

Proteïnes d'*Escherichia coli* implicades en el diàleg amb l'enteròcit: Caracterització del regulador transcripcional LldR i de la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa extracel·lular

Maria Laura Aguilera Gil

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

**PROTEÏNES D'*Escherichia coli* IMPLICADES EN EL DIÀLEG
AMB L'ENTERÒCIT: CARACTERITZACIÓ DEL REGULADOR
TRANSCRIPCIONAL LIDR I DE LA GLICERALDEHID-3-FOSFAT
DESHIDROGENASA EXTRACEL·LULAR.**

MARIA LAURA AGUILERA GIL

2010



UNIVERSITAT DE BARCELONA



FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOTECNOLOGIA
BIENNI 2004-2006

**PROTEÏNES D'*Escherichia coli* IMPLICADES EN EL DIÀLEG
AMB L'ENTERÒCIT: CARACTERITZACIÓ DEL REGULADOR
TRANSCRIPCIONAL LIDR I DE LA GLICERALDEHID-3-FOSFAT
DESHIDROGENASA EXTRACEL·LULAR.**

Memòria presentada per Maria Laura Aguilera Gil per optar al títol de doctor
per la Universitat de Barcelona

Aquesta tesi doctoral ha estat realitzada sota la direcció de la Dra. Laura
Baldomà Llavínés i la Dra. Josefa Badia Palacín

Dra. Laura Baldomà Llavínés

Dra. Josefa Badia Palacín

Maria Laura Aguilera Gil

MARIA LAURA AGUILERA GIL

2010

*Hi ha tantes coses a fer
i em queda tan poc temps per fer-les,
tantes coses a fer,
Llocs per recordar,
Ulls per besar,
a fora hi ha un dia a punt d'estrenar.*

Els pets

Para CTN

Els agraiments són l'últim que escric d'aquesta memòria. Per mi són, però, el més important, perquè cap de nosaltres arribaria enlloc sense l'ajuda dels altres. Per això, en aquests anys de tesi, l'aprenentatge més valuós no és científic, sinó el saber valorar que al meu voltant hi ha molta gent que em recolza i m'estima. Moltes gràcies a tots. Aquesta tesi és també vostra.

M'agradaria agrair a la Dra. Laura Baldomà la confiança que m'ha demostrat en la meua feina. També li vull agrair el seu treball incansable per introduir nous horitzons en el grup, encara que això comporti una feina extra de posar a punt tantes coses noves, també ha fet que els resultats siguin més gratificants.

A la Dra. Pepita Badia, gràcies per no creure mai que alguna cosa és impossible i estar sempre disposada a buscar una solució ràpida a tot.

A les dues, m'agradaria agrair-vos que el despatx sempre tingui la porta oberta, perquè en qualsevol moment sempre he pogut entrar per demanar ajuda científico-tècnica-laboral-personal.

Al Dr. Joan Aguilar, gràcies per donar-me la oportunitat d'entrar en el grup. Gràcies també per la lectura crítica i les aportacions a aquesta memòria.

A la Dra. Rosa Giménez, gràcies per les converses que hem tingut al respecte de tots els temes possibles. Converses científiques i metafísiques, des d'alimentació fins a allò que és important a la vida. Gràcies per l'ajuda tècnica i perquè sé que sempre puc confiar en tu.

Als companys de grup, moltes gràcies a tots, als que estan ara i també al que han passat per aquí en algun moment. Eva, no hace falta que te diga que has sido indispensable desde el primer día que pisé este laboratorio. Pero lo que te quiero agradecer no es todo lo que me has enseñado de este trabajo (que ya sabes que lo has hecho), sino el haberte convertido en una buena amiga y haber compartido conmigo momentos tan importantes de tu vida. Siempre has sido un gran apoyo para mí. Elaine, gracias por poner esa alegría y punto de locura en el laboratorio, por tener siempre una historia divertida que contar y por reírte hasta de ti misma. Karla, más calladita, pero igualmente importante, ten por seguro que con constancia conseguirás lo que te propongas. Entre las dos me habéis alegrado las etapas finales de esta tesis. Espero poder ayudaros en el camino que os queda por recorrer. També vull donar les gràcies a tots aquells amb els que he coincidit en algun moment. La Lucía, la Laia, la Cristina... i al Fernando perquè sempre m'ha tractat amb afecte especial. Moltes gràcies també a tots els estudiants, Leonardos, treballs pràctics, etc. que heu anat passant per aquí

Als companys del departament de tots els grups, Faustos, ST, Peixos, Plantes, Ciudad.lab i Taulers, he d'agrair-vos que sempre he rebut ajuda quan he anat a pidolar alguna cosa per poder acabar un experiment en l'últim moment. Espero haver-vos estat d'ajuda en algun moment jo també. Entre nosaltres sempre ens hem respectat, independentment del grup al que pertanyem, i això és el més important. Gràcies també a tots els "jefes", per un departament sòlid al darrera que ens recolza en els primers passos de les nostres carreres.

A les secretàries, gràcies per totes les gestions, i els dubtes de tràmits eficaçment resolts. A Silvia, gracias por estar siempre dispuesta a echar una mano, a veces sin ni siquiera tener que pedirte lo. Gracias también por no ser sólo la técnico del departamento y dejarme conocerte un poco más. Andrés, gracias por hacer que el primer saludo que recibo por las mañanas siempre sea sonriente, aún a costa de ser el blanco de tus bromas.

També m'agradaria donar les gràcies a tots aquells que des de fora de les fronteres del laboratori, també heu estat recolzant-me incondicionalment. A mis padres, porque siempre se han esforzado para darme siempre todo lo mejor, aunque sé que a ellos les parece que nunca es suficiente. Gracias por hacerme sentir que estáis orgullosos de mí. A mis "futuros", gracias por aceptar a una científica loca en la familia, se que esta profesión no es siempre fácil de entender. A Laura, gracias por las tardes de domingo de Play y Wii, que me han ayudado a desconectar y relajarme en los momentos más estresantes.

A la Irene, gràcies per haver fet que l'amistat continués més enllà de la carrera, per tenir sempre algú amb qui parlar, per les estones de gimnàs, i per tantes altres coses. Potser no penses en tu mateixa com una persona forta, però per mi ets tot un exemple. A l'Eva, gràcies per ser la meva amiga des del primer minut que ens vam conèixer, i per posar sempre el punt imaginatiu i "esplaiero". A totes dues, gràcies per tot el que em viscut juntes, i pel que encara ens queda per compartir. Als seus companys de viatge, el Jordi i el Xavi, gràcies per fer-me riure sempre, no podria haver demanat res millor per les meves amigues. Als quatre, sé que sempre puc comptar amb vosaltres.

Cris, no hay espacio suficiente para agradecerte todo lo que haces por mí. Gracias por aguantar el tirón siempre y por hacer todo lo posible por hacerme feliz cada día de mi vida.

PRESENTACIÓ

Les superfícies mucoses de l'individu humà es troben colonitzades per una gran varietat de microorganismes que conformen la microbiota, concentrant-se la major part d'ells en el tracte gastrointestinal. La relació entre l'epiteli intestinal i la microbiota és essencial pel desenvolupament i homeòstasi de l'intestí, i se'n obté un benefici mutu. L'epiteli intestinal, a més d'actuar com a barrera física per impedir que els bacteris accedeixin a òrgans essencials, representa la superfície on l'hoste pot interaccionar amb el bacteri. Així, els epitelis tenen un paper clau en la comunicació entre l'hoste i els bacteris que colonitzen el tracte intestinal, tant en condicions de salut com en condicions de malaltia. Independentment de quin sigui el balanç final d'aquesta interacció, la gran pressió selectiva que té lloc en la interfície bacteri-hoste determina que ambdues parts hagin desenvolupat múltiples maneres de comunicar-se entre elles. Aquest diàleg és essencial per a la supervivència tant del bacteri com de l'hoste.

Tradicionalment, la relació bacteri-hoste s'havia abordat des del punt de vista dels efectes negatius que el bacteri, sobretot els bacteris patògens, té sobre l'hoste. Actualment, però molts estudis se centren en components de la microbiota, entre ells els probiòtics, donat els seus efectes positius sobre el desenvolupament i homeòstasi del tracte intestinal.

En aquest treball s'han abordat dos aspectes relacionats amb la interacció bacteri-hoste. Per una banda, com a model d'adaptació metabòlica durant l'adhesió d'*Escherichia coli* a enteròcits, s'ha estudiat la regulació de l'operó *lldPRD*. Per altra banda, s'ha aprofundit en l'estudi dels mecanismes de secreció de la proteïna multifuncional gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH) de soques patògenes i probiòtiques com a mecanisme que el bacteri utilitza per interaccionar amb l'hoste.

En referència a l'adaptació metabòlica durant l'adhesió, es va prendre com a punt de partida un anàlisi per *microarrays* realitzat per Dahan *i col* (2004) en el que s'estudiaven els canvis en l'expressió d'*E. coli* enterohemorràgica (EHEC) adherida a membranes plasmàtiques d'eritròcits. S'ha seleccionat un dels gens sobreexpressats, *lldR*, com a representant del gens implicats en el metabolisme general que poden estar implicats en l'adaptació dels bacteris a l'hàbitat intestinal. *lldR* codifica la proteïna reguladora de l'operó *lldPRD*, responsable del metabolisme d'L-lactat en *E. coli*. Un cop confirmada la sobreexpressió d'*lldR* en un model d'infecció de cèl·lules epitelials Caco-2, i donat que no hi havia evidències experimentals a la bibliografia sobre la regulació de l'operó al que pertany aquest gen, s'ha procedit a la caracterització dels seus mecanismes de regulació. Així, s'ha assignat a *lldR* un paper dual com a activador de la transcripció en presència d'L-lactat en el medi, i com a repressor en absència d'aquest, a través de la formació d'un bucle de DNA format mitjançant la unió d'*lldR* a dues seqüències operadores, que impedeix la transcripció. El fet que l'operó *lldPRD* estigui sobreexpressat en bacteris adherits podria representar un mecanisme pel qual el bacteri s'adapta a l'augment local de la concentració d'L-lactat a la superfície intestinal, degut al metabolisme de la glucosa per part de l'enteròcit. Així, la regulació del metabolisme d'L-lactat contribuiria a l'establiment d'una relació entre l'enterobacteri i la cèl·lula hoste, no només en el cas de les soques patògenes, sinó també de les soques no patògenes que poden colonitzar el tracte intestinal de mamífers.

Pel que fa als mecanismes de secreció i interacció de la GAPDH bacteriana amb l'hoste, prèviament a aquest treball en el nostre laboratori ja s'havia identificat aquesta proteïna com a proteïna secretada per soques patògenes EHEC i EPEC (*E. coli* enteropatògena) crescudes en determinats medis de cultiu. En el present estudi s'ha aprofundit en la caracterització dels mecanismes de secreció. S'ha determinat la participació de dos mecanismes de secreció alternatius, el de tipus injectisoma (T3aSS), actiu en soques patògenes en medi de cultiu eucariota, i un altre mecanisme encara per identificar, actiu en soques patògenes i probiòtiques (*E. coli* Nissle 1917) en medi de cultiu bacteriològic ric. El fet que només es detecti secreció de GAPDH en soques patògenes i probiòtiques, però no en soques aïllades naturals no patògenes com EcoR26, podria indicar que la secreció i/o exposició de la proteïna a la superfície representa un avantatge per aquests bacteris en termes d'adhesió i colonització. Així, per exemple, s'ha determinat la capacitat d'unió de la GAPDH a fibrinogen i plasminogen. Aquest tipus d'interaccions han estat àmpliament descrites tant en soques patògenes com no patògenes com a mecanisme dels bacteris per facilitar l'adhesió a l'hoste, a través de l'activació del plasminogen i degradació de la matriu extracel·lular (Jin *i col*, 2005; Pancholi i Chhatwal, 2003; Bergmann *i col*, 2005). Addicionalment, la GAPDH pot tenir altres funcions en la relació amb l'hoste. En aquest estudi s'ha determinat la capacitat de la GAPDH de ser internalitzada en la cèl·lula eucariota en forma de vesícules, però queda per determinar la finalitat de la internalització i els efectes que podria tenir en l'hoste. Donat que s'ha identificat el sistema T3SS com un dels mecanismes implicats en la secreció de GAPDH en soques patògenes, també és possible que la proteïna sigui translocada per aquest sistema al citoplasma de la cèl·lula hoste. En una primera aproximació per tal d'identificar proteïnes citoplasmàtiques de l'hoste que interaccionen amb GAPDH, es van abordar experiments de *pull-down* en els que s'ha observat la interacció de GAPDH amb els factors d'elongació de la traducció EF1B γ i EF1B α . Igual que la GAPDH, aquestes dues proteïnes són proteïnes multifuncionals implicades en múltiples processos cel·lulars a més del de la traducció. Finalment, i vinculat amb la multifuncionalitat de la GAPDH, en aquest estudi s'ha comprovat la capacitat de la proteïna GAPDH de ser ADP-ribosilada. Les modificacions postraduccionals de la GAPDH es relacionen amb les seves diferents funcions i localitzacions subcel·lulars. La GAPDH, però, també té activitat ADP-ribosiltransferasa, fet que podria determinar la seva participació en la modificació de proteïnes de l'hoste en el cas de ser translocada al citoplasma de la cèl·lula eucariota. Per exemple, s'ha determinat que la GAPDH de *Listeria monocytogenes* interfereix en el trànsit intracel·lular de la cèl·lula infectada. Per tant, la GAPDH exerceix funcions importants en la interacció bacteri-cèl·lula epitelial tant pel que fa a bacteris patògens com probiòtics. Futures investigacions hauran de determinar la seva implicació en la interferència i/o regulació de determinats processos cel·lulars de l'hoste.

En el context de la comunicació entre el bacteri i l'hoste colonitzat, els resultats d'aquest treball ajuden a entendre alguns dels mecanismes pels quals les soques d'*E. coli* patògenes i/o probiòtiques s'adapten a l'entorn intestinal i s'adhereixen a l'epiteli més eficaçment que els bacteris que no presenten aquests mecanismes.

ABREVIACIONS

2D	Bidimensional
A/E	Lesions <i>attaching and effacing</i> (unió i esborrat)
ATP	Adenosinatrifosfat
BSA	Albúmina de sèrum boví
CAA	Hidrolitzat àcid de caseïna
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)dimetilamoni]-1-propà sulfonat
Ci	Curie
DIG	Digoxigenina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfòxid
D.O.	Densitat òptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Àcid etilendiaminotetracètic
EF1B	Factor d'elongació eucariota 1B
EF-Tu	Factor d'elongació Tu
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorràgica
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMSA	Assaig de retardació de la mobilitat electroforètica
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatògena
ESI	Ionització per electroesprai
FBS	Sèrum fetal boví
G3P	Gliceraldehid-3-fosfat
GAPDH	Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa
GST	Glutatió-S-transferasa
HEPES	Àcid 4-(2hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfònic
HRP	Peroxidasa de rave
IL	Interleuquina
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranòsid
LB	Medi de cultiu Luria-Bertani
LEE	<i>Locus of enterocyte effacement</i>
mA	Mil·liampers
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight</i>
MBP	Proteïna d'unió a maltosa
MOI	Multiplicitat d'infecció

MS	Espectrometria de masses
NAD	Nicotinamida dinucleòtid
NO	Òxid nítric
o/n	Tota la nit (<i>overnight</i>)
OMP	Proteïna de membrana externa
OMV	Vesícula de membrana externa
ONPG	o-Nitrofenil-Beta-D-Galactopiranòsid
ORF	Marc obert de lectura
PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida
PBS	Tampó fosfat salí
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PEP	Fosfoenolpiruvat
pfu	Unitat formadora de calbes de lisi
pI	Punt isoelèctric
PMSF	Fluorur de fenil-metil-sulfonil
PTS	Sistema fosfotransferasa
PVDF	Difluorur de polivinilidè
RACE	Amplificació ràpida d'extrems de cDNA
RBS	Lloc d'unió del ribosoma
RHB	Tampó de rehidratació
RT-PCR	PCR acoblada a transcripció inversa
SD	Desviació estàndard
SDS	Dodecil sulfat sòdic
SM	Medi mineral mínim
SNP	Nitroprussiat sòdic
TBS	Tampó Tris salí
TCA	Àcid tricloroacètic
TEM	Microscòpia electrònica de transmissió
TFB	Tampó de transformació
Tir	Receptor translocat de la intimina
Tn	Transposó
Tris	Tris(hidroximetil)aminometà
TxSS	Sistema de secreció de tipus x (T1SS-T8SS)
U	Unitat d'activitat enzimàtica
Xgal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranòsid

ÍNDEX

ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ	3
1.1. DIÀLEG BACTERI-CÈL·LULA HOSTE	3
1.1.1. COMUNITATS MICROBIANES QUE COLONITZEN EL TRACTE INTESTINAL.....	3
1.1.1.1. Microbiota intestinal.....	3
1.1.1.2. Microorganismes probiòtics	5
1.1.1.3. Microorganismes patògens	6
1.1.2. DIÀLEG BACTERI-HOSTE: ESTUDIS GENÒMICS I PROTEÒMICS	9
1.2. IMPLICACIÓ DE PROTEÏNES MULTIFUNCIONALS EN EL DIÀLEG BACTERI-HOSTE.....	10
1.2.1. PROTEÏNES MULTIFUNCIONALS	10
1.2.1.1. Proteïnes multifuncionals a la superfície de microorganismes	10
1.2.1.2. GAPDH a la superfície de microorganismes	12
1.2.1.3. GAPDH com a proteïna diana de modificacions postraduccionals.....	13
1.2.2. SISTEMES DE SECRECIÓ DE PROTEÏNES EN BACTERIS GRAMNEGATIUS.....	14
1.2.2.1. Sistemes de secreció en dues etapes (<i>two-step</i>)	16
1.2.2.2. Sistemes de secreció en una etapa (<i>one-step</i>)	19
1.2.2.3. Vesícules de membrana externa	21
1.3. METABOLISME D' L-LACTAT EN <i>E. coli</i>.....	22
1.3.1. REGULACIÓ DE L'OPERÓ <i>lldPRD</i>	22
1.3.2. FAMÍLIA DE PROTEÏNES REGULADORES GntR	24
OBJECTIUS.....	25
2. MATERIALS	29
2.1. SOQUES BACTERIANES	29
2.2. LÍNIES CEL·LULARS	30
2.3. VECTORS	30
2.4. OLIGONUCLEÒTIDS.....	31

2.5. REACTIUS I KITS COMERCIALS.....	31
2.5.1. REACTIUS EMPRATS EN ELS CULTIUS CEL·LULARS.....	31
2.6. SUPORT INFORMÀTIC	32
2.6.1. PROGRAMES INFORMÀTICS	32
2.6.2. BASES DE DADES.....	32
3. MÈTODES	35
3.1. MÈTODES MICROBIOLÒGICS	35
3.1.1. MEDIS DE CULTIU I CONDICIONS DE CREIXEMENT BACTERIÀ.....	35
3.1.2. OBTENCIÓ I TRANSFORMACIÓ DE CÈL·LULES COMPETENTS.....	36
3.1.3. TRANSDUCCIÓ GENERALITZADA AMB EL BACTERIÒFAG P1	37
3.1.4. OBTENCIÓ DE MUTANTS	37
3.2. CULTIU DE CÈL·LULES EUCARIOTES.....	37
3.2.1. CONDICIONS DE CULTIU DE LÍNIES TUMORALS.....	37
3.2.1.1. Composició dels medis.....	38
3.3. INFECCIÓ DE CÈL·LULES EUCARIOTES AMB ENTEROBACTERIS.....	38
3.3.1. INFECCIÓ DE CÈL·LULES Caco-2 EN CULTIU AMB ENTEROBACTERIS	38
3.3.2. OBTENCIÓ DE BACTERIS ADHERITS A CÈL·LULES Caco-2	39
3.3.3. INTERNALITZACIÓ DE GAPDH CONJUGADA A OR COL·LOÏDAL EN CÈL·LULES HeLa.....	39
3.4. ANÀLISI I PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES	40
3.4.1. OBTENCIÓ D'EXTRACTES CEL·LULARS EUCARIOTES.....	40
3.4.2. OBTENCIÓ DE LA FRACCIÓ DE MEMBRANA DE CÈL·LULES EUCARIOTES	40
3.4.3. OBTENCIÓ D'EXTRACTES CEL·LULARS BACTERIANS	40
3.4.4. OBTENCIÓ DE LES PROTEÏNES BACTERIANES SECRETADES AL MEDI DE CULTIU	41
3.4.5. FRACCIONAMENT SUBCEL·LULAR DE BACTERIS	41
3.4.6. OBTENCIÓ DE VESÍCULES DE MEMBRANA EXTERNA DE BACTERIS	42
3.4.7. PRECIPITACIÓ DE PROTEÏNES	42
3.4.7.1. Precipitació fraccionada amb sulfat d'amoní.....	42
3.4.7.2. Precipitació amb àcid tricloroacètic (TCA)	43

3.4.8. PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES RECOMBINANTS	43
3.4.8.1. Expressió i purificació de GAPDH recombinant (GST)	43
3.4.8.2. Expressió i purificació d'LldR i PdhR recombinants (MBP)	44
3.4.9. DETERMINACIÓ D'ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES.....	44
3.4.9.1. Activitat gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH).....	45
3.4.9.2. Activitat β -galactosidasa.....	45
3.4.9.3. ADP-ribosilació	45
3.4.10. PURIFICACIÓ D'ANTICOSSOS ANTI-GAPDH PER CROMATOGRAFIA D'AFINITAT.....	46
3.4.11. SEPARACIÓ ELECTROFORÈTICA DE PROTEÏNES EN GELS DE POLIACRILAMIDA-SDS (SDS-PAGE)	47
3.4.11.1. Electroforesi monodimensional.....	47
3.4.11.2. Electroforesi bidimensional.	47
3.4.12. ESPECTROMETRIA DE MASSES.....	48
3.4.13. ANÀLISI DE PROTEÏNES PER <i>WESTERN BLOT</i>	48
3.5. ANÀLISI D'INTERACCIONS PROTEÏNA-PROTEÏNA.....	49
3.5.1. <i>FAR-WESTERN BLOT</i>	49
3.5.2. <i>ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY</i> (ELISA).....	50
3.5.3. <i>PULL-DOWN</i>	51
3.6. TÈCNiques DE MICROSCÒPIA.....	52
3.6.1. MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE TRANSMISSIÓ (TEM).....	52
3.6.2. IMMUNOCITOQUÍMICA AMB ANTISÈRUM ESPECÍFIC ANTI-GAPDH.....	52
3.6.3. TINCIÓ NEGATIVA	52
3.6.4. CONJUGACIÓ DE GAPDH A OR COL·LOÏDAL	52
3.7. PREPARACIÓ I ANÀLISI DEL DNA.....	53
3.7.1. MANIPULACIÓ DEL DNA	53
3.7.2. CONSTRUCCIÓ DE MOLÈCULES HÍBRIDES DE DNA.....	54
3.7.3. MUTAGÈNESI DIRIGIDA.....	54
3.8. CARACTERITZACIÓ DE PROMOTORS.....	54
3.8.1. FUSIÓ DE PROMOTORS AL GEN <i>lacZ</i>	54
3.8.2. ASSAIGS DE RETARDACIÓ DE LA MOBILITAT ELECTROFORÈTICA (EMSA).....	55

3.9. PREPARACIÓ I ANÀLISI DE L'RNA	55
3.9.1. OBTENCIÓ D'RNA BACTERIÀ.....	55
3.9.2. ANÀLISI DE L'EXPRESSION GÈNICA MITJANÇANT PCR ACOBLADA A TRANSCRIPCIÓ INVERSA (RT-PCR).....	56
3.9.3. DETERMINACIÓ DE L'INICI DE TRANSCRIPCIÓ PER 5'-RACE	56
3.10. ANÀLISI ESTADÍSTIC	57
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	61
4.1. CARACTERITZACIÓ DEL REGULADOR TRANSCRIPCIONAL LldR I EL SEU PAPER EN L'ADAPTACIÓ METABÒLICA D'<i>E. coli</i> DURANT L'ADHESIÓ A ENTERÒCITS	61
4.1.1. ANÀLISI DE L'EXPRESSION DELS GENS <i>lldR</i> i <i>lldP</i> EN BACTERIS EHEC ADHERITS A CÈL·LULES Caco-2.....	61
4.1.2. IDENTIFICACIÓ DE PROMOTORS EN EL SISTEMA GÈNIC <i>lldPRD</i>	62
4.1.3. DETERMINACIÓ DE L'INICI DE TRANSCRIPCIÓ DE L'OPERÓ <i>lldPRD</i>	64
4.1.4. ANÀLISI DE L'EXPRESSION DE L'OPERÓ <i>lldPRD</i> EN ALTRES FONTS DE CARBONI.....	65
4.1.5. FUNCIÓ D'LldR i PdhR EN LA REGULACIÓ DE L'OPERÓ <i>lldPRD</i>	67
4.1.5.1. Funció d'LldR en la regulació de l'operó <i>lldPRD</i>	67
4.1.5.2. Funció de PdhR en la regulació de l'operó <i>lldPRD</i>	68
4.1.6. ESTUDI DE LA UNIÓ D'LldR I PdhR ALS OPERADORS O1 I O2.....	69
4.1.6.1. Obtenció de preparacions d'LldR i PdhR purificades	69
4.1.6.2. Anàlisi de la retardació de la mobilitat electroforètica dels operadors O1 i O2	70
4.1.7. ANÀLISI D'L-LACTAT COM A MOLÈCULA EFECTORA D'LldR.....	74
4.1.8. FUNCIÓ DELS DOS OPERADORS RECONEGUTS PER LldR EN EL CONTROL TRANSCRIPCIONAL DE L'OPERÓ <i>lldPRD</i>	76
4.1.9. EFECTE DE CANVIAR LA FASE HELICOÏDAL ENTRE ELS DOS OPERADORS D'LldR	77
4.1.10. MODEL DE REGULACIÓ DE L'OPERÓ <i>lldPRD</i>	78
4.1.11. L'AUGMENT D'EXPRESSION D' <i>lldPRD</i> EN BACTERIS EHEC ADHERITS A CÈL·LULES Caco-2 CONTRIBUEIX A L'ADAPTACIÓ METABÒLICA EN AQUEST NOU HABITAT.....	81

4.2. SECRECIÓ DE GAPDH EN <i>E. coli</i> I LA SEVA IMPLICACIÓ EN LA INTERACCIÓ AMB L'HOSTE.....	82
4.2.1. CARACTERITZACIÓ DE LA SECRECIÓ DE GAPDH	82
4.2.1.1. Localització subcel·lular de GAPDH en soques EHEC i EPEC.....	82
4.2.1.2. Anàlisi de les condicions de secreció de GAPDH en soques EHEC i EPEC	84
4.2.1.3. La GAPDH no és secretada per vesícules de membrana externa	87
4.2.1.4. Secreció de GAPDH per l'injectisoma (T3aSS) en soques EHEC i EPEC	88
4.2.1.5. Secreció de GAPDH en soques d' <i>E. coli</i> no patògenes i probiòtiques.....	90
4.2.1.6. Consideracions respecte als sistemes que poden estar implicats en la secreció de GAPDH	92
4.2.2. CARACTERITZACIÓ DE LA INTERACCIÓ DE GAPDH EXTRACEL·LULAR D' <i>E. COLI</i> AMB COMPONENTS DE L'HOSTE.....	94
4.2.2.1. Interacció de GAPDH d' <i>E. coli</i> amb proteïnes humanes	94
4.2.2.2. Internalització de GAPDH d' <i>E. coli</i> conjugada a or col·loïdal en cèl·lules HeLa	97
4.2.2.3. Identificació de proteïnes de cèl·lules Caco-2 que interaccionen amb GAPDH d' <i>E. coli</i>	99
4.2.2.4. Implicacions de la interacció de GAPDH amb components de l'hoste durant la colonització de l'epiteli intestinal.....	101
4.2.3. GAPDH D' <i>E. coli</i> COM A DIANA DE MODIFICACIONS POSTRADUCCIONALS DEPENDENTS DE NAD ⁺ : IMPLICACIÓ EN LA INTERACCIÓ AMB L'EPITELI INTESTINAL.....	103
4.2.3.1. Identificació de proteïnes d' <i>E. coli</i> modificades per ADP-ribosilació	103
4.2.3.2. Auto-ADP-ribosilació de GAPDH.....	105
4.2.3.3. Identificació de l'aminoàcid de GAPDH modificat per ADP-ribosilació.....	106
4.2.3.4. Estimulació de la modificació postraduccional de GAPDH per òxid nítric.....	108
4.2.3.5. Implicació de la modificació postraduccional per NAD ⁺ de GAPDH en la interacció amb l'epiteli intestinal.....	109
4.3 COMUNICACIÓ <i>E. coli</i> - ENTERÒCIT: APORTACIONS D'AQUEST TREBALL	110
5. CONCLUSIONS	113
6. REFERÈNCIES	117

7. ANNEXES	129
A.1 OLIGONUCLEÒTIDS	131
A.2 FRAGMENTS DE PCR	135
8. PUBLICACIONS	137

Aguilera L, Campos E, Giménez R, Badía J, Aguilar J, Baldomà L. Dual role of LldR in regulation of the *lldPRD* operon, involved in L-lactate metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2008. 190(8):2997-3005.

Egea L, Aguilera L, Giménez R, Sorolla MA, Aguilar J, Badía J, Baldomà L. Role of secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the infection mechanism of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: interaction of the extracellular enzyme with human plasminogen and fibrinogen. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007. 39(6):1190-203.

Aguilera L, Giménez R, Badia J, Aguilar J, Baldomà L. NAD⁺-dependent post-translational modification of *Escherichia coli* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Int Microbiol.* 2009. 12(3):187-92.

1

INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1. DIÀLEG BACTERI-CÈL·LULA HOSTE

La interacció bacteri-hoste inicialment va ser considerada erròniament com a perjudicial per ambdós components, conduint en últim terme al desenvolupament de certes patologies, però actualment se sap que determinades interaccions amb microorganismes són necessàries i beneficioses per l'hoste. Independentment de quin sigui el balanç final d'aquesta interacció, la gran pressió selectiva que té lloc a la interfície bacteri-hoste determina que ambdues parts hagin desenvolupat múltiples maneres de comunicar-se entre elles. Aquesta comunicació o diàleg és essencial per a la supervivència tant del bacteri com de l'hoste.

En el tracte gastrointestinal, l'epiteli intestinal, a més d'actuar com a barrera física per impedir que els bacteris accedeixin a òrgans essencials de l'organisme, representa la superfície on l'hoste pot interaccionar amb el bacteri. Així, els epitelis tenen un paper clau en la comunicació entre l'hoste i els bacteris que colonitzen el tracte intestinal tant en condicions de salut com en condicions de malaltia.

1.1.1. COMUNITATS MICROBIANES QUE COLONITZEN EL TRACTE INTESTINAL

1.1.1.1. Microbiota intestinal

En una persona adulta, el nombre de microorganismes associats a les seves superfícies mucoses excedeix el nombre total de cèl·lules de l'individu en més d'un ordre de magnitud. En els humans, la població més complexa i nombrosa de microorganismes es troba en el tracte gastrointestinal (Falk *i col*, 1998). Com en la majoria d'ecosistemes naturals, la magnitud de la biodiversitat del tracte gastrointestinal encara està per definir, però actualment es creu que la microbiota està formada per entre 500 i 1.000 espècies diferents, amb una biomassa d'1.5kg. L'ecosistema intestinal humà és molt dinàmic i manté diferències regionals molt marcades. En un individu sa, tots els nínxols intestinals disponibles es troben ocupats per membres de la microbiota. Dins d'un mateix nínxol, alguns membres microbians actuen com a residents (autòctons), mentre que altres són transitoris (al·lòctons). En

qualsevol posició al llarg del tracte intestinal, o a la interfície lumen-mucosa, els microorganismes transitoris poden representar membres autòctons desplaçats d'altres nínxols propers, o poden provenir de la ingesta de menjar i aigua (Xu i Gordon, 2003).

L'establiment de la microbiota intestinal s'inicia en el moment del naixement. Quan no hi ha limitacions d'espai o de nutrients, predominen els microorganismes comensals amb una alta velocitat de divisió. A mesura que la població augmenta i s'esgoten els nutrients, els diferents nínxols comencen a ser ocupats per microorganismes més especialitzats. Els primers bacteris en colonitzar l'intestí humà deriven de la flora del canal del part. En nounats, predominen *Escherichia coli*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* i *Bifidobacterium*. La capacitat d'altres comensals per envair l'espai ja ocupat depèn de la seva habilitat per utilitzar els substrats d'una manera més eficient i/o de provocar alteracions en el reservori de nutrients que s'adaptin millor a les seves pròpies necessitats metabòliques (Hooper i col, 1999).

Tot i la variabilitat intra i interindividual dels microorganismes que formen part de la microbiota intestinal, algunes característiques comunes són evidents. En primer lloc, en els adults, més del 99.9% dels bacteris cultivables són anaerobis obligats, i només el 0.1% són anaerobis facultatius. Els gèneres més representats són *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Escherichia* i *Veillonella*. Segon, la densitat de població bacteriana augmenta en vuit ordres de magnitud de l'intestí prim proximal al colon. La biodiversitat també sembla augmentar al llarg d'aquest eix. Tercer, la microbiota funciona com un òrgan multifuncional que proveeix trets metabòlics que no han evolucionat completament en el nostre genoma. Aquests trets inclouen la capacitat de trencar polisacàrids vegetals no digeribles d'altra manera, la biotransformació d'àcids biliars conjugats, la degradació d'oxalats de la dieta i la síntesi de certes vitamines. A més, la colonització postnatal del nostre intestí educa el sistema immune, i així esdevenim tolerants a una gran varietat d'immunodeterminants microbians, reduint les respostes al·lèrgiques (Xu i Gordon, 2003).

Diferents estudis han evidenciat que la microbiota intestinal endògena o comensal modula l'expressió de gens implicats en diverses funcions intestinals essencials tals com l'absorció de nutrients, l'enfortiment de la funció de la mucosa, el metabolisme de xenobiòtics i toxines, la motilitat intestinal, l'angiogènesi i la maduració intestinal postnatal (Hooper i col, 2001). Els estudis realitzats per Hooper i col (1999) es poden considerar paradigma de la coordinació entre microbiota i hoste. *Bacteroides thetaiotaomicron*, membre prominent de la microbiota normal de l'intestí distal de ratolins i humans, utilitza el repressor FucR, com a sensor de la disponibilitat del sucre L-fucosa. FucR coordina l'expressió de l'operó *fuc*, que codifica en els bacteris els enzims pel metabolisme d'L-fucosa, amb l'expressió d'un altre locus que regula la producció de glicans fucosilats a la paret de l'enteròcit. FucR porta a terme aquesta doble funció emprant L-fucosa com a inductor del locus bacterià i com a corepressor del locus enterocític. Així, un cop a l'intestí s'assoleix una densitat crítica de microorganismes, aquesta població pot senyalitzar per tal que hi hagi una producció sostinguda de glicans fucosilats en l'hoste. El fet de senyalitzar a l'hoste només en el moment en que la disponibilitat de fucosa es troba per sota de cert valor, assegura evitar que *B. thetaiotaomicron* gastí energia en la senyalització quan la fucosa és abundant. Mitjançant l'estreta coordinació de producció de fucosa per part

de l'hoste amb la velocitat d'utilització d'aquesta, també s'evita un excés de fucosa epitelial hidrolitzable. Això podria minimitzar el risc d'invasió per patògens que utilitzin glicans fucosilats com a receptors per les seves adhesines.

Queda clar que de la relació entre l'epiteli intestinal i la microbiota se n'obté un benefici mutu, i per tant és considerada com una relació de mutualisme o simbiosi. Una de les funcions de la microbiota de l'intestí es la resistència a la colonització de l'hoste per part de patògens no residents (*Salmonella*, *Yersinia*, *Listeria* i *Vibrio*). Alguns components de la microbiota són, però, també patògens potencials i oportunistes presents en quantitats restringides si l'ecosistema no es troba pertorbat per exemple per antibiòtics. Això vol dir que si es presenta l'oportunitat, la majoria de bacteris intestinals expandiran el seu habitat. Aquesta expansió pot tenir efectes variables en l'hoste. Les espècies bacterianes endògenes poden provocar malalties en els seus hostes per diversos mecanismes. Per exemple, quan l'ecosistema es trastorna, components menors de la microbiota poden expandir-se o fins i tot colonitzar altres hàbitats on l'hoste no sigui capaç d'acomodar-los o tolerar-los. Alguns exemples de patògens que emergeixen de la microbiota intestinal normal i provoquen malalties quan s'expandeixen inclouen bacteris associats amb infeccions del tracte urinari (*E. coli*), septicèmia (*E. coli*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*) i enterocolitis necrotitzant infantil (*Klebsiella*, *E. coli*, *Clostridium*) (Falk i col, 1998).

La comprensió dels mecanismes moleculars que permeten que els components de la microbiota interactuïn amb l'hoste per establir una relació avantatjosa per tots dos és important a l'hora de considerar els orígens de les infeccions oportunistes, els estats immunopatològics o la propagació de resistència a antibiòtics, entre altres fenòmens.

1.1.1.2. Microorganismes probiòtics

Els probiòtics són preparacions de microorganismes vius que, si es consumeixen com a suplement amb la dieta, són capaços de sobreviure en el tracte gastrointestinal humà i modular els sistemes fisiològics de l'hoste, incloent el sistema immune. Moltes preparacions que contenen soques probiòtiques es troben disponibles com a productes comercials. La gran majoria de bacteris probiòtics són bacteris làctics grampositius, membres dels gèneres *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, que també formen part de la microbiota normal en individus sans. Tanmateix, existeixen també algunes preparacions comercials probiòtiques que utilitzen bacteris gramnegatius com la soca *E. coli* Nissle 1917 (Cross i col, 2004).

Entre els efectes que algunes soques probiòtiques exerceixen sobre l'hoste, s'ha descrit que són capaces de reduir la colonització de l'intestí per patògens a través d'una competició directa pels llocs d'unió, la producció d'antimicrobians i la modulació de la resposta immune adquirida. També poden millorar la intolerància a la lactosa i reduir els nivells de colesterol en sèrum. A més, hi ha evidència científica de que els bacteris probiòtics exerceixen algun tipus d'influència beneficiosa sobre les cèl·lules epitelials que regula el seu desenvolupament i la seva funció (Sánchez i col, 2008).

Tot i que no es coneixen en profunditat els mecanismes pels quals les soques probiòtiques exerceixen els seus efectes a l'intestí, durant els últims anys s'han caracteritzat moltes proteïnes exportades per aquests microorganismes, sobretot en el gènere *Lactobacillus*. Aquestes proteïnes exportades podrien ser responsables d'alguns dels mecanismes pels quals els probiòtics contribueixen al manteniment de

l'homeòstasi intestinal, degut a la seva situació privilegiada a la superfície bacteriana, que els posa en contacte directe amb l'ambient intestinal. S'ha demostrat que algunes són capaces d'unir-se a components epitelials com el mucus o la matriu extracel·lular. A més de les proteïnes típicament exportades a la superfície dels bacteris, que acostumen a presentar un pèptid senyal per a la seva localització extracel·lular, recentment, diverses proteïnes citoplasmàtiques amb funcions essencials en el creixement i el metabolisme bacterià han estat descrites en la superfície bacteriana o en el proteoma extracel·lular, tot i que no posseeixen cap motiu d'export o domini d'unió a la membrana. Aquestes proteïnes podrien facilitar l'adhesió a les cèl·lules de l'hoste (Sánchez *i col*, 2008). Entre les proteïnes d'aquests tipus s'ha descrit la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa o GAPDH (INTRODUCCIÓ 1.2).

En relació amb els bacteris probiòtics gramnegatius, la soca *E. coli* Nissle 1917 és un aïllat fecal no patogènic del serotip O6:K5:H1 que es comercialitza com a medicament sota el nom de Mutaflor® (Ardeypharm). Es va emprar com a agent probiòtic en la era preantibiòtica des de 1920 per tractar infeccions intestinals. Recentment, estudis clínics han mostrat que l'administració d'aquesta soca és equivalent a medicació estàndard en el manteniment de la remissió de la colitis ulcerativa i podria ser una alternativa al tractament de la malaltia de Crohn. *E. coli* Nissle 1917 és capaç de colonitzar l'intestí d'humans i animals. No causa colitis i no té cap efecte en la migració, expansió clonal i activació de limfòcits T CD4⁺, ni en animals sans ni en animals amb colitis ulcerativa. Per tant, aquesta soca compleix tots els requisits per ser considerada un agent bioterapèutic i reconeguda com a microorganisme segur per l'ús humà. La informació disponible sobre les característiques que contribueixen al seu caràcter probiòtic, però, és limitada (Sun *i col*, 2005).

1.1.1.3. Microorganismes patògens

Els bacteris patògens intestinals poden o bé adherir-se a l'epiteli intestinal i colonitzar la seva superfície, o bé envair la cèl·lula i causar lesions inflamatòries. En el primer grup trobem bacteris com *E. coli* enterohemorràgica (EHEC) o *E. coli* enteropatogènica (EPEC), que no són invasius, encara que el tipus d'interacció que estableixen amb la cèl·lula epitelial és semblant a la dels microorganismes enteroinvasius en el fet que secreten proteïnes efectores que faciliten l'adherència íntima i la destrucció de les microvellositats de la vora en raspall de l'enteròcit provocant un reordenament del citoesquelet d'actina. En la categoria de patògens enteroinvasius hi trobem, entre d'altres, bacteris com *Salmonella*, *Shigella* o *Yersinia*.

Enteropatògens no invasius: EHEC i EPEC

Els bacteris de les espècies d'*E. coli* són el major constituent de la microbiota anaeròbica facultativa humana. Diferents grups d'*E. coli* són patògens importants de l'intestí, i resulten en diferents formes de malalties diarreiques. EHEC és un problema de salut en el món occidental. La infecció per EHEC resulta en una forma hemorràgica de colitis que es pot complicar severament a síndrome urèmic hemolític, resultant en una fallada renal aguda en nens i finalment la mort. EPEC, en canvi, tot i que ja no és una causa de diarrea important en els països desenvolupats, encara és una de les primeres causes de diarrea infantil en els països en desenvolupament.

Ambdós patògens colonitzen la mucosa intestinal i, modificant la funció de l'epiteli, produeixen la formació de lesions A/E (*attaching and effacing*, o d'unió i

esborrat), que es caracteritzen per la pèrdua dels microvilli, unió íntima del bacteri a l'hoste i formació d'unes estructures en forma de pedestal que abracen el bacteri unit a la cèl·lula hoste (Fig. 1.1). Aquest fenomen és el resultat del reordenament del citoesquelet d'actina que té lloc al voltant dels bacteris adherits.

Els gens necessaris i suficients per desencadenar les lesions A/E estan codificats dins d'una illa de patogenicitat de 35kb anomenada *locus of enterocyte effacement* (LEE) conservada entre les soques d'*E. coli* que provoquen aquests tipus de lesions (Fig. 1.2). L'illa LEE codifica el sistema de secreció de tipus 3 (T3SS) o injectisoma, un complex multiproteic assemblet a través de les dues membranes bacterianes que permet el lliurament directe de proteïnes efectores a l'interior de la cèl·lula hoste. El *locus* LEE també codifica aquests factors translocats pel T3SS a la cèl·lula hoste, un regulador, l'adhesina anomenada intimina i el seu receptor, a més d'altres proteïnes (Nougayrède *i col*, 2003).

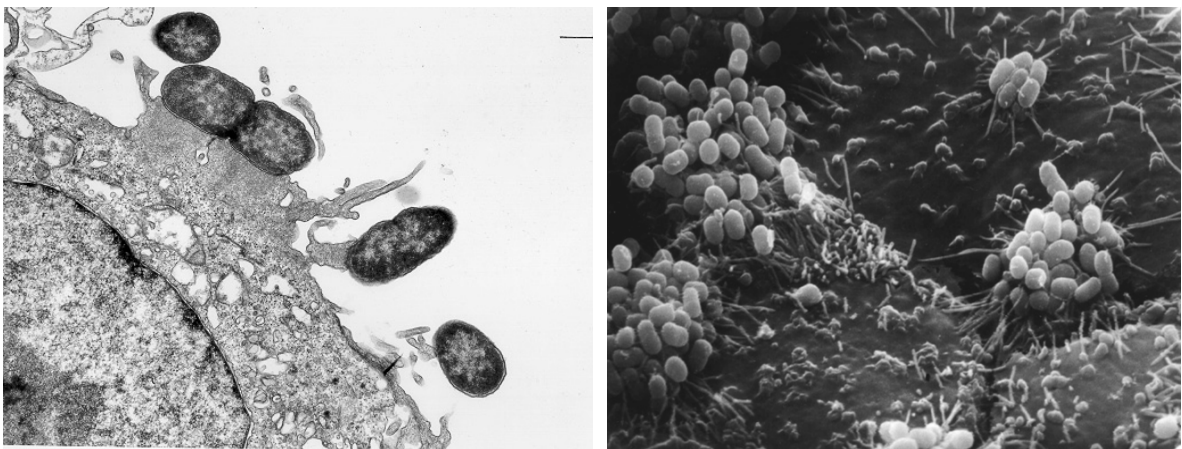


Figura 1.1. Adhesió d'EPEC a cèl·lules intestinals. A l'esquerra, micrografia electrònica de transmissió mostrant les lesions A/E (*attaching and effacing*). Els bacteris EPEC han esborrat els microvilli i s'han adherit íntimament a la superfície de la cèl·lula HEp-2, que respon a l'adhesió del bacteri formant una estructura en forma de pedestal a sota del bacteri adherit. A la dreta, micrografia electrònica d'escaneig d'alta resolució de bacteris EPEC mostrant l'efecte d'adhesió localitzada a cèl·lules HEp-2. Font: Donnenberg MS (<http://medschool.umaryland.edu/infeMSD/>).

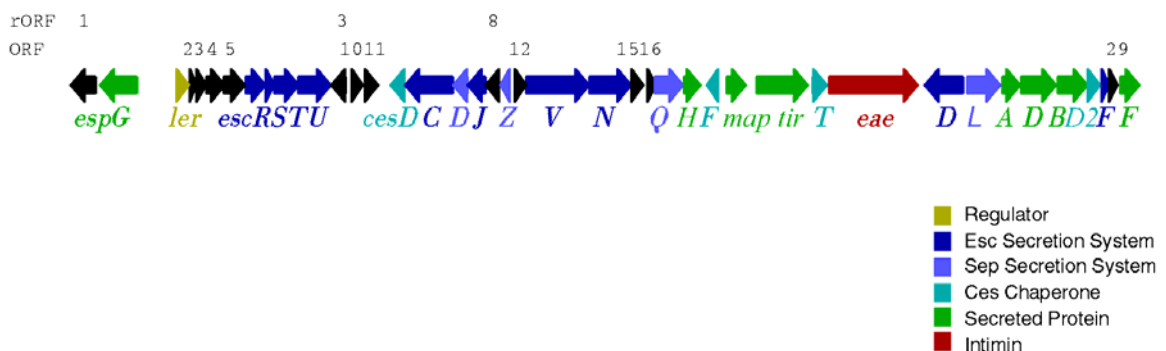


Figura 1.2. Illa de patogenicitat LEE (*locus of enterocyte effacement*) d'EPEC. Consisteix en 41 ORFs, necessaris i suficients per a la formació de les lesions A/E. Font: Donnenberg MS (<http://medschool.umaryland.edu/infeMSD/>).

La intimina és una proteïna de membrana externa codificada pel gen *eae* present en l'illa LEE, requerida per l'adhesió íntima del bacteri a les cèl·lules epitelials, per la reorganització del citoesquelet i per la virulència completa d'EPEC. El receptor de la intimina és un producte d'EPEC codificat en el sistema LEE, anomenat Tir per *translocated intimin receptor*. Tir és introduït a la cèl·lula hoste a través del T3SS. S'ha proposat que el receptor Tir és primerament lliurat pel T3SS en el citoplasma de la cèl·lula hoste, on és fosforilat, i això permet la seva inserció a la membrana. El bucle extracel·lular de Tir representa el domini d'unió de la intimina, present a la superfície d'EPEC, i permet l'adhesió íntima del bacteri a la superfície de l'hoste (Fig. 1.3). D'aquesta manera, el patògen subverteix funcions essencials de la cèl·lula hoste per construir estructures focals d'actina que ancoren fortament els bacteris al citoesquelet de la cèl·lula hoste via el receptor Tir (Nougayrède *et al*, 2003).

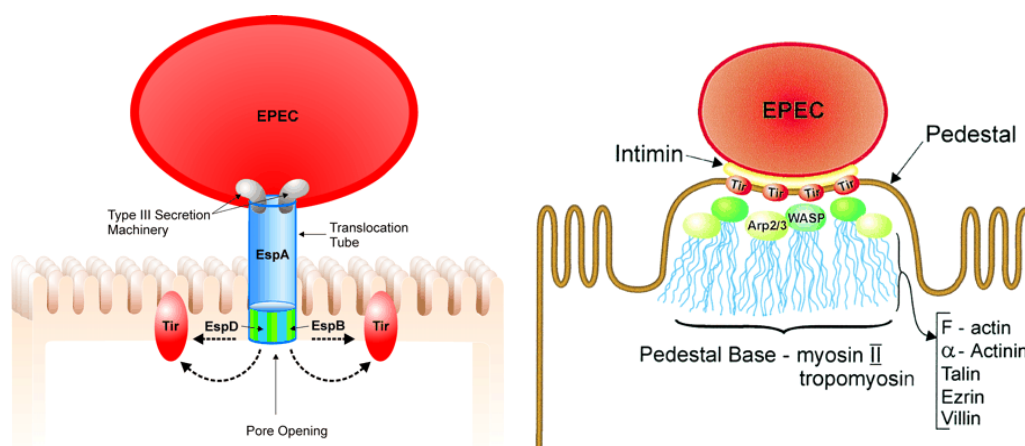


Figura 1.3. Translocació d'efectors d'EPEC i formació de pedestals en la cèl·lula hoste. A l'esquerra, la translocació d'efectors d'EPEC a la cèl·lula hoste té lloc a través dels T3SS, codificat a l'illa de patogenicitat LEE. Un cop a l'interior de la cèl·lula hoste, Tir és inserat a la membrana. A la dreta: formació de l'estructura en forma de pedestal a la zona subjacent al bacteri. EPEC s'uneix íntimament a la cèl·lula hoste via la interacció entre intimina i Tir, que aprofita la maquinària senyalitzadora i el citoesquelet de l'hoste per formar els pedestals. Font: Vallance i Finlay (2000).

La unió de la intimina al receptor Tir és considerada d'importància crítica per a l'adhesió, però a més de la unió a aquest receptor, la intimina pot unir-se a un altre coreceptor eucariòtic. La possibilitat que la intimina s'uneixi a un coreceptor podria significar que aquesta interacció està implicada en el tropisme per un teixit determinat, i això estaria relacionat amb el fet que EPEC pot colonitzar l'intestí prim i el gros, mentre que EHEC només pot colonitzar l'intestí gros. Encara que altres adhesines i processos reguladors podrien tenir un paper en aquest fenomen, el tropisme per un teixit determinat sembla variar amb el subtipus d'intimina (Nougayrède *et al*, 2003).

Les soques EPEC formen microcolònies tridimensionals discretes en la superfície de les cèl·lules a les que s'adhereixen, en comptes de cobrir completament la superfície cel·lular de l'hoste (Fig. 1.1). Aquest fenotip característic s'anomena adherència localitzada, i ve determinat per un factor d'adherència codificat en un plàsmid present en EPEC, que produeix un pilus de tipus 4. Aquestes fímbries són capaces d'associar-se per formar estructures agregades semblants a una corda, i per això aquest pilus s'anomena *bundling forming pilus* o BFP (pilus formador de feixos).

Sembla que aquest pilus intervé en les interaccions entre els bacteris, permetent la formació de les microcolònies en la superfície de l'epiteli (Nougayrède *i col*, 2003).

Així doncs, l'establiment de la infecció per EPEC i EHEC, i la formació de lesions A/E tenen lloc en 3 fases diferents: primer, les interaccions inicials amb la cèl·lula hoste són mediades a través del BFP i/o altres factors. Segon, s'estructura el T3SS (injectisoma) i les proteïnes efectores són translocades al citoplasma de la cèl·lula hoste. Entre aquestes proteïnes es troba la proteïna Tir, que s'insereix a la membrana de la cèl·lula hoste. Finalment, es produeix la unió entre Tir i la intimina exposada a la superfície del patogen, Tir indueix reordenament en el citoesquelet de la cèl·lula hoste i es formen pedestals a la zona subjacent dels bacteris adherits íntimament. Addicionalment, després de la formació de les lesions A/E, EPEC forma microcolònies disperses, i s'indueix l'apoptosi de la cèl·lula hoste.

1.1.2. DIÀLEG BACTERI-HOSTE: ESTUDIS GENÒMICS I PROTEÒMICS

L'adhesió comporta una sèrie de conseqüències tant pel bacteri que s'adhereix com per la cèl·lula hoste a la qual s'ha adherit. La majoria d'estudis genòmics i proteòmics, però, s'han centrat en evidenciar com l'hoste reacciona a la presència de bacteris que el colonitzen. Els estudis sobre la influència de les cèl·lules epitelials intestinals sobre els bacteris adherits són més escassos i recents.

Un estudi de l'expressió de gens de *Borrelia burgdorferi* en contacte amb cèl·lules de mamífer va evidenciar canvis en l'expressió de determinats gens en els bacteris adherits, indicant que existeix regulació de certs gens procarotes per factors específics de la cèl·lula hoste (Brooks *i col*, 2003). Un altre estudi similar realitzat per infecció de diferents tipus de cèl·lules epitelials amb *Neisseria meningitidis* va permetre identificar canvis en la transcripció d'uns 72 gens en els bacteris adherits. Cal destacar que els gens regulats en aquestes condicions no només corresponien a factors de virulència, sinó que també eren gens implicats en processos metabòlics, transport de nutrients o responsables de la síntesi de proteïnes de membrana (Dietrich *i col*, 2003). Aquest estudi també posa de manifest que l'expressió diferencial d'alguns d'aquests gens d'*N. meningitidis* és dependent del tipus de cèl·lula hoste amb la que ha entrat en contacte. Així doncs, tant els bacteris intestinals com les cèl·lules de l'epiteli intestinal emeten senyals que són capaces de regular no només la seva expressió gènica, sinó també la de l'organisme amb el que estan en contacte.

Un altre exemple d'aquest tipus d'estudis és el realitzat per Dahan *i col* (2004), en el que es van determinar, mitjançant *microarrays*, els canvis en la transcripció de gens de bacteris EHEC O157:H7 durant l'adhesió a membranes plasmàtiques d'eritròcits. L'expressió de 404 gens va canviar entre els bacteris associats a eritròcits i els bacteris no adherits. Entre ells, cal destacar que no només va variar l'expressió de gens relacionats amb la virulència (gens de l'illa LEE), sinó també gens relacionats amb proteïnes de membrana externa, estrès i metabolisme. Per exemple, l'expressió dels gens que codifiquen enzims com l'ènolesa es trobava disminuïda, mentre que la del gen *lldR*, que codifica la proteïna reguladora de l'operó *lldPRD*, responsable del metabolisme d'L-lactat en *E. coli*, es trobava augmentada.

En estudis proteòmics realitzats en el nostre grup es va avaluar l'expressió de proteïnes en la soca EHEC adherida a cèl·lules Caco-2. Es va observar l'expressió

diferencial de determinades proteïnes en els bacteris adherits respecte als lliures en el medi. Entre les proteïnes identificades, es van trobar proteïnes implicades en funcions no relacionades amb la patogenicitat com síntesi de proteïnes, transport, metabolisme general i resposta a estrès oxidatiu. Entre elles cal destacar la GAPDH, que a més del seu paper en metabolisme, pot desenvolupar altres funcions alternatives. Així, s'ha descrit la seva localització en la superfície de microorganismes on exerceix funcions no glicolítiques relacionades amb l'adhesió i/o virulència del bacteri.

1.2. IMPLICACIÓ DE PROTEÏNES MULTIFUNCIONALS EN EL DIÀLEG BACTERI-HOSTE

1.2.1. PROTEÏNES MULTIFUNCIONALS

Els enzims anomenats *housekeeping*, d'expressió constitutiva, són presents en gairebé tots els organismes en els que duen a terme funcions metabòliques essencials per a la supervivència. La majoria dels enzims glicolítics formen part d'aquest grup, i es troben fins i tot en aquells organismes que no tenen els enzims dels cicles dels àcids tricarbòxílics i que per tant sobreviuen en condicions d'anaerobiosis o microaeròfilia. La seva expressió generalment no està sota el control de cap maquinària de regulació sofisticada (Pancholi i Chhatwal, 2003).

En els últims anys, diversos autors han observat que determinats enzims *housekeeping* poden dur a terme una gran varietat de funcions. S'ha anomenat aquests enzims proteïnes multifuncionals o *moonlighting*, per la seva habilitat de dur a terme funcions diferents segons la seva localització cel·lular, el tipus cel·lular en el que es troben, el seu estat oligomèric o concentració cel·lular del seu lligand, substrat, cofactor o producte (Jeffery, 2009). Existeixen un gran nombre de descripcions d'aquests enzims clàssicament citoplasmàtics, a la superfície de microorganismes, on duen a terme una varietat de funcions. La presència d'enzims d'expressió constitutiva en localitzacions inesperades està directament relacionat amb el desenvolupament de funcions alternatives molt sovint relacionades amb la millora de l'adhesió del microorganisme. Molt probablement aquestes proteïnes tenen un paper clau en la relació del bacteri amb l'hoste, ja que es troben en una localització privilegiada, a la superfície de contacte entre els microorganismes i l'hoste (Pancholi i Chhatwal, 2003).

Es desconeix el sistema pel qual les proteïnes multifuncionals poden ser exportades a la superfície cel·lular, ja que no tenen una seqüència senyal típica de transport ni mecanismes d'ancoratge a la membrana, però s'ha proposat que podrien ser transportades en un estat ja plegat o fins i tot oligomèric per algun mecanisme encara per identificar.

1.2.1.1. Proteïnes multifuncionals a la superfície de microorganismes

La primera descripció de la presència d'un enzim d'expressió constitutiva en la superfície de bacteris patògens feia referència a la GAPDH d'*Streptococcus* del grup A, i va produir-se simultàniament en dos grups independents (Lottenberg *i col*, 1992; Pancholi i Fischetti, 1992). Des d'aquest moment, la majoria de descripcions de

proteïnes multifuncionals a la superfície de microorganismes estan relacionades amb patògens grampositius. Tanmateix, en els darrers anys ha tingut lloc un notable augment d'aquestes descripcions en bacteris probiòtics i patògens gramnegatius.

Entre les proteïnes multifuncionals descrites a la superfície de patògens, destaquen la GAPDH, que es presentarà més endavant, i l'enolasa, un altre enzim de la glicòlisi. L'enolasa ha estat identificada en la superfície de patògens grampositius, com són diverses espècies d'*Streptococcus* (Bergmann *i col*, 2003) i *Listeria monocytogenes*, i també en patògens gramnegatius com *Aeromonas hydrophila* (Sha *i col*, 2003). Una de les funcions de les enolases procariotes és unir plasminogen. La conversió del plasminogen adquirit a plasmina per activadors del bacteri o de l'hoste equipen a la superfície bacteriana amb activitat proteasa. La proteòlisi localitzada causada per la digestió no específica de proteïnes per part del bacteri recobert de plasmina pot afavorir la disseminació del bacteri i la penetració en els teixits. L'activitat d'unió al plasminogen de l'enolasa indica que aquesta proteïna podria tenir un paper important en l'inici de la malaltia modulant el sistema fibrinolític pericel·lular i intravascular (Pancholi i Chhatwal, 2003). L'enolasa, però, també ha estat identificada en la superfície de *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, probiòtics grampositius. Un estudi comparatiu de la capacitat d'unió de plasminogen de les diferents enolases mostra que les funcions associades amb la virulència de les enolases d'*Streptococcus* i *Staphylococcus*, activació del plasminogen i adhesió a l'hoste, també són presents en les enolases de *Lactobacillus* (Antikainen *i col*, 2007).

Els enzims glicolítics també s'han trobat associats al recobriment extern o tegument de protozous i paràsits com *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* i *Trypanosoma congolense*, on presenten activitat com a receptor per diverses proteïnes de la matriu extracel·lular.

A més d'enzims de la glicòlisi, també s'ha observat la presència d'altres proteïnes d'expressió constitutiva en la superfície de bacteris. Per exemple, el factor d'elongació de la síntesi proteica Tu (EF-Tu) present en la superfície de *Lactobacillus johnsonii* intervé en l'adhesió a mucina humana i pot produir una resposta proinflamatòria en cèl·lules HT-29, participant en l'homeòstasi de l'intestí (Granato *i col*, 2004). També s'ha observat EF-Tu en la superfície d'*L. monocytogenes*, *Mycoplasma pneumoniae*, EHEC, EPEC i *Pseudomonas aureginosa*. En aquest últim microorganisme, l'EF-Tu extracel·lular pot unir-se a reguladors del plasma i degradar el component C3b del complement, així com unir-se a plasminogen i degradar fibrinogen (Kunert *i col*, 2007). De la mateixa manera, les proteïnes de resposta a xoc tèrmic (*heat-shock proteins*) Hsp60 i Hsp70, també anomenades GroEL i DnaK respectivament, s'han descrit com a proteïnes de superfície amb capacitat d'unió a mucina (Bergonzelli *i col*, 2006).

Els estudis proteòmics de l'embolcall de múltiples microorganismes ha donat lloc a l'augment de les descripcions de proteïnes multifuncionals en la superfície de microorganismes. Per exemple, el proteoma extracel·lular d'*L. monocytogenes* ha revelat la presència de moltes proteïnes multifuncionals a la superfície cel·lular, com GAPDH, enolasa, DnaK, GroEL i fosfoglicerat quinasa, entre d'altres (Schaumburg *i col*, 2004). També s'han identificat les principals proteïnes de superfície d'*Streptococcus agalactiae*, entre les que es troben l'ornitina carbamoil transferasa, fosfoglicerat quinasa, purina nucleòsid fosforilasa, enolasa, glucosa-6-fosfat isomerasa, superòxid dismutasa, DnaK, Hsp-60 i GAPDH (Hughes *i col*, 2002).

Totes aquestes dades apunten cada vegada més a l'existència d'una funció d'aquestes proteïnes en la interacció bacteri-hoste. Mentre que en un principi aquesta relació es va plantejar des del punt de vista de l'adhesió i invasió de patògens, actualment s'ha comprovat que aquestes proteïnes podrien estar desenvolupant una funció en membres de la microbiota, ja sigui utilitzant mecanismes similars als dels patògens per competir amb ells en la colonització dels epitelis, o participant directament en el manteniment de la homeòstasi intestinal. A més, diversos estudis han demostrat que aquestes proteïnes multifuncionals que es troben en superfície, entre elles la GAPDH, són antigèniques en humans i poden donar lloc a una resposta immune protectora en animals d'experimentació (Ling *i col*, 2004; Liu *i col*, 2005).

1.2.1.2. GAPDH a la superfície de microorganismes

Com ja s'ha comentat, la GAPDH va ser identificada a la superfície de patògens per primera vegada en espècies grampositives, concretament en *Streptococcus* del grup A (Lottenberg *i col*, 1992; Pancholi i Fischetti, 1992). Aquesta va ser la primera descripció d'un enzim glicolític, considerat citoplasmàtic, en una localització no esperada. A més, es va descriure que aquesta GAPDH associada a la superfície del patogen era enzimàticament activa i tenia capacitat d'unió a fibronectina i lisozim, i a proteïnes del citoesquelet, apuntant per primera vegada a una funció alternativa a la glicolítica en aquesta nova localització cel·lular. Posteriorment, el mateix grup d'investigadors va demostrar la participació de la GAPDH localitzada en la superfície d'*Streptococcus* del grup A en la transducció de senyals a l'hoste durant la infecció de cèl·lules de faringe (Pancholi i Fischetti, 1997). En un altre estudi, es va caracteritzar la presència d'un receptor de GAPDH en la membrana de cèl·lules de faringe, i aquest va ser identificat com a uPAR (urokinase plasminogen activator)/CD87, indicant una relació entre el sistema del plasminogen humà i les possibles funcions no glicolítiques de la GAPDH de superfície (Jin *i col*, 2005). Concretament, s'ha demostrat que la interacció amb el plasminogen humà a través de la GAPDH de superfície millora l'adhesió d'*Streptococcus* del grup A a les cèl·lules de faringe (Boël *i col*, 2005). Cal destacar que també s'ha descrit la interacció de la GAPDH extracel·lular d'*Streptococcus* del grup A amb el component C5a del sistema del complement humà, afavorint la seva degradació en coordinació amb una proteasa de la superfície bacteriana (ScpA), i facilitant l'evasió del patogen de la detecció per part del sistema immunitari de l'hoste (Terao *i col*, 2006).

En aquest mateix sentit, s'ha demostrat que els *Streptococcus* del grup B també exporten GAPDH a l'exterior cel·lular, i que aquesta GAPDH pot induir l'activació de cèl·lules B policlonals de l'hoste i augmentar la secreció d'interleuquina IL-10. L'habilitat dels constituents microbians d'induir l'activació de cèl·lules B policlonals en l'hoste infectat constitueix un mecanisme d'evasió immunitària emprada pels patògens per suprimir les respostes immunitàries específiques i potencialment protectores. Per altra banda, l'IL-10 té un efecte antiinflamatori, i per tant la seva estimulació per part de GAPDH podria disminuir la resposta immunitària i facilitar la colonització per part del patogen (Madureira *i col*, 2007).

Existeixen altres moltes descripcions de GAPDH en la superfície de patògens, com en *Staphylococcus* i *L. monocytogenes*, però més recentment també s'ha identificat en el medi extracel·lular de probiòtics grampositius dels gèneres *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Un tret comú de totes elles és la seva capacitat d'unió al plasminogen humà (Modun i Williams, 1999; Schaumburg *i col*, 2004; Antikainen *i*

col, 2007). En el cas del *Lactobacillus*, també s'ha descrit la interacció de la GAPDH amb mucina de colon humà a través dels antígens de grup sanguini ABO per facilitar l'adhesió a les cèl·lules epitelials de la mucosa (Kinoshita *i col*, 2008).

En fongs patògens, com *Candida albicans*, la GAPDH s'associa a la paret cel·lular i pot interaccionar amb fibronectina i laminina (Gozalbo *i col*, 2006). En *Paracoccidioides brasiliensis*, a més de la unió a fibronectina i laminina, s'ha descrit que la GAPDH de superfície pot unir-se també a col·lagen de tipus I (Barbosa *i col*, 2006). La GAPDH de *Saccharomyces cerevisiae* (Ferreira-da-Silva *i col*, 2006) i *Kluyveromyces marxianus* (Delgado *i col*, 2001) també és present en la paret cel·lular. Aquestes dades suggereixen un paper de la GAPDH en la unió i la internalització del fong a l'hoste, participant en l'establiment de la malaltia.

La localització de proteïnes multifuncionals en la superfície de bacteris gramnegatius són més escasses. En EPEC, els autors Kenny i Finlay (1995) van demostrar que, com a pas important en la intercomunicació bacteri-hoste, la secreció de cinc proteïnes és crítica per iniciar la transducció de senyals en cèl·lules epitelials. La seqüència N-terminal d'una d'aquestes proteïnes coincideix, excepte en dos *mismatch*, amb la seqüència de GAPDH. Cal destacar que en un estudi posterior de les proteïnes secretades per EPEC i EHEC s'han identificat diversos enzims de la glicòlisi, entre ells la GAPDH, però els autors van atribuir aquest resultat a contaminació citosòlica i no a un procés de secreció (Li *i col*, 2004).

El nostre grup ha estat pioner en la descripció de GAPDH com a proteïna extracel·lular en les soques EPEC i EHEC. En estudis previs a aquest treball, es va detectar la secreció de GAPDH per part d'aquests patògens crescuts en medi de cultiu eucariota, però no en medi bacteriològic mínim (Egea, 2006). En aquest treball, s'ha avançat en la caracterització de la secreció de la proteïna en aquestes i altres soques no patògenes, i s'han seguit diverses aproximacions per descriure interaccions de la GAPDH extracel·lular amb l'hoste (Egea *i col*, 2007).

1.2.1.3. GAPDH com a proteïna diana de modificacions postraduccionals

La GAPDH és un enzim glicolític que catalitza la conversió de gliceraldehid-3-fosfat a 1,3-bifosfoglicerat en presència de NAD^+ i HPO_4^{2-} , però que pot dur a terme altres funcions tant en mamífers com en procariotes, i per això és considerada una proteïna multifuncional o *moonlighting*.

Vàries evidències demostren que la GAPDH de mamífers presenta una gran diversitat de funcions no relacionades amb la seva funció glicolítica. Entre aquestes funcions s'ha descrit que està implicada en la fusió de membranes i assemblatge de microtúbuls, que posseeix activitat fosfotransferasa/quinasa, exporta RNA nuclear i participa en la replicació i reparació de DNA. Altres investigacions han suggerit una implicació de la GAPDH en l'apoptosi, manteniment dels telòmers i control transcripcional. Es relaciona també amb malalties neurodegeneratives associades amb l'envelliment, càncer de pròstata, patogènesi viral i síndrome metabòlic. La GAPDH té capacitat d'autofosforilar-se i de fosforilar també altres proteïnes, mecanisme clàssic de transducció de senyals a la cèl·lula de mamífer. S'ha postulat que les diferents funcions de la proteïna podrien venir determinades tant per la seva localització cel·lular com per les modificacions transcripcionals que pateix (Sirover, 2005).

La GAPDH és diana de diverses modificacions postraduccionals, com glutatilonilació, S-nitrosilació, unió d'àcids grassos nitrogenats, fosforilació i ADP-

ribosilació. Aquestes múltiples modificacions porten a la formació de diverses formes de la proteïna que es diferencien en el seu pI i per tant poden ser resoltes i identificades en estudis de proteòmica bidimensional. La majoria d'aquestes modificacions s'associen amb respostes a estrès o adaptació a noves situacions, i podrien tenir conseqüències fisiològiques importants. Així per exemple, s'ha descrit que la GAPDH pot ser diana de glutatilonilació en la isquèmia cardíaca (Eaton *i col*, 2002). En llevats, l'estrès oxidatiu provoca la modificació de la GAPDH per grups carbonil que porta a la pèrdua d'activitat de l'enzim (Reverter-Branchat *i col*, 2004).

