



Asignación de nuevas funciones a la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en *E. coli*

Elaine Ferreira Melo

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.



FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**ASIGNACIÓN DE NUEVAS FUNCIONES A LA ENZIMA
GLICERALDEHÍDO-3-FOSFATO DESHIDROGENASA
EN *E. coli***

ELAINE FERREIRA MELO

2012



FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

**ASIGNACIÓN DE NUEVAS FUNCIONES A LA ENZIMA
GLICERALDEHÍDO-3-FOSFATO DESHIDROGENASA
EN *E. coli***

Memoria presentada por Elaine Ferreira Melo para optar al grado de
doctor por la Universidad de Barcelona

Esta tesis doctoral ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Laura
Baldomà Llavínés y la Dra. Rosa Giménez Claudio

Dra. Laura Baldomà Llavínés

Dra. Rosa Giménez Claudio

Elaine Ferreira Melo

ELAINE FERREIRA MELO

2012

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis doctoral no sería posible si no fuera por la colaboración de muchas personas a las cuales me gustaría darles mis más sinceras gracias.

A la Dra. Laura Baldomà Llavínés y a la Dra. Rosa Giménez Claudio, directoras de esta tesis doctoral, por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo en vuestro grupo y principalmente por haberme ayudado a ampliar mis conocimientos en el área de la investigación.

A la Dra. Josefa Badía por ayudarme en la corrección de esta tesis doctoral aportando siempre una visión más práctica y por estar siempre dispuesta a resolver los problemas cotidianos.

Al Dr. Juan Aguilar por colaborar atentamente en la revisión de las publicaciones realizadas por el grupo.

A Laura Baldomà por tu ayuda incondicional en la realización de este trabajo, por haber contribuido en el diseño de todos los experimentos y sobretodo por haber dedicado muchas horas de tu tiempo libre en la corrección de esta tesis.

A Rosa aunque por mucho que la palabra “gracias” tenga un gran significado es insuficiente para agradecer y expresar lo importante que tú has sido para mí. Tú has sido esencial en la realización de este trabajo no sólo por haber aportado tus conocimientos sino también por haberme prestado tu tiempo y tus manos para ayudarme en la “poyata” por innumerables veces. Gracias por haber sido no sólo mi jefa pero también mi amiga, compartiendo experiencias y consejos que tanto me han ayudado a superar muchos momentos de dificultades en el discurrir de estos años. Sin mencionar lo mucho que me has alegrado el día con tus historias. De hecho la que más me gusta es la del alambre en los zapatos. Eres muy grande Rosa y me has enseñado que para ser grande sólo hace falta hacer lo que se quiere. Te llevaré siempre en mi corazón. ¡Muchísimas gracias por todo!

A todas las “colis” por todos los buenos momentos y experiencias compartidas. A Laura “La Pequeña” por tu buena voluntad en ayudarme, por aportar a mis locuras momentos de sensatez y por siempre haber venido a trabajar con buen humor, haciendo con que los días fueran mucho más agradables. A Karla “My Little Mex” por haberme escuchado y dado tu apoyo siempre que lo necesité. Eres una luchadora nata y estoy segura que conseguirás todo lo que desees. A Lorena mi “Lore Lore Macu Macu” por tus ganas de ayudar, por tu alegría contagiosa, que cautiva a todo mundo, y principalmente por tu amistad dentro y fuera del laboratorio. Os quiero y os echaré muchísimo de menos.

A los antiguos compañeros Eva, Fernando y Lucía, a pesar del poco tiempo de convivencia en el laboratorio, habéis aportado algo positivo a mi trabajo.

A los alumnos de Máster, Erasmus, entre otros, Arely, Regina, Ana, Queral, Cristina, Tomás, Susanna, Sabina, Marc, Alessandro y Mirian, no sólo por haber escogido nuestro laboratorio para ampliar sus conocimientos sino también por darme la oportunidad de aprender a enseñar.

A los compañeros de los demás grupos por siempre haberme proporcionado no sólo apoyo moral como apoyo material. Sin ellos, algunos de los experimentos habrían tardado más de lo necesario.

A los técnicos del departamento Silvia, Andrés y Quim, por vuestra importante labor en el mantenimiento del buen funcionamiento de todos los equipos del departamento y preparación de todos los materiales para las clases prácticas. Además, aunque parezca raro, tengo que agradecer a Andrés por siempre meterse conmigo y hacer mis mañanas más divertidas.

A Vero y a Ciudad por la cercanía y cariño con el cual siempre me habéis tratado.

A las secretarias del departamento por vuestra ayuda con la burocracia.

A toda mi familia de Bilbao por siempre estar animándome a seguir adelante demostrando lo orgullosos que están de mi. Ezkerrik asko.

A minha família brasileira, principalmente aos meus pais, por ter acreditado em mim, por ter dado o apoio necessário para que eu pudesse alcançar este objetivo e sobretudo por ter me ensinado que a honestidade, o trabalho e o esforço sempre são recompensados. Muito obrigada!

A mi Rober, que ha sido una de las personas que más apoyo me ha dado en la realización de esta tesis. Gracias mi amor, por tu paciencia, comprensión, cariño y principalmente por su apoyo incondicional en mis decisiones. Sin ti no habría llegado hasta aquí. ¡Te quiero!

PRESENTACIÓN

En la actualidad y desde una perspectiva de biología de sistemas, la identificación de interacciones proteína-proteína en las células resulta de gran importancia para entender los procesos biológicos a nivel molecular. Así, cada vez tiene mayor importancia el estudio de las proteínas, no de manera individual sino a través de las interacciones que establecen con otras proteínas o biomoléculas ya que estas asociaciones son fundamentales para el desarrollo de las funciones celulares. Este enfoque permite entender a nivel molecular situaciones fisiológicas y/o patológicas que son derivadas de la ausencia o alteración de algunas proteínas o sus interacciones. En este sentido, una parte importante de este trabajo está orientada a la aplicación de metodologías que permiten identificar y evaluar interacciones proteína-proteína para asignar nuevas funciones a la enzima gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) en *E. coli*.

Estudios realizados en varios organismos muestran que GAPDH es una proteína multifuncional, capaz de ejercer diferentes funciones según su localización subcelular, estado oligomérico o interacciones con otras proteínas o ligandos (Jeffery, 2009; Sirover *et al.*, 2005). Existe un gran número de estudios que demuestran la implicación de GAPDH en diversos procesos celulares en mamíferos como transporte y fusión de membranas, ensamblaje de microtúbulos, regulación transcripcional, exporte de RNA, replicación y reparación de DNA y apoptosis entre otros.

En bacterias, las descripciones sobre funciones alternativas de GAPDH han estado asociadas hasta el presente con su localización extracelular en patógenos y probióticos. GAPDH es una de las proteínas *housekeeping* secretada y expuesta en la superficie de patógenos que participa en procesos de adhesión y virulencia (Pancholi y Chhatwal, 2003; Egea *et al.*, 2007). En probióticos, se ha propuesto que la proteína secretada contribuye a la colonización del tracto intestinal, siendo un mecanismo de competición frente a patógenos (Kinoshita *et al.*, 2008; Aguilera *et al.*, 2012). Estudios llevados a cabo por nuestro grupo han contribuido a establecer el mecanismo de secreción de GAPDH en cepas de *E. coli* enteropatógenas. En estos patógenos, GAPDH es secretada a través del sistema de secreción tipo III (T3SS) mediante su interacción con la chaperona CesT (Aguilera *et al.*, 2012). Cabe mencionar que en este estudio colaboré en la purificación de CesT y la aplicación de metodologías para el análisis de su interacción con GAPDH.

El objetivo de este trabajo es contribuir a la identificación de nuevas funciones de GAPDH en *E. coli* a nivel intracelular.

En primer lugar, se analizó la capacidad de GAPDH de actuar como regulador de la expresión génica, puesto que varios estudios sugerían que esta proteína podría estar involucrada en la regulación de determinados genes en bacterias (Boël *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2011). Se escogió como modelo para este estudio el gen *ndh* (codifica NADH deshidrogenasa 2) ya que GAPDH había sido identificada como una de las proteínas retenida al promotor de este gen en experimentos de purificación mediante el uso de *Dynabeads* (Green *et al.*, 1997). El análisis de la fusión de promotor $\phi(ndh-lacZ)$ llevado a cabo en esta tesis no mostró diferencias significativas en la expresión de este gen en cepas deficientes de GAPDH con respecto a la cepa parental. Además, los resultados obtenidos en ensayos de retardación de la movilidad electroforética (EMSA) indicaban que el complejo

de retardación formado no era específico de la interacción directa entre GAPDH y secuencias presentes en el promotor de *ndh*; más bien sugerían que su formación era debida a alguna proteína reguladora asociada a la preparación de GAPDH recombinante.

Este resultado nos llevó a plantear una nueva aproximación para explorar nuevas funciones de GAPDH a nivel intracelular, basada en la utilización de metodologías que permiten identificar y evaluar interacciones proteína-proteína. Mediante la metodología de *cross-linking in vivo* con formaldehído, seguida de inmunoprecipitación y análisis por espectrometría de masas de las proteínas unidas a GAPDH-V5 se identificaron varias proteínas implicadas en distintos procesos celulares. A través de ensayos de *Pull-down* seguidos de *Western Blot* se validó la interacción de GAPDH con EF-Tu, piruvato quinasa, triptofanasa, fosfoglicolato fosfatasa (PGPasa) y las subunidades α y β de la ATP sintasa. La diversidad de proteínas identificadas sugiere que GAPDH, a través de múltiples interacciones, podría estar participando o modulando procesos metabólicos, de transporte, síntesis de proteínas, obtención de energía y reparación de DNA.

En este punto nos interesó analizar la implicación de GAPDH en procesos de reparación del DNA, por dos motivos: (i) La interacción identificada con PGPasa, enzima involucrada en el metabolismo del 2-fosfoglicolato generado en la reparación del DNA dañado por bleomicina (BM) (Pellicer *et al.*, 2003); (ii) Diversos estudios asignan a GAPDH un papel en procesos de reparación del DNA en humanos (Sirover *et al.* 1999; Azam *et al.*, 2008). La primera evidencia sobre la participación de GAPDH en la formación de complejos moleculares implicados en reparación de DNA fue obtenida en la caracterización de la interacción entre PGPasa y GAPDH. Dicha interacción incrementa en células tratadas con BM y además depende de alguna modificación post-traducciona de GAPDH.

