'ATP lliure es realitzava per extraccions fenol-cloroform o per gel filtració en una columna de Sephadex G-25. Assumint que no existeix pèrdua de DNA en la purificació, la concentració final del mateix és de 10 ng/µl. La sonda així preparada es guardava a -20°C.

4.2.3. Preparació del gel de poliacrilamida

4.2.3.1. Condicions de binding amb extractes crus totals

El gel utilitzat per dur a terme l'electroforesi de les mescles de reacció quan la fracció proteica provenia d'extractes crus era de baixa força iònica. Es realitzava amb el tampó TBE 0.5X, per evitar la distorsió de les unions proteïna-DNA a causa de les sals presents en el medi. En aquest cas la composició del gel contenia glicerol a la mateixa concentració que les mostres, per evitar la formació de llargues cues en els complexos retardats.

Gel de poliacrilamida 5 % (50 ml totals)

Acrilamida 30 %	8.33 ml
TBE5X	5 ml
Glicerol	5 ml
H ₂ O destil.lada	qsp 50 ml

Agents polimeritzants

Persulfat amònic 10 %	350 µl/50 ml de gel
TEMED	35 µl/50 ml de gel

4.2.3.2. Condicions de binding amb Hys₆-ArcA purificada

En aquest cas el gel utilitzat tenia una concentració superior de TBE. Es realitzava amb TBE 1X. La composició del gel era la següent:

Gel de poliacrilamida 5 % (50 ml totals)

Acrilamida 30 %	8.33 ml
TBE5X	10 ml
H ₂ Omq	qsp 50 ml

Agents polimeritzants

Persulfat amònic 10 %	350 µl/50 ml de gel
TEMED	35 µl/50 ml de gel

4.2.4. Reacció d'unió de la proteïna la DNA marcat**4.2.4.1. Condicions de binding amb extractes crus totals**

La reacció d'unió dels extractes crus i el DNA marcat es va dur a terme tal i com havia estat descrit per Nunoshiba *et al* (1992). La composició de les mescles contenia:

Reaccions de binding (20 µl / reacció)

Tris-HCl, pH 7.5	10mM
KCl	75 mM
DTT	2 mM
Glicerol	10 %
Poly(dI.dC)	0.1 µg /reacció
Extractes proteïcs	diferents quantitats
DNA	20 ng /reacció

Per tal de facilitar la manipulació de les mostres, es tenia preparat un Tampó de binding 5X, el qual contenia tots els elements de les mescles excepte el DNA i els extractes proteïcs.

5X Tampó de binding

Tris-HCl, pH 7.5	50 mM
KCl	375 mM
DTT	10 mM
Glicerol	50 %
Poly(dI.dC)	25 µg /ml

Les mescles de reacció eren incubades a 25°C durant 15 min. Després de la incubació les mostres es guardaven en gel fins el moment de la seva electroforesi.

4.2.4.2. Condicions de binding amb Hys₆-ArcA purificada

La reacció d'unió de Hys₆-ArcA amb el fragment de DNA marcat es duia a terme en les següents condicions:

Mescla de reacció

DNA marcat	20 ng
Hys ₆ -ArcA	variable
GSB 5X	6 µl
1X PBuffer	variable
H ₂ OmQ	qsp 30 µl
DNA competidor	excés

Gel Shift Buffer 5X (GSB 5X)

Tris-HCl, pH 7.4	500 mM
KCl	500 mM
MgCl ₂	50 mM
Glicerol	50 %
DTT	10 %

Normalment s'assajaven diferents quantitats de proteïna no fosforilada i fosforilada. Perquè totes les mostres tinguessin la mateixa quantitat de sals, el que es feia era afegir tampó de fosforilació (PBuffer 1X) de manera que la suma de volums de proteïna i de tampó fós la mateixa per totes les mostres assajades. En alguns casos s'afegia DNA competidor en un excés 500 molar respecte a la quantitat de sonda usada.

Les mescles s'incubaven a 25°C durant 30 min, i es guardaven en gel fins el moment de la seva electroforesi.

4.2.5. Electroforesi de les mescles de reacció

Tant en el cas dels assajos d'unió a extractes crus com en els cas dels d'unió a ArcA, les electroforesis es desenvolupaven a 4°C (cambra freda), en gels prèviament correguts durant 1 hora. El tampó dels gels era preparat amb antelació al desenvolupament de l'electroforesi de manera que estigués també atemperat a 4°C. És important recordar que les cubetes d'electroforesi no han de contenir traces de cap detergent o agent reductor (SDS, DTT, β -mercaptoetanol), ja que la seva presència impedeix la retardació de les bandes per destrucció de les unions que mantenen unit el DNA i les proteïnes.

4.2.5.1. Per mescles de reacció d'extractes crus

Un cop s'havia dut a terme la incubació del DNA marcat i dels extractes crus, s'addicionava als 20 μ l de reacció 4 μ l de tampó de càrrega 6X. La barreja era sembrada en el gel ja precorregut durant 1 hora a 20 mA d'intensitat.

Les electroforesis es duïen a terme en un gel de poliacrilamida al 5% en tampó TBE 0.5X. Al llarg de l'electroforesi la intensitat va disminuint, i s'ha d'anar corregint (mai arribant a superar els 20 mA). L'electroforesi s'acabava quan el primer colorant començava a sortir del gel.

Tampó de càrrega 6X

Blau de bromofenol	0.1 %
Xilen cianol	0.1 %
Glicerol	50 %

Un cop realitzada l'electroforesi, els gels eren assecats al buid a 80°C durant 2 hores i exposats a una pel·lícula autorradiogràfica.