Cal destacar que la GAPDH és la única diana intracel·lular de l'òxid nítric (NO) en cèl·lules de mamífer. L'NO exerceix una funció dual en la cèl·lula de mamífer. Una primera funció consisteix en actuar com a missatger en un gran nombre de processos com la inflamació o la resposta immune i actuant també com a neurotransmissor. En segon lloc, l'NO està directament implicat en la toxicitat cel·lular, que causa dany en el DNA. Aquesta toxicitat pot relacionar-se també amb la interacció d'aquest compost amb altres proteïnes mitjançant mecanismes postraduccionals. Diversos estudis han demostrat que l'NO pot modificar la GAPDH primer per una S-nitrosilació de la proteïna que inhibeix molt fortament l'activitat glicolítica a través d'un mecanisme reversible, i després per la inducció que l'NO exerceix sobre la unió covalent irreversible del NAD⁺ a la GAPDH (Brune i Lapetina, 1995).

Una altra de les modificacions postraduccionals descrites per la GAPDH és l'ADP-ribosilació. Aquesta és una modificació postraducciona covalent reversible catalitzada per ADP-ribosiltransferases. Aquests enzims transfereixen l'ADP-ribosa provinent del NAD⁺ a un aminoàcid específic de la proteïna diana, amb el conseqüent alliberament de nicotinamida. S'han aïllat diverses ADP-ribosiltransferases de procariotes i eucariotes, amb especificitats per diferents aminoàcids (Koch-Nolte *i col*, 2008; Lin, 2007; Ueda 1985). En eucariotes, l'ADP-ribosilació ha estat implicada en diversos processos cel·lulars.

A més de ser diana d'ADP-ribosilació, s'ha observat que en procariotes grampositius la GAPDH és capaç a la vegada d'ADP-ribosilar altres substrats i/o automodificar-se. En aquest context, la GAPDH d'*L. monocytogenes* provoca l'ADP-ribosilació específica de Rab-5a en els fagosomes en la cèl·lula hoste, bloquejant d'aquesta manera l'activitat d'intercanvi GDP/GTP, portant a la inactivació de Rab-5a i a interferint en el trànsit intracel·lular (Álvarez-Domínguez *i col*, 2008). La GAPDH d'*Streptococcus* també posseeix activitat ADP-ribosiltransferasa, i pot catalitzar la seva pròpia modificació, però encara no s'han identificat altres substrats per aquesta activitat (Pancholi i Fischetti, 1993). La GAPDH extracel·lular d'*E. histolytica* també és ADP-ribosilada, i aquest fet podria tenir un paper important en la supervivència d'aquest patògen humà o en la interacció amb molècules de l'hoste (Álvarez *i col*, 2007).

1.2.2. SISTEMES DE SECRECIÓ DE PROTEÏNES EN BACTERIS GRAMNEGATIUS

Con ja s'ha presentat, les proteïnes multifuncionals exposades a la superfície de microorganismes o secretades al medi extracel·lular són transportades per sistemes encara no identificats. En el cas d'*E. coli*, bacteri gramnegatiu, el fet que la seva envolta estigui formada per dues membranes dificulta encara més el procés de secreció de proteïnes. La membrana externa és una estructura essencial que permet

als bacteris gramnegatius colonitzar ambients com el lumen intestinal, i proveeix una barrera protectora addicional contra les defenses antimicrobianes de l'hoste i els antibiòtics. Tanmateix, la membrana externa també és una barrera per a la secreció de proteïnes, i el transport a través d'ella comporta una despesa d'energia. Així doncs, els bacteris gramnegatius han desenvolupat un ampli ventall de mecanismes per a la secreció a través de l'envolta cel·lular.

La varietat de mecanismes de secreció i el constant descobriment de noves proteïnes implicades en aquests mecanismes ha comportat una modificació contínua de la classificació dels sistemes de transport. En aquests estudi es presenta una descripció simplificada i actualitzada dels diferents mecanismes de secreció dels bacteris gramnegatius descrits fins al moment (Desvaux *i col*, 2009). Com ja s'ha indicat, la secreció a través de dues membranes comporta una sofisticació dels sistemes de transport. Les proteïnes secretades poden arribar a l'exterior cel·lular en una sola etapa a través d'un complex proteic que travessi en un sol pas les dues membranes (sistemes *one-step*), o bé ho poden fer en dues etapes (sistemes *two-step*). En aquest últim cas, existeixen dos sistemes d'export a la membrana interna (Sec i Tat) i múltiples complexos encarregats de la translocació a través de la membrana externa. La classificació alfanumèrica recomanada pels sistemes de secreció dels bacteris gramnegatius es refereix als sistemes que travessen la membrana externa, mentre que els que travessen exclusivament la membrana interna mantenen la nomenclatura comú amb els bacteris grampositius. A la taula 1.1 i a la figura 1.4 es presenta un resum d'aquesta classificació.

Taula 1.1 Classificació dels sistemes de secreció de proteïnes en bacteris gramnegatius.

Sistemes <i>two-step</i>					
Membrana interna	Membrana externa		Descripció	Exemples de substrats transportats	
Sec	T2SS	T2aSS	Secretó clàssic	PulA (<i>K. oxytoca</i>)	
		T2bSS	Pili tipus 4	Bfp (EPEC); R64 Pil (<i>E. coli</i>)	
		T2cSS	Tad	Pili Flp (<i>A. actinomycetemcomitans</i>)	
	T5SS	T5aSS	Autotransportadors tipus 1		Proteasa d'IgA1 (<i>N. gonorrhoeae</i>)
		T5bSS	Sistemes <i>two-partner</i>		FHA (<i>B. pertussis</i>)
		T5cSS	Autotransportadors trimèrics		YadA (<i>Yersinia pestis</i>)
		T7SS	Chaperone usher (fimbria)		Pili P i pili tipus 1 (<i>E. coli</i> uropatògena)
	T8SS	Extracel·lular nucleation-precipitation (curli)		CsgA (<i>E. coli</i>)	
Tat	T2SS	T2aSS	Secretó clàssic	PnlH (<i>Dickeya dadantii</i>)	
Sistemes <i>one-step</i>					
T1SS			Transportadors tipus ABC	HlyA (EHEC)	
T3SS	T3aSS	Injectisoma		Tir (EHEC i EPEC)	
	T3bSS	Export de proteïnes del flagel		Flagelina (<i>E. coli</i>)	
T4SS	T4aSS	Homòlegs de VirB		Pilus T (<i>A. tumefaciens</i>)	
	T4bSS	Homòlegs de Tra		TraA pilus F (<i>E. coli</i>)	
T6SS				Hcp i Vrg (<i>Vibrio cholerae</i>) AaiC (<i>E. coli</i> enteroagregativa)	

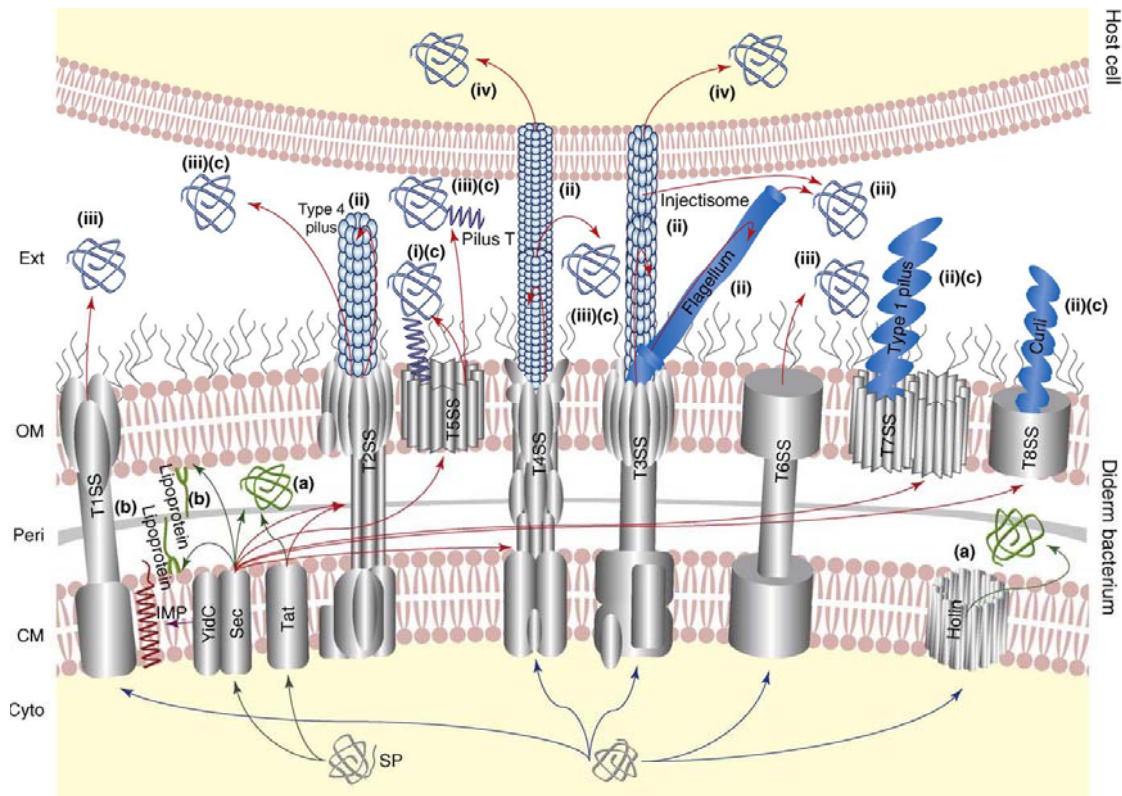


Figura 1.4. Representació esquemàtica de la localització subcel·lular de les proteïnes secretades en bacteris gramnegatius en relació amb el seu sistema de translocació. En els bacteris gramnegatius, les proteïnes secretades poden (i) localitzar-se a la superfície cel·lular ancorades a la membrana externa; (ii) formar part d'apèndix cel·lulars com el flagel (T3bSS) o estructures tipus pili (pilus tipus 4 via T2bSS, injectisoma via T3aSS, pilus T via T4SS, pilus tipus 1 via T7SS, o curli via T8SS); (iii) ser alliberats extracel·lularment via T1SS-T6SS; o (iv) ser injectades directament en la cèl·lula hoste, via T3aSS o T4SS. Les proteïnes exportades al periplasma poden (a) romandre en el periplasma; (b) romandre ancorades a la membrana citoplasmàtica o a la membrana externa per la seva cara perioplasmàtica; (c) ser secretades a través d'algun dels sistemes de secreció. Les fletxes negres indiquen rutes de proteïnes dirigides a la membrana citoplasmàtica amb un pèptid senyal N-terminal, mentre que les fletxes blaves indiquen rutes usades per les proteïnes sense aquest senyal. Les fletxes vermelles estan relacionades amb les proteïnes secretades, les fletxes violetes corresponen a la integració de proteïnes a la membrana i les fletxes verdes es relacionen amb les proteïnes exportades al periplasma. Les proteïnes secretades són blaves, les exportades al periplasma són verdes. Cyto: citoplasma; CM: membrana citoplasmàtica; Peri: periplasma; OM: membrana externa; Ext: espai extracel·lular. Font: Desvaux *i col* (2009).

1.2.2.1. Sistemes de secreció en dues etapes (*two-step*)

Translocació a través de la membrana interna

En els procarïotes, s'utilitzen dues rutes principals per translocar proteïnes a través de la membrana citoplasmàtica. La via de Sec és la ruta principal per l'export de proteïnes en la majoria de bacteris. Més recentment s'ha descrit una segona via de transport anomenada Tat (*twin-arginine translocation*) en referència a la seqüència consens del seu pèptid senyal (Palmer *i col*, 2005).

Secreció dependent de Sec:

El transport de proteïnes no plegades al periplasma s'aconsegueix amb un translocó amb diverses subunitats. Aquest consisteix en dos complexos heterotrimèrics, SecYEG i SecDFYajC, que es troben inserits a la membrana interna, i un component accessori, SecA. Les proteïnes destinades a la via Sec es tradueixen com a preproteïnes i contenen un pèptid senyal N-terminal. La hidròlisi de l'ATP catalitzada per SecA, junt amb la força motriu protònica dirigeix l'export de la preproteïna al periplasma. Després, el pèptid senyal és digerit per peptidases periplasmàtiques específiques i la proteïna madura és alliberada al periplasma. Si hi ha senyals addicionals en la proteïna, aquesta serà reconeguda per alguns dels sistemes de transport a la membrana externa i serà exportada a l'exterior cel·lular. Els sistemes de transport de la membrana externa acoblats a Sec són el T2SS, T5SS, T7SS i T8SS (Gerlach i Hensel, 2007; Kostakioti *i col*, 2005).

Secreció dependent de Tat:

Generalment, els substrats de Tat estan destinats al periplasma, però també poden ser transportats a través de la membrana externa pel T2aSS.

La maquinària Tat empra únicament el gradient electroquímico de protons transmembrana per portar a terme el transport de proteïnes plegades i sovint oligomeritzades a través de la membrana citoplasmàtica. Els substrats de Tat tenen una seqüència senyal a l'extrem N-terminal definida com SRRxFLK. Les dues arginines consecutives són gairebé invariants, però en algunes circumstàncies es tolera la substitució d'una d'elles o de totes dues per lisina (Palmer *i col*, 2005). A més, s'ha descrit algun cas en que el pèptid senyal no conté una diana per la peptidasa, llavors no és digerit i pot servir com a punt d'ancoratge a la membrana de la proteïna translocada (Coulthurst i Palmer, 2008).

En *E. coli*, els gens *tatA*, *B*, *C* i *E* codifiquen components de membrana de la maquinària de translocació Tat. Els gens *tatABC* estan organitzats en un operó que també conté un quart gen, *tatD*, que aparentment no té cap funció en el transport de proteïnes via Tat. *tatE* és una duplicació críptica de *tatA*, i les proteïnes codificades per aquests dos gens són funcionalment intercanviables. TatB és essencial per la funcionalitat de la via Tat. TatA s'associa amb TatBC quan la proteïna substrat i el gradient electroquímico de membrana es troben presents. Aquesta associació és transitòria, i es perd una vegada el substrat ha estat translocat. En *E. coli*, 18 dels 28 substrats coneguts de Tat s'uneixen a cofactors redox i tenen papers importants en la flexibilitat respiratòria de l'organisme. És crucial que la cèl·lula assegni la inserció completa del cofactor abans d'exportar la proteïna. A més, molts d'aquests substrats existeixen com heterodímers on el pèptid senyal específic per la via Tat només es troba en una de les subunitats. La segona subunitat no posseeix un pèptid senyal, però és exportada al periplasma perquè forma un complex amb la subunitat que sí el porta. Per tant, almenys per alguns substrats de Tat, és evident que els pèptids senyal i les proteïnes *xaperones* actuen en tàndem per assegurar l'assemblatge coordinat i el transport de les proteïnes substrat (Palmer *i col*, 2005).

Translocació a través de la membrana externa

T2SS:

El sistema T2SS és el responsable del transport extracel·lular d'un ampli ventall d'enzims hidrolítics i toxines. La producció del pilus de tipus 4, responsable de l'adhesió i motilitat de diversos bacteris, també té lloc a través del T2SS (T2bSS).

Els substrats del T2aSS (també anomenat secretó clàssic) travessen la membrana interna via la translocasa Sec i es pleguen en el periplasma amb l'ajuda dels enzims allà presents, o bé la travessen ja plegats a través del complex Tat. El transport a través de la membrana externa implica de 12 a 15 proteïnes, però només una d'elles, la proteïna D, és una proteïna integral de membrana externa que forma el canal per la translocació de proteïnes (secretina). La resta de proteïnes que formen l'aparell secretor es troben associades a la membrana interna i al periplasma (pseudopilines), amb l'excepció de la lipoproteïna S, que quan hi és present, es localitza a la part interior de la membrana externa (Gerlach i Hensel, 2007; Kostakioti *i col*, 2005). L'exemple més estudiat de T2aSS és el sistema de secreció de pul·lulunasa de *Klebsiella oxytoca*. En *E. coli*, existeix un operó homòleg a aquest, l'operó *gsp*, que si bé és funcional, no s'expressa en condicions de laboratori (Francetic *i col*, 1996).

Pel que fa al T2bSS, és el sistema d'assemblatge del pilus de tipus 4. Aquests pili són filaments extremadament prims, llargs i flexibles que moltes vegades interactuen entre ells lateralment. Les subunitats de pilina són extremadament variables en la seva seqüència i llargada, però sempre presenten un motiu N-terminal consens. Són sintetitzades com a precursors (prepilines) amb un pèptid senyal hidrofòbic que és digerit per una peptidasa específica. El pilus de tipus 4 facilita l'adhesió, directa o indirectament, promovent interaccions entre els bacteris i la formació de biofilms en nombrosos patògens humans com EPEC (Bfp). En els bacteris gramnegatius, la maquinària de síntesi del pilus tipus 4 inclou una o més proteïnes, a més de la pilina principal, amb un motiu N-terminal que pot diferir lleugerament del consens, una peptidasa específica, una ATPasa que dóna energia a l'assemblatge del pilus, una proteïna integral de membrana interna i una proteïna integral de membrana externa (secretina) necessària per l'emergència del pilus a la superfície (Pelicic, 2008).

T5SS:

Els autotransportadors (T5aSS), típicament, són factors de virulència amb diversos papers en la patogènesi, com la intimina d'EPEC i EHEC. Són sintetitzats com precursors multidomini consistents en un senyal N-terminal dependent de Sec, un domini passatger i un domini transportador. Després del transport a través de la membrana interna i digestió del pèptid senyal, el domini transportador s'insereix a la membrana externa i dirigeix la secreció del domini passatger a l'exterior cel·lular. Aquest domini passatger pot mantenir-se associat a la superfície cel·lular o ser alliberat al medi (Gerlach i Hensel, 2007; Kostakioti *i col*, 2005).

En el cas dels sistemes *two-partner* (T5bSS) el domini passatger i el domini transportador es tradueixen com a dues proteïnes separades. Les proteïnes secretades a través d'aquest sistema, anomenades proteïnes TpsA, travessen la membrana interna amb l'ajuda d'un pèptid senyal dependent de Sec. El transport a través de la membrana externa implica una proteïna integral de la membrana externa

que forma un canal, TpsB. Durant el transport a través d'aquesta membrana TpsA adopta la seva conformació nativa (Gerlach i Hensel, 2007; Kostakioti *i col*, 2005).

T7SS (*Chaperone usher*):

Aquesta via està associada a l'assemblatge d'estructures de superfície adhesives dels bacteris gramnegatius. El sistema millor caracteritzat d'aquest tipus és el pilus de tipus 1 de soques d'*E. coli* uropatogèniques. Totes les subunitats necessàries són sintetitzades en forma de preproteïnes i translocades al periplasma de manera dependent de Sec. Seguidament al transport a través de la membrana interna, les subunitats han d'interaccionar amb una *xaperona* periplasmàtica que evita les interaccions prematures entre les subunitats del pilus. Els complexos *xaperona*-subunitat es dirigeixen llavors cap a la membrana externa a través d'una proteïna anomenada *usher*, que serveix com a plataforma per l'assemblatge de les fibres i la secreció a la superfície cel·lular. En aquesta plataforma, les interaccions *xaperona*-subunitat són intercanviades per interaccions subunitat-subunitat (Gerlach i Hensel, 2007; Kostakioti *i col*, 2005).

T8SS: (extracellular nucleation precipitation)

Aquest sistema de transport és el responsable de l'assemblatge del curli (adhesina de tipus fimbria), comú en les soques d'*E. coli* i *Salmonella* spp. El curli és responsable d'interaccions específiques amb hostes eucariotes i la formació de biofilms (Gerlach i Hensel, 2007; Kostakioti *i col*, 2005).

1.2.2.2. Sistemes de secreció en una etapa (*one-step*)

T1SS:

Els sistemes de secreció de tipus 1 són complexos heterotrimèrics que estan formats per un exportador de tipus *ATP-binding cassette* (ABC) a la membrana interna, una proteïna de fusió de membrana (MFP) i una proteïna formadora de porus a la membrana externa (OMP). El T1SS permet la secreció d'un ampli ventall de substrats (proteïcs i no proteïcs) del citoplasma a l'espai extracel·lular en un sol pas, sense un intermediari periplasmàtic. La majoria de les proteïnes secretades per aquest sistema presenten un senyal C-terminal ric en glicines (GGXGDXXX) que no és eliminat en el procés de secreció, però aquest motiu no sempre hi és present. L'exemple més característic de proteïna secretada pel sistema T1SS és l' α -hemolisina (HlyA), secretada per soques d'*E. coli* uropatogèniques. Aquest sistema utilitza com a OMP la proteïna TolC, que també és emprada molt comunament per altres sistemes T1SS (Gerlach i Hensel, 2007; Kostakioti *i col*, 2005).

T4SS:

El T4SS es caracteritza per la capacitat de translocar proteïnes o complexos de proteïnes i DNA de cadena senzilla, de manera dependent del contacte amb una altra cèl·lula o independentment d'aquest. Basat en la similitud de seqüències, es creu que el T4SS ha evolucionat a partir de la maquinària de conjugació dels bacteris. El T4SS és generalment independent de Sec, amb l'excepció del transport de la toxina PT de *Bordetella pertussis*. L'exemple més característic de T4SS és el sistema de transferència T-DNA d'*Agrobacterium tumefaciens*. El T4SS està implicat en la transferència horitzontal de DNA, i per tant, en l'evolució i transmissió d'illes de patogenicitat i resistència a antibiòtics. També està implicat en el contacte de

patògens amb hostes específics i la introducció d'efectors en el citoplasma de la cèl·lula receptora (Gerlach i Hensel, 2007; Kostakioti *i col*, 2005).

T6SS

Aquest sistema de secreció és de descobriment recent, i la seva estructura encara no està ben definida. S'ha identificat la seva presència en una gran varietat de microorganismes, i no sembla estar restringit als bacteris patògens (Bingle *i col*, 2008). Les proteïnes secretades no presenten un pèptid senyal. Entre els sistemes de secreció pertanyents al T6SS, s'han identificat dos en *E. coli* enteroagregativa, codificats per gens que es localitzen en una de les seves illes de patogenicitat, i són responsables de la secreció de dues proteïnes que participen en la virulència d'aquest patògen (Dudley *i col*, 2006).

T3SS:

El sistema T3SS de tipus injectisoma és emprat per les soques patògenes per introduir proteïnes efectores en el citoplasma de la cèl·lula hoste. L'injectisoma d'EHEC i EPEC està compost per un cos basal ancorat a les membranes del bacteri i una agulla externa. Les proteïnes que formen el cos basal s'anomenen proteïnes Esc. Entre elles, EscN és l'ATPasa que proporciona l'energia necessària pel procés de secreció. La introducció d'efectors al citoplasma de la cèl·lula hoste requereix tres proteïnes addicionals, anomenades translocadors, que són elles mateixes exportades per l'injectisoma. Una característica general de tots els T3SS és que dos dels translocadors són hidrofòbics (EspB i EspD en EPEC) i el tercer és hidrofílic (EspA). S'ha demostrat que els dos translocadors hidrofòbics formen un porus a la membrana de la cèl·lula hoste per permetre la translocació dels efectors. Els tres translocadors es troben codificats en un gran operó, junt amb un gen que codifica una petita proteïna que actua com a xaperona pels translocadors hidrofòbics, i algunes vegades un gen que codifica una proteïna implicada en la regulació del T3SS (Mueller *i col*, 2008). Totes les proteïnes implicades en el T3SS es troben codificades en l'illa de patogenicitat (LEE en EPEC).

Així doncs, el filament en forma d'agulla d'EPEC està format pel translocador EspA i la proteïna EscF. EscF forma l'estructura interna principal de l'agulla i és un element necessari de l'aparell secretor. EspA forma una beina que sobresurt fins a 600nm a l'exterior del bacteri, allargant l'estructura iniciada per EscF i uneix el bacteri a la cèl·lula hoste. Els filaments d'EspA semblen funcionar com un conducte per la translocació de proteïnes efectores. A l'extrem d'aquesta estructura, els translocadors EspB i EspD ajuden a formar el porus a la membrana de l'hoste pel qual passen les molècules efectores com Tir, EspF, EspG, o EspH, que també es troben codificades a l'illa LEE. En absència de l'aparell translocador EspABD, les proteïnes efectores poden ser secretades però no translocades a la cèl·lula hoste. En canvi, encara que EscF és un component estructural de l'aparell translocador, també és un component funcional de l'aparell secretor, ja que la seva absència porta a la pèrdua de secreció a través de T3SS (O'Connell *i col*, 2004).

El sistema T3SS també és responsable de la biogènesi del flagel dels bacteris gramnegatius (T3bSS). L'estructura d'aquest sistema d'export del flagel és semblant a la de l'injectisoma, i les seves subunitats presenten una homologia que indica que estan evolutiva i funcionalment relacionats (Fig. 1.5). Encara que inicialment es creia que el sistema d'export del flagel tenia com a única funció la biogènesi d'aquest

òrgan, s'ha demostrat que també es requereix pel transport de proteïnes al medi extracel·lular (Young *et al.*, 1999).

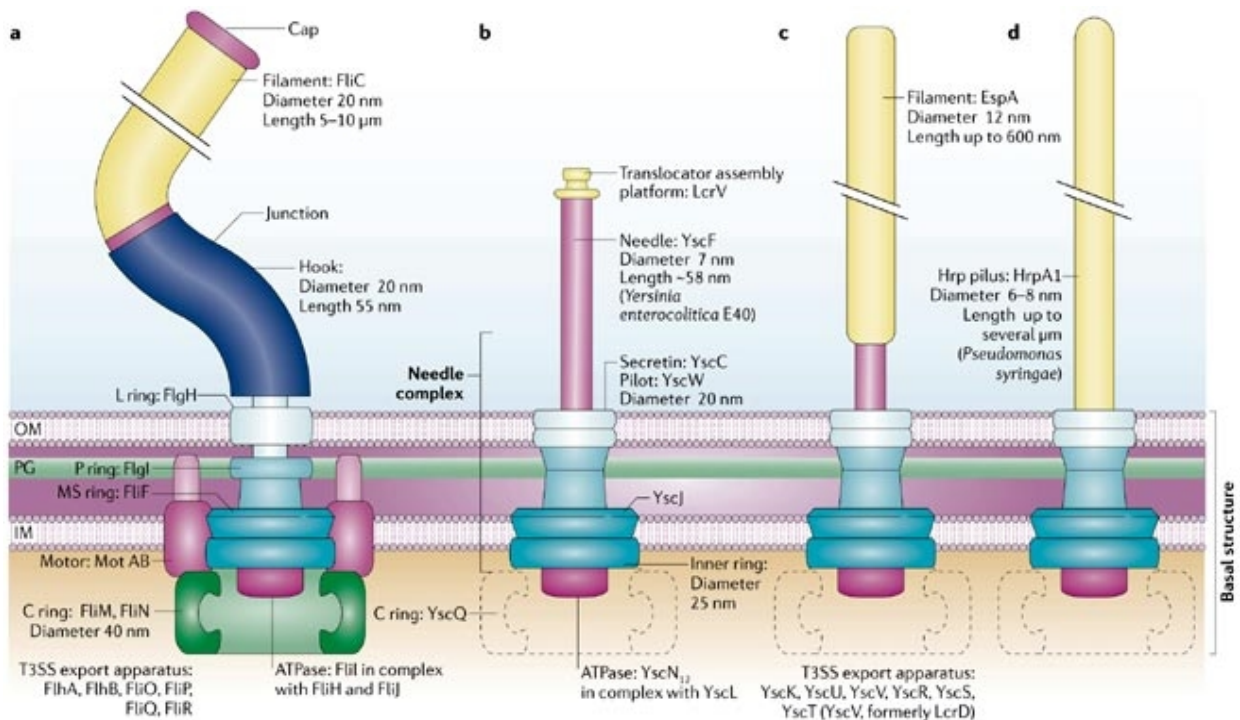


Figura 1.5. Estructura del flagel i de l'injectisoma. (a) Representació esquemàtica del flagel, **(b)** de l'injectisoma Ysc, **(c)** de l'injectisoma d'EPEC i **(d)** de l'injectisoma de patògens de plantes. IM: membrana interna; OM: membrana externa; PG: peptidoglicà. Font: Cornelis (2006).

1.2.2.3. Vesícules de membrana externa

Les vesícules de membrana externa (*outer membrane vesicles*, OMV) no es troben classificades entre els sistemes de transport de proteïnes, ja que el seu funcionament és totalment diferent al d'aquests. Les vesícules però, són un mecanisme d'interacció entre el bacteri i les altres cèl·lules procarïotes o eucariotes del medi i poden introduir el seu contingut en la cèl·lula receptora fusionant-se amb la seva membrana. Tant les espècies patògenes com les no patògenes de bacteris gramnegatius secreten vesícules, incloent *E. coli*.

Les OMV es descarreguen constantment a partir de la superfície de les cèl·lules durant el creixement bacterià en tots els bacteris gramnegatius. Es generen a partir de regions de la membrana externa del bacteri, atrapant part del periplasma subjacent, de manera que realment són com petites partícules de paret cel·lular gramnegativa. Posseeixen OMPs, lipopolisacàrid, fosfolípids i constituents periplasmàtics, tots situats com ho estarien habitualment en el bacteri, però a menor escala. Les OMV són doncs, estructures envoltades per una bicapa lipídica, esfèriques i tenen un diàmetre de 50-250nm. (Beveridge, 1999).

La vesiculació és un procés ubic pels bacteris gramnegatius creixent en una varietat d'ambients, en medi líquid, sòlid, o formant biofilms. La formació d'OMV i el seu alliberament és una despesa d'energia per la cèl·lula. Per això, és poc probable

que els bacteris produeixin membranes sense una funció. Les vesícules produïdes en el bacteris patògens contenen adhesines, toxines i compostos immunomoduladors, i poden intervenir directament en la unió del bacteri i la invasió, causar citotoxicitat i modular la resposta immune de l'hoste. En els bacteris no patògens, les OMV poden tenir un paper protector, ja que contribueixen a la supervivència bacteriana reduint els nivells de compostos tòxics com el toluè i ajudant a desfer-se de fags atacants (Kuehn i Kesty, 2006).

1.3. METABOLISME D' L-LACTAT EN *E. coli*

Com s'ha exposat anteriorment, diversos estudis genòmics i proteòmics han identificat gens i proteïnes diferencialment expressats en els bacteris adherits a la cèl·lula hoste respecte als bacteris lliures. Les seves funcions no sempre estan relacionades amb virulència, sinó també amb l'adaptació del bacteri a l'hoste. El gen *lldR* es va identificar entre els gens sobreexpressats en els bacteris EHEC adherits a membranes d'eritròcits (Dahan *i col*, 2004). Aquest gen codifica la proteïna reguladora de l'operó *lldPRD*, responsable del metabolisme d'L-lactat en *E. coli*.

S'han descrit tres enzims responsables del metabolisme de lactat en *E. coli*. Dos d'ells actuen en condicions aeròbiques, LldD i Dld, i són específics per a la transformació d'L-lactat i D-lactat, respectivament, a piruvat. Aquestes deshidrogenases són flavoproteïnes lligades a la membrana plasmàtica acoblades a la cadena respiratòria. El tercer enzim, LdhA, catalitza la conversió de piruvat a D-lactat en condicions anaeròbiques, i és una proteïna soluble dependent de NADH (Bunch *i col*, 1997).

L'enzim responsable del metabolisme d'L-lactat en condicions aeròbiques en *E. coli* és codificat pel gen *lldD* (anteriorment anomenat *lctD*), que es troba formant part del sistema genètic *lldPRD* (anteriorment *lctPRD*). Aquest operó es troba situat al minut 80.8 del cromosoma d'*E. coli*, i és induït per creixement en L-lactat. A més del gen *lldD*, se situen en aquest operó els gens *lldP* (*lctP*) i *lldR* (*lctR*). El primer codifica la permeasa que permet el transport d'L-lactat a l'interior de la cèl·lula, i el segon codifica una proteïna reguladora (Dong *i col*, 1993). Encara que la molècula d'L-lactat també és reconeguda per la glicolat permeasa, codificada pel gen *glcA*, la seva expressió no s'indueix per creixement en L-lactat (Núñez *i col*, 2002).

1.3.1. REGULACIÓ DE L'OPERÓ *lldPRD*

En un estudi sobre la identificació de llocs d'unió pel repressor anaeròbic Arca en la regió 5' del sistema genètic *lldPRD* dut a terme per Lynch i Lin (1996), es va proposar l'existència de dos promotors i dos inicis de transcripció en aquesta regió (triangles oberts en la figura 1.4). Un dels promotors, anomenat P1 en aquell estudi, seria responsable de la transcripció basal de l'operó observada en condicions de no inducció i l'altre promotor, P2, seria actiu només en presència d'L-lactat.

La proteïna reguladora d'aquest operó, LldR, pertany a la família de reguladors GntR, concretament a la subfamília FadR, i presenta una alta homologia amb un altre membre d'aquesta família, PdhR, no només en el domini N-terminal sinó també en el C-terminal (35% d'identitat i 62% de similitud). Per tant, aquestes proteïnes podrien

reconèixer seqüències similars i respondre de la mateixa manera a efectors anàlegs. PdhR regula negativament l'expressió de l'operó *pdhR-aceEF-ldp*, format pels gens que codifiquen les diferents subunitats del complex de la piruvat deshidrogenasa, responsable de la descarboxilació oxidativa del piruvat a acetil-coenzim A (Quail i col, 1994). En absència de piruvat, PdhR s'uneix a la seqüència palindròmica ⁺¹¹AATTGGTaaGCCAATT⁺²⁷, localitzada a 3' de l'inici de transcripció de *pdhR*. La repressió per PdhR és antagonitzada per piruvat, la seva molècula efectora (Quail i Guest, 1995). Recentment, *ndh*, gen que codifica la NADH deshidrogenasa II, i *cyoABCDE*, operó que codifica el citocrom de tipus *bo*, han estat identificats entre les dianes de regulació de PdhR. Aquestes dues proteïnes formen la via de transport d'electrons després de la piruvat deshidrogenasa. La piruvat deshidrogenasa genera NADH, mentre que Ndh i CyoABCDE transporten els electrons del NADH a l'oxigen. La comparació entre els llocs d'unió de PdhR presents en diferents promotors va portar a l'establiment d'una seqüència consens pel reconeixement de PdhR: ATTGGTNNNACCAAT (Ogasawara i col, 2007).

Donada l'homologia entre LldR i PdhR, Quail i Guest (1995) van dur a terme un anàlisi *in silico* del possibles llocs d'unió per aquestes proteïnes en la regió promotora de l'operó *lldPRD*. En aquest anàlisi es van identificar dos possibles llocs d'unió amb una seqüència similar a la de reconeixement de PdhR (O1 i O2 a la figura 1.6). Posteriorment, Lynch i Lin (1996) van proposar que LldR interaccionaria amb l'operador situat a 3' dels dos inicis de transcripció identificats per ells mateixos, mentre que PdhR podria interaccionar amb l'operador a 5' d'aquests inicis de transcripció. D'acord amb aquestes localitzacions, aquests autors van proposar que LldR actuaria com a repressor de l'operó *lldPRD* en absència d'L-lactat, mentre PdhR actuaria com a activador en absència de piruvat per estimular la captació i metabolisme d'L-lactat en aquestes condicions, tanmateix no es va aportar cap evidència experimental. Així doncs, a l'inici d'aquest treball es desconeixia quina era la participació de les proteïnes LldR i PdhR en la regulació de l'operó *lldPRD*, i les hipòtesis plantejades pels diferents autors no havien estat confirmades experimentalment.

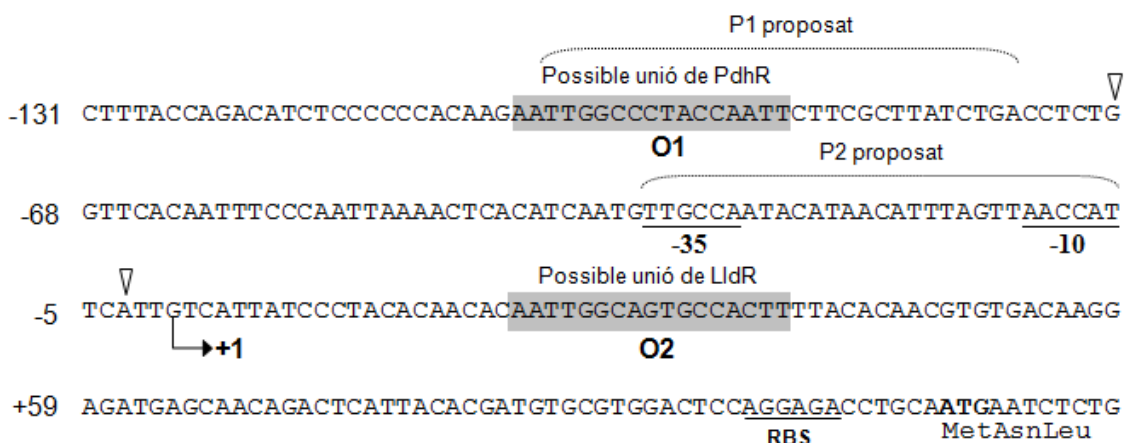


Figura 1.6. Organització dels elements reguladors de l'operó *lldPRD*. (A) La seqüència de la regió promotora d'*lldPRD* es troba numerada respecte a l'inici de transcripció identificat en aquest estudi, indicat com a +1 en la imatge (RESULTATS I DISCUSSIÓ 4.1.3). Les seqüències promotores -10 i -35 i el lloc d'unió al ribosoma (RBS) es troben subratllats. També s'indica el codó d'inici de la traducció (ATG), els promotors P1 i P2 proposats prèviament per Lynch i Lin (1996) i els seus corresponents inicis de transcripció (triangles oberts). P1 correspondria al promotor actiu en condicions basals, mentre que P2 seria induït en presència d'L-lactat. O1 i O2 corresponen als llocs d'unió a PdhR i LldR, respectivament, predits també *in silico* per Lynch i Lin (1996).

1.3.2. FAMÍLIA DE PROTEÏNES REGULADORES GntR

La família de proteïnes reguladores GntR, anomenada així pel repressor de l'operó del gluconat GntR de *Bacillus subtilis*, inclou al voltant de 270 membres que es troben distribuïts entre grups de bacteris molt diversos i regulen molts processos biològics (Haydon i Guest, 1991; Rigali *i col*, 2002). Les proteïnes de la família GntR presenten una alta homologia de seqüència en una regió de 69 residus a l'extrem N-terminal, que presenta una estructura HTH (*helix-turn-helix*) i per tant determina el domini d'unió al DNA. En contrast, s'ha observat que l'extrem C-terminal, que conforma els dominis d'unió d'efectors i oligomerització, és molt més heterogeni. Segons anàlisis estructurals, filogenètics i funcionals, s'han descrit quatre subfamílies. LldR pertany a la subfamília FadR, que agrupa més del 40% de tots els reguladors de tipus GntR (Rigali *i col*, 2002). La majoria de proteïnes de tipus FadR estan implicades en la regulació de substrats oxidats, com el piruvat (PdhR), glicolat (GlcC) i L-lactat (LldR).

Donada l'alta similitud entre els membres de la subfamília FadR i les característiques de les seves seqüències de reconeixement, s'ha proposat un model d'unió per aquest grup (Rigali *i col*, 2002). Els membres de la família FadR són dímers en solució (Miwa i Fujita, 1988; Raman *i col*, 1997) i s'uneixen en forma de dímer a operadors palindròmics específics, de manera que cada monòmer reconeix una meitat del palíndrom (Rigali *i col*, 2002; van Aalten *i col*, 2000). Tanmateix, a altes concentracions, la proteïna GntR de *B. subtilis* s'ha trobat en forma polimeritzada (Miwa i Fujita, 1988), el que indica la capacitat de les proteïnes d'aquest tipus d'oligomeritzar. En *E. coli*, GntR s'uneix a dos operadors per regular negativament la transcripció del gen *gntT*. S'ha proposat que la repressió total d'aquest gen s'aconsegueix mitjançant la formació d'un bucle de DNA gràcies a la interacció entre dues molècules de GntR unides a dues seqüències operadores en el promotor *gntT* (Peekhaus i Conway, 1998).

Les estructures del DNA com els bucles tenen una gran importància en els processos de regulació transcripcional. Els bucles es formen quan dues proteïnes iguals o diferents s'uneixen a llocs específics del DNA separats entre sí i interaccionen entre elles, o quan una sola proteïna s'uneix a dos llocs distanciats entre ells. Per tal que aquesta interacció es produeixi, són necessaris dos elements, una orientació adequada de les regions operadores on s'uneixen les proteïnes reguladores, i proteïnes que dobleguin el DNA. Els factors transcripcionals que poden doblegar el DNA, anomenats de forma general *histone-like proteins* per la seva semblança amb les histones eucariotes, també participen en l'empaquetament del cromosoma bacterià. Entre elles es troben les proteïnes IHF, FIS, HU i H-NS. Totes elles es caracteritzen per ser petites, bàsiques, i relativament abundants, i encara que són bastant similars, existeixen diferències entre elles. Per exemple, mentre que IHF i FIS s'uneixen a una seqüència de DNA específica, HU i H-NS es poden unir al DNA de forma inespecífica en regions intrínsecament corbades (Semsey *i col*, 2005).

OBJECTIUS

L'objectiu principal d'aquest treball ha estat aprofundir en el coneixement de determinats mecanismes pels quals bacteri i epitelí intestinal estableixen una comunicació bidireccional, tant si el balanç final d'aquesta relació és negatiu, com seria en el cas de soques patògenes, o positiu en el cas de membres de la microbiota intestinal.

Concretament, els objectius plantejats han estat:

- (1) Estudiar la regulació de l'operó *lldPRD* implicat en el metabolisme de l'L-lactat en *E. coli* com a mecanisme d'adaptació metabòlica durant l'adhesió a enteròcits.
 - Estudiar l'expressió del gen *lldR* en bacteris adherits a cèl·lules Caco-2.
 - Caracteritzar la funció d'LldR en la regulació de l'operó *lldPRD*.
- (2) Aprofundir en l'estudi de la GAPDH extracel·lular com a proteïna multifuncional implicada en la interacció d'*E. coli* amb l'epitelí intestinal.
 - Caracteritzar la secreció de GAPDH.
 - ▶ Identificar els factors presents en el medi de cultiu que afecten a la secreció de GAPDH.
 - ▶ Determinar si la secreció de GAPDH és una característica exclusiva de les soques d'*E. coli* patògenes.
 - ▶ Identificar el sistema de secreció pel qual la GAPDH és transportada a la superfície i alliberada al medi.
 - Caracteritzar la interacció de la GAPDH extracel·lular amb components de l'hoste:
 - ▶ Examinar la interacció de GAPDH amb components de la matriu extracel·lular de l'hoste.
 - ▶ Determinar la capacitat de la GAPDH de ser internalitzada en la cèl·lula hoste.
 - ▶ Identificar proteïnes de l'enteròcit que interaccionen amb GAPDH.
 - Caracteritzar la GAPDH com a diana de la modificació postraduccional dependent de NAD⁺ i la seva possible implicació en la interacció amb l'epitelí intestinal.

2

MATERIALS

2. MATERIALS

2.1. SOQUES BACTERIANES

En aquest treball s'han utilitzat soques d'*Escherichia coli* enteropatògenes així com també soques no patògenes de laboratori o aïllats naturals. En la Taula 2.1 es detallen les característiques més importants d'aquestes soques i la referència de cadascuna d'elles.

TAULA 2.1. Soques d'*E. coli* utilitzades en aquest treball. Per cada soca s'indica el seu nom, descripció del genotip i/o fenotip i la seva referència.

SOQUES DE LABORATORI		
SOCA	DESCRIPCIÓ	REFERÈNCIA
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B, F ⁻ <i>ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> λ(DE3)	Amersham Pharmacia
BSN27	<i>trp::Tn10Δhns</i>	Johansson <i>i col</i> (1998)
CAG12095	<i>zab3051::Tn10</i>	Nichols <i>i col</i> (1998)
DY330	W3110 <i>lacU169 gal490 cI857 (cro-bioA)</i>	Yu <i>i col</i> (2000)
ECL1	<i>HfrC phoA8 relA1 tonA22 T2' (λ)</i>	Lin (1976)
JA217	MC4100 <i>ace^f816</i>	Aquest treball
JA218	MC4100 <i>ΔlldR::cat</i>	Aquest treball
JA219	MC4100 <i>ΔlldR::cat ace^f816</i>	Aquest treball
JRG2547	<i>ace^f816 (lacIPOZYA)X74 rpsL</i>	Haydon <i>i col</i> (1993)
MC4100	F ⁻ <i>araD (argF-lac) rpsL(Str^r) relA flhD deoC ptsF rbs</i>	Casadaban (1976)
TE2680	F ⁻ λ ⁻ <i>IN(rrnD-rrnE)1 Δ(lac)X74 rpsL galk2 recD1903::Tn10d-Tet trpDC700::putPA1303::[Kn^s-Cm^r-lac]</i>	Elliot (1992)
W3CG	F ⁻ λ ⁻ <i>thyA36 deoC2 IN(rrnD-rrnE) (W3110) ΔgapA::tet supE</i>	Günter i Plückthun (1990)
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lac^f ΔM15 Tn10(Tc^r)]</i>	Stratagene
TOP10	F ⁻ <i>ΔmcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galk rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	Invitrogen
JA184	<i>HfrC phoA8 relA 1 tonA22 T2' (λ)Lyx⁺ himA::cat</i>	Ibáñez <i>i col</i> (2000)
JA185	<i>HfrC phoA8 relA 1 tonA22 T2' (λ)Lyx⁺ himD::cat</i>	Ibáñez <i>i col</i> (2000)

SOQUES D'ÀLLATS NATURALS

SOCA	DESCRIPCIÓ	REFERÈNCIA
EcoR26	aïllat natural d'infant humà (Massachusetts)	Ochman i Selander (1984)
Nissle 1917	aïllat natural humà probiòtic (Dobrudsha)	Ardeypharm

SOQUES PATÒGENES

SOCA	DESCRIPCIÓ	REFERÈNCIA
86-24h11	EHEC (serotip O157:H7) <i>Stx2</i> (Nal ^r , Kn ^r)	Cedida per MS Donnenberg
E2348/69	EPEC (serotip O127:H6)	Donnenberg <i>i col</i> (1990)
CVD452	E2348/69 Δ <i>escN</i>	Jarvis <i>i col</i> (1995)
CVD452/pCVD446	E2348/69 Δ <i>escN/pescN</i>	Jarvis <i>i col</i> (1995)
UMD864	E2348/69 Δ <i>espB</i>	Donnenberg <i>i col</i> (1993)

Al llarg d'aquest treball, sempre ens referirem a la soca 86-24h11 sota el nom genèric d'EHEC, i a la soca E2348/69 com a EPEC.

2.2. LÍNIES CEL·LULARS

- **Caco-2:** cèl·lules epitelials derivades d'adenocarcinoma de colon humà. *American Type Culture Collection*, ATCC HTB-37.
- **HeLa:** cèl·lules epitelials d'adenocarcinoma de cèrvix. *American Type Culture Collection*, ATCC CCL-2.

2.3. VECTORS

Per a la realització d'aquest treball s'han utilitzat diferents tipus de vectors, tant plasmídics com fàgics. Els vectors plasmídics s'han utilitzat per a l'obtenció de construccions recombinants destinades a l'estudi de fusions transcripcionals, purificació de proteïnes i assaig d'activitats enzimàtiques. Per altra banda, els bacteriòfags s'han utilitzat per a la transducció de material genètic entre soques bacterianes.

TAULA 2.2. Vectors utilitzats en aquest treball. Per a cada vector s'indica el seu nom, la descripció de les seves principals característiques i el seu origen o referència.

VECTOR	APLICACIÓ	DESCRIPCIÓ	REFERÈNCIA
PLASMIDIS			
pRS550	Fusions transcripcionals	Ap ^r Kn ^r <i>LacZYA</i>	Simons <i>i col.</i> (1987)
pCAT19	Mutagènesi	Ap ^r Tn9-CAT(Cm ^r)	Fuqua (1992)
pMALc2x	Expressió i purificació de proteïnes de fusió a MBP	Ap ^r <i>malE</i> α - <i>lacZ</i> <i>lacI</i> ^q	New England Biolabs
pGEX-3X	Expressió i purificació de proteïnes de fusió a GST	GST·Tag, Ap ^r <i>lacI</i> ^q	Amersham Pharmacia
pGEMT	Clonatge de fragments amb extrems 3' dA	Ap ^r , α - <i>lacZ</i>	Promega
pGEX-GapA	Expressió i purificació de GST-GAPDH	GST·Tag, Ap ^r <i>lacI</i> ^q <i>gapA</i>	Egea (2006)

FAGS

P1	Transducció	P1 <i>vir</i>	Miller (1992)
----	-------------	---------------	---------------

2.4. OLIGONUCLEÒTIDS

Els oligonucleòtids emprats en aquest treball com a encebadors en reaccions de PCR i seqüenciació de DNA van ser subministrats per Sigma-Aldrich. Com a norma general, els oligonucleòtids van ser dissenyats 100% homòlegs a la seqüència a la qual havien d'hibridar, excepte en alguns casos en què s'afegiren a l'extrem 5' seqüències que contenien dianes per a diferents endonucleases de restricció, o en el cas que fossin emprats per mutagènesi dirigida.

La seqüència de tots els oligonucleòtids utilitzats en aquest treball es troba detallada en l'ANNEX A.1.

2.5. REACTIUS I KITS COMERCIALS

Els reactius utilitzats en aquest treball van ser adquirits de la màxima puresa i qualitat requerida en cada cas. La conservació (temperatura, humitat, efecte de la llum) i manipulació (esterilitat, toxicitat, preparació extemporània) es van realitzar seguint les indicacions del fabricant.

Els diferents *kits* utilitzats han estat subministrats per diferents cases comercials, segons es detallarà oportunament i, llevat que s'indiqui el contrari, es van seguir els protocols inclosos en aquests.

2.5.1. REACTIUS EMPRATS EN ELS CULTIUS CEL·LULARS

Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (DMEM)Gibco ref. 41966-052

Ham's F-12Gibco ref. 21700-018

Foetal Bovine Serum (FBS)Gibco ref. 10106-169

Penicillin-Streptomycin 10.000UI/ml – 10.000µg/mlGibco ref. 15140-122

Tripsina EDTAGibco ref. 25300-054

HEPES *Buffer Solution* 1MGibco ref. 15630-056

MEM Non Essential Amino Acids 100XGibco ref. 11140-035

Bicarbonat Gibco ref. 25080- 060

Phosphate-Buffered Saline (PBS) 10XGibco ref. 70013-016

2.6. SUPORT INFORMÀTIC

2.6.1. PROGRAMES INFORMÀTICS

- **OMIGA v2.0:** Programa desenvolupat per Oxford Molecular Ltd. (GCG, Madison, WI. USA). Permet accedir a bases de dades per recuperar seqüències, conèixer els possibles marcs de lectura, elaborar mapes de restricció, alinear seqüències, etc. Es va emprar per analitzar tant seqüències de nucleòtids com d'aminoàcids (Rawitch, 2000).
- **CHROMAS LITE v2.01:** Aquest programa s'ha emprat per processar els resultats de les reaccions de seqüenciació. Es troba disponible al web http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html.
- **BLAST** (*Basic Local Alignment Search Tool*, Altschul *i col*, 1997): Aquest programa, disponible a través de la pàgina web del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), permet l'estudi comparatiu de les seqüències obtingudes amb les ja descrites a les bases de dades.
- **WEBCUTTER 2.0:** Aquest programa es va fer servir per localitzar les dianes de restricció a les seqüències nucleotídiques. Està disponible a través de la pàgina web <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/> (Webcutter 2.0, copyright 1997 Max Heiman).

2.6.2. BASES DE DADES

Les principals bases de dades emprades en aquest treball han estat les següents:

- **GENBANK:** És una base de dades d'àcids nucleics produïda i mantinguda pel NCBI en col·laboració amb altres organismes com l'EMBL (Benson *et al*, 1998). S'hi pot accedir a l'adreça següent: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- **SWISS-PROT:** Base dades de proteïnes que inclou informació de diferents fonts. S'hi pot accedir a l'adreça: <http://www.expasy.ch>.

3

MÉTODES

3. MÈTODES

A continuació es descriuen els mètodes emprats durant la realització d'aquest treball. Les tècniques més habituals en Biologia Molecular es descriuen breument amb la seva corresponent referència bibliogràfica. Per la seva novetat en el grup on s'ha realitzat la tesi doctoral, alguns mètodes es descriuen més detalladament.

3.1. MÈTODES MICROBIOLÒGICS

3.1.1. MEDIS DE CULTIU I CONDICIONS DE CREIXEMENT BACTERIÀ

Els creixements de les soques utilitzades en aquest treball es van realitzar en diferents medis de cultiu, tant els usats clàssicament per cultius bacterians, ja siguin complets o mínims, així com també en medis usats per cultiu de cèl·lules eucariotes, en diferents condicions d'aeració i temperatura segons s'anirà detallant oportunament.

De manera rutinària, els cultius bacterians es feien créixer en medi Luria-Bertani (LB) o medi mínim. Per a l'obtenció de medis sòlids s'addicionava als medis líquids agar bacteriològic a l'1.5% (p/v). Per les plaques d'agar tou, aquest s'addicionava al 0.75% (p/v).

El medi mínim estava compost per un medi mineral basal (SM, Boronat i Aguilar, 1979), suplementat amb diferents fonts de carboni a una concentració final de 60mM carboni, si no s'indica el contrari, o bé suplementat amb caseïna 0.2% (CAA). La soca mutant *gapA* es va fer créixer en medi mínim complementat amb malat i glicerol com a fonts de carboni (Günter i Plückthun, 1990). En experiments específics, també s'ha fet servir el medi mínim MT (Schurig-Briccio *i col*, 2008).

LB	Concentració	SM	Concentració
Triptona	1%	NaH ₂ PO ₄	34mM
Extracte de llevat	0.5%	K ₂ HPO ₄	64mM
NaCl	0.5%	(NH ₄) ₂ SO ₄	20mM
		FeSO ₄	0.001mM
		MgSO ₄	0.3mM
		CaCl ₂	0.01mM

MT	Concentració
NaCl	99mM
KCl	50mM
CaCl ₂	1mM
NH ₄ Cl	21mM
Na ₂ SO ₄	1mM
KH ₂ PO ₄	2mM
Tris	100mM
Fe Cl ₃	1.7µM
MgSO ₄	0.8mM

Segons l'experiment, les soques bacterianes també es feien créixer en medis utilitzats en cultiu de cèl·lules eucariotes tals com *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) o Ham's F-12 però en absència de sèrum i d'antibiòtics. Vegeu la composició a l'apartat MÈTODES 3.2.1.1.

Pel creixement de bacteris amb resistència a antibiòtics, aquests s'addicionaven al medi de cultiu a les següents concentracions finals: ampicil·lina 100µg/ml, tetraciclina 12.5µg/ml, kanamicina 25µg/ml, cloramfenicol 30µg/ml (o 15µg/ml en el cas dels mutants per inserció d'un *cassette* CAT). Pel creixement de soques amb fusions transcripcionals, s'addicionava triptòfan a una concentració 0.1mM. Per a la selecció de determinats clons recombinants, l'X-Gal s'afegia a una concentració final de 30µg/ml. En el cas d'afegir IPTG, la concentració s'indicarà en cada cas.

Els cultius líquids s'incubaven a la temperatura desitjada en agitació constant a 250rpm en un agitador orbital. Quan s'indica, els cultius s'incubaven a 37°C i atmosfera amb 5% de CO₂ sense agitació per tal de mimetitzar al màxim l'hàbitat natural dels bacteris *in vivo* a l'entorn intestinal. El creixement bacterià en els cultius líquids se seguia per lectura de la densitat òptica (D.O.) a 600 nm.

Per al manteniment a llarg termini les soques s'han guardat en forma de suspensions en glicerol al 20% a -80°C.

3.1.2. OBTENCIÓ I TRANSFORMACIÓ DE CÈL·LULES COMPETENTS

S'han fet servir diversos mètodes d'obtenció i transformació de cèl·lules competents segons les característiques de cada soca.

Per a l'obtenció de cèl·lules competents de la soca d'*E. coli* XL1-Blue de manera rutinària es va fer servir el mètode descrit per Ausubel *et al.* (1991), en el que s'usa una solució de CaCl₂ (CaCl₂ 60mM, glicerol 15%, Tris-HCl 10mM pH 7). Les cèl·lules preparades per aquest mètode poden ser emmagatzemades a -80°C. A l'hora de transformar-les, es descongelaven i eren sotmeses a un xoc tèrmic.

L'electroporació va ser el mètode emprat per a la transformació de la soca d'*E. coli* DY330. Les cèl·lules es van fer competents mitjançant una descàrrega elèctrica, curta i d'alt voltatge, simultàniament al procés de transformació. Les cèl·lules havien estat preparades i al·lquotades prèviament en una solució de glicerol al 10% i conservades a -80°C (Zabarovsky & Winberg, 1990). L'electroporador utilitzat en aquest treball va ser un *E. coli* *Pulser* (Bio-Rad), i la descàrrega elèctrica produïda era de 1.6 kV durant aproximadament 3.4 ms.

Per a l'obtenció de cèl·lules competents d'altres soques d'*E. coli* no patògenes s'ha fet servir el mètode de TFB (MES-K 10mM pH 6.2, KCl 100mM, MnCl₂ 10mM) i DMSO/DTT (acetat potàssic 10mM pH 7.5, DTT 1M, DMSO 90%) per permeabilitzar la membrana (Hanahan, 1985). Les cèl·lules tractades amb aquest protocol van ser transformades per xoc tèrmic.

3.1.3. TRANSDUCCIÓ GENERALITZADA AMB EL BACTERIÒFAG P1

Aquest procés permet la transferència de material genètic d'una soca a una altra. El mètode utilitzat en aquest treball ha estat el descrit per Miller (1972).

Els lisats s'obtingueren per creixement de la soca donadora juntament amb el fag P1 salvatge en presència de CaCl_2 5mM. Després de la lisi cel·lular, la progènie de fags resultant se separava de les restes cel·lulars mitjançant centrifugació. Aquest conjunt de fags constituïa el lisat P1 de la soca donadora. La titulació dels lisats obtinguts es va dur a terme mitjançant recompte de les calbes de lisi obtingudes en plaques d'LB- CaCl_2 en les que s'havia sembrat la infecció d'una soca receptora amb diferents dilucions del lisat a titular. El títol òptim d'un lisat és com a mínim de 10^9 pfu/ml.

Per dur a terme el procés de transducció se segueix un procés anàleg al desenvolupat per la titulació del lisat però impedit, en aquest cas, que es produeixi lisi bacteriana. La infecció s'atura per l'addició d'un agent quelant, citrat sòdic 20mM, que segresti el catió Ca^{2+} , i les cèl·lules se sembren en plaques selectives. Els lisògens obtinguts s'han de purificar tres vegades en presència de citrat sòdic 20mM.

3.1.4. OBTENCIÓ DE MUTANTS

La soca mutant JA217 (MC4100 *ace^f816*) es va construir de la següent manera. Per tal de facilitar la transferència de la mutació puntual *ace^f816* present a JRG2547 al fons genètic de la soca MC4100, en primer lloc es va introduir un marcador de resistència a antibiòtic en un locus proper a la mutació de JRG2745. En concret, la inserció Tn10 de la soca CAG12095 (*zab3051::Tn10*, Nichols *i col*, 1998) es va introduir a la soca JRG2547 (*ace^f816*) per transducció amb el bacteriòfag P1. Els transductants es van seleccionar en plaques de tetraciclina es va comprovar quin d'ells retenia la mutació *ace^f816* mitjançant PCR seguida d'una reacció de seqüenciació. El clon seleccionat es va utilitzar per transduir de nou el marcador Tn10 juntament amb la mutació *ace^f816* a la soca MC4100, que va ser confirmada per PCR seguida de la seqüenciació del gen *pdhR*.

Les soques JA218 i JA219 porten totes dues una mutació Δ *lldR::cat*, i van ser construïdes mitjançant recombinació homòloga dirigida seguint el procediment descrit per Yu *i col* (2000). El gen *lldR* va ser substituït completament per un *cassette* de resistència a cloramfenicol (*cat*), obtingut per amplificació per PCR a partir del plàsmid pCAT19. Als encebadors dissenyats per amplificar aquest fragment se'ls va afegir en els seus extrems 5' les seqüències homòlogues als extrems que flanquegen el gen *lldR*, i els fragments lineals resultants de l'amplificació es van introduir per electroporació en la soca DY330. Després de la recombinació homòloga, la mutació Δ *lldR::cat* es va introduir en la soca MC4100 o en la soca JA217 per transducció amb el bacteriòfag P1, donant lloc a les soques JA218 i JA219, respectivament.

3.2. CULTIU DE CÈL·LULES EUCARIOTES

3.2.1. CONDICIONS DE CULTIU DE LÍNIES TUMORALS

Per al manteniment rutinari de les línies cel·lulars, aquestes es feien créixer en plaques de 100 mm en medi DMEM o Ham's F-12 amb FBS (*Foetal Bovine Serum*) al 10% addicionat d'antibiòtics i aminoàcids no essencials. Totes les línies cel·lulars utilitzades en aquest treball s'incubaven a 37°C en atmosfera humidificada i 5% de CO_2 . Quan les cèl·lules

assolien una confluència d'aproximadament el 80%, es procedia a l'expansió del cultiu mitjançant el tractament amb tripsina.

Pel manteniment de les línies cel·lulars a llarg termini, les cèl·lules eren criopreservades en medi complet i DMSO 10%, i congelades gradualment en nitrogen líquid.

3.2.1.1. Composició dels medis

DMEM (ref.41966-052)	Concentració
FBS	10%
Aminoàcids no essencials	1x
Penicil·lina-estreptomicina (100x)	100 U/ml- 100 µg/ml
HEPES	25mM

Ham's F-12 (ref. 21700-018)	Concentració
Bicarbonat sòdic 7.5%	3.69 g/l
FBS	10%
Penicil·lina-estreptomicina (100x)	100 U/ml- 100 µg/ml
HEPES	25mM

Aquests medis de cultiu han estat utilitzats també en els experiments d'infecció de cèl·lules eucariotes amb enterobacteris o per al creixement de cultius bacterians. En aquests casos estaven formats pels mateixos components però en absència de sèrum i d'antibiòtics.

3.3. INFECCIÓ DE CÈL·LULES EUCARIOTES AMB ENTEROBACTERIS

3.3.1. INFECCIÓ DE CÈL·LULES Caco-2 EN CULTIU AMB ENTEROBACTERIS

Les soques EHEC o EPEC es mantenen en plaques d'LB a 4°C i es cultivaven en medi LB o/n en agitació a 37°C. Prèviament a la infecció de les cèl·lules epitelials, els cultius bacterians eren diluïts 1:50 en 10 ml d'LB i es feien créixer fins que assolien la fase de creixement exponencial ($D.O_{600nm} = 0.5-1$).

La infecció es realitzava sobre monocapes confluents de cèl·lules Caco-2. Dues hores abans de la infecció, les cèl·lules Caco-2 eren rentades 3 vegades amb PBS 1x i se'ls addicionava medi sense FBS i sense antibiòtics. La infecció es feia per addició d'un volum adient de cultiu bacterià per tal d'assolir una multiplicitat d'infecció (MOI) bacteri:Caco-2 de 100:1. El mateix volum de medi servia com a vehicle control.

Transcorregut el temps d'infecció (4h) s'aspirava el medi, es rentaven les cèl·lules tres vegades amb PBS 1x i es procedia a la obtenció dels bacteris adherits.

3.3.2. OBTENCIÓ DE BACTERIS ADHERITS A CÈL·LULES Caco-2

Després d'infectar les cèl·lules Caco-2 amb EHEC o EPEC, l'aïllament de bacteris adherits es va fer per tractament amb tripsina i posterior separació de les cèl·lules eucariotes per centrifugació segons el mètode descrit per Dietrich *i col* (2003).

Els bacteris del sobrenedant dels cultius, i per tant no adherits a cèl·lules Caco-2, eren també recuperats i tractats paral·lelament amb tripsina ja que aquests eren utilitzats com a control de bacteris planctònics.

3.3.3. INTERNALITZACIÓ DE GAPDH CONJUGADA A OR COL·LOÏDAL EN CÈL·LULES HeLa.

La internalització de GAPDH recombinant en cèl·lules HeLa es va dur a terme amb GAPDH conjugada a or col·loïdal. Per a la conjugació es va seguir el procediment descrit a MÈTODES 3.6.4. La incubació del conjugat es va realitzar en plaques de 100mm de cèl·lules HeLa en medi DMEM a diferents temps per tal de poder observar la dinàmica d'internalització de la proteïna. Com a control es va utilitzar un excés de 50 vegades de GAPDH no conjugada. Les mostres es van fixar i processar per a la seva observació al microscopi electrònic de transmissió.

En detall:

1. Obtenir plaques de cèl·lules HeLa de 100mm a una confluència del 70-80%.
2. Rentar les plaques amb medi DMEM sense sèrum prèviament a la realització de l'experiment.
3. Incubar les cèl·lules amb GAPDH recombinant conjugada a or col·loïdal (MÈTODES 3.6.4), normalment 7µg de proteïna conjugada per cada placa (5ml DMEM/placa), durant 1h a 4°C. Durant aquest temps, té lloc la unió de GAPDH a la membrana de la cèl·lula HeLa. Com a control, es va utilitzar una placa incubada amb proteïna conjugada en presència d'un excés de 50 vegades de GAPDH sense conjugat a or col·loïdal.
4. Passat el temps estipulat, eliminar el medi d'incubació (i per tant la proteïna no associada a la superfície de les cèl·lules).
5. Rentar una vegada amb medi DMEM fred.
6. Afegir medi DMEM sense sèrum i incubar les cèl·lules a 37°C. Aquesta incubació es va parar a diferents temps per tal de poder observar diferents moments del procés d'internalització de la proteïna. Una de les plaques es va parar a temps zero per observar la unió de la proteïna a la membrana abans de ser internalitzada. La placa incubada amb un excés de GAPDH sense conjugat es va mantenir el mateix temps que la placa incubada durant més temps.
7. En el moment estipulat per cada placa, retirar el medi i afegir 10ml de fixador (PHEM: Pipes 60mM, HEPES 25mM, EGTA 10mM, MgCl₂ 2mM, pH 6.9, addicionat amb paraformaldehid 4% i glutaraldehid 2%). Incubar 30min a 4°C en agitació suau.
8. Eliminar el fixador usat i afegir 10ml de fixador nou. Incubar 30min a 4°C en agitació suau.
9. Desenganxar les cèl·lules de la placa amb un *scraper* i passar-les a un tub de tipus Falcon®.
10. Centrifugar durant 5min a 1.000xg a 4°C. Mantenir el sediment sense resuspendre en fixador a 4°C.

11. Aquestes preparacions han de ser processades per crioultramicrotomia per a la seva observació al microscopi electrònic de transmissió. Aquests procés es va dur a terme en els Serveis Científico-tècnics de la Universitat de Barcelona (MÈTODES 3.6.1).

3.4. ANÀLISI I PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES

3.4.1. OBTENCIÓ D'EXTRACTES CEL·LULARS EUCARIOTES

Per a l'obtenció d'extractes cel·lulars totals (fracció citosòlica i de membrana), es van rascar les cèl·lules adherides a les plaques de cultiu amb un *scraper*, es van centrifugar i resuspendre en el tampó adient en cada cas. Les cèl·lules es van trencar per disruptió sònica i després es van centrifugar per eliminar les restes cel·lulars. La concentració de proteïna del sobrenedant es va determinar pel mètode Lowry (Lowry *i col*, 1951), utilitzant albúmina de sèrum boví (BSA) com a estàndard.

3.4.2. OBTENCIÓ DE LA FRACCIÓ DE MEMBRANA DE CÈL·LULES EUCARIOTES

Per obtenir la fracció de membrana de les cèl·lules Caco-2 es va partir de plaques de cultiu de 100mm. Les cèl·lules es van incubar en tampó hipotònic a 4°C i després es van fer diversos cicles de congelació i descongelació en nitrogen líquid. Així se'n va obtenir l'extracte cel·lular i la fracció de membrana es va aïllar per ultracentrifugació.

En detall:

1. Rascar les cèl·lules adherides a les plaques amb un *scraper* en tampó hipotònic (Na_3PO_4 5mM, MgCl_2 5mM, PMSF 2mM, *Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets*, Roche Diagnostics) i incubar durant 1h 30min a 4°C, agitant de tant en tant per tal d'homogeneïtzar la mostra.
2. Congelar i descongelar la suspensió en nitrogen líquid. Repetir cinc vegades.
3. Centrifugar 30min a 100.000xg a 4°C.
4. Ressuspendre el sediment (on ha quedat la fracció de membrana) en TBS (Tris-HCl 20mM, NaCl 150mM, pH 7.6) amb Zwittergent 3-12 al 0.1% i inhibidors de proteases (*Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets*, Roche Diagnostics). Incubar 2h a 4°C agitant de tant en tant per tal de solubilitzar les proteïnes de membrana.
5. Centrifugar durant 30min a 4.000xg a 4°C i recollir el sobrenedant, on han quedat les proteïnes de membrana.

3.4.3. OBTENCIÓ D'EXTRACTES CEL·LULARS BACTERIANS

El medi intracel·lular dels cultius bacterians es va obtenir per disruptió sònica segons el procediment descrit per Boronat & Aguilar (1979). La concentració de proteïnes es va determinar pel mètode Lowry (Lowry *i col*, 1951), utilitzant BSA com a estàndard.

3.4.4. OBTENCIÓ DE LES PROTEÏNES BACTERIANES SECRETADES AL MEDI DE CULTIU

Per a l'estudi de les proteïnes secretades en el medi de cultiu, es van obtenir i concentrar les proteïnes alliberades al medi per les diferents soques a diferents temps.

Es van fer créixer cultius bacterians en LB o/n. Aquests cultius van ser diluïts 1:50 en el medi adequat a cada experiment i incubats sense agitació a 37°C i en atmosfera al 5% de CO₂. Al temps determinat per cada experiment, els bacteris es recollien per centrifugació (5.000xg, 10min, 4°C) i el sobrenedant obtingut es filtrava a través de filtres de porus de 0.22µm (Millipore) per eliminar qualsevol bacteri contaminant. A partir del sobrenedant lliure de cèl·lules, les proteïnes es precipitaven amb TCA o sulfat amònic (MÈTODES 3.4.7), o se n'obtenia la fracció de vesícules segons la finalitat de cada experiment (MÈTODES 3.4.6).