Para estudiar a nivel funcional la implicación de GAPDH en procesos de reparación del DNA se obtuvieron construcciones de RNA antisentido (asRNA) que permitían un silenciamiento condicionado del gen *gapA*. El análisis de la viabilidad de las células silenciadas frente al tratamiento con los compuestos genotóxicos BM, metilmetanosulfonato (MMS) y H_2O_2 , así como la cuantificación de centrosapurínicos/apirimidínicos (centros AP) generados en el DNA de modo espontáneo en un mutante *knockout* de *gapA* demostraron la implicación funcional de GAPDH en la reparación de centros AP en *E. coli*. Dicha función depende del estado reducido de la Cys catalítica. Ello nos llevó a analizar, mediante ensayos de *Pull-down* seguidos de *Western Blot*, la interacción de GAPDH con proteínas implicadas en los mecanismos de reparación de estas lesiones, activados frente al tratamiento con BM y MMS. Se ha evidenciado interacción de GAPDH con Endo IV, nucleasa involucrada en el sistema de reparación por escisión de bases (BER) y SSB (*single stranded DNA binding protein*), implicada en los procesos de recombinación homóloga y en la respuesta SOS. Por último, se evaluó la morfología de cepas deficientes en GAPDH (*knockout* y silenciadas), observándose en estas cepas la formación de filamentos en fase estacionaria. Esta morfología es compatible con una deficiente reparación de las lesiones generadas en el DNA durante el crecimiento. Los resultados de este trabajo permiten asignar función a GAPDH en procesos de reparación del DNA en *E. coli*. A través de su participación en complejos multiproteicos, GAPDH podría estar regulando la actividad de proteínas involucradas en la reparación del DNA como Endo IV.

ABREVIATURAS

β-ME	β-Mercaptoetanol
2D	Electroforesis bidimensional
Ada	O ⁶ -metilguanina-DNA-metiltransferasa
AlkA	3-metiladenina-DNA-glicosilasa II
AlkB	1-metiladenina-DNA-dioxigenasa
Amp	Ampicilina
ATP	Adenosíntrifosfato
AtpA	Atp sintasa subunidad alfa
AtpD	Atp sintasa subunidad beta
BACTH	<i>Bacterial Adenilate Cyclase Two Hybrid</i>
Bisacrilamida	N, N'-Metileno-bisacrilamida
BM	Bleomicina
BSA	Albúmina de suero bovino
CAP	Proteína activadora del catabolismo
cfu	Unidad formadora de colonias
Cm	Cloranfenicol
csp	Cantidad suficiente para
DNA pol	DNA polimerasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilendiaminotetracetato
EF-Tu	Factor de elongación Tu
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Endo IV	Endonucleasa IV
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
Exo III	Exonucleasa III
FA	Formaldehído
G3P	Gliceraldehído-3-fosfato
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GEB	Tampón de elución de glutatión
GST	Glutatión-S-transferasa
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
Kan	Kanamicina
Kb	Kilobase
kDa	kiloDalton
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
mA	Miliamperio
Maldi-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight</i>
MMS	Metilmetanosulfonato
MS	Espectrometría de masas
MT	Medio mínimo con baja concentración de fosfato
NAD⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
Ndh	NADH deshidrogenasa-2

NO	Ácido nítrico
o/n	<i>Overnight</i>
Ogt	O ⁶ -metilguanina-DNA-transferasa
OMP	Proteína de membrana externa
ONPG	<i>o</i> -Nitro-fenil-D-galactopiranosido
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pfu	Unidad formadora de calva de lisis
PGPasa	Fosfoglicolato fosfatasa
pI	Punto isoeléctrico
PK	Piruvato quinasa
PTasRNA	<i>Paired-termini asRNA</i>
PVDF	Polivinilidenofluoruro
RBS	<i>Ribosome binding site</i>
RHB	Tampón de rehidratación
RIPA	Tampón de lisis de células y tejidos
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico
SM	Medio mineral basal
SSB	<i>Single stranded DNA binding protein</i>
Tag	3-metiladenina-DNA-glicosilasa I
TBE	Tampón Tris-HCl, Borato y EDTA
TBS	Tampón Tris-salino
Tet	Tetraciclina
TCA	Ácido tricloroacético
TE	Tampón Tris-HCl, EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina
TFB	Tampón de transformación
Tm	Temperatura de hibridación
Tn	Transposón
TnaA	Triptofanasa
Tris	Tris (hidoximetil) aminometano
U	Unidad de actividad enzimática
V	Voltio
V5	Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr
W	Vatios
xg	Gravedades
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. PROTEÍNAS MULTIFUNCIONALES.....	1
1.2. GAPDH COMO PROTEÍNA MULTIFUNCIONAL.....	4
1.2.1. FUNCIONES DE GAPDH EN MAMÍFEROS	5
1.2.2. FUNCIONES DE GAPDH EN BACTERIAS.....	7
1.2.2.1. Funciones en el entorno extracelular	7
1.2.2.1.1. Mecanismos de secreción de GAPDH en <i>E. coli</i>	10
1.2.2.2. Funciones intracelulares	12
1.3. LESIONES GENERADAS EN EL DNA POR ACCIÓN DE AGENTES GENOTÓXICOS.....	14
1.3.1. POR ACCIÓN DE BLEOMICINA.....	14
1.3.2. POR ACCIÓN DE METILMETANOSULFONATO	16
1.4. MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL DNA EN <i>E. coli</i>.....	17
1.4.1. RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA	18
1.4.2. REPARACIÓN DIRECTA	19
1.4.3. SISTEMA DE ESCISIÓN DE BASES (BER).....	21
1.4.4. RESPUESTA SOS.....	23
OBJETIVOS.....	27

2. MATERIALES.....	31
2.1. CEPAS BACTERIANAS	31
2.2. VECTORES	32
2.3. OLIGONUCLEÓTIDOS.....	34
2.4. REACTIVOS Y KITS COMERCIALES	34
2.5. SOPORTE INFORMÁTICO	34
2.5.1. PROGRAMAS INFORMÁTICOS	34
2.5.2. BASES DE DATOS.....	35
3. MÉTODOS.....	39
3.1. METODOS MICROBIOLÓGICOS.....	39
3.1.1. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO BACTERIANO ...	39
3.1.1.2. Composición de los medios de cultivo.....	39
3.1.2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	41
3.1.2.1. Mediante TFB.....	41
3.1.2.2. Mediante CaCl ₂	42
3.1.3. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES POR CHOQUE TÉRMICO...	42
3.1.4. TRANSDUCCIÓN GENERALIZADA CON EL BACTERIÓFAGO P1.....	43
3.1.4.1. Preparación de un lisado P1.....	43
3.1.4.2. Transducción a genoma.....	44
3.2. ANÁLISIS Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	44
3.2.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES	44
3.2.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE LOWRY	45
3.2.3. PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS	45
3.2.3.1. Precipitación con sulfato de amonio	45

3.2.3.2. Precipitación con ácido tricloroacético (TCA)	46
3.2.3.3. Precipitación con acetona.....	46
3.2.4. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	47
3.2.5. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS FUSIONADAS A GST	47
3.2.5.1. Expresión.....	47
3.2.5.2. Purificación.....	48
3.2.6. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS FUSIONADAS A HIS ₆ -TAG....	49
3.2.6.1. Expresión.....	50
3.2.6.2. Purificación.....	51
3.2.7. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE GAPDH- V5-HIS ₆	52
3.2.7.1. Expresión.....	52
3.2.7.2. Purificación.....	53
3.2.8. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	54
3.2.8.1. Actividad gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.....	54
3.2.8.2. Actividad β-galactosidasa	54
3.2.9. PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-PGPasa MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.....	55
3.2.10. SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.....	56
3.2.10.1. Electroforesis monodimensional.....	56
3.2.10.2. Electroforesis bidimensional.....	58
3.2.11. ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	59
3.2.12. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE <i>WESTERN BLOT</i>	60
3.3. ANÁLISIS DE INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA.....	61
3.3.1. <i>CROSS-LINKING "IN VIVO"</i> CON FORMALDEHÍDO.....	61
3.3.2. DOBLE HÍBRIDO (<i>BACTERIAL ADENILATE CYCLASE TWO HYBRID SYSTEM</i>)	62
3.3.3. <i>FAR-WESTERN BLOT</i>	63

3.3.4. <i>PULL-DOWN</i>	64
3.3.5. INTERFEROMETRÍA DE BIOCAPA	64
3.4. DETERMINACIÓN DE NIVELES DE ATP	65
3.5. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA	66
3.5.1. TINCIÓN DE GRAM DE CÉLULAS BACTERIANAS	66
3.6. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DEL DNA	67
3.6.1. OBTENCIÓN DE DNA GENÓMICO.....	67
3.6.2. OBTENCIÓN DE DNA PLASMÍDICO.....	67
3.6.3. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DEL DNA	67
3.6.4. LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA	67
3.6.5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	68
3.6.6. OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA	69
3.6.7. SELECCIÓN DE CLONES RECOMBINANTES	70
3.6.8. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DEL DNA	70
3.6.9. RESOLUCIÓN Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA	70
3.6.9.1. Separación de fragmentos de DNA en geles de agarosa mediante electroforesis	70
3.6.9.2. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa	71
3.6.9.3. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de poliacrilamida.	71
3.6.9.4. Purificación de fragmentos de DNA obtenidos por PCR	72
3.6.10. CONSTRUCCIÓN DE MOLÉCULAS HÍBRIDAS DE DNA (OBTENCIÓN DE DNA RECOMBINANTE).....	73
3.7. CARACTERIZACIÓN DE PROMOTORES.....	73
3.7.1. FUSIÓN DE PROMOTORES AL GEN <i>lacZ</i>	73

3.8. ENSAYOS DE RETARDO DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA	75
3.8.1. MARCAJE DEL FRAGMENTO DE DNA UTILIZADO COMO SONDA	75
3.8.2. REACCIÓN DE UNIÓN DNA-PROTEÍNA.....	76
3.8.3. SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE LAS SONDAS Y LOS COMPLEJOS DE RETARDO	77
3.9. CUANTIFICACIÓN DE CENTROS ABÁSICOS (AP SITES).....	78
3.10. CONSTRUCCIÓN DE RNA ANTISENTIDO PARA EL GEN <i>gapA</i>.....	79
3.11. TRATAMIENTO DE CULTIVOS BACTERIANOS CON AGENTES GENOTÓXICOS.....	80
3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	80
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	83
4.1. ANÁLISIS DE GAPDH COMO REGULADOR DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>ndh</i> EN <i>E. coli</i>.....	83
4.1.1. ANÁLISIS <i>IN VIVO</i> DE LA EXPRESIÓN DE Φ (<i>ndh-lacZ</i>) EN MUTANTES DEFICIENTES EN GAPDH	83
4.1.2. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE GAPDH CON EL PROMOTOR DEL GEN <i>ndh</i>	85
4.2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON GAPDH EN <i>E. coli</i>.....	88
4.2.1. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON GAPDH MEDIANTE <i>CROSS-LINKING IN VIVO</i> CON FORMALDEHÍDO	88
4.2.1.1. <i>Cross-linking in vivo</i> con formaldehído.....	89
4.2.1.2. Purificación mediante inmunoafinidad de los complejos formados con GAPDH-V5	91