4.2.5.2. Per mescles de reacció de Hys₆-ArcA

Les mostres eren sotmeses a electroforesi en gels de poliacrilamida al 5% en tampó TBE 1X. El gel era precorregut durant com a mínim 30 min, a 150 V i a 4°C. A les mostres de 30 μ l s'addicionava 6 μ l de tampó de càrrega 6X. L'electroforesi es desenvolupava a 4°C i a 150 V de diferència de potencial fins que el primer colorant era a punt de sortir del gel. Els gels eren assecats al buid a 80°C durant 2 hores. La visualització de l'experiment es realitza per autorradiografia.

4.3. Assaig de protecció a la DNasa I (“footprinting”)

El footprinting o experiment de protecció a la DNasa I té com a finalitat localitzar la seqüència de DNA a la qual s'uneix una proteïna determinada. Es basa en l'ús d'una nucleasa inespecífica, la DNasa I, enzim que degrada el dsDNA sense tallar per cap seqüència en concret, sempre que el DNA no estigui protegit per cap proteïna. El fragment de DNA està marcat radioactivament només per un dels seus extrems. La protecció que una proteïna provoca sobre el DNA és visible quan el producte de la digestió amb DNasaI és analitzat en un gel de poliacrilamida-urea. Les zones de protecció tenen l'aspecte de “finestres” que han quedat fora de l'abast de l'acció de l'enzim.

L'experiment de footprinting es realitza sobre les dues cadenes del DNA, ja que la zona de protecció a la DNasa I no sempre és igual en ambdues. Com a control de l'experiment es duu a terme una digestió sobre el DNA nuu.

En aquets treball els experiments de footprinting únicament es van realitzar amb proteïna purificada ArcA, i van ser tots ells realitzats al laboratori del Professor E. C. C. Lin, Harvard Medical School, Boston, USA.

4.3.1. Marcatge del fragment de DNA

El fragment de DNA es marca amb la T4 PNK. Després de la reacció de fosforilació amb γ^{32} -ATP, la mostra es divideix per ser sotmesa a dues digestions amb enzims de restricció diferents. En cadascuna de les dues reaccions s'elimina un dels extrems marcats, de manera que s'obté el fragment de DNA marcat per només un dels seus dos extrems.

En la reacció s'utilitzen les següents concentracions de reactius:

Marcatge del fragment de DNA (40 μ l)

Fragment DNA	600 ng
γ^{32} -ATP	20 μ Ci
T4 PNK	10 U
T4 PNK 10X Buffer	4 μ l
H ₂ Omq	qsp 40 μ l

La mescla s'incuba a 37°C durant 30 min. Després s'hi afegeixen 10 U més de T4 PNK i s'incuba 30 min més. Es transfereixen 20.5 μ l de reacció a dos tubs. La mescla de reacció és sotmesa a digestions amb els enzims de restricció *Bam*HI i *Eco*RI. Per dur a terme la reacció s'afegeixen als 20.5 μ l:

Digestió de la mostra (50 µl)

DNA marcat	20.5 µl
<i>Bam</i> HI o <i>Eco</i> RI	40 U
Tampó de digestió 10X	5 µl
H ₂ Omq	qsp 50 µl

Incubar a 37°C durant 1 hora.

Després de la digestió la mescla de reacció és sotmesa a una extracció fenol/cloroform. El DNA es precipita amb etanol 100%, es recull per centrifugació, amb molt de compte es renta el pellet amb etanol al 70% i es seca el DNA. Aquest es ressupèn amb 50 µl de TE pH 8.0 i es guarda a -20°C.

4.3.2. Digestió amb la DNasa I

Les reaccions de protecció a la DNasa I es duen a terme de forma seqüencial. En primer lloc es posen en contacte el DNA i les diferents quantitats de proteïna (el rang de concentracions de DNA i proteïnes que s'assagen depèn de cada cas en concret) durant 1 min; s'addiciona a continuació una solució de Ca²⁺ i Mg²⁺ que s'incuba durant 1 min més; s'addiciona la DNasa I i s'incuba durant 1 min. Finalment la reacció s'atura per addició d'una solució de parada. Es fa una extracció fenol/cloroform de la mescla i es precipita el DNA, que posteriorment es ressupèn en tampó de càrrega per poder ser directament aplicat a un gel d'urea-poliacrilamida, previ escalfament a 95°C de la mostra.

Més detalladament el procés consisteix en:

Reaccions de footprinting

DNA marcat (1 extrem)	5 µl
DNA binding buffer	25 µl
Proteïna	variable
H ₂ Omq	qsp 50 µl

Col·locar els tubs en gel com a mínim durant 10 min. Escalfar la solució de parada a 37°C. Diluir 5 U de DNasa RQ1 RNasa-free en 100 µl de Tris-HCl, pH 8.0, 10mM, i mantenir-la en gel.

Per parelles, transferir els tubs de les mescles de DNA i proteïna a temperatura ambient durant 1 min. Addicionar 50 µl de la solució de Ca²⁺ i Mg²⁺ a temperatura ambient i incubar 1 min més. Addicionar 3 µl de la DNasa diluïda, mesclar amb la pipeta i incubar durant 1 min. Addicionar 90 µl de solució de parada i 100 µl de la barreja de fenol/cloroform equilibrada amb 0.5 M NaCl. Guardar els tubs en gel fins que totes les reaccions s'hagin dut a terme.

És molt important que tots els tubs segueixin el mateix protocol, i que cap d'ells no estigui més temps que el dictat en cada reacció. Agitar vigorosament els tubs i centrifugar-los durant 5 min. Fer l'extracció, addicionar etanol al 100% i precipitar els productes de la reacció.