3.4.5. FRACCIONAMENT SUBCEL·LULAR DE BACTERIS

Les fraccions de periplasma i membrana de bacteris gramnegatius es van obtenir d'acord amb el protocol descrit a Wai *i col* (2003). Les cèl·lules en cultiu es recollien per centrifugació, i la fracció periplasmàtica s'obtenia per *shock* osmòtic. Posteriorment les cèl·lules eren sonicades per alliberar el contingut citoplasmàtic i la fracció de membranes s'obtenia per ultracentrifugació. Les fraccions així obtingudes eren analitzades per electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS.

En detall:

1. Preparar cultius de les soques desitjades en les condicions determinades per cada experiment.
2. Recollir els bacteris per centrifugació a 4.500xg, 10min, 4°C.
3. Ressuspendre les cèl·lules en Tris-HCl 10mM pH 7.4 i tornar a centrifugar a 4.500xg, 10min, 4°C.
4. Ressuspendre les cèl·lules en una solució de sucrosa al 20% (p/v), Tris-HCl 20mM pH 8 i Na-EDTA 1mM i incubar durant 10min a temperatura ambient per produir el *shock* osmòtic. Habitualment, les cèl·lules es ressuspenien en un volum equivalent al 25% del volum del cultiu original.
5. Centrifugar 4.500xg, 15min, 4°C.
6. Ressuspendre en aigua freda en un volum equivalent al 25% del volum del cultiu original.
7. Incubar durant 10min a 4°C.
8. Centrifugar a 12.000xg, 10min, 4°C.
9. El sobrenedant constitueix la fracció periplasmàtica. Per tal de concentrar la mostra, el periplasma es precipitava amb TCA (MÈTODES 3.4.7.2). El sediment de cèl·lules es continuava processant per obtenir la fracció de membrana.
10. Ressuspendre les cèl·lules en Tris-HCl 10mM pH 7.4 i centrifugar a 4.500xg, 10min, 4°C.
11. Ressuspendre les cèl·lules en Tris-HCl 10mM pH 7.4 en un volum equivalent al 25% del volum del cultiu original. Alliberar el contingut citoplasmàtic mitjançant disrupció per ultrasons.
12. Centrifugar a 4.500xg, 10min, 4°C per tal d'eliminar les cèl·lules senceres. Descartar el sediment.
13. Centrifugar el sobrenedant a 100.000xg, 60min, 4°C.

14. El sobrenedant constitueix la fracció citoplasmàtica. El sediment, que constitueix la fracció de membrana, es ressuspenia en Tris-HCl 10mM pH 7.4.

3.4.6. OBTENCIÓ DE VESÍCULES DE MEMBRANA EXTERNA DE BACTERIS

Les vesícules de membrana externa (*outer membrane vesicles*, OMV) alliberades al medi de cultiu es van aïllar d'acord amb el protocol descrit per Kadurugamuwa i Beveridge (1999). Els sobrenedants s'obtenien a partir de cultius bacterians en diferents medis segons cada experiment (MÈTODES 3.4.4). Posteriorment al filtrat del sobrenedant, les vesícules es recollien per ultracentrifugació, es rentaven i es ressuspenien en Tris-HCl 20mM pH 8.

Les vesícules així obtingudes es poden processar per microscòpia electrònica o per anàlisi per *Western Blot*.

En detall:

1. Preparar cultius de les soques desitjades en les condicions determinades per cada experiment.
2. Recollir els bacteris per centrifugació a 5.000xg, 10min, 4°C i guardar el sobrenedant.
3. Filtrar el sobrenedant del cultiu a través de filtres acoblats a xeringues de porus de 0.22µm (Millipore). Això constitueix la fracció de sobrenedant lliure de cèl·lules. Una part d'aquesta fracció s'ha de precipitar amb TCA (MÈTODES 3.4.7.2) pel seu anàlisi per *Western Blot*, i la resta es processa per a l'obtenció de les vesícules.
4. Centrifugar el sobrenedant filtrat restant a 150.000xg durant 3h a 4°C.
5. Reservar el sobrenedant, que constitueix la fracció lliure de vesícules. Aquesta fracció conté les proteïnes secretades al medi en forma soluble, i s'ha de precipitar amb TCA igual que els sobrenedants complets (MÈTODES 3.4.7.2).
6. Rensuspendre el sediment, que constitueix la fracció de vesícules, en tampó TBS i tornar a centrifugar.
7. El sediment constitueix la fracció de vesícules. Rensuspendre en Tris-HCl 20mM pH 8.

3.4.7. PRECIPITACIÓ DE PROTEÏNES

3.4.7.1. Precipitació fraccionada amb sulfat d'amoni

El sulfat d'amoni precipita proteïnes de forma diferencial atenent al percentatge de saturació. Aquest mètode es va utilitzar per tal de purificar la fracció γ -globulina del sèrum de conill. Aquesta fracció precipita al 35% de sulfat d'amoni. Així mateix, també es va utilitzar per precipitar les proteïnes secretades al medi extracel·lular quan era necessari preservar la funcionalitat de les proteïnes, com en els estudis d'ADP-ribosilació. En aquest cas, la precipitació de GAPDH es va fer al 95% de sulfat d'amoni tal com descriuen D'Alessio i Josse (1971).

Un cop precipitada la fracció proteica de les mostres per addició de sulfat amònic, aquestes se centrifugaven a 12.000xg durant 30min a 4°C i es ressuspenien en el tampó adient per cada experiment. Abans de la seva utilització, era necessari dialitzar les mostres enfront el mateix tampó per tal d'eliminar les restes de sulfat amònic.

3.4.7.2. Precipitació amb àcid tricloroacètic (TCA)

Aquest mètode de precipitació de proteïnes es va utilitzar en aquest treball per analitzar les proteïnes que es trobaven en el sobrenedant de cultius bacterians, quan no era necessari preservar la seva funció. Es tracta de proteïnes secretades que no es troben en concentracions suficients per ser detectades directament.

Un cop filtrats els sobrenedants dels cultius (MÈTODES 3.4.4), les proteïnes d'aquesta fracció eren precipitades per l'addició de TCA al 10% i posterior incubació a 4°C durant 1h com a mínim. Les proteïnes precipitades se centrifugaven (16.000xg, 25min, 4°C) i es rentaven amb acetona al 90% en fred dues vegades. Després de la última centrifugació, es deixava evaporar l'acetona a 37°C i finalment les mostres es ressuspenien en el tampó adient per cada experiment, normalment Tris-HCl 100mM pH 7.4, tampó de càrrega per electroforesi de proteïnes monodimensional o tampó de rehidratació per electroforesi bidimensional.

3.4.8. PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES RECOMBINANTS

3.4.8.1. Expressió i purificació de GAPDH recombinant (GST)

La proteïna GAPDH es va purificar utilitzant un sistema de fusió a glutatió-S-transferasa (GST). El plàsmid utilitzat per aquest fi va ser el vector de clonatge pGEX-3X. Aquest vector conté el gen que codifica la GST a l'extrem 5' del lloc de clonatge, i un lloc de reconeixement per la proteasa Factor Xa. Les proteïnes fusionades a la GST poden ser fàcilment purificades a partir d'un extracte cel·lular mitjançant cromatografia d'afinitat en una columna de glutatió. Les proteïnes són eluïdes en condicions no desnaturalitzants per preservar la seva funcionalitat i poden ser separades de la GST mitjançant la digestió amb Factor Xa, que pot ser posteriorment eliminat.

El clon utilitzat per la sobreexpressió i purificació de la proteïna recombinant va ser el pGEX-GapA, que havia estat prèviament construït i es descriu en la tesi doctoral de Laia Egea Pujol (Egea, 2006).

Expressió

La proteïna GST-GAPDH va ser sobreexpressada en la soca BL21 d'acord amb el següent protocol. La soca transformada amb el plàsmid pGEX-GapA es feia créixer o/n en agitació a 37°C en LB. Aquest cultiu era diluït 1:50 en LB i s'incubava a 37°C en agitació fins que s'assolia la fase de creixement exponencial ($D.O_{600nm}=0.5-0.8$). En aquest moment s'afegia IPTG 0.1mM al medi per induir l'expressió de la proteïna de fusió i es mantenia durant 16 hores a 20°C.

Purificació

Les cèl·lules es van recollir per centrifugació i es van ressuspendre en PBS (NaCl 140mM, KCl 2.7mM, Na_2HPO_4 10mM, KH_2PO_4 1.8mM, pH 7.3). Després d'obtenir l'extracte cel·lular per sonicació, aquest es diluïa 10 vegades i s'aplicava a una columna de *Glutathione Sepharose 4B* (GE Healthcare), seguint les indicacions del fabricant. La GAPDH es va separar de la GST mitjançant el tractament proteolític amb Factor Xa diluït en *Factor Xa Cleavage Buffer* (Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM, $CaCl_2$ 1mM, pH 7.5) durant tota la nit a temperatura ambient i la GAPDH digerida va ser eluïda de la columna amb aquest mateix tampó. El Factor Xa va ser eliminat de la preparació mitjançant una cromatografia d'afinitat amb agarosa anti-Factor Xa (Sigma).

Les mostres obtingudes van ser analitzades mitjançant electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS tal com es descriu a MÈTODES 3.4.11 (Laemmli, 1970). La concentració de

proteïna es va determinar pel mètode Lowry (Lowry *i col*, 1951), utilitzant BSA com a estàndard.

3.4.8.2. Expressió i purificació d'LldR i PdhR recombinants (MBP)

Per sobreexpressar i purificar les proteïnes LldR i PdhR es va utilitzar el plàsmid pMAL-c2x (New England Biolabs). Aquest vector permet clonar el gen d'interès a l'extrem 3' del gen *malE*, que codifica la *Maltose-Binding Protein* (MBP), el que resulta en la producció d'una proteïna de fusió a MBP. Aquest gen té una deleció del senyal de secreció, la qual cosa porta a l'expressió de la proteïna de fusió al citoplasma. Aquest vector també conté la seqüència codificant pel lloc de reconeixement de la proteasa Factor Xa.

Clonatge

Es va amplificar la regió codificant dels gens *lldR* i *pdhR*, emprant DNA de la soca MC4100 com a DNA motlle. Els encebadors utilitzats (ANNEX A.1) van ser dissenyats per introduir els gens en els llocs de restricció *EcoRI* i *BamHI* a l'extrem 3' del gen *malE*, mantenint el marc de lectura en fase. El fragment resultant de l'amplificació es va clonar al vector pMAL-c2x, i després de transformar en la soca XL1-Blue, la construcció recombinant va ser confirmada per seqüenciació.

Expressió

La soca XL1-Blue transformada amb el plàsmid corresponent es feia créixer o/n en agitació a 37°C en LB amb ampicil·lina i glucosa 0.2% (p/v). Aquest cultiu era diluït 1:50 en LB amb ampicil·lina i glucosa 0.2% (p/v), i s'incubava a 37°C fins que s'assolia la fase de creixement exponencial ($D.O_{600nm}=0.5-0.8$). En aquest moment s'afegia IPTG 0.3mM al medi per tal d'induir l'expressió de la proteïna de fusió i la incubació es mantenia durant 16 hores a 37°C.

Purificació

Les cèl·lules es van recollir per centrifugació i es van ressuspèndre en *Column Buffer* (Tris-HCl 20mM pH 7.4, NaCl 200mM, EDTA 1mM). Després d'obtenir l'extracte cel·lular per sonicació, es diluïa i s'aplicava a una columna d'amilosa (New England Biolabs). La purificació i l'elució es duia a terme seguint el protocol del fabricant. Les proteïnes d'interès es van separar de la MBP mitjançant el tractament proteolític amb Factor Xa. El plegament d'MBP-LldR en solució dificultava la digestió per part de la proteasa, però la digestió era completa quan el tractament proteolític s'aplicava a la proteïna de fusió unida a la columna d'afinitat, o bé quan s'afegia L-lactat 10mM a la reacció.

Les mostres obtingudes van ser analitzades mitjançant electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS tal com es descriu a MÈTODES 3.4.11 (Laemmli, 1970). La concentració de proteïna es va determinar pel mètode Lowry (Lowry *i col*, 1951), utilitzant BSA com a estàndard.

3.4.9. DETERMINACIÓ D'ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES

La determinació d'algunes de les activitats enzimàtiques es va fer per mètodes espectrofotomètrics o colorimètrics emprant un espectrofotòmetre termostatitzat de doble feix "Shimadzu UV 1603". En el cas de les activitats d'ADP-ribosilació, es van fer servir mètodes radioactius.

3.4.9.1. Activitat gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH)

L'activitat GAPDH es va mesurar segons el mètode descrit per Pancholi i Fischetti (1992). El mètode es basa en què la GAPDH catalitza la conversió de gliceraldehid-3-fosfat a 1,3-bisfosfoglicerat en presència de fosfat inorgànic i genera NADH a partir de NAD⁺. El cofactor reduït es podrà determinar per mesura de l'absorbància a 340nm.

L'activitat de la proteïna recombinant (1µg) es determinava per mesura de l'increment d'absorbància a 340nm en un volum final d'1ml en tampó d'assaig (Trietanolamina 40mM, Na₂HPO₄ 50mM, EDTA 5mM, pH 8.6), en presència de gliceraldehid-3-fosfat (2mM) i NAD⁺ (1mM) a 30°C. A la vegada es processaven reaccions control en les que no s'havia afegit GAPDH o gliceraldehid-3-fosfat. Per assajar l'activitat GAPDH en mostres provinents d'experiments d'ADP-ribosilació s'usava un volum equivalent a 1µg de proteïna recombinant (aproximadament 10µl de reacció d'ADP-ribosilació) i se seguia el mateix protocol.

3.4.9.2. Activitat 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 420nm produït quan la β-galactosidasa expressada per les cèl·lules en cultiu hidrolitza el substrat O-nitrofenil-β-D-galactopiranosid (ONPG).

Amb aquest objectiu, els cultius de les soques amb les fusions transcripcionals objecte d'estudi es feien créixer en el medi adient a cada experiment fins a una D.O._{600nm} d'aproximadament 0.5 (fase logarítmica). 100µL dels cultius eren diluïts en tampó Z (Na₂HPO₄ 60mM, NaH₂PO₄ 40mM, KCl 10mM, MgSO₄ 1mM, β-mercaptoetanol 50mM, pH 7) fins a un volum final d'1ml i tractats a temperatura ambient durant 15min amb SDS (15µl de SDS 0.1%) i cloroform (15µl) per tal de permeabilitzar les cèl·lules. La reacció es duïa a terme en presència d'ONPG a 28°C fins que s'observava el desenvolupament de color groc i s'aturava amb l'addició de 500µl de Na₂CO₃ 1M. L'absorbància de les mostres es mesurava a 420nm i 550nm i l'activitat enzimàtica s'expressava en unitats Miller, segons la fórmula:

$$U_{\text{MILLER}} = 1000 \times \frac{A_{420} - (1,75 \times A_{550})}{t \times v \times \text{D.O.}_{600}}$$

A_{420} : Absorbància de la mescla de reacció a 420 nm
 A_{550} : Absorbància de la mescla de reacció a 550 nm
 t: Temps de reacció en minuts
 v: Volum de cultiu assajat en ml
 D.O._{600} : Densitat òptica del cultiu a 600 nm

3.4.9.3. ADP-ribosilació

Els assaigs d'ADP-ribosilació es van dur a terme amb proteïnes secretades prèviament concentrades per precipitació amb sulfat amònic (75µg/reacció), amb extracte cel·lular total (200µg/reacció) o amb proteïna recombinant purificada (10µg/reacció). La reacció tenia un volum final de 100µl, i contenia, a més de la mostra proteica: Tris-HCl 100mM pH 7.5, DTT 1mM, ATP 0.5mM, MgCl₂ 2mM, E-64 80µM, NAD⁺ 2µM i 2µCi de [³²P]NAD⁺ (51mCi/mmol). En determinats experiments es va afegir un excés de NAD⁺ no radioactiu (100µM) o ADP-ribosa (100µM) com a possibles competidors. Quan s'indica, es va afegir HgCl₂, hidroxilamina (pH 7.4) o nitroprussiat de sodi (SNP) a diferents concentracions per estudiar el seu efecte sobre la reacció. Aquests compostos s'afegien a la reacció abans de l'addició de [³²P]NAD⁺.

Les reaccions es portaven a terme a 37°C en un bany termostatitzat durant 1h. Passat aquest temps, la reacció s'aturava i es processava per electroforesi monodimensional o bidimensional, o es determinava l'activitat GAPDH.

En detall:

- 1- Obtenir la mostra (sobrenedant, extracte cel·lular o proteïna purificada) en tampó de reacció (Tris-HCl 100mM pH 7.5, DTT 1mM, ATP 0.5mM, MgCl₂ 2mM, E-64 80μM).
- 2- Preparar els tubs de reacció amb tots els components perquè quedin a les concentracions finals adequades en cada cas en un volum final de 100μl. Addicionar la proteïna i el [³²P]NAD⁺ en últim lloc, mantenint les reaccions a 4°C. En alguns experiments, es feien reaccions no radioactives que es processaven en paral·lel per a la identificació de les proteïnes ADP-ribosilades per espectrometria de masses.
- 3- Incubar les reaccions durant 1h a 37°C en un bany termostatitzat. Paral·lelament, algunes reaccions es mantenien a 4°C com a control negatiu.
- 4- Passat el temps indicat, parar les reaccions afegint tampó de càrrega per electroforesi de proteïnes 4x o TCA al 10%, depenent de quin hagi de ser el processament posterior de la mostra. Per l'assaig de l'activitat GAPDH, les reaccions s'aturaven per canvi de temperatura a 4°C i l'activitat es determinava immediatament (MÈTODES 3.4.9.1).
- 5- Per l'electroforesi monodimensional, les mostres s'escalfaven a 70°C durant 20min i es procedia a l'electroforesi de la manera habitual en gels de 16cm (MÈTODES 3.4.11.1). Per fer una electroforesi bidimensional, les mostres es precipitaven amb TCA i es processaven tal i com es descriu a MÈTODES 3.4.11.2.
- 6- Assecar els gels d'electroforesi. En el cas dels gels amb mostres no radioactives, es revelaven per diferents mètodes i es guardaven sense assecar per tal d'escindir les bandes d'interès.
- 7- Posar a contactar amb una pel·lícula d'autoradiografia a -80°C (1-3 dies).
- 8- Revelar la pel·lícula.

3.4.10. PURIFICACIÓ D'ANTICOSSOS ANTI-GAPDH PER CROMATOGRAFIA D'AFINITAT

A l'inici d'aquest treball es disposava d'una preparació d'anticossos anti-GAPDH obtinguda a partir de la immunització de conills albins (raça Nova Zelanda) mitjançant injecció subcutània de proteïna GAPDH purificada (Egea, 2006).

La purificació de la fracció γ -globulina del sèrum es va fer mitjançant precipitació amb sulfat d'amoni al 35% de saturació (MÈTODES 3.4.7.1) i es van obtenir anticossos de puresa més elevada mitjançant cromatografia d'afinitat emprant una columna on la GAPDH hi estava unida covalentment.

Així, la fracció γ -globulina anti-GAPDH es va purificar per afinitat utilitzant l'*UltraLink[®] EDC/DADPA Immobilization Kit* (PIERCE). Per a la unió covalent de la GAPDH a la resina es va utilitzar el mateix *kit*, que permet la unió covalent de molècules que contenen grups -COOH (en aquest cas la proteïna contra la qual es volen obtenir anticossos específics) a un suport de gel (*3M Emphase Biosupport medium AB1 gel*) en una columna de manera que els anticossos poden ser purificats per cromatografia d'afinitat. Es va seguir el protocol indicat per la casa comercial, que consta de dos passos. En un primer pas, la GAPDH s'immobilitza a la columna utilitzant 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimida-HCl. Posteriorment, la fracció γ -globulina parcialment purificada s'aplica a la columna d'afinitat DADPA-GapA. Els anticossos que s'uneixen són finalment eluïts amb tampó glicina 0.1M pH 2.5 i neutralitzats immediatament amb una solució de Tris pH 10. Els anticossos s'han de dialitzar enfront PBS 1x prèviament al seu emmagatzematge a -20°C.

Posteriorment a la seva obtenció, la dilució a utilitzar per *Western Blot* va ser ajustada utilitzant diferents dilucions d'anticòs i diferents quantitats de proteïna GAPDH.

3.4.11. SEPARACIÓ ELECTROFORÈTICA DE PROTEÏNES EN GELS DE POLIACRILAMIDA-SDS (SDS-PAGE)

3.4.11.1. Electroforesi monodimensional

L'electroforesi en gels de poliacrilamida en presència d'SDS (Laemmli, 1970) és una tècnica bàsica utilitzada per separar proteïnes en funció del seu pes molecular. En aquest treball s'han utilitzat gels amb un percentatge d'acrilamida entre 8-15% en funció del pes molecular de les proteïnes a separar. Com a marcador de pes molecular s'ha usat el *BENCHMARK™ Prestained Protein Ladder* (Gibco). Per a la realització dels gels es va utilitzar l'equip *Mini PROTEAN® 3 Electrophoresis Cell* i per a l'electroforesi la font *Power Pac Basic*, ambdós de BioRad.

Prèviament a la seva aplicació al gel, s'afegia tampó de càrrega a les mostres (Tris-HCl 0.25M pH 6.8, SDS 8%, glicerol 40%, β -mercaptoetanol 20%, blau de bromofenol 0.08% v/v) i es bullien durant 5 minuts.

L'electroforesi es va desenvolupar a una intensitat de corrent de 15mA en tampó d'electroforesi (Tris-HCl 25mM pH 8.3, glicina 192mM, SDS 0.1%).

Una vegada realitzada l'electroforesi, les bandes proteiques eren revelades per tinció amb Blau de Coomassie®, nitrat de plata (*PlusOne Silver Staining Kit*, GE Healthcare) o *Sypro® Ruby Protein Gel Stain* (Molecular Probes), seguint les instruccions de cada fabricant. En el cas dels assaigs d'ADP-ribosilació, el gel era assecat i autoradiografiat. En altres casos, el gel era processat per immunodetecció per *Western Blot* o *Far-western Blot*.

3.4.11.2. Electroforesi bidimensional.

L'electroforesi 2D és una tècnica que permet analitzar mescleres complexes de proteïnes procedents de mostres biològiques. Inicialment, les proteïnes se separen segons el seu punt isoelèctric (pI) mitjançant isoelectroenfoc en gels de gradients de pH immobilitzats en condicions desnaturalitzants. En la segona dimensió, les proteïnes se separen d'acord amb la massa molecular en un gel estàndard SDS-PAGE. A continuació, es duu a terme la visualització de les proteïnes mitjançant els diferents mètodes de detecció disponibles, segons cada experiment.

En detall:

- 1- Preparar les mostres a analitzar en tampó de rehidratació RHB (Urea 9M, CHAPS 4%, DTT 50mM, 100x *Bio-Lyte 3-10 Ampholyte* (BioRad) 0.5%, traces de Blau de Bromofenol). La quantitat de proteïna aplicada en cada electroforesi variava depenent de la procedència i naturalesa de la mostra.
 - En el cas dels sobrenedants de cultius bacterians o les mostres provinents de reaccions d'ADP-ribosilació, les proteïnes es precipitaven amb TCA (MÈTODES 3.4.7.2) i es ressuspenien directament en el volum adient de tampó de rehidratació RHB.
 - En el cas de les mostres de GAPDH recombinant, la quantitat adequada de proteïna es diluïa directament en aquest tampó.
- 2- Aplicar la mostra (125 μ l) en una tira d'IPG (*Immobilized pH Gradient*) de 7 cm, de diferents rangs de pH segons cada experiment. Cobrir amb oli mineral i hidratar a 20°C durant 12-16 hores sobre placa Peltier.

- 3- Desenvolupar la primera dimensió utilitzant el sistema d'isoelectroenfoc *Protean IEF-Cell* (BioRad) seguint el protocol descrit pel fabricant.
- 4- Després de l'isoelectroenfoc, submergir la tira d'IPG en tampó d'equilibri (Tris-HCl 0.375M pH 8.8, DTT 130mM, urea 6M, glicerol 20% (v/v), SDS 2% p/v) durant 15min.
- 5- Incubar la tira amb un segon tampó d'equilibri (iodoacetamida 135mM, Tris-HCl 0.375M, urea 6M, glicerol 20% v/v, SDS 2% p/v) durant 15min més.
- 6- Aplicar la tira equilibrada a un gel de diferents percentatges d'acrilamida segons cada experiment, i separar les proteïnes de la mateixa manera que en una electroforesi monodimensional.
- 7- Visualitzar les proteïnes amb un dels diferents mètodes de tinció existents o bé per immunodetecció.

3.4.12. ESPECTROMETRIA DE MASSES

Després de l'electroforesi (mono o bidimensional) i de la visualització de les proteïnes amb el mètode especificat en cada cas, les bandes o *spots* d'interès van ser escindits del gel i digerits amb tripsina (*Sequencing grade modified*, Promega) en el robot automàtic *Investigator ProGest* de Genomic Solutions (Serveis Científico-tècnics de la Universitat de Barcelona).

Els pèptids alliberats del gel es van analitzar o bé per espectrometria de masses MALDI-TOF/TOF (*4700 Proteomics Analyzer*, Applied Biosystems) o bé per ESI-MS-MS (Q-TOF Global, Micromass-Waters) (Serveis Científico-tècnics de la Universitat de Barcelona).

Els espectres es sotmetien en format MASCOT per a la cerca en bases de dades. Alguns dels pèptids obtinguts per digestió amb tripsina eren analitzats per cromatografia líquida combinada a espectrometria de masses (Cap-LC-nano-ESI-Q-TOF) (CapLC, Micromass-Waters). Les dades resultants es generaven en format PKL i es sotmetien a cerca en una base de dades en el servidor MASCOT.

3.4.13. ANÀLISI DE PROTEÏNES PER *WESTERN BLOT*

Aquesta tècnica permet detectar la unió entre una proteïna i els seus anticossos específics. Primer es va sotmetre la mostra proteica a una separació electroforètica mono o bidimensional (MÈTODES 3.4.11). Seguidament, les proteïnes es van transferir a una membrana de PVDF (*HyBond-P polyvinylidene difluoride*, GE Healthcare) en un aparell de transferència *BioRad MiniTransblot[®] Cell* (BioRad) amb tampó de transferència (Tris 25mM, glicina 0.2M) durant 1h-1h 20min a 400mA a 4°C i en constant agitació.

Un cop transferides les proteïnes, es va procedir a la seva detecció amb anticossos específics. En primer lloc, se saturava la membrana amb solució de bloqueig (PBS-Tween[®]20 0.05% i llet desnatada al 5%) durant 1h a temperatura ambient. Seguidament, la membrana s'incubava tota la nit amb l'anticòs primari a 4°C. La dilució de l'anticòs variava segons la puresa i especificitat d'aquest. L'endemà, s'eliminava l'excés d'anticòs primari rentant tres vegades amb solució de rentat (PBS-Tween[®]20 0.05%). La incubació amb l'anticòs secundari anti-conill conjugat a peroxidasa (dilució 1/15.000) es duia a terme en solució de bloqueig durant 1h a temperatura ambient. Finalment, es rentava la membrana amb solució de rentat i es procedia a la detecció dels complexos proteïna-anticòs amb el *kit ECL Plus Western Blotting detection system* (GE Healthcare) seguint les instruccions del fabricant.

A continuació es mostra una relació dels anticossos emprats en aquest treball i la dilució a la que s'ha fet servir per experiments de *Western Blot*.

Anticossos primaris	Espècie de procedència	Dilució emprada
Anti-GAPDH	Conill	1/5.000
Anti-H-NS (cedit pel Dr. Antonio Juárez)	Conill	1/5.000
Anti- β -galactosidasa (ab616, Abcam)	Conill	1/10.000
Anti-plasminogen (H-90, Santa Cruz Biotechnology)	Conill	1/400
Anticossos secundaris	Espècie de procedència	Dilució emprada
Donkey Rabbit Ig, HRP linked F(ab') ₂ Fragment(GE Healthcare)	Ase	1/15.000

3.5. ANÀLISI D'INTERACCIONS PROTEÏNA-PROTEÏNA

3.5.1. FAR-WESTERN BLOT

La tècnica de *Far-western Blot* es va aplicar per comprovar la interacció de la GAPDH amb unes proteïnes determinades. En primer lloc, es van separar les proteïnes d'interès en un gel d'electroforesi desnaturant. Seguidament es van transferir a una membrana de PVDF. Aquesta membrana es va saturar amb gelatina i llavors es va incubar amb la proteïna problema (normalment GAPDH) de la qual es vol valorar la seva capacitat per interaccionar amb alguna de les altres proteïnes que hi ha a la membrana (aquesta incubació s'ha d'ometre en el control negatiu). Després de rentar extensivament, la membrana es va processar essencialment com si fos un *Western Blot* tradicional, amb un anticòs contra la proteïna amb la qual s'ha fet la incubació de la membrana.

En aquest treball, aquest experiment s'ha fet de dues maneres. Primerament, se separaven mitjançant SDS-PAGE les proteïnes que es volia comprovar si interaccionaven amb GAPDH, incubant la membrana transferida amb GAPDH, tal i com s'ha descrit anteriorment. Alternativament, es va fer el mateix experiment a l'inrevés. Es va separar GAPDH en una electroforesi bidimensional i després de la transferència es va incubar la membrana amb una de les proteïnes que havien donat un resultat positiu en l'experiment anterior.

En detall:

1. Realitzar l'electroforesi monodimensional o bidimensional amb 5 μ g de les proteïnes problema (MÈTODES 3.4.11). En concret, fibrinogen, plasminogen, actina, fibronectina i GAPDH.
2. Transferir les proteïnes a una membrana de PVDF.
3. Bloquejar la membrana amb solució de blocatge (TBS-gelatina 1%) durant tota la nit en constant agitació a 4°C.
4. Incubar la membrana amb la proteïna a estudi (GAPDH 1 μ g/ml o plasminogen 5 μ g/ml) diluïda en tampó de blocatge durant 3h en constant agitació a temperatura ambient. Aquest pas s'ha d'ometre en una membrana paral·lela que servirà com a control negatiu.
5. Fer quatre rentats amb solució de rentat (TBS-Tween[®]20 0.05%) durant 10min. Aquests rentats han de ser el més intensos possible.
6. A partir d'aquí, seguir el procediment com en un anàlisi per *Western Blot* (MÈTODES 3.4.13), però mantenint la composició de la solució de blocatge i de rentat específica del *Far-Western Blot*. L'anticòs primari ha de ser sempre el que reconeix la proteïna que s'ha usat per incubar la membrana ja transferida.

7. El revelat de les bandes reactives es va dur a terme amb el *kit ECL Plus Western Blotting detection system* (GE Healthcare).

3.5.2. ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

L'assaig ELISA es va dur a terme en plaques d'alta capacitat d'unió (Maxisorp, NUNC). Aquesta tècnica es va fer servir per determinar la capacitat d'unió de GAPDH a proteïnes humanes (actina, plasminogen, fibrinogen i fibronectina). En primer lloc es va recobrir els pous de les plaques amb les proteïnes problema. Seguidament, els pous es van saturar amb gelatina i després es van incubar amb GAPDH. Finalment, la quantitat de GAPDH unida a les proteïnes assajades es va determinar espectrofotomètricament amb l'anticòs específic anti-GAPDH, l'anticòs secundari corresponent i O-fenilendiamina com a substrat cromogènic. En absència de GAPDH, els valors de fons obtinguts van ser molt baixos per totes les proteïnes testades, però de totes maneres es van sostroure dels resultats per obtenir l'absorbància específica.

En detall:

1. Fixar les proteïnes als pous (entre 5 i 10µg/ml en PBS) en un volum final de 100µl/pou. La fixació es va dur a terme a temperatura ambient durant 8h en una cambra humida. A més de les proteïnes problema, també es van fixar uns pous amb GAPDH com a control positiu i es van reservar uns pous per ometre la incubació amb GAPDH com a control negatiu. També es van deixar uns pous sense proteïna fixada com a blanc de l'assaig.
2. Bloquejar tota la nit en solució de bloqueig (TBS-gelatina 1%) a 4°C en cambra humida.
3. Fer 3 rentats amb TBS-Tween®20 0.05%.
4. Fer un últim rentat amb TBS.
5. Incubar amb GAPDH (1µg/ml, 100µl/pou) en solució de bloqueig durant 3h a temperatura ambient en cambra humida. Aquesta incubació s'ha d'ometre en els controls negatius.
6. Fer 3 rentats amb TBS-Tween®20 0.05%.
7. Fer un rentat addicional amb TBS.
8. Incubar amb l'anticòs primari (anti-GAPDH, dilució 1:9.000, 100µl/pou) en solució de bloqueig durant tota la nit a 4°C en cambra humida.
9. Fer 3 rentats amb TBS-Tween®20 0.05%.
10. Fer un rentat addicional amb TBS.
11. Incubar amb l'anticòs secundari (*Donkey Rabbit Ig, HRP linked F(ab')₂ Fragment* (GE Healthcare), 1:9.000, 100µl/pou) en solució de bloqueig durant 2h a temperatura ambient.
12. Fer 3 rentats amb TBS-Tween®20 0.05%.
13. Fer un rentat addicional amb TBS.
14. Afegir els substrat cromogènic O-fenilendiamina (200µl/pou) i deixar que es desenvolupi el color.
15. Parar la reacció amb 50µl de H₂SO₄ 3M.
16. Llegir l'absorbància a 420nm.

3.5.3. PULL-DOWN

En aquest treball, la tècnica de *pull-down* es va fer servir per identificar proteïnes de cèl·lules eucariotes que interaccionessin amb GAPDH fusionada a GST. La proteïna recombinant purificada es va unir a una resina de *Glutathione Sepharose 4B* (GE Healthcare) i es va incubar amb un extracte cel·lular o la fracció de membrana de cèl·lules Caco-2 o HeLa. Per l'experiment es va utilitzar la mateixa resina *Glutathione Sepharose 4B* que per les purificacions de GST-GAPDH. En aquest cas, es van emprar columnes més petites acoblades a tubs tipus *ependorf* o bé directament tubs sense columna. El control negatiu va consistir en fer un experiment paral·lel amb GST unida a la resina en comptes de GST-GAPDH i un altre amb GST-GAPDH però sense extracte cel·lular eucariota. Les proteïnes que interaccionen amb GAPDH quedaven unides a la resina a través de GST-GAPDH. Després de rentar bé la resina, les proteïnes unides es van eluir amb tampó de càrrega per ser analitzades per electroforesi en gel de poliacrilamida. Les proteïnes van ser revelades amb la tècnica més adient en cada cas i les bandes corresponents a les proteïnes unides a GAPDH van ser escindides del gel i identificades per espectrometria de masses.

En detall:

1. Purificar GST i GST-GAPDH en columna de *Glutathione Sepharose 4B* (MÈTODES 3.4.8.1), però en comptes d'usar la proteasa Factor Xa, eluir la proteïna de fusió amb glutatió 10mM.
2. Dialitzar la proteïna recombinant enfront de PBS per eliminar el glutatió.
3. Obtenir la fracció proteica a assajar (extracte cel·lular de Caco-2 o HeLa, o fracció de membrana) en el tampó més adient en cada cas, amb inhibidors de proteases.
4. Posar 100µl de resina *Glutathione Sepharose 4B* en cada tub. Centrifugar 30s a 1.000xg a temperatura ambient. Aquestes condicions de centrifugació es van mantenir en tots el passos d'aquest protocol.
5. Rentar la resina 3 vegades amb TBS (400µl).
6. Aplicar la proteïna recombinant purificada a la columna amb resina (1mg/tub) a temperatura ambient en constant rotació. Centrifugar.
7. Rentar 3 vegades amb TBS.
8. Incubar amb l'extracte o fracció cel·lular a assajar (la quantitat de proteïna variarà en cada cas) durant tota la nit a 4°C en constant rotació. Ajustar el volum final de la mostra a 400µl. Centrifugar.
9. Rentar 5 vegades amb TBS.
10. Ressuspendre la resina en tampó de càrrega per electroforesi (160µl). Bullir les mostres 5min a 95°C.
11. Separar les mostres en un gel SDS-PAGE.
12. Revelar pel mètode més adient (normalment per tinció amb *Sypro® Ruby Protein Gel Stain*, Molecular Probes).
13. Retallar les bandes de proteïna d'interès i identificar-les per espectrometria de masses.

3.6. TÈCNIQUES DE MICROSCÒPIA

3.6.1. MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE TRANSMISSIÓ (TEM)

La microscòpia electrònica de transmissió va ser utilitzada en aquest treball per a la immunodetecció de l'enzim GAPDH en els diferents compartiments subcel·lulars, per visualitzar les vesícules OMV alliberades al medi de cultiu i per estudiar la internalització de la GAPDH bacteriana a les cèl·lules eucariotes.

Les cèl·lules van ser recollides per centrifugació, fixades i processades per crioultramicrotomia. Les cèl·lules van ser fixades a 4°C en tampó PHEM (Pipes 60mM, HEPES 25mM, EGTA 10mM, MgCl₂ 2mM, pH 6.9) addicionat amb paraformaldehid 4% i glutaraldehid 2%. Després, les mostres es van rentar amb tampó PHEM més glicina, van ser incloses en gelatina al 10% i infoses en sacarosa 2.3M. Els blocs de gelatina es van congelar en nitrogen líquid. Es van preparar talls fins en un ultracriomicrotom (Leica EM FCS) i es van recollir en reixetes d'or per ser processades per immunocitoquímica (Serveis Científico-tècnics de la Universitat de Barcelona).

3.6.2. IMMUNOCITOQUÍMICA AMB ANTISÈRUM ESPECÍFIC ANTI-GAPDH

En aquest treball es va utilitzar aquesta tècnica per detectar específicament la proteïna GAPDH bacteriana utilitzant un anticòs primari anti-GAPDH de conill i un anticòs secundari anti-conill lligat a partícules d'or col·loïdal (Knutton, 2003).

Breument, les mostres adsorbides en reixetes Formvar-carbonades d'or es van incubar a temperatura ambient en gotes de PBS amb 2% de gelatina durant 20min, després en PBS amb glicina 15mM durant 15min i finalment en PBS amb BSA 1% durant 10min. Seguidament, les mostres es van incubar amb anticòs anti-GAPDH de conill (dilució 1:20 en PBS-BSA 1%) durant 60min. Després es van fer tres rentats amb PBS durant 10min i es van incubar les mostres amb anticòs secundari IgG anti-conill lligat a partícules d'or col·loïdal (10nm, dilució 1:50 en PBS-BSA 1%) durant 30min. Finalment, es van fer tres rentats en PBS durant 10min i dos rentats en aigua destil·lada. Els controls van consistir en ometre l'anticòs primari en algunes mostres per descartar la unió inespecífica de l'anticòs secundari. Seguidament es va procedir a la fixació i tinció negativa de la mostra per a la posterior visualització al microscopi electrònic de transmissió (Jeol, JEM 1010) en els Serveis Científico-tècnics de la Universitat de Barcelona.

3.6.3. TINCIÓ NEGATIVA

La tinció negativa es basa en la visualització de la mostra per addició de sals de metalls pesants, que tenen la capacitat d'ocupar les regions hidratades del voltant i dins de la mostra, però que no s'uneixen a aquesta. Les reixetes amb la mostra es van incubar amb una gota de 50µl d'acetat d'uranil durant 1min, després es va assecat l'excés de reactiu i es van guardar en un dessecador fins el moment de la observació al microscopi.

3.6.4. CONJUGACIÓ DE GAPDH A OR COL·LOÏDAL

Per tal de dur a terme estudis d'internalització de GAPDH recombinant en cèl·lules HeLa (MÈTODES 3.3.3), aquesta proteïna purificada es va conjuguar a partícules d'or col·loïdal de 10nm de diàmetre (Sigma).

En detall:

1. Purificar proteïna de fusió GST-GAPDH segons el procediment descrit anteriorment (MÈTODES 3.4.8.1) i digerir amb Factor Xa. És recomanable no afegir glicerol a la preparació.
2. Barrejar la proteïna purificada amb or col·loïdal de 10nm (10µg de proteïna per cada mil·lilitre d'or col·loïdal). Agitar fortament amb vòrtex i incubar 3min a temperatura ambient.
3. Afegir polietilenglicol (PEG) 20.000 perquè quedi a una concentració final de 0.02%.
4. Centrifugar durant 45min a 16.000xg a 4°C.
5. Retirar el sobrenedant i reservar-lo per quantificar la proteïna que no s'ha conjugat a l'or col·loïdal. Ressuspendre el sediment en el mateix volum inicial de Tris HCl 0.05M pH 7.2 PEG 0.02%.
6. Centrifugar durant 45min a 16.000xg a 4°C.
7. Retirar el sobrenedant. Ressuspendre el sediment en el volum adequat de PBS-PEG 20.000 0.02%. El volum de ressuspensió dependrà de la quantitat de proteïna que s'hagi conjugat a l'or i la concentració de GAPDH necessària per a la realització d'experiments posteriors.
8. Abans de fer servir la preparació de GAPDH-or col·loïdal, aquesta s'ha de centrifugar 5min a baixa velocitat per sedimentar les partícules d'or que hagin format agregats.

3.7. PREPARACIÓ I ANÀLISI DEL DNA

Les manipulacions de DNA *in vitro* es van realitzar d'acord amb protocols estàndard (Sambrook i Russell, 2001).

3.7.1. MANIPULACIÓ DEL DNA

Per obtenir el DNA genòmic d'*E. coli* s'ha utilitzat el *kit* comercial *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* de Promega. L'obtenció de DNA genòmic es va efectuar a partir de 2ml de cultiu de cèl·lules en fase estacionària de la soca desitjada seguint el protocol proporcionat per la casa comercial per bacteris gramnegatius.

Per obtenir DNA plasmídic a petita escala es va utilitzar el *kit* *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). L'obtenció de DNA plasmídic a mitjana escala es va dur a terme amb el *kit* *Wizard® Plus SV Midipreps DNA Purification System* (Promega).

Per a l'obtenció de fragments de DNA, es van amplificar les seqüències desitjades a partir de DNA cromosòmic de la soca indicada, mitjançant la tècnica de PCR. Quan va ser necessari, es van incorporar llocs de restricció específics als extrems 5' dels encebadors per facilitar el clonatge en el vector apropiat. L'enzim utilitzat va ser *PfuTurbo® DNA polymerase* (Stratagene), *Expand High Fidelity PCR System* (Roche Diagnostics) o *Biotools DNA Polymerase* (Biotools), segons les necessitats de cada experiment. Els encebadors utilitzats en aquest treball es troben llistats a l'ANNEX A.1.

Per a la purificació de fragments de DNA a partir d'un gel d'agarosa es va utilitzar el *kit* *QIAquick™ Gel Extraction Kit* (QIAGEN), seguint les indicacions descrites per la casa

comercial. Per a la purificació de fragments obtinguts per PCR que no presentaven bandes inespecífiques, es va emprar el *kit QIAquick™ PCR Purification Kit* (QIAGEN).

Per a la seqüenciació automàtica de fragments de DNA es va seguir el protocol descrit en el *kit ABI Prism Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v3.1* (PE Biosystems) i la fluorescència incorporada a les cadenes de DNA sintetitzades es mesurava en el seqüenciador *377 DNA Sequencer, Abi Prism* de Perkin Elmer (Serveis Científico-tècnics de la Universitat de Barcelona).

3.7.2. CONSTRUCCIÓ DE MOLÈCULES HÍBRIDES DE DNA

El primer pas consisteix en l'obtenció del DNA de partida (vector de clonació i insert que es vol clonar). L'insert es va obtenir mitjançant la tècnica de PCR o per digestió a partir d'un altre plasmidi. A continuació ambdós DNAs es tractaven amb els enzims de restricció i modificadors necessaris amb l'objectiu d'obtenir molècules compatibles. El vector i l'insert així tractats es van lligar amb la T4 DNA lligasa (*Fast-Link™ DNA ligase* 100U, 2U/μl) i s'introduïen en cèl·lules d'*E. coli* competents (MÈTODES 3.1.2.). D'entre les colònies crescudes en plaques de selecció, s'identificaven els clons recombinants mitjançant PCR i se n'obtenia el DNA plasmídic. El DNA obtingut s'analitzava per seqüenciació.

3.7.3. MUTAGÈNESI DIRIGIDA

Per a la introducció de mutacions puntuals en la proteïna recombinant GAPDH-GST es va utilitzar el *kit Quick-Change™ Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene). Breument, la construcció a mutar, el plàsmid pGEX-GapA (MÈTODES 3.4.8.1), es va usar com a motlle d'una reacció de PCR utilitzant dos encebadors que contenen la mutació desitjada. Després de la reacció d'amplificació, el DNA es va tractar amb l'enzim *DpnI* durant 1h a 37°C per eliminar el DNA metilat motlle. El vector resultant va ser transformat en cèl·lules competents XL1-Blue i la introducció únicament de la mutació desitjada es va comprovar per seqüenciació del DNA.

Per introduir mutacions en les seqüències de les caixes d'unió d'LldR, es van dissenyar encebadors que continguessin aquestes mutacions i es va procedir a amplificar el fragment de promotor per PCR. La inserció de seqüències de 5pb o 10pb en el fragment corresponent al promotor complet es va fer per *crossover* PCR (Link *i col*, 1997).

3.8. CARACTERITZACIÓ DE PROMOTORS

3.8.1. FUSIÓ DE PROMOTORS AL GEN *lacZ*

Per crear fusions transcripcionals o d'operó, en primer lloc es van obtenir els fragments de DNA mitjançant la tècnica de PCR. Normalment es van utilitzar encebadors que incorporaven les dianes de restricció *BamHI* i *EcoRI* en els extrems 5'. Els fragments obtinguts van ser purificats i digerits amb els enzims escollits i clonats en el vector pRS550 (Simons *i col*, 1987), a l'extrem 5' del gen *lacZ*. La família de plàsmids pRS contenen un operó *lac* críptic i gens que confereixen resistència als antibiòtics kanamicina i ampicil·lina. Els plàsmids recombinants resultants es van introduir a la soca competent XL1-Blue i es van seleccionar en plaques d'LB amb X-gal, ampicil·lina i kanamicina. Els plàsmids seleccionats van ser seqüenciats per comprovar que no s'havia introduït cap mutació no desitjada.

Les fusions de promotor al gen *lacZ* van ser transferides de plàsmid multicòpia a genoma en forma de còpia única segons el mètode descrit per Elliot (1992). En primer lloc, la

fusió era transferida al genoma de la soca TE2680. Els transformants se seleccionaven per resistència a kanamicina i es comprovava que fossin sensibles a ampicil·lina i cloramfenicol. A continuació, la fusió es transferia a la soca d'estudi mitjançant un lisat P1. Totes les soques portadores d'una fusió de promotor al genoma presenten auxotròfia per l'aminoàcid triptòfan, ja que la construcció s'insereix en el lloc on es localitzen els gens implicats en la biosíntesi d'aquest aminoàcid.

L'activitat β -galactosidasa de les fusions transcripcionals obtingudes es va determinar segons el mètode descrit per Miller (1972), que es troba explicat a MÈTODES 3.4.9.2.

3.8.2. ASSAIGS DE RETARDACIÓ DE LA MOBILITAT ELECTROFORÈTICA (EMSA)

Els assaigs de retardació de la mobilitat electroforètica (*gel shift o electrophoretic mobility shift assay, EMSA*) es van dur a terme amb proteïna purificada a diferents concentracions. Pel marcatge de les sondes es va emprar un *kit* de marcatge no radioactiu amb digoxigenina (Roche Diagnostics, GmbH). Els fragments de DNA obtinguts per PCR es van marcar a l'extrem 3' amb una transferasa terminal i DIG-ddUTP segons les instruccions del fabricant.

La reacció d'unió (*binding*) es va portar a terme tal i com havia descrit Lane *i col* (1992). La proteïna es va barrejar amb les sondes marcades (1-2ng) en un volum final de reacció de 20 μ l que contenia: Tris-HCl 10mM pH 7.4, KCl 100mM, MgCl₂ 10mM, glicerol 10% i DTT 2mM. Com a competidor no específic es va fer servir Poly(dI-dC). En algunes reaccions es va afegir L-lactat en concentracions creixents fins a 100mM. Aquestes reaccions d'unió es van incubar 15min a 30°C i es van separar en gels de poliacrilamida al 5% no desnaturalitzants amb glicerol al 4% i a 4°C en tampó Tris-borat-EDTA (Tris-borat 89mM pH 8, EDTA 2mM).

Seguidament a la separació electroforètica, els complexos es van transferir a una membrana de nitrocel·lulosa. Aquesta es va bloquejar i incubar amb un anticòs anti-digoxigenina d'acord amb les instruccions del fabricant. Els fragments de DNA marcats amb digoxigenina es van detectar per quimioluminescència en una pel·lícula de raig X.

3.9. PREPARACIÓ I ANÀLISI DE L'RNA

3.9.1. OBTENCIÓ D'RNA BACTERIÀ

Per a l'obtenció d'RNA bacterià total es va utilitzar tant el *kit RiboPure™-Bacteria* (Ambion), com el *kit RNeasy total RNA* (Qiagen), sempre seguint les instruccions del fabricant corresponent. En tots dos casos, l'RNA obtingut es va tractar amb DNasa lliure d'RNasa. Tots els materials emprats en l'obtenció i manipulació d'RNA eren lliures d'RNases.

La quantificació de l'RNA obtingut es va dur a terme en un espectrofotòmetre NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop®), i la seva qualitat es va comprovar en un gel d'agarosa/formaldehid 2.2M.

3.9.2. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA MITJANÇANT PCR ACOBLADA A TRANSCRIPCIÓ INVERSA (RT-PCR)

La tècnica d'RT-PCR (Sambrook *i col*, 2001) permet determinar l'expressió del gen objecte d'estudi mitjançant la identificació del seu mRNA específic. Aquesta tècnica es basa en l'obtenció de cDNA a partir de l'RNA per l'acció de la retrotranscriptasa o transcriptasa inversa i la posterior amplificació mitjançant PCR a partir d'aquest cDNA. Els encebadors es van dissenyar perquè hibridessin flanquejant un fragment intern del gen que es vol estudiar.

En aquest treball, l'estudi de l'expressió dels gens a través d'aquesta tècnica es va fer de manera semiquantitativa.

En detall:

1. Obtenir l'RNA total.
2. Desnaturalitzar l'RNA mitjançant incubació a 70°C durant 5min.
3. Afegir: DTT (10mM), hexanucleòtids degenerats (6.25ng/μl), dNTPs (0.5mM), RNAsin (inhibidor d'RNases) (20U), el tampó proporcionat per la casa comercial (1x) i 200U d'enzim transcriptasa inversa (*M-MLVTM Reverse Transcriptase*, Gibco). Incubar 1h a 37°C. Preparar i processar en paral·lel dos controls, un en absència d'RNA i l'altre en absència de transcriptasa inversa.
4. Desenvolupar la reacció de PCR utilitzant una parella d'oligonucleòtids que hibridin en regions internes del gen objecte d'estudi i com a motlle el cDNA sintetitzat. Ajustar el nombre de cicles de PCR de tal manera que permeti la quantificació en el rang de linealitat i es maximitzin les diferències entre mostres.
5. Visualitzar els productes de PCR amplificats mitjançant electroforesi en gel d'agarosa i utilitzant el revelador fluorescent Vista Green[®]. Quantificar la intensitat de les bandes de PCR en el rang de linealitat mitjançant *Phosphorimager Storm 840* (Molecular Dynamics) i el programa *Image Quant 5.2*.

Els valors resultants de la quantificació es normalitzaven respecte el gen d'expressió constitutiva (*rrsB*) i s'expressaven en unitats arbitràries segons la relació:

Ratio= intensitat banda gen estudi/intensitat banda gen expressió constitutiva

3.9.3. DETERMINACIÓ DE L'INICI DE TRANSCRIPCIÓ PER 5'-RACE

La regió 5' del transcrit *lldPRD* es va determinar per amplificació ràpida dels extrems 5' del cDNA (*Rapid Amplification of cDNA 5' ends*, RACE) emprant un *kit* comercial (Roche Diagnostics, GmbH).

En primer lloc es va obtenir RNA de cultius aeròbics de la soca MC4100 en condicions d'inducció (cultius amb L-lactat com a única font de carboni) o no inducció (cultius amb CAA com a única font de carboni). A partir d'aquesta preparació d'RNA, es va transcriure el cDNA amb un oligonucleòtid *antisense* específic per *lldP*. Seguidament es va afegir una cua dA homopolimèrica a l'extrem 3' d'aquest cDNA mitjançant una transferasa terminal. Després es va fer una amplificació dels productes de la transcripció reversa amb un encebador específic per *lldP* més intern que l'utilitzat anteriorment i un encebador d'ancoratge oligo(dT). Els productes obtinguts es van clonar en el vector pGEMT per a la seqüenciació del DNA. Es van analitzar un mínim de 10 clons per cada condició.

3.10. ANÀLISI ESTADÍSTIC

Els resultats van ser analitzats amb el programa d'estadística SPSS 12.0. Les diferències entre mitjanes de més de dos grups van ser determinades per l'anàlisi de la variància (ANOVA), seguit del test de Tukey. Les diferències entre les mitjanes de dos grups van ser analitzades amb el test de la t d'Student per mostres independents. Un valor $P < 0.05$ s'ha considerat estadísticament significatiu. Els resultats s'han expressat com la mitjana \pm la desviació estàndard (SD), i el nombre de determinacions per grup ha estat igual o superior a tres.

4

RESULTATS I DISCUSSIÓ

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. CARACTERITZACIÓ DEL REGULADOR TRANSCRIPCIONAL *lIdR* I EL SEU PAPER EN L'ADAPTACIÓ METABÒLICA D'*E. coli* DURANT L'ADHESIÓ A ENTERÒCITS

4.1.1. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DELS GENS *lIdR* I *lIdP* EN BACTERIS EHEC ADHERITS A CÈL·LULES Caco-2

Prèviament a aquest treball, estudis de transcriptòmica havien identificat *lIdR* com a un dels gens sobreexpressats en cèl·lules d'EHEC adherides a membranes d'eritròcits (Dahan *i col*, 2004). En aquest treball s'han dut a terme assaigs d'RT-PCR per tal de comprovar si aquest patró d'expressió es dona també en el nostre model d'adhesió a cèl·lules d'epiteli intestinal Caco-2, i analitzar si també afecta a altres gens del sistema *lId*.

Amb aquesta finalitat, es va dur a terme la infecció de monocapes de cèl·lules Caco-2 amb la soca EHEC 86-24h11 durant 4h amb una multiplicitat d'infecció (MOI) bacteri:Caco-2 de 100:1. Posteriorment es van recollir els bacteris adherits i els planctònics (MÈTODES 3.3) i es va obtenir l'RNA total. L'expressió dels gens *lIdR* i *lIdP* es va analitzar per RT-PCR semiquantitativa amb els oligonucleòtids específics dissenyats per cadascun dels gens (ANNEX A.1). El nombre de cicles de PCR es va ajustar per cada gen de tal manera que permetés la quantificació en el rang de linealitat. Seguidament s'aplicaven en un gel d'agarosa 18µl dels productes de PCR amb 2µl el revelador fluorescent Vista Green® i es quantificava la intensitat de les bandes mitjançant *Phosphorimager Storm 840* (Molecular Dynamics) i el programa ImageQuant 5.2. La intensitat de cada banda es normalitzava respecte a la intensitat de banda del gen d'expressió constitutiva *rrsB* en cada una de les condicions (MÈTODES 3.9).

Els resultats es presenten a la figura 4.1, i mostren que el gen *lIdR* està sobreexpressat aproximadament dues vegades en bacteris adherits, mentre que en l'expressió del gen *lIdP* no s'observen diferències significatives entre bacteris adherits i planctònics. Aquest resultat no semblaria compatible amb l'estructura d'operó proposada pels gens *lIdPRD* (Lynch i Lin, 1996).

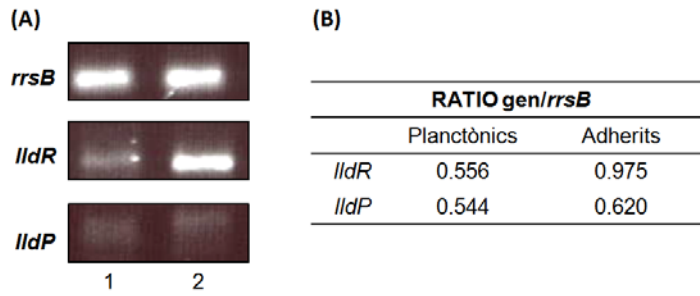


Figura 4.1. Anàlisi mitjançant RT-PCR de l'expressió dels gens *lldR* i *lldP*. (A) Anàlisi de l'expressió dels gens *lldR* i *lldP* de bacteris EHEC planctònics (carril 1) o adherits a cèl·lules Caco-2 (carril 2) després de 4h d'infecció. Es mostra l'amplificació per PCR de cada un dels gens a estudi i la del gen d'expressió constitutiva *rrsB* com a control. (B) Relació numèrica (unitats arbitràries) dels nivells d'mRNA de cada gen normalitzat respecte el gen d'expressió constitutiva *rrsB* en cada una de les condicions.

4.1.2. IDENTIFICACIÓ DE PROMOTORS EN EL SISTEMA GÈNIC *lldPRD*

Amb l'objectiu de determinar si hi havia promotors interns en el sistema gènic *lldPRD* responsables de dirigir la transcripció del gen regulador *lldR* de manera independent al primer gen *lldP*, es van construir cinc fusions transcripcionals al gen *lacZ*. Tres d'elles contien la regió 5' de cada un dels gens de l'operó *lldPRD* individualment, mentre que les altres dues abarcaven els gens *lldP*, *lldR* i un fragment del darrer gen *lldD*, i es diferenciaven entre elles per la presència o absència de la regió 5' d'*lldP* (Fig. 4.2). Aquestes construccions es van transferir a la soca d'*E. coli* MC4100 com a còpia única. L'activitat β -galactosidasa es va mesurar en cultius aeròbics en medi mínim amb CAA o L-lactat com a única font de carboni. Tal i com es pot observar a la figura 4.2, només les dues construccions que contien la regió 5' del gen *lldP* conservaven l'activitat promotora basal i la induïda per L-lactat. En aquestes, el nivell d'activitat basal obtingut va ser d'entre 194 i 270 unitats Miller, mentre que l'expressió en presència d'L-lactat augmentava fins a nou vegades. Les altres tres construccions, corresponents a regions entre les posicions +119 i +2638 no presentaven activitat promotora basal ni induïble per L-lactat.

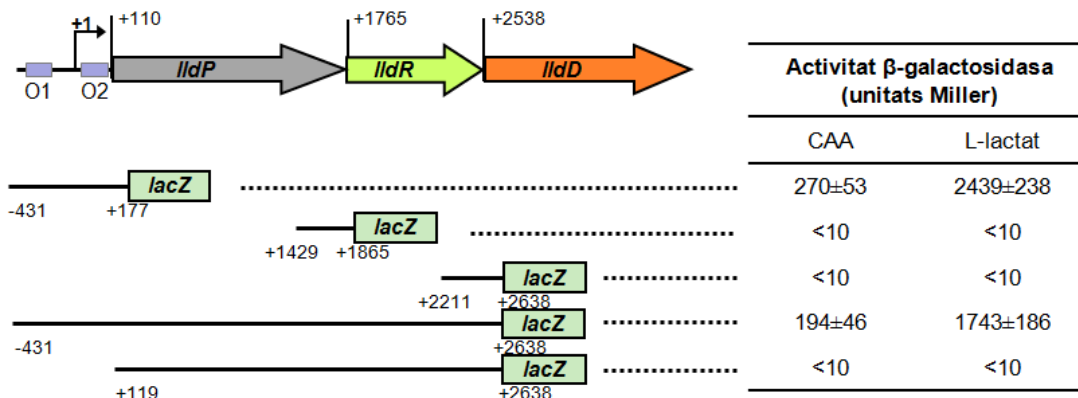


Figura 4.2. Anàlisi de fusions transcripcionals per identificar promotors funcionals en el sistema gènic *lldPRD*. L'extensió i direcció dels gens de l'operó, *lldP* (codifica l'L-lactat permeasa), *lldR* (codifica la proteïna reguladora de l'operó) i *lldD* (codifica l'L-lactat deshidrogenasa), s'indiquen amb fletxes. També s'indiquen el lloc d'inici de la transcripció (posició +1) determinat en aquest treball (RESULTATS I DISCUSSIÓ 4.1.3) i els dos operadors proposats prèviament a aquest estudi, O1 i O2. Els fragments fusionats al gen *lacZ* es mostren a sota i estan numerats respecte al lloc d'inici de la transcripció determinat en aquest treball. Aquests fragments es van fusionar al gen *lacZ* i es van introduir a la soca MC4100 en forma de còpia única. Els valors d'activitat β -galactosidasa corresponents a cada fragment s'indiquen a la taula de la dreta i es troben expressats com a mitjana \pm SD.

Així doncs, aquests resultats indicaven que només les seqüències promotores localitzades a la regió 5' del gen *lldP* són funcionals, i que per tant els gens *lldP*, *lldR* i *lldD* constitueixen un operó induïble per L-lactat.

Amb l'objectiu de determinar el promotor mínim necessari per a l'expressió de l'operó *lldPRD*, es van construir noves fusions transcripcionals al gen *lacZ*. Aquestes fusions corresponien a deleccions de la regió 5', donant lloc a construccions que s'estenien des de les posicions -331, -231, -131 o -27 fins a la posició +177, i com a referència es comparaven amb la regió promotora completa compresa entre les posicions -431 i +177, que anomenarem $\Phi(lldP-lacZ)$ (Fig. 4.3).

La construcció -131 va ser la fusió més petita que encara mantenia el mateix nivell d'activitat β -galactosidasa que la construcció completa $\Phi(lldP-lacZ)$ tant en condicions basals com en condicions d'inducció (Fig. 4.3, construcció 4). Així doncs, aquests resultats indiquen que no existeixen elements actuant en *cis* que controlin l'expressió de l'operó *lldPRD* més enllà de la posició -131. A més a més, aquesta construcció encara conté els operadors O1 i O2, possibles llocs d'unió de la proteïna reguladora de l'operó, LldR (INTRODUCCIÓ 1.2).

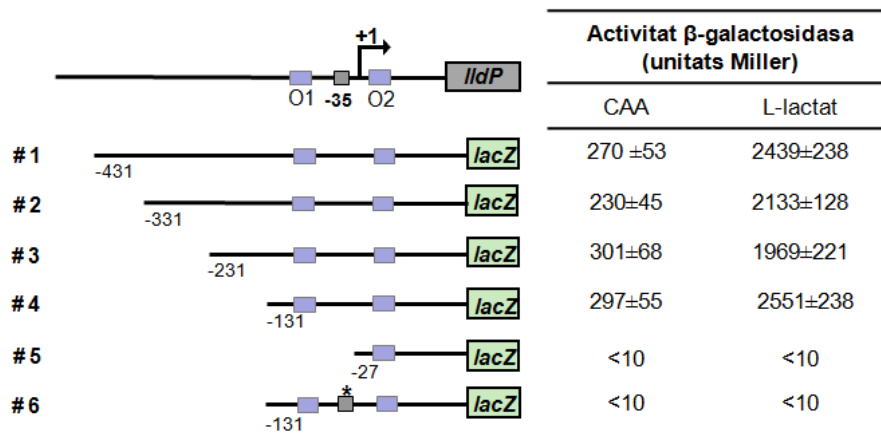


Figura 4.3. Anàlisi de fusions transcripcionals corresponents a deleccions de la regió promotora de l'operó *lldPRD* i a la mutació de la seqüència -35 determinada en aquest treball. S'indiquen el lloc d'inici de la transcripció (posició +1) i els dos operadors, O1 i O2. Els fragments fusionats al gen *lacZ* es mostren a sota i estan numerats respecte al lloc d'inici de la transcripció determinat en aquest treball. La caixa -35 mutada s'indica amb un asterisc. Aquestes construccions es van introduir a la soca MC4100 en forma de còpia única. Els valors d'activitat β -galactosidasa corresponents a cada construcció s'indiquen a la taula de la dreta i es troben expressats com a mitjana \pm SD.

La transcripció d'*lldR* té lloc per tant conjuntament amb els altres dos gens en un mRNA policistrònic. En aquest sentit, el diferent nivell d'expressió entre *lldP* i *lldR* en bacteris adherits a cèl·lules Caco-2 (RESULTATS I DISCUSSIÓ 4.1.1) podria ser conseqüència de la inestabilitat de l'mRNA policistrònic. Està descrit que diferències en l'expressió dels gens individuals que formen part d'un mateix operó són degudes a diferències en l'estabilitat dels diferents segments de l'mRNA, determinades a la vegada per la distribució d'elements estabilitzadors com estructures secundàries i elements promotors de la degradació com seqüències de tall per endonucleases al llarg de la seqüència del missatger (Klug, 1993).

4.1.3. DETERMINACIÓ DE L'INICI DE TRANSCRIPCIÓ DE L'OPERÓ *lldPRD*

Prèviament a aquest treball s'havien descrit dues seqüències promotores en la regió 5' del sistema gènic *lldPRD* (Lynch i Lin, 1996). En el present estudi, els inicis de transcripció es van determinar mitjançant la tècnica 5'-RACE (MÈTODES 3.9.3). Es va obtenir RNA total de cultius aeròbics de la soca MC4100 en medi mínim amb CAA (condicions de no inducció) o amb L-lactat (condicions d'inducció) com a única font de carboni. Com es pot observar a la figura 4.4B, l'anàlisi dels productes de 5'-RACE en totes dues condicions (10 clons per cada una) van revelar l'existència d'un únic inici de transcripció, localitzat 110 nucleòtids per davant del codó d'inici de la traducció d'*lldP*. L'anàlisi *in silico* de la regió 5' adjacent a l'inici de transcripció va permetre identificar les possibles seqüències promotores -10 i -35 reconegudes per la subunitat $\sigma 70$ de l'RNA polimerasa (Fig. 4.4A). Aquestes seqüències -35 i -10 (TTGCCA-17nt-AACCAT) coincideixen amb el promotor P2, que prèviament s'havia postulat com a promotor induïble per la presència d'L-lactat en el medi de cultiu (Lynch i Lin, 1996).

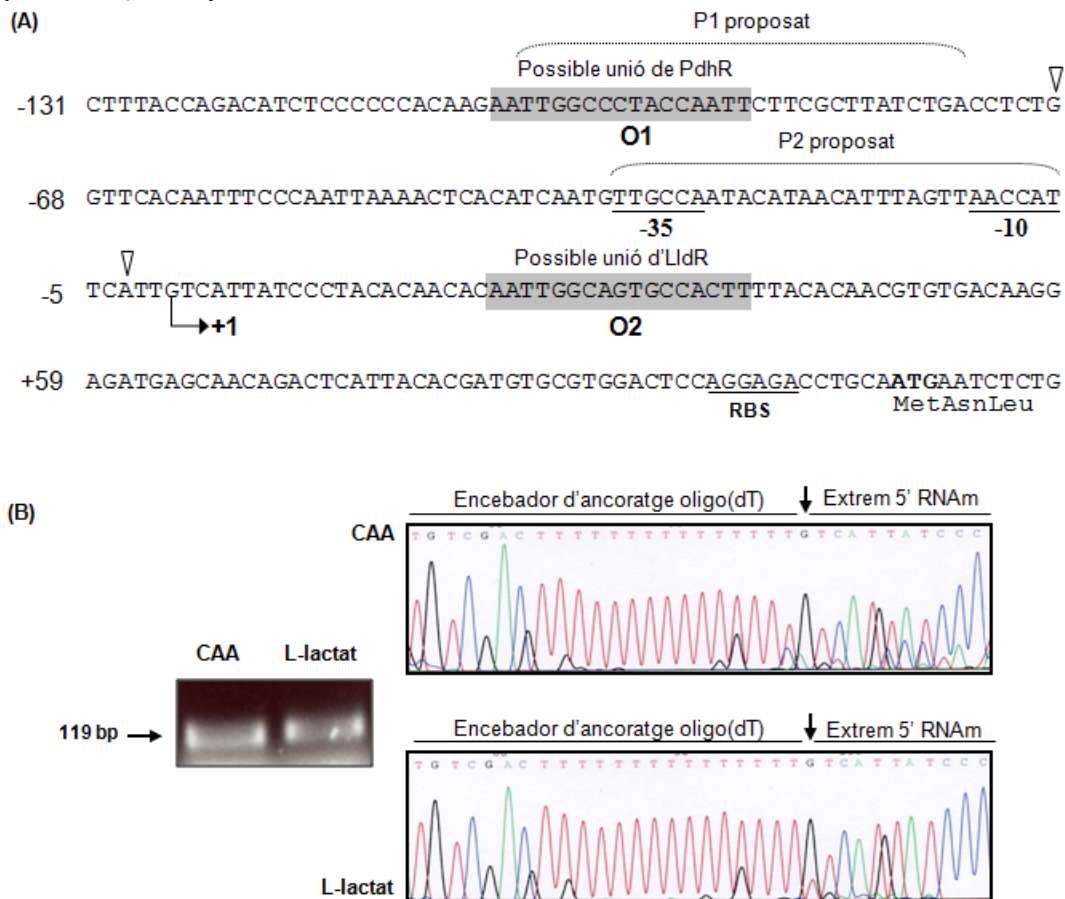


Figura 4.4. Organització dels elements reguladors de l'operó *lldPRD*. (A) La seqüència de la regió promotora d'*lldPRD* es troba numerada respecte a l'inici de transcripció identificat en aquest estudi, indicat com a +1 en la imatge. Les seqüències promotores -10 i -35 i el lloc d'unió al ribosoma (RBS) es troben subratllats. També s'indica el codó d'inici de la traducció (ATG), els promotors P1 i P2 proposats prèviament per Lynch i Lin (1996) i els seus corresponents inicis de transcripció (triangles oberts). O1 i O2 corresponen als llocs d'unió de les proteïnes reguladores PdhR i LldR, respectivament, predits també per Lynch i Lin (1996). (B) Identificació de l'inici de transcripció mitjançant la tècnica de 5'-RACE. Es mostren les bandes corresponents als fragments de cDNA obtinguts i el resultat de la seqüenciació d'un clon típic derivat d'mRNA obtingut de cultius de la soca MC4100 en CAA o en L-lactat. En els cromatogrames s'indica la localització de l'encebador d'ancoratge i de l'inici de transcripció identificat.