4.2.1.3. Identificación de las proteínas unidas a GAPDH-V5	92
4.2.2. PROTEÍNAS QUE INMUNOPRECIPITAN CON GAPDH EN AUSENCIA DE <i>CROSS-LINKING</i>	95
4.2.3. VALIDACIÓN POR OTRAS METODOLOGÍAS DE LAS INTERACCIONES IDENTIFICADAS	99
4.2.3.1. Sistema de doble híbrido basado en la reconstitución de la adenilato ciclase en <i>E. coli</i>	99
4.2.3.2. Ensayos de <i>Pull-down</i> con proteínas fusionadas a His ₆ - <i>tag</i>	105
4.2.3.2.1. Ensayos de <i>Pull-down</i> con proteínas inmovilizadas a resina de níquel y GAPDH purificada.....	105
4.2.3.2.2. Ensayos de <i>Pull-down</i> con proteínas inmovilizadas a resina de níquel y GAPDH nativa presente en extractos celulares....	108
4.2.4. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE GAPDH y PGPasa	111
4.2.4.1. Efecto de la bleomicina en la interacción entre GAPDH y PGPasa.....	113
4.3. ESTUDIO FUNCIONAL DE LA PARTICIPACIÓN DE GAPDH EN LOS PROCESOS DE REPARACIÓN DEL DNA EN <i>E. coli</i>	115
4.3.1. OBTENCIÓN DE RNA ANTISENTIDO PARA EL GEN <i>gapA</i>	115
4.3.1.1. Análisis de la respuesta de células silenciadas al tratamiento con agentes genotóxicos	120
4.3.2. DETERMINACIÓN DE CENTROS ABÁSICOS EN EL DNA EN CÉLULAS DEFICIENTES EN GAPDH	125
4.3.3. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ATP EN CÉLULAS DEFICIENTES EN GAPDH	128
4.3.4. ANÁLISIS MEDIANTE <i>PULL-DOWN</i> DE LA INTERACCIÓN DE GAPDH CON PROTEÍNAS QUE PARTICIPAN EN LOS SISTEMAS DE REPARACIÓN DEL DNA.....	129
4.3.5. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE MUTANTES DEFICIENTES EN GAPDH.....	136
4.4. INTERACCIÓN DE GAPDH CON LA CHAPERONA CesT DEL SISTEMA DE SECRECIÓN T3SS	140
4.5. APORTACIONES DE ESTE TRABAJO AL CARÁCTER MULTIFUNCIONAL DE GAPDH EN <i>E. coli</i>.....	145

5. CONCLUSIONES	153
------------------------------	------------

6. BIBLIOGRAFÍA.....	157
-----------------------------	------------

7. ANEXO.1: OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS COMO CEBADORES.....	175
---	------------

8. PUBLICACIONES.....	179
------------------------------	------------

Aguilera, L., Ferreira, E., Giménez, R., Fernández, F. J., Taulés, M., Aguilar, J., Vega, M. C., Badia, J., Baldomà, L. Secretion of the housekeeping protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by the LEE-encoded type III secretion system in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Int J Biochem Cell Biol.* 44(6):955-62 (2012).

Ferreira, E., Giménez, R., Aguilera, L., Guzmán, K., Aguilar, J., Badia, J., Baldomà, L. Protein interaction studies point to new functions for *Escherichia coli* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Research in Microbiology* (en proceso de revisión)

1

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PROTEÍNAS MULTIFUNCIONALES

El concepto de un gen – una proteína – una función resulta actualmente muy simple. Existen diferentes mecanismos a través de los cuales un gen puede codificar múltiples funciones, como por ejemplo el *splicing* alternativo del RNA en eucariotas. Sin embargo, existen también mecanismos que determinan la capacidad de una determinada proteína para llevar a cabo más de una función. Estas son las proteínas multifuncionales.

Entre las proteínas multifuncionales se encuentra un grupo especial constituido por las denominadas proteínas *moonlighting* en las que las diversas funciones están asociadas a una única cadena polipeptídica (Jeffery, 2009). Una característica general es que las distintas funciones de una proteína *moonlighting* no están relacionadas entre sí. Se postula que muchas de estas proteínas presentaban inicialmente una única función aunque con los procesos de evolución éstas fueron adquiriendo funciones adicionales. Cada día aumenta el número de proteínas identificadas como multifuncionales. Dentro de la clase de proteínas *moonlighting* no se incluyen proteínas en que las diferentes funciones resultan de la fusión de genes, proteínas de familias homólogas, variantes de empalme, o enzimas con actividad promiscua. Tampoco se incluyen proteínas que presenten la misma función en distintos tipos celulares o localización subcelular (Jeffery, 1999; Jeffery, 2003; Jeffery, 2009). Otro criterio importante para definir las proteínas *moonlighting* es la independencia de las distintas funciones, lo que significa que la inactivación de una de las funciones (ej. mutación) no suele afectar a la otra función y vice-versa (Huberts *et al.*, 2010).

Los primeros ejemplos de proteínas *moonlighting* fueron descritos en la década de los años 80, cuando se descubrió que ciertos cristalinos, proteínas estructurales presentes en la lente del ojo de los vertebrados, eran enzimas bien conocidas. Por ejemplo, el ϵ -cristalino de pato se trata de la enzima lactato deshidrogenasa (Hendriks *et al.*, 1988), mientras que el τ -cristalino de tortuga corresponde a la enzima de la glicólisis α -enolasa (Wistow *et al.*, 1988). No obstante, el concepto de multifuncionalidad no debe ser aplicado solamente a enzimas que presentan varias funciones sino también a otro tipo de proteínas como receptores, canales de membrana, chaperonas y proteínas ribosomales.

Se han propuesto diferentes vías o mecanismos a través de los cuales una proteína multifuncional o *moonlighting* puede ejercer las diferentes funciones. Así la función de la proteína puede variar de acuerdo con su localización subcelular, tipo celular, estado oligomérico, interacción con otras proteínas o macromoléculas, concentración celular de un ligando, sustrato, cofactor o producto (Figura 1.1).

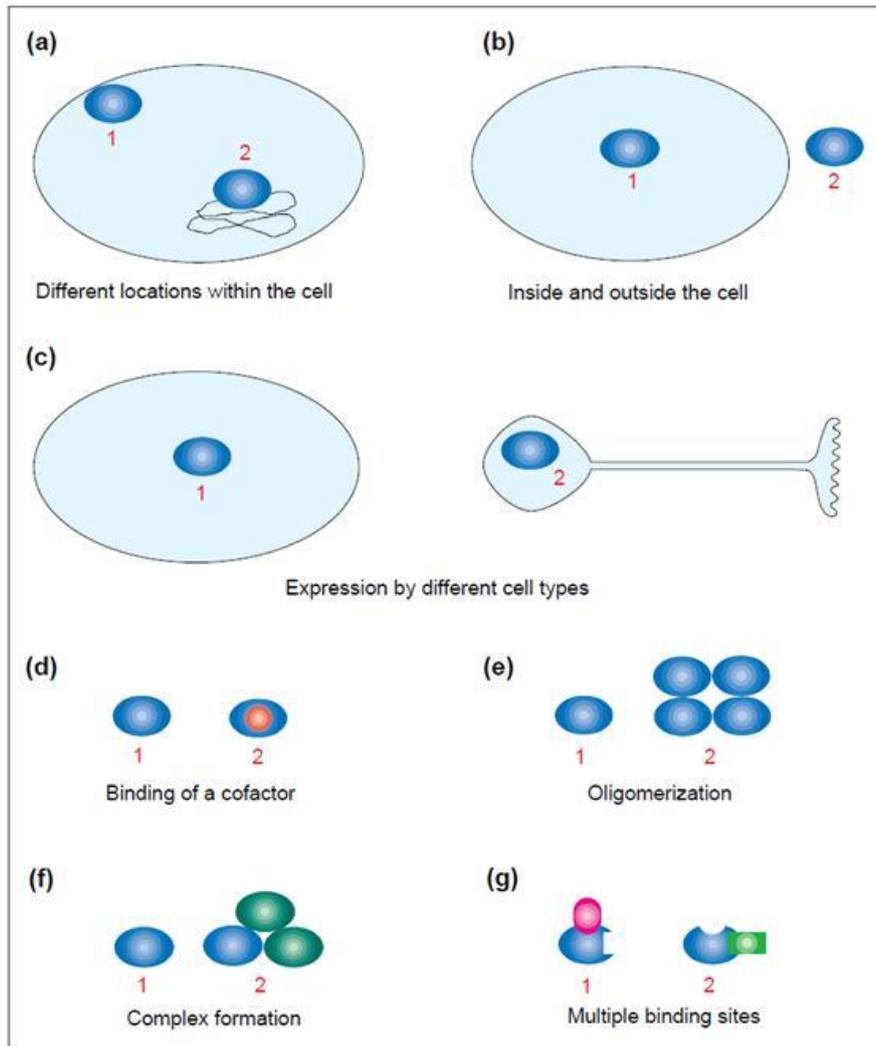


Figura 1.1. Ejemplos de mecanismos que modifican la función de proteínas multifuncionales. Las proteínas pueden tener diferentes funciones: **(a)** Según su localización intracelular (Ej. Cuando está unida a la membrana celular o al DNA). **(b)** Cuando son secretadas al medio. **(c)** Cuando son expresadas por diferentes tipos celulares. **(d)** Según estén unidas al sustrato, al producto o al cofactor. **(e)** Según si presentan una estructura monomérica o multimérica. **(f)** Cuando interaccionan con diferentes polipéptidos para formar distintos complejos proteicos. **(g)** Si presentan distintos sitios de unión para diferentes sustratos o ligandos. (Tomado de Jeffery, 1999)

La unión a una molécula, metabolito u otra proteína, o la asociación a un complejo multiprotéico puede inducir en estas proteínas un cambio en su función. Algunas proteínas *moonlighting* utilizan diferentes superficies de exposición para cada función. En la mayoría de los casos estas estrategias no son excluyentes, pudiendo estar implicadas una combinación de ellas. En este contexto, la resolución de la estructura tridimensional de las proteínas multifuncionales resulta de gran

importancia puesto que en muchos casos proporciona la clave sobre el mecanismo molecular relacionado con cada una de las funciones (revisado en Jeffery, 2009).

Como ejemplo de proteínas *moonlighting*, se destaca la proteína PutA de *E. coli* o de *Salmonella typhimurium*. Esta proteína, en ausencia de prolina permanece en el citoplasma donde actúa como represor transcripcional a través de su interacción con una secuencia de DNA específica en el promotor del operon *put*, manteniendo reprimida la expresión de este sistema génico implicado en la degradación de prolina. Sin embargo, cuando PutA interacciona con prolina, el cambio de conformación inducido lleva a la proteína a asociarse a la membrana plasmática donde a través de su actividad prolina deshidrogenasa y actividad pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa cataliza la degradación de este aminoácido (Ostrovsky de Spicer y Maloy, 1993). Otro ejemplo a destacar, es la enzima de la glicolisis gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) humana, que como tetrámero convierte gliceraldehído-3-fosfato en 1,3-bifosfoglicerato mientras que en forma de monómero presenta actividad uracil-DNA glicosilasa. Esta actividad es importante para eliminar el uracilo que está presente en el DNA debido al uso accidental de dUTP durante la síntesis del DNA o generado por desaminación de los residuos de citosina. El hecho de que GAPDH presente una forma oligomérica o monomérica depende de las concentraciones intracelulares de proteína, NAD⁺ y ATP (Meyer-Siegler *et al.*, 1991; Jeffery, 1999). Además esta enzima presenta múltiples funciones adicionales tal como se describe en INTRODUCCIÓN 1.2.

Muchas de las funciones desempeñadas por las proteínas pueden ser inferidas a partir de funciones conocidas de proteínas homólogas, sin embargo la existencia de proteínas *moonlighting* complica esta interpretación. Del mismo modo, la multifuncionalidad puede dificultar el análisis de resultados obtenidos de estudios proteómicos ya que la misma proteína puede presentar diferentes patrones de expresión o múltiples *partners* de interacción no relacionados entre si. Sin embargo, aproximaciones proteómicas a gran escala pueden ser de gran utilidad a la hora de identificar proteínas *moonlighting*. Así, la identificación de una proteína en un tipo celular no esperado o formando parte de un nuevo complejo multiprotéico puede sugerir una nueva función para esta proteína. Así por ejemplo, mediante una aproximación proteómica basada en *microarrays*, se identificó una nueva actividad de unión a DNA para la enzima Arg5,6 (N-acetil gamma-glutamil fosfato reductasa / acetilglutamato quinasa) de levadura implicada en la síntesis de ornitina (Jeffery, 2009). En un futuro inmediato estudios proteómicos de este tipo, que utilizan métodos de cribado masivo, se vislumbran como herramientas de gran potencial para identificar nuevas proteínas *moonlighting*.

La existencia de proteínas multifuncionales representa un beneficio para el organismo. Por una parte reduce el número de proteínas a sintetizar y en consecuencia la cantidad de DNA a replicar. En muchos casos la combinación de funciones proporciona un mecanismo para coordinar diversas funciones celulares,

como por ejemplo procesos metabólicos y vías de señalización, lo que permite a la célula responder a cambios en las condiciones ambientales o del entorno.

Tal como se ha comentado entre las proteínas multifuncionales descritas en los últimos tiempos destacamos la enzima GAPDH. Varios estudios realizados de modo independiente, en distintas especies y por diferentes metodologías encuentran GAPDH desempeñando funciones no relacionadas con la glicólisis.

1.2. GAPDH COMO PROTEÍNA MULTIFUNCIONAL

Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (E.C 1.2.1.12) es una enzima de expresión constitutiva que desempeña un papel importante en la vía glicolítica debido a su actividad catalítica en la síntesis del intermediario 1,3-bisfosfoglicerato. Esta enzima es considerada una proteína de tipo *housekeeping* que está presente en prácticamente todos los organismos, donde lleva a cabo funciones metabólicas esenciales para la supervivencia. Esta enzima se expresa incluso en organismos que carecen del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, aportando una actividad metabólica esencial para el crecimiento anaerobio o en condiciones de microaerofilia.

Aunque GAPDH muestre un papel esencial en los procesos de producción de energía, no puede ser considerada solamente como una proteína clásica de la vía glicolítica ya que varios estudios la describen como una proteína multifuncional involucrada en numerosos procesos biológicos tanto en microorganismos patógenos (Pancholi y Chhatwal, 2003), probióticos (Kinoshita *et al.*, 2008a; Kinoshita *et al.*, 2008b) como en mamíferos (revisado en Sirover, 2005; Sirover, 2011). De hecho, GAPDH puede ser considerada un modelo de proteína *moonlighting* porque presenta una gran variedad de funciones celulares debido a su capacidad de formar interacciones complejas. Además, su disfunción puede contribuir al desarrollo de importantes patologías humanas (Sirover 2011).

La diversidad funcional presentada por GAPDH, tal como se ha descrito anteriormente para proteínas *moonlighting*, depende de distintos factores como su localización subcelular, estado oligomérico, concentración intracelular de sustrato, cofactores o ligandos, así como de las interacciones que puede establecer con otras proteínas (Jeffery, 1999; Sirover, 2005; Sirover, 2011). En las células esta proteína se presenta mayoritariamente en forma de tetrámero compuesto de cuatro subunidades idénticas de 37kDa, siendo esta forma la que presenta actividad gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. En humanos GAPDH puede ser localizada en múltiples compartimentos celulares como la membrana plasmática, retículo endoplasmático, núcleo y citoplasma (Krynetski *et al.*, 2003).

Cabe considerar la gran diversidad de modificaciones post-traduccionales descritas para GAPDH que pueden también determinar su multifuncionalidad (Sirover, 2011). Entre estas modificaciones está su unión a glutation, S-nitrosilación, fosforilación, acetilación o ADP-ribosilación. Estas modificaciones dan lugar a diversas formas de la proteína que se diferencian en su pI, y por tanto pueden ser separadas a través de electroforesis bidimensional. La mayoría de estas modificaciones están asociadas a respuestas frente a situaciones de estrés y pueden tener importantes consecuencias fisiológicas y funcionales. Así por ejemplo se ha descrito que GAPDH puede ser diana de glutationilación en la isquemia cardiaca (Eaton *et al.*, 2002). En bacterias, levaduras y mamíferos, el estrés oxidativo provoca la modificación de grupos carbonilo de GAPDH lo que conduce a su inactivación (Cabisco y Ros, 2006).

En mamíferos se ha descrito que GAPDH es diana intracelular del óxido nítrico (NO). El NO ejerce dos funciones en mamíferos. Una primera función consiste en actuar como mensajero en gran número de procesos inflamatorios, actuando también como neurotransmisor. En segundo lugar, el NO está directamente implicado en la toxicidad celular, que causa daño en el DNA. Esta toxicidad puede estar relacionada con la capacidad de este compuesto de participar en reacciones de modificación post-traduccionales de proteínas. Diversos estudios demostraron que el NO puede modificar GAPDH primero por una S-nitrosilación de la proteína que inhibe fuertemente la actividad glicolítica, y después por la inducción que el NO ejerce sobre la unión covalente del NAD⁺ a GAPDH (Brüne y Lapetina, 1995).

1.2.1. FUNCIONES DE GAPDH EN MAMÍFEROS

Varias evidencias demuestran la participación de GAPDH en diversas actividades biológicas en mamíferos que no están relacionadas con su función glicolítica. Entre estas funciones se ha descrito la implicación de GAPDH en el transporte a través de membranas, transporte intracelular de vesículas, ensamblaje de microtúbulos, exporte de RNA, mecanismos de regulación transcripcional y post-transcripcional, reparación y replicación del DNA. Estudios recientes, involucran GAPDH en procesos de apoptosis, mantenimiento de telómeros y control transcripcional. Además, se la relaciona con enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento, cáncer de próstata, patogénesis viral, o síndrome metabólico entre otros. Las múltiples funciones de GAPDH en mamíferos y su relación con procesos patológicos están ampliamente descritas en varias revisiones (Figura 1.2) (Sirover, 1999; Sirover, 2005; Sirover, 2011).

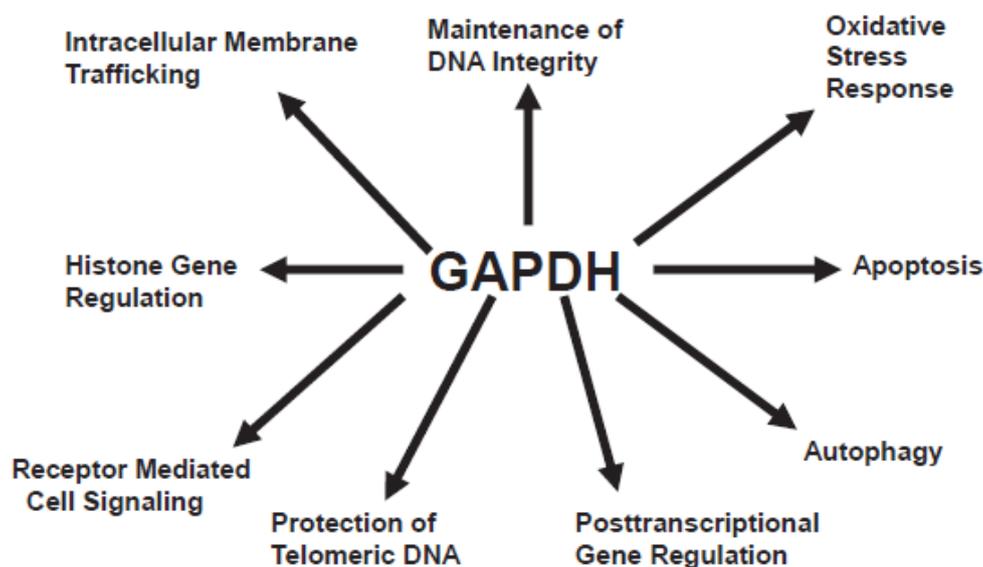


Figura 1.2. Diversidad funcional de GAPDH. (Tomado de Sirover, 2011)

Las diversas funciones de GAPDH requieren normalmente su asociación con complejos proteicos. De hecho, muchas de las funciones de GAPDH fueron deducidas a partir de su identificación formando parte de complejos macromoleculares implicados en diversas funciones celulares. Así, respecto a la participación de GAPDH en la regulación de la expresión de genes se ha descrito que GAPDH se une a Oct-1 formando, conjuntamente con otras proteínas, un complejo denominado OCA-S que regula la expresión de los genes de las histonas, especialmente durante el ciclo celular (Sirover, 2005). Otro estudio independiente, implica GAPDH en la regulación post-transcripcional de ET-1, proteína vasoconstrictora endotelial que puede también ser requerida para el desarrollo embrionario y que podría estar involucrada en patologías del corazón, riñón o pulmón. Concretamente, en este estudio se observó que la depleción intracelular de GAPDH provoca un aumento del orden del 50% en los niveles de expresión de ET-1 (Sirover, 2011).