Per tal de comprovar la funcionalitat del promotor identificat, es van construir fusions transcripcionals al gen *lacZ* en les que la seqüència -35 es trobava deletada o bé mutada a la seqüència AAAGGA. Com es pot observar a la figura 4.3 (construccions 5 i 6), aquestes modificacions van anul·lar totalment l'activitat β -galactosidasa tant en presència com en absència d'L-lactat. En canvi, la mutació dirigida de la seqüència -35 corresponent al promotor basal P1 proposat per Lynch i Lin (1996) (Fig. 4.13, construcció 2), que se solapa amb el lloc d'unió proposat per PdhR, no anul·la l'expressió de l'operó en cap de les dues condicions estudiades. Aquests resultats confirmen que la transcripció de l'operó *lldPRD* té lloc a partir de l'únic promotor identificat en aquest treball.

4.1.4. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DE L'OPERÓ *lldPRD* EN ALTRES FONTS DE CARBONI

L'expressió de la fusió transcripcional corresponent a la regió compresa entre les posicions -431 i +177 Φ (*lldP-lacZ*) es va estudiar també en cultius creixent en altres fonts de carboni. En aquest estudi, la soca MC4100 Φ (*lldP-lacZ*) es va fer créixer aeròbicament en medi mínim amb les següents fonts de carboni: CAA, L-lactat, D-xilosa, D-lactat, glicolat, glucosa, o combinacions de les anteriors. Els resultats de l'activitat β -galactosidasa determinada en aquests cultius es presenten a la figura 4.5.

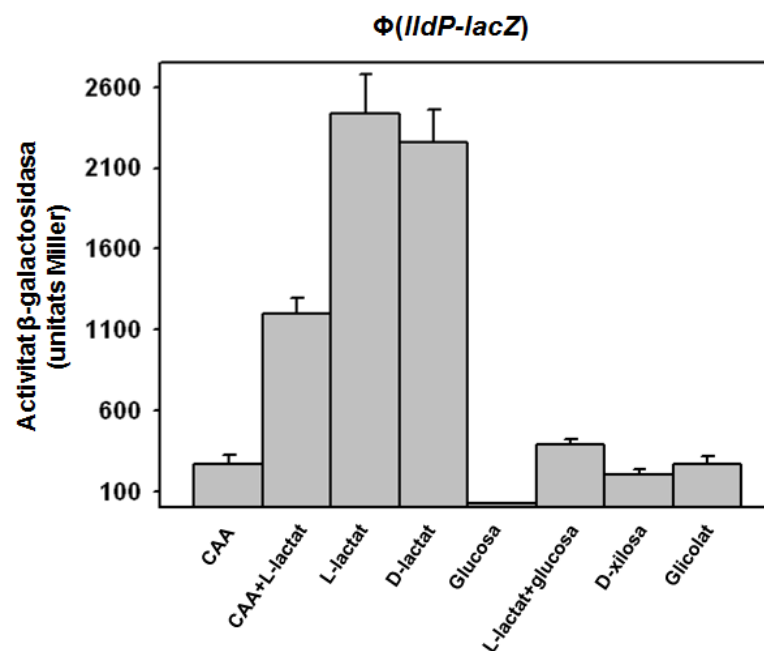


Figura 4.5. Activitat β -galactosidasa de la fusió transcripcional Φ (*lldP-lacZ*) en diferents condicions de cultiu. Activitat β -galactosidasa de la soca MC4100 Φ (*lldP-lacZ*) creixent en medi mínim i les fonts de carboni indicades. Els valors de l'activitat s'expressen en unitats Miller com a mitjana \pm SD.

L'expressió de l'operó *lldPRD* en cultius en D-xilosa o glicolat era semblant a l'obtinguda en condicions basals en presència de CAA, indicant que aquestes fonts de carboni no tenen un efecte en la regulació de l'operó *lldPRD*. En canvi, es va observar repressió de l'expressió de l'operó en cèl·lules creixent en glucosa o glucosa+L-lactat. Quan les cèl·lules es feien créixer en presència de CAA+L-lactat es va observar que, tot i que l'activitat β -galactosidasa augmentava fins a valors al voltant de 1200 ± 98 unitats Miller, el nivell d'inducció era lleugerament inferior a l'obtingut si la única font de carboni era L-lactat (2439 ± 238 unitats Miller). Aquest efecte podria ser conseqüència de diferències en la velocitat de creixement de cada cultiu. Aquest fenomen també s'ha observat en altres sistemes gènics quan la font de carboni inductora (glicolat o L-ascorbat) s'afegeix al cultiu en presència de CAA (Pellicer, 1998; Campos, 2004).

Els resultats indiquen que l'expressió de l'operó pot ser també induïda per D-lactat a nivells similars als obtinguts en L-lactat. Aquests dos compostos són enantiòmers, i per tant estructuralment molt semblants. És probable que la proteïna reguladora LldR pugui reconèixer ambdues molècules com a efectors al·lostèrics. De manera similar, LldP, la lactat permeasa codificada en aquest operó, presenta especificitat pel transport d'L- i D-lactat a l'interior de la cèl·lula, així com també és capaç de transportar glicolat (Núñez *i col*, 2001). Tanmateix, només els dos isòmers de lactat indueixen l'expressió de l'operó, i no així el glicolat.

En referència a la repressió de la transcripció de l'operó *lldPRD* en presència de glucosa en el medi de cultiu, existeixen diversos mecanismes que explicarien aquest fenomen de repressió catabòlica. En un cultiu amb glucosa i L-lactat, el bacteri és capaç de seleccionar el carbohidrat que aporta un major rendiment energètic, en aquest cas la glucosa, i inhibeix la síntesi dels enzims implicats en el metabolisme dels altres nutrients presents en el medi que aporten menor rendiment, en aquest cas l'L-lactat.

Un dels possibles mecanismes per la repressió catabòlica depèn de la proteïna CRP (*Cyclic AMP Receptor Protein*), també coneguda com a CAP (*Catabolite Activator Protein*), que unida al seu efector AMPc, és capaç d'unir-se a una seqüència específica present en el promotor dels seus gens diana i actuar com a activador de la transcripció d'aquests gens. El mecanisme de regulació a través del complex CRP-AMPc està controlat pel sistema fosfotransferasa dependent de fosfoenolpiruvat (PTS-PEP), del que forma part el transportador específic de glucosa (EIIA^{Glc}). En absència de glucosa, aquesta proteïna es troba fosforilada i és capaç d'activar l'adenilat ciclase, que sintetitza AMPc a partir d'ATP (Stülke i Hillen, 1999). Aquest AMPc s'uneix a CRP per formar el complex actiu CRP-AMPc que regula l'expressió de molts gens que responen a la presència o absència d'una font de carboni rica com la glucosa. En aquest treball, la participació del complex CRP-AMPc en la regulació de l'operó *lldPRD* s'ha descartat en base als resultats obtinguts en assaigs de retardació de la mobilitat electroforètica (EMSA). Com a sonda es va usar un fragment corresponent a la regió promotora de l'operó i com a font de proteïna, extractes cel·lulars de la soca MC4100 en presència d'AMPc. En aquestes condicions no es va formar cap complex de retardació addicional respecte a les mostres incubades en absència d'AMPc (resultats no mostrats). Aquests resultats suggereixen que el complex CRP-AMPc no està implicat en el control transcripcional de l'operó *lldPRD*.

Alternativament, existeix un mecanisme anomenat exclusió de l'inductor que produeix un efecte de repressió catabòlica independent del complex CRP-AMPC, i que depèn de l'estat de fosforilació/defosforilació de la subunitat EIIA^{Glc} del sistema de transport PTS-PEP de la glucosa. En presència de glucosa la subunitat EIIA^{Glc} es troba majoritàriament defosforilada i en aquesta forma és capaç d'unir-se a determinades permeases provocant la seva inactivació. En conseqüència s'inhibeix el transport del carbohidrat i per tant no es produeix l'activació del sistema gènic que codifica els enzims responsables del seu metabolisme (Brücker *i col*, 2002). En el cas de l'operó *lldPRD*, es podria estar produint una inhibició al·lostèrica de la permeasa LldP a través de la interacció d'aquesta proteïna transportadora i EIIA^{Glc} en la seva forma defosforilada en presència de glucosa en el medi. Degut a la falta d'inductor L-lactat a l'interior de la cèl·lula, l'expressió de l'operó es trobaria reprimida, donats valors basals de transcripció.

4.1.5. FUNCIO D'LldR i PdhR EN LA REGULACIÓ DE L'OPERÓ *lldPRD*

La proteïna reguladora de l'operó lactat, LldR, és altament similar a PdhR, repressor que regula la transcripció de l'operó *pdhR-aceEF-lpd*, implicat en el metabolisme del piruvat. En base a aquesta elevada similitud entre LldR i PdhR (35% d'identitat i 62% de similitud), que es dona tant en la regió carboxi- com amino-terminal, Quail i Guest (1995) van dur a terme un anàlisi computacional de possibles llocs d'unió d'aquestes proteïnes en el promotor d'*lldPRD*. En aquest anàlisi es van identificar dos llocs d'unió molt semblants a la seqüència consens d'unió de PdhR, que en aquest treball s'han anomenat O1 i O2 (Fig. 4.4). Posteriorment, donada la localització d'aquestes seqüències respecte als suposats promotors, Lynch i Lin (1996) van plantejar la hipòtesi de que LldR podria unir-se a O2, situat a 3' de P1 i P2, i actuaria com a repressor de la transcripció de l'operó, mentre que PdhR podria interaccionar amb O1, a 5' dels promotors, i per tant actuar com a activador de l'operó. Tanmateix no hi havia evidències experimentals que confirmessin aquesta proposta (INTRODUCCIÓ 1.2).

4.1.5.1. Funció d'LldR en la regulació de l'operó *lldPRD*

Amb l'objectiu de confirmar experimentalment la funció d'LldR en el control de l'expressió de l'operó *lldPRD* es va construir un mutant Δ *lldR*, la soca JA218, en la qual el gen *lldR* es troba substituït per un *cassette* de resistència a cloramfenicol (MÈTODES 3.1.4). Es va introduir la fusió transcripcional Φ (*lldP-lacZ*) en aquesta soca i seguidament es va analitzar l'expressió de l'operó mitjançant la mesura de l'activitat β -galactosidasa. Els resultats es presenten a la figura 4.6. L'absència d'LldR en la soca JA218 Φ (*lldP-lacZ*) anul·lava la inducció de l'operó en presència d'L-lactat. Aquest resultat indica que en presència d'L-lactat, el regulador LldR actua com a activador de l'expressió de l'operó. En canvi, l'activitat basal en els cultius crescuts en presència de CAA va incrementar dues vegades en aquesta soca mutant Δ *lldR*. Així doncs, aquests resultats suggereixen que la funció d'LldR és la d'un repressor en absència d'L-lactat, però actua com a activador de la transcripció quan l'inductor hi és present.

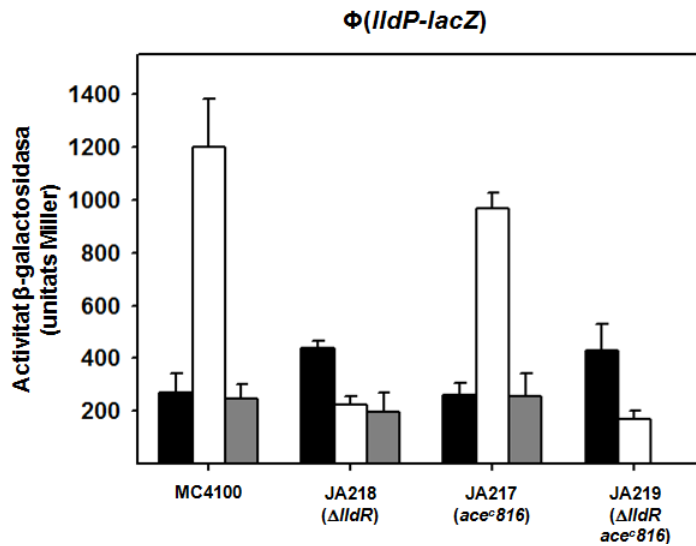


Figura 4.6. Activitat β -galactosidasa de la fusió transcripcional $\Phi(IldP-lacZ)$ en diferents fons genètics i condicions de cultiu. Les cèl·lules es van fer créixer aeròbicament en CAA 0.2% (barres negres), CAA+L-lactat 20mM (barres blanques) o CAA+piruvat 40mM (barres grises). Els valors de l'activitat s'expressen en unitats Miller com a mitjana \pm SD.

4.1.5.2. Funció de PdhR en la regulació de l'operó *IldPRD*

La possible funció de PdhR en la regulació de l'operó *IldPRD* es va analitzar mesurant l'expressió de $\Phi(IldP-lacZ)$ en el fons genètic de la soca JA217, que és portadora d'una mutació que dona lloc a una proteïna PdhR no funcional. Aquesta soca es va obtenir per transferència de la mutació *ace816* de la soca JRG2547 en el fons genètic de la soca MC4100 (MÈTODES 3.1.4). La correcta transferència de la mutació a la soca MC4100 es va confirmar tant per PCR com per l'anàlisi de l'activitat d'una fusió transcripcional del promotor de l'operó *pdhR-aceEF-lpd* $\Phi(pdh-lacZ)$, en presència i absència de piruvat (Haydon *i col*, 1993). Tal i com es mostra a la figura 4.7, la soca JA217 (*ace816*) perd la repressió de la transcripció de l'operó *pdhR-aceEF-lpd* en absència de piruvat, mentre que la repressió és evident en la soca de tipus salvatge MC4100.

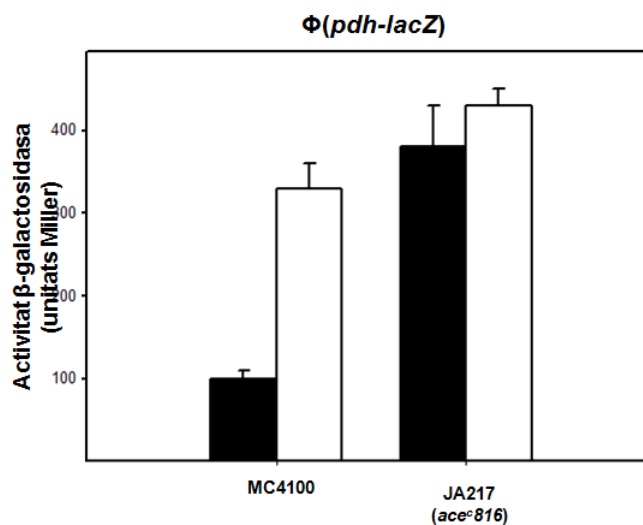


Figura 4.7. Activitat β -galactosidasa de la fusió transcripcional $\Phi(pdh-lacZ)$ en diferents fons genètics i condicions de cultiu. Les cèl·lules es van fer créixer aeròbicament en LB (barres negres) o LB+piruvat 40mM (barres blanques). Els valors de l'activitat s'expressen en unitats Miller com a mitjana \pm SD.

Un cop validada la deficiència de funció de PdhR en la soca JA217, es va passar a analitzar l'expressió de la fusió $\Phi(\text{lldP-lacZ})$ en aquesta soca. Els resultats de l'anàlisi de l'expressió mostrats a la figura 4.6 indiquen que, independentment de la presència o absència d'L-lactat, no existeixen diferències en l'expressió de $\Phi(\text{lldP-lacZ})$ entre les soques JA217 (*ace^f816*) i la de tipus salvatge MC4100. Per tant, la proteïna reguladora PdhR no té cap funció en la regulació de l'operó *lldPRD* en les condicions assajades.

L'expressió de la fusió transcripcional $\Phi(\text{lldP-lacZ})$ es va estudiar també en la soca JA219, doble mutant $\Delta\text{lldR ace}^f816$. Aquesta soca tenia el mateix patró d'expressió que la soca JA218, mutant ΔlldR (Fig. 4.6). Aquest resultat reafirma la manca de participació de PdhR en el control de l'expressió de l'operó *lldPRD*.

A més a més, es va analitzar l'expressió de $\Phi(\text{lldP-lacZ})$ en les dues soques mutants JA217 (*ace^f816*) i JA218 (ΔlldR) en presència de piruvat, la molècula efectora de PdhR. El patró d'expressió de l'operó *lldPRD* en les dues soques era independent de la presència o absència de piruvat, indicant que aquesta molècula no és un efector d'aquest operó.

Aquests resultats confirmen que LldR és la única proteïna reguladora implicada en la inducció de l'expressió de l'operó *lldPRD* en presència d'L-lactat, i que actua com a repressor en absència d'aquest inductor. Així mateix, es descarta la participació de PdhR en el control transcripcional de l'operó *lldPRD*.

4.1.6. ESTUDI DE LA UNIÓ D'LldR I PdhR ALS OPERADORS O1 I O2

Els resultats exposats fins al moment evidencien que LldR regula l'expressió de l'operó *lldPRD*, mentre que PdhR no participaria en aquesta regulació. Per caracteritzar la capacitat d'unió de les dues proteïnes als operadors O1 i O2, proposades prèviament com a llocs d'unió per PdhR i LldR, respectivament (Quail i Guest, 1995), es van portar a terme assaigs de retardació de la mobilitat electroforètica (EMSA) utilitzant proteïna purificada i les diferents sondes de DNA marcades amb digoxigenina.

4.1.6.1. Obtenció de preparacions d'LldR i PdhR purificades

Per portar a terme els estudis d'EMSA, en primer lloc es van purificar les proteïnes LldR i PdhR a partir de les corresponents proteïnes de fusió a la proteïna d'unió a maltosa (MBP, MÈTODES 3.4.8.2). Els oligonucleòtids emprats per amplificar per PCR els gens *lldR* i *pdhR* per a la seva clonació en el vector pMAL pc2x es detallen en l'ANNEX A.1. Els plàsmids recombinants van ser introduïts a la soca XL1-Blue i la inducció de les proteïnes de fusió es va dur a terme per addició d'IPTG a cultius de la soca transformada. Posteriorment, es va obtenir l'extracte cel·lular per purificar les proteïnes recombinants en una columna d'amilosa. Les proteïnes unides a la columna d'amilosa van ser eluïdes amb maltosa 10mM i recollides en fraccions. A la figura 4.8 es mostra l'anàlisi del procés de purificació d'MBP-LldR i MBP-PdhR.

Les proteïnes MBP-LldR i MBP-PdhR eluïdes de la columna van ser tractades amb Factor Xa. Mentre que la proteïna MBP-PdhR va ser digerida amb alta eficiència (Fig. 4.8A, carril 9), la proteïna MBP-LldR era resistent a aquesta digestió. (Fig. 4.8B, carril 9). En aquest cas es van provar dues alternatives. En primer lloc es va dur a terme la digestió amb Factor Xa amb la proteïna MBP-LldR unida a la columna

d'amilosa, abans de l'elució. Per altra banda, la segona estratègia va consistir en digerir la proteïna MBP-LldR eluïda de la columna en presència d'L-lactat 10mM. Totes dues aproximacions van millorar el resultat, i van permetre la total digestió de la proteïna de fusió amb Factor Xa (Fig. 4.12B). Es va decidir usar la preparació obtinguda per digestió dins la columna per tal d'evitar possibles interferències de l'L-lactat en la capacitat d'unió al DNA d'aquesta proteïna en els experiments d'EMSA.

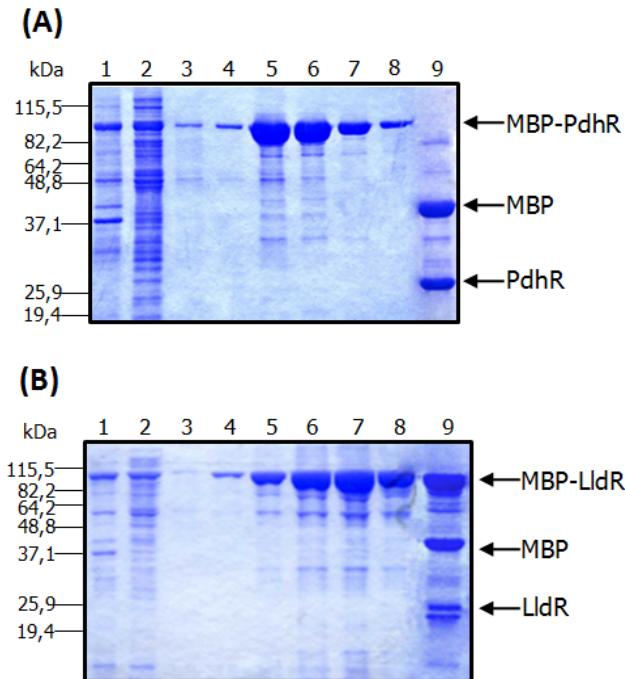


Figura 4.8. Anàlisi per SDS-PAGE de l'expressió i purificació de les proteïnes de fusió a MBP en una columna d'amilosa. (A) Sobreexpressió i purificació de PdhR. Carril 1: extracte cel·lular de cultius induïts. Carril 2: Fracció no retinguda a la columna d'amilosa. Carril 3-8: fraccions d'elució d'MBP-PdhR amb maltosa. Carril 9: MBP-PdhR tractada amb Factor Xa. **(B)** Sobreexpressió i purificació d'LldR. Carril 1: extracte cel·lular dels cultius induïts. Carril 2: Fracció no retinguda a la columna d'amilosa. Carril 3-8: fraccions d'elució d'MBP-LldR amb maltosa. Carril 9: MBP-LldR tractada amb Factor Xa. S'indiquen les mides corresponents al marcador de pes molecular.

4.1.6.2. Anàlisi de la retardació de la mobilitat electroforètica dels operadors O1 i O2

Els fragments de DNA utilitzats com a sondes es van amplificar per PCR i es van marcar amb digoxigenina (MÈTODES 3.8.2). Les sondes emprades contenen O1 (P77), O2 (P85), o bé tots dos operadors (P190). Com a fracció proteica es van emprar les proteïnes recombinants LldR i PdhR purificades.

A la figura 4.9 es presenten els resultats d'EMSA obtinguts amb la sonda P190 i la proteïna LldR. Aquesta sonda compren una regió del promotor d'*lldPRD* que conté tant l'operador O1 com O2 (de la posició -131 a la +67). El resultat mostra que LldR és capaç d'unir-se a aquesta regió i formar com a mínim tres complexos de retardació. Aquests podrien ser conseqüència de la unió d'LldR en diferents regions de la sonda, o bé de l'oligomerització de diverses molècules d'LldR, com a mínim una d'elles unida a la sonda.

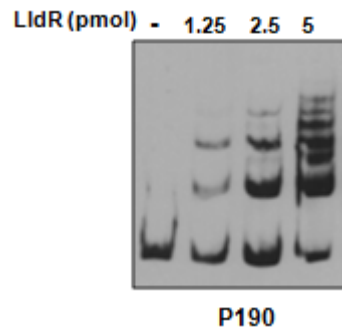


Figura 4.9. Unió d'LldR a la sonda P190. La sonda P190 es va afegir a les reaccions d'unió amb diferents quantitats d'LldR purificada (1.25, 2.5 o 5 pmol). Totes les reaccions contenien poli(dI-dC) 500mM com a competidor no específic i es van incubar a 30°C durant 15min i seguidament van ser sotmeses a electroforesi en gel de poliacrilamida al 5%.

Un cop confirmada la capacitat d'unió d'LldR a la sonda P190, es van amplificar i marcar amb digoxigenina els fragments corresponents a les sondes P77 i P85, que contenen O1 i O2, respectivament (Fig. 4.10A), amb l'objectiu de comprovar la unió d'LldR i/o PdhR a cada un dels operadors proposats.

Els resultats obtinguts, que es mostren a la figura 4.10B, van demostrar que LldR és capaç d'unir-se a tots dos fragments, observant-se la formació de dos complexos de retardació amb O1(CI i CII) i només un complex amb O2 (CI).

En canvi, PdhR només va mostrar capacitat d'unió al fragment P77, que conté O1, però amb molta menys afinitat que LldR. Com a control, es va dissenyar una sonda que contingués l'operador propi de PdhR en l'operó *pdhR-aceEF-lpd* (PpdhR) per descartar una possible falta de funcionalitat de la proteïna PdhR purificada que fos la causant de la menor afinitat d'aquesta proteïna per O1 i la falta d'unió a O2. Com es pot comprovar a la figura 4.10B, PdhR va ser capaç d'unir-se al seu operador ja a concentracions molt baixes de proteïna, entre 10 i 100 vegades inferiors a la concentració necessària per unir-se a P77, indicant que la proteïna recombinant obtinguda en aquest treball és funcional. En aquesta figura també es pot observar la formació de complexos de retardació addicionals a mesura que s'augmentava la quantitat de PdhR en les reaccions d'unió.

L'alineament d'O1 i O2 amb l'operador PdhR propi de l'operó *pdhR-aceEF-lpd* (AATTGGTaaGACCAATT) va mostrar una alta identitat entre les seqüències palindròmiques, excepte en els nucleòtids que flanquegen l'espaiador de l'operador (en vermell a la figura 4.10A). Recentment, s'ha descrit la seqüència consens d'unió de PdhR, derivada dels operadors de *pdhR-aceEF-lpd*, *ndh* i *cyoABCDE* (Ogasawara *i col*, 2007). Segons aquesta descripció, les posicions que flanquegen l'espaiador de l'operador estan sempre conservades en aquests operons on s'ha comprovat la regulació per part de PdhR a través de la seva unió a les caixes conservades. Tanmateix, en el cas de l'operó *lldPRD*, només un d'aquests nucleòtids es conserva en O1, i cap en O2. Donats els resultats d'unió de PdhR a aquests operadors en els assaigs d'EMSA, els nucleòtids esmentats podrien tenir un paper important en el reconeixement de les seqüències per part del regulador afí. En el cas d'O1, un canvi en aquests nucleòtids disminueix l'afinitat d'unió de PdhR a l'operador, mentre que en

el cas d'O2, en que cap dels dos nucleòtids es conserva, no és possible la unió de PdhR.

A més, cal tenir en compte que donada la baixa afinitat de PdhR per O1 observada a partir dels assaigs *in vitro*, aquesta unió probablement no es dona *in vivo*, ja que les concentracions intracel·lulars de PdhR són de ben segur inferiors a les emprades en l'assaig de retardació de la mobilitat electroforètica. Això està d'acord amb els resultats obtinguts en l'anàlisi de l'expressió de l'operó duts a terme en la soca mutant JA217 (*ace^f816*) mitjançant la mesura de l'activitat β -galactosidasa de la fusió transcripcional Φ (*lldP-lacZ*), en que no s'observava cap efecte de la mutació *ace^f816* en el patró d'expressió de l'operó *lldPRD* (RESULTATS I DISCUSSIÓ 4.1.5), descartant la participació de PdhR en el control d'*lldPRD*.

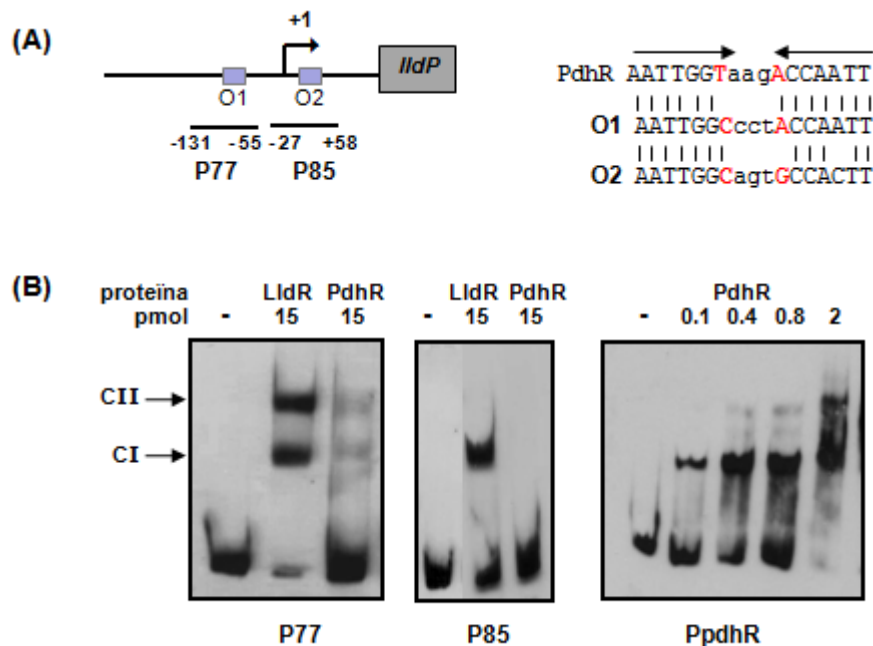


Figura 4.10. Unió d'LldR i PdhR a les seqüències promotores que contenen els operadors O1 i O2. (A) A l'esquerra es mostra un diagrama de la regió promotora d'*lldP*. S'indiquen els operadors proposats O1 i O2 i els fragments usats com a sondes en experiments d'EMSA, P77 i P85. A la dreta es mostra un alineament de la seqüència de l'operador de PdhR present en la regió promotora de l'operó *pdhR-aceEF-lpd* amb les seqüències dels operadors O1 i O2 en el promotor *lldPRD*. Les fletxes indiquen les repeticions invertides presents en els operadors reconeguts per proteïnes de la família GntR. (B) Anàlisi per EMSA amb les sondes de DNA indicades marcades amb digoxigenina. Les sondes P77 o P85 es van afegir a les reaccions d'unió amb 15 pmol d'LldR o PdhR purificades. La sonda corresponent a l'operador de PdhR (PpdhR) es va afegir a reaccions que contenien diferents quantitats de PdhR (entre 0.1 i 2 pmol). Totes les reaccions contenien poli(dI-dC) 500mM com a competidor no específic i es van incubar a 30°C durant 15min i seguidament van ser sotmeses a electroforesi en gel de poliacrilamida al 5%.

Donat que LldR era capaç d'unir-se als fragments de DNA que contenen O1 i O2, es van realitzar nous experiments d'EMSA amb quantitats inferiors de proteïna (entre 1 i 10pmol). Els resultats es mostren a la figura 4.11A. LldR va ser capaç d'unir-se al fragment P77 a concentracions més baixes que al fragment P85, indicant que té més afinitat per O1 que per O2. A concentracions inferiors a 2pmol, la unió

d'LldR a la sonda P77 (O1) dona lloc a la formació d'un únic complex de retardació (CI), el qual presenta la mateixa mobilitat que l'únic complex format amb P85 (O2). Tenint en compte que les proteïnes de la subfamília FadR s'uneixen als seus operadors en forma de dímers, els complexos formats per LldR-P77 i LldR-P85 que presenten la mateixa mobilitat electroforètica (CI), es poden considerar dímers d'LldR units a O1 i O2, respectivament. En el cas d'LldR-P77, quan s'augmenta la quantitat de proteïna s'observa la formació d'un segon complex de retardació amb una mobilitat més reduïda (CII), que podria correspondre a la interacció entre dos dímers d'LldR, un d'ells unit a P77.

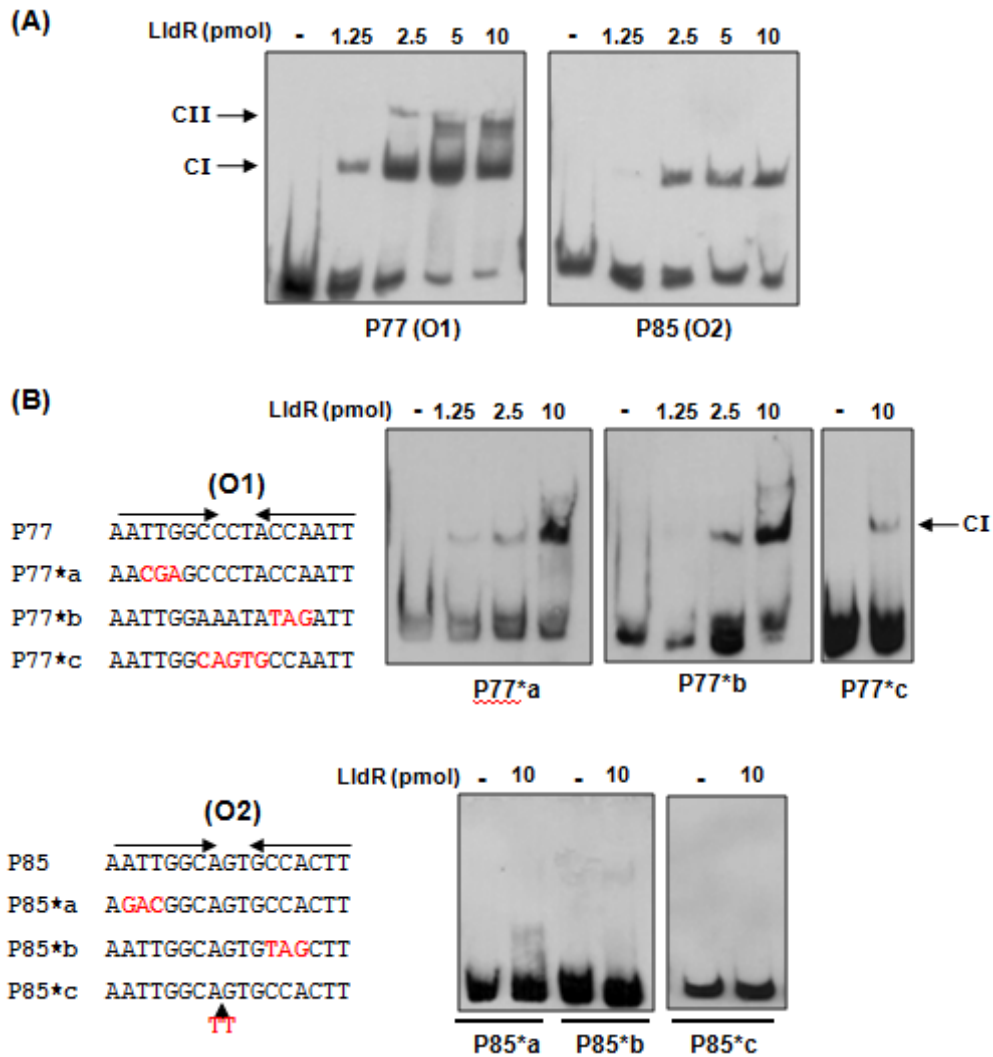


Figura 4.11. Caracterització de la unió d'LldR als operadors O1 i O2. Totes les reaccions contenen poli(dI-dC) 500mM com a competidor no específic, es van incubar a 30°C durant 15min i seguidament van ser sotmeses a electroforesi en gel de poliacrilamida al 5%. **(A)** Anàlisi per EMSA dels complexos LldR-P77 i LldR-P85 que es formen amb quantitats creixents de proteïna purificada. Les sondes de DNA marcades amb digoxigenina es van incubar amb les quantitats indicades de proteïna. **(B)** Efecte de les mutacions introduïdes a les sondes P77 i P85 sobre la formació de complexos amb LldR i la seva mobilitat electroforètica. A la dreta de cada EMSA es pot observar la seqüència de l'operador corresponent i les mutacions introduïdes a cada sonda (en vermell). Les fletxes indiquen les repeticions invertides existents a cada operador.

Per confirmar que LldR reconeix específicament les seqüències dels dos operadors descrits, O1 i O2, dins dels corresponents fragments de DNA usats com a sondes, es van dissenyar nous fragments en els que s'havien mutat dirigidament 3 nucleòtids en cada meitat de les seqüències palindròmiques (Fig. 4.11B). Aquests fragments de DNA, anomenats P77*a i P77*b per les mutacions en O1, i P85*a i P85*b per les mutacions en O2, van ser amplificats per PCR i marcats amb digoxigenina per utilitzar-los com a sondes en assaigs d'EMSA.

Les mutacions en O2 van anul·lar completament la unió d'LldR a O2 (P85*a i P85*b). Aquests mateix resultat es va obtenir quan es van inserir 2 nucleòtids (TT) entre els dos elements de simetria d'O2 (P85*c). Aquests resultats indiquen que tant la seqüència d'O2 com la distància entre les repeticions invertides són crucials per a la unió d'LldR a aquest operador.

En el cas de l'operador d'alta afinitat O1, les mutacions en qualsevol dels dos braços del palíndrom (P77*a i P77*b) anul·laven la formació del complex CII. Pel que fa al complex CI, les mutacions en aquestes sondes no impedièren la seva formació, però sí que reduïen significativament l'afinitat d'LldR per aquest fragment de DNA.

Per analitzar la importància que tenen els nucleòtids localitzats en l'espaiador entre els dos elements de simetria, aquests es van modificar i es van substituir pels corresponents a l'espaiador d'O2 (P77*c). Això converteix O1 en O2, excepte per una posició en una de les meitats del palíndrom. Entre els nucleòtids modificats, es troben els dos que flanquegen l'espaiador, que ja havíem determinat que podien ser importants per l'afinitat amb què la proteïna reguladora s'uneix a l'operador, per exemple en el cas de PdhR. En concret, la mutació de l'espaiador va provocar que l'operador O1 es comportés d'una manera semblant a l'operador O2, és a dir, presentava una menor afinitat per LldR i només es formava un complex de retardació en comptes de dos. Aquests resultats indiquen que les posicions modificades en aquestes sondes són importants per l'afinitat d'unió i formació del complex LldR-DNA.

4.1.7. ANÀLISI D'L-LACTAT COM A MOLÈCULA EFECTORA D'LldR

El següent objectiu va ser determinar si L-lactat és la molècula efectora que regula l'activitat d'LldR quant a la seva capacitat d'unió a les seqüències operadores O1 i O2. Està descrit que la unió de molècules efectores al domini C-terminal de les proteïnes de tipus FadR, subfamília a la qual pertany el regulador LldR, provoca un canvi conformacional que sovint anul·la la interacció entre la proteïna i el DNA (DiRusso *i col*, 1999; Quail *i col*, 1995). Per tal de comprovar si l'L-lactat és capaç de regular la capacitat d'unió d'LldR als operadors O1 i O2, es van portar a terme assaigs d'EMSA amb la proteïna LldR (5pmol) i les sondes de DNA P77 i P85, en presència d'L-lactat (entre 10 i 100mM). Els resultats es presenten a la figura 4.12A.

Quan la sonda utilitzada va ser la P77, que conté l'operador O1, l'addició d'L-lactat no semblava tenir efecte a baixes concentracions, però sí a concentracions d'L-lactat superiors a 50mM. En presència d'L-lactat 100mM, el complex CII desapareixia. Aquest resultat suggereix que la presència de l'inductor, tot i no eliminar la unió al DNA, implicaria un canvi conformacional en la proteïna que disminueix la seva capacitat d'oligomeritzar, en concret, de formar complex CII, corresponent al tetràmer proposat.

Quan la sonda va ser la P85, que conté l'operador O2, l'addició d'L-lactat reduïa significativament la formació del complex de retardació CI a les concentracions més altes de l'inductor.

Tot i que les concentracions d'L-lactat que provoquen un canvi en el patró dels complexos de retardació formats en els assaigs d'EMSA són molt elevades, aquests resultats semblen indicar que L-lactat és capaç d'interaccionar amb LIdR i provocar un canvi de conformació d'aquesta proteïna reguladora, actuant per tant com a molècula efectora d'LIdR.

Una altra evidència de l'efecte de l'L-lactat sobre la conformació d'LIdR va provenir dels experiments duts a terme per millorar la digestió de la proteïna de fusió MBP-LIdR amb Factor Xa. En solució, aquesta proteïna no era completament digerida pel Factor Xa, probablement perquè el plegament fa que el punt de tall de la proteasa no sigui accessible. En aquests casos, l'addició d'una molècula que sigui capaç d'interaccionar amb la proteïna i canviar la seva conformació pot millorar-ne la digestió (segons les instruccions del fabricant del sistema de purificació pMAL, New England Biolabs). Així doncs, es va comprovar l'efecte de l'addició d'L-lactat en l'eficiència de digestió de la proteïna de fusió MBP-LIdR amb Factor Xa. Com es mostra a la figura 4.12B, es va aconseguir una digestió completa de la proteïna de fusió en presència d'L-lactat 10mM. La concentració d'L-lactat a la que s'observa la millora de la digestió de la proteïna (10mM) és inferior a la concentració d'efector necessària per observar algun efecte en els resultats dels assaigs d'EMSA (50-100mM). La causa podria ser que el DNA unit a LIdR dificulti el canvi de conformació produït per l'efector L-lactat, ja que l'estructura de la proteïna unida al DNA seria més rígida i difícil de modificar que no pas lliure en solució, com en el cas de la preparació tractada amb Factor Xa.

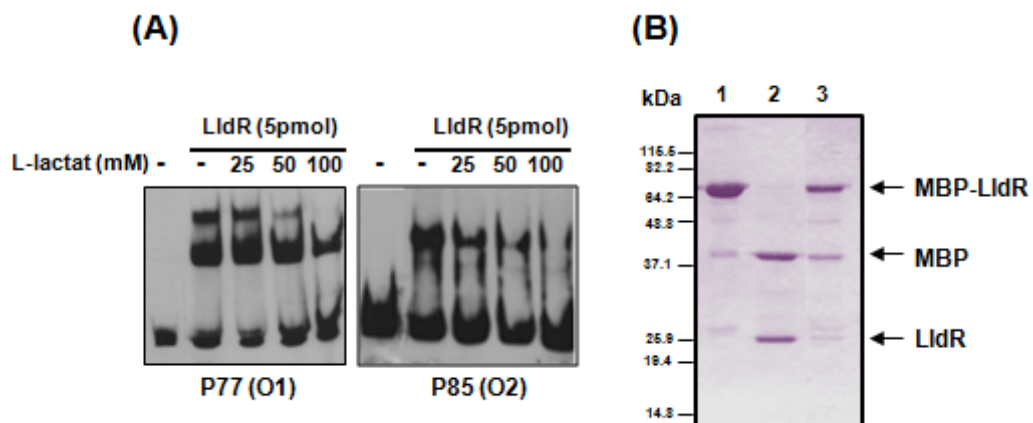


Figura 4.12. Efecte de l'L-lactat sobre la conformació d'LIdR. (A) Assaigs d'EMSA realitzats amb les sondes de DNA indicades marcades amb digoxigenina. Les sondes P77 o P85 es van afegir a les reaccions d'unió amb 5pmol d'LIdR purificat. L'inductor L-lactat es va afegir a cada reacció a la concentració indicada en cada carril. Les reaccions d'unió es van incubar a 30°C durant 15min i seguidament van ser sotmeses a electroforesi en gel de poliacrilamida. **(B)** Efecte de l'L-lactat en la digestió d'MBP-LIdR amb Factor Xa. Carril 1: MBP-LIdR eluïda de la columna d'amilosa amb maltosa. Carril 2: MBP-LIdR tractada amb Factor Xa en presència d'L-lactat 10mM. Carril 3: MBP-LIdR tractada amb Factor Xa en absència d'L-lactat. S'indiquen les mides corresponents al marcador de pes molecular.

En conjunt, aquests resultats indiquen que l' L-lactat és capaç d'unir-se a la proteïna reguladora de l'operó, LldR, i induir un canvi conformacional que disminueix la seva capacitat d'unió al DNA en el cas de seqüències amb més baixa afinitat (O2), i també la seva capacitat d'oligomeritzar i formar complexos de retardació més grans (O1).

Com a conseqüència d'aquests canvis, la presència d'L-lactat anul·la la repressió de la transcripció, ja sigui perquè provoca la dissociació d'LldR-O2, o bé perquè evita la interacció entre dos dímers d'LldR, cada un d'ells unit a un dels operadors. Aquesta hipòtesi és congruent amb la formació d'un bucle de DNA que reprimeixi la transcripció en absència d'L-lactat, tal i com es discuteix més endavant.

4.1.8. FUNCIO DELS DOS OPERADORS RECONEGUTS PER LldR EN EL CONTROL TRANSCRIPCIONAL DE L'OPERÓ *lldPRD*

Per tal d'analitzar la participació *in vivo* dels operadors O1 i O2 en la regulació de l'operó *lldPRD*, es van construir fusions transcripcionals al gen *lacZ* que contenien diferents mutacions que alteraven les seqüències dels operadors o la distància entre ells. Com a punt de referència es va prendre la construcció que comprèn les posicions -131 a +177, ja que anteriorment ja havíem determinat que tots els elements en *cis* que participen en la regulació de l'operó *lldPRD* en presència d'L-lactat es troben en aquesta regió (Fig. 4.3) Aquestes fusions transcripcionals es van transferir a la soca MC4100 en forma de còpia única i l'expressió de l'operó va ser estudiada mitjançant la mesura de l'activitat β -galactosidasa en diferents condicions de cultiu.

Les mutacions corresponents a les sondes de DNA usades en els estudis d'EMSA van ser introduïdes en les fusions transcripcionals corresponents a la construcció -131. Concretament, a la figura 4.13 es mostren els resultats obtinguts per les fusions transcripcionals corresponents a les mutacions presents en les sondes P77*a i P85*b (construccions 2 i 3).

Les mutacions introduïdes en l'operador O1 (Fig. 4.13, construcció 2) van anul·lar la inducció de l'operó en cultius en L-lactat. Aquest resultat confirma que O1 està implicat en la inducció de la transcripció mediada per la unió d'LldR, en presència d'L-lactat. A més a més, aquestes mutacions en O1 van provocar que el nivell basal de transcripció en absència d'L-lactat augmentés fins a tres vegades. Això indica que, addicionalment al seu paper activador, O1 pot estar implicat en la repressió de l'operó en condicions basals, no inductores. Aquest mateix resultat es va obtenir quan es va introduir la mutació corresponent a la sonda P77*b en la fusió transcripcional (resultat no mostrat). En canvi, la mutació introduïda a O2 (Fig. 4.13, construcció 3), no va afectar al nivell d'inducció de l'operó en presència d'L-lactat. Per tant, O2 no és necessari per a l'activació de la transcripció de l'operó en condicions inductores. Tal i com s'havia observat amb l'operador O1, l'activitat β -galactosidasa de la fusió transcripcional amb la mutació en O2 va augmentar tres vegades en condicions basals (cultius en CAA). El mateix patró d'expressió es va obtenir quan es va introduir la mutació corresponent a la sonda P85*a (resultat no mostrat).

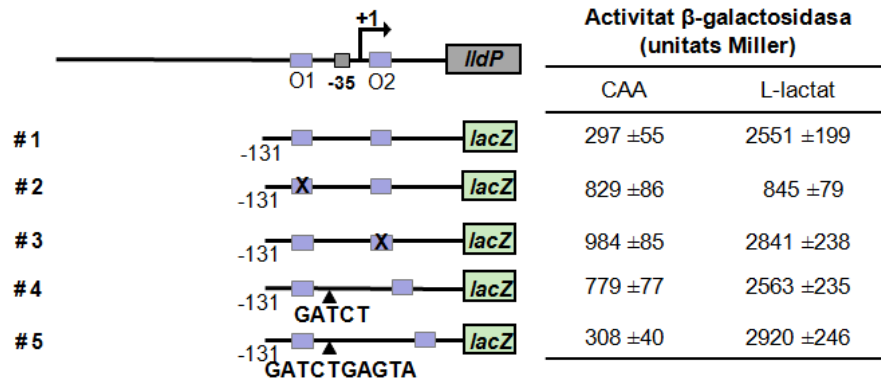


Figura 4.13. Efecte de les mutacions i insercions introduïdes en les fusions transcripcionals d'*lldP* al gen *lacZ*. Els dos operadors, O1 i O2, es troben representats per requadres grisos. La seqüència -35 és la identificada en aquesta tesi. Les diferents construccions es mostren a sota del diagrama superior i la numeració respecte a l'inici de transcripció es mostra a l'esquerra. Les mutacions en O1 i O2 s'indiquen amb una creu sobre el requadre gris corresponent. Les insercions de 5bp o 10bp entre els dos operadors s'indiquen a les construccions 4 i 5. Aquests fragments de DNA es van fusionar al gen *lacZ* i es van introduir com a còpia única a la soca MC4100. Els valors d'activitat β-galactosidasa corresponents a cada construcció s'indiquen a la taula de la dreta i es troben expressats com a mitjana ±SD.

En conjunt, aquests resultats demostren que tant O1 com O2 són necessaris per a la repressió de la transcripció de l'operó *lldPRD* en condicions no inductores, és a dir, en absència d'L-lactat en el medi, mentre que només O1 és necessari en el mecanisme d'inducció en presència d'L-lactat.

4.1.9. EFECTE DE CANVIAR LA FASE HELICOÏDAL ENTRE ELS DOS OPERADORS D'LldR

Els resultats presentats fins aquest moment indicaven que la repressió completa de la transcripció de l'operó *lldPRD* en condicions no inductores requereix que els dos operadors estiguin ocupats per LldR. Aquest fet probablement resulta en la formació d'un bucle de DNA mitjançant la interacció entre les molècules d'LldR unides a cadascun dels operadors. Aquest tipus de repressió mitjançant la formació d'un bucle de DNA ja ha estat descrita anteriorment en altres sistemes gènics en *E. coli*, com per exemple en els operons *ara*, *gal*, *lac* i *deo* (Mathews, 1992) i així mateix ha estat proposat per altres membres de la família de GntR (Peekhaus i Conway, 1998).

Amb l'objectiu de comprovar si un canvi en la fase helicoidal dels operadors O1 i O2 afecta a la repressió de la transcripció de l'operó *lldPRD*, es van construir fusions de promotor al gen *lacZ* en les que es va insertar una seqüència de 5bp o 10bp entre els dos operadors, de manera que es canviava la seva orientació angular (5bp) o es restaurava (10bp). Aquestes construccions es van introduir en forma de còpia única a la soca MC4100 i l'expressió de l'operó es va determinar mitjançant la mesura de l'activitat β-galactosidasa.

Tal i com es mostra a la figura 4.13 (construcció 4), la construcció en la qual s'havien afegit 5bp presentava una transcripció basal en CAA augmentada, mentre que es mantenia la inducció per L-lactat. Aquests fet és coherent amb la hipòtesi que canviar la orientació angular entre O1 i O2 impediria la formació d'un bucle de DNA entre les molècules d'LldR unides als operadors, i per tant s'impediria la repressió de la transcripció en condicions basals. A més, aquest resultat també està d'acord amb les observacions prèvies de que només les mutacions en O1 eliminen la inducció en L-lactat.

Respecte la construcció en que s'havien insertat 10bp (Fig. 4.13, construcció 5), i en la que per tant l'orientació angular dels operadors es trobava restablerta, no es va modificar el patró d'expressió del gen reporter *lacZ*. Els nivells d'activitat β -galactosidasa obtinguts en aquest cas eren del mateix ordre que en la fusió control sense modificacions. Això recolza la hipòtesi de la formació d'un bucle de DNA entre les molècules d'LldR unides a O1 i O2 a la mateixa cara de l'hèlix de DNA, la qual cosa porta a la repressió de l'operó en absència d'L-lactat.

Degut a la mida d'aquest bucle, altres factors podrien contribuir a la seva estabilització. Està descrit que l'estabilització de bucles de DNA superiors a 50-80bp requereix de la participació de proteïnes addicionals com H-NS, IHF, HU o FIS que facilitarien la curvatura del DNA (Semsey *i col*, 2005). En aquest treball s'ha analitzat l'efecte de mutacions en les proteïnes H-NS i IHF en l'expressió de l'operó *lldPRD*. Es pot descartar la contribució d'IHF i H-NS en la formació del bucle, ja que el patró d'expressió de $\Phi(lldP-lacZ)$ en una soca portadora de mutacions en els gens que codifiquen IHF (*himA::cat* i *himD::cat*) o H-NS (*trp::Tn10Δhns*) no era diferent del patró presentat per la soca tipus salvatge. Aquests resultats es van confirmar en assaigs d'EMSA amb extractes cel·lulars d'aquestes soques mutants i la sonda P190, els quals no van mostrar la desaparició de cap dels complexos de retardació formats en el cas de la soca de tipus salvatge (resultats no mostrats).

Alternativament, es poden considerar altres mecanismes que portin a la repressió en condicions basals quan tots dos operadors estan ocupats per LldR. Per exemple, que dos dímers units als operadors orientats en la mateixa cara de l'hèlix de DNA actuïn sinèrgicament per reprimir la transcripció. En aquest model, no hi hauria interacció directe entre els dos dímers, però degut a la distància entre O1 i O2 (100bp), seria igualment necessària la participació d'altres proteïnes per una interacció sinèrgica efectiva entre les molècules d'LldR.

4.1.10. MODEL DE REGULACIÓ DE L'OPERÓ *lldPRD*

Considerant el conjunt de resultats obtinguts dels estudis de regulació de l'operó *lldPRD*, s'ha demostrat que el regulador transcripcional LldR té una funció dual com a activador i com a repressor de la transcripció d'aquest sistema gènic, segons hi hagi o no L-lactat en el medi.

A partir d'aquests resultats, es pot construir un model de regulació de l'operó *lldPRD* per part d'LldR (Fig. 4.14).

Quan no hi ha L-lactat en el medi, la proteïna LldR s'uneix tant a O1 com a O2. Donat que LldR presenta diferents afinitats per cadascun dels operadors, un dímer d'LldR unit a O1 podria facilitar la unió d'un altre dímer a O2. Se sap que la ocupació *in vivo* del lloc d'unió de menor afinitat (O2 en aquest model) es troba molt

sovint associada a la cooperació d'interaccions proteïna-proteïna (Semsey *i col*, 2005). Aquest mecanisme incrementa la concentració local de proteïna, la qual cosa facilita la unió al lloc menys afí. Això probablement porta a la formació d'un bucle i a la repressió de la transcripció. L'anàlisi de fusions transcripcionals al gen *lacZ* en el mutant $\Delta//dR$ (soca JA218) i de fusions amb mutacions en O1 i O2 en la soca de tipus salvatge (Fig. 4.13, construcció 2 i 3), demostren que és necessària la ocupació de tots dos operadors per a una repressió efectiva de la transcripció en condicions basals, en absència d'L-lactat. La formació d'un bucle entre aquests dos operadors ocupats per LldR s'ha demostrat canviant la orientació d'una de les seqüències respecte l'altra i analitzant el patró d'expressió de l'operó. S'ha observat que és necessària una orientació específica entre O1 i O2 per produir la repressió de la transcripció, probablement degut a que és necessària la interacció entre dímers d'LldR units als dos operadors i la formació d'un bucle de DNA entre ells (Fig. 4.13, construccions 4 i 5). Degut a la mida del bucle, altres factors podrien contribuir a la seva estabilització. En aquest treball ja s'ha descartat la participació de les proteïnes estructurals IHF i H-NS en aquest mecanisme, però altres proteïnes com HU i FIS podrien estar implicades.

En presència d'L-lactat en el medi, la unió d'aquest efector al domini C-terminal d'LldR provoca un canvi conformacional que porta a la desestabilització del bucle, de manera que es pot formar el complex obert de transcripció. Els assaigs d'EMSA en presència d'L-lactat han revelat que aquesta molècula és capaç de modificar el nombre de complexos de retardació que es formen amb les sondes P77 i P85, que contenen O1 i O2 respectivament. Així, en presència d'L-lactat, LldR és encara capaç d'unir-se a O1. Aquesta unió és imprescindible per a la inducció de la transcripció en presència de la molècula inductora, tal i com es dedueix de l'anàlisi de la fusió transcripcional $\Phi(//dP-lacZ)$ en el fons genòmic del mutant $\Delta//dR$ (soca JA218) i de la fusió transcripcional amb mutacions en O1 en la soca de tipus salvatge (Fig. 4.13, construcció 2). Tanmateix, la conformació que adopta LldR en presència d'L-lactat disminueix la seva capacitat d'oligomeritzar amb altres molècules d'LldR, ja que en els resultats dels assaigs EMSA en aquestes condicions no s'observa un segon complex de retardació (Fig. 4.12A). Com a conseqüència, és probable que el bucle de DNA que reprimeix la transcripció en condicions basals es desestabilitzi, ja que LldR unit a O1 no podria interaccionar amb LldR unit a O2. A més, també hem observat que en presència d'L-lactat, la molècula d'LldR unida a O2 també disminueix la seva afinitat per l'operador. Pels resultats obtinguts dels assaigs de l'expressió de l'operó *//dPRD* mitjançant fusions transcripcionals al gen *lacZ*, sabem que la unió d'LldR a O2 no és necessària per a la inducció de la transcripció en presència d'L-lactat (Fig. 4.13, construcció 3). En aquesta situació, LldR unit a O1, probablement com a dímer, podria interaccionar amb l'RNA polimerasa o altres reguladors transcripcionals per induir la transcripció de l'operó *//dPRD*.

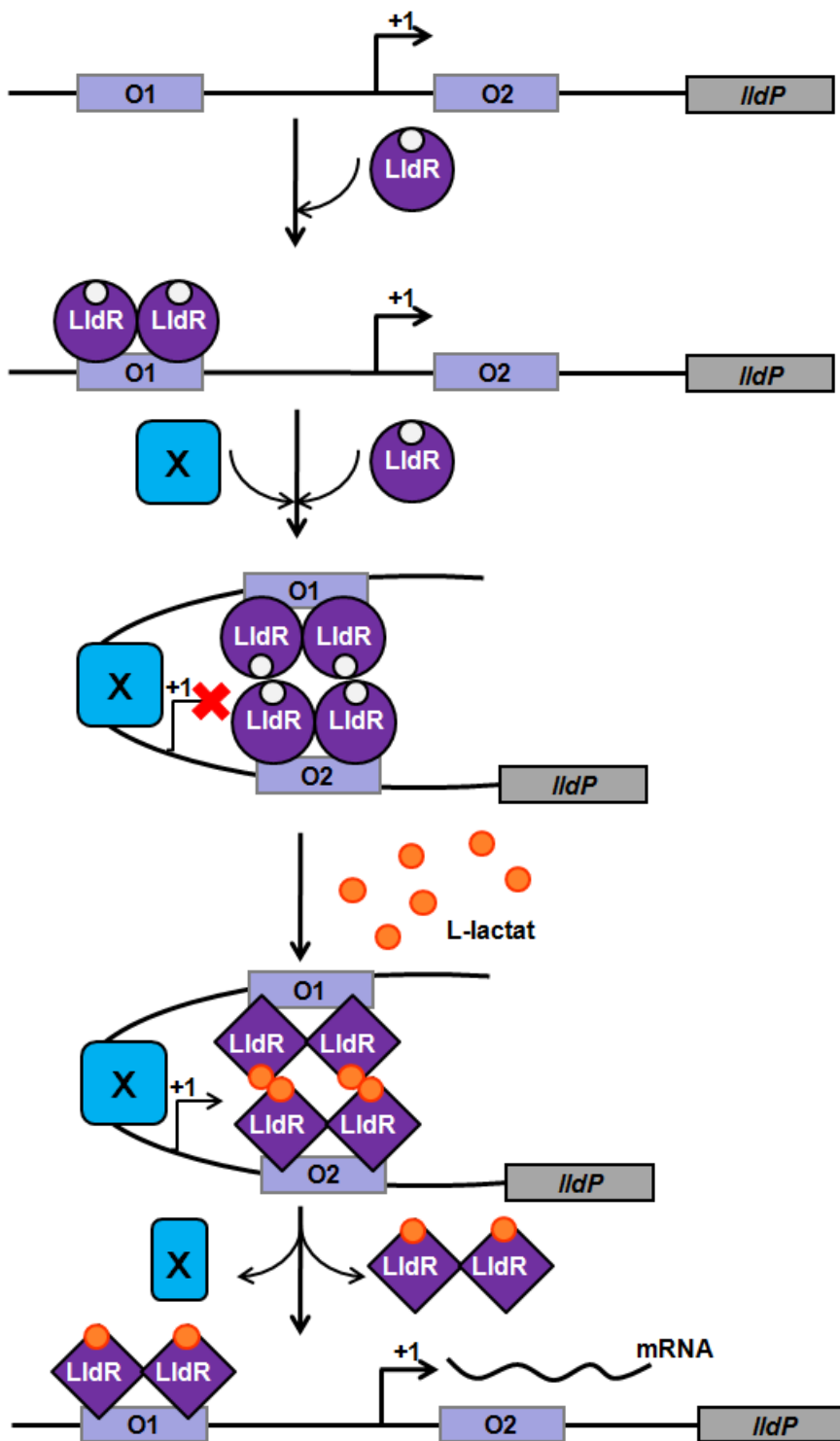


Figura 4.14. Model proposat per la regulació de l'expressió de l'operó *lldPRD* per part de la proteïna reguladora *LldR*. En absència d'L-lactat, *LldR* s'uneix a *O1*, i facilita la unió d'*LldR* a *O2*. La formació d'un bucle de DNA gràcies a la interacció entre dos dímers d'*LldR* units a cada un dels operadors en aquestes condicions reprimeix la transcripció de l'operó en absència de l'inductor. És possible que sigui necessària la participació d'altres proteïnes estructurals per a la formació del bucle. En presència d'L-lactat, *LldR* pateix un canvi de conformació que porta a la dissociació de la interacció entre *O1* i *O2* a través d'*LldR*. *LldR* es manté unit a *O1*, però la unió a *O2* ja no es necessita. En aquesta situació, és possible la transcripció de l'operó *lldPRD* a través de la interacció d'*LldR* amb el *O1* i les proteïnes de la maquinària de la transcripció.

4.1.11. L'AUGMENT D'EXPRESSIÓ D'*lIdPRD* EN BACTERIS EHEC ADHERITS A CÈL·LULES Caco-2 CONTRIBUEIX A L'ADAPTACIÓ METABÒLICA EN AQUEST NOU HABITAT

El coneixement de la regulació de l'operó *lIdPRD* resulta d'interès en el context de l'adaptació dels bacteris als diferents hàbitats, com és l'epiteli intestinal. En aquest sentit, l'estudi per RT-PCR de l'expressió dels gens *lIdR* i *lIdP* en EHEC adherits a membranes de cèl·lules Caco-2 (RESULTATS I DISCUSSIÓ 4.1.1) mostra que el gen regulador de l'operó està sobreexpressat en els bacteris adherits respecte als bacteris lliures en el medi. Com ja s'ha discutit anteriorment, el fet que només el gen regulador, i no el gen que codifica la permeasa es trobi sobreexpressat, pot ser degut a diferències en l'estabilitat dels diferents segments de l'mRNA policistrònic.

La sobreexpressió del gen *lIdR*, i per tant l'operó *lIdPRD*, en bacteris adherits podria ser deguda a què en la superfície intestinal hi ha un augment local de la concentració d'L-lactat degut al metabolisme anaeròbic de la glucosa per part dels enteròcits que induiria l'operó *lIdPRD*. Aquest augment local d'L-lactat no estaria doncs afectant als bacteris planctònics, que tindrien un nivell molt baix d'expressió de l'operó, ja que el medi DMEM, en el qual s'han dut a terme les infeccions de cèl·lules Caco-2, té un alt contingut de glucosa, que com ja s'ha comentat, reprimeix l'expressió de l'operó.

Així doncs, la regulació de l'operó *lIdPRD* és un exemple de com els bacteris que es troben adherits a les cèl·lules intestinals s'estarien adaptant a aquest nou hàbitat mitjançant la utilització d'una font de carboni produïda per l'hoste, i d'aquesta manera augmentant els seus recursos per sobreviure. Així, la regulació del metabolisme de l'L-lactat contribuiria a l'establiment d'una relació entre l'enterobacteri i l'enteròcit, no només en el cas de les soques patògenes, sinó també de les soques no patògenes que poden colonitzar el tracte intestinal de mamífers.

4.2. SECRECIÓ DE GAPDH EN *E. coli* I LA SEVA IMPLICACIÓ EN LA INTERACCIÓ AMB L'HOSTE.

4.2.1. CARACTERITZACIÓ DE LA SECRECIÓ DE GAPDH

L'enzim de la glicòlisi GAPDH és una proteïna *housekeeping* d'expressió constitutiva, tradicionalment considerat de funció exclusivament metabòlica. Diferents autors, però, han demostrat que determinats enzims de la glicòlisi poden dur a terme una gran varietat de funcions (Jeffery, 2009). A més, és de destacar que hi ha un gran nombre de descripcions que mostren que aquests enzims clàssicament citoplasmàtics es troben a la superfície de diferents microorganismes. En la majoria de casos aquests organismes posseeixen o bé només una membrana externa o bé membrana i paret cel·lular com és el cas dels bacteris grampositius. Tanmateix, tals descripcions són escasses en bacteris gramnegatius (INTRODUCCIÓ 1.3).

Estudis previs del grup en el qual s'ha realitzat aquesta tesi doctoral havien demostrat per primera vegada que la GAPDH també és secretada i es localitza a la superfície cel·lular en bacteris gramnegatius, concretament en les soques patògenes EHEC i EPEC (Egea, 2006; Egea *i col*, 2007). En aquest treball, s'ha aprofundit en l'estudi dels mecanismes de secreció de GAPDH en soques EHEC i EPEC, i en altres soques no patògenes.

4.2.1.1. Localització subcel·lular de GAPDH en soques EHEC i EPEC

Estudis previs havien demostrat la localització extracel·lular de GAPDH en soques EHEC i EPEC crescudes en medi DMEM. La proteïna és secretada en una forma enzimàticament activa. Així mateix, la localització en la superfície cel·lular es va demostrar per immunolocalització de la proteïna i observació per microscòpia (Egea, 2006; Egea *i col*, 2007).

En aquest treball, es va plantejar estudiar la localització subcel·lular de GAPDH en soques EHEC i EPEC. Amb aquest objectiu, es van realitzar cultius d'aquestes soques en medi DMEM a 37°C sense agitació durant 8h. Passat aquest temps, les cèl·lules es van recollir per centrifugació i es va procedir al seu processament per crioultramicrotomia (MÈTODES 3.6.1). Posteriorment, la GAPDH es va localitzar en els diferents compartiments subcel·lulars mitjançant immunodetecció amb un anticòs específic anti-GAPDH (MÈTODES 3.6.2) seguit d'un anticòs secundari conjugat a or col·loïdal i subseqüent observació al microscopi electrònic. A la figura 4.15 es mostren imatges representatives dels resultats obtinguts.

En aquestes preparacions s'observa que tant la membrana interna com la membrana externa es van conservar bé estructuralment durant el processament de la mostra. La immunocitoquímica va revelar partícules d'or col·loïdal en el citoplasma (d'acord amb la funció glicolítica intracel·lular de l'enzim), i també en la membrana interna, en el periplasma i la membrana externa. Les mostres control, obtingudes ometent la incubació amb l'anticòs anti-GAPDH, no presentaven cap marcatge (no mostrat). Aquests resultats suggereixen que existeix un trànsit de GAPDH des de l'interior de la cèl·lula cap a l'exterior de la mateixa, confirmant un procés de secreció de GAPDH al medi extracel·lular.

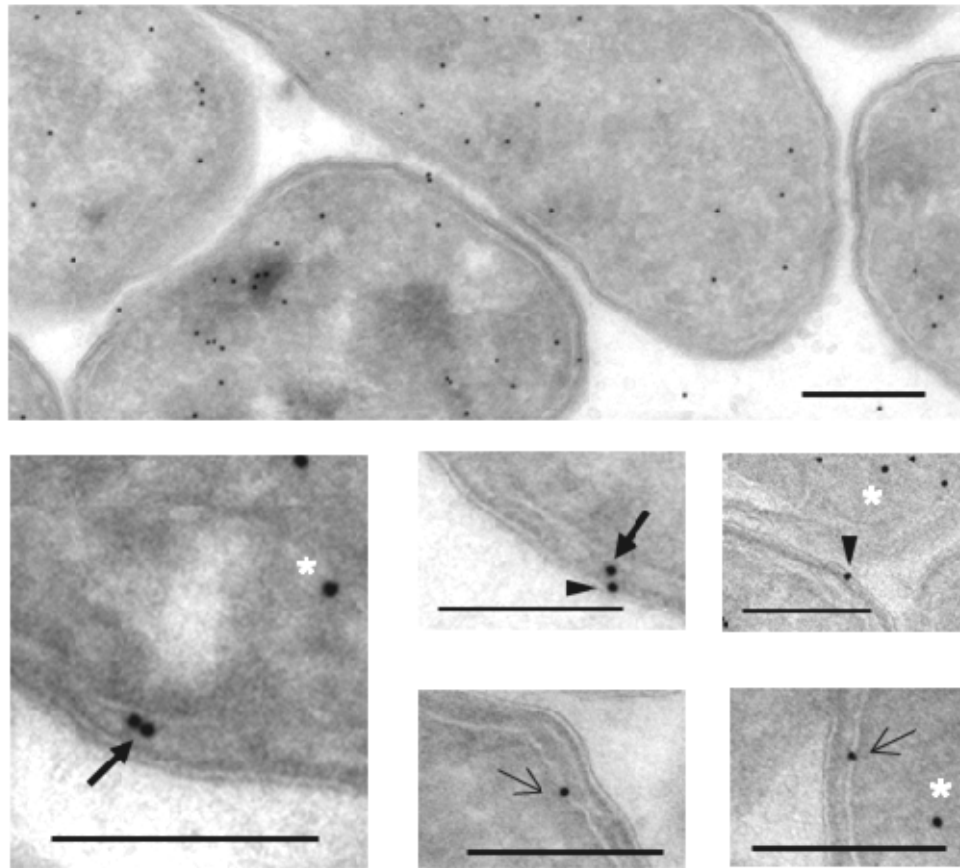


Figura 4.15. Localització subcel·lular de GAPDH en bacteris EHEC. Els cultius de la soca EHEC es van fixar i processar per crioultramicrotomia tal i com es descriu a MÈTODES 3.6. Les partícules d'or col·loïdal, corresponents a la detecció de GAPDH, es van localitzar en el citoplasma de les cèl·lules bacterianes (asteriscs blancs), en la membrana interna (fletxes primes), en l'espai periplasmàtic (fletxes gruixudes) i a la superfície de la membrana externa (triangles negres). La barra a cada imatge correspon a 200nm.

Per tal de corroborar els resultats obtinguts per immunolocalització, es va realitzar un fraccionament de cèl·lules d'EHEC recollides a partir dels mateixos cultius estudiats per microscòpia. Es va obtenir la fracció de membrana, periplasma i citoplasma dels bacteris d'acord amb el procés detallat a MÈTODES 3.4.5 i es va analitzar la presència de GAPDH en cada una de les fraccions per *Western Blot* (MÈTODES 3.4.13). La proteïna GAPDH es va detectar amb un anticòs específic anti-GAPDH, i la possible contaminació citosòlica en les fraccions de membrana i periplasma es va avaluar amb un anticòs que reconeix específicament la proteïna citoplasmàtica H-NS.

Tal i com es mostra a la figura 4.16, es va detectar GAPDH en tots els compartiments cel·lulars analitzats. L'absència d'H-NS en les fraccions de membrana i periplasma descarta que la detecció de GAPDH en aquestes fraccions es degui a contaminació citosòlica. Aquest resultat confirma l'existència d'un procés de secreció de GAPDH al medi extracel·lular, tal i com indicava el resultat obtingut per immunocitoquímica.

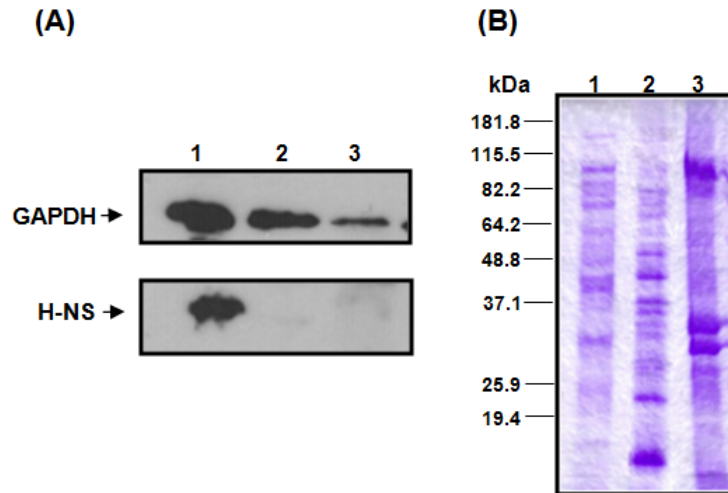


Figura 4.16. Localització subcel·lular de GAPDH en EHEC. Les cèl·lules d'EHEC cultivades en DMEM durant 8h a 37°C es van recollir i fraccionar tal i com es descriu a mètodes 3.4.5. Carril 1: fracció citoplasmàtica. Carril 2: fracció de periplasma. Carril 3: fracció de membrana. **(A)** Anàlisi per *Western Blot* de les fraccions obtingudes. Per aquest anàlisi es va emprar un anticòs específic anti-GAPDH, i la contaminació citosòlica es va descartar amb un anticòs anti-H-NS. **(B)** Anàlisi electroforètic de les fraccions obtingudes. Les proteïnes es van visualitzar mitjançant tinció amb Blau de Coomassie®.

4.2.1.2. Anàlisi de les condicions de secreció de GAPDH en soques EHEC i EPEC

En estudis previs es va demostrar que la proteïna GAPDH és secretada per les soques EHEC i EPEC en medis de cultiu eucariota (DMEM i F-12) a 37°C, però no en medi bacteriològic mínim (SM) amb glucosa 20mM com a única font de carboni. La cinètica de secreció en aquestes condicions va mostrar que la secreció de GAPDH s'inicia a les 4h de cultiu en la soca EPEC, i a partir de les 6h en la soca EHEC. A més, aquest procés és independent del pH final del cultiu i de les condicions d'aireació (Egea, 2006; Egea *i col*, 2007).

En aquest treball s'ha analitzat més detalladament el procés de secreció de GAPDH en soques EHEC i EPEC en diferents condicions de cultiu.

Amb aquest objectiu, es van realitzar cultius de les soques EHEC i EPEC en medi DMEM, F-12, LB i SM-glucosa 20mM, a 37°C i 30°C sense aireació en un incubador de CO₂. Passat el temps de cultiu (8h), les cèl·lules es van recollir per centrifugació i els sobrenedants es van filtrar i concentrar (MÈTODES 3.4.4). Les mostres així obtingudes es van analitzar per *Western Blot* amb un anticòs específic anti-GAPDH. Com a control de contaminació citosòlica, les mostres també es van analitzar amb un anticòs contra la proteïna intracel·lular H-NS. Com es pot observar a la figura 4.17, es va detectar GAPDH als sobrenedants de cultius d'EHEC i EPEC en medi eucariota DMEM i F-12, i també en el medi de cultiu bacteriològic LB. Tanmateix, no es va detectar secreció de GAPDH en medi mínim SM-glucosa. En aquests experiments també es va observar que la secreció de GAPDH es produïa a 37°C, però no a 30°C. En cap de les mostres de sobrenedant es va detectar contaminació citosòlica amb l'anticòs anti-H-NS.

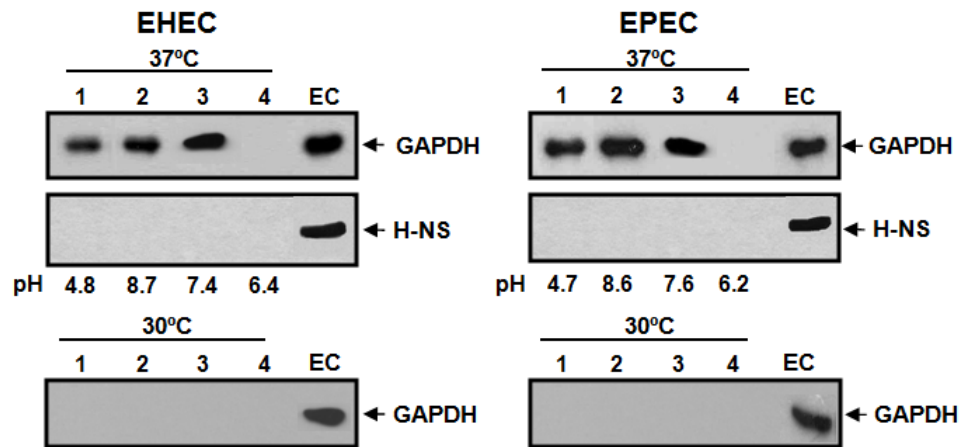


Figura 4.17. Anàlisi de la secreció de GAPDH per *Western Blot* amb anticossos específics anti-GAPDH. Com a control de contaminació citosòlica es va emprar un anticòs anti-H-NS. Les soques EHEC i EPEC es van incubar a 30 o 37°C durant 8h en medi DMEM (carril 1), Ham's F-12 (carril 2), LB (carril 3), o SM-glucosa 20mM (carril 4). Per cada medi s'indica el pH final del cultiu. EC: extracte cel·lular total (5µg).

Aquests resultats confirmen que la proteïna GAPDH és secretada al medi per part dels patògens gramnegatius EHEC i EPEC crescuts en medi de cultiu eucariota i en LB a 37°C. S'ha descartat que aquest resultat sigui artefactual degut a lisi cel·lular, ja que no s'ha detectat la presència de la proteïna intracel·lular H-NS en els sobrenedants analitzats. La temperatura de cultiu és un dels factors que afecta al procés de secreció. Com ja han descrit altres autors, els patògens secreten diferents proteïnes (factors de virulència) a 37°C, però aquesta secreció no es produeix a 30°C (Kenny *et al.*, 1997).

Així mateix, s'ha observat que la secreció pot dependre de la composició del medi de cultiu. Donat que tant el medi DMEM com l'SM contenen la mateixa concentració de glucosa i que la velocitat de creixement és semblant en els dos medis, les diferències en la secreció de GAPDH no es poden atribuir a la glucosa. Per tal de determinar quins factors de la composició del medi podrien afectar a la secreció de la proteïna, es van realitzar cultius d'EHEC en els medis anteriors, i en els mateixos medis modificats en algun dels seus components. Concretament, es va analitzar la secreció de GAPDH en funció del contingut d'amoni inorgànic, fosfat, ferro o aminoàcids del medi. El resultat obtingut dels assaigs de *Western Blot* dels sobrenedants obtinguts d'aquests cultius es mostra a la figura 4.18.

CARRIL:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MEDI:	DMEM	F-12	LB	LB +N	SM-glu	SM-glu +ad	SM-glu +glut	LB +P	MT-glu	SM- CAA
Amoni (mM)	-	-	-	20	20	-	-	-	20	20
Fosfat (mM)	0.9	1	-	-	100	100	100	100	2	100
Ferro (µM)	0.3	3	17	17	1	1	1	17	3	1
Aminoàcids	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+

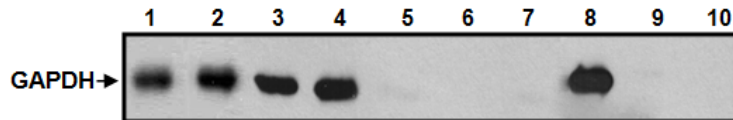


Figura 4.18. Anàlisi per *Western Blot* de la secreció de GAPDH en la soca EHEC en diferents medis. Els cultius es van realitzar en els medis indicats durant 8h a 37°C. Els sobrenedants obtinguts es van filtrar i precipitar amb TCA. Cada carril correspon a un cultiu en un medi determinat. El medi de cada carril i el seu contingut en els components analitzats es mostra en la taula de la part superior. glu: glucosa; ad: adenina; glut: glutamina.

En relació amb el contingut d'amoni, el medi LB no en conté, mentre que el medi SM té una concentració de 20mM amoni. Així doncs, es van preparar cultius de la soca EHEC en medi LB addicionat d'amoni 20mM (Fig. 4.18, carril 4), i en SM en el qual l'amoni havia estat substituït per una altra font de nitrogen (adenina o glutamina, fig. 4.18, carrils 6 i 7). L'anàlisi dels sobrenedants per *Western Blot* va mostrar que les diferències en el contingut d'amoni o el seu origen no és un factor que afecti a la secreció de GAPDH. Aquesta té lloc en medi LB, independentment de la presència o absència d'amoni, i no es va detectar secreció en els sobrenedants obtinguts en medi SM addicionat de glutamina o adenina.

Quant al contingut de fosfat, tant els medis de cultiu eucariota com l'LB tenen un baix contingut de fosfat (Fig. 4.18, carril 3), mentre que el medi mínim SM té una concentració de fosfat de 100mM (Fig. 4.18, carril 5). Per tal d'analitzar si la secreció de GAPDH és un procés regulat pel nivell de fosfat, es van obtenir sobrenedants de cultius d'EHEC en un medi mínim amb baix contingut de fosfat (MT, Fig. 4.18, carril 9). Així mateix, es va realitzar també un cultiu en medi LB en presència de fosfat 100mM (Fig. 4.18, carril 8). Aquest component no va modificar la secreció de GAPDH, ja que no es va detectar aquesta proteïna en els sobrenedants de medi mínim amb un baix contingut de fosfat, i sí es va detectar en els sobrenedants d'LB addicionat amb fosfat.

En relació amb el contingut de ferro, podem observar que els dos medis de cultiu eucariota, DMEM i F-12 (Fig. 4.18, carril 1 i 2), tenen una baixa concentració de ferro. En canvi, el medi LB conté entre 5 i 50 vegades més de ferro (Fig. 4.18, carril 3), però tanmateix, en tots 3 medis es produeix la secreció de GAPDH. Aquests resultats indiquen que el ferro no seria un factor determinant en la secreció de GAPDH en la soca EHEC.

Finalment, es va analitzar la secreció de GAPDH segons la presència o absència d'aminoàcids en el medi, ja que tots dos medis de cultiu eucariota contenen sèrum i aminoàcids essencials, i dos dels components de l'LB són triptona i extracte

de llevat (Fig. 4.18, carril 1, 2 i 3). En canvi, els medis mínims no contenen aminoàcids. Així doncs, es van obtenir sobrenedants de cultius d'EHEC en medi mínim SM amb CAA (hidrolitzat de caseïna) com a font de carboni i aminoàcids (Fig. 4.18, carril 10). Aquesta modificació del medi tampoc va tenir cap efecte sobre la secreció de GAPDH, indicant que la presència d'aminoàcids en el medi no és un factor determinant per la secreció de GAPDH.

En conjunt, aquesta anàlisi indica que la secreció de GAPDH en la soca EHEC depèn del medi de cultiu, però el contingut d'amoni, fosfat, ferro o aminoàcids no són factors reguladors del procés de secreció.

4.2.1.3. La GAPDH no és secretada per vesícules de membrana externa

La secreció de proteïnes és el mecanisme principal pel qual els patògens es comuniquen amb i intoxiquen la cèl·lula hoste. La secreció d'aquests factors per part de microorganismes gramnegatius és més complicat pel fet que la seva coberta està formada per dues bicapes lipídiques amb un espai periplasmàtic entre elles. Per aquesta raó, aquests bacteris han desenvolupat estratègies per permetre que proteïnes específiques arribin al medi extracel·lular (Saier, 2006). Una d'aquestes estratègies consisteix en un export mediat per vesícules que es desprenen de l'embolcall dels bacteris gramnegatius en creixement. Les vesícules de membrana externa (OMV) contenen proteïnes, lipopolisacàrid, fosfolípids, DNA i constituents periplasmàtics (Beveridge, 1999). Diversos factors de virulència com proteases, fosfolipases, autolisines o hemolisines són secretades per aquesta via (Balsalobre *i col*, 2006; Kuehn i Kesty, 2005; Wai *i col*, 2003).

Per tal de comprovar si la secreció de GAPDH estava mediada per OMV de les soques EHEC i EPEC, es van purificar vesícules a partir del sobrenedant de cultius d'aquestes soques en DMEM, segons el protocol descrit a MÈTODES 3.4.6. Es va realitzar una tinció negativa d'aquestes preparacions pel seu anàlisi per microscòpia electrònica. Aquest anàlisi va confirmar que les preparacions obtingudes es trobaven enriquides en vesícules amb un diàmetre entre 25 i 50 nm (Fig. 4.19A). Per estudiar si la secreció de GAPDH es trobava associada a les OMV es van realitzar experiments de *Western Blot* amb mostres derivades del mateix volum de cultiu que en l'anàlisi dels sobrenedants. Les mostres obtingudes van ser: sobrenedant lliure de cèl·lules previ a l'aïllament d'OMV; sobrenedant lliure de cèl·lules posterior a l'aïllament de les OMV per centrifugació, per tant, depleccionat de vesícules; i OMV aïllades per centrifugació. L'anàlisi per *Western Blot* d'aquestes mostres (Fig. 4.19C), va mostrar que la secreció de GAPDH no està associada a les OMV dels bacteris, ja que no es va detectar proteïna en la mostra corresponent a aquesta fracció. En canvi, sí que es va detectar GAPDH en el sobrenedant depleccionat de vesícules, i amb la mateixa intensitat que en el sobrenedant complet, indicant que la secreció de la proteïna tindria lloc majoritàriament en forma de proteïna lliure soluble. Les mostres van ser analitzades també amb un anticòs anti-H-NS per descartar contaminació citosòlica. Els resultats mostrats a la figura 4.19 corresponen a cultius de les soques EHEC i EPEC en medi DMEM. Es van obtenir els mateixos resultats amb cultius de totes dues soques en medi LB (resultats no mostrats).

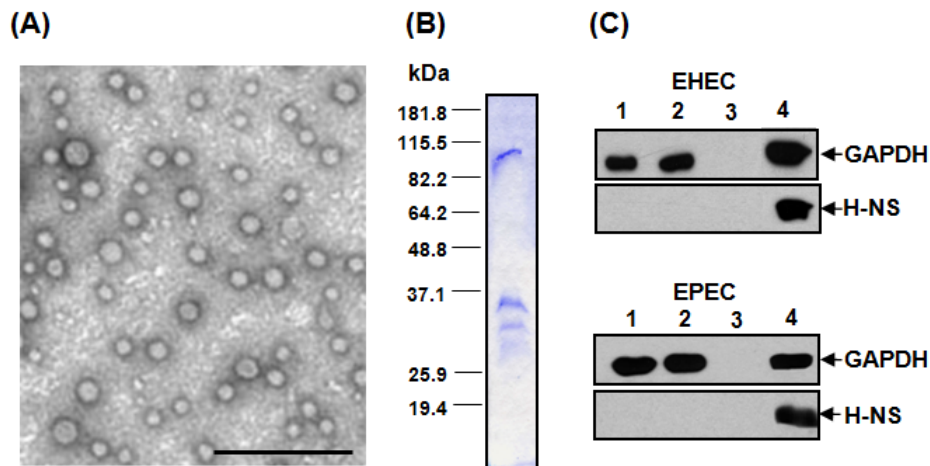


Figura 4.19. Anàlisi de la secreció de GAPDH en OMV. (A) Microscòpia electrònica de vesícules aïllades de cultius d'EHEC en medi DMEM. La barra equival a 200nm. (B) Anàlisi electroforètic d'aquestes vesícules. Les proteïnes es van visualitzar per tinció amb Blau de Coomassie®. (C) Anàlisi per *Western Blot* de mostres extracel·lulars de cultius d'EHEC i EPEC. Carril 1: sobrenedants lliures de cèl·lules concentrats per precipitació amb TCA. Carril 2: Sobrenedant lliure de cèl·lules i depleccionat d'OMV concentrat per precipitació amb TCA. Carril 3: Fracció d'OMV aïllades a partir del sobrenedants. Carril 4: extracte cel·lular total (5µg).

4.2.1.4. Secreció de GAPDH per l'injectisoma (T3aSS) en soques EHEC i EPEC

Les soques patògenes EHEC i EPEC, en la seva illa de patogenicitat LEE, contenen gens específics per a la secreció i translocació de proteïnes a l'interior de la cèl·lula hoste. Les proteïnes codificades per aquests gens conformen el sistema de secreció T3SS de tipus injectisoma. Els gens de l'illa LEE no s'expressen en medi de cultiu bacterià com LB (Ebel *i col*, 1996). Condicions ambientals similars a les de l'entorn en el tracte gastrointestinal, estimulen la secreció de proteïnes en soques d'EPEC (Kenny *i col*, 1997), essent la secreció màxima a 37°C, pH 7 i osmolaritat fisiològica i requerint bicarbonat sòdic, calci i concentracions mil·limolars de ferro.

Donat que la GAPDH era secretada per soques EHEC i EPEC en cultiu en medi DMEM i F-12 (ambdós medis inductors de l'injectisoma), es va estudiar si el sistema T3SS era el responsable de la secreció d'aquesta proteïna en aquestes condicions. Amb aquest objectiu, es va analitzar la secreció de GAPDH en dos mutants derivats de la soca EPEC, les soques CVD452 i UMD864. La soca CVD452 és un mutant $\Delta escN$, gen que codifica l'ATPasa que proporciona l'energia necessària pel procés de secreció, i per tant aquest mutant no és capaç de secretar cap de les proteïnes que són exportades pel T3SS (Jarvis *i col*, 1995). El mutant UMD864 és un mutant $\Delta espB$, proteïna que forma part del complex de translocació de les proteïnes a l'interior de la cèl·lula hoste. S'ha descrit que els mutants en *espB* són incapaços de dur a terme aquesta translocació d'efectors, però sí que mantenen la secreció d'aquestes proteïnes al medi extracel·lular.

Així doncs, es van realitzar cultius sense agitació de les soques EPEC, CV452 i UMD864 en medi DMEM a 37°C durant 8h i o/n. Passat els temps d'incubació, es van recollir les cèl·lules i es va analitzar la presència de GAPDH en el sobrenedant dels

cultius per *Western Blot*. Com a control de lisi cel·lular, aquesta vegada es va fer servir un anticòs específic que reconeix l'enzim intracel·lular β -galactosidasa, i per tant en els cultius es va afegir IPTG 5mM per tal d'induir l'expressió del gen *lacZ*. Els resultats es mostren a la figura 4.20.

En relació amb els cultius en medi DMEM, es va detectar secreció de GAPDH en la soca EPEC tipus salvatge tant a 8h com a 16h. No es va detectar secreció de la proteïna en el cultius de la soca CVD452 ($\Delta escN$) en cap dels dos temps d'incubació, suggerint que el sistema T3SS podria estar implicat en la secreció de GAPDH en medi DMEM. Pel que fa a la soca UMD864 ($\Delta espB$), la secreció de GAPDH no era detectable en cultius de 8h, però sí en cultius o/n. Això concorda amb el fet que aquest mutant presenta un defecte en la translocació de proteïnes a l'hoste, però és capaç de secretar proteïnes a través de l'injectisoma, encara que amb una cinètica més lenta. En conjunt, aquests resultats suggereixen que el T3SS seria responsable de la secreció de GAPDH en les soques EHEC i EPEC incubades en el medi de cultiu eucariota DMEM a 37°C.

Donat que està descrit que l'injectisoma no s'expressa en bacteris creixent en medi LB, es va procedir a analitzar la secreció de GAPDH dels mutants CVD452 i UMD864 en cultius en LB. Com a control positiu de secreció en aquest medi es va emprar la soca parental EPEC tipus salvatge (Fig. 4.20). Com es pot observar, es produeix secreció de GAPDH en la soca de tipus salvatge i en les dues soques mutants ja a les 8h de cultiu. Aquest resultat suggereix que, tot i que el T3SS seria responsable de la secreció de GAPDH en cèl·lules crescudes en DMEM, no ho seria en LB. El fet que no es detecti β -galactosidasa en cap dels sobrenedants, tot i presentar elevats nivells intracel·lulars, demostra que la presència de GAPDH en els sobrenedants en els que es detecta la proteïna respon a un procés de secreció i no a lisi cel·lular.

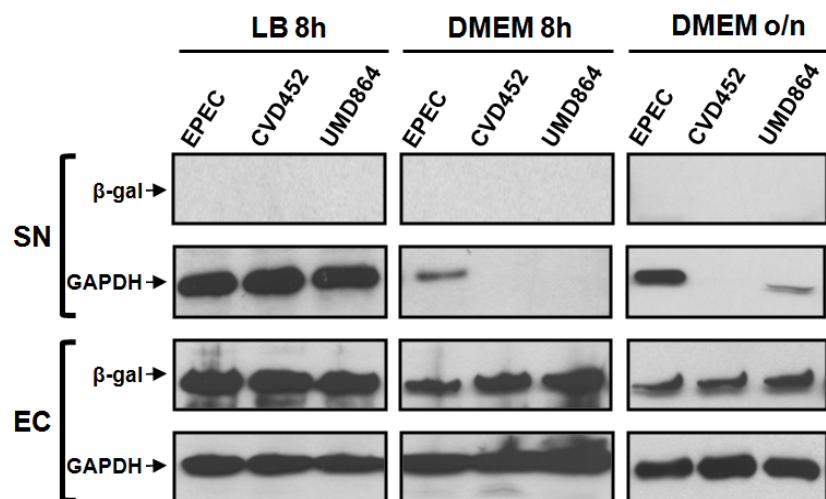


Figura 4.20. Anàlisi de la secreció de GAPDH per *Western Blot* amb anticossos específics anti-GAPDH. Com control de contaminació citosòlica es va emprar un anticòs anti- β -galactosidasa. Les soques EPEC, CVD452 i UMD864 es van incubar a 37°C durant 8h o o/n en medi DMEM o LB. En tots els cultius es va afegir IPTG 5mM com inductor del gen *lacZ*, i es va analitzar l'extracte cel·lular total per comprovar-ne l'expressió. Els sobrenedants obtinguts es van filtrar i precipitar amb TCA. SN:sobrenedant. EC: extracte cel·lular total.

Per tal de confirmar que la falta de secreció de GAPDH en la soca CVD452 és deguda a la mutació en *escN*, es va analitzar la secreció de GAPDH en aquesta soca transformada amb el plàsmid pCVD446, que conté el gen *escN* de tipus salvatge. Es van dur a terme cultius en medi DMEM de les soques EPEC, CVD452 i CVD452 (pCVD446), i la secreció de GAPDH es va analitzar en els sobrenedants per *Western Blot*. En aquests estudis també es va usar l'anticòs anti- β -galactosidasa com a control de contaminació citoplasmàtica. Com es pot observar a la figura 4.21, el plàsmid pCVD446 restaura la secreció de GAPDH per part de la soca CVD452, confirmant la implicació del sistema de secreció T3SS de tipus injectisoma en la secreció de GAPDH en medi DMEM.

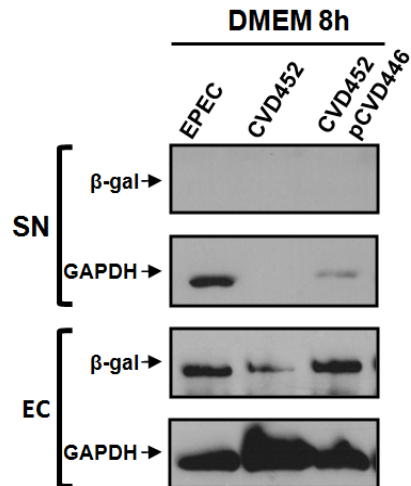


Figura 4.21. Anàlisi de la secreció de GAPDH per *Western Blot* amb anticossos específics anti-GAPDH. Com control de contaminació citosòlica es va emprar un anticòs anti- β -galactosidasa. Les soques EPEC, CVD452 i CVD452 complementada amb el plàsmid pCVD446 es van incubar a 37°C durant 8h en DMEM. En tots els cultius es va afegir IPTG 5mM com inductor del gen *lacZ*, i es va analitzar l'extracte cel·lular total per comprovar-ne l'expressió. Els sobrenedants obtinguts es van filtrar i precipitar amb TCA. SN:sobrenedant. EC: extracte cel·lular total.

Els resultats presentats fins aquest moment indiquen que la secreció de GAPDH en les soques EHEC i EPEC podria produir-se per dos mecanismes diferents segons el medi de cultiu. En medi DMEM, només l'injectisoma estaria actiu, ja que la soca CVD452 (Δ *escN*) no secreta GAPDH en aquest medi. En canvi, aquesta mateixa soca manté la secreció de la proteïna en medi LB, suggerint que hi ha algun altre sistema, actiu en aquests cultius, responsable de la secreció. Cal remarcar que, mentre que el sistema T3SS de tipus injectisoma és un sistema exclusiu de soques patògenes, el sistema alternatiu actiu en LB podria no ser-ho, i per tant, participar en la secreció de GAPDH en altres soques no patògenes.

4.2.1.5. Secreció de GAPDH en soques d'*E. coli* no patògenes i probiòtiques

Per tal de determinar si la secreció de GAPDH en medi LB també es produeix en soques no patògenes, es van preparar cultius de les soques d'*E. coli* TOP10, EcoR26 i Nissle 1917. La primera és una soca de laboratori, que permet la sobreexpressió de proteïnes recombinants mitjançant la inducció amb L-arabina. La soca EcoR26 és un aïllat natural de femta d'un individu sa, i la soca Nissle 1917 és una soca probiòtica aïllada durant la segona guerra mundial i actualment

comercialitzada per Ardeypharm® (INTRODUCCIÓ 1.1.1.2). Es van preparar cultius d'aquestes soques en LB en presència d'IPTG, i les cèl·lules es van recollir en fase exponencial per centrifugació. Els sobrenedants van ser filtrats i processats per determinar la secreció de GAPDH per *Western Blot*. Com a control de contaminació citosòlica es va emprar un anticòs anti- β -galactosidasa.

Els resultats obtinguts es mostren a la figura 4.22. Com es pot observar, cap de les soques analitzades secreta GAPDH en medi DMEM. Això és congruent amb els resultats obtinguts en les soques patògenes, en que el sistema T3SS és l'únic sistema actiu en medi de cultiu eucariota, i per tant les soques que no expressen aquest sistema no secreten GAPDH en medi DMEM.

Pel que fa a la secreció de GAPDH en medi LB, tant la soca de laboratori TOP10 com la probiòtica Nissle 1917 secreten GAPDH en aquest medi. Aquest resultat és compatible amb l'anàlisi de secreció en soques EHEC i EPEC, del que es deduïa un sistema alternatiu responsable de la secreció de GAPDH en LB i diferent de l'injectisoma. Pel que fa a la soca EcoR26, no es detecta secreció de GAPDH en cap dels cultius analitzats.

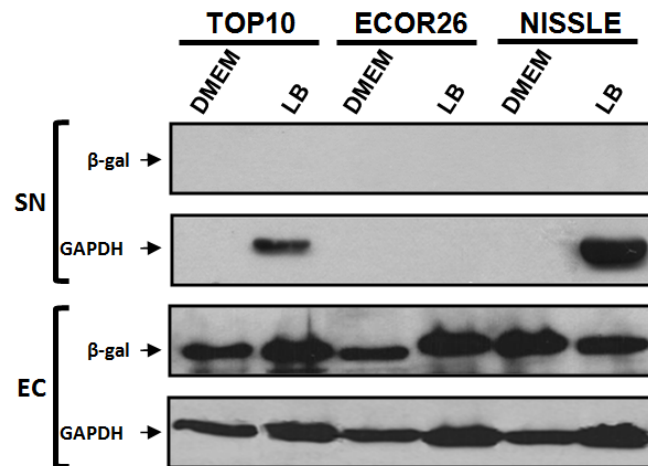


Figura 4.22. Anàlisi de la secreció de GAPDH per *Western Blot* amb anticossos específics anti-GAPDH. Com a control de la contaminació citosòlica es va emprar un anticòs anti- β -galactosidasa. Les soques TOP10, EcoR26 i Nissle 1917 es van fer créixer sense agitació a 37°C durant 8h en medi LB o DMEM. En tots els cultius es va afegir IPTG 5mM com inductor del gen *lacZ*, i es va analitzar l'extracte cel·lular total per comprovar-ne l'expressió. Els sobrenedants obtinguts es van filtrar i precipitar amb TCA, i posteriorment van ser analitzats amb un anticòs específic. SN: sobrenedant. EC: extracte cel·lular total.

Aquests resultats confirmen l'existència de dos mecanismes de secreció de GAPDH diferents segons les condicions de cultiu. El sistema T3SS de tipus injectisoma, sistema exclusiu de soques patògenes, es troba actiu només en medi DMEM. La secreció de GAPDH en medi LB és produïda per un altre mecanisme de secreció encara sense identificar, present també en soques probiòtiques. La manca de secreció en l'aïllat natural EcoR26 podria estar indicant que la secreció de GAPDH constitueix un avantatge en la colonització del tracte intestinal de les soques patògenes i/o probiòtiques respecte a la flora natural de l'intestí de persones sanes. Pel que fa a la secreció en la soca de laboratori, cal remarcar que aquest tipus de soques estan altament modificades i poden tenir desregulats determinats sistemes gènics, que no s'expressen normalment en soques naturals.

4.2.1.6. Consideracions respecte als sistemes que poden estar implicats en la secreció de GAPDH

Els resultats presentats indiquen que la GAPDH és secretada per les soques EHEC i EPEC en medi de cultiu eucariota i medi bacteriològic ric, i que pot romandre associada a la membrana de la cèl·lula. Els estudis de microscòpia han permès localitzar la proteïna en tots els compartiments subcel·lulars, incloent l'espai periplasmàtic i les membranes cel·lulars. S'ha comprovat que la GAPDH alliberada al medi es troba soluble i activa, i no associada a vesícules despreses de la membrana externa dels bacteris durant el cultiu.

En relació amb la identificació del sistema responsable de l'export de GAPDH, les evidències experimentals indiquen l'existència de com a mínim dos sistemes alternatius responsables d'aquest transport. La soca mutant CVD452 ($\Delta escN$) no secreta GAPDH en medi DMEM, indicant que el responsable de la secreció en aquest medi és el sistema T3SS de tipus injectisoma. En canvi, la secreció d'aquesta soca mutant en medi LB no es troba afectada, indicant que existeix un altre sistema alternatiu, diferent del T3SS de tipus injectisoma, responsable de la secreció en medi bacteriològic. El fet que les soques de laboratori TOP10 i la probiòtica Nissle 1917 secretin GAPDH només en LB mostra que aquest segon sistema de transport no es troba restringit a les soques patògenes, i que probablement no s'expressa en medi DMEM.

Així doncs, en aquest treball s'ha identificat el sistema T3SS com a responsable del transport de GAPDH en DMEM en les soques patògenes. Manca identificar el segon sistema alternatiu per a la secreció en medi bacteriològic ric. Tenint en compte les característiques de cada sistema de secreció (INTRODUCCIÓ 1.2.2), però, es poden plantejar algunes hipòtesis, per les qual és important tenir en compte que la GAPDH és secretada al medi de forma soluble i activa. A més, com en la majoria de proteïnes multifuncionals exportades a la superfície, no s'ha descrit en la seva seqüència cap pèptid senyal de secreció N-terminal ni domini d'ancoratge a la membrana C-terminal típic. Com ja s'ha exposat existeixen fins a vuit sistemes de secreció de proteïnes en bacteris gramnegatius (INTRODUCCIÓ 1.2.2). Se'n poden distingir dos tipus principals, els que permeten que la proteïna sigui exportada a través de les dues membranes de l'envolta en un sol pas, i els que necessiten de dues etapes (Desvaux *i col*, 2009).

Els sistemes en dues etapes estan formats per dos complexos proteics, un situat a la membrana externa i l'altre a la membrana interna (Sec o Tat). La secreció a través del complex Sec està determinada per la presència d'un pèptid senyal a l'extrem N-terminal que és processat al periplasma (Gerlach i Hensel, 2007; Kostakioti *i col*, 2005). Així doncs, a priori es podria descartar la translocació de GAPDH a través d'aquest sistema, ja que no compliria aquests requisits. Un estudi de la secreció de proteïnes en *L. monocytogenes*, però, ha determinat l'existència d'un segon gen *secA*, anomenat *secA2*, del qual depèn la secreció de com a mínim 19 proteïnes, 10 d'elles del tipus multifuncional sense pèptid senyal (Lenz *i col*, 2003). Aquests estudi deixa oberta la possibilitat de l'existència d'un mecanisme pel qual les proteïnes sense pèptid senyal puguin ser reconegudes per algun subtipus de sistema Sec i translocades d'aquesta manera fins al periplasma. L'altre complex principal de translocació de proteïnes al periplasma és el sistema Tat. Aquest sistema és capaç de transportar proteïnes ja plegades i fins i tot oligomèriques a través de la membrana interna. La secreció de GAPDH compliria tots aquests requisits. A més, el motiu que

determina la translocació a través del complex Tat són dos residus d'arginina en l'extrem N-terminal de la proteïna. La GAPDH no presenta aquests dos residus, però també s'ha descrit que aquests residus poden ser substituïts per dues lisines (Palmer *i col*, 2005), que la seqüència de GAPDH sí que conservaria. Alternativament, Tat pot transportar complexos en els que només una de les proteïnes presenti el motiu senyal. Aquesta possibilitat tampoc es pot descartar en el cas de la GAPDH, ja que s'ha descrit que aquesta es troba interaccionant amb diferents proteïnes en altres organismes (Sirover, 2005). Així doncs, caldria en primer lloc determinar si la secreció de GAPDH en medi LB depèn d'un d'aquests dos sistemes a la membrana interna, i després caldria identificar el complex responsable del transport a través de la membrana externa. En aquest sentit, es pot descartar el T5SS (proteïnes autotransportadores), ja que l'estructura de la GAPDH és prou coneguda com per considerar que algun dels seus dominis pugui ser responsable de la translocació de la resta de la proteïna. Cal considerar, doncs, la possibilitat de la participació del T2SS en la secreció de GAPDH. L'exemple més conegut de sistemes d'aquest tipus és el de la pul·lunasa de *K. oxytoca*, del qual es troben homòlegs en *E. coli* (operó *gsp*), però aquest és críptic en soques d'*E. coli* K-12 (Francetic *i col*, 1996). En aquest context, es pot especular que aquest sistema estaria silenciada en aïllats naturals no patògens com la soca EcoR26, però seria transcripcionalment actiu en soques patògenes o probiòtiques com a conseqüència d'una diferent regulació. En el cas de certes soques de laboratori com la TOP10, l'acumulació de mutacions podria haver portat a l'activació d'aquest sistema de secreció.

Per altra banda, seria possible que, donat que en medi eucariota la GAPDH és secretada a través del T3SS injectisoma, el transportador actiu en medi bacteriològic sigui homòleg a aquest sistema. S'ha de contemplar la possibilitat, doncs, que la GAPDH pugui ser exportada a través del sistema d'assemblatge del flagel·lar, ja que aquests dos sistemes estan evolutivament relacionats i comparteixen moltes semblances estructurals. Recentment s'ha descrit que, tot i que en medi DMEM els bacteris no formen flagel·lar, perquè no formen el sistema de transport flagel·lar, en la soca EPEC crescuda en aquest medi sí que es produeix secreció de flagel·lina. S'ha proposat que en absència d'un aparell d'export flagel·lar funcional, els monòmers de flagel·lina poden ser secretats pel T3SS de tipus injectisoma i són detectats en forma soluble en el medi de cultiu, però no es forma un flagel amb capacitat motora (Badea *i col*, 2009). En *Salmonella*, s'ha descrit que algunes de les proteïnes secretades per l'injectisoma contenen dos dominis senyalitzadors que confereixen especificitat de la via de transport, un dels quals constitueix un lloc d'unió per una xaperona. En absència d'aquest domini, o en absència de la xaperona corresponent, aquestes proteïnes són secretades pel sistema d'export flagel·lar (Lee i Galán, 2004). En *Yersinia* s'ha observat que el sistema d'export flagel·lar pot secretar altres proteïnes no flagel·lars relacionades amb la interacció amb l'hoste (Young *i col*, 1999). Per tant, és possible que en absència de l'injectisoma T3aSS funcional, la secreció de GAPDH pugui ser desviada cap al sistema d'export flagel·lar. També cal considerar la possibilitat que el sistema flagel·lar sigui el sistema de transport de la GAPDH en les soques patògenes o no patògenes amb millor capacitat colonitzadora, i que la secreció a través de l'injectisoma T3aSS sigui la via utilitzada en condicions de creixement en les que els bacteris no produeixen flagel, com és el cas del medi DMEM.

Finalment, el fet que només es detecti secreció en soques patògenes i probiòtiques, però no en soques aïllades naturals com la EcoR26, podria significar que

l'export d'aquesta proteïna representa algun avantatge pel bacteri, i per això ha estat seleccionat i s'ha mantingut en aquestes soques. Les soques EHEC, EPEC i Nissle 1917 tenen probablement més capacitat d'adhesió i colonització que no pas les aïl·lades naturals que no es troben tan íntimament adherides a la cèl·lula hoste. Això podria estar determinat per la seva capacitat de secretar proteïnes multifuncionals com la pròpia GAPDH, i per tant apunta a una funció de la GAPDH en la interacció bacteri-hoste, com es discutirà en les pròximes seccions.

4.2.2. CARACTERITZACIÓ DE LA INTERACCIÓ DE GAPDH EXTRACEL·LULAR D'*E. coli* AMB COMPONENTS DE L'HOSTE

Un pas crític en l'establiment de la infecció per part de bacteris és la unió a components de l'hoste. S'han fet molts estudis sobre la interacció de GAPDH de patògens grampositius amb components de l'hoste, com proteïnes del citoesquelet o de la matriu extracel·lular (Gozalbo *i col*, 1998; Pancholi i Fischetti, 1992; Seifert *i col*, 2003; Schaumburg *i col*, 2004). Totes aquestes interaccions podrien estar contribuint a l'adhesió del patògen i la seva virulència, i per tant tenir un paper en el mecanisme de patogènesis. Donat que les soques probiòtiques també secreten GAPDH, es pot especular que aquestes interaccions poden contribuir a la colonització del tracte intestinal per part d'aquests microorganismes.

Estudis previs a aquest treball ja havien demostrat la interacció de la proteïna GAPDH de soques EHEC i EPEC amb la cèl·lula hoste en infeccions de monocapes de cèl·lules Caco-2. Després de 4h d'infecció, una fracció de GAPDH romanía associada a la cèl·lula Caco-2 (Egea, 2006, Egea *i col* 2007). Aquest resultat suggeria que la proteïna, o bé interaccionava amb la membrana de l'hoste, o bé era translocada a l'interior del citoplasma.

Donat que els resultats obtinguts fins al moment en aquest treball revelen que la proteïna pot ser secretada de forma soluble al medi extracel·lular o bé translocada a través del sistema T3SS depenent de la soca i el medi de cultiu, és possible que la GAPDH interaccioni amb components de l'hoste tant extracel·lulars com intracel·lulars. En aquest treball s'ha aprofundit en l'estudi de les proteïnes de l'hoste que interaccionen amb la GAPDH secretada.

4.2.2.1. Interacció de GAPDH d'*E. coli* amb proteïnes humanes

Pel que fa a la funció de la GAPDH secretada al medi o associada a la superfície de soques d'*E. coli*, aquesta proteïna extracel·lular podria unir-se a proteïnes de l'hoste. En aquest estudi es va analitzar la capacitat de GAPDH d'interaccionar amb proteïnes de la matriu extracel·lular o del citoesquelet de l'hoste, en concret amb fibrinogen, fibronectina, plasminogen i actina.

La capacitat d'interacció de la GAPDH d'*E. coli* amb proteïnes humanes es va analitzar en primer lloc per *Far-Western Blot*. Les proteïnes humanes actina, fibrinogen, plasminogen i fibronectina (5µg) van ser separades en un gel de poliacrilamida-SDS i transferides a una membrana de PVDF. Aquesta membrana es va incubar amb GAPDH recombinant (1µg/ml) durant 3h, i després de diversos rentats, va ser incubada amb un anticòs específic anti-GAPDH per visualitzar les bandes reactives. Aquelles bandes on hi hagués interaccionat la GAPDH, reaccionarien amb l'anticòs anti-GAPDH. Com a control es va ometre la incubació de la membrana amb

GAPDH recombinant, i així es van descartar possibles reaccions creuades de les proteïnes humanes amb l'anticòs anti-GAPDH (MÈTODES 3.5.1).

Els resultats es mostren a la figura 4.23, i indiquen que la GAPDH és capaç d'interaccionar amb dues de les proteïnes analitzades, plasminogen i fibrinogen.

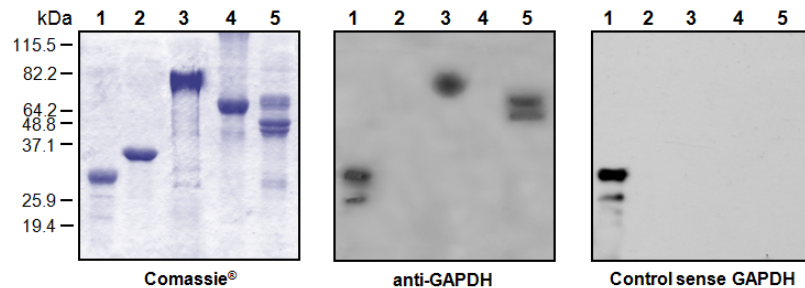


Figura 4.23. Anàlisi per Far-Western Blot de la interacció de GAPDH amb proteïnes de l'hoste. Les proteïnes humanes seleccionades (5µg) van ser sotmeses a electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS. A l'esquerra es pot observar una tinció amb Blau de Coomassie® d'aquestes proteïnes. Les dues membranes de la dreta es van revelar mitjançant la incubació amb un anticòs específic anti-GAPDH. El panell central correspon a les mateixes proteïnes transferides a una membrana de PVDF i incubada amb GAPDH recombinant (1µg/ml). En el tercer panell, es va ometre el pas d'incubació de la membrana amb GAPDH recombinant com a control negatiu. Carril 1: GAPDH, control positiu. Carril 2: actina. Carril 3: plasminogen. Carril 4: fibronectina. Carril 5: fibrinogen.

Donat que la proteïna GAPDH presenta múltiples formes atribuïdes a diverses modificacions postraduccional amb diferent punt isoelèctric (pI), es va analitzar si la interacció amb aquestes proteïnes de l'hoste es trobava associada a una de les formes. Aquesta aproximació es va dur a terme sotmetent la proteïna recombinant GAPDH a una electroforesi bidimensional (MÈTODES 3.4.11.2) per tal de separar les diferents formes segons el seu pI, i posterior transferència a una membrana de PVDF. Aquesta membrana va ser incubada amb plasminogen i posteriorment es va revelar la interacció amb la GAPDH immobilitzada a la membrana amb un anticòs específic anti-plasminogen.

Els resultats es presenten a la figura 4.24 i indiquen que la interacció de GAPDH amb plasminogen no depèn d'una forma concreta amb un pI determinat.

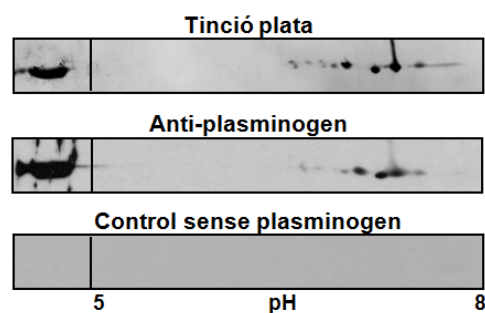


Figura 4.24. Anàlisi per Far-Western Blot de la interacció de GAPDH amb plasminogen. La proteïna GAPDH recombinant (2.5µg) va ser sotmesa a una electroforesi bidimensional. El panell superior correspon a una tinció del gel per nitrat de plata. El panell central correspon a la proteïna transferida a una membrana de PVDF i incubada amb plasminogen (5µg/ml). En el panel inferior, es va ometre el pas d'incubació de la membrana transferida amb plasminogen com a control negatiu. Les dues membranes transferides, incubades o no amb plasminogen, es van revelar mitjançant la incubació amb un anticòs específic anti-plasminogen.

Donat que en els assaigs de *Far-Western Blot* una de les dues proteïnes de les que s'avalua la interacció es troba desnaturitzada i immobilitzada en la membrana de PVDF, es va plantejar l'anàlisi de la interacció de GAPDH amb les mateixes proteïnes humanes en un experiment de tipus ELISA, que no implica la desnaturització de cap de les dues proteïnes que interaccionen.

Així doncs, en primer lloc es van immobilitzar les proteïnes a assajar (actina, fibrinogen, fibrina i plasminogen) en plaques de 96 pous i després es van incubar amb diferents quantitats de GAPDH purificada. La GAPDH unida a cada una de les proteïnes es va detectar amb un anticòs anti-GAPDH seguit d'un anticòs secundari conjugat a peroxidasa i es va revelar amb un substrat cromogènic per mesura de l'absorbància a 492nm, segons el procediment descrit a MÈTODES 3.5.2. Els resultats es mostren a la figura 4.25 i confirmen la interacció de GAPDH amb fibrinogen i plasminogen, mentre que no es va detectar una interacció significativa amb actina i fibrina.

En conjunt, aquests resultats demostren que la proteïna GAPDH d'*E. coli* és capaç d'interaccionar amb plasminogen i fibrinogen, ambdues proteïnes de la matriu extracel·lular de l'hoste. En aquest sentit, cal destacar que el residu lisina C-terminal de la GAPDH d'*Streptococcus*, important per a la unió del plasminogen (Winram i Lottenberg, 1998), es conserva en la seqüència de GAPDH d'*E. coli*. El plasminogen és una serina proteasa abundant en el plasma humà i els fluids extracel·lulars. Aquesta proteïna també s'associa a la superfície de moltes cèl·lules de l'organisme. La capacitat de proteïnes com GAPDH, o també l'enolasa, d'unir-se a plasminogen, ha estat relacionada amb els mecanismes de patogènesis. La plasmina, la forma activa resultant de la proteòlisi del plasminogen, pot degradar les proteïnes extracel·lulars i promoure la migració dels bacteris (Bergmann *i col*, 2005). D'aquesta manera, la proteïna GAPDH extracel·lular de soques patògenes com EHEC o EPEC, o probiòtiques com Nissle 1917, podrien contribuir a l'adhesió i/o la migració dels bacteris a través de la mucosa, afavorint així la colonització.

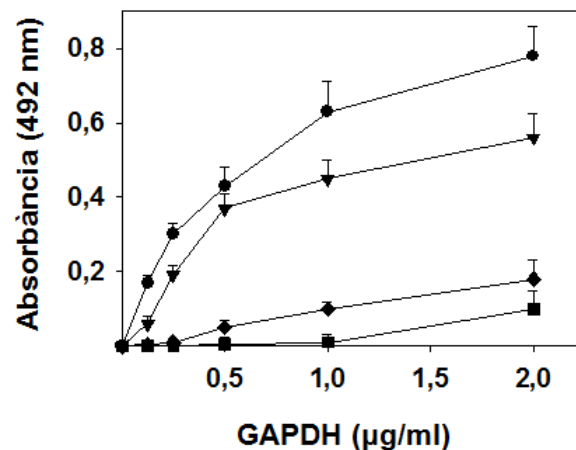


Figura 4.25. Anàlisi de la interacció de GAPDH amb proteïnes de l'hoste per ELISA. Els pous d'una microplaca de 96 pous es van recobrir amb actina (quadres), plasminogen (cercles), fibronectina (rombes) o fibrinogen (triangles) i posteriorment van ser incubats amb diferents concentracions de GAPDH purificada. La unió de GAPDH a aquestes proteïnes es va determinar tal i com es detalla a MÈTODES 3.5.2. Les dades es representen com la mitjana \pm SD de tres experiments.

4.2.2.2. Internalització de GAPDH d'*E. coli* conjugada a or col·loïdal en cèl·lules HeLa

Com s'ha vist fins ara, la GAPDH pot ser secretada de forma soluble en el medi de cultiu en soques d'*E. coli* patògenes i probiòtiques. Per tal de comprovar si aquesta GAPDH soluble podria ser internalitzada en la cèl·lula hoste, es van dur a terme experiments en els que s'incubaven cèl·lules epitelials en cultiu amb la proteïna recombinant conjugada a or col·loïdal. Posteriorment, les cèl·lules eren observades al microscopi electrònic per tal de localitzar molècules de la proteïna internalitzada.

Amb aquest objectiu es van preparar plaques de cèl·lules HeLa en cultiu, a una confluència del 70-80%. La proteïna GAPDH purificada es va conjuguar a or col·loïdal segons el procediment descrit a MÈTODES 3.6.4. La qualitat de la preparació del conjugat va ser avaluada per tinció negativa i observació al microscopi. A continuació es va procedir a la incubació de les cèl·lules epitelials amb la proteïna conjugada en dues etapes (MÈTODES 3.3.3). En primer lloc s'incubaven les cèl·lules amb la proteïna (7µg/placa) a 4°C durant una hora. En aquest període es permetia la unió de GAPDH a la membrana d'una manera específica, però no la seva internalització. Passat aquest temps, s'eliminava l'excés de proteïna no unida mitjançant rentats i s'incubaven les cèl·lules a 37°C durant diferents temps. En aquest moment és quan s'havia de produir la internalització del conjugat que s'havia unit prèviament a la membrana. Aquesta incubació es va mantenir un temps diferent per cada placa, amb l'objectiu d'observar la internalització en diferents fases. Finalitzat el temps d'incubació determinat per cada placa, les cèl·lules es fixaven i es processaven per crioultramicrotomia als Serveis Científico-tècnics de la Universitat de Barcelona.

Com es pot observar a la figura 4.26, es va localitzar GAPDH conjugada a or col·loïdal a l'interior de la cèl·lula HeLa, indicant que la proteïna lliure secretada pot ser internalitzada en la cèl·lula hoste. En els temps més curts d'incubació a 37°C (0-10min), es van detectar molècules de conjugat sobretot a la superfície de la cèl·lula HeLa, i en zones lleugerament invaginades d'aquesta membrana. En les mostres corresponents a 15-30min, el conjugat ja es detecta a l'interior de la cèl·lula hoste, englobat sempre en vesícules. Aquestes primeres vesícules són properes a la superfície cel·lular, però a mesura que passa el temps (60min), les vesícules són cada vegada més internes. Les mostres incubades paral·lelament amb un excés de GAPDH no conjugada no van mostrar cap molècula de GAPDH-or col·loïdal ni a l'interior ni a la superfície de la cèl·lula, indicant que la unió del conjugat és específic per la proteïna, i no pas per partícula d'or (resultat no mostrat).

Aquests resultats indiquen que la GAPDH secretada de forma soluble en el medi de cultiu podria ser internalitzada en cèl·lules epitelials en cultiu. Les imatges obtingudes, però, no permeten identificar el tipus de vesícules que envolten la proteïna, i per tant, no podem saber quina és la funció o el destí final de la GAPDH a l'interior de la cèl·lula eucariota.

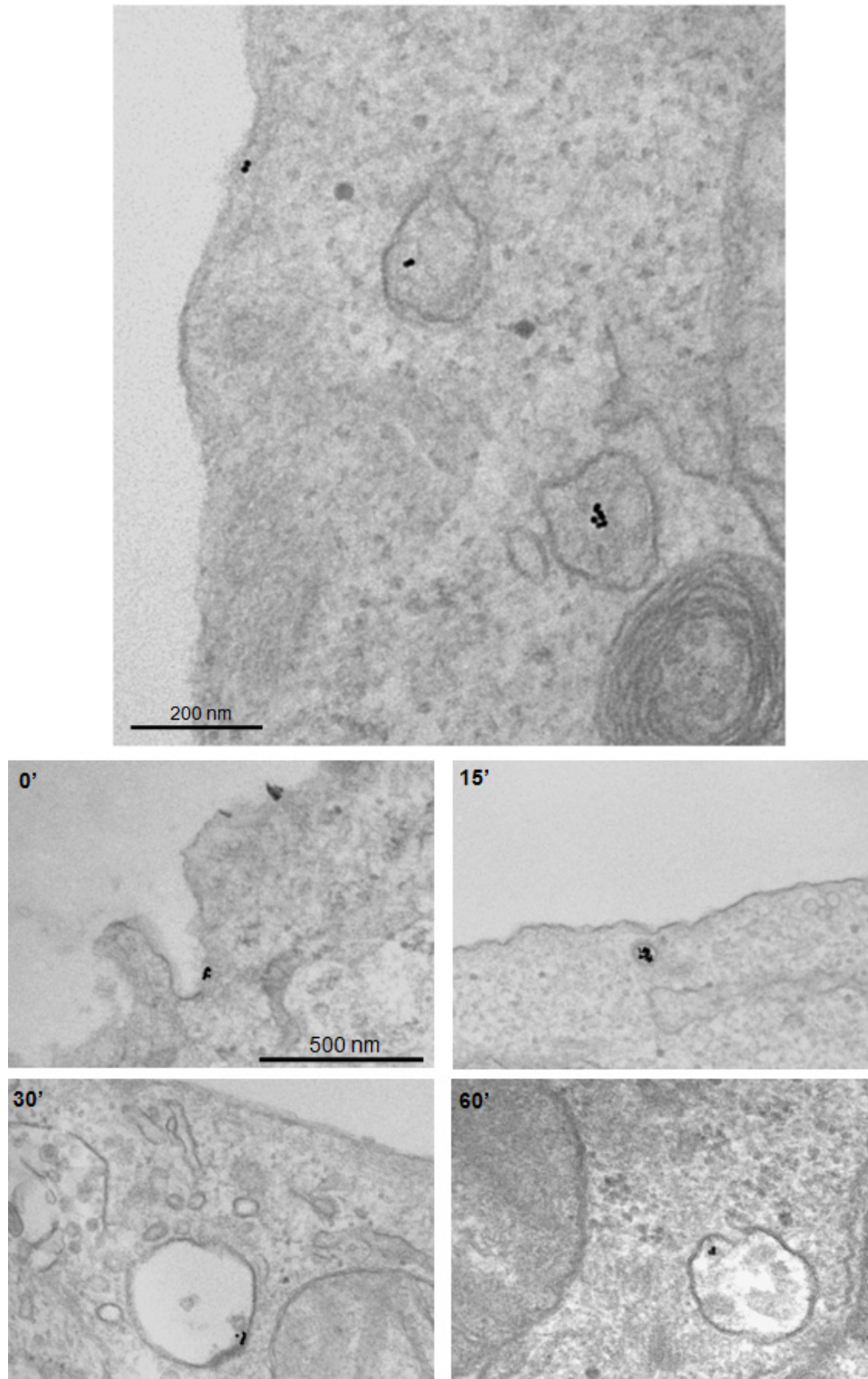


Figura 4.26. Internalització de GAPDH conjugada a or col·loïdal en cèl·lules HeLa. La proteïna conjugada va ser afegida a cultius de cèl·lules HeLa al 80% de confluència i incubada a 4°C durant 1h per permetre la unió específica de la proteïna a la membrana. Posteriorment es va eliminar la proteïna no unida i es van incubar les cèl·lules a diferents temps a 37°C per permetre la internalització. Finalment, les cèl·lules van ser fixades i processades per crioultramicrotomia en el Serveis Científico-tècnics de la Universitat de Barcelona. El temps indicat en cada imatge correspon al temps d'incubació a 37°C.

La incorporació de molècules a la cèl·lula eucariota mediada per endocitosi pot ser inespecífica (pinocitosi i macropinocitosi) o específica unida a receptors de membrana (dependent de clatrina). En aquest sentit, caldria valorar si la GAPDH detectada al citoplasma de les cèl·lules HeLa en aquest experiment respon a una endocitosi específica conseqüència del reconeixement de la GAPDH per part d'algun receptor de la cèl·lula hoste. En aquest cas, és possible que la GAPDH tingués una funció específica dins de la cèl·lula hoste. L'altra possibilitat és que la internalització s'hagi produït a l'atzar, que la GAPDH hagi quedat englobada en les vesícules en formació juntament amb el medi de cultiu durant l'endocitosi inespecífica del material soluble que la cèl·lula té al seu voltant. En aquest cas, és probable que el destí final de la proteïna fossin els lisosomes, on es produiria la seva degradació. Per tal de discernir entre els diferents tipus d'endocitosi, es va plantejar dur a terme el mateix experiment d'internalització amb proteïna marcada amb fluorescència (Atto 488, Innova Biosciences), de manera que l'estudi fos més dinàmic i permetés la utilització de compostos inhibidors de les diferents vies d'internalització. En aquest experiment, però, no es va detectar senyal fluorescent a l'interior de la cèl·lula eucariota. És possible que la quantitat de GAPDH internalitzada sigui insuficient per detectar-la amb aquest mètode. De manera similar, en els estudis de secreció de flagel·lina a través de l'injectisoma en EPEC realitzats per Badea *i col* (2009) no es va poder determinar si es produïa la translocació de flagel·lina a la cèl·lula hoste emprant flagel·lina marcada amb fluorescència. Els autors postulaven que la porció de proteïna translocada podria ser massa petita per ser detectada.

4.2.2.3. Identificació de proteïnes de cèl·lules Caco-2 que interaccionen amb GAPDH d'*E. coli*

Tal com hem presentat fins al moment, la proteïna GAPDH d'*E. coli* pot ser internalitzada via vesícules en cèl·lules epitelials, i pel fet de ser secretada a través del sistema T3SS de tipus injectisoma podria ser translocada al citoplasma de les cèl·lules infectades amb EPEC o EHEC. Aquests resultats obren noves expectatives a identificar funcions de GAPDH en la senyalització dins la cèl·lula hoste.

En aquest context ens vam plantejar identificar proteïnes de la cèl·lula hoste capaces d'interaccionar amb la GAPDH bacteriana mitjançant experiments de tipus *pull-down* (MÈTODES 3.5.3). En ells, s'incubava *in vitro* la proteïna de fusió GST-GAPDH o GST (control negatiu) purificada immobilitzada en una columna de glutatió amb un extracte de cèl·lules epitelials HeLa o Caco-2. Les proteïnes que interaccionen amb la proteïna immobilitzada a la columna han de quedar específicament retingudes. Finalment, la columna era eluïda amb tampó de càrrega per electroforesi i les proteïnes eren resoltes en un gel de poliacrilamida. Les bandes d'interès eren escindides i la proteïna corresponent era identificada per espectrometria de masses en els Serveis Científico-tècnics de la Universitat de Barcelona (MÈTODES 3.4.12).

El resultat obtingut es presenta a la figura 4.27. En els carrils 2 i 3 s'observa la presència de moltes bandes d'origen majoritàriament bacterià, ja que són presents tant si s'ha afegit extracte eucariota (carril 2) com si no (carril 3). Aquestes bandes podrien emascarar alguna de les interaccions amb proteïnes eucariotes. Es van escollir per a la seva identificació les bandes presents en la mostra amb GAPDH i extracte eucariota, i que no apareixien en els controls negatius (carrils 1 i 3), i que per tant corresponen a proteïnes de Caco-2 que interaccionen *in vitro* amb la GAPDH immobilitzada en la columna de glutatió. Es van seleccionar dues proteïnes eucariotes

candidates a interaccionar amb la GAPDH bacteriana, una d'aproximadament 50 kDa identificada per espectrometria de masses com el factor d'elongació de la traducció 1γ , i l'altra d'aproximadament 30kDa identificada com el factor d'elongació de la traducció 1β . El mateix resultat es va obtenir quan es va emprar un extracte cel·lular de cèl·lules HeLa. Quan la mostra analitzada va ser la fracció de membrana de cèl·lules HeLa es van identificar les mateixes dues proteïnes, fet compatible amb la presència d'aquestes proteïnes associades a estructures membranoses.

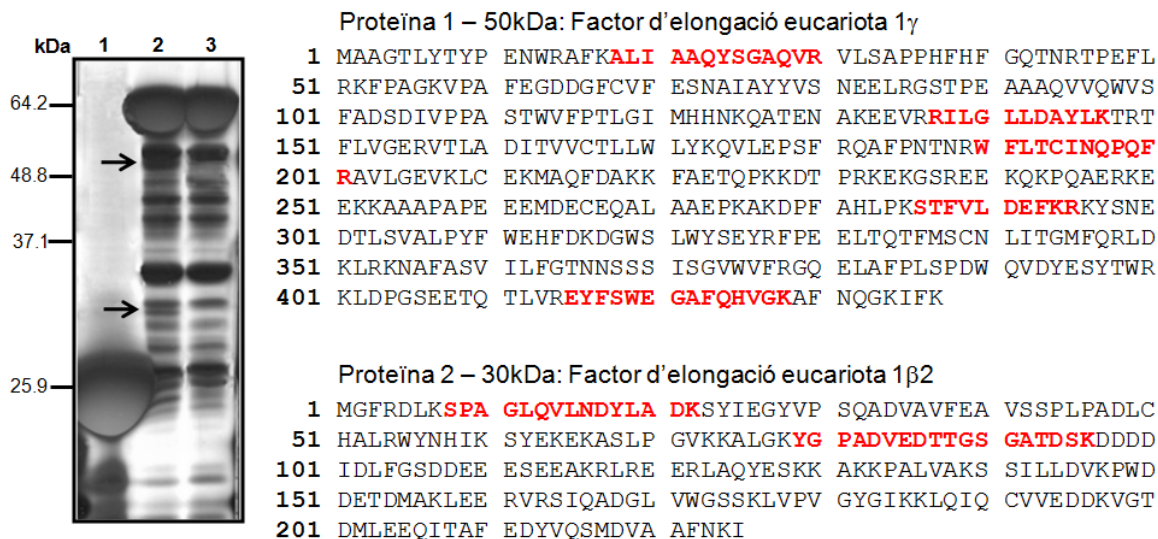


Figura 4.27. Identificació de proteïnes eucariotes que interaccionen amb GAPDH bacteriana per pull-down. A l'esquerra, anàlisi de la interacció de GST-GAPDH amb proteïnes de cèl·lules Caco-2 en un gel de poliacrilamida revelat amb nitrat de plata. Carril 1: interacció de la proteïna GST immobilitzada a la columna de glutatió amb un extracte cel·lular de Caco-2 (control negatiu). Carril 2: interacció de la proteïna GST-GAPDH immobilitzada a la columna de glutatió amb un extracte cel·lular de Caco-2. Carril 3: GST-GAPDH immobilitzada a la columna de glutatió sense incubar amb extracte eucariota (control negatiu). Les bandes assenyalades amb fletxes van ser escindides i identificades per espectrometria de masses. A la dreta, seqüència de les proteïnes escindides del gel identificades per espectrometria de masses. Es destaquen en vermell els pèptids identificats.

Aquestes dues proteïnes identificades són dues de les subunitats del factor d'elongació eEF1B, responsable del lliurament enzimàtic de l'aminoacil tRNA al ribosoma. La subunitat EF1 γ (EF1B γ) té una funció estructural, la d'assegurar un assemblatge correcte de les diferents subunitats del complex proteic. La subunitat EF1 β (EF1B α en la nomenclatura actual recomanada) és una proteïna d'intercanvi GDP/GTP i catalitza l'intercanvi del GDP unit a la proteïna G EF1A per GTP, pas essencial en el cicle d'elongació de les proteïnes (Le Sourd *et al*, 2006). Els factors d'elongació eucariòtics estan implicats en diversos processos cel·lulars a més de la traducció, i per tant, també es consideren proteïnes multifuncionals. Es troben implicats en el control traduccional, la transducció de senyals, l'organització del citoesquelet, apoptosi, síntesi de l'RNA, mitosi i alguns processos patològics (Ejiri, 2002). La GAPDH, tant eucariota com procariota, també ha estat descrita com una proteïna multifuncional implicada en algun d'aquests processos (Sirover, 1999 i 2005), i per tant és possible que es produeixi una interacció entre aquestes dues proteïnes en el desenvolupament d'alguna de les seves funcions alternatives. Així, la GAPDH

extracel·lular translocada a l'interior de la cèl·lula hoste podria interferir en aquests processos. Tanmateix, cal prendre aquest resultat com a preliminar, ja que es tracta d'una primera aproximació i no ha estat confirmat *in vivo* per cap altra tècnica que pugui ser millor reflex del que passa realment a l'interior de la cèl·lula

4.2.2.4. Implicacions de la interacció de GAPDH amb components de l'hoste durant la colonització del l'epiteli intestinal

S'han estudiat les possibles interaccions de la GAPDH d'*E. coli* amb components de la cèl·lula hoste mitjançant diferents aproximacions. S'ha confirmat la interacció amb components de la matriu extracel·lular com plasminogen i fibrinogen, s'ha comprovat la capacitat de la GAPDH de ser internalitzada per cèl·lules eucariotes en cultiu, i s'han descrit dues possibles noves interaccions de la proteïna amb components intracel·lulars de l'hoste.

En primer lloc, s'ha confirmat la interacció de la GAPDH amb plasminogen i fibrinogen, mitjançant *Far-Western Blot* i ELISA. Les descripcions d'interaccions de GAPDH o d'altres proteïnes multifuncionals presents en la superfície de microorganismes patògens i/o probiòtics amb components de la matriu extracel·lular són nombroses. Un prerrequisit per la capacitat invasiva d'un patògen és la seva habilitat per sobrepassar les barreres epitelials i endotelials per guanyar accés a la submucosa i a la sang. Una estratègia exitosa emprada pels bacteris patògens per degradar la matriu extracel·lular i promoure la invasió és el reclutament d'activitat proteolítica en la superfície bacteriana, però aquesta habilitat també és compartida per bacteris probiòtics (Antikainen *i col*, 2007). Els bacteris que utilitzen el sistema del plasminogen per a la seva migració en l'hoste immobilitzen plasminogen en els receptors de la superfície bacteriana, i l'activen a plasmina mitjançant activadors propis o aprofitant els activadors del plasminogen de l'hoste. L'activitat plasmina adquirida promou la disseminació i transmigració del bacteri a través de les membranes basals. És el cas de la GAPDH d'*Streptococcus* del grup A i *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus*, *L. monocytogenes*, *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, entre d'altres. (Boël *i col*, 2005; Bergmann *i col*, 2004; Modun i Williams, 1999; Schaumburg *i col*, 2004; Hurmalainen *i col*, 2007; Candela *i col*, 2007). També s'ha descrit la capacitat d'unir plasminogen i facilitar la seva activació en les proteïnes bacterianes enolasa i el factor d'elongació Tu. L'acció coordinada de l'enolasa i de la GAPDH en la superfície dels bacteris podria resultar en una millora de l'habilitat per degradar la matriu extracel·lular i envair els teixits de l'hoste (Bergmann *i col*, 2004; Hurmalainen *i col*, 2007). L'activació del plasminogen en bacteris probiòtics grampositius és majoritàriament dependent de l'alliberament gradual d'enolasa i GAPDH associada a la superfície, encara que també la poden immobilitzar, en contrast amb els patògens en els que l'activació del plasminogen passa per la immobilització del plasminogen/plasmina en la seva superfície. Això suggereix que els probiòtics no tenen el potencial endogen per activar el plasminogen present en diversos enteropatògens (que produeixen estreptoquinasa), sinó que competeixen per la interacció entre el plasminogen i els patògens gastrointestinals (Sánchez, 2008).

Altres proteïnes multifuncionals de la superfície de microorganismes poden interaccionar amb components de la matriu extracel·lular. Per exemple, la GAPDH d'*Streptococcus* i *Candida* s'uneix a fibronectina, igual que els enzims d'expressió constitutiva de la superfície de diversos paràsits i micoplasmes (Pancholi i Chhatwal, 2003). Els *Lactobacillus* interaccionen amb mucines del colon humà, i en aquesta

interacció participen proteïnes com GAPDH, EF-Tu i GroEL exposades a la superfície del probiòtic (Kinoshita *i col*, 2008; Hurmalainen *i col*, 2007; Granato *i col*, 2004; Bergonzelli *i col*, 2006). Unint-se a components de l'hoste, aquestes proteïnes multifuncionals localitzades en la superfície cel·lular permeten al patogen adherir-se i envair la cèl·lula hoste, sobreviure i persistir intracel·lularment o envair i degradar el teixit hoste. En el cas dels probiòtics, els estaria ajudant igualment a interaccionar amb l'hoste i adherir-s'hi, i representaria una mesura per competir amb els patògens.

A més de les interaccions extracel·lulars de la GAPDH, en el present estudi s'ha observat la capacitat de la proteïna per ser endocitada per cèl·lules epitelials en cultiu. Tot i que no s'ha determinat ni el mecanisme ni la funció d'aquesta internalització, diversos estudis fets per altres grups indiquen la seva versemblança. Per exemple, en cèl·lules d'EPEC, s'ha descrit que el receptor de la intimina translocat a la cèl·lula hoste (Tir), normalment a través de l'injectisoma, en certes condicions pot ser internalitzat a la cèl·lula hoste per la via endocítica. L'estudi dut a terme per Michgehl *i col* (2006) va revelar la capacitat de Tir de ser internalitzat a la cèl·lula hoste independentment de la seva translocació a través de l'injectisoma i exposat a la membrana de la cèl·lula eucariota de manera funcional, fins i tot si s'empra la proteïna aïllada i purificada. En *L. monocytogenes*, s'ha descrit que la GAPDH pot interaccionar amb la proteïna Rab-5a, i és responsable del reclutament d'aquesta proteïna als fagosomes. A més, l'activitat ADP-ribosiltransferasa de la GAPDH bloqueja el factor intercanviador de Rab-5a i interfereix en l'activitat d'intercanvi GDP/GTP, inhibint la fusió fagosoma-endosoma, demostrant que la GAPDH podria tenir capacitat per intervenir en el trànsit intracel·lular (Álvarez-Domínguez *i col*, 2008). No es pot descartar que aquesta activitat també existeixi en la GAPDH d'*E. coli*, ja que a més de ser internalitzada en vesícules, també té activitat ADP-ribosiltransferasa, com es presentarà més endavant. L'endocitosis és el mecanisme pel qual algunes toxines entren en la cèl·lula hoste. Per exemple, s'ha observat que la toxina PT de *B. pertussis* és internalitzada per les cèl·lules diana mitjançant endocitosis mediada per receptor. Un cop a l'interior de la cèl·lula, és dirigida al compartiment lisosomal, on serà degradada, però una petita fracció de la toxina és canalitzada a través de transport retrògrad a la regió del Golgi. Aquest fet és aparentment necessari perquè es produeixi l'ADP-ribosilació de les proteïnes G, que resulten en la intoxicació de la cèl·lula (el Baya *i col*, 1997).