Por su relación con los resultados obtenidos en este trabajo, nos centraremos en el papel de GAPDH en los mecanismos de reparación de DNA. Ya se ha mencionado anteriormente (INTRODUCCIÓN 1.1) que en su localización nuclear, la forma monomérica de GAPDH presenta actividad uracil-DNA glicosilasa, actividad implicada en la eliminación del uracilo presente en la molécula de DNA (Meyer-Siegler *et al.*, 1991; Jeffery, 1999). Puesto que la desaminación de los residuos de citosina es, por definición, un evento mutagénico, GAPDH a través de la actividad uracil-DNA glicosilasa desempeña una función importante en la reparación del DNA siendo también, responsable del mantenimiento de la información genética

(Sirover, 1999). Más recientemente, se ha descrito que GAPDH humana presenta un papel directo en la reactivación de la forma oxidada de la enzima endonucleasa APE1 esencial para la reparación de los centros abásicos o centros AP (apurínicos/apirimidínicos) generados en el DNA de modo espontáneo o por acción de drogas como bleomicina o agentes alquilantes. Esta función es posible por tres motivos: en primer lugar GAPDH posee una cisteína en su centro catalítico con actividad redox, en segundo lugar, es conocido que GAPDH se transloca del citoplasma al núcleo en respuesta al estrés que causa daños oxidativos en el DNA, y en tercer lugar, esta proteína se une a moléculas de DNA dañado. Básicamente, GAPDH mantiene el estado reducido de la enzima APE1, reactivando así su actividad endonucleasa. Las cisteínas involucradas en su función redox son las cisteínas del centro activo, C152 (catalítica) y C156. Utilizando proteínas recombinantes se ha podido comprobar que la C152 de GAPDH no es requerida para la interacción con APE1 pero es indispensable para ejercer su actividad reductora y reparadora sobre esta enzima (Azam *et al.*, 2008). En este estudio se postula que GAPDH podría ejercer esta misma función en numerosas proteínas susceptibles a cambios estructurales inducidos por el estrés oxidativo, lo que podría explicar la implicación de GAPDH en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson (Azam *et al.*, 2008). Otro estudio también implica GAPDH en la reparación del DNA. En este caso, se observa el acúmulo de GAPDH en el núcleo celular después de exponer las células a agentes genotóxicos. Además, se identifica GAPDH formando parte de un complejo proteico que reconoce moléculas de DNA modificadas por la incorporación de tioguanosinas, 5-fluorouridina, entre otros (Krynetski *et al.*, 2003). También se ha evidenciado la participación de GAPDH en la protección de la integridad de los telómeros. Esta función es esencial para el mantenimiento de la integridad del DNA y de la estructura del cromosoma. En este sentido se ha descrito que GAPDH se une directamente al DNA telomérico formando un complejo. Este complejo previene el acortamiento del telómero, que durante la replicación, provocan las ceramidas u otras drogas utilizadas en el tratamiento del cáncer (Sirover, 2005; Sirover, 2011).

1.2.2. FUNCIONES DE GAPDH EN BACTERIAS

1.2.2.1. Funciones en el entorno extracelular

Existe un gran número de descripciones sobre la secreción y localización en la superficie celular de proteínas *housekeeping* multifuncionales por parte de microorganismos patógenos, entre las que se encuentran varios enzimas de la glicólisis. La localización de estas proteínas clásicamente citoplasmáticas en el entorno extracelular está relacionada con funciones en los procesos de interacción y adhesión al huésped (Pancholi y Chhatwal, 2003). En la mayoría de los casos se desconoce el sistema a través del cual estas proteínas multifuncionales son secretadas o exportadas a la superficie celular ya que no presentan la secuencia señal típica de transporte.

La primera enzima de expresión constitutiva descrita en la superficie de bacterias patógenas fue GAPDH. Concretamente, se identificó en la superficie del patógeno gram-positivo *Streptococcus pyogenes* (Lottenberg *et al.*, 1992; Pancholi y Fischetti, 1992). Se demostró que la proteína asociada a la superficie de este patógeno era enzimáticamente activa y tenía capacidad de unión a las proteínas humanas fibronectina y lisozima, y a proteínas del citoesqueleto, apuntando por primera vez una función alternativa para GAPDH, independiente de su participación en la vía glicolítica, en esta nueva localización extracelular. La mayoría de descripciones sobre otras proteínas multifuncionales en la superficie de microorganismos están relacionadas con bacterias patógenas gram-positivas (Pancholi y Chhatwal, 2003). Sin embargo, en los últimos años están apareciendo evidencias sobre la localización extracelular de estas proteínas en la superficie de patógenos gram-negativos y probióticos.

Varios estudios sobre distintos patógenos gram-positivos relatan la capacidad de GAPDH extracelular de interactuar con numerosos componentes del huésped como lisozima, proteínas del citoesqueleto (actina y miosina) proteínas de la matriz extracelular (fibronectina), transferrina, plasminógeno, entre otros (Lottenberg *et al.*, 1992; Seifert *et al.*, 2003; Schaumburg *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2005, Matta *et al.*, 2010). En un estudio realizado por Pancholi y Fischetti (1992), se demostró la participación de GAPDH, localizada en la superficie de *Streptococcus* del grupo A, en la transducción de señales en el huésped durante la infección de células de faringe. En otro estudio, se identificó un receptor de GAPDH en la membrana de células de faringe, la proteína uPAR (*urokinase plasminogen activator*)/CD87, indicando una relación entre el sistema del plasminógeno humano y las posibles funciones no glicolíticas de la GAPDH extracelular (Jin *et al.*, 2005). Concretamente, se demostró que la interacción entre el plasminógeno humano y GAPDH presente en la superficie de la bacteria mejora la adhesión de las cepas de *Streptococcus* del grupo A a células de faringe (Boël *et al.*, 2005). Cabe mencionar, que también se ha descrito la interacción de la GAPDH extracelular de *Streptococcus* del grupo A con el componente C5a del sistema del complemento humano, lo que favorece su degradación en coordinación con una proteasa de la superficie bacteriana (ScpA), facilitando que el patógeno evada el sistema inmune del huésped (Terao *et al.*, 2006). En este mismo sentido, se ha demostrado que células de *Streptococcus* del grupo B también exportan GAPDH al exterior celular, y que esta GAPDH puede inducir la activación de células B policlonales del huésped y aumentar la secreción de interleuquina IL-10. La capacidad de factores microbianos de inducir la activación de células B policlonales en el huésped constituye un mecanismo de evasión empleado por los patógenos para suprimir las respuestas inmunes específicas y potencialmente protectoras (Madureira *et al.*, 2007).

En otro estudio realizado en *Bacillus anthracis* se ha detectado la presencia de GAPDH tanto en su secretoma como en la superficie de las esporas. En este caso se

demostró también la interacción de GAPDH con plasminógeno sugiriendo la participación de GAPDH en los mecanismos de infección (Matta *et al.*, 2010). No obstante, aunque GAPDH extracelular facilita la colonización bacteriana del huésped y puede contribuir a la virulencia de patógenos, hay que considerar que no es en sí un factor de virulencia, ya que también facilita la adhesión de probióticos.

Respecto a patógenos de tipo gram-negativo, el grupo dónde se ha realizado este trabajo fue pionero en el estudio de la localización extracelular de GAPDH en cepas de *Escherichia coli* enteropatógenas (EPEC) o enterohemorrágicas (EHEC) y su implicación en la interacción con enterocitos y diferentes componentes del huésped. Se demostró que esta proteína se localiza en la superficie de estas cepas de *Escherichia coli* patógenas y es además secretada al medio en forma soluble y activa. Ensayos de *Western Blot* y ELISA han evidenciado la capacidad de esta proteína de interactuar con las proteínas humanas plasminógeno y fibrinógeno, así como su asociación a células Caco-2 después de la infección (Egea *et al.*, 2007). Estas interacciones atribuyen a GAPDH una función relacionada con la degradación de proteínas de la matriz extracelular del huésped, que en el caso de enteropatógenos facilitaría su migración a través de la mucosa intestinal. Otro aspecto de la función de GAPDH en la interacción con la mucosa intestinal está relacionado con posibles modificaciones post-traduccionales de esta proteína. Ensayos de ADP-ribosilación han evidenciado que esta enzima es modificada por NAD⁺ tanto en el citoplasma como en el medio extracelular y dicha modificación afecta la Cys149 del centro activo. El óxido nítrico estimula la modificación postraduccional dependiente de NAD⁺. Así, la proteína secretada por la bacteria puede actuar como diana de oxidación y por tanto como mecanismo de protección frente a la respuesta oxidativa del huésped (Aguilera *et al.*, 2009).

Existen muchos estudios realizados en patógenos que atribuyen a GAPDH un papel en el mecanismo de patogénesis, si bien recientemente algunos estudios relatan funciones no relacionadas con la glicólisis para GAPDH en probióticos. Los probióticos son un grupo de microorganismos intestinales no patógenos que cuando se administran a humanos ejercen efectos beneficiosos para el organismo. Son utilizados como suplementos dietéticos o como productos farmacéuticos en el tratamiento de patologías intestinales. Algunas cepas probióticas reducen la colonización por parte de patógenos a través de la competición directa por los centros de adhesión, la producción de agentes antimicrobianos o la modulación de la respuesta inmune adquirida del huésped. Además ejercen una influencia beneficiosa sobre las células epiteliales regulando su desarrollo y función. Precisamente, las proteínas secretadas por cepas probióticas, dada su situación extracelular, pueden ser las responsables de algunas de estas características probióticas (Sánchez *et al.*, 2008).

En un estudio llevado a cabo con la cepa probiótica *Lactobacillus plantarum* LA 318, se reportó la secreción de GAPDH y su interacción con la mucina de colon humano a través de antígenos del grupo ABO para facilitar la adhesión a las células epiteliales de la mucosa (Kinoshita *et al.*, 2008a; Kinoshita *et al.*, 2008b). Más tarde otro grupo, identificó la presencia de GAPDH en el secretoma de otras cepas probióticas como *Lactobacillus rhamnosus* (Sánchez *et al.*, 2009a y Sánchez *et al.*, 2009b). Recientemente, nuestro grupo ha demostrado la secreción de GAPDH por la cepa probiótica *E. coli* Nissle 1917. (Aguilera *et al.*, 2012). Por tanto, GAPDH extracelular podría presentar ventajas en el proceso de colonización, principalmente de la mucosa intestinal, siendo parte de un mecanismo de competición entre probióticos y patógenos.