Una tercera aproximació per avaluar les interaccions de la GAPDH extracel·lular amb components de la cèl·lula hoste ha estat mitjançant assaigs de *pull-down*. En aquests experiments s'han identificat dues proteïnes que interaccionen amb la GAPDH d'*E. coli*, els factors d'elongació EF1B γ i EF1B α . Cal tenir en compte que aquestes proteïnes, igual que la GAPDH eucariota i procariota, presenten múltiples funcions, i durant el desenvolupament d'aquestes funcions podrien estar formant part del mateix complex. En aquest sentit, doncs, no és inversemblant trobar que la GAPDH procariota sigui capaç d'interaccionar *in vitro* amb els factors d'elongació eucariotes, com també ho fa amb el factor EF-Tu procariota (resultats no publicats), tanmateix si aquesta interacció té algun significat biològic encara està per investigar. Primerament, caldria confirmar que la GAPDH és capaç de ser translocada a la cèl·lula hoste, que pot interaccionar *in vivo* amb EF1B γ i EF1B α , i quins efectes té aquesta interacció en la cèl·lula hoste.

4.2.3. GAPDH D'*E. coli* COM A DIANA DE MODIFICACIONS POSTRADUCCIONALS DEPENDENTS DE NAD⁺: IMPLICACIÓ EN LA INTERACCIÓ AMB L'EPITELI INTESTINAL

En molts organismes, la GAPDH és objecte de diverses modificacions covalents, com glutationilació, S-nitrosilació, unió d'àcids grassos nitrogenats, fosforilació i ADP-ribosilació. Moltes d'aquestes modificacions estan associades a respostes a estrès oxidatiu i podrien ser crucials per a una adaptació adequada a condicions d'estrès d'oxigen (Batthyany *i col*, 2006; Colussi *i col*, 2000; Eaton *i col*, 2002; Reverter-Branchat *i col*, 2004; Roca *i col*, 2008).

L'ADP-ribosilació és una modificació postraduccionals covalent reversible que consisteix en la transferència enzimàtica d'ADP-ribosa, provinent d'una molècula de NAD⁺, a un aminoàcid específic de la proteïna diana, i la subseqüent alliberació de nicotinamida. Aquesta modificació regula les funcions de la proteïna i afecta a molts processos biològics. Per exemple l'ADP-ribosilació de la GAPDH secretada s'ha relacionat amb la interacció amb l'hoste en alguns patògens (Álvarez *i col*, 2007; Pancholi i Fischetti, 1993). Per aquesta raó, s'ha estudiat la modificació postraduccionals per ADP-ribosilació de la GAPDH d'*E. coli*.

4.2.3.1. Identificació de proteïnes d'*E. coli* modificades per ADP-ribosilació

Per tal d'identificar proteïnes secretades per soques EHEC i EPEC que podrien ser ADP-ribosilades, es van obtenir sobrenedants de cultius d'aquestes soques en DMEM i es van concentrar per precipitació amb sulfat d'amoni (MÈTODES 3.4.4 I 3.4.7). Les mostres es van dialitzar enfront també d'assaig per ADP-ribosilació per eliminar el sulfat d'amoni, que podria interferir en la reacció. Les reaccions d'ADP-ribosilació es van dur a terme tal i com es descriu a MÈTODES 3.4.9.3, amb 75µg de proteïna del sobrenedant i en presència de [³²P]-NAD⁺. Com es pot observar a la figura 4.28A, es van detectar dues proteïnes marcades radioactivament en aquestes condicions, de 35 i 72kDa aproximadament, tant en sobrenedants de cultius d'EPEC com d'EHEC. Com a controls, es van dur a terme reaccions en paral·lel amb un excés de NAD⁺ no radioactiu (100µM; Fig. 4.28A, carrils 2 i 5) o amb 100µM d'ADP-ribosa no radioactiva (Fig. 4.28A, carrils 3 i 6). Només l'addició de NAD⁺ no radioactiu va inhibir el marcatge de les proteïnes modificades, indicant que aquesta modificació depèn de NAD⁺, i no és una glucosilació per part de l'ADP-ribosa, ja que aquesta per si sola no és capaç de modificar la proteïna.

Per analitzar si aquestes proteïnes també es modificaven en el medi intracel·lular, es van dur a terme reaccions d'ADP-ribosilació amb extractes cel·lulars (200µg/reacció) obtinguts per disruptió sònica de les cèl·lules recollides de cultius d'EHEC en DMEM. Com es pot observar a la figura 4.28B, es van detectar les mateixes proteïnes de 35 i 72 kDa marcades radioactivament per [³²P]-NAD⁺, indicant que aquestes proteïnes poden ser modificades també a l'interior de la cèl·lula. Les mateixes reaccions es van dur a terme amb extractes cel·lulars d'altres soques d'*E. coli* no patògenes (ECL1 i EcoR26). El resultat obtingut en aquest cas va ser el mateix que per les soques patògenes. Això suggereix que la modificació detectada es produeix en proteïnes que s'expressen en totes les soques d'*E. coli*, i no exclusivament en les patògenes (Fig. 4.28B). En tots els experiments realitzats amb extractes cel·lulars, les proteïnes marcades radioactivament apareixien com bandes febles, la qual cosa pot ser atribuïda a la presència d'ADP-ribosilhidrolases intracel·lulars, tal i com s'ha descrit per altres procarïotes (Pancholi i Fischetti,

1993). De fet, quan es va incubar el sobrenedant d'un cultiu d'EHEC amb una fracció intracel·lular de les mateixes cèl·lules en una reacció d'ADP-ribosilació, la radioactivitat incorporada en les proteïnes de 72 i 35kDa es va reduir significativament (no mostrat). Això suggereix que aquesta modificació dependent de NAD^+ pot ser revertida *in vivo* per factors intracel·lulars.

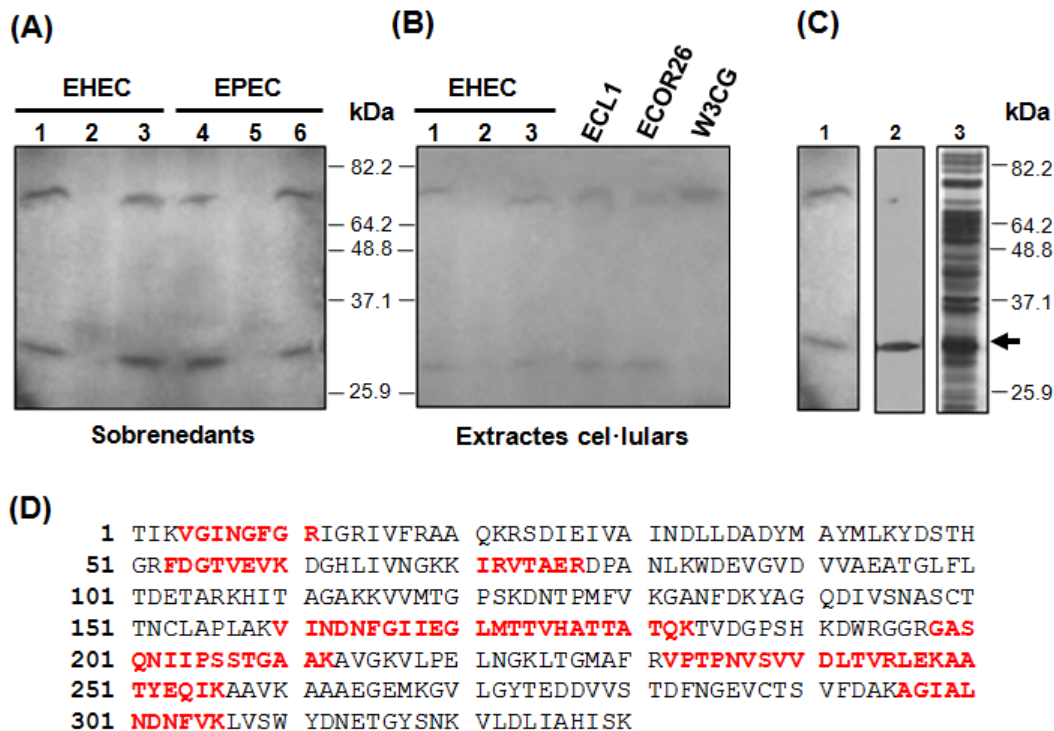


Figura 4.28. ADP-ribosilació de proteïnes d'*E. coli*. Les mostres amb [^{32}P]- NAD^+ es van incubar en condicions d'ADP-ribosilació durant 1h a 37°C. Les reaccions es van aturar per addició de tampó de càrrega per SDS-PAGE i es van escalfar a 70°C durant 20min. Seguidament es van sotmetre a electroforesi en gels de poliacrilamida al 12%. (A) Autoradiografia de les reaccions d'ADP-ribosilació portades a terme amb la fracció de proteïnes secretades de les soques EHEC i EPEC (75µg) seguint el protocol descrit a MÈTODES 3.4.9.3 (carrils 1 i 4), amb un excés de 50 vegades de NAD^+ no radioactiu (carrils 2 i 5), o en presència d'ADP-ribosa no radioactiva (carrils 3 i 6), afegits com a competidors. (B) Autoradiografia de reaccions d'ADP-ribosilació realitzades amb extractes cel·lulars (200µg) de les soques indicades en cada carril. Per la soca EHEC, les reaccions també es van dur a terme en presència d'un excés de NAD^+ no radioactiu (carril 2), o d'ADP-ribosa no radioactiva (carril 3). (C) Els sobrenedants d'EHEC sotmesos a ADP-ribosilació analitzats per autoradiografia (carril 1), també van ser analitzats per *Western Blot* amb un anticòs anti-GAPDH (carril 2), i per tinció del gel amb nitrat de plata (carril 3). La fletxa indica la banda de 35kDa escindida per a la identificació de la proteïna per espectrometria de masses. (D) Els pèptids identificats per espectrometria de masses s'indiquen en vermell en la seqüència de GAPDH d'*E. coli*.

Les reaccions d'ADP-ribosilació també es van dur a terme amb extractes cel·lulars de la soca W3CG (Ganter i Plückthun, 1990), una soca mutant $\Delta gapA::tet$. La banda marcada radioactivament corresponent a la proteïna de 35kDa va desaparèixer en aquestes mostres, el que suggeria que la proteïna GAPDH era una de les dianes de la modificació postraduccionals dependent de NAD^+ (Fig. 4.28B). A més a més, per confirmar aquest resultat es va dur a terme un assaig de *Western Blot* de les reaccions d'ADP-ribosilació realitzades amb sobrenedant de cultius d'EHEC amb anticossos específics anti-GAPDH (Fig. 4.28C, carril 2). En aquest experiment es va

observar que la banda coincident amb la de 35kDa marcada radioactivament reaccionava amb els anticossos anti-GAPDH. Per confirmar la identitat d'aquesta proteïna com a GAPDH, es van realitzar reaccions d'ADP-ribosilació no radioactives. Aquestes van ser sotmeses a electroforesi i el gel es va revelar amb nitrat de plata (Fig. 4.28C, carril 3). La banda coincident amb la proteïna marcada radioactivament en les reaccions amb $[^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$ va ser escindida del gel i identificada per espectrometria de masses als Serveis Científico-tècnics de la Universitat de Barcelona (MÈTODES 3.4.12). Aquesta anàlisi va confirmar la identitat de la proteïna de 35kDa ADP-ribosilada com a GAPDH d'*E. coli* (Fig. 4.28D).

4.2.3.2. Auto-ADP-ribosilació de GAPDH

Per tal d'analitzar si la GAPDH és capaç de promoure la seva pròpia modificació, tal i com s'ha descrit per aquesta proteïna en altres organismes (Pancholi i Fischetti, 1993), es van dur a terme reaccions d'ADP-ribosilació amb GAPDH recombinant. La proteïna purificada va incorporar radioactivitat, que clarament disminuïa en presència de NAD^+ no radioactiu, però es mantenia en presència d'ADP-ribosa no radioactiva (Fig. 4.29A). En experiments previs, l'electroforesi bidimensional de la proteïna GAPDH ja havia revelat l'existència de múltiples formes de la proteïna amb diferents punts isoelèctrics. Aquest mateix anàlisi es va dur a terme amb mostres de GAPDH provinents de reaccions d'ADP-ribosilació. Els gels es van revelar tant per autoradiografia com per tinció amb nitrat de plata i per *Western Blot* amb un anticòs anti-GAPDH (Fig. 4.29B). Com es pot observar, la forma de GAPDH ADP-ribosilada correspon a una de les formes menys abundants amb un pI més baix.

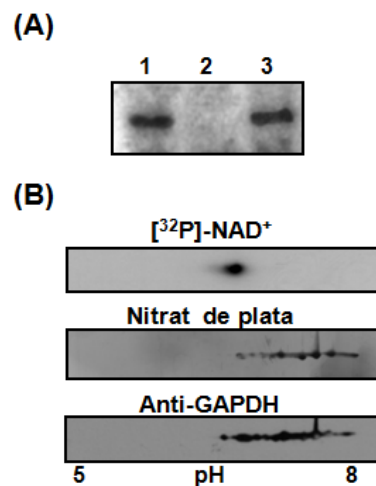


Figura 4.29. ADP-ribosilació de GAPDH recombinant. La proteïna purificada (10 μg) es va incubar amb $[^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$ en condicions d'ADP-ribosilació durant 1h a 37°C i seguidament es va sotmetre la reacció a una electroforesi en gel de poliacrilamida. **(A)** Autoradiografia de reaccions d'ADP-ribosilació realitzades amb GAPDH d'*E. coli* recombinant (carril 1), amb un excés de NAD^+ no radioactiu 100 μM (carril 2) o en presència d'ADP-ribosa no radioactiva (carril 3). **(B)** Anàlisi de les reaccions en una electroforesi bidimensional. Després de les reaccions d'ADP-ribosilació, les mostres es van precipitar amb TCA 10%, van ser electroenfoacades en tires d'IPG i sotmeses a SDS-PAGE en gels del 12% per obtenir la segona dimensió. La GAPDH ADP-ribosilada es va revelar per autoradiografia (panell superior), i la mateixa mostra també es va analitzar per tinció amb nitrat de plata (panell central) i per *Western Blot* amb un anticòs anti-GAPDH (panell inferior).

4.2.3.3. Identificació de l'aminoàcid de GAPDH modificat per ADP-ribosilació

Per tal d'identificar el residu de la GAPDH modificat per ADP-ribosilació, es van dur a terme reaccions amb GAPDH recombinant en presència de concentracions creixents (0-5mM) d'hidroxilamina o HgCl_2 . El primer compost inhibeix específicament l'ADP-ribosilació en residus d'arginina, mentre que el segon inhibeix específicament la modificació de residus de cisteïna. Com es pot observar a la figura 4.30A, la presència d'hidroxilamina no va afectar a la incorporació de radioactivitat en la GAPDH, mentre que el HgCl_2 va inhibir la incorporació de ^{32}P de manera proporcional a la concentració. El mateix resultat es va obtenir quan es van dur a terme les reaccions amb la fracció de proteïna secretada (resultat no mostrat). Per tant, aquests resultats suggereixen que la modificació per ADP-ribosilació de la GAPDH té lloc en residus de cisteïna a través d'un enllaç de tipus tiol.

Per comprovar aquesta hipòtesi, es van realitzar reaccions d'ADP-ribosilació en presència d'un excés de diferents aminoàcids per veure quin d'ells tenia un efecte d'inhibició competitiva sobre la modificació de GAPDH recombinant d'*E. coli*. Els aminoàcids emprats en aquest experiment van ser L-cisteïna, L-arginina i L-histidina, ja que tots tres són possibles acceptors d'ADP-ribose. Com es pot observar a la figura 4.30B, només l'addició de L-cisteïna lliure va competir amb la modificació de GAPDH, confirmant el resultat obtingut anteriorment. Aquesta inhibició era dependent de la concentració de l'aminoàcid, com es desprèn de l'anàlisi de reaccions d'ADP-ribosilació realitzades en presència de diferents concentracions d'L-cisteïna (Fig. 4.30B, panell inferior). La inhibició de l'ADP-ribosilació també es va observar en reaccions realitzades amb la fracció de proteïna secretada (resultat no mostrat).

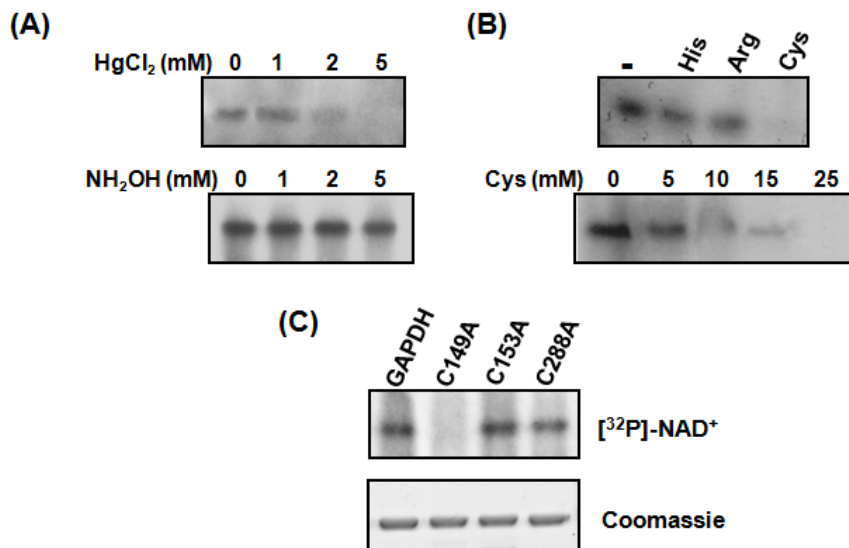


Figura 4.30. Identificació del residu de GAPDH modificat per ADP-ribosilació. (A) Autoradiografia mostrant l'efecte d'afegir concentracions creixents d' HgCl_2 o hidroxilamina a les reaccions d'ADP-ribosilació de GAPDH recombinant (10 μg). Les concentracions de cada compost s'indiquen a cada carril. (B) Autoradiografia de les reaccions d'ADP-ribosilació portades a terme amb GAPDH purificada (10 μg) en absència o presència d'histidina, arginina o cisteïna 25mM (panell superior), o en presència de les concentracions indicades de cisteïna (panell inferior). (C) Autoradiografia i tinció amb Blau de Coomassie[®] de reaccions d'ADP-ribosilació realitzades amb les proteïnes purificades de tipus salvatge (GAPDH) o els mutants indicats.

La proteïna GAPDH d'*E. coli* conté tres residus de cisteïna en la seva seqüència, en les posicions 149, 153 i 288. Per tal d'identificar quin d'aquests tres residus és el modificat per ADP-ribosilació, es va procedir a mutar dirigidament cada un d'ells per alanina i les proteïnes recombinants es van purificar (MÈTODES 3.7.3). Es van dur a terme reaccions d'ADP-ribosilació amb cada una de les proteïnes recombinants i amb la de tipus salvatge. Les mutacions C153A o C288A no van afectar a l'ADP-ribosilació de GAPDH, però la mutació C149A va eliminar el marcatge radioactiu de la proteïna (Fig. 4.30C). Aquests resultats mostren que el residu de la GAPDH d'*E. coli* modificat per ADP-ribosilació és la cisteïna 149, que es troba en el centre actiu de la proteïna.

Donat que l'aminoàcid modificat es trobava al centre actiu, la seva ADP-ribosilació podria ser un mecanisme per inactivar la proteïna. Així doncs, es va assajar la seva activitat enzimàtica. Amb aquest objectiu es van dur a terme reaccions d'ADP-ribosilació amb GAPDH recombinant amb concentracions creixents de NAD^+ no radioactiu. Aquestes reaccions es van dur a terme a 37°C durant 1h i immediatament es va assajar l'activitat GAPDH segons el procediment descrit a MÈTODES 3.4.9.1. Els resultats es mostren a la figura 4.31. A una concentració de NAD^+ $2\mu\text{M}$, que correspon a la concentració emprada normalment a les reaccions d'ADP-ribosilació, no es va observar cap canvi significatiu en l'activitat de GAPDH. El fet que només una petita fracció de la totalitat de GAPDH sigui ADP-ribosilada, tal i com es dedueix del resultat de l'anàlisi fet en l'electroforesi bidimensional (Fig. 4.29B), podria explicar aquesta falta d'efecte. A més, concentracions més altes de NAD^+ augmenten l'activitat GAPDH en comptes de disminuir-la, i podrien estar emmascarant un efecte inhibitori de l'ADP-ribosilació de la proteïna. Aquest mateix efecte s'ha descrit també per la GAPDH d'*Entamoeba histolytica* (Álvarez *i col*, 2007), i probablement és degut a l'efecte estabilitzador del cofactor sobre les deshidrogenases dependents de NAD^+ , ja que quan la reacció d'ADP-ribosilació es va dur a terme a 4°C , condició en la que no es produeix ADP-ribosilació, es va observar el mateix fenomen. Tot i que no s'ha pogut demostrar, és possible que l'ADP-ribosilació de la GAPDH tingui algun efecte inactivador en l'enzim.

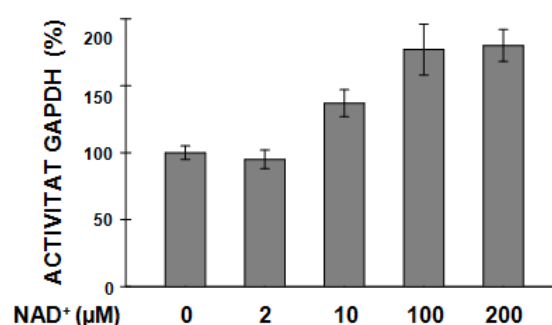


Figura 4.31. Activitat enzimàtica de la GAPDH recombinant en condicions d'ADP-ribosilació. Les mostres es van sotmetre a reaccions d'ADP-ribosilació durant 1h a 37°C amb les concentracions indicades de NAD^+ . L'activitat GAPDH es va mesurar immediatament segons el protocol descrit a MÈTODES 3.4.9.1. Els resultats es mostren com a mitjana \pm SD.

4.2.3.4. Estimulació de la modificació postraducciona de GAPDH per òxid nítric

A més de l'activitat d'ADP-ribosilació de GAPDH de mamífers i bacteris, s'ha descrit que l'òxid nítric (NO) estimula una modificació postraducciona dependent de NAD^+ que consisteix en la unió covalent i irreversible del coenzim al lloc tiol del centre actiu de la GAPDH (McDonald i Moss, 1993).

En aquest treball es van dur a terme reaccions d'ADP-ribosilació amb $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$ en absència i presència de nitroprussiat sòdic (SNP) 2mM, un donador d'NO. Aquest experiment es va realitzar tant amb GAPDH recombinant (10 μg) com amb el sobrenedant de cultius de la soca EHEC en DMEM (75 μg), a diferents temps. Els resultats es presenten a la figura 4.32, i com es pot observar, la incorporació de radioactivitat a la GAPDH va ser clarament superior en les reaccions en les que s'havia addicionat SNP. Aquesta diferència ja és visible en els temps més curts de reacció, i augmenta a mesura que s'allarga el temps d'incubació.

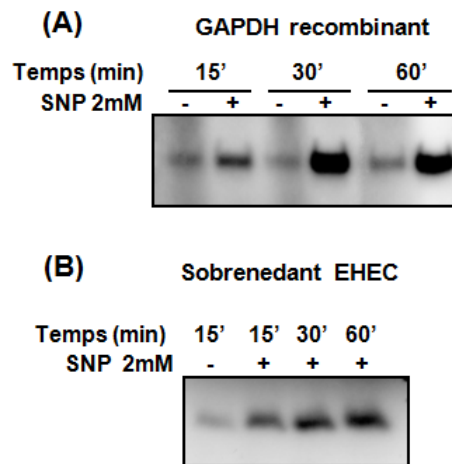


Figura 4.32. Efecte de l'addició d'SNP en la modificació de GAPDH per NAD^+ . La GAPDH purificada **(A)**, o el sobrenedant de cultius d'EHEC **(B)**, es van incubar amb $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$ en absència o presència d'SNP (2mM). En el temps indicat per cada mostra, les reaccions es van aturar per addició de tampó de càrrega per SDS-PAGE i es van escalfar a 70 $^{\circ}\text{C}$ durant 20min. Seguidament es van sotmetre a electroforesi en gels al 12%. Es mostren les autoradiografies corresponents.

Les espècies reactives del nitrogen funcionen com a poderosos antimicrobians en les defenses de l'hoste. Recentment, s'ha identificat un conjunt de proteïnes d'*E. coli* com a dianes de modificació en grups tiol reversibles després d'un tractament amb òxid nítric *in vivo* (Brandes *i col*, 2007). La GAPDH és una d'aquestes proteïnes. Se sap que després del tractament de GAPDH amb donadors d'òxid nítric, la cisteïna de la posició 149 és S-nitrosilada, i això comporta una inactivació reversible de l'enzim (Ishii *i col*, 1999; Mohr *i col*, 1999). Diversos estudis han demostrat que en aquestes condicions, en que la cisteïna 149 es troba S-nitrosilada, la modificació postraducciona dependent de NAD^+ no és realment una ADP-ribosilació, sinó una unió directa de la molècula de NAD^+ sencera al centre actiu de l'enzim (Itoga *i col*, 1997; McDonald i Moss, 1993), la qual cosa resulta en una inactivació irreversible de l'enzim. En aquesta reacció, el substrat preferit és el NADH i no el NAD^+ (Mohr *i col*, 1996). Donat que es requereix l'S-nitrosilació de la cisteïna 149 per iniciar la unió

irreversible del NAD^+ (NADH), aquest mecanisme no explicaria la modificació de la GAPDH d'*E. coli* observada *in vivo* o en reaccions realitzades en absència de donador d'NO. De fet, en estudis realitzats per comprovar la modificació covalent de GAPDH de mamífer per NAD^+ induïda per NO, el marcatge de GAPDH era indetectable en absència dels donadors d'NO (McDonald i Moss, 1993; Mohr *i col*, 1996).

4.2.3.5. Implicació de la modificació postraduccional per NAD^+ de la GAPDH en la interacció d'*E. coli* amb l'epiteli intestinal

Els resultats obtinguts apunten a l'existència de funcions addicionals per la GAPDH extracel·lular en les soques d'*E. coli* que la secreten, tant patògenes com probiòtiques. A més a més del paper proposat en promoure la migració bacteriana a través de la seva interacció amb plasminogen i fibrinogen, la GAPDH extracel·lular, com a diana de modificacions postraduccionals, podria formar part dels compostos rics en cisteïna que les soques d'*E. coli* secreten per protegir-se de la resposta oxidativa de l'hoste durant la infecció o colonització.

En mamífers, la modificació de la GAPDH s'ha relacionat amb les diferents funcions que pot exercir la proteïna, i en concret amb la seva localització subcel·lular. Per exemple, s'ha determinat que la GAPDH citosòlica té un pI més àcid, mentre que la GAPDH nuclear el té més bàsic. Diferents modificacions postraduccionals estarien determinant la localització de la proteïna, i per tant també la seva funció (Sirover, 2005).

Alternativament, la GAPDH extracel·lular també podria tenir una funció en la senyalització cel·lular en l'hoste, o, mitjançant la seva activitat ADP-ribosiltransferasa, podria modificar proteïnes de les cèl·lules epitelials en les primeres fases de la colonització. Això seria compatible amb la fracció de GAPDH internalitzada o translocada a l'interior de la cèl·lula hoste. Com ja s'ha exposat anteriorment, en *L. monocytogenes*, la GAPDH intervé en el trànsit intracel·lular a través de la seva activitat ADP-ribosiltransferasa, inactivant l'intercanviador GDP/GTP Rab-5a (Álvarez-Domínguez *i col*, 2008).

4.3. COMUNICACIÓ *E.coli*-ENTERÒCIT: APORTACIONS D'AQUEST TREBALL

En el context de la colonització de l'epiteli intestinal, s'ha proposat que s'estableix una comunicació o diàleg entre els bacteris i l'enteròcit. En aquest sentit, aquest treball contribueix a la comprensió de determinats fenòmens que tenen lloc durant la colonització i adaptació metabòlica dels bacteris adherits a l'epiteli.

D'una banda, la inducció de l'operó *lldPRD* en bacteris adherits a cèl·lules d'epiteli intestinal constitueix un exemple d'adaptació metabòlica a la situació d'adhesió i confereix al bacteri la capacitat d'utilitzar com a font de carboni un dels productes de fermentació excretat per la cèl·lula eucariota.

Per altra banda, patògens i probiòtics comparteixen la capacitat de secreció de determinades proteïnes *housekeeping* amb característiques multifuncionals, el que confereix a aquestes proteïnes un paper clau en la comunicació i interacció amb l'hoste. La secreció de GAPDH per part de patògens i probiòtics representa un avantatge per aquests bacteris en la colonització dels epitelis respecte d'altres components de la microbiota. En aquest sentit, la capacitat de GAPDH d'interaccionar amb plasminogen i fibrinogen pot representar un mecanisme dirigit a degradar aquestes proteïnes de la matriu extracel·lular, facilitant així la migració d'aquests bacteris a través de la mucosa intestinal i contribuint a la capacitat adhesió a l'epiteli intestinal. Aquest és un pas essencial tant per a la colonització dels epitelis per part de comunitats microbianes beneficioses de la microbiota com per iniciar la infecció de l'enteròcit per part patògens. Un altre aspecte de la funció de la GAPDH en la interacció amb la mucosa intestinal està relacionat amb les modificacions postraduccionals d'aquesta proteïna. El fet que la GAPDH sigui capaç de catalitzar la seva pròpia ADP-ribosilació, i a més, sigui irreversiblement modificada per NAD^+ en presència d'òxid nítric suggereix noves funcions per la GAPDH extracel·lular. La proteïna secretada podria formar part dels sistemes de protecció del bacteri front la resposta oxidativa de l'hoste durant la infecció o podria estar implicada en mecanismes de transducció de senyal en la cèl·lula hoste.

5

CONCLUSIONS

5. CONCLUSIONS

1. Quant a la implicació del regulador transcripcional LldR en el diàleg bacteri-enteròcit:
 - a. El gen *lldR* es troba sobreexpressat en bacteris EHEC adherits a cèl·lules Caco-2.
 - b. Els gens *lldP*, *lldR* i *lldD* es transcriuen a partir d'un únic promotor situat la regió 5' del gen *lldP*. L'inici de transcripció de l'operó *lldPRD* està localitzat 110 nucleòtids a 5' del codó d'inici de la traducció d'*lldP*.
 - c. L'operó *lldPRD* és induït per L-lactat i sotmès a repressió catabòlica per glucosa a través del mecanisme d'exclusió de l'inductor.
 - d. S'ha demostrat que PdhR no participa en el control transcripcional d'*lldPRD*.
 - e. LldR regula l'operó *lldPRD* de forma dual. En absència d'L-lactat la unió simultània d'LldR als operadors O1 i O2 promou la repressió de la transcripció a través de la formació d'un bucle, mentre que en presència d'L-lactat activa la transcripció a través de la unió exclusiva a l'operador O1.
 - f. La sobreexpressió de l'operó *lldPRD* en bacteris adherits pot ser deguda a la producció local d'L-lactat per part de l'enteròcit. Aquesta seria una resposta adaptativa del bacteri en la utilització d'una font de carboni excretada per l'hoste.

2. Quant a la implicació de la GAPDH extracel·lular d'*E. coli* en el diàleg amb l'enteròcit:
 - a. La secreció de GAPDH en soques EHEC i EPEC té lloc a través d'almenys dos sistemes: (i) el sistema T3SS de tipus injectisoma en bacteris crescuts en medi de cultiu eucariota; (ii) un altre sistema encara per identificar, no exclusiu de soques patògenes i actiu en cèl·lules crescudes en medi bacteriològic LB.
 - b. La secreció de GAPDH en soques d'*E. coli* patògenes i probiòtiques (Nissle 1917), però no en soques naturals aïllades d'individus sans (EcoR26), indica que la proteïna extracel·lular desenvolupa un paper en l'adhesió i/o interacció del bacteri amb l'hoste. En aquest sentit s'ha demostrat que GAPDH és capaç d'interaccionar amb plasminogen i fibrinogen, la qual cosa pot facilitar la migració d'aquestes soques a través de la matriu extracel·lular i afavorir la colonització.
 - c. La GAPDH secretada pel bacteri és internalitzada per endocitosi per cèl·lules epitelials HeLa en cultiu. Es desconeix el mecanisme i funció d'aquesta internalització.
 - d. Estudis preliminars *in vitro* han identificat la interacció de GAPDH amb els factors d'elongació de la traducció eucariotes EF1B γ i EF1B α .
 - e. La GAPDH és modificada postraduccionalment per ADP-ribosilació de la cisteïna 149. L'enzim és capaç de catalitzar la seva pròpia modificació.
 - f. L'òxid nítric estimula la modificació irreversible de GAPDH per NAD⁺. La proteïna secretada podria actuar com a diana d'oxidació i per tant com a mecanisme de protecció enfront la resposta oxidativa de l'hoste.

6

REFERÈNCIES

6. REFERÈNCIES

A

- Altschul** SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997. 25:3389-402.
- Álvarez** AH, Martínez-Cadena G, Silva ME, Saavedra E, Avila EE. *Entamoeba histolytica*: ADP-ribosylation of secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Exp Parasitol.* 2007. 117(4):349-56.
- Álvarez-Domínguez** C, Madrazo-Toca F, Fernández-Prieto L, Vandekerckhove J, Pareja E, Tobes R, Gómez-López MT, Del Cerro-Vadillo E, Fresno M, Leyva-Cobián F, Carrasco-Marín E. Characterization of a *Listeria monocytogenes* protein interfering with Rab5a. *Traffic.* 2008. 9(3):325-37.
- Antikainen** J, Kuparinen V, Lähteenmäki K, Korhonen TK. Enolases from Gram-positive bacterial pathogens and commensal lactobacilli share functional similarity in virulence-associated traits. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007. 51(3):526-34.
- Ausubel** FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Current protocols in molecular biology.* 1991. Ed. John Wiley & Sons. New York.

B

- Badea** L, Beatson SA, Kaparakis M, Ferrero RL, Hartland EL. Secretion of flagellin by the LEE-encoded type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *BMC Microbiol.* 2009. 9:30.
- Balsalobre** C, Silván JM, Berglund S, Mizunoe Y, Uhlin BE, Wai SN. Release of the type I secreted alpha-haemolysin via outer membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2006. 59(1):99-112.
- Barbosa** MS, Bão SN, Andreotti PF, de Faria FP, Felipe MS, dos Santos Feitosa L, Mendes-Giannini MJ, Soares CM. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immun.* 2006. 74(1):382-9.

- Batthyany** C, Schopfer FJ, Baker PR, Durán R, Baker LM, Huang Y, Cerveňansky C, Branchaud BP, Freeman BA. Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids *in vivo*. *J Biol Chem*. 2006. 281(29):20450-63.
- Benson** DA, Boguski M, Lipman DJ, Ostell J, Ouellette BF. GenBank. *Nucleic Acids Res*. 1998. 26:1-7.
- Bergmann** S, Wild D, Diekmann O, Frank R, Bracht D, Chhatwal GS, Hammerschmidt S. Identification of a novel plasmin(ogen)-binding motif in surface displayed alpha-enolase of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*. 2003. 49(2):411-23.
- Bergmann** S, Rohde M, Preissner KT, Hammerschmidt S. The nine residue plasminogen-binding motif of the pneumococcal enolase is the major cofactor of plasmin-mediated degradation of extracellular matrix, dissolution of fibrin and transmigration. *Thromb Haemost*. 2005. 94(2):304-11.
- Bergonzelli** GE, Granato D, Pridmore RD, Marvin-Guy LF, Donnicola D, Corthésy-Theulaz IE. GroEL of *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC 533) is cell surface associated: potential role in interactions with the host and the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*. 2006. 74(1):425-34.
- Beveridge** TJ. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol*. 1999. 181(16):4725-33.
- Bingle** LE, Bailey CM, Pallen MJ. Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr Opin Microbiol*. 2008. 11(1):3-8.
- Boël** G, Jin H, Pancholi V. Inhibition of cell surface export of group A streptococcal anchorless surface dehydrogenase affects bacterial adherence and antiphagocytic properties. *Infect Immun*. 2005. 73(10):6237-48.
- Boronat** A, Aguilar J. Rhamnose-induced propanediol oxidoreductase in *Escherichia coli*: Purification, properties, and comparison with the fucose-induced enzyme. *J. Bacteriol*. 1979. 140:320-326.
- Brandes** N, Rinck A, Leichert LI, Jakob U. Nitrosative stress treatment of *E. coli* targets distinct set of thiol-containing proteins. *Mol Microbiol*. 2007. 66(4):901-14.
- Brooks** CS, Hefty PS, Jolliff SE, Akins DR. Global analysis of *Borrelia burgdorferi* genes regulated by mammalian host-specific signals. *Infect Immun*. 2003. 71(6):3371-83.
- Brückner**, R. y Titgemeyer, F. Carbon catabolic repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol. Letters*. 2002. 209:142-8.
- Brüne** B, Lapetina EG. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a target for nitric oxide signaling. *Adv Pharmacol*. 1995. 34:351-60.
- Bunch** PK, Mat-Jan F, Lee N, Clark DP. The *ldhA* gene encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Microbiology*. 1997. 143 (Pt 1):187-95.

C

- Campos**, E. Genómica funcional en *Escherichia coli*. Caracterización y análisis de la función de los sistemas parálogos *yiaK-S* y *yjfR-X* (*ulaA-G*). Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona, 2004.
- Candela** M, Bergmann S, Vici M, Vitali B, Turroni S, Eikmanns BJ, Hammerschmidt S, Brigidi P. Binding of human plasminogen to *Bifidobacterium*. *J Bacteriol*. 2007. 189(16):5929-36.

- Casadaban** MJ. Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J. Mol. Biol.* 1976. 104:541-55.
- Colussi** C, Albertini MC, Coppola S, Rovidati S, Galli F, Ghibelli L. H₂O₂-induced block of glycolysis as an active ADP-ribosylation reaction protecting cells from apoptosis. *FASEB J.* 2000. 14(14):2266-76.
- Cornelis** GR. The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol.* 2006. 4(11):811-25.
- Coulthurst** SJ, Palmer T. A new way out: protein localization on the bacterial cell surface via Tat and a novel Type II secretion system. *Mol Microbiol.* 2008. 69(6):1331-5.
- Cross** ML, Ganner A, Teilab D, Fray LM. Patterns of cytokine induction by gram-positive and gram-negative probiotic bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2004. 42(2):173-80.

D

- D'Alessio** G, Josse J. Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, phosphoglycerate kinase, and phosphoglyceromutase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 1971. 246:4319-25.
- Dahan** S, Knutton S, Shaw RK, Crepin VF, Dougan G, Frankel G. Transcriptome of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 adhering to eukaryotic plasma membranes. *Infect. Immun.* 2004. 72(9): 5452-59.
- Delgado** ML, O'Connor JE, Azorín I, Renau-Piqueras J, Gil ML, Gozalbo D. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* TDH1, TDH2 and TDH3 genes are also cell wall proteins. *Microbiology.* 2001, 147(Pt 2):411-7.
- Desvaux** M, Hébraud M, Talon R, Henderson IR. Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends Microbiol.* 2009. (4):139-45.
- Dietrich** G, Kurz S, Hünber C, Aepinus C, Theiss S, Guckenberger M, Panzer U, Weber J, Frosh M. Transcriptome analysis of *Neisseria meningitidis* during infection. *J. Bacteriol.* 2003. 185:155-64.
- DiRusso**, CC, Black PN, Weimar JD. Molecular inroads into the regulation and metabolism of fatty acids, lessons from bacteria. *Prog. Lipid Res.* 1999. 38:129-97.
- Dong** JM, Taylor JS, Latour DJ, Iuchi S, Lin EC. Three overlapping *lct* genes involved in L-lactate utilization by *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1993. 175(20):6671-8.
- Donnenberg** MS, Calderwood SB, Donohue RA, Keush GT, Kaper JB. Construction and analysis of TnphoA mutants of enteropathogenic *Escherichia coli* unable to invade HEP-2 cells. *Infect. Immun.* 1990. 58:1565-71.
- Donnenberg** MS, Yu J, Kaper JB. A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *J. Bacteriol.* 1993. 175:4670-80.
- Dudley** EG, Thomson NR, Parkhill J, Morin NP, Nataro JP. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a *pheU* pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2006. 61(5):1267-82.

E

- Eaton** P, Wright N, Hearse DJ, Shattock MJ. Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase oxidation during cardiac ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2002. 34(11):1549-60.
- Ebel** F, Deibel C, Kresse AU, Guzmán CA, Chakraborty T. Temperature- and medium-dependent secretion of proteins by shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1996. 64:4472-79.
- Egea** L. Implicació del proinflamatori PAF i de la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa d'*Escherichia coli* enterohemorràgica en el diàleg enteròcit-bacteri en la infecció intestinal. Tesi doctoral. Universitat de Barcelona, 2006.
- Egea** L, Aguilera L, Giménez R, Sorolla MA, Aguilar J, Badía J, Baldoma L. Role of secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the infection mechanism of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: interaction of the extracellular enzyme with human plasminogen and fibrinogen. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007. 39(6):1190-203.
- Ejiri** S. Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc finger protein R1-associated nuclear localization. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2002. 66(1):1-21.
- el Bayâ** A, Linnemann R, von Olleschik-Elbheim L, Robenek H, Schmidt MA. Endocytosis and retrograde transport of pertussis toxin to the Golgi complex as a prerequisite for cellular intoxication. *Eur J Cell Biol.* 1997. 73(1):40-8.
- Elliott** T. A method for constructing single-copy lac fusions in *Salmonella typhimurium* and its application to the *hemA-prfA* operon. *J. Bacteriol.* 1992. 174:245-253.

F

- Falk** PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998. 62(4):1157-70.
- Ferreira-da-Silva** F, Pereira PJ, Gales L, Roessle M, Svergun DI, Moradas-Ferreira P, Damas AM. The crystal and solution structures of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase reveal different quaternary structures. *J Biol Chem.* 2006. 281(44):33433-40.
- Francetic** O, Pugsley AP. The cryptic general secretory pathway (*gsp*) operon of *Escherichia coli* K-12 encodes functional proteins. *J Bacteriol.* 1996. 178(12):3544-9.
- Fuqua** WC. An improved chloramphenicol resistance gene cassette for site-directed marker replacement mutagenesis. *BioTechniques.* 1992. 12:223-5.

G

- Ganter** C, Plüctun A. Glycine to alanine substitutions in helices of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Effects on stability. *Biochemistry.* 1990. 29:9395-402.
- Gerlach** RG, Hensel M. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol.* 2007. 297(6):401-15.

- Gozalbo** D, Gil-Navarro I, Azorín I, Renau-Piqueras J, Martínez JP, Gil ML. The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. *Infect Immun*. 1998. 66(5):2052-9.
- Granato** D, Bergonzelli GE, Pridmore RD, Marvin L, Rouvet M, Corthésy-Theulaz IE. Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infect Immun*. 2004. 72(4):2160-9.

H

- Hanahan** D. Techniques for transformation of *Escherichia coli* a "DNA cloning: a practical approach". 1995. Editat per Glover DM i Hames BD. Second Edition. IRL Press, Oxford. 1:1-35.
- Haydon** DJ, Guest JR. A new family of bacterial regulatory proteins. *FEMS Microbiol*. 1991. 63:291-5.
- Haydon** DJ, Quail MA, Guest JR. A mutation causing constitutive synthesis of the pyruvate dehydrogenase complex in *Escherichia coli* is located within the *pdhR* gene. *FEBS Lett*. 1993. 336:43-7.
- Hooper** LV, Xu J, Falk PG, Midtvedt T, Gordon JI. A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive ecosystem. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999. 96(17):9833-8.
- Hooper** LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*. 2001. 291(5505):881-4.
- Hughes** MJ, Moore JC, Lane JD, Wilson R, Pribul PK, Younes ZN, Dobson RJ, Everest P, Reason AJ, Redfern JM, Greer FM, Paxton T, Panico M, Morris HR, Feldman RG, Santangelo JD. Identification of major outer surface proteins of *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun*. 2002. 70(3):1254-9.
- Hurmala** V, Edelman S, Antikainen J, Baumann M, Lähteenmäki K, Korhonen TK. Extracellular proteins of *Lactobacillus crispatus* enhance activation of human plasminogen. *Microbiology*. 2007. 153(Pt 4):1112-22.

I

- Ibañez** E, Campos E, Baldomà L, Aguilar J, Badía J. Regulation of expression of the *yiaKLMNOPQRS* operon for carbohydrate utilization in *Escherichia coli*: involvement of the main transcriptional factors. *J Bacteriol*. 2000. 182(16):4617-24.
- Ishii** T, Sunami O, Nakajima H, Nishio H, Takeuchi T, Hata F. Critical role of sulfenic acid formation of thiols in the inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by nitric oxide. *Biochem Pharmacol*. 1999. 58(1):133-43.
- Itoga** M, Tsuchiya M, Ishino H, Shimoyama M. Nitric oxide-induced modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with NAD⁺ is not ADP-ribosylation. *J Biochem*. 1997. 121(6):1041-6.

J

- Jarvis** KG, Girón JA, Jerse AE, McDaniel TK, Donnenberg MS, Kaper JB. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. Proc Natl Acad Sci USA. 1995. 92(17):7996-8000
- Jeffery** CJ. Moonlighting proteins - an update. Mol Biosyst. 2009. 5(4):345-50.
- Jin** H, Song YP, Boel G, Kochar J, Pancholi V. Group A streptococcal surface GAPDH, SDH, recognizes uPAR/CD87 as its receptor on the human pharyngeal cell and mediates bacterial adherence to host cells. J Mol Biol. 2005. 350(1):27-41.
- Johansson** J, Dagberg B, Richet E, Uhlin BE. H-NS and StpA proteins stimulate expression of the maltose regulon in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1998. 180(23):6117-25.

K

- Kadurugamuwa** JL, Beveridge TL. Membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* and *Shigella flexneri* can be integrated into the surfaces of other gram-negative bacteria. Microbiology. 1999. 145:2051-60.
- Kenny** B, Abe A, Stein M, Finlay BB. Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. Infect. Immun. 1997. 65:2606-12.
- Kenny** B, Finlay BB. Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995. 92(17):7991-5.
- Kinoshita** H, Uchida H, Kawai Y, Kawasaki T, Wakahara N, Matsuo H, Watanabe M, Kitazawa H, Ohnuma S, Miura K, Horii A, Saito T. Cell surface *Lactobacillus plantarum* LA 318 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) adheres to human colonic mucin. J Appl Microbiol. 2008. 104(6):1667-74.
- Kinoshita** H, Wakahara N, Watanabe M, Kawasaki T, Matsuo H, Kawai Y, Kitazawa H, Ohnuma S, Miura K, Horii A, Saito T. Cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) of *Lactobacillus plantarum* LA 318 recognizes human A and B blood group antigens. Res Microbiol. 2008. 159(9-10):685-91.
- Klug** G. The role of mRNA degradation in the regulated expression of bacterial photosynthesis genes. Mol Microbiol. 1993. 9(1):1-7.
- Knutton** S. Microscopic methods to study STEC. Methods in Molecular Medicine, vol.73. En "*E. coli* shiga toxin methods and protocols". 2003. Editat per Philpott D i Ebel F. Humana Press, Inc, Totowa, NJ, pp.137-149.
- Koch-Nolte** F, Kernstock S, Mueller-Dieckmann C, Weiss MS, Haag F. Mammalian ADP-ribosyltransferases and ADP-ribosylhydrolases. Front Biosci. 2008.13:6716-29.
- Kostakioti** M, Newman CL, Thanassi DG, Stathopoulos C. Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane. J Bacteriol. 2005. 187(13):4306-14.
- Kuehn** MJ, Kesty NC. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. Genes Dev. 2005. 19(22):2645-55.
- Kunert** A, Losse J, Gruszyn C, Hühn M, Kaendler K, Mikkat S, Volke D, Hoffmann R, Jokiranta TS, Seeberger H, Moellmann U, Hellwage J, Zipfel PF. Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. J Immunol. 2007. 179(5):2979-88.

L

- Laemmli** UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*.1970. 227:680-5.
- Lane** D, Prentki P, Chandler M. Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions. *Microbiol. Rev.* 1992. 56:509-28.
- Le Sourd** F, Boulben S, Le Bouffant R, Cormier P, Morales J, Belle R, Mulner-Lorillon O. eEF1B: At the dawn of the 21st century. *Biochim Biophys Acta.* 2006. 1759(1-2):13-31.
- Lee** SH, Galán JE. *Salmonella* type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. *Mol Microbiol.* 2004. 51(2):483-95.
- Lenz** LL, Mohammadi S, Geissler A, Portnoy DA. SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003. 100(21):12432-7.
- Li** M, Rosenshine I, Tung SL, Wang XH, Friedberg D, Hew CL, Leung KY. Comparative proteomic analysis of extracellular proteins of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* strains and their *ihf* and *ler* mutants. *Appl Environ Microbiol.* 2004. 70(9):5274-82.
- Lin** ECC. Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 1976. 30:535-79.
- Lin** H. Nicotinamide adenine dinucleotide: beyond a redox coenzyme. *Org Biomol Chem.* 2007. 5(16):2541-54.
- Ling** E, Feldman G, Portnoi M, Dagan R, Overweg K, Mulholland F, Chalifa-Caspi V, Wells J, Mizrahi-Nebenzahl Y. Glycolytic enzymes associated with the cell surface of *Streptococcus pneumoniae* are antigenic in humans and elicit protective immune responses in the mouse. *Clin Exp Immunol.* 2004. 138(2):290-8.
- Link** AJ, Phillips D, Church GM. Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J. Bacteriol.* 1997. 179:6228-6237.
- Liu** Y, Oshima S, Kurohara K, Ohnishi K, Kawai K. Vaccine efficacy of recombinant GAPDH of *Edwardsiella tarda* against Edwardsiellosis. *Microbiol Immunol.* 2005. 49(7):605-12.
- Lottenberg** R, Broder CC, Boyle MD, Kain SJ, Schroeder BL, Curtiss R 3rd. Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of a streptococcal plasmin receptor. *J Bacteriol.* 1992. 174(16):5204-10.
- Lowry** OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951. 193:265-25.
- Lynch** AS, Lin ECC. Transcriptional control mediated by the ArcA two-component response regulator protein of *Escherichia coli*: characterization of DNA binding at target promoters. *J. Bacteriol.* 1996. 178:6238-49.

M

- Madureira** P, Baptista M, Vieira M, Magalhães V, Camelo A, Oliveira L, Ribeiro A, Tavares D, Trieu-Cuot P, Vilanova M, Ferreira P. *Streptococcus agalactiae* GAPDH is a virulence-associated immunomodulatory protein. *J Immunol.* 2007. 178(3):1379-87.
- Mathews** KS. DNA looping. *Microbiol. Rev.* 1992. 56:123-36.

- McDonald** LJ, Moss J. Stimulation by nitric oxide of an NAD linkage to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993. 90(13):6238-41
- Michgehl** S, Heusipp G, Greune L, Rüter C, Schmidt MA. Esp-independent functional integration of the translocated intimin receptor (Tir) of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) into host cell membranes. *Cell Microbiol*. 2006. 8(4):625-33.
- Miller** JH. A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and related bacteria. 1992. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Miwa** Y, Fujita Y. Purification and characterization of a repressor for the *Bacillus subtilis gnt* operon. *J Biol Chem*. 1988. 263(26):13252-7.
- Modun** B, Williams P. The staphylococcal transferrin-binding protein is a cell wall glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Infect Immun*. 1999. 67(3):1086-92.
- Mohr** S, Stamler JS, Brüne B. Posttranslational modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by S-nitrosylation and subsequent NADH attachment. *J Biol Chem*. 1996. 271(8):4209-14.
- Mohr** S, Hallak H, de Boitte A, Lapetina EG, Brüne B. Nitric oxide-induced S-glutathionylation and inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem*. 1999. 274(14):9427-30
- Mueller** CA, Broz P, Cornelis GR. The type III secretion system tip complex and translocon. *Mol Microbiol*. 2008. 68(5):1085-95.

N

- Nichols** BP, Obaid S, Meiners, V. Sequence analysis of Tn10 insertion sites in a collection of *Escherichia coli* strains used for genetic mapping and strain construction. *J Bacteriol*. 1998. 180:6408-11.
- Nougayrède** JP, Fernandes PJ, Sonnenberg MS. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cell Microbiol*. 2003. 5(6):359-72.
- Núñez** MF, Kwon O, Wilson TH, Aguilar J, Baldoma L, Lin EC. Transport of L-Lactate, D-Lactate, and glycolate by the LldP and GlcA membrane carriers of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002. 290(2):824-9.
- Núñez** MF, Pellicer MT, Badía J, Aguilar J, Baldomà L. The gene *yghK* linked to the *glc* operon of *Escherichia coli* encodes a permease for glycolate that is structurally and functionally similar to L-lactate permease. *Microbiology*. 2001. 147:1069-77.

O

- Ochman** H, Selander RK. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J. Bacteriol*. 1984. 157:690-3.
- O'Connell** CB, Creasey EA, Knutton S, Elliott S, Crowther LJ, Luo W, Albert MJ, Kaper JB, Frankel G, Sonnenberg MS. SepL, a protein required for enteropathogenic *Escherichia coli* type III translocation, interacts with secretion component SepD. *Mol Microbiol*. 2004. 52(6):1613-25.
- Ogasawara** H, Ishida Y, Yamada K, Yamamoto K, Ishihama A. PdhR (pyruvate dehydrogenase complex regulator) controls the respiratory electron transport system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. 2007. 189:5534-41.

P

- Palmer T**, Sargent F, Berks BC. Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway. *Trends Microbiol.* 2005. (4):175-80.
- Pancholi V**, Fischetti VA. A major surface protein on Group A *Streptococci* is glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J. Exp. Med.* 1992. 176:415-26.
- Pancholi V**, Fischetti VA. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on the surface of group A streptococci is also an ADP-ribosylating enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993. 90(17):8154-8.
- Pancholi V, Fischetti VA.** Regulation of the phosphorylation of human pharyngeal cell proteins by group A streptococcal surface dehydrogenase: signal transduction between streptococci and pharyngeal cells. *J Exp Med.* 1997. 186(10):1633-43.
- Pancholi V**, Chhatwal GS. Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. *Int J Med Microbiol.* 2003. 293(6):391-401.
- Peekhaus N**, Conway T. Positive and negative transcriptional regulation of the *Escherichia coli* gluconate regulon gene *gntT* by GntR and the cyclic AMP (cAMP)-cAMP receptor protein complex. *J. Bacteriol.* 1998. 180:1777-85.
- Pelicic V.** Type IV pili: e pluribus unum? *Mol Microbiol.* 2008. 68(4):827-37.
- Pellicer MT.** Caracterització genètica i funcional de l'operó *glc*, implicat en el metabolisme de glicolat i glioxilat a *Escherichia coli*. Tesi doctoral. Universitat de Barcelona, 1998.

Q

- Quail MA**, Guest JR. Purification, characterization and mode of action of PdhR, the transcriptional repressor of the *pdhR-aceE-lpd* operon of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 1995. 15:519-529.
- Quail MA**, Haydon DJ, Guest JR. The *pdhR-aceEF-lpd* operon of *Escherichia coli* expresses the pyruvate dehydrogenase complex. *Mol Microbiol.* 1994. 12(1):95-104.

R

- Raman N**, Black PN, DiRusso CC. Characterization of the fatty acid-responsive transcription factor FadR. Biochemical and genetic analyses of the native conformation and functional domains. *J Biol Chem.* 1997. 272(49):30645-50.
- Rawitch AB.** An improved tool for molecular biology. *Science.* 2000. 288:457-8.
- Reverter-Branchat G**, Cabisco E, Tamarit J, Ros J. Oxidative damage to specific proteins in replicative and chronological-aged *Saccharomyces cerevisiae*: common targets and prevention by calorie restriction. *J Biol Chem.* 2004. 279(30):31983-9.
- Rigali S**, Derouaux A, Giannotta F, Dusart J. Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *J Biol Chem.* 2002. 277(15):12507-15.
- Roca I**, Ballana E, Panosa A, Torrents E, Gibert I. Fumarate and nitrate reduction (FNR) dependent activation of the *Escherichia coli* anaerobic ribonucleotide reductase *nrdDG* promoter. *Int Microbiol.* 2008. 11(1):49-56.

S

- Saier** MH Jr. Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. *J Membr Biol.* 2006. 214(2):75-90.
- Sambrook** J, Russell DW. "Molecular cloning: a laboratory manual". 2001. 3rd edition. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
- Sánchez** B, Bressollier P, Urdaci MC. Exported proteins in probiotic bacteria: adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular cross-talking with the host. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008. 54(1):1-17.
- Schaumburg** J, Diekmann O, Hagendorff P, Bergmann S, Rohde M, Hammerschmidt S, Jänsch L, Wehland J, Kärst U. The cell wall subproteome of *Listeria monocytogenes*. *Proteomics.* 2004. (10):2991-3006.
- Schurig-Briccio** LA, Rintoul MR, Volentini SI, Farías RN, Baldomà L, Badía J, Rodríguez-Montelongo L, Rapisarda VA. A critical phosphate concentration in the stationary phase maintains *ndh* gene expression and aerobic respiratory chain activity in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 2008. 284(1):76-83.
- Seifert** KN, McArthur WP, Bleiweis AS, Brady LJ. Characterization of group B streptococcal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: surface localization, enzymatic activity, and protein-protein interactions. *Can J Microbiol.* 2003. 49(5):350-6.
- Semsey** S, Virnik K, Adhya S. A gamut of loops: meandering DNA. *Trends Biochem. Sci.* 2005. 30:334-41.
- Sha** J, Galindo CL, Pancholi V, Popov VL, Zhao Y, Houston CW, Chopra AK. Differential expression of the enolase gene under in vivo versus in vitro growth conditions of *Aeromonas hydrophila*. *Microb Pathog.* 2003. 34(4):195-204.
- Simons** RW, Houman F, Kleckner N. Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for proteins and operon fusions. *Gene.* 1987. 53:85-96.
- Sirover** MA. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta.* 1999. 1432(2):159-84.
- Sirover** MA. New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. *J Cell Biochem.* 2005. 95(1):45-52.
- Stülke**, J, Hillen W. Carbon catabolite repression in bacteria. *Current opinion in Microbiol.* 1999. 2:195-201
- Sun** J, Gunzer F, Westendorf AM, Buer J, Scharfe M, Jarek M, Gössling F, Blöcker H, Zeng AP. Genomic peculiarity of coding sequences and metabolic potential of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 inferred from raw genome data. *J Biotechnol.* 2005. 117(2):147-61.

T

- Terao** Y, Yamaguchi M, Hamada S, Kawabata S. Multifunctional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pyogenes* is essential for evasion from neutrophils. *J Biol Chem.* 2006. 281(20):14215-23.

U

Ueda K, Hayaishi O. ADP-ribosylation. *Annu Rev Biochem.* 1985. 54:73-100.

V

Vallance BA, Finlay BB. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000. 97(16):8799-806.

van Aalten DM, DiRusso CC, Knudsen J, Wierenga RK. Crystal structure of FadR, a fatty acid-responsive transcription factor with a novel acyl coenzyme A-binding fold. *EMBO J.* 2000. 19(19):5167-77.

W

Wai SN, Lindmark B, Söderblom T, Takade A, Westermark M, Oscarsson J, Jass J, Richter-Dahlfors A, Mizunoe Y, Uhlin BE. Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell.* 2003. 115(1):25-35.

Winram SB, Lottenberg R. Site-directed mutagenesis of streptococcal plasmin receptor protein (Plr) identifies the C-terminal Lys334 as essential for plasmin binding, but mutation of the *plr* gene does not reduce plasmin binding to group A streptococci. *Microbiology.* 1998, 144 (Pt 8):2025-35.

X

Xu J, Gordon JI. Inaugural Article: Honor thy symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003. 100(18):10452-9.

Y

Young GM, Schmiel DH, Miller VL. A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999. 96(11):6456-61.

Yu D, Ellis HM, Lee EC, Jenkins NA, Copeland NG, Court DL. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000. 97:5978-83.

Z

Zabarovsky ER, Winberg G. High efficiency electroporation of ligated DNA into bacteria. *Nucleic Acids Res.* 1990. 18(19):5912.

7

ANNEXES

ANNEX A.1: OLIGONUCLEÒTIDS EMPRATS COM A ENCEBADORS

En el següent annex es llisten tots els encebadors emprats en aquest treball. En els casos en que els encebadors contenen alguna diana de restricció, aquesta es troba destacada en color (**EcoRI** en vermell, **BamHI** en verd). Les regions de l'encebador que no són homòlogues al DNA motlle per tal d'introduir alguna mutació o inserció es troben subratllades.

Encebadors emprats en les reaccions d'RT-PCR

Nom	Seqüència
rrsB_fw	TGCAAGTCGAACGGTAACAG
rrsB_rv	AGTTATCCCCCTCCATCAGG
lldR_fw	CGCCTGTCAGACGAGGTTGC
lldR_rv	CCGCTTGTGAGGCGATATCC
lldP_fw	GGCAACAAAACACTACGATCCC
lldP_rv	CCAGGCCGACCAGCAATGCG

Encebadors emprats per determinar l'inici de transcripció per RACE

Nom	Seqüència
RACE-2	GAGATTCATTGCAGGTCTCCTGG
Poli(dT)	GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTV; V=A, C o G (Roche)
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6	TAAATCCACTGTGATATCTT

Encebadors emprats per a l'estudi del promotor de l'operó *pdh-aceEF-lpd*

Nom	Seqüència
S11_pdhR_fw	CCTGTATGGACATAAGGTGA
S11_pdhR_rv	CGGAGAGTTTTGGTTGGCGG
pdhR_bam1	CGC GGATCC ATTAATAAATCACAAAATTGG
pdhR_eco1	CGC GAATTC TCCAGTTGCTTGCTCAATCAC

Encebadors emprats per a l'estudi del promotor de l'operó *lctPRD*

Nom	Seqüència
lct_bam	GGAGGATCCAGAAGCTGATGAAGATGC
lct_bam2	CGCGGATCCTGGCAACAAAACACTACGATCCCG
lct_bam3	CGCGGATCCTGCATTCACCTTCTTCTCGC
lct_bam4	CGCGGATCCTTTTCATCTGGCGATTGCCG
Lct_bam4bis	CGCGGATCCTCGTTGTGCACCCAATGACC
Lct_bam5	CGCGGATCCATTCTATAGGCCGAGTAAG
lct_bam6	CGCGGATCCTTTACCAGACATCTCCCC
lct_bam7	CGCGGATCCTACATAACATTTAGTTAACC
lct_bam9	CGCGGATCCTTTACCAGACATCTCCCCCACAAGAACGAGCCCTACCAATT
lct_bam12	CGCGGATCCTTTACCAGACATCTCCCCCACAAGAATTGGCCCTATAGATTCTTC GCTTATCT
S15_lct_fw	CATTATTGTCATTATCCCTACACAACACAGACGGCAGTGCCACTTTTAC
S16_lct_fw	CCATTATTGTCATTATCCCTACACAACACAATTGGCAGTGTAGCTTTTACACAAC
lct_ins5_fw	GTCATTATCCCGATCTTACACAACAC
lct_ins10_fw	GTCATTATCCCGATCTGAGTATACACAACAC
-35mutFw	AACTCACATCAATGAAAGGAATACATAACATTTAG
P77 O1/O2	CTTTACCAGACATCTCCCCCACAAGAATTGGCAGTGCCAATTCCAATTCTTCG
lct_eco	GCGAATTCAGCGATGCTATCAGACTGG
lct_eco2	CGCGAATTCGTGTATTGAGAATATGCACCACC
lct_eco3	CGCGAATTCAGCGGGCAACTTCATGCC
S2_lct_rv	GGGAAATTGTGAACCAGAGG
S15_lct_rv	GTGGCACTGCCGCTGTGTGTGTGTA
S16_lct_rv	GTTGTGTAAAAGCTACTGCCAAT
lct_ins5_rv	GTGTTGTGTAAGATCGGGATAATG
Lct_ins10_rv	GTGTTGTGTATACTCAGATCGGGATAATG
-35mutRv	CTAAATGTTATGTATTCCTTTCATTGATGTGAGTT
P85	TCCTTGTCACACGTTGTGTA
P85ins2	TCCTTGTCACACGTTGTGTAAAAGTGGCAA ACT GCCAATTGTGTTGTG
M13	AGTAAAACGACGGCCAGT

Encebadors emprats per a la construcció del mutant Δ lIdR

Nom	Seqüència
lIdR_fw_cm	ATGATTGTTTTACCCAGACGCCTGTCAGACGAGGTTGCCGATCGTGTGCG GTGTTGACGGAAGATCACTTCG
lIdR_rv_cm	TCCCTCGAATGCTCATTATGCTCACCGGGCAGGCGGGTAATCCGTGCGT GGACCAGGCGTTTAAGGGCACC
lIdR_fw_check	CGCTTTACTGTCAAACACAGCC

Encebadors emprats per a la comprovació de la mutació *ace*⁸¹⁶

Nom	Seqüència
pdhR_seq	GCAAAACAGTTTGACGTCTCC
pdhR_check_rv	GGTTCTACGTTTAGTTGCCG

Encebadors emprats pel clonatge de proteïnes de fusió a MBP

Nom	Seqüència
pdhR_pmal_ecofw	CGC GAATTC ATGGCCTACAGCAAATCCG
pdhR_pmal_bamrv	CGC GGATCC CTAATTCTTCGTTGCTCCA
lIdR_enterok_ecofw	CGC GAATTC GATGACGATGACAAGATGATTGTTTTACCCAGACGCCTGTC
lIdR_pmal_bamrv	CGC GGATCC TAATCATGCGTTTTCTCCC
malE	GGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCC

Encebadors emprats per la mutagènesi dirigida de GAPDH clonada en pGEX

Nom	Seqüència
gapdh_cys_mut1_fw	GTTTCCAACGCTTCCGCTACCACCAACTGCCTG
gapdh_cys_mut1_rv	CAGGCAGTTGGTGGTAGCCGGAAGCGTTGGAAAC
gapdh_cys_mut2_fw	CCTGCACCACCAAGCTCTGGTCCGCTGGC
gapdh_cys_mut2_rv	GCCAGCGGAGCCAGAGCGTTGGTGGTGCAGG
gapdh_cys_mut3_fw	GATTTCAACGGCGAAGTTGCTACTTCCGTGTTCCG
gapdh_cys_mut3_rv	CGAACACGGAAGTAGCAACTTCGCCGTTGAAATC
pGEX1	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
pGEX2	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG

ANNEX A.2: FRAGMENTS OBTINGUTS PER PCR

A continuació es mostren les principals característiques dels fragments de DNA amplificats per PCR utilitzats en la construcció de fusions transcripcionals al gen *lacZ* i com a sondes en els assaigs d'EMSA.

Fragments obtinguts per PCR per a la construcció de fusions transcripcionals al gen *lacZ*

ENCEBADORS		PROMOTOR	
Forward/ Reverse	Operó/gen	Posició inici/ Posició final	Característiques especials
lct_bam/lct_eco	<i>lldP</i>	-431/+177	
lct_bam3/lct_eco3	<i>lldR</i>	+1429/+1865	
lct_bam4/lct_eco2	<i>lldD</i>	+2211/+2638	
lct_bam/lct_eco2	<i>lldPRD</i>	-431/+2638	
lct_bam2/lct_eco2	<i>lldRD</i>	+119/+2638	
lct_bam4bis/lct_eco	<i>lldP</i>	-331/+177	
lct_bam5/lct_eco	<i>lldP</i>	-231/+177	
lct_bam6/lct_eco	<i>lldP</i>	-131/+177	
lct_bam7/lct_eco	<i>lldP</i>	-27/+177	
lct_bam6/-35mutFw/ -35mutRv/lct_eco	<i>lldP</i>	-131/+177	Crossover PCR. Mutació de la seqüència -35 identificada en aquest treball
lct_bam9/lct_eco	<i>lldP</i>	-131/+177	O1 mutat (equivalent a sonda P77*a)
lct_bam12/lct_eco	<i>lldP</i>	-131/+177	O1 mutat (equivalent a sonda P77*b)
lct_bam6/S15_lct_fw/ S15_lct_rv/lct_eco	<i>lldP</i>	-131/+177	Crossover PCR O2 mutat (equivalent a sonda P85*a)
lct_bam6/S16_lct_fw/ S16_lct_rv/lct_eco	<i>lldP</i>	-131/+177	Crossover PCR O2 mutat (equivalent a sonda P85*b)
lct_bam6/lct_ins5_fw/ lct_ins5_rv/lct_eco	<i>lldP</i>	-131/+177	Crossover PCR Inserció de 5bp entre O1 i O2
lct_bam6/lct_ins10_fw/ lct_ins10_rv/lct_eco	<i>lldP</i>	-131/+177	Crossover PCR Inserció de 10bp entre O1 i O2
pdhR_bam1/pdhR_eco1	<i>pdhR</i>	-303/+117	

Fragments obtinguts per PCR emprats com a sondes en els assaigs d' EMSA

ENCEBADORS		SONDA	
Forward/ Reverse	Nom	Posició inici/ Posició final	Característiques especials
Lct_bam6 / P85	P190	-131/+58	O1 i O2
Lct_bam6 / S2_lct_rv	P77	-131/-55	O1
Lct_bam9 / S2_lct_rv	P77*a	-131/-55	Mutació en O1
Lct_bam12 / S2_lct_rv	P77*b	-131/-55	Mutació en O1
P77O1/O2 / S2_lct_rv	P77*c	-131/-55	Mutació en l'espaiador d' O1
Lct_bam7 / P85	P85	-27/+58	O2
S15_lct_fw / P85	P85*a	-27/+58	Mutació en O2
S16_lct_fw / P85	P85*b	-27/+58	Mutació en O2
Lct_bam7 / P85ins2	P85*c	-27/+58	Inserció de 2bp en O2
S11_pdhR_fw / S11_pdhR_rv	PpdhR	-41/+95	Promotor de PdhR

8

PUBLICACIONES

Dual Role of LldR in Regulation of the *lldPRD* Operon, Involved in L-Lactate Metabolism in *Escherichia coli*[∇]

Laura Aguilera, Evangelina Campos, Rosa Giménez, Josefa Badía, Juan Aguilar,* and Laura Baldoma

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB),
Facultat de Farmacia, Universitat de Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain

Received 27 December 2007/Accepted 2 February 2008

The *lldPRD* operon of *Escherichia coli*, involved in L-lactate metabolism, is induced by growth in this compound. We experimentally identified that this system is transcribed from a single promoter with an initiation site located 110 nucleotides upstream of the ATG start codon. On the basis of computational data, it had been proposed that LldR and its homologue PdhR act as regulators of the *lldPRD* operon. Nevertheless, no experimental data on the function of these regulators have been reported so far. Here we show that induction of an *lldP-lacZ* fusion by L-lactate is lost in an Δ *lldR* mutant, indicating the role of LldR in this induction. Expression analysis of this construct in a *pdhR* mutant ruled out the participation of PdhR in the control of *lldPRD*. Gel shift experiments showed that LldR binds to two operator sites, O1 (positions –105 to –89) and O2 (positions +22 to +38), with O1 being filled at a lower concentration of LldR. L-lactate induced a conformational change in LldR that did not modify its DNA binding activity. Mutations in O1 and O2 enhanced the basal transcriptional level. However, only mutations in O1 abolished induction by L-lactate. Mutants with a change in helical phasing between O1 and O2 behaved like O2 mutants. These results were consistent with the hypothesis that LldR has a dual role, acting as a repressor or an activator of *lldPRD*. We propose that in the absence of L-lactate, LldR binds to both O1 and O2, probably leading to DNA looping and the repression of transcription. Binding of L-lactate to LldR promotes a conformational change that may disrupt the DNA loop, allowing the formation of the transcription open complex.