1.2.2.1.1. Mecanismos de secreción de GAPDH en *E. coli*

Aunque las descripciones sobre la localización extracelular de GAPDH en bacterias Gram-positivas se remontan veinte años atrás, el mecanismo que dirige su secreción es todavía desconocido. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha contribuido a este estudio en cepas de *E. coli*.

En las bacterias Gram-negativas la envoltura celular está formada por dos membranas, la interna y la externa, lo que dificulta en mayor medida el proceso de secreción de proteínas. La membrana externa es una estructura esencial que permite a estas bacterias colonizar ambientes como el lumen intestinal y proporciona además una barrera protectora adicional frente a las defensas antimicrobianas del huésped y a los antibióticos. Sin embargo, la membrana externa constituye también una barrera para la secreción de proteínas, y el transporte de las mismas a través de ella comporta un gasto energético. Por todo ello, las bacterias Gram-negativas han desarrollado un amplio abanico de mecanismos para la secreción de proteínas a través de la envoltura celular. Así, además de la secreción a través de vesículas de membrana externa se han descrito ocho sistemas de secreción de proteínas, denominados T1SS a T8SS, (Desvaux *et al.*, 2009). Estos sistemas se pueden dividir en dos grupos: (i) sistemas que promueven la secreción de la proteína desde el citosol al exterior en una sola etapa a través de un complejo proteico que atraviesa las dos membranas, y (ii) sistemas que promueven la secreción en dos etapas, en la primera la proteína es translocada al espacio periplasmático a través de la membrana interna y en la segunda etapa es exportada al exterior a través de proteínas de la membrana externa.

Por la relación con los resultados que se presentaran en este trabajo, nos centraremos en el sistema de secreción T3SS, también denominado “inyectisoma”. Este es un sistema específico de cepas patógenas, esencial para la virulencia de las mismas, como es el caso de cepas EHEC y EPEC. El sistema T3SS es un complejo aparato formado por un cuerpo basal anclado a las membranas de la bacteria y una aguja protuberante que facilita la introducción por inyección de proteínas

bacterianas, que actúan como factores de virulencia (denominadas efectores), directamente en el citoplasma de la célula huésped (Marlovits *et al.*, 2006; Izoré *et al.*, 2011). Los efectores del T3SS desempeñan un importante papel en la infección ya que pueden modular o alterar funciones y estructuras celulares del huésped así como la respuesta inmune (revisado en Dean y Keny, 2009). Las proteínas que constituyen el cuerpo basal se denominan Esc; entre ellas está EscN, la ATPasa que proporciona la energía necesaria para el proceso de secreción (Figura 1.3). La introducción de efectores al citoplasma de la célula huésped requiere proteínas adicionales, denominadas translocadores, que son también ellas mismas exportadas a través de este sistema. En EHEC y EPEC los genes que codifican las proteínas que conforman el aparato de secreción T3SS, así como algunos efectores, chaperonas específicas y reguladores de su expresión están codificadas en la isla de patogenicidad LEE (MacDaniel y Kaper, 1997). La expresión de los genes de esta isla es activada en presencia de bicarbonato, compuesto presente en el intestino y componente de medios de cultivo para células eucariotas como el DMEM.

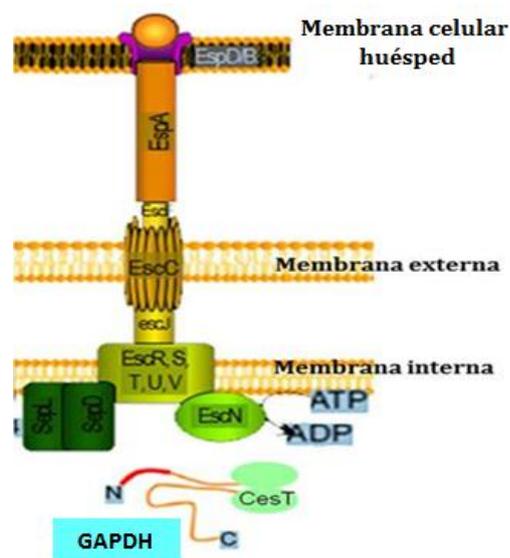


Figura 1.3. Estructura del sistema de secreción T3SS de EPEC.

El sistema T3SS está implicado en la secreción de un gran número de proteínas al medio (Deng *et al.*, 2010). Las proteínas secretadas por este sistema pueden dividirse en varias categorías según el orden en que son secretadas. Las proteínas sustrato inicialmente secretadas son de hecho las que forman la estructura de aguja protuberante. Esta aguja secreta entonces los translocadores EspA, EspB y EspD (sustratos intermedios) y finalmente las proteínas efectoras (sustratos tardíos). Los translocadores son necesarios para la introducción de los efectores dentro del citoplasma de la célula huésped (Luo y Donenberg, 2006). El orden de

secreción de translocadores y efectores es regulado por las proteínas SepL y SepD (Deng *et al.*, 2005; O'Connell *et al.*, 2004).

Hasta el momento se han identificado múltiples efectores del sistema T3SS, algunos están codificados en la isla LEE, mientras otros están codificados en otras islas o por genes de patogenicidad distribuidos en el genoma de estos patógenos (revisado en Dean y Keny, 2009). Los efectores del T3SS están normalmente asociados a una chaperona citosólica que no es secretada (chaperonas de clase I). Estas chaperonas son proteínas pequeñas (15-20kDa) y solubles, con un pI ácido. Forman homodímeros que se unen a la región N-terminal de los efectores y quedan retenidas en la célula bacteriana una vez el efector ha sido translocado al interior de la célula huésped (Parsot *et al.*, 2003; Izoré *et al.*, 2011). Las interacciones entre la chaperona y el efector se dan principalmente a través de elementos de estructura secundaria del efector y regiones hidrofóbicas presentes en la chaperona en su forma dimérica (Parsot *et al.*, 2003). En cuanto a la función de estas chaperonas, se han propuesto varios mecanismos: (i) estabilización del sustrato, (ii) prevención de interacciones prematuras del sustrato con otras proteínas bacterianas o (iii) regulación de la expresión de genes de virulencia (Page y Parsot, 2002).

En EPEC, la chaperona CesT, codificada en la isla de patogenicidad LEE, es capaz de interactuar con varios efectores del T3SS (algunos codificados en la isla LEE, otros codificados fuera de ella) así como también con la ATPasa del sistema EscN (Thomas *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2007). A través de esta interacción, CesT promueve el acercamiento de las proteínas efectoras al aparato de secreción T3SS necesario para su secreción (Figura 1.3) (Thomas *et al.*, 2005).

Nuestro grupo de investigación ha demostrado que la secreción de GAPDH en el patógeno EPEC tiene lugar a través de al menos dos mecanismos. En células crecidas en medio DMEM, GAPDH es secretada a través del sistema T3SS, mientras que en cultivos en medio LB la secreción tiene lugar a través de un mecanismo todavía desconocido. Este sistema activo en LB es también funcional en la cepa probiótica *E. coli* Nissle 1917 (Aguilera *et al.*, 2012). Un aspecto importante de este estudio fue demostrar la interacción de GAPDH con la chaperona CesT. Parte de los resultados presentados en esta tesis han contribuido a este análisis (DISCUSIÓN Y RESULTADOS 4.4).

1.2.2.2. Funciones intracelulares

A parte del papel de GAPDH extracelular en los procesos de virulencia o colonización del huésped, no hay apenas estudios que describan su participación en otras funciones distintas de su actividad catalítica a nivel intracelular en *E. coli* o en otras bacterias.

Resultados derivados de algunos estudios sugieren que GAPDH podría interactuar con DNA y actuar como regulador de la expresión génica. Así, en un estudio llevado a cabo en *E. coli* K-12, encaminado a identificar reguladores de la transcripción del gen que codifica NADH deshidrogenasa-2 (*ndh*), se aisló y se identificó GAPDH como una de las proteínas capaces de interactuar con el promotor de este gen (Green *et al.*, 1997). Dicha interacción fue evidenciada mediante experimentos *in vitro* usando la metodología de *Dynabeads*, sin embargo los autores no llevaron a cabo ningún tipo de caracterización ni análisis de su función como regulador de la transcripción de este gen *in vivo*.

Tal como se ha comentado anteriormente en *Streptococcus pyogenes* el exporte de GAPDH en superficie es esencial para la virulencia de este patógeno. Un estudio llevado a cabo con cepas que expresan una forma modificada de GAPDH en su extremo C-terminal, que promueve su anclaje a la membrana e impide su secreción, mostró la expresión del gen *emm1* disminuida. Este gen codifica para la proteína M del tipo I que es un constituyente de la pared del *Streptococcus*. Esta proteína es considerada uno de los mayores factores de virulencia debido a sus actividades proinflamatorias y antifagocíticas (Brown, 2004). En este modelo de GAPDH anclada a membrana, los niveles de GAPDH intracelulares son superiores a los de la cepa tipo salvaje capaz de secretar dicha proteína. Estos resultados llevaron a los autores a sugerir la implicación de GAPDH en el control transcripcional de este gen, si bien no se abordaron aproximaciones experimentales para corroborar esta función (Boël *et al.*, 2005). Un estudio transcriptómico posterior basado en la utilización de *microarrays* utilizando el mismo modelo de GAPDH anclado a membrana mostró que un incremento en los niveles intracelulares de GAPDH comporta una disminución en la expresión de genes implicados tanto en la virulencia como en el metabolismo de aminoácidos y de carbohidratos. Además, se observó un aumento en la expresión de genes involucrados en el metabolismo de los lípidos (Jin *et al.*, 2011). En base a estos resultados los autores sugieren que GAPDH podría actuar como modulador de genes de virulencia a través de alguno de los siguientes mecanismos: (i) GAPDH podría ser un factor de transcripción, (ii) GAPDH podría formar parte de complejos de transcripción implicados en la expresión de genes de virulencia, o (iii) alternativamente su exporte a la superficie del patógeno podría regular el patrón de expresión de determinados genes.

En conjunto estos estudios implican a GAPDH en los procesos de regulación de la expresión de determinados genes en diferentes bacterias, si bien se desconoce el mecanismo involucrado.

En el área de la biología de sistemas, cada vez tiene más importancia el estudio de las proteínas a través de las interacciones que establecen con otras proteínas ya que estas asociaciones son fundamentales para el desarrollo de las diferentes funciones celulares. De hecho, muchas de las funciones de GAPDH humana fueron

identificadas a través de su detección como componente de complejos macromoleculares involucrados en los procesos celulares en estudio (Sirover, 2005).

En *E. coli*, varios grupos han realizado estudios masivos para identificar interacciones entre proteínas (Butland *et al.*, 2005; Arifuzzaman *et al.*, 2006). Estos estudios están basados en la utilización de proteínas fusionadas a *tags* o etiquetas que permiten la purificación por cromatografía de afinidad de estas proteínas y las que interactúan con ellas. Así, el estudio realizado por Butland *et al.*, 2005 evidenció la co-purificación de GAPDH con una gran variedad de proteínas que incluyen subunidades de la RNA polimerasa (RpoA, RpoB, RpoC y RpoD), el factor regulador de quimiotaxis CheZ, el factor de elongación de la transcripción GreA, el regulador transcripcional CpxR, la enzima de reparación de DNA O⁶-metilguanina-DNA-transferasa (Ogt), la chaperona DnaK, la subunidad reguladora de la enzima D-tagatosa-1,6-bisfosfato aldolasa (GatZ), entre otras. En el estudio realizado por Arifuzzaman *et al.*, 2006, se describe la posible interacción de GAPDH con la fosfoglicolato fosfatasa (PGPasa) y la chaperona *trigger factor* (Tig). Además, se ha identificado en *E. coli*, mediante análisis proteómico, la asociación de GAPDH con Tiorredoxina-1 (TrxA) (Kumar *et al.*, 2004). La observación de GAPDH asociada a numerosas proteínas involucradas en distintos procesos celulares, sugiere que al igual que en mamíferos, la GAPDH bacteriana podría presentar otras funciones, no relacionadas con la obtención de energía.

1.3. LESIONES GENERADAS EN EL DNA POR ACCIÓN DE AGENTES GENOTÓXICOS

1.3.1. POR ACCIÓN DE BLEOMICINA

La bleomicina (BM) es una droga radiomimética cuyo mecanismo de acción se basa en la oxidación de la desoxirribosa del DNA, por captación del H⁺, predominantemente de las posiciones C-1', C-4' y C-5' de la molécula de azúcar. La eliminación del H⁺ en el C-1' seguido de la adición de O₂ genera centros abásicos en el DNA ya que la desoxirribosa se convierte en desoxirribonolactona (Figura 1.4A). La adición de otro O₂ al radical libre presente en la posición C-4' promueve la ruptura de la cadena con la formación de extremos 3'-fosfoglicolato y 5'-fosfato. Sin embargo, si en lugar de una oxidación ocurre una hidroxilación en esta misma posición, se generan centros abásicos (Figura 1.4B). La captación del H⁺ de la posición C-5' es menos frecuente pero cuando ocurre resulta en la ruptura de cadena con la formación de extremos 3'-fosfato y 5'-aldehído (Figura 1.4C). Puesto que la BM predominantemente sustrae el H⁺ de la posición C-4', en presencia de Fe²⁺, se generan simultáneamente rupturas de doble cadena con la formación

mayoritaria de extremos 3'-fosfoglicolato (Giloni *et al.*, 1981) y centros abásicos (Levin y Demple, 1996; Povirk, 1996; Xu *et al.*, 2012).

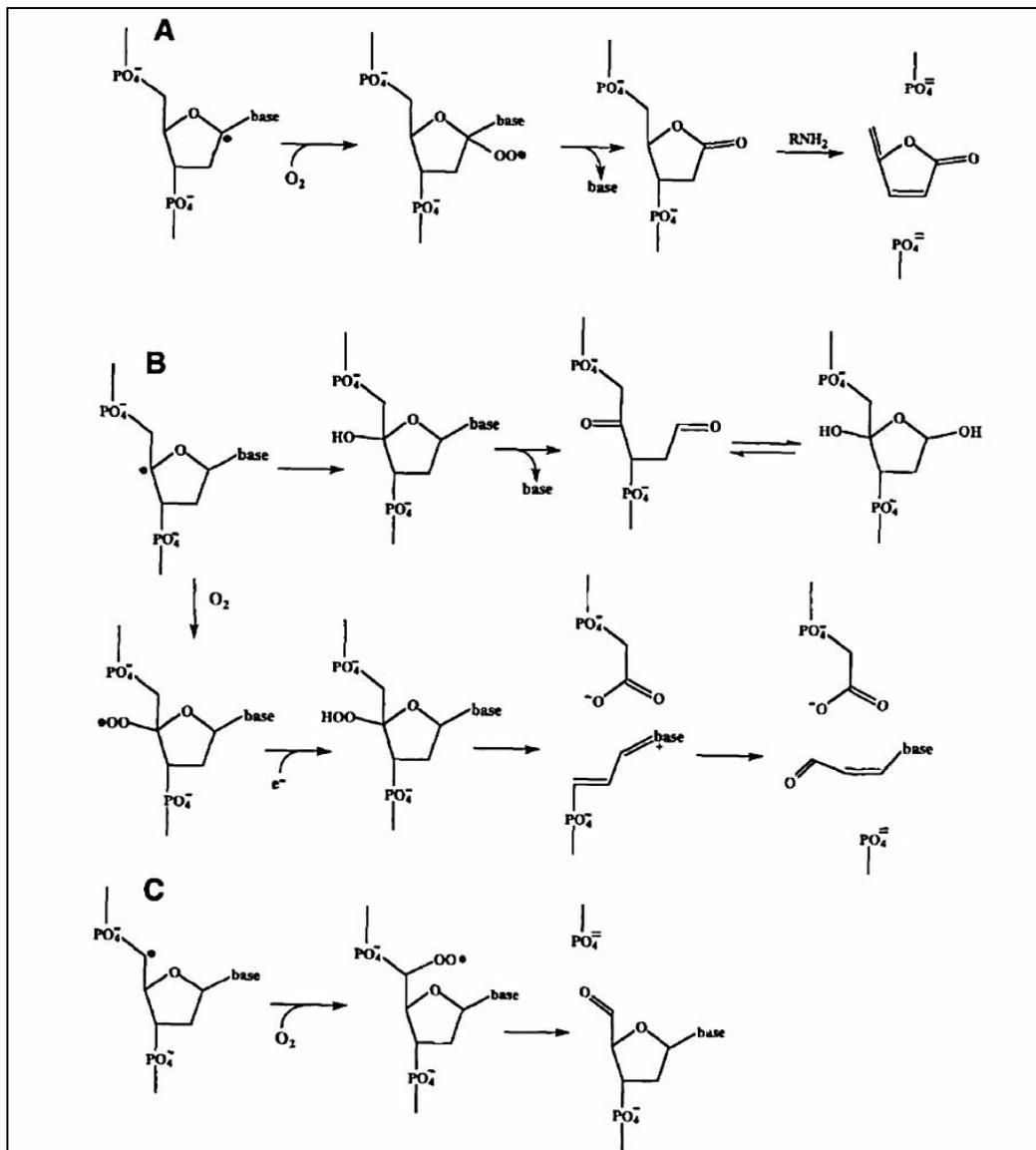


Figura 1.4. Esquema de los distintos mecanismos de oxidación de la desoxirribosa del DNA por acción de la bleomicina: (A) La captación del H^+ y la incorporación de O_2 sobre el C-1' genera centros abásicos. **(B)** La adición de O_2 sobre el radical libre presente en la posición C-4' promueve la ruptura de cadena con la formación de extremos 3'-fosfoglicolato y 5'-fosfato. Por otro lado, la incorporación de un grupo hidroxilo en esta misma posición conlleva a la formación de centros abásicos. **(C)** La captación del H^+ en la posición C-5' genera la ruptura de cadena con la formación de extremos 3'-fosfato y 5'-aldehído. (Tomado de Povirk, 1996)

Se han descrito mecanismos para reparar las rupturas de doble cadena de DNA que comienzan con la reparación de los extremos 3'-fosfoglicolato. Se han reportado diversas nucleasas que reparan estos extremos en bacterias (Demple y Harrison, 1994; Sandigursky y Franklin, 1998), levaduras (Sander y Ramotar, 1997) y eucariotas superiores (Xu *et al.*, 1998). Estas nucleasas liberan los

extremos 3'-fosfoglicolato generando 2-fosfoglicolato que a su vez es desfosforilado, por acción de la fosfoglicolato fosfatasa a glicolato que es incorporado al metabolismo general (Pellicer *et al.*, 2003). Seguidamente a la eliminación de los extremos 3'-fosfoglicolato, se repara la ruptura de las cadenas mediante recombinación homóloga (Povirk, 1996; Morita *et al.*, 2010). Cabe mencionar que la ruptura de doble cadena generada por la BM podría también ser reparada por el mecanismo de recombinación no homóloga. No obstante, todavía no hay evidencias de que este sistema de reparación exista en *E. coli*, aunque se hayan encontrado genes que codifican proteínas homólogas a las que participan en este sistema de reparación, en otras cepas bacterianas (Bowater y Doherty, 2006).

Por otro lado, la reparación de los centros abásicos generados por BM, se lleva a cabo por el sistema de escisión de bases (BER) (Carpenter *et al.*, 2007, Sikora *et al.*, 2010), que se describe en el apartado 1.4.3 de esta introducción.

Cabe destacar que el daño generado por BM en el DNA induce también la activación de la respuesta SOS, puesto que genera rupturas de doble cadena, impidiendo la replicación. La respuesta SOS es un mecanismo esencial que las células utilizan para resistir a los efectos de agentes tóxicos (Walker, 1984; Krishna *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2012).

1.3.2. POR ACCIÓN DE METILMETANOSULFONATO

Los agentes alquilantes pueden introducir metilaciones en 12 sitios distintos en las bases del DNA, incluyendo los oxígenos exocíclicos y los nitrógenos cíclicos. Incluso pueden metilar átomos de oxígeno unidos a los fosfatos de las moléculas de azúcar, generando así metilfosfotriésteres. La proporción de alquilación en los diferentes sitios de las bases del DNA depende del tipo de reacción química que lleva a cabo el agente alquilante (sustitución nucleofílica S_N1 -monomolecular o S_N2 -bimolecular) (Sedgwick, 2004; Wyatt y Pittman, 2006).