The *lldPRD* operon (formerly named *lct*) of *Escherichia coli* is responsible for aerobic L-lactate metabolism. It includes three genes that form a single transcriptional unit inducible by growth in L-lactate. The *lldD* gene encodes the dehydrogenase, *lldP* encodes the permease, and *lldR* encodes a regulatory protein (4). Although L-lactate is also recognized by the permease encoded by *glcA*, the lack of induction of this gene by growth on L-lactate indicates that LldP mediates the uptake of L-lactate in vivo (18, 19).

It has been proposed that the *lldPRD* operon can be transcribed from two promoter sequences (Fig. 1). In this proposal, P1 is responsible for the basal transcription observed under noninducing conditions, and P2 is active only in the presence of L-lactate (13). In addition, the *lldPRD* operon is proposed to be under the control of the global regulator ArcA, which binds to positions –14 to +3 with respect to the transcriptional start site, corresponding to the proposed P2 promoter, and represses the expression of this operon under anaerobic conditions (13).

The LldR protein belongs to the GntR regulator family. This family, named after the repressor of the *Bacillus subtilis* gluconate GntR operon, includes about 270 members, which are distributed among the most diverse bacterial groups and regulate various biological processes (7, 25). The GntR family proteins share amino acid sequence similarities in a 69-residue N-terminal region that determines the DNA binding domain.

In contrast, high heterogeneity has been observed among the various C-terminal effector-binding and oligomerization domains. According to structural, phylogenetic, and functional analyses, four subfamilies have been described. LldR belongs to the first subfamily, called FadR, which groups >40% of the GntR regulators (25). Most of the FadR-like proteins are involved in the regulation of oxidized substrates, such as pyruvate (PdhR), gluconate (GntR), glycolate (GlcC), and L-lactate (LldR).

Given the high similarity between the members of the FadR subfamily and the characteristics of their recognition sequences, a model for protein binding has been proposed for this group (25). Members of the FadR subfamily are dimers in solution (16, 24) and bind as dimers to specific palindromic operator sites, with each monomer recognizing a half-site (25, 31). However, at a high protein concentration, GntR of *B. subtilis* is found in a polymerized form (16), which indicates the ability of the GntR-like proteins to oligomerize. In *E. coli*, GntR binds to two operator sites to negatively regulate the transcription of the *gntT* gene. Total repression of *gntT* was suggested to be achieved by DNA looping through interaction between the two GntR molecules (21).

LldR is highly homologous to PdhR (35% identity and 62% similarity overall) in both the amino-terminal and carboxy-terminal domains. PdhR negatively regulates the expression of the *pdhR-aceEF-lpd* operon, involved in the oxidative decarboxylation of pyruvate to acetyl-coenzyme A (22). In the absence of pyruvate, PdhR binds to the palindromic sequence (+¹¹AATTGGTaaGACCAATT⁺²⁷) located downstream of the transcriptional start site of the *pdhR* promoter. PdhR repression is antagonized by pyruvate, its effector molecule (23). Recently, *ndh*, encoding NADH dehydrogenase II, and

* Corresponding author. Mailing address: Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Farmacia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain. Phone: 34-934034496. Fax: 34-934024520. E-mail: juanaguilar@ub.edu.

[∇] Published ahead of print on 8 February 2008.

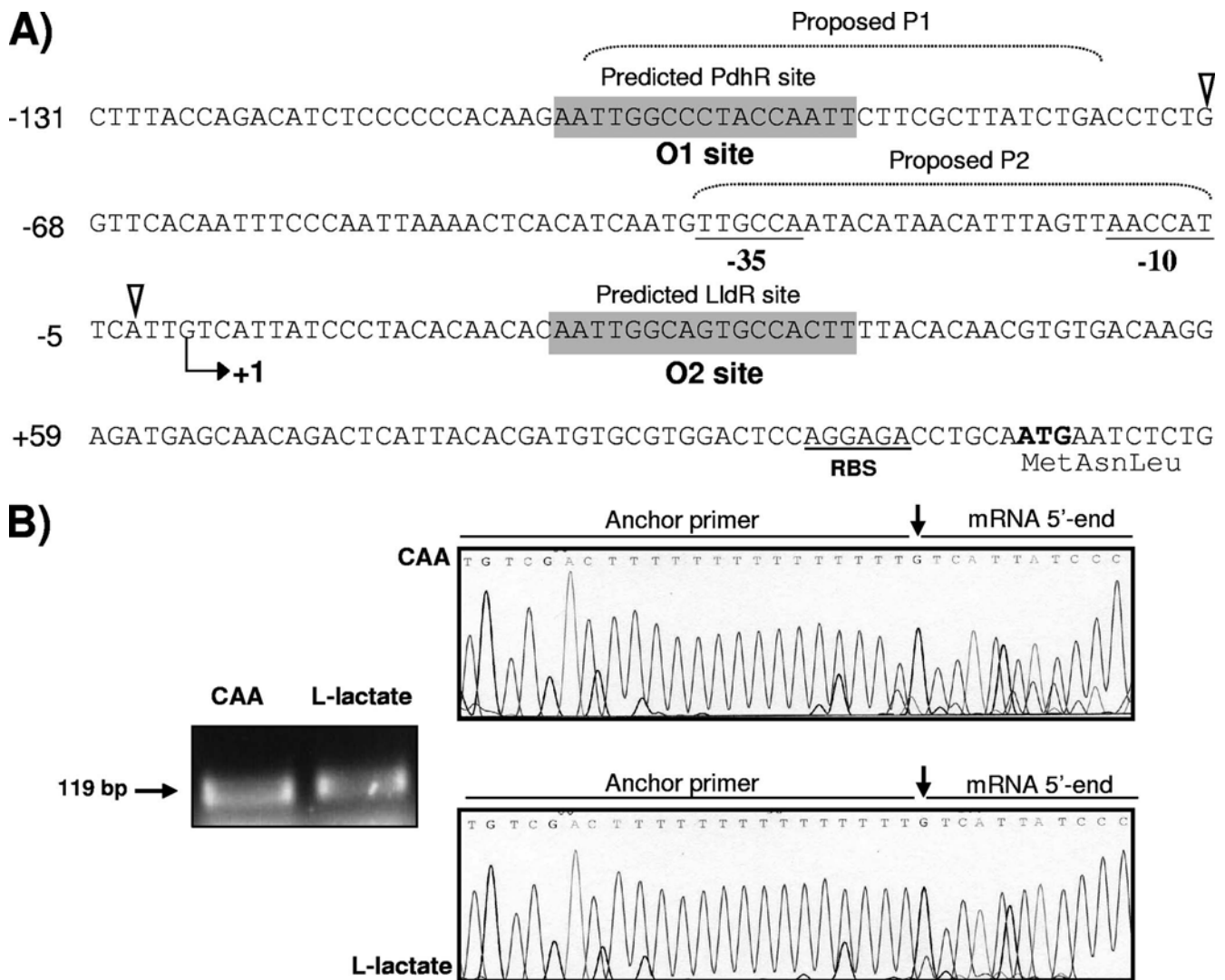


FIG. 1. Organization of transcriptional regulatory elements of the *lldPRD* operon. (A) The *lldPRD* promoter sequence is numbered relative to the 5' end determined in this study, which is shown by an arrowhead labeled "+1." The -10 and -35 promoter sequences are underlined, and the ribosome binding site (RBS) and predicted ATG start codon (in bold) are indicated. The two previously proposed promoters, i.e., the basal P1 and inducible P2 (13) promoters, and the corresponding transcriptional initiation sites (open triangles) are also indicated above the nucleotide sequence. The predicted PdhR and LldR binding sites (13, 23) are named the O1 and O2 operator sites, respectively. (B) Identification of *lldPRD* 5' end by sequencing across ligation sites of 5'-RACE products. Chromatograms display the sequences at ligation sites of typical cloned 5'-RACE products derived from transcripts obtained from MC4100 cells grown in CAA or in L-lactate. Arrows indicate the transcription initiation site.

cyoABCDE, encoding the cytochrome *bo* type, were identified as regulation targets of PdhR (20). Comparison of the PdhR binding sites present in different target promoters led to the establishment of ATTGGTNNNACCAT as a consensus sequence for PdhR recognition (20).

On the basis of LldR and PdhR similarity, a computational analysis of potential binding sites in the *lldPRD* promoter was performed by Quail and Guest (23). This analysis identified two sites displaying sequences similar to the PdhR recognition site. Subsequently, Lynch and Lin (13) proposed that the binding site for LldR may be downstream of P1 and P2, while PdhR may interact with the site upstream of these promoters (Fig. 1). According to these locations, PdhR was proposed to be an activator and LldR a repressor of the *lldPRD* operon, although no experimental data were presented by these authors.

In this paper, we provide evidence that *lldPRD* is not under the control of PdhR but is under the control of LldR, which has a dual regulatory function. This protein can act as a repressor or as an activator, depending on the absence or presence of L-lactate in the medium.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and growth conditions. The *E. coli* strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Cells were grown on Luria broth (LB) or minimal medium and harvested as described previously (1). Where indicated, carbon sources were added at a 60 mM final carbon concentration. Casein acid hydrolysate (CAA) was used at 0.2%. When required, the following antibiotics were used at the indicated concentrations: ampicillin, 100 μ g/ml; chloramphenicol, 30 μ g/ml; kanamycin, 50 μ g/ml; and tetracycline, 12.5 μ g/ml. To grow strains carrying transcriptional fusions, tryptophan was added at 0.1 mM. 5-Bromo-4-chloro-3-

TABLE 1. Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Genotype or description	Source or reference
<i>E. coli</i> strains		
XL1Blue	<i>recA1 lac endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1</i> [F' <i>proAB lacI^qΔM15 Tn10</i>]	Stratagene
MC4100	F ⁻ <i>araD Δ(argF-lac) rpsL(Str^r) relA fliH deoC ptsF rbs</i>	2
JRG2547	<i>ace^c816 Δ(lacIPOZYA)X74 rpsL</i>	8
DY330	W3110 <i>ΔlacU169 gal490 λcI857 Δ(cro-bioA)</i>	32
TE2680	F ⁻ λ ⁻ IN(<i>rmD-rmE</i>) <i>ΔlacX74 rplS galK2 recD::Tn10dtd trpDC700::putA13033::(Kan^r Cm^r lac)</i>	5
CAG12095	<i>zab3051::Tn10</i>	17
JA217	MC4100 <i>ace^c816</i>	This study
JA218	MC4100 <i>ΔlldR::cat</i>	This study
JA219	MC4100 <i>ΔlldR::cat ace^c816</i>	This study
Plasmids		
pRS550	Ap ^r Km ^r ; contains promoterless <i>lacZYA</i>	30
pCAT19	Ap ^r Cm ^r	6
pMALc2X	Ap ^r <i>lacI^q</i>	New England Biolabs

indolyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal) and isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) were used at 30 μg/ml and 10 μg/ml, respectively.

Mutant strain construction. Strain JA217 (MC4100 *ace^c816*) was obtained in this study. The Tn10 insertion from strain CAG12095 (*zab3051::Tn10*) (17) was introduced into strain JRG2547 (*ace^c816*) by P1 transduction. A tetracycline-resistant transductant that retained the *ace^c816* mutation was selected and used to transduce the two markers into strain MC4100. The presence of the *ace^c816* mutation was confirmed by PCR amplification followed by DNA sequencing. Strains JA218 and JA219, carrying a *ΔlldR::cat* mutation, were constructed by gene replacement using targeted homologous recombination, as described by Yu et al. (32). The entire *lldR* gene was replaced with a gene that confers resistance to chloramphenicol (*cat*), which was obtained by PCR from plasmid pCAT19 (6). Linear DNA containing the 50-bp homologous sequences flanking *lldR* in its ends was introduced into strain DY329. After homologous recombination, the *ΔlldR::cat* mutation was then introduced by P1 transduction into strain MC4100 to yield strain JA218 or into strain JA217 to yield the double mutant (*lldR::cat ace^c816*) strain JA219.

Enzyme activities and protein measurements. β-Galactosidase activity was assayed by the hydrolysis of o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside and expressed as Miller units (15). For this purpose, cell cultures were grown until mid-log phase (an optical density at 600 nm of 0.5). The data reported are representative of at least four separate experiments performed in triplicate and are expressed as means ± standard deviations (SD). Protein concentration was determined by the method of Lowry et al. (12).

DNA manipulation and site-directed mutagenesis. Bacterial genomic DNA was obtained as described by Silhavy et al. (29). Plasmid DNA was routinely prepared by the boiling method (9). For large-scale preparation, a crude DNA sample was purified on a column (Qiagen). DNA manipulations were performed essentially as described by Sambrook and Russell (26). DNA sequencing (27) was carried out with an automated ABI 377 DNA sequencer. DNA fragments were amplified by PCR, using *E. coli* chromosomal DNA as a template. When necessary, specific restriction sites were incorporated at the 5' ends of the primers to facilitate the cloning of the fragments into the appropriate vector. PCRs were performed with *Pfu* DNA polymerase under standard conditions. All primers used in this study are available upon request.

Site-directed mutagenesis of *lldR* binding sites in the probes used in the mobility shift assays was performed by PCR, using primers containing the desired mutations. Insertion of 5 bp or 10 bp into the fragment containing the full-length promoter region was done by crossover PCR (11).

Mapping of the 5' end of the *lldPRD* transcript. The 5' region of the *lldPRD* transcript was determined by the rapid amplification of cDNA 5' ends (5'-RACE) (26), using a commercial 5'-RACE kit (Roche Diagnostics, GmbH). Total RNA was isolated from MC4100 cells grown aerobically to an optical density at 600 nm of 0.5 under noninducing conditions (with CAA) or inducing conditions (with L-lactate as the sole carbon source), using a Qiagen RNeasy total RNA kit, and then treated with RNase-free DNase. The cDNA was transcribed from the preparation of RNA with a specific *lldP* antisense oligonucleotide. A homopolymeric dA tail was added (via terminal transferase) to the 3' terminus of the *lldP* cDNA. Amplification of reverse transcription products was performed with nested *lldP*-specific primers and an oligo(dT) anchor primer. The

obtained products were cloned into a pGEM vector for sequencing and subsequent manipulation.

Construction of *lacZ* fusions and deletions of the *lld* promoter region. To create operon fusions, DNA fragments were obtained by PCR and cloned into plasmid pRS550 (30). The pRS plasmids contain a cryptic *lac* operon and genes that confer resistance to both kanamycin and ampicillin. After transformation of strain XL1-Blue, recombinant plasmids were selected as blue colonies on LB plates containing X-Gal, ampicillin, and kanamycin and sequenced using the M13 primer to ensure that no mutation was introduced. Single-copy fusions on the *E. coli* chromosome were obtained as described by Elliot (5), using strain TE2680. The transformants were selected for kanamycin resistance and screened for sensitivity to ampicillin and chloramphenicol. P1 *vir* lysates were made to transduce the fusions into the desired genetic background.

Expression and purification of LldR and PdhR. To overexpress and purify the LldR and PdhR proteins, the corresponding coding regions were amplified by PCR and cloned in-frame into pMAL-c2X (New England BioLabs), resulting in the expression of the protein of interest fused to maltose binding protein (MBP).

The recombinant enzyme was overexpressed in *E. coli* XL1-Blue in the presence of 0.3 mM IPTG. Purification of the MBP fusion proteins was carried out according to an established protocol (New England BioLabs). Purified LldR or PdhR was separated from MBP after proteolytic treatment with factor Xa. MBP-LldR folding made difficult the cleavage of the fusion protein in solution. However, digestion was complete when this proteolytic treatment was applied to the fusion protein bound to the affinity chromatography column. Purified proteins were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, performed according to a standard procedure (10).

DNA binding studies. A nonradioactive digoxigenin (DIG) gel shift kit for 3'-end labeling of DNA fragments (Roche Diagnostics, GmbH) was used for protein-DNA binding assays. The fragments obtained by PCR were labeled at the 3' end with terminal transferase and DIG-ddUTP and used in gel shift reaction mixtures according to the manufacturer's instructions. Electrophoretic mobility shift assays were performed with purified proteins. Polyacrylamide gels containing 10% glycerol were run at 4°C using Tris-borate-EDTA buffer. Protein samples were mixed with the labeled probes in a 20-μl reaction volume containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10% glycerol, and 2 mM dithiothreitol. Poly(dI-dC) was used as a nonspecific competitor. Incubation was performed for 15 min at 30°C. Where indicated, L-lactate was added to binding reaction mixtures at increasing concentrations up to 100 mM. Following electrophoretic separation, the oligonucleotide-protein complexes were blotted onto nylon membranes. Chemiluminescence detection of DIG-labeled DNA-protein complexes on the nylon membranes was obtained by exposure to X-ray film.

RESULTS AND DISCUSSION

Promoters in the *lldPRD* genetic system. To determine the functional promoters in the *lld* genetic system, five transcriptional fusions to *lacZ* were constructed (Fig. 2) and transferred into the genetic background of strain MC4100. β-Galactoside

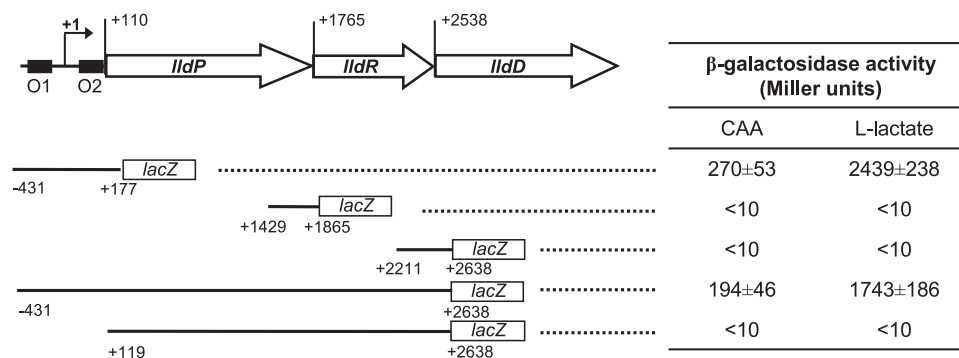


FIG. 2. Analysis of transcriptional fusions to identify functional promoters in the *lldPRD* genetic system. The extension and direction of the *lld* genes, *lldP* (encoding L-lactate permease), *lldR* (encoding the regulatory protein), and *lldD* (encoding L-lactate dehydrogenase), are indicated by open arrows. The transcriptional start site (position +1) and the two putative operator sites, O1 and O2, are indicated upstream from these genes. Fragments fused to *lacZ* for testing of promoter function are shown below and are numbered relative to the transcriptional start site. These fragments were fused to *lacZ* and introduced as single-copy fusions in the genetic background of strain MC4100. The values for β -galactosidase activity under the different growth conditions are indicated in the table on the right and expressed as means \pm SD.

dase activities were measured in cells grown aerobically in CAA or in L-lactate as the sole carbon source. Only the two transcriptional fusions bearing the 5' upstream region of *lldP* displayed a basal level of expression, of between 194 and 270 Miller units. This level of expression increased around ninefold in cells grown in L-lactate. The three additional constructs displayed negligible β -galactosidase activities under both growth conditions. These results indicate that only the promoter sequences located at the 5' end of *lldP* are functional and that the three genes of the *lld* system constitute an operon which is inducible by L-lactate. Thus, the transcriptional fusion $\phi(lldP::lacZ)$, which contains the -431-to-+177 promoter region, was used for further studies.

Expression of this transcriptional fusion was also analyzed by growth of strain MC4100 in other carbon sources. Basal levels of *lldPRD* expression similar to those obtained with CAA were achieved by growth on D-xylose (205 \pm 34 Miller units) or glycolate (271 \pm 45 Miller units), while expression of the *lldP::lacZ* fusion was repressed by glucose (24 \pm 4 Miller units). When L-lactate was added to CAA medium, induction of this fusion was also observed, although β -galactosidase levels (1,200 \pm 98 Miller units) were somewhat lower than those obtained with L-lactate as the sole carbon source. This effect, probably due to differences in growth rate, was also seen in other genetic systems when the inducing carbon source (glycolate or L-ascorbate) was used in the presence of CAA (unpublished results).

Mapping of the 5' end of the *lldPRD* transcript. Two transcriptional start points at the 5' end of the *lldP* gene have been proposed previously (13) (Fig. 1). In this study, the 5' end of the *lldPRD* mRNA was determined by the 5'-RACE method (26). Several clones were isolated through 5'-RACE with a nested oligonucleotide cDNA pool derived from MC4100 cells grown in CAA or L-lactate. Analysis of the 5'-RACE products (10 clones for each growing condition) in all cases revealed only one transcriptional initiation site, which was located 110 nucleotides (nt) upstream of the predicted ATG start codon (Fig. 1). Inspection of the DNA sequences upstream of nt +1, the mRNA start site, revealed the presence of the putative -35 and -10 sequences (TTGCCA-17 nt-AACCAT) (Fig. 1),

whose location coincided with the predicted P2 inducible promoter (13). Both deletion of the -35 promoter sequence and its site-directed mutagenesis to AAAGGA in the $\phi(lldP::lacZ)$ transcriptional fusion totally abolished β -galactosidase expression under both inducing and noninducing conditions (Fig. 3, lines 3 and 4). In contrast, mutation of the -35 sequence of the proposed P1 basal promoter, which overlaps with the predicted PdhR operator, did not abolish *lacZ* expression under either of the two conditions tested (Fig. 3, line 5). These results strongly indicate that transcription of the *lldPRD* operon is directed by the single promoter identified in this study.

LldR and PdhR in the regulation of the *lldPRD* operon. The locations of the putative recognition sites (renamed O1 and O2 in this study) identified by *in silico* analysis of the *lldPRD* promoter region led Lynch and Lin (13) to propose that the LldR protein acted as a repressor. In order to confirm experimentally whether the LldR protein is an activator or a repressor, we constructed strain JA218, in which the gene encoding LldR is replaced by the *cat* cassette, which confers resistance to chloramphenicol. Induction of $\phi(lldP::lacZ)$ expression by L-lactate was abolished in the *lldR* mutant (Fig. 4). These results suggest that the function of LldR in the presence of L-lactate is the transcriptional activation of the *lldPRD* operon. In contrast, the basal level of activity in CAA was twofold higher than that of the parental strain, which suggests that LldR is a repressor in the absence of L-lactate.

O1 is highly similar to the PdhR binding site present in the *pdhR-aceEF-lpd* operon (13, 23). In the present study, the putative role of PdhR in the control of the *lldPRD* operon was analyzed by measuring $\phi(lldP::lacZ)$ expression in strain JA217 (MC4100 *ace*^{c816}), which carries a nonfunctional PdhR protein. Regardless of the presence or absence of L-lactate as an inducer, no significant differences in $\phi(lldP::lacZ)$ expression were observed between strains JA217 and MC4100 (Fig. 4). This suggests that PdhR is not involved in the *in vivo* regulation of *lldPRD* expression under the conditions tested. Furthermore, the expression of this transcriptional fusion in these strains was also independent of the presence or absence of pyruvate (not shown), indicating that pyruvate is not an effector molecule for the *lldPRD* operon. Expression of

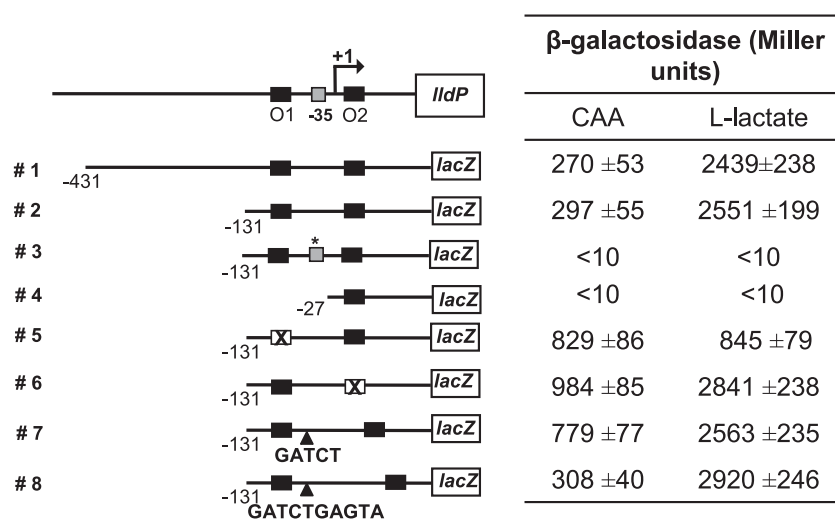


FIG. 3. Effects of deletions, mutations, or changes in O1-to-O2 helical phasing on *lldPRD* expression. The two LldR binding sites (O1 and O2 operators) are represented by black boxes in the diagram shown at the top. The gray box corresponds to the -35 promoter sequence identified in this study. The different constructs are shown below the top diagram and numbered at the left side. Mutations in either O1 or O2 are indicated by hatched boxes, and the mutation of the -35 promoter sequence is marked by an asterisk. The 5-bp or 10-bp insertions between both operator sites are indicated at the bottom (lines 7 and 8). These fragments were fused to *lacZ* and introduced as single-copy fusions in the genetic background of strain MC4100. Values for β -galactosidase activity under inducing or noninducing conditions of growth are indicated in the table on the right and expressed as means \pm SD.

$\phi(lldP::lacZ)$ was also assayed in the *lldR pdhR* double mutant strain JA219. This strain had the same pattern of expression as the *lldR* mutant strain JA218 (Fig. 4). These results confirm the role of LldR as the only regulator mediating L-lactate induction of the *lldPRD* operon and its function as a repressor in the absence of L-lactate.

Analysis of LldR and PdhR binding to O1 and O2. To examine the binding of LldR and PdhR to O1 and O2 (Fig. 1), gel shift experiments with purified LldR and PdhR were performed with fragment P77 (containing O1) and fragment P85 (containing O2). The results presented in Fig. 5B show binding of LldR to both fragments, whereas PdhR was able to bind only to fragment P77, containing O1. However, the affinity of

PdhR for O1 was much lower than that of LldR. To assess the function of the PdhR preparation, binding of PdhR to its specific operator was analyzed as a control (Fig. 5B). In this case, the PdhR-DNA complex was formed with smaller amounts of protein. As observed by other authors (20), at a higher protein concentration additional complexes with reduced mobility were observed. The low affinity of PdhR for O1 may not be compatible with an *in vivo* role of this regulator in the control of the *lldPRD* operon.

Alignment of the O1 and O2 sequences with the PdhR operator site present in the *pdhR* promoter (AATTGGTaagACAATT) revealed high identity in the palindromic sequences, except for the nucleotides flanking the spacer of the operator (underlined). Only one of these underlined nucleotides is conserved in O1, and none of them are conserved in O2 (Fig. 5A). Thus, PdhR binding results indicate that these positions of the palindrome are involved in specific recognition by the cognate regulator. This is in agreement with the recent description of the PdhR consensus sequence derived from the *ndh* and *cyoABCDE* operators, where these positions are always conserved (20).

Since the LldR protein bound to O1 and O2, gel shift assays were performed with probe P77 or P85 and increasing amounts of LldR (Fig. 6A). Binding of LldR to probe P77 was observed at a lower concentration of LldR, suggesting that this protein displays a greater affinity for O1 than for O2. As stated above, FadR-like proteins bind as dimers to the specific palindromic operator. Following this model, the P77- and P85-LldR complexes, displaying the same electrophoretic mobility, can be attributed to an LldR dimer bound to O1 and O2, respectively. As in the case of PdhR, at higher LldR concentrations another complex with reduced mobility was observed with probe P77, probably resulting from the interaction between two dimeric LldR molecules, with one of them being tightly bound to O1.

To confirm that LldR binds to the postulated operator se-

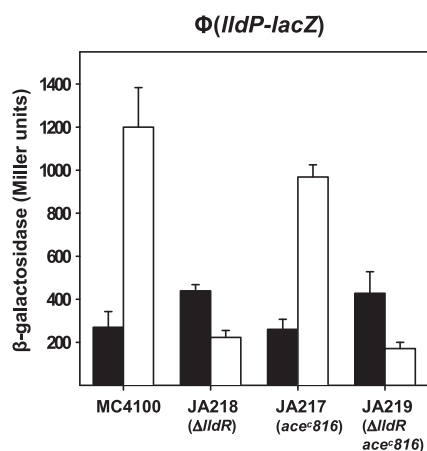


FIG. 4. β -Galactosidase activities of the $\Phi(lldP-lacZ)$ transcriptional fusion in different genetic backgrounds. Cells were grown aerobically in CAA (black bars) or in CAA plus 20 mM L-lactate (white bars). Activity values are expressed as means \pm SD.

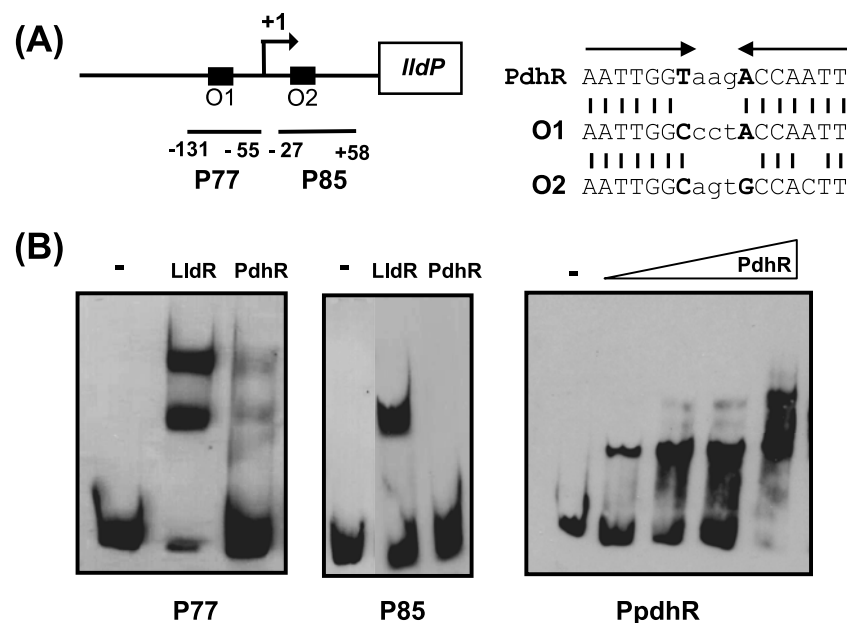


FIG. 5. Binding of LldR and PdhR to promoter fragments containing the O1 or O2 operator site. (A) (Left) Diagram of the *lldP* promoter region with the proposed O1 and O2 sites and the promoter fragments used as probes (P77 and P85). (Right) Sequence alignment of the PdhR operator present in the *pdhR-aceEF-ldp* operon promoter and the operators O1 and O2 in the *lldP* promoter. The arrows indicate the inverted repeat present in the operator sites recognized by GntR-like bacterial proteins. (B) Gel shift assays performed with the indicated DIG-labeled DNA probes. Probes P77 (encompassing O1) and P85 (encompassing O2) were added to binding mixtures containing 15 pmol of either purified LldR or PdhR. The probe encompassing the PdhR operator site was added to binding mixtures containing increasing amounts of PdhR (0.1, 0.4, 0.8, or 2 pmol). Reaction mixtures were incubated at 30°C for 15 min and directly subjected to polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

quences O1 and O2, site-directed mutagenesis of 3 nt in each half-site of the two palindromic sequences was performed (Fig. 6B). This yielded probes P77*a and P77*b (mutations in O1) and probes P85*a and P85*b (mutations in O2). Gel shift experiments performed with P85*a and P85*b showed that mutations in either of the two half-sites of O2 abolished LldR binding (Fig. 6B). Insertion of 2 bp (TT) between the two symmetry elements of O2 also abolished LldR binding, suggesting that the distance between the two half-sites of the LldR inverted repeat is crucial for binding.

For the high-affinity operator O1, mutations at either of the two half-sites (P77*a and P77*b) did not abolish LldR binding but significantly reduced its affinity (Fig. 6B). To analyze the importance of the O1 spacer nucleotides in LldR binding, site-directed mutagenesis was performed to change the spacer O1 sequence into the corresponding O2 sequence (P77*c). Gel shift experiments showed that this mutated O1 construct behaved like O2 and displayed reduced affinity for LldR binding (Fig. 6B). These results indicate that these positions are important for binding and formation of the LldR-DNA complex.

Effect of L-lactate on LldR function. Binding of the effector molecules to the C-terminal domain of the FadR-like proteins promotes a conformational change that often abolishes DNA-protein interaction (3, 23). Nevertheless, the addition of L-lactate (at concentrations up to 100 mM) to binding reaction mixtures did not modify the number or the mobility of the complexes formed between LldR and P77 or P85 (data not shown). Evidence that L-lactate promoted a conformational change in LldR was obtained from experiments performed to improve cleavage of the MBP-LldR fusion protein. In solution,

this protein was not cleaved with factor Xa, probably because protein folding made the cleavage site inaccessible. In such cases, addition to the reaction of any molecule able to interact with and change the protein conformation has been reported to improve digestion (pMAL protein fusion and purification system instruction manual, New England BioLabs). Thus, in our case, L-lactate was tested as a putative ligand of LldR. Digestion of the MBP-LldR protein was accomplished in the presence of 10 mM L-lactate (Fig. 7). This result indicates that L-lactate does bind to LldR and promotes a conformational change that, in this case, allows the accessibility of the recognition site of factor Xa. This conformational change did not prevent LldR-DNA binding but may allow interaction of LldR with RNA polymerase or other proteins involved in the formation of the transcription complex.

Function of the two operator sites recognized by LldR in the control of the *lldPRD* operon. To analyze the *in vivo* participation of O1 and O2 in the regulation of the *lldPRD* operon, single-copy *lacZ* fusions of promoter fragments containing different deletions or mutations were introduced in the genetic background of strain MC4100 (Fig. 3). The fusion containing the full-length promoter (Fig. 3, line 1) was used as an expression reference. Constructions with deletions upstream of position -331 or -231 were tested and yielded the same level of β -galactosidase activity as the full-length promoter (not shown). The large deletion still containing O1 and O2 (Fig. 3, line 2) also maintained the β -galactosidase level of the full-length construct. These results suggest that no other *cis*-acting elements controlling *lldPRD* transcription are present upstream of position -131.

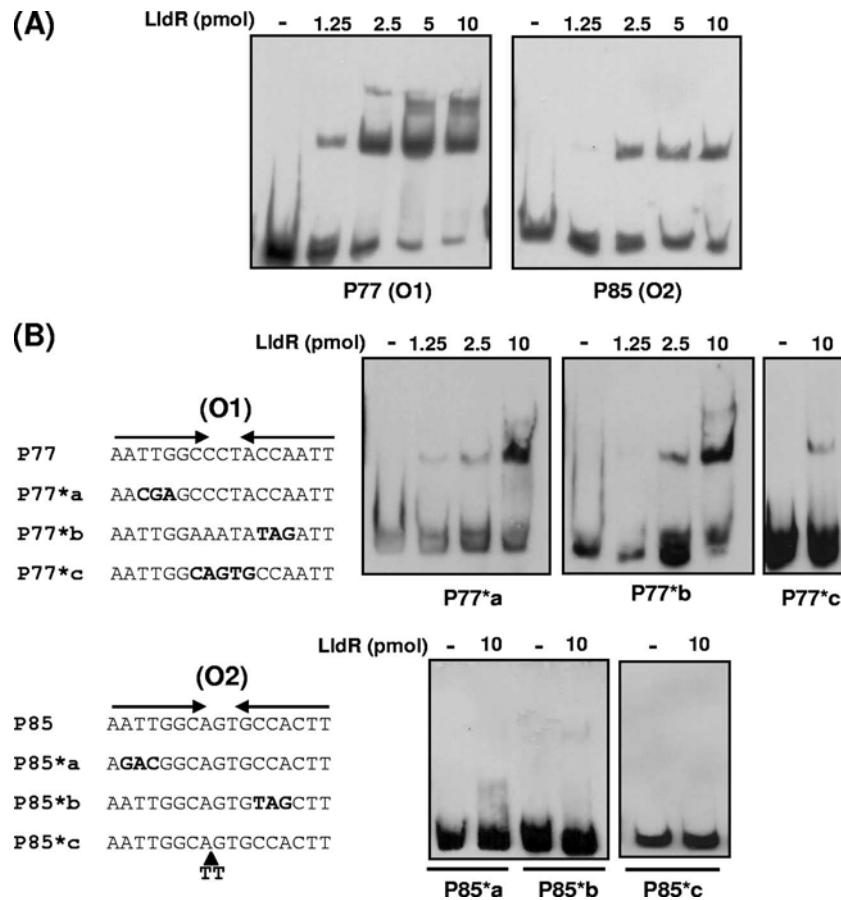


FIG. 6. Characterization of LldR binding to O1 and O2 operators. (A) Electrophoretic mobilities of the LldR-O1 and LldR-O2 complexes formed at increasing concentrations of protein. DIG-labeled DNA probes (for the region of each probe, see Fig. 4) were incubated at 30°C for 15 min with the indicated amounts of LldR and subjected to PAGE. (B) Effects of mutations in O1 and O2 operator sites on LldR binding. Mutations introduced by site-directed mutagenesis into the O1 or O2 palindromic sequence are shown in bold below the corresponding wild-type sequence. The arrows indicate the inverted repeat present in each operator site. The corresponding DIG-labeled fragments were added to binding mixtures containing the indicated amounts of LldR and incubated and processed as described above.

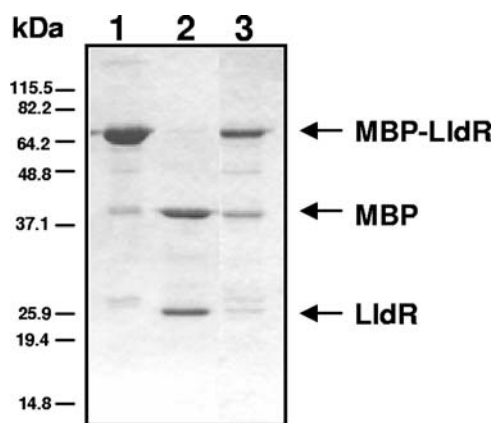


FIG. 7. Effect of L-lactate on cleavage of the fusion protein MBP-LldR by factor Xa. Proteins were separated by sodium dodecyl sulfate-10% PAGE and stained with Coomassie blue. Lane 1, MBP-LldR fusion protein eluted from the amylose column with 10 mM maltose before cleavage with factor Xa; lane 2, MBP-LldR digestion products after an overnight incubation with factor Xa in the presence of 10 mM L-lactate; lane 3, MBP-LldR digestion products after an overnight incubation with factor Xa in the absence of 10 mM L-lactate. Molecular masses of the markers are indicated on the left.

The involvement of O1 and O2 in control of the *lldPRD* operon was assessed by analysis of promoter fusions containing mutations in one of these *cis*-acting elements. The O1 and O2 mutations present in probes P77*a and P85*b, respectively, were introduced into the *lacZ* promoter fusion. Mutations in O1 abolished induction by L-lactate (Fig. 3, line 5). This confirms the role of the O1 site in the activation mediated by LldR in the presence of L-lactate. In addition, mutations in O1 yielded a threefold increase in the basal transcription level, suggesting that O1 may be involved in *lldPRD* operon repression under noninducing conditions. The same results were obtained with the O1 mutation present in P77*b (not shown). In contrast, mutations in O2 did not affect the induction level in the presence of L-lactate (Fig. 3, line 6). Therefore, O2 is not required for activation of *lldPRD* transcription. As in the case of O1, mutations in O2 increased the basal transcription level, reflecting its contribution to the repression of this operon in the absence of L-lactate.

Effect of changing DNA helical phasing between the two LldR operator sites. The results presented above indicate that full repression under noninducing conditions requires the oc-

occupancy of the two operators by LldR, which probably results in DNA looping through interaction between LldR molecules. Repression by means of DNA looping was shown in the regulation of many other operons in *E. coli*, such as the *ara*, *gal*, *lac*, and *deo* operons (14), and it was also proposed for other members of the GntR family (21). In order to test whether repression was affected by the helical phasing of the operators present in the *lldP* promoter region, we changed their angular orientation by inserting 5 bp between O1 and O2 (Fig. 3, line 7). The construct containing the 5-bp insertion exhibited increased basal β -galactosidase activity in CAA, a fact consistent with the abolition of DNA looping mediated by the binding of LldR molecules to O1 and O2 in their normal orientation. However, induction of this transcriptional fusion by L-lactate was not impaired. This result agrees with the previous observation that only mutations in O1 abolished L-lactate induction.

Insertion of 10 bp between O1 and O2 to restore their normal angular orientation did not modify the β -galactosidase expression pattern (Fig. 3, line 8). This result reinforces the hypothesis of DNA looping mediated by interaction between LldR molecules bound to O1 and O2 on the same helical face, which leads to operon repression in the absence of L-lactate.

Alternatively, other mechanisms can be considered to explain the basal repression observed when both O1 and O2 are occupied. For instance, two LldR dimer molecules bound to these operators on the same face of the helix would act synergistically to repress transcription. However, due to the distance between the two end points of O1 and O2 (100 base pairs), other proteins may be required for an effective synergic interaction between the LldR molecules.

Model for the control of the L-lactate operon. In this study, we have provided evidence to support the hypothesis that LldR has a dual function as a repressor and activator of *lldPRD* operon transcription, depending on the presence of L-lactate. From these results, a model for the control of the L-lactate operon by LldR may be derived.

When L-lactate is not present, LldR binds to both O1 (positions -105 to -89) and O2 (positions +22 to +38). On the basis of the different LldR affinities for these operators, LldR tightly bound to O1 may facilitate interaction of a new molecule of LldR with O2. It is widely accepted that in vivo occupancy of the weaker binding site (O2 in this model) is often associated with cooperativity of protein-protein interactions. This mechanism increases the local concentration of the protein, which facilitates its binding to the weaker site (28). This probably leads to DNA looping and to the repression of transcription. Due to the loop size, other factors, such as the architectural proteins HU and Fis, might contribute to stabilizing this loop (28). The contribution of IHF to this mechanism can be ruled out since the expression pattern of the *lldP::lacZ* fusion was not modified by mutations in the genes encoding the IHF subunits (*himA::cat* and *himD::cat* mutants) (not shown).

When L-lactate is present, binding of this effector molecule to the C-terminal domain of LldR promotes a conformational change that may lead to destabilization of the DNA loop in such a way that the transcription open complex is formed. In this situation, LldR bound to O1 may interact with RNA polymerase or other transcriptional regulators to activate *lldPRD* transcription.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by grant BFU 2004-03586/BMC from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain. L.A. received a predoctoral fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain. We thank John R. Guest for providing strain JRG2547.

REFERENCES

- Boronat, A., and J. Aguilera. 1979. Rhamnose-induced propanediol oxidoreductase in *Escherichia coli*: purification, properties, and comparison with the fucose-induced enzyme. *J. Bacteriol.* **140**:320-326.
- Casadaban, M. J. 1976. Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J. Mol. Biol.* **104**:541-555.
- DiRusso, C. C., P. N. Black, and J. D. Weimar. 1999. Molecular inroads into the regulation and metabolism of fatty acids, lessons from bacteria. *Prog. Lipid Res.* **38**:129-197.
- Dong, J. M., J. S. Taylor, D. J. Latour, S. Iuchi, and E. C. C. Lin. 1993. Three overlapping *let* genes involved in L-lactate utilization by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**:6671-6678.
- Elliott, T. 1992. A method for constructing single-copy *lac* fusions in *Salmonella typhimurium* and its application to the *hemA-prfA* operon. *J. Bacteriol.* **174**:245-253.
- Fuqua, W. C. 1992. An improved chloramphenicol resistance gene cassette for site-directed marker replacement mutagenesis. *BioTechniques* **12**:223-225.
- Haydon, D. J., and J. R. Guest. 1991. A new family of bacterial regulatory proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **63**:291-295.
- Haydon, D. J., M. A. Quail, and J. R. Guest. 1993. A mutation causing constitutive synthesis of the pyruvate dehydrogenase complex in *Escherichia coli* is located within the *pdhR* gene. *FEBS Lett.* **336**:43-47.
- Holmes, D. S., and M. Quigley. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**:193-197.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **222**:680-685.
- Link, A. J., D. Phillips, and G. M. Church. 1997. Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J. Bacteriol.* **179**:6228-6237.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-273.
- Lynch, A. S., and E. C. C. Lin. 1996. Transcriptional control mediated by the ArcA two-component response regulator protein of *Escherichia coli*: characterization of DNA binding at target promoters. *J. Bacteriol.* **178**:6238-6249.
- Mathews, K. S. 1992. DNA looping. *Microbiol. Rev.* **56**:123-136.
- Miller, J. H. A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Miwa, Y., and Y. Fujita. 1988. Purification and characterization of a repressor for the *Bacillus subtilis* *gnt* operon. *J. Biol. Chem.* **263**:13252-13257.
- Nichols, B. P., S. Obaid, and V. Meiners. 1998. Sequence analysis of Tn10 insertion sites in a collection of *Escherichia coli* strains used for genetic mapping and strain construction. *J. Bacteriol.* **180**:6408-6411.
- Núñez, M. F., M. T. Pellicer, J. Badía, J. Aguilera, and L. Baldoma. 2001. The gene *yghK* linked to the *glc* operon of *Escherichia coli* encodes a permease for glycolate that is structurally and functionally similar to L-lactate permease. *Microbiology* **147**:1069-1077.
- Núñez, M. F., O. Kwon, T. H. Wilson, J. Aguilera, L. Baldoma, and E. C. C. Lin. 2002. Transport of L-lactate, D-lactate and glycolate by the LldP and GlcA membrane carriers of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**:824-829.
- Ogasawara, H., Y. Ishida, K. Yamada, K. Yamamoto, and A. Ishihama. 2007. PdhR (pyruvate dehydrogenase complex regulator) controls the respiratory electron transport system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **189**:5534-5541.
- Peekhaus, N., and T. Conway. 1998. Positive and negative transcriptional regulation of the *Escherichia coli* gluconate regulon gene *gntT* by GntR and the cyclic AMP (cAMP)-cAMP receptor protein complex. *J. Bacteriol.* **180**:1777-1785.
- Quail, M. A., D. J. Haydon, and J. R. Guest. 1994. The *pdhR-aceE-lpd* operon of *Escherichia coli* expresses the pyruvate dehydrogenase complex. *Mol. Microbiol.* **12**:95-104.
- Quail, M. A., and J. R. Guest. 1995. Purification, characterization and mode of action of PdhR, the transcriptional repressor of the *pdhR-aceEF-lpd* operon of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **15**:519-529.
- Raman, N., P. N. Black, and C. C. DiRusso. 1997. Characterization of the fatty acid-responsive transcription factor FadR. *J. Biol. Chem.* **272**:30645-30650.
- Rigali, S., A. Derouaux, F. Giannotta, and J. Dusart. 2002. Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *J. Biol. Chem.* **277**:12507-12515.
- Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

27. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463–5467.
28. **Semsey, S., K. Virnik, and S. Adhya.** 2005. A gamut of loops: meandering DNA. *Trends Biochem. Sci.* **30**:334–341.
29. **Silhavy, T. J., M. L. Berman, and L. Enquist.** 1984. Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
30. **Simons, R. W., F. Houtman, and N. Kleckner.** 1987. Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**:85–96.
31. **van Aalten, D. M. F., C. C. DiRusso, J. Knudsen, and R. K. Wierenga.** 2000. Crystal structure of FadR, a fatty acid-responsive transcription factor with a novel acyl coenzyme A-binding fold. *EMBO J.* **19**:5167–5177.
32. **Yu, D., H. M. Ellis, E.-C. Lee, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, and D. L. Court.** 2000. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:5978–5983.



Role of secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the infection mechanism of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: Interaction of the extracellular enzyme with human plasminogen and fibrinogen

L. Egea^{a,1}, L. Aguilera^a, R. Giménez^a, M.A. Sorolla^b,
J. Aguilar^a, J. Badía^a, L. Baldoma^{a,*}

^a Department of Biochemistry, School of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Diagonal, 643. E-08028-Barcelona, Spain

^b Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, E-25008 Lleida, Spain

Received 29 December 2006; received in revised form 8 March 2007; accepted 9 March 2007

Available online 15 March 2007

Abstract

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (EC 1.2.1.12) is an anchorless, multifunctional protein displayed on the surface of several fungi and Gram-positive pathogens, which contributes to their adhesion and virulence. To date a role for extracellular GAPDH in the pathogenesis of Gram-negative bacteria has not been described. The aim of this study was to analyze the extracellular localization of GAPDH in enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* strains and to examine its interaction with host components that could be related to the infection mechanism. Recombinant *E. coli* GAPDH was purified and polyclonal antibodies were obtained. Western blotting and immunoelectron microscopy showed that GAPDH is located on the bacterial surface and released to the culture medium of EHEC and EPEC strains. GAPDH export in these Gram-negative pathogens depends on the external medium, is not mediated by vesicles and leads to an extracellular active enzyme. Non-pathogenic *E. coli* strains do not secrete GAPDH. Two-dimensional electrophoresis analysis showed that in *E. coli* GAPDH is present at least in two major forms with different isoelectric points. Of these forms, the more basic is secreted. Purified GAPDH was found to bind human plasminogen and fibrinogen in Far-Western blot and ELISA-based assays. In addition, GAPDH remained associated with colonic Caco-2 epithelial cells after adhesion of EHEC or EPEC. These observations indicate that exported GAPDH may act as a virulence factor which could contribute to EHEC and EPEC pathogenesis. This is the first description of an extracellular localization for this enzyme, with a function other than its glycolytic role in Gram-negative pathogens.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Extracellular glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Enterohemorrhagic *Escherichia coli*; Enteropathogenic *Escherichia coli*; Infection mechanisms; Plasminogen; Intestinal epithelial cells

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; EHEC, enterohemorrhagic *Escherichia coli*; EPEC, enteropathogenic *Escherichia coli*; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GST, glutathione-S-transferase; LB, Luria–Bertani broth; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight; MS, mass spectrometry; PGPase, phosphoglycolate phosphatase; PVDF, polyvinylidene difluoride; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulphate- polyacrylamide gel electrophoresis; TCA, trichloroacetic acid

* Corresponding author. Tel.: +34 934034496; fax: +34 934024520.

E-mail address: lbaldoma@ub.edu (L. Baldoma).

¹ Present address: Departments of Medicine and Pediatrics, Laboratory of Mucosal Immunology, University of California at San Diego, La Jolla, CA 92093, USA.

1. Introduction

A large number of recent reports have shown that classical cytoplasmic housekeeping enzymes with no detectable secretion or retention signal are present on the surface of microbial pathogens, where they exert functions related to the adhesion and/or virulence of the pathogen (Pancholi & Chhatwal, 2003). However, how these enzymes are exported and exposed on the surface is still unknown. Most descriptions of the expression of cytoplasmic housekeeping enzymes on the microbial surface deal with fungi and Gram-positive pathogens, whereas few examples have been reported for Gram-negative bacteria.

Among the housekeeping proteins with extracellular localization in pathogens there are several glycolytic enzymes, such as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; EC 1.2.1.12). The localization of GAPDH on the surface of a pathogen was first described in Gram-positive bacteria. In fact, two research groups simultaneously described this finding in group A streptococci (Lottenberg et al., 1992; Pancholi & Fischetti, 1992). Since then, several reports in yeast and other Gram-positive pathogens showed that extracellular GAPDH interacts with various host components, including plasminogen, cytoskeleton proteins (actin, myosin), or extracellular matrix proteins such as fibronectin (Gozalbo et al., 1998; Pancholi & Fischetti, 1992; Seifert, McArthur, Bleiweis, & Brady, 2003; Schaumburg et al., 2004). Recently, the membrane protein uPAR/CD87 in pharyngeal cells has been identified as a receptor for surface GAPDH in *S. pyogenes* (Jin, Song, Boel, Kochar, & Pancholi, 2005). These interactions contribute to the adhesion of the pathogen and to its virulence, and thus play a role in the mechanism of pathogenesis.

The possible extracellular localization of GAPDH and its role in Gram-negative pathogens has been poorly studied. In *Enterobacteriaceae*, GAPDH has been identified as an outer membrane protein in *Edwardsiella tarda* and the recombinant enzyme has been used to develop a vaccine against this pathogen (Kawai, Liu, Ohnishi, Oshima, 2004; Liu, Oshima, Kurohara, Ohnishi, & Kawai, 2005). In enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), a 39 kDa protein with an N-terminal sequence displaying significant similarity to GAPDH was observed among some secreted proteins in the culture medium (Kenny & Finlay, 1995). In *E. coli*, GAPDH is encoded by two genes, *gapA* and *gapC*. Many *E. coli* K-12 strains routinely used as standards in experimental research have accumulated mutations in *gapC*, generating stop codons which result in a truncated,

non-functional protein (Espinosa-Urgel, & Kolter, 1998; Hidalgo, Limón, & Aguilar, 1996). However, in natural isolates or pathogenic *E. coli* strains the *gapC* open reading frame is complete, although no information is available on its expression.

EPEC and enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) are closely related human pathogens which secrete many extracellular proteins and are distinguished from other pathogenic *E. coli* strains by their ability to produce a characteristic histopathological feature, known as attaching and effacing lesions, on the mucosa (Donnenberg & Whittam, 2001).

Here we examined GAPDH as a secreted protein in these Gram-negative pathogens. We show that in EHEC and EPEC, GAPDH is an extracellular protein that binds human plasminogen and fibrinogen, and interacts with intestinal epithelial cells. This finding indicates a role of extracellular GAPDH in the infection mechanism.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains, plasmids and growth conditions

The *E. coli* strains and plasmids are listed in Table 1. Bacterial cells were routinely grown at 37 °C in Luria–Bertani broth (LB). The *gapA* mutant strain W3CG was grown in minimal medium supplemented with malate and glycerol as carbon sources (Ganter & Plückerthun, 1990). Where indicated, the cells were grown without shaking at 37 °C in Ham's F-12, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (GIBCO), or minimal medium (Boronat & Aguilar, 1979) supplemented with 20 mM glucose, in a CO₂ incubator. Growth was monitored by measuring the optical density at 600 nm (OD₆₀₀). When required, tetracycline (12.5 µg/ml) or ampicillin (100 µg/ml) was added to the medium.

2.2. Caco-2 cell culture, infection conditions, and fractionation of infected Caco-2 cells with Triton X-100

Caco-2 cells were grown at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere in DMEM supplemented with nonessential amino acids, 25 mM HEPES, 10% fetal calf serum, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml).

Before infection, confluent monolayers of Caco-2 cells were washed three times in PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.3), and maintained in DMEM without serum or antibiotics. EHEC 86-24h11 or EPEC E2348/69 were grown in LB overnight at 37 °C, and then the culture was diluted

Table 1
Strains and plasmid used in this study

Strain or plasmid	Genotype or description	Source or reference
<i>E. coli</i> strains		
XL1Blue	<i>recA1 lac endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1</i> (F' <i>proAB lac^f lacZ ΔM15 Tn10</i>)	Stratagene
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal</i>	Amersham Pharmacia
86-24h11	EHEC O157:H7 <i>stx-2</i>	M. S. Donnenberg
E2348/69	Wild type EPEC O127:H6	M. S. Donnenberg
W3CG	F ⁻ λ ⁻ <i>thyA36 deoC2 IN(rrmD-rrmE)</i> (W3110) Δ <i>gapA::tet supE</i>	Ganter & Plückerthun, 1990
EcoR12	Human stool isolate	Ochman & Selander, 1984
EcoR26	Human stool isolate	Ochman & Selander, 1984
EcoR41	Human stool isolate	Ochman & Selander, 1984
Plasmids		
pGEX-3X	GST-Tag, Ap ^r <i>lac^f</i>	Amersham Pharmacia

1:50 in fresh medium and grown to an OD₆₀₀ of 0.7. Monolayers of Caco-2 were infected for 4 hr at 37 °C with a bacteria/cell ratio of 100:1.

Following infection, Caco-2 cells were washed twice in 10 ml of ice-cold PBS, scraped into 1 ml of ice-cold PBS and collected by centrifugation (2 min at 1600 × *g*). The pellet was lysed for 30 min at room temperature with 200 μl of Triton/Tris lysis solution (50 mM Tris–HCl, 1% Triton X-100, pH 7.5, 2× complete protease inhibitor cocktail). Ten microliters of the lysate was diluted and plated to determine the cfu/ml for each sample, to standardize electrophoresis loading volumes. The lysate was processed as described elsewhere (Wolf, Nisan, Hanski, Frankel, & Rosenshine, 1998) to obtain the Triton-soluble and Triton-insoluble fractions. These samples were boiled, centrifuged, and the cleared supernatants were analyzed by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

2.3. Recombinant DNA techniques, RNA isolation and RT-PCR assays

DNA manipulations *in vitro* were performed according to standard protocols (Sambrook & Russell, 2001). DNA was sequenced in an automated ABI 377 DNA sequencer with fluorescent dye termination methods.

Bacterial total RNA was extracted using the RiboPureTM-Bacteria kit (Ambion). DNase treatment was applied to all samples. RNA was quantified by measuring absorbance at 260 and 280 nm, and the integrity was verified on 1% agarose/formaldehyde gels.

The same amount of total RNA (1 μg) was reverse transcribed with random hexamers using M-MLV reverse transcriptase (20 U) for 1 hr at 37 °C in a final volume of 20 μl. To rule out genomic DNA contamination, control reactions were performed in parallel

without reverse transcriptase. cDNA products (4 μl) were amplified by PCR in a 50 μl reaction mixture under standard conditions. The specific primers for *gapA* gene were GapA-F (5'-GGTATCAACGGTTTTGGCCG-3') and GapA-R (5'-CGAAGTTAGCGCCTTTAACG-3'), and the specific primers for *gapC* were GapC-F (5'-GGTATTAACGGTTTTGGTCG-3') and GapC-R (5'-GGAAACAATGGTGTTCGTTGC-3'). The rRNA 16S gene (*rrsB*) was used as control. Temperature profiles for the amplification were as follows: 1 min of denaturation at 95 °C, 45 s of annealing at 57 °C and 1 min extension at 72 °C. This protocol was applied for 30 cycles and followed by a final 10 min extension at 72 °C.

2.4. Expression and purification of recombinant GAPDH

GAPDH was purified using a glutathione-S-transferase (GST) gene fusion system with recognition sites for Factor Xa cleavage. The *gapA* gene from EHEC 86-24h11 was amplified by PCR with primers GapA1-GST (5'-CGCGGATCCTTA TGACTATCAAAGTAGGTATC-3') and GapA2-GST (5'-GGC-GAATTCAACTTATTTAGAGATGTGAGC-3'), bearing, respectively, *Bam*HI and *Eco*RI restriction sites (underlined). The PCR fragment was digested and cloned into the *Bam*HI and *Eco*RI restriction sites of plasmid pGEX-3X, yielding plasmid pGEX-GapA.

GAPDH was overexpressed in strain BL21(DE3) carrying recombinant plasmid pGEX-GapA after isopropyl-β-thiogalactoside (0.1 mM) induction in LB-ampicillin medium for 16 hr at 20 °C. To purify GAPDH, the cell pellet was suspended in PBS and sonically disrupted on ice. The cell extract, previously diluted 10-fold, was applied to a column containing glutathione-sepharose 4B resin (Amersham Pharmacia Biotech).

Digestion of the bound GST-fusion protein was performed as described elsewhere (Pellicer, Nuñez, Aguilar, Badia, & Baldoma, 2003). The cleaved GAPDH protein was eluted with PBS and further purified by affinity chromatography with anti-Factor Xa-agarose resin (Sigma) to remove Factor Xa.

2.5. Preparation of anti-GAPDH specific antibody

Antisera against *E. coli* GAPDH were raised in New Zealand White rabbits as described elsewhere (Baldoma & Aguilar, 1987) by using the purified protein as an antigen.

Anti-GAPDH specific antibodies were purified by affinity chromatography. For this purpose, purified GAPDH was covalently linked to UltralinkTM Immobilized DADPA on 3 M Emphase Biosupport medium AB1 gel (Pierce) using water-soluble 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide-HCl. To purify the anti-GAPDH immunoglobulin, 3 ml of the globulin fraction partially purified from the GAPDH-antisera was applied to the DADPA-GapA affinity column and the bound antibodies were eluted with 0.1 M glycine buffer, pH 2.5. Collected fractions were neutralized with Tris solution, pH 10, and dialyzed overnight against PBS.

2.6. Isolation of secreted proteins in culture medium

Overnight cultures in LB were diluted 1:50 in the indicated culture media and incubated without shaking at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. At different times, the bacteria were removed by centrifugation (5000 × *g*, 10 min, 4 °C), and the supernatant was passed through a 0.22 μm-pore-size filter (Millipore). The proteins in the filtrate were precipitated by incubation on ice for at least 1 hr with 10% trichloroacetic acid (TCA). The protein pellet was washed in 90% (v/v) ice-cold acetone, air-dried and suspended in loading buffer before being resolved by SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

2.7. Vesicle isolation

Vesicles were isolated from culture supernatants according to Kadurugamuwa and Beveridge (1999). In brief, bacterial cells were pelleted by centrifugation and the supernatants were filtered as described above. Vesicles were then collected by centrifugation at 150,000 × *g* for 3 hr at 4 °C, washed and resuspended in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0.

Structural analysis of vesicles was performed by negative staining using 0.5% uranyl acetate (Wai et al., 2003)

and examined by transmission electron microscopy (Jeol, JEM 1010, Japan).

2.8. Two-dimensional gel electrophoresis

Bacterial cells were harvested and then resuspended in 25 mM Tris-HCl, pH 8, plus 8 M urea, 2% CHAPS, 1.2% DeStreak and a mixture of protease inhibitors (Roche complete mini-EDTA). After sonic disruption on ice, cell debris was removed by centrifugation at 16,000 × *g* for 30 min at 4 °C. The protein concentration of the cell extract was determined by the RC DC Protein Assay (BioRad). Appropriate volumes of these cell extracts were diluted in 150 μl of rehydration buffer (9 M urea, 4% CHAPS, 50 mM dithiothreitol, 0.5% immobilized pH gradient buffer and bromophenol blue). In the case of secreted proteins, the TCA precipitated fraction was rinsed three times in acetone and resuspended in rehydration buffer.

Isoelectric focusing (5–25 μg of protein) was performed in immobilized pH 5–8 gradient strips (BioRad). Second-dimension SDS-PAGE was performed on 12.5% acrylamide gels followed by anti-GAPDH Western blot. Parallel gels were silver-stained to visualize total protein and used for protein identification.

2.9. Mass spectrometry of proteins

Following SDS-PAGE, gels were scanned and the protein spots of interest were excised and digested with trypsin (Sequencing grade modified, Promega) in the automatic Investigator ProGest robot of Genomic Solutions. Peptides released from the gel were subjected to matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) analyses at the “Serveis Científicotècnics” from the University of Barcelona. The spectra were submitted for database searching in a generic MASCOT format. Some of the digested peptide samples were analyzed by combined liquid chromatography/tandem mass spectrometry (CapLC-nano-ESI-Q-TOF) (CapLC, Micromass-Waters). In these cases data were generated in PKL file format, which were submitted to the MASCOT server for database search.

2.10. Western blot analysis

For Western blot analysis, protein samples were electrophoresed in an SDS-polyacrylamide gel and transferred to a HyBond-P polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane by using a Bio-Rad MiniTransblot apparatus. The membrane was blocked in PBS-0.05%

Tween-20 and 5% skimmed milk (blocking solution) for 1 hr at room temperature. It was then incubated with specific antibodies against GAPDH (1:5000 dilution in blocking solution) or with antibodies against H-NS (1:5000 dilution) for 16 hr at 4 °C. The protein-antibody complex was visualized by using the ECL Plus Western blotting detection system (Amersham Pharmacia Biotech). The secondary antibody was donkey anti-rabbit immunoglobulin horseradish peroxidase-linked, diluted 1:15,000 in blocking solution.

Binding of GAPDH to human proteins was analyzed by Far-Western assays. Actin, plasminogen, fibrinogen or fibronectin (5 µg each) were subjected to SDS-PAGE and blotted onto a PVDF membrane. Purified GAPDH was processed in parallel as positive control. After being blocked overnight with 1% gelatin in TBS buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.6), the membrane was incubated with purified GAPDH (1 µg/ml) diluted in the same blocking buffer for 3 hr and then washed four times in TBS-0.05% Tween-20. The membrane was incubated with anti-GAPDH specific antibodies (1:5000 dilution TBS-1% gelatin-0.05% Tween-20) for 16 hr at 4 °C, and processed as described above using the ECL Western blotting kit to visualize the reactive bands. The incubation step with purified GAPDH was omitted as negative control.

Binding of plasminogen to GAPDH was also analyzed by Far-Western assays. In this case, purified GAPDH was subjected to two-dimensional gel electrophoresis before being blotted onto the PVDF membrane, which was incubated with human plasminogen (5 µg/ml). Immunoblotting was performed essentially as described above using a rabbit polyclonal antibody raised against the 16–105 amino acid peptide of human plasminogen (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) (1:400 dilution, 1 hr incubation at room temperature). The incubation step with human plasminogen was omitted as negative control.

2.11. Solid-phase ligand-binding assay

This assay was performed in a 96-well high-binding microtiter plate (maxisorp, NUNC). To determine the binding of GAPDH to human proteins (actin, plasminogen, fibrinogen or fibronectin), wells were coated with a fixed amount of these proteins (5 µg/ml, 100 µl/well) dissolved in PBS buffer by 8 hr incubation at room temperature. Negative control wells coated with 0.5% gelatin, and positive control wells coated with GAPDH were prepared in parallel. The wells were incubated overnight with TBS blocking buffer (containing 1% gelatin) and then reacted with purified

GAPDH (0.125 µg/ml to 2 µg/ml) in a final volume of 100 µl and further incubated for 3 hr at room temperature. The plates were washed three times in TBS-0.05% Tween-20 and once in TBS buffer. The amount of GAPDH bound to these proteins was determined spectrophotometrically (492 nm) in an ELISA-based assay using anti-GAPDH-specific antibody (1:9000) followed by peroxidase-labelled donkey anti-rabbit antibody (1:9000) and *o*-phenylenediamine as chromogenic substrate. All the incubation steps were performed in TBS-0.05% Tween-20 buffer containing 1% gelatin. The specificity of the absorbance values was assessed in ELISA assays in which incubation with GAPDH was omitted. In the absence of added GAPDH, the background values obtained with the indicated antibody dilutions were very low (less than 0.06) for all the proteins tested, but they were nevertheless subtracted from the test values to obtain specific absorbance.

2.12. Transmission electron microscopy

Bacterial surface-associated GAPDH was examined by immunonegative staining transmission electron microscopy as described by Knutton (2003), except that the immunolabelling was performed before chemical fixation in order to preserve the extracellular protein. Appropriate controls were incorporated into all labelling experiments.

For ultrastructural immunocytochemical studies, bacterial cells were collected by centrifugation, fixed and processed for cryoultramicrotomy analysis. Bacterial cells were chemically fixed at 4 °C with a mixture of 4% paraformaldehyde and 0.2% glutaraldehyde in PHEM buffer (60 mM Pipes, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, pH 6.9). After washing in PHEM buffer containing 50 mM glycine, cells were embedded in 10% gelatin and infused in 2.3 M sucrose. Mounted gelatin blocks were frozen in liquid nitrogen. Thin sections were prepared in an ultracryomicrotome (Leica EM FCS, Vienna, Austria) and collected on Au-grids with 2% methylcellulose in 2.3 M sucrose. Ultrathin cryosections were incubated at room temperature on drops of 2% gelatin in PBS for 20 min at 37 °C, followed by 50 mM glycine in PBS for 15 min and in PBS-1% BSA for 10 min. Subsequently, the samples were incubated with anti-GAPDH antibody (1:20 in PBS-1% BSA) for 60 min. After three washes in PBS for 10 min, sections were incubated for 20 min with protein A coupled to 10 nm diameter colloidal gold particles (1:70 dilution in PBS-1% BSA). This was followed by three washes in PBS for 10 min and two washes in distilled water. As a control for non-specific binding of the colloidal gold-

conjugated antibody, the primary polyclonal antibody was omitted.

2.13. Enzyme activities

GAPDH activity was measured following the increase in absorbance at 340 nm due to NADH formation, according to Pancholi and Fischetti (1992). To determine the enzymatic activity of secreted GAPDH, supernatants from bacterial cultures were passed through a 0.22 μ m-pore-size filter and precipitated with 95% ammonium sulphate according to D'Alessio and Josse (1971). The protein pellets were resuspended in 50 mM Na₂HPO₄, pH 7.5 and analyzed by GAPDH activity.

GAPDH activity on the bacterial cell surface was measured using suspensions of whole cells as the enzymatic source (Pancholi & Fischetti, 1992). Bacteria were collected by centrifugation at 4500 \times g, washed twice in 50 mM Na₂HPO₄, pH 7.5, and resuspended in the same buffer. Bacterial suspensions of 2 \times 10⁸ cfu/100 μ l were incubated with 7 μ l glyceraldehyde-3-phosphate (50 mg/ml), 100 μ l NAD⁺ (10 mM) and assay buffer (40 mM triethanolamine, 50 mM Na₂HPO₄, and 5 mM EDTA, pH 8.6) in a final volume of 1 ml. After 15 min at 30 °C, cells were removed by centrifugation and the supernatant was examined for the presence of NADH by measuring the absorbance at 340 nm. Control reactions were carried out in which

either bacterial cells or glyceraldehyde-3-phosphate was omitted.

3. Results

3.1. Identification of GAPDH as an extracellular protein in EHEC cultures

One-dimensional SDS-PAGE followed by MALDI-TOF/MS analysis of the proteins secreted by overnight cultures of EHEC 86-24h11 grown in DMEM showed GAPDH in the cell-free supernatant. Two findings indicated that the GAPDH secreted was the enzyme encoded by *gapA* and not by the paralogue *gapC* gene: (i) the correspondence of the sequences identified by MALDI-TOF/MS with those of the *gapA*-encoded enzyme (Fig. 1A), and (ii) the very low level of *gapC* expression in bacterial cells grown in this culture medium as determined by RT-PCR. After 30 cycles of amplification, the PCR product corresponding to the *gapC* mRNA was almost undetectable (Fig. 1B), and hence, the corresponding GapC protein was assumed to be negligible.

3.2. Purification of GAPDH and production of polyclonal antibody

To detect and characterize extracellular GAPDH we were interested in the generation of specific polyclonal

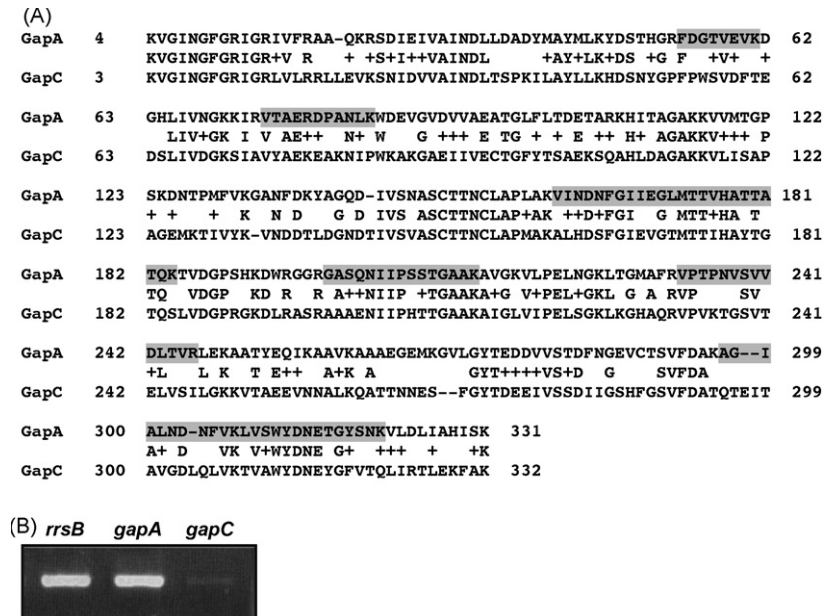


Fig. 1. Identification of the GAPDH secreted by EHEC as the product of *gapA* gene. (A) Alignment of the amino acid sequence of *gapA* and *gapC*-encoded enzymes. The peptides identified by MALDI-TOF/MS are highlighted in grey. (B) RT-PCR analysis of *gapA* and *gapC* expression in cells of strain EHEC 86-24h11 grown in DMEM. Gene *rrsB* of constitutive expression was used as control.

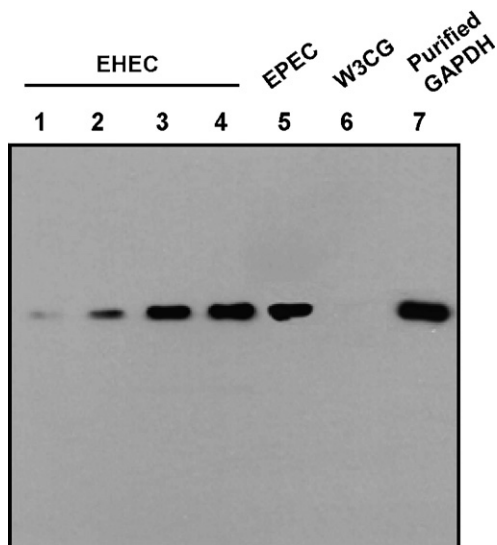


Fig. 2. Western blot analysis of GAPDH in cell extracts of different *E. coli* strains. The amount of total protein loaded was: Lane 1, 0.5 µg; lane 2, 1 µg; lane 3, 2.5 µg; lanes 4–6, 5 µg; and lane 7, 0.5 µg of purified GAPDH as control. The protein extracts were fractionated by SDS-PAGE, blotted onto a PVDF membrane and reacted with rabbit polyclonal anti-GAPDH antibody purified by affinity chromatography. The protein–antibody complex was visualized by using the ECL Plus Western blotting detection system (Amersham Pharmacia Biotech), and donkey anti-rabbit immunoglobulin horseradish peroxidase-linked as the secondary antibody.

antibodies. The *gapA* gene from strain EHEC 86-24h11 was amplified by PCR, cloned in pGEX-3X and purified using the GST-fusion system. The purified protein was used as an antigen to obtain rabbit anti-GAPDH specific antibodies, which were further purified by affinity chromatography. To assess the specificity of this

antibody preparation, cell extracts of EHEC 86-24h11, EPEC E2348/69 and the $\Delta gapA$ mutant strain W3CG were analyzed by Western blot. A single band of 36 kDa coincident with that of the purified protein was present in cell extracts from EHEC and EPEC strains, whereas no band was detected in the $\Delta gapA$ cell extracts (Fig. 2).

3.3. GAPDH presents different forms in EHEC

Cell extracts of strain EHEC 86-24h11 grown in DMEM were analyzed by two-dimensional gel electrophoresis revealed by silver staining and by Western blot. Fig. 3 shows two major immunodetected GAPDH specific spots indicating that this enzyme was present at least in two forms. The more basic form was the most abundant. These spots were excised from the silver-stained gel and both were identified by mass spectrometry as the *gapA* encoded GAPDH enzyme. These data are consistent with post-translational modifications which led to the alternative forms of the enzyme with different isoelectric points. When this analysis was performed with the extracellular fraction of DMEM grown bacterial cells, we identified one spot, which corresponded to the more basic form.

3.4. Conditions of GAPDH secretion

A time course of GAPDH secretion was performed with strains EHEC 86-24h11 and EPEC E2348/69. Overnight cultures of these strains were diluted 1:50 and grown in DMEM without shaking at 37 °C. At different times, the pH of the culture medium was measured and the secreted proteins were analyzed by Western blot

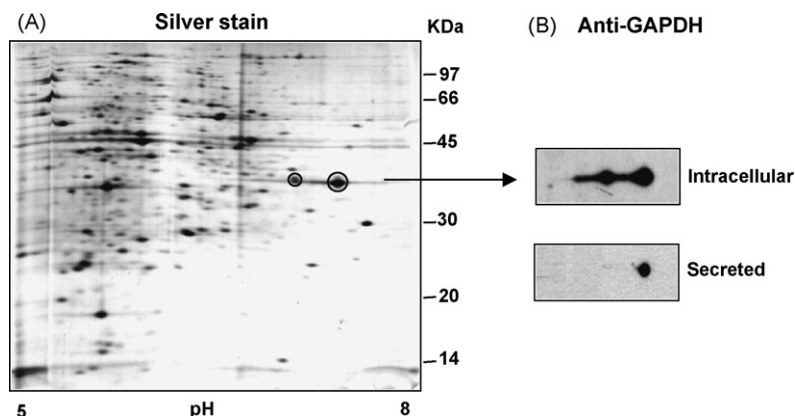


Fig. 3. Identification of different GAPDH forms by two-dimensional gel analysis in strain EHEC 86-24h11. (A) Silver-stained gel loaded with cell extract (15 µg protein) of this strain grown in DMEM. The two circled spots were identified by mass spectrometry as *gapA*-encoded GAPDH. (B) Anti-GAPDH Western blots of 2D gels loaded with the same cell extract (5 µg protein) or with the secreted protein fraction obtained from DMEM grown cultures.

using anti-GAPDH specific antibodies. Fig. 4A shows that extracellular GAPDH was detected in supernatants of EHEC 86-24h11 cultures after 6 hr of growth at an OD_{600} of 0.80 (pH 5.3). In the case of EPEC E2348/69, although cells grew at the same rate, the protein was immunodetected 2 hr earlier, at an OD_{600} of 0.37 (pH 8.0). To rule out the possibility that the presence of GAPDH in the culture medium was due to cytosolic contamination, immunoblots were run in parallel using antibodies against the abundant intracellular protein H-NS (Paytubi et al., 2004). No extracellular specific band was detected for this control protein in the supernatant cultures of either strain (Fig. 4A). The same result was obtained when the supernatants were immunoblotted with antibodies against another intracellular protein such as phosphoglycolate phosphatase (PGPase) (Pellicer et al., 2003) (not shown). This indicated that the presence

of GAPDH in the supernatant of exponentially growing bacteria was attributable to a secretion process rather than cell lysis. Attending to these results, cultures grown to an OD_{600} of 1.0 were routinely used to perform new experiments for further analysis of extracellular GAPDH.

Immunoblotting experiments of culture supernatants showed that GAPDH was also exported by EHEC and EPEC cells grown in the tissue culture medium Ham's F-12, or in rich bacterial medium LB, and that this process did not take place in bacteria grown at 30 °C (Fig. 4B). When cells were grown in glucose minimal medium, extracellular GAPDH was not detected. The secretion process does not appear to be regulated by environmental pH since the extracellular enzyme was detected in cultures with a final pH that was either acidic (DMEM cultures), neutral (LB cultures) or basic (Ham's F-12 cul-

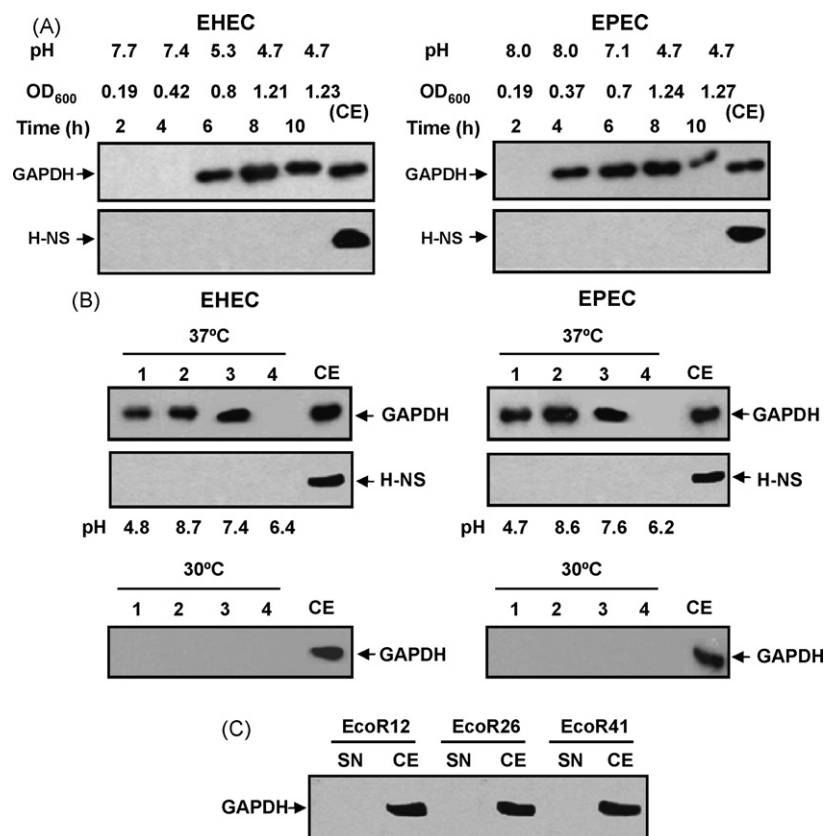


Fig. 4. Analysis by Western blot of GAPDH secretion. Aliquots of 0.5 ml of the supernatant cultures were precipitated with TCA and analyzed by Western blot using anti-GAPDH specific antibodies, or anti-H-NS as a control of cytosolic contamination. (A) Time course of GAPDH secretion by EHEC 86-24h11 and EPEC E23448/69 strains grown in DMEM at 37 °C without shaking. The OD_{600} and pH values are indicated for each time. (B) Effect of the culture medium and the temperature on GAPDH secretion. These strains were grown for 8 hr in DMEM (lane 1), Ham's F-12 (lane 2), LB (lane 3), or glucose minimal medium (lane 4), either at 37 °C or at 30 °C. For each medium the final pH is indicated below. (C) GAPDH secretion by non-pathogenic *E. coli* strains. SN, cell-free supernatants obtained from DMEM cultures of strains EcoR12, EcoR26, and EcoR41 grown to an OD_{600} of 1.25. CE, cell extract (5 μ g protein) used as positive control.

tures) (Fig. 4B). The same results on GAPDH secretion were obtained when bacterial cultures were grown with shaking (not shown).

Secretion of GAPDH by non-pathogenic strains was analyzed in human stool isolates (strains EcoR12, EcoR26 and EcoR41) taken from the Selander collection (Ochman & Selander, 1984). No immunospecific extracellular GAPDH band was detected in the corresponding culture supernatants (Fig. 4C).

The presence of GAPDH in the culture medium of EHEC 86-24h11 and EPEC E2348/69 was confirmed by assaying its catalytic activity. To this end, cell-free supernatants were concentrated by ammonium sulphate precipitation and analyzed for GAPDH activity. Supernatants from DMEM cultures of either strain showed significant NADH formation coupled to glyceraldehyde-3-phosphate oxidation (Fig. 5A). Similar results were obtained for cultures grown in Ham's F-12 whereas supernatants from glucose cultures displayed negligible level of activity. As expected, cell-free supernatants of the non-pathogenic strains EcoR26 (Fig. 5A), EcoR12, or EcoR41 did not display GAPDH activity.

3.5. Subcellular localization of GAPDH

The presence of GAPDH on the bacterial cell surface was first analyzed by measuring its catalytic activity linked to this extracellular localization. The assays were carried out using whole EHEC 86-24h11 and EPEC E2348/69 cells collected from DMEM cultures after 8 hr incubation and processed as indicated in methods for cell surface activity determination. Intact cells displayed GAPDH activity attributable to the enzyme located on the cell surface. As control these bacterial cells did not catalyze NADH formation in the absence of glyceraldehyde-3-phosphate (Fig. 5B). The absence of GAPDH activity in cell suspensions of strain EcoR26 again ruled out the extracellular localization of this enzyme in non-pathogenic strains.

Further evidence of the cell surface localization of GAPDH was obtained by immunonegative staining. EHEC 86-24h11 and EPEC E2348/69 cells collected from DMEM cultures were stained with primary affinity-purified anti-GAPDH antibodies, followed by gold-labelled secondary antibodies, fixation and negative staining. Representative electron micrographs are shown in Fig. 6A. The results showed that GAPDH was present on the cell surface of intact DMEM-grown bacterial cells.

To define more precisely the cellular localization of GAPDH we performed immunocytochemical experiments using ultrathin sections prepared for cry-

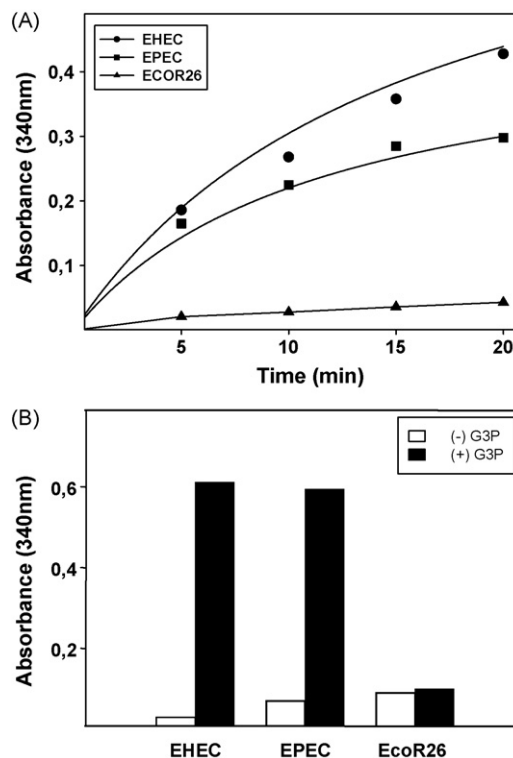


Fig. 5. Extracellular GAPDH activity determined in cell-free supernatants (A) or whole cells (B) of strains EHEC 86-24h11, EPEC E23448/69 and EcoR26 grown in DMEM. The GAPDH activity was measured by monitoring NADH formation coupled to the conversion of glyceraldehyde-3-phosphate to 1,3-bisphosphoglycerate (absorbance at 340 nm) at different time intervals or as an endpoint reading after 15 min of incubation. (A) GAPDH activity in cell-free supernatants. Cells of strains EHEC86-24h11 (circles), EPEC E23448/69 (squares) and EcoR26 (triangles) were collected by centrifugation, and equal volumes of the cell-free supernatants were processed by ammonium sulphate precipitation as described in materials and methods. (B) GAPDH activity on cell surface of bacterial cells was measured using suspensions of whole cells (2×10^8 cfu/100 μ l) as the enzyme source. The GAPDH activity was determined at 30 °C by measuring the absorbance at 340 nm as an endpoint reading of the supernatant obtained after 15 min of incubation in 1 ml of the assay mixture (black bars). Control reactions were performed in the absence of glyceraldehyde-3-phosphate (white bars).

ultramicrotomy from EHEC 86-24h11 cells grown in DMEM (Fig. 6B). Inner and outer membranes appeared as clearly defined structures in these sections (Fig. 6B). The immunolabelling assays revealed gold particles in the cytoplasm (consistent with the intracellular glycolytic function of this enzyme), but also in the inner membrane, in the periplasm, and in the outer membrane, suggesting GAPDH trafficking from inside to outside the cell. Control samples, obtained by omitting the incubation step with the anti-GAPDH specific antibody, were not labelled.

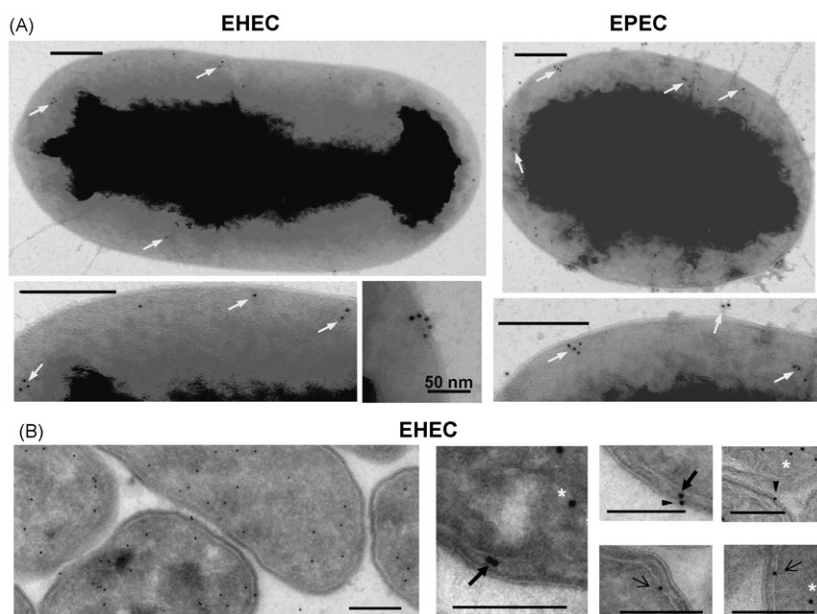


Fig. 6. Immunoelectron microscopy detection of GAPDH. (A) Localization of GAPDH on the bacterial cell surface. EHEC 86-24h11 and EPEC E23448/69 cells grown in DMEM were immunolabelled and processed for negative staining transmission electron microscopy. Colloidal gold particles localized on the cell surface are indicated by white arrows. (B) Subcellular distribution of GAPDH in EHEC 86-24h11. Cell cultures of this strain were fixed and processed for cryoultramicroscopy analysis as described in the methods section. Colloidal gold particles were localized in the cytoplasm of bacterial cells (white stars), in the inner membrane (thin arrows), in the periplasmic space (thick arrows) and at the surface of the outer membrane (arrowheads). Bar = 200 nm, except where indicated.

3.6. Secreted GAPDH is not associated with bacterial vesicles

Vesicles were purified from cell-free culture supernatants of EHEC 86-24h11 or EPEC E23448/69 grown in DMEM. These preparations were analyzed by electron microscopy after negative staining and shown to be enriched in vesicles with a diameter within the range of 25–50 nm (Fig. 7A). To study whether the secreted GAPDH was associated with vesicles we performed immunoblotting experiments with samples derived from the same volume of bacterial culture. These samples were (i) cell-free supernatant before isolation of vesicles (total secreted GAPDH), (ii) cell-free supernatant after removal of vesicles by centrifugation (soluble extracellular GAPDH), and (iii) vesicles collected by centrifugation (vesicle-associated GAPDH). Western blot analysis of these samples (Fig. 7C) showed the absence of the GAPDH specific band in vesicle preparations. The intensity of the band corresponding to soluble GAPDH was equal to that of the total secreted samples, indicating that secreted GAPDH was present mainly as a free soluble protein in the culture supernatants. The absence of H-NS specific bands in Western blots reacted with antibodies against this intracellular protein again ruled out cytosolic contamination.

3.7. Binding of recombinant GAPDH to human proteins

The ability of purified *E. coli* GAPDH to bind human proteins, known to interact with the extracellular GAPDH of other pathogens, was first analyzed by Far-Western assays. We selected for this study actin, fibrinogen, plasminogen and fibronectin. Our results indicated that *E. coli* GAPDH interacted with plasminogen and fibrinogen (Fig. 8A). The specificity of the binding of GAPDH to these proteins was demonstrated by the absence of any band of cross-reacting material when the incubation step with GAPDH was omitted.

The ability of purified GAPDH to bind these human proteins was further analyzed by solid-phase ligand-binding assays, which do not involve denaturation of the proteins to be analyzed. Actin, fibrinogen, plasminogen and fibronectin were coated on 96-well ELISA plates (0.5 μ g/well) and incubated with different concentrations of GAPDH. Bound GAPDH was detected as described in Section 2.11. Results indeed confirmed binding of GAPDH to plasminogen and fibrinogen. This bacterial enzyme did not interact with actin or fibronectin to any significant extent (Fig. 8B).

The presence of multiple forms of GAPDH (encoded by *gapA*) led us to analyze whether plasminogen binding

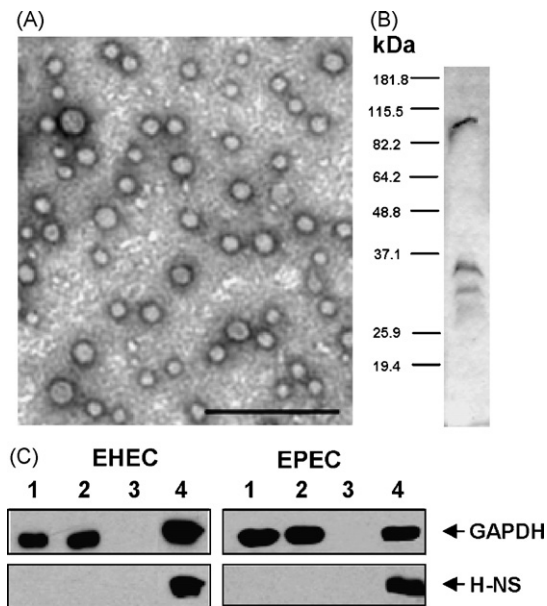


Fig. 7. Analysis of GAPDH secretion through vesicles. (A) Electron microscopy of isolated vesicles from DMEM cultures of strain EHEC 86-24h11. Bar = 200 nm. (B) Electrophoretical analysis of these vesicles. The 10% SDS-PAGE gel was stained with Coomassie blue. Molecular size markers are indicated. (C) Western blot analysis of different extracellular samples derived from the same volume of EHEC 86-24h11 or EPEC E23448/69 cultures (0.5 ml): Lane 1, TCA-precipitated cell-free supernatants before isolation of vesicles; lane 2, TCA-precipitated cell-free supernatant after removal of the vesicles; lane 3, vesicles collected by centrifugation; lane 4, cell extract (5 μ g protein).

activity is specifically linked to one of these forms. This was approached by Far-Western experiments in which purified GAPDH was subjected to two-dimensional gel electrophoresis and electroblotted, and the membrane was reacted with soluble human plasminogen followed by immunodetection with a rabbit polyclonal anti-plasminogen antibody. Purified GAPDH yielded several spots that interacted with plasminogen (Fig. 8C), thus providing evidence that this binding is not dependent on the form.

3.8. Interaction of GAPDH with intestinal epithelial cells during bacterial infection

We next examined whether extracellular GAPDH, either secreted or cell surface associated, interacted with Caco-2 intestinal epithelial cells during infection. After 4 hr infection with EHEC 86-24h11 or EPEC E2348/69, the supernatant was removed and the Caco-2 monolayer was washed extensively. The epithelial cells were divided into a Triton-soluble fraction (containing eukaryotic host cell cytoplasmic and

membrane proteins) and a Triton-insoluble fraction (containing eukaryotic host cell cytoskeletal components and adhered bacteria). Immunoblotting analysis revealed GAPDH in the Triton-soluble fraction (Fig. 8D). To rule out contamination with other bacterial proteins that do not interact with the host cell, immunoblotting with a negative control antibody against H-NS was carried out in parallel. The absence of this intracellular protein in the Triton-soluble fraction indicated that GAPDH interacted with the eukaryotic cell.

4. Discussion

Our results indicate that GAPDH is secreted by the Gram-negative pathogens EHEC and EPEC. The presence in the extracellular medium of GAPDH, but not PGPase or H-NS, rules out cell lysis to explain this extracellular localization.

In *E. coli*, two genes (*gapA* and *gapC*) encode GAPDH proteins with highly similar sequences, and we attempted to discern which accounted for the exported enzyme. Our results demonstrate that the secreted GAPDH is the product of the *gapA* gene. Although the open reading frame of *gapC* is complete in EHEC, so the gene could be functional, its expression is negligible in DMEM cultures. This indicates that the *gapC*-encoded enzyme may not contribute to the adaptation or survival of this pathogen in environmental conditions similar to that present in the gut.

The presence of multiple forms of GAPDH, attributable to post-translational modifications, has been widely reported in other microorganisms (Cash, Argo, Ford, Lawrie, & McKenzie, 1999; Barbosa et al., 2006; Pessione et al., 2005), but not in *E. coli*. Here we show that cell extracts of EHEC contained two major forms of *gapA*-encoded GAPDH, which differ in their pI. The more basic form was found in the extracellular medium. Additional forms appeared as minor spots when large amounts of recombinant protein were applied to 2D gels (see Fig. 8C).

The fact that extracellular GAPDH, either secreted or cell surface associated, is enzymatically active indicates maintenance of the protein structure through the export process, thus retaining the possibility of different extracellular roles. This is especially relevant for a multifunctional protein. Likewise, the secreted glycolytic enzymes enolase from *Aeromonas hydrophila* (Sha et al., 2003) and GAPDH from *Streptococcus* sp. (Pancholi & Fischetti, 1992) were also reported to be active outside the cell.

Our results on GAPDH secretion by EHEC and EPEC in different culture media showed that this pro-

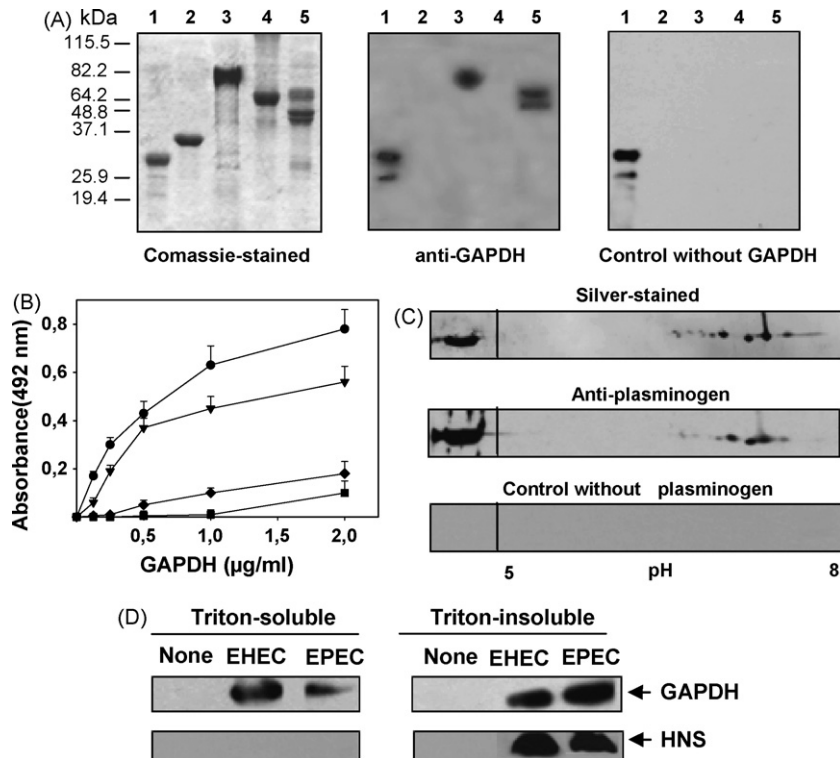


Fig. 8. Binding of bacterial GAPDH to host components. (A) Far-Western analysis of binding of soluble GAPDH to PVDF-immobilized human proteins. Samples containing 5 µg protein of GAPDH (lane 1, as positive control), actin (lane 2), plasminogen (lane 3), fibronectin (lane 4) or fibrinogen (lane 5) were subjected to SDS-PAGE, and the gel was either Coomassie blue-stained (first panel) or electroblotted. The PVDF membrane was reacted with recombinant GAPDH (1 µg/ml), subsequently incubated with antibodies against GAPDH and processed to visualize the reactive bands (second panel). The third panel shows the result of this analysis when the incubation step with purified GAPDH was omitted. (B) Binding of purified GAPDH to immobilized human proteins as revealed by solid-phase ligand-binding assay. Actin (squares), plasminogen (circles), fibronectin (diamonds), fibrinogen (triangles) were coated on 96-well microtiter plates and reacted with different concentrations of purified GAPDH. The binding of GAPDH to these human proteins was determined as indicated in the methods section. Data are the mean \pm SE from three experiments. (C) Far-Western analysis of binding of soluble plasminogen to PVDF-immobilized GAPDH. Samples containing 2.5 µg of purified GAPDH were subjected to two-dimensional gel electrophoresis, and the gel was either silver-stained (first panel) or electroblotted. The PVDF membrane was reacted with human plasminogen (5 µg/ml), subsequently incubated with antibodies against plasminogen and processed to visualize the reactive bands (second panel). The third panel shows the result of this analysis when the incubation step with human plasminogen was omitted. In each panel, the left square corresponds to purified GAPDH (2.5 µg) subjected to mono-dimensional gel electrophoresis. (D) Association of bacterial GAPDH with Caco-2 cells. After 4 hr infection with EHEC 86-24h11 or EPEC E23448/69, Caco-2 cells were washed and fractionated into a Triton X-100 soluble and a Triton X-100 insoluble fraction. These fractions were analyzed by Western blotting with anti-GAPDH specific antibodies or anti-H-NS as a negative control of bacterial contamination. Non-infected Caco-2 cells were processed as negative control (labelled as none).

cess depends on the composition of the external medium. Given that DMEM and glucose-minimal medium share the same glucose concentration and that bacterial growth rates are similar in these media, differences in extracellular localization cannot be attributable to glucose itself. Although secretion of GAPDH has been reported to be regulated by environmental pH in other bacteria such as *S. oralis* and *S. gordinii* (Nelson et al., 2001; Wilkins, Beighton, & Homer, 2003), our results showed that pH did not significantly affect GAPDH secretion in EHEC or EPEC.

GAPDH, like many other housekeeping and multi-functional enzymes in pathogens, is exported, regardless

of the absence of a signal sequence or hydrophobic domain, by an unknown mechanism. Recently, a proteomic study performed in *Listeria monocytogenes* allowed the identification of 17 proteins exported through the SecA2-dependent secretion system (Lenz, Mohammadi, Geissler, & Portnoy, 2003). These include classical cytosolic proteins which do not display a typical secretion signal, like EF-Tu or enolase. However, in that study GAPDH was not identified among these proteins.

Extracellular secretion of proteins is the major mechanism by which pathogens communicate with and intoxicate host cells. Secretion of such factors by Gram-negative pathogens is complicated by the fact that the

bacterial envelope consists of two lipid bilayers, with periplasm in between. For this reason Gram-negative bacteria have developed many strategies to enable specific proteins to reach the extracellular medium (Saier, 2006). One such strategy consists of vesicle-mediated export. Vesicles are released from the envelope of growing Gram-negative bacteria and serve as secretory vehicles. Outer membrane vesicles (OMVs) contain membrane proteins, lipopolysaccharide, phospholipids, DNA, and periplasmic constituents (Beveridge, 1999). Many virulence factors such as proteases, phospholipases, autolysins, or hemolysins have been found to be secreted by this pathway (Balsalobre et al., 2006; Kuehn & Kesty, 2005; Wai et al., 2003).

Our results showed that GAPDH export in EHEC and EPEC pathogens is not mediated by the vesicle secretion pathway. In fact, secreted GAPDH is found in the cell-free supernatant as a soluble protein, rather than associated to vesicles. Although the immunocytochemistry results evidenced the presence of GAPDH in the periplasm and associated to the inner and outer membranes, this protein is not incorporated during vesicle formation. Alternatively, selective protein leakage could be considered, since release of periplasmic proteins into the medium has been observed in the absence of cell lysis (Rinas & Hoffman, 2004). This indicates that the outer and the cytoplasmic membranes are not tight bags but are of variable porous structure depending on the circumstances. Since the bacterial envelope is of particular importance to pathogens because most virulence determinants reside in it, or must cross it, these microorganisms may well have developed mechanisms or strategies to regulate the surface permeability.

A critical first step in the establishment of infection by pathogens is the attachment to host components. Regarding the putative role of extracellular GAPDH in EHEC or EPEC infection, our results showed its interaction with plasminogen and fibrinogen. This is consistent with the fact that the C-terminal Lys residue of streptococcal GAPDH, important for plasminogen binding (Winram & Lottenberg, 1998), is conserved in the *E. coli* GAPDH sequence. Plasminogen is a serin-protease that is abundant in human plasma and extracellular fluids. This protein is also found associated with the surface of many cells in the body. Plasminogen binding activity of extracellular bacterial enzymes such as GAPDH, or enolase, has been related to mechanisms of pathogenesis. Plasmin, the resulting activated form of plasminogen, can degrade extracellular matrix proteins and promote bacterial migration (Bergmann, Rohde, Preissner, & Hammerschmidt, 2005). In this way, EHEC or EPEC extracellular GAPDH, either exposed on the bacterial

surface or secreted near the host cell, may contribute to migration of these pathogens through the gut mucosa.

Furthermore, our finding that GAPDH is also associated with intestinal epithelial cells after infection with EHEC or EPEC strongly suggests a role for extracellular GAPDH in the interaction of the pathogen with the gut epithelium. The detection of GAPDH in the triton soluble fraction suggests that the protein either interacts with the host cell membrane or is translocated into the cytoplasm, acting as an effector molecule to trigger signal transduction events. Additional studies are in progress to identify the target proteins of the *E. coli* GAPDH in Caco-2 cells.

Acknowledgments

This study was supported by grant BFU 2004-03586/BMC from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain. L.E, L.A and M.A.S were recipients of a predoctoral fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain. We thank Michael S. Donnenberg for providing strains EHEC86-24h11 and EPEC E2348/69, Andreas Plückthun for strain W3CG, and Antoni Juárez for anti-H-NS antibodies. We thank Carmen López for technical support in the electron microscopy experiments, and Angels Franch in the ELISA protocol.

References

- Baldoma, L., & Aguilar, J. (1987). Involvement of lactaldehyde dehydrogenase in several metabolic pathways of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 13991–13996.
- Balsalobre, C., Silvan, J. M., Berglung, S., Mizunoe, Y., Uhlin, B. E., & Wai, S. N. (2006). Release of the type I secreted alpha-hemolysin via outer membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 59, 99–112.
- Barbosa, M. S., Báó, S. N., Andreotti, P. F., de Faria, F. P., Felipe, M. S. S., Feitosa, L. C., et al. (2006). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infection & Immunity*, 74, 382–389.
- Bergmann, S., Rohde, M., Preissner, K. T., & Hammerschmidt, S. (2005). The nine residue plasminogen-binding motif of the pneumococcal enolase is the major cofactor of plasmin-mediated degradation of extracellular matrix, dissolution of fibrin and transmigration. *Thrombosis and Haemostasis*, 94, 304–311.
- Beveridge, T. J. (1999). Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of Bacteriology*, 181, 4725–4733.
- Boronat, A., & Aguilar, J. (1979). Rhamnose-induced propanediol oxidoreductase in *Escherichia coli*: Purification, properties, and comparison with fucose-induced enzyme. *Journal of Bacteriology*, 140, 320–326.
- Cash, P., Argo, E., Ford, L., Lawrie, L., & McKenzie, H. (1999). A proteomic analysis of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Electrophoresis*, 20, 2259–2268.

- D'Alessio, G., & Josse, J. (1971). Glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, phosphoglycerate kinase, and phosphoglyceromutase of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 246, 4319–4325.
- Donnenberg, M. S., & Whittam, T. S. (2001). Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Investigation*, 107, 539–548.
- Espinosa-Urgel, M., & Kolter, R. (1998). *Escherichia coli* genes expressed preferentially in an aquatic environment. *Molecular Microbiology*, 28, 325–332.
- Ganter, C., & Plückthun, A. (1990). Glycine to alanine substitutions in helices of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Effects on stability. *Biochemistry*, 29, 9395–9402.
- Gozalbo, D., Gil-Navarro, I., Azorin, I., Renal-Piqueras, J., Martinez, J. P., & Gil, M. L. (1998). The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. *Infection & Immunity*, 66, 2052–2059.
- Hidalgo, E., Limón, A., & Aguilar, J. (1996). A second *Escherichia coli* gene with similarity to *gapA*. *Microbiology*, 12, 99–106.
- Jin, H., Song, Y. P., Boel, G., Kochar, J., & Pancholi, V. (2005). Group A streptococcal surface GAPDH, SDH, recognizes uPAR/CD87 as its receptor on the human pharyngeal cell and mediates bacterial adherence to host cells. *Journal of Molecular Biology*, 350, 27–41.
- Kadurugamuwa, J. L., & Beveridge, T. J. (1999). Membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* and *Shigella flexneri* can be integrated into the surfaces of other Gram-negative bacteria. *Microbiology*, 145, 2051–2060.
- Kawai, K., Liu, Y., Ohnishi, K., & Oshima, S. (2004). A conserved 37 kDa outer membrane protein of *Edwardsiella tarda* is an effective vaccine candidate. *Vaccine*, 22, 3411–3418.
- Kenny, B., & Finlay, A. (1995). Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA*, 92, 7991–7995.
- Knutton, S. (2003). Microscopic methods to study STEC. In D. Philpott & F. Ebel (Eds.), *E. coli shiga toxin methods and protocols. Methods in molecular medicine* (pp. 141–143). Totowa, NJ: Humana press, Inc.
- Kuehn, M. J., & Kesty, N. C. (2005). Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes & Development*, 19, 2645–2655.
- Laemmlí, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 222, 680–685.
- Lenz, L. L., Mohammadi, S., Geissler, A., & Portnoy, D. A. (2003). SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 100, 12432–12437.
- Liu, Y., Oshima, S., Kurohara, K., Ohnishi, K., & Hawaii, K. (2005). Vaccine efficacy of recombinant GAPDH of *Edwardsiella tarda* against edwardsiellosis. *Microbiology and Immunology*, 49, 605–612.
- Lottenberg, R., Broder, C. C., Boyle, M. D. P., Kain, S. J., Shroeder, B. L., & Curtis, R., III. (1992). Cloning, sequence analysis and expression in *Escherichia coli* of a streptococcal plasmin receptor. *Journal of Bacteriology*, 174, 5204–5210.
- Nelson, D., Goldstein, J. M., Boatright, K., Harty, D. W. S., Cook, S. L., Hickman, P. J., et al. (2001). pH-regulated secretion of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus gordonii* FSS2: Purification, characterization and cloning of the gene encoding this enzyme. *Journal of Dental Research*, 80, 371–377.
- Ochman, H., & Selander, R. K. (1984). Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *Journal of Bacteriology*, 157, 690–693.
- Pancholi, V., & Chhatwal, G. S. (2003). Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 293, 391–401.
- Pancholi, V., & Fischetti, V. A. (1992). A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with multiple binding activity. *Journal of Experimental Medicine*, 176, 415–426.
- Paytubi, S., Madrid, C., Forns, N., Nieto, J. M., Balsalobre, C., Uhlin, B. E., et al. (2004). YdgT, the Hha paralogue in *Escherichia coli*, forms heteromeric complexes with H-NS and StpA. *Molecular Microbiology*, 54, 251–263.
- Pellicer, M. T., Nuñez, M. F., Aguilar, J., Badia, J., & Baldoma, L. (2003). Role of 2-phosphoglycolate phosphatase of *Escherichia coli* in metabolism of the 2-phosphoglycolate formed in DNA repair. *Journal of Bacteriology*, 185, 5815–5821.
- Pessione, E., Mazzoli, R., Giuffrida, M. G., Lamberti, C., Garcia-Moruno, E., Barello, C., et al. (2005). A proteomic approach to studying biogenic amine producing lactic acid bacteria. *Proteomics*, 5, 687–698.
- Rinas, U., & Hoffman, F. (2004). Selective leakage of host-cell proteins during high-cell-density cultivation of recombinant and non-recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, 20, 679–687.
- Saier, M. J., Jr. (2006). Protein secretion systems in gram-negative bacteria. *Microbe*, 1, 414–419.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring harbor Laboratory.
- Schaumburg, J., Diekmann, O., Hagendorf, P., Bergmann, S., Rodhe, M., Hammerschmidt, S., et al. (2004). The cell wall proteome of *Listeria monocytogenes*. *Proteomics*, 4, 2991–3006.
- Seifert, K. N., McArthur, W. P., Bleiweis, A. S., & Brady, J. (2003). Characterization of group B streptococcal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Surface localization, enzymatic activity, and protein–protein interactions. *Canadian Journal of Microbiology*, 49, 350–356.
- Sha, J., Galindo, C. L., Pancholi, V., Popov, V. L., Zhao, Y., Houston, C. W., et al. (2003). Differential expression of the enolase gene under in vivo versus in vitro growth conditions of *Aeromonas hydrophila*. *Microbial Pathogenesis*, 34, 195–204.
- Wai, S. N., Lindmark, B., Söderblom, T., Takade, A., Westermark, M., Oscarsson, J., et al. (2003). Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell*, 115, 25–35.
- Wilkins, J. C., Beighton, D., & Homer, K. A. (2003). Effect of acidic pH on expression of surface-associated proteins of *streptococcus oralis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 5290–5296.
- Winram, S. B., & Lottenberg, R. (1998). Site-directed mutagenesis of streptococcal plasmin receptor protein (Plr) identifies the C-terminal Lys334 as essential for plasmin binding, but mutation of the *plr* gene does not reduce plasmin binding to group A streptococci. *Microbiology*, 144, 2025–2035.
- Wolf, C., Nisan, I., Hanski, E., Frankel, G., & Rosenshine, I. (1998). Protein translocation into host epithelial cells by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 28, 143–155.

NAD⁺-dependent post-translational modification of *Escherichia coli* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Laura Aguilera, Rosa Giménez, Josefa Badia, Juan Aguilar, Laura Baldoma*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biomedicine of the University of Barcelona (IBUB),
Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Received 21 April 2009 · Accepted 20 August 2009

Summary. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a multifunctional housekeeping protein reported to be a target of several covalent modifications in many organisms. In a previous study, enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* strains were shown to secrete GAPDH and the protein to bind human plasminogen and fibrinogen. Here we report that GAPDH of these pathogens is ADP-ribosylated either in the cytoplasm or in the extracellular medium. GAPDH catalyzes its own modification, which involves Cys-149 at the active site. ADP-ribosylation of extracellular GAPDH may play an important role in the host-pathogen interaction, as also proposed in other pathogens. [Int Microbiol 2009; 12(3):187-192]

Keywords: *Escherichia coli* · glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) · secreted proteins · ADP-ribosylation · covalent modification of proteins

Introduction

Several cytoplasmic housekeeping enzymes with no detectable secretion and retention signal are present on the surface of microbial pathogens, where they perform functions related to the adhesion and/or virulence of the pathogen [13]. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; EC 1.2.1.12) is among these secreted proteins that interact with different host components [14,19]. In gram-negative bacteria, the extracellular location of GAPDH in enterohemor-

rhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* strains was reported by our group [5]. This protein is secreted into the medium in a soluble and active form and is also found on the cell surface of these pathogens. *Escherichia coli* GAPDH binds human plasminogen and fibrinogen and remains associated with colon epithelial Caco-2 cells after the adhesion of EHEC or EPEC [5].

In many organisms GAPDH can be a target of several covalent modifications including glutathionylation, S-nitrosylation, binding of nitrated fatty acids, phosphorylation, and ADP-ribosylation [2-4,16]. Most of these modifications are linked to oxidative stress responses and may be crucial for proper adaptation to conditions of oxygen stress [3,16,17]. ADP-ribosylation is a reversible, post-translational, covalent modification of proteins in which the ADP-ribose moiety of NAD⁺ is enzymatically transferred to specific amino acid residues (His, Arg, or Cys) of the target protein, with the subsequent release of nicotinamide [7,10,20]. This modification

*Corresponding author: L. Baldomà
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona
Av. Diagonal, 643
08028 Barcelona, Spain
Tel. +34-934034496. Fax: 34-934024520
E-mail: lbaldoma@ub.edu

regulates protein function and affects many biological processes. For instance, in *Entamoeba histolytica* or group A streptococci ADP-ribosylation of secreted GAPDH has been implicated in the interaction of these pathogens with the host [1,15]. Here, we provide the first report of covalent modification of GAPDH by ADP-ribosylation in gram-negative bacteria.

Materials and methods

Growth conditions. Bacterial cells were routinely grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) broth. The *gapA* mutant strain W3CG was grown in minimal medium supplemented with malate and glycerol as the carbon source [6]. Where indicated, cells were grown without shaking at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco) in a CO₂ incubator. Growth was monitored by measuring the optical density at 600 nm (OD₆₀₀). When required tetracycline (12.5 µg/ml) or ampicillin (100 µg/ml) was added to the medium.

Preparation of cell extracts and isolation of secreted proteins in culture medium. Overnight cultures in LB were diluted 1:50 in the indicated culture media and incubated without shaking at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The bacteria were collected by centrifugation (5000 ×g, 10 min, 4°C) and resuspended in appropriate buffer. After sonic disruption on ice, cell debris was removed by centrifugation at 16,000 ×g for 30 min at 4°C. The protein concentration of the cell extract was determined by the method of Lowry [11]. Secreted proteins were isolated by filtering the culture supernatant through a 0.22-µm pore size filter (Millipore), and the proteins in the filtrate were precipitated by incubation on ice for at least 1 h with 10% trichloroacetic acid (TCA). The protein pellet was washed in 90% (v/v) ice-cold acetone, air-dried, and suspended in loading buffer before being resolved by SDS-PAGE [8]. For ADP-ribosylation assays, the secreted proteins were concentrated from 100 ml of the filtrated supernatant by 95% ammonium sulfate precipitation. The protein pellets were resuspended in 0.5 ml of 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 1 mM dithiothreitol (DTT) and then dialyzed overnight against the same buffer.

Purification of recombinant GAPDH. Recombinant GAPDH was expressed and purified using the glutathione-S-transferase (GST) gene fusion system with recognition sites for factor Xa cleavage, as described in detail previously [5].

ADP-ribosylation assays. The ADP-ribosylation reaction mixtures (100 µl) contained: 100 mM Tris-HCl, (pH 7.5), 1 mM DTT, 0.5 mM ATP, 2 mM MgCl₂, 80 µM E-64, 2 µM NAD⁺ plus 2 µCi [³²P]NAD⁺ (51 mCi/mmol), and protein sample (75 µg secreted proteins or 200 µg cell extracts) as the source of both enzyme and substrate(s). When indicated, reactions were done with 10 µg of purified recombinant GAPDH. In some experiments, 100 µM non-radioactive NAD⁺ or 100 µM non-radioactive ADP-ribose was added as putative competitor. The effect of HgCl₂ or hydroxylamine (pH 7.4) on NAD⁺-dependent modification was determined by incorporating these reagents at concentrations up to 5 mM into the reaction buffer prior to the addition of [³²P]NAD⁺. ADP-ribosylation reactions were incubated for 1 h at 37°C followed by the addition of 25 µl of 4× SDS-loading buffer to stop the reaction. The samples were heated to 70°C for 20 min and subjected to 12% SDS-PAGE [8]. The gel was dried and autoradiographed at -80°C.

Western blot. Western blot analysis using specific antibodies against *E. coli* GAPDH was carried out as described previously [5].

Two-dimensional gel electrophoresis. 2D gel electrophoresis was performed using the Protean IEF-Cell (Bio-Rad). Appropriate volumes of protein samples were diluted in 125 µl of rehydration buffer (9 M urea, 4% CHAPS, 50 mM DTT, 0.5% immobilized pH gradient buffer, and traces of bromophenol blue). Isoelectric focusing was carried out in immobilized pH 5–8 gradient strips (BioRad). Second-dimension SDS-PAGE was done on 12.5% acrylamide gels.

Mass spectrometry of proteins. Following SDS-PAGE [8], the gels were stained and the protein bands of interest excised and digested with trypsin (Sequencing grade modified, Promega) in the automatic Investigator ProGest robot of Genomic Solutions. Peptides released from the gel were analyzed by combined liquid chromatography/tandem mass spectrometry (Cap-LC-nano-ESI-Q-TOF) (CapLC, Micromass-Waters) at the Scientific-Technical Services of the University of Barcelona. Data were generated in PKL file format, which were submitted for database searching in the MASCOT server.

DNA manipulation and site-directed mutagenesis. DNA manipulations in vitro were carried out according to standard protocols [18]. Site-directed mutagenesis was done using the QuickChange PCR-based mutagenesis procedure (Stratagene) with pGEX-GapA [5] as the template. The primers used to construct the GAPDH C149A mutant were *gapdh*-mut1-fw (5'-GTTTCCAACGCTTCCGCTACCACCAACTGCCTG-3') and *gapdh*-mut2-rv (5'-CAGGCAGTTGGTGGTAGCGGAAGCGTTGGAA AC-3'). To construct C153A, the mutant primers were *gapdh*-mut2-fw (5'-CCTGCA CCACCAACGCTCTGGCTCC GCTGGC-3') and *gapdh*-mut2-rv (5'-GCC AGCGGAGCCAGAGCGTTGGTGGT GCAGG-3'), and for C288A mutant, *gapdh*-mut3-fw (5'-GATTCAACGGCGAAGTTGCTACTCCG TGTTTCG-3') and *gapdh*-mut3-rv (5'-CGAACACGGGAAGTAGCAACTTC GCCGTTG AAATC-3'). The mutated codons are underlined. The appropriate substitutions and the absence of mutations were confirmed by sequencing the inserts in both directions.

Results and Discussion

Identification of GAPDH as an ADP-ribosylated protein in *Escherichia coli*. To identify secreted proteins that could be ADP-ribosylated in EHEC or EPEC strains, cell-free supernatants of EHEC strain 86-24h11 or EPEC strain E2348/69 [5] grown in DMEM were concentrated by ammonium sulfate precipitation. These samples were incubated under ADP-ribosylation conditions and processed as described in Materials and methods. Two protein bands, of 35 and 72 kDa, were radiolabeled in these conditions (Fig. 1A, lanes 1 and 4). The presence of non-radioactive NAD⁺ inhibited the labeling of both proteins (Fig. 1A, lanes 2 and 5) whereas non-radioactive ADP-ribose did not modify the ADP-ribosylation signal (Fig. 1A, lanes 3 and 6). These results indicate that the covalent modification of both proteins depends on NAD⁺.

The same 35 and 72 kDa protein bands were visualized when the ADP-ribosylation reactions were carried out with cell extracts of EHEC, indicating that these proteins are also modified in the intracellular medium (Fig. 1B). The fact that these results hold true for cell extracts of the non-pathogenic

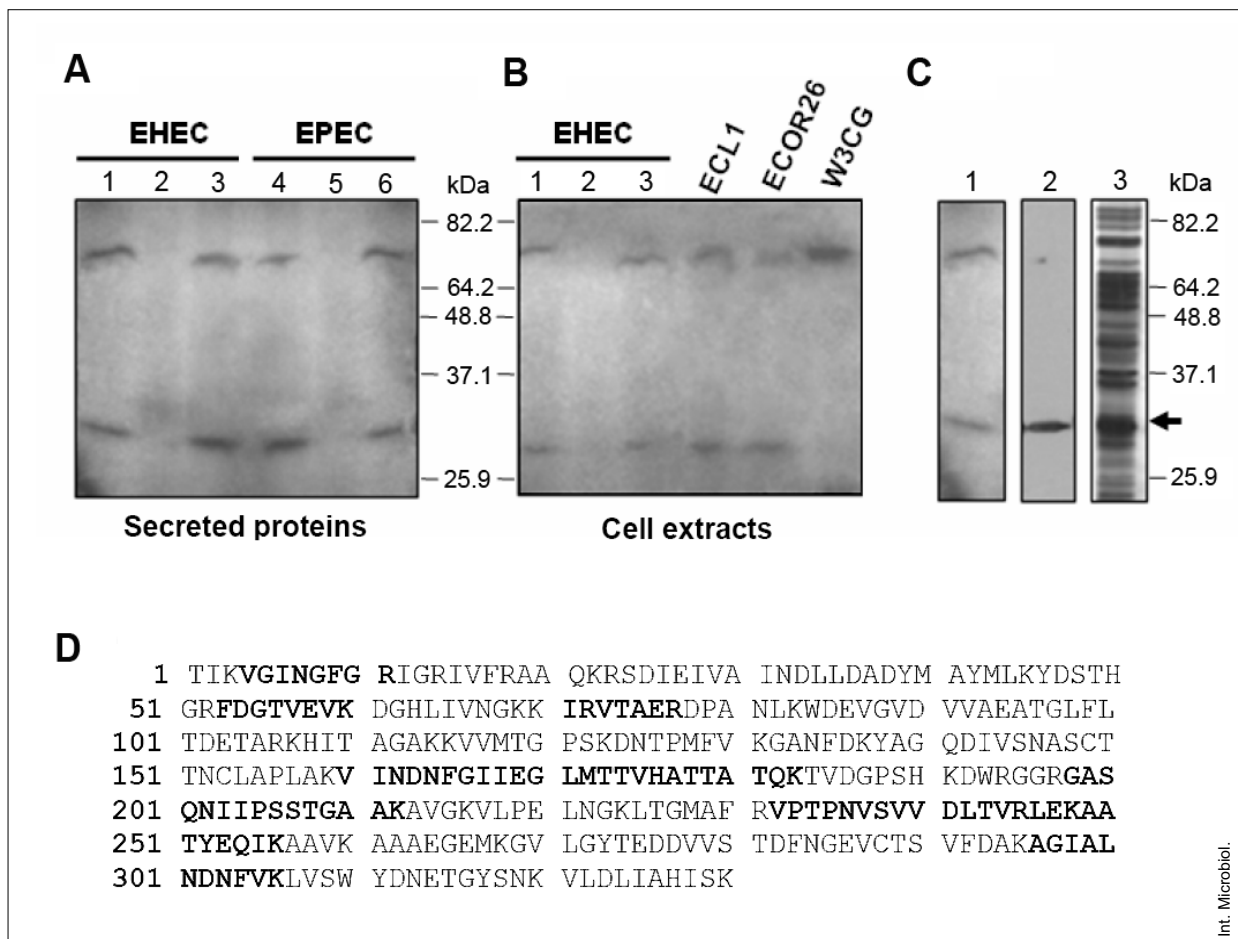


Fig. 1. ADP-ribosylation of *E. coli* proteins. (A) Autoradiograph of ADP-ribosylation reactions carried out with the secreted protein fraction of EHEC or EPEC strains following the standard protocol (lanes 1 and 4) or in the presence of a 50-fold molar excess of non-radioactive NAD^+ (lanes 2 and 5) or ADP-ribose (lanes 3 and 6) as competitors. (B) Autoradiograph of ADP-ribosylation reactions done with cell extracts of the indicated strains. EHEC reactions were also performed in the presence of a 50-fold molar excess of non-radioactive NAD^+ (lane 2) or ADP-ribose (lane 3). (C) ADP-ribosylated secreted protein samples of EHEC were analyzed by autoradiography (lane 1), by Western blotting with anti-GAPDH specific antibodies (lane 2), or by silver staining (lane 3). The arrow indicates the 35-kDa protein band identified by mass spectrometry as *gapA*-encoded GAPDH. (D) The peptides identified by mass spectrometry are indicated in bold over the GAPDH amino acid sequence.

strains ECL1 [9] and EcoR26 [12] suggested that this modification affects proteins expressed in all *E. coli* strains (Fig. 1B). In all experiments done with cell extracts, the labeled proteins appeared as fainter bands, which can be attributed to the presence of intracellular ADP-ribosylhydrolases, as described in other prokaryotes [15]. Likewise, when EHEC-secreted protein samples were incubated at 37°C with the corresponding cytoplasmic fraction in [^{32}P]ADP-ribosylation reaction mixtures, the radioactivity incorporated into the 35 and 72 kDa proteins was significantly reduced (not shown). This suggests that in vivo NAD^+ -dependent modification of these proteins can be blunted by intracellular factors.

The finding that the labeled 35 kDa protein was absent in cell extracts of the *gapA* mutant strain W3CG [6] suggested

that GAPDH was one of the protein targets of post-translational modification by NAD^+ (Fig. 1B). This was further supported by the results of Western blot analysis of ADP-ribosylation reactions carried out with cell-free supernatants of EHEC. A 35-kDa protein band coincident with that labeled in the presence of [^{32}P]NAD $^+$ was detected with specific antibodies against GAPDH (Fig. 1C, lane 2). To confirm the identity of the 35-kDa protein as GAPDH, non-radioactive ADP-ribosylation samples were electrophoresed in parallel and the protein band coincident with the radioactive signal was excised from a silver-stained duplicate gel (Fig. 1C, lane 3), digested with trypsin, and analyzed by mass spectrometry. This allowed the identification of several peptides belonging all to *E. coli* GAPDH (Fig. 1D).

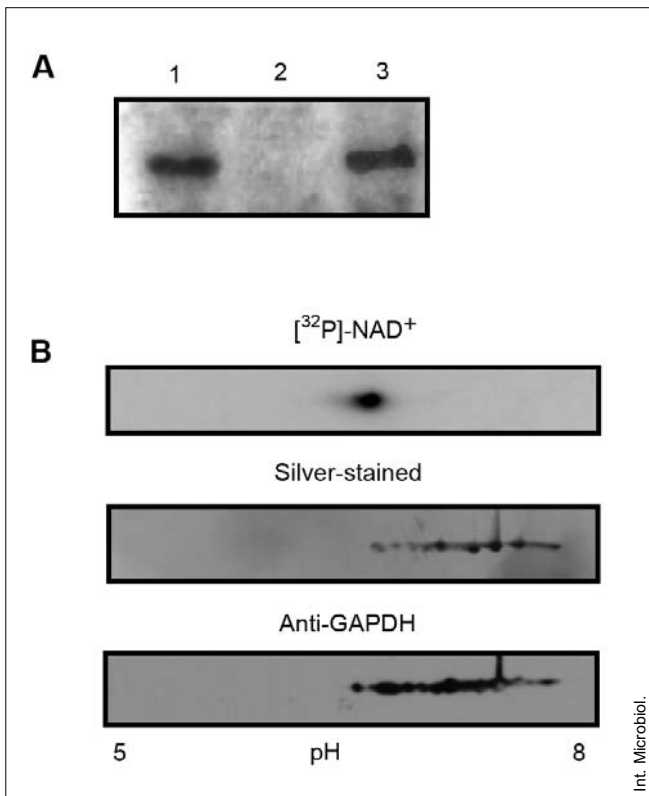


Fig. 2. ADP-ribosylation of recombinant GAPDH. (A) Autoradiograph of ADP-ribosylation reactions done with purified *E. coli* GAPDH following the standard protocol (lane 1) or in the presence of a 50-fold molar excess of non-radioactive NAD^+ (lane 2) or ADP-ribose (lane 3). (B) Two-dimensional gel analysis of ADP-ribosylated GAPDH. Gels were processed for autoradiography (upper strip), silver staining (middle strip) or Western blotting with specific anti-GAPDH antibodies (bottom strip).

To examine whether *E. coli* GAPDH is able to promote its own modification, as described for the GAPDH of other organisms [15], recombinant GAPDH was incubated with $[\text{}^{32}\text{P}]\text{NAD}^+$ under ADP-ribosylation conditions. As shown in Fig. 2A, the purified enzyme showed radioactive labeling, which clearly diminished in the presence of non-radioactive NAD^+ . In a previous study, the results of two-dimensional (2D) gel electrophoresis analysis of recombinant GAPDH showed that there are multiple forms of GAPDH which differ in their pI [5]. Here, a similar 2D-analysis was done with GAPDH incubated under ADP-ribosylation conditions. The gels were dried and either autoradiographed at -80°C or processed for anti-GAPDH Western blotting. Parallel gels were silver-stained to visualize total protein. Results of this 2D analysis showed that the ADP-ribosylated form corresponded to a minor spot displaying the lowest pI (Fig. 2B).

Identification of Cys-149 as the amino acid acceptor of the NAD^+ -dependent modification.

In an attempt to identify which residue was modified by NAD^+ , ADP-ribosylation reactions were carried out in the presence of increasing concentrations (0–5 mM) of hydroxylamine (which inhibits Arg-specific ADP-ribosylation), or HgCl_2 (which inhibits Cys-specific ADP-ribosylation) [15]. The presence of hydroxylamine did not affect the radioactivity

incorporated into recombinant GAPDH, whereas HgCl_2 inhibited ^{32}P -incorporation in a dose-dependent manner (Fig. 3A). The same result was obtained when the secreted protein fraction was used as a substrate in the ADP-ribosylation reaction (not shown). These results suggest that the NAD^+ -dependent modification of *E. coli* GAPDH occurred through a thiol linkage to a Cys residue. To test this hypothesis, competitive inhibition of GAPDH ADP-ribosylation was carried out in the presence of an excess of free L-Cys, L-Arg or L-His, which are ADP-ribose acceptors. Consistently, GAPDH labeling in the presence of $[\text{}^{32}\text{P}]\text{NAD}^+$ was only inhibited by L-Cys and this inhibition was dose-dependent (Fig. 3B). Inhibition by L-Cys was also observed with the secreted protein (not shown).

There are three Cys residues in *E. coli* GAPDH, Cys-149, Cys-153, and Cys-288. To identify which of these residues was the target of the NAD^+ -dependent modification, each Cys residue was changed to Ala. The mutated proteins were expressed and purified as described for the wild-type protein [5] and then incubated with $[\text{}^{32}\text{P}]\text{NAD}^+$ under ADP-ribosylation conditions. Mutations C153A or C288A did not impair radioactive incorporation into the protein, whereas mutation C149A abolished NAD^+ -dependent labeling (Fig. 3C). These results clearly pointed to the active-site Cys-149 as the target residue of this modification.

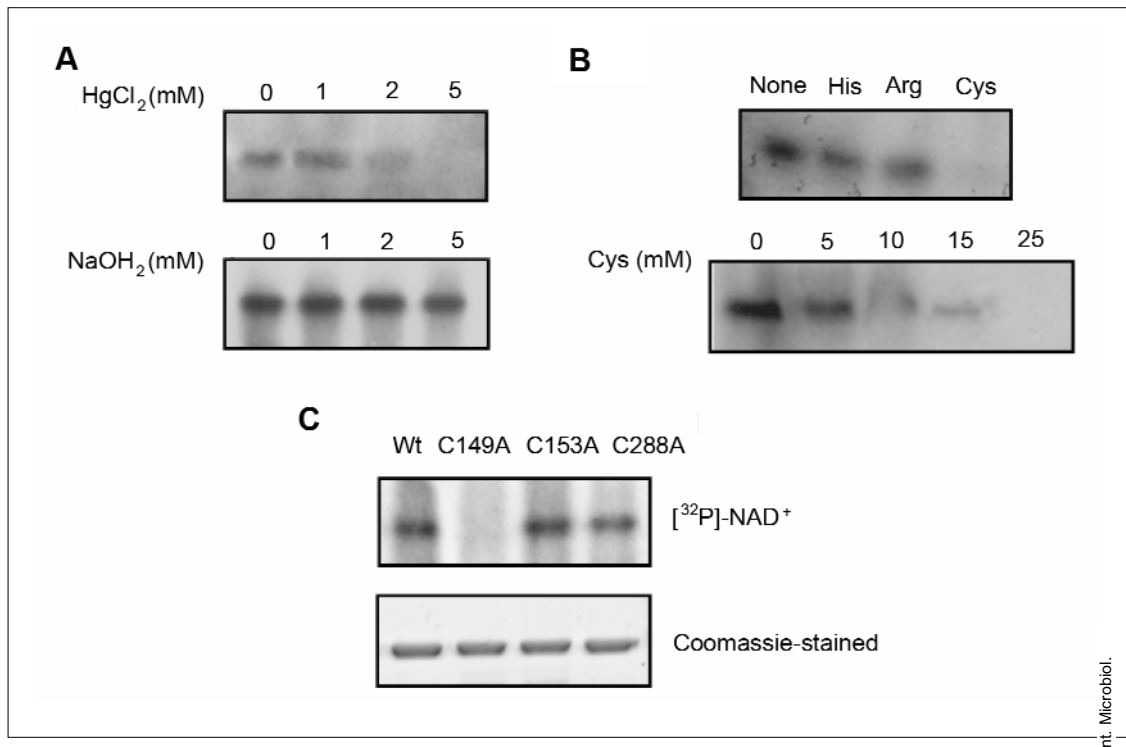


Fig. 3. Identification of the GAPDH amino acid residue modified under ADP-ribosylation conditions. (A) Autoradiograph showing the effect of increasing concentrations of HgCl₂ or hydroxylamine on ADP-ribosylation of purified GAPDH. (B) Autoradiograph of ADP-ribosylation reactions carried out with purified GAPDH in the absence or in the presence of 25 mM His, Arg, or Cys (upper strip), or in the presence of the indicated Cys concentrations (bottom strip). (C) Autoradiography and Coomassie blue staining of ADP-ribosylation reactions carried out with purified wild-type GAPDH (WT) or the indicated GAPDH mutants.

Since ADP-ribosylation is involved in signal transduction events, our results point to additional roles for extracellular GAPDH in the interaction of EHEC and EPEC strains with the host, as proposed for other pathogens [1,15]. Moreover, since this reversible NAD⁺-dependent modification also takes place in the cytoplasm of pathogenic and non-pathogenic *E. coli* strains, GAPDH may also play a regulatory role within *E. coli* cells under physiological conditions.

Acknowledgements. This study was supported by grant BFU 2007-63090 / BMC from the Spanish Ministry of Science and Education (MEC). L.A. was a recipient of a predoctoral fellowship from the MEC. We thank Michael S. Donnenberg for providing strains EHEC86-24h11 and EPEC E2348/69 and Andreas Plückthun for strain W3CG.

References

- Alvarez AH, Martinez-Cadena G, Silva ME, Saavedra E, Avila EE (2007) *Entamoeba histolytica*: ADP-ribosylation of secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Exp Parasitol* 117:349-356
- Batthyany C, Schopfer FJ, Baker PR, et al. (2006) Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids in vivo. *J Biol Chem* 281:20450-20463
- Colussi C, Albertini MC, Coppola S, Rovidati S, Galli F, Ghibelli L (2000) H₂O₂-induced block of glycolysis as an active ADP-ribosylation reaction protecting cells from apoptosis. *FASEB J* 14:2266-2276
- Eaton P, Wright N, Hearse DJ, Shattock MJ (2002) Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase oxidation during cardiac ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 34:1549-1560
- Egea L, Aguilera L, Giménez R, Sorolla MA, Aguilar J, Badía J, Baldoma L (2007) Role of secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the infection mechanism of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: interaction of the extracellular enzyme with human plasminogen and fibrinogen. *Int J Biochem Cell Biol* 39:1190-1203
- Ganter C, Plückthun A (1990) Glycine to alanine substitutions in helices of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: effects on stability. *Biochemistry* 29:9395-9402
- Koch-Nolte F, Kerstock S, Mueller-Dieckmann C, Weiss MS, Haag F (2008) Mammalian ADP-ribosyltransferases and ADP-ribosylhydrolases. *Frontiers in Bioscience* 13:6716-6729
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 222:680-685
- Lin ECC (1976) Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 30:535-578
- Lin H (2007) Nicotinamide adenine dinucleotide: beyond a redox coenzyme. *Org Biomol Chem* 5:2541-2554
- Lowry OH., Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-273
- Ochman H, Selander RK (1984) Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol* 157:690-693

13. Pancholi V, Chhatwal GS (2003) Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. *Int J Med Microbiol* 293:391-401
14. Pancholi V, Fischetti VA (1992) A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with multiple binding activity. *J Exp Med* 176:415-426
15. Pancholi V, Fischetti VA (1993) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on the surface of group A streptococci is also an ADP-ribosylating enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8154-8158
16. Reverter-Branchat G, Cabisco E, Tamarit J, Ros J (2004) Oxidative damage to specific proteins in replicative and chronological-aged *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279:31983-31989
17. Roca I, Ballana E, Panosa A, Torrents E, Gibert I (2008) Fumarate and nitrate reduction (FNR) dependent activation of the *Escherichia coli* anaerobic ribonucleotide reductase *nrdDG* promoter. *Int Microbiol* 11:49-56
18. Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
19. Schaumburg J, Diekmann O, Hagendorf P, et al. (2004) The cell wall proteome of *Listeria monocytogenes*. *Proteomics* 4:2991-3006
20. Ueda K, Hayashi O (1985) ADP-ribosylation. *Annu Rev Biochem* 54:73-100