El metilmetanosulfonato (MMS) es un agente alquilante del tipo S_N2 (Sedgwick, 2004; Wyatt y Pittman, 2006) que genera mayoritariamente metilaciones en los átomos de nitrógeno de las purinas que constituyen el DNA, exhibiendo propiedades citotóxicas y mutagénicas. La exposición de las células al MMS promueve la formación de 1-metiladenina (1-meA), 3-metiladenina (3-meA), 7-metiladenina (7-meA), 3-metilguanina (3-meG), 7-metilguanina (7-meG), O⁶-metilguanina (O⁶-meG), 3-metilcitosina (3-meC) y metilfosfotriésteres (Sikora *et al.*, 2010).

Los daños generados en el DNA por el MMS pueden ser corregidos por dos sistemas de reparación, el sistema de reparación directa por acción de las O⁶-alquiltransferasas Ogt y Ada o de la dioxigenasa AlkB, y el sistema de escisión de bases (BER) por acción de las glicosilasas 3-metiladenina-DNA-glicosilasa I (Tag) y 3-metiladenina-DNA-glicosilasa II (AlkA). (Sedgwick, 2004; Sikora *et al.*, 2010).

Cabe destacar que al eliminar las bases metiladas estas glicosilasas generan centros abásicos que desestabilizan la molécula de DNA, y que deben ser reparados por el sistema BER a través de AP-endonucleasas como Exonucleasa III (codificada por el gen *xth*) y Endonucleasa IV (codificada por el gen *nfo*), en *E. coli*.

Además el MMS detiene la síntesis del DNA y por tanto promueve la activación de la respuesta SOS (Walker, 1984; Janion, 2008).

1.4. MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL DNA EN *E. coli*

Para la supervivencia de los organismos es esencial garantizar la integridad y la propagación de su información genética. El genoma es objeto de constantes agresiones causadas por agentes endógenos y exógenos que le provocan una amplia variedad de lesiones. (Schärer, 2003; Altieri *et al.*, 2008). Entre las causas que provocan lesiones endógenas se incluyen, entre otras, errores de replicación, depurinaciones espontáneas o alteraciones causadas por especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas habitualmente en el metabolismo celular (Sarkar *et al.*, 2004). Las lesiones endógenas ocurren de modo espontáneo y continuado, incluso bajo condiciones fisiológicas normales debido a la inestabilidad intrínseca de los enlaces químicos que mantienen la estructura del DNA (Morita *et al.*, 2010). Las lesiones exógenas pueden ser originadas debido a la exposición a agentes ambientales tales como luz ultravioleta (UV), radiación ionizante, agentes químicos que causan mutaciones como el MMS, la BM, el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), entre otros (Sarkar *et al.*, 2004; Morita *et al.*, 2010). Las consecuencias biológicas de estos daños dependen de la naturaleza química de la lesión. La mayoría de las lesiones causadas en el DNA afectan la fidelidad de la replicación lo que conlleva a la aparición de mutaciones.

Para reparar los daños generados en el DNA se activan una variedad de mecanismos celulares, entre ellos el sistema de reparación directa (*Direct Reversal*), el sistema de reparación por escisión de bases (*Base Excision Repair*, BER), el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (*Nucleotide Excision Repair*, NER), el sistema de reparación de apareamiento incorrecto (*Mismatch Repair System*) y el sistema de reparación por recombinación (*Recombination Repair Pathways*) (Ivanov *et al.*, 2007; Morita *et al.*, 2010). Muchos de estos mecanismos de reparación requieren interacciones funcionales entre múltiples proteínas y estudios recientes describen incluso rutas de complementación entre estos sistemas (Morita *et al.*, 2010).

Además de los mecanismos de reparación citados anteriormente, la exposición de *E. coli* a agentes o condiciones que provocan extensas lesiones en el DNA y que interfieren en la replicación, conlleva también la activación de la respuesta SOS (Walker, 1984; Goodman, 2002; Janion, 2008; Xu *et al.*, 2012).

Teniendo en cuenta los objetivos de este estudio, entre todos los mecanismos involucrados en la reparación del DNA en *E. coli* cabe destacar los sistemas implicados en la reparación de los daños causados por BM y MMS: la recombinación homóloga, la reparación directa, el sistema BER y la respuesta SOS.

1.4.1. RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

La recombinación homóloga repara la ruptura de doble cadena del DNA causada por radiación ionizante, ROS, agentes genotóxicos como BM, disfunción de nucleasas o alteración en la replicación (Morita *et al.*, 2010).

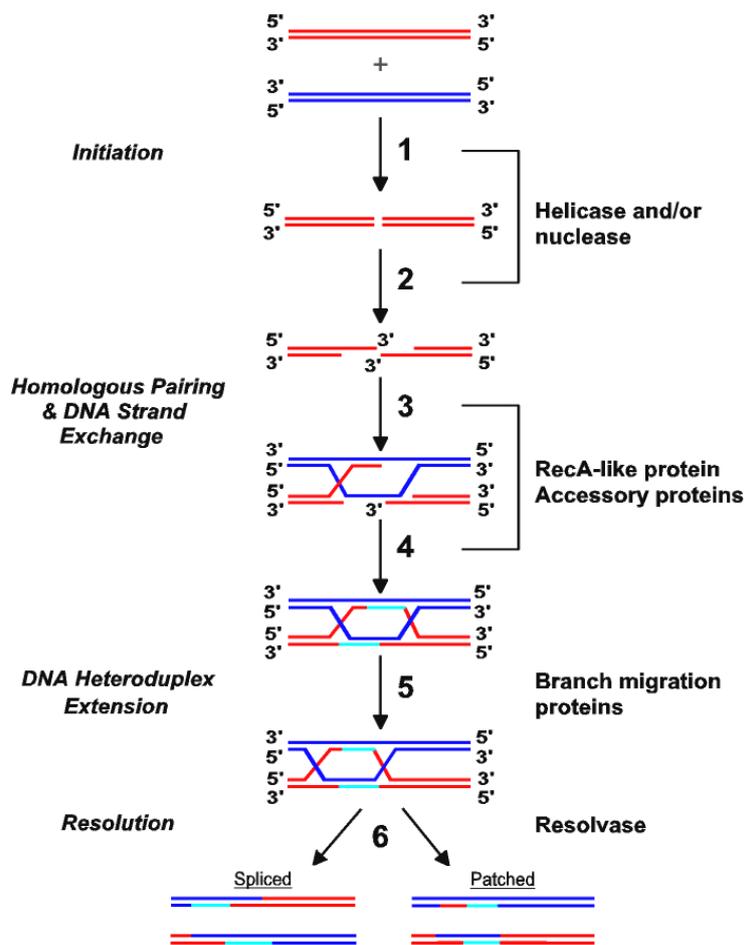


Figura 1.5. Recombinación homóloga en *E. coli*. **Etapa 1-** Alineación de las cadenas de DNA homólogas. **Etapa 2-** Acción de las actividades helicasa y exonucleasa de la enzima RecBCD para generar extremos 3' de cadena sencilla. **Etapa 3-** Unión de la proteína RecA a los extremos 3' de cadena sencilla. **Etapa 4-** Formación de un intermediario de *Holliday*. **Etapa 5-** Migración de cadenas por acción de RuvAB. **Etapa 6-** Resolución del intermediario de *Holliday* por RuvC. Este último paso puede originar distintos tipos de productos tales como el *spliced* (producto recombinado) y el *patched* (producto no recombinado). (Tomado de Bianco *et al.*, 1998)

Para reparar la doble cadena de DNA sin pérdida de información la célula necesita un alto nivel de redundancia genética (o sea tener rutas alternativas para llevar a cabo una misma función) y una secuencia homóloga extra que pueda ser utilizada como molde para reparar la doble cadena dañada. El principio de la recombinación homóloga se basa en la recombinación intracatenaria de un dúplex dañado con un dúplex homólogo intacto. El resultado de la unión de las moléculas es “resuelto” por una escisión simétrica en las cadenas homólogas formando dos nuevas moléculas de DNA, cada una conteniendo una cadena sencilla lesionada. En este sentido las hebras dañadas pueden ser regeneradas utilizando la cadena complementaria como molde (Kuzminov, 1999).

Concretamente, en *E. coli* la recombinación homóloga tiene lugar en varias etapas (Figura 1.5). En primer lugar, el alineamiento de las cadenas homólogas, la generación de una cadena simple (ssDNA) por la acción del complejo RecBCD que tiene actividad helicasa (separa las cadenas del DNA) y exonucleasa (genera extensiones de cadena sencilla 3'). En segundo lugar, se produce la invasión de la cadena homóloga mediada por RecA que se une a la extensión de cadena sencilla. En esta etapa cabe destacar el papel de la proteína SSB (*single stranded DNA binding protein*) que facilita la unión de RecA a ssDNA, evitando el apareamiento intracatenario de bases (Bianco *et al.*, 1998; Kuzminov, 1999). En tercer lugar, se forma la estructura de *Holliday* y se produce la migración de cadena, ambos procesos mediados por RuvAB (las dos cadenas quedan conectadas y la DNA polimerasa empieza la elongación reparadora de los extremos 3'). Finalmente, la resolución de la estructura de *Holliday* por RuvC genera dos moléculas independientes de DNA recombinante. La resolución de esta estructura puede originar distintos tipos de productos según sí las regiones adyacentes del DNA híbrido se recombinan o no (Bianco *et al.*, 1998; Kuzminov, 1999; Morita *et al.*, 2010).

1.4.2. REPARACIÓN DIRECTA

Este sistema de reparación se lleva a cabo cuando las purinas, principalmente guaninas, son metiladas por agentes alquilantes como el MMS. En *E. coli* este sistema de reparación implica dos alquilmetiltransferasas, Ogt y Ada, y la dioxigenasa AlkB que eliminan directamente los grupos metilos regenerando las bases. Este sistema da inicio a la respuesta adaptativa, la cual está compuesta por un regulador positivo, la proteína Ada, que cuando es metilada, activa la transcripción del regulón formado por los genes *ada*, *alkA* (implicada en la respuesta BER), *alkB* y *aidB* (Lindahl *et al.*, 1988; Saget y Walker, 1994; Landini y Volkert, 2000). Estas proteínas participan alternativamente en la reparación del daño generado por MMS según la lesión producida (Figura 1.6). La O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferasa (Ogt), se expresa constitutivamente y se inactiva cuando transfiere el grupo metilo de las O⁶-metilguaninas a su propia cisteína. La proteína Ada presenta una actividad similar a Ogt pero además, esta

proteína elimina los grupos metilos de los S_p -diastereoisómeros metilfosfotriésteres transfiriéndolos a su residuo Cys-38, siendo así inductora de la respuesta adaptativa (Sedgwick, 2004; Sikora *et al.*, 2010). La proteína 1-metiladenina-DNA-dioxigenasa (AlkB) convierte los residuos 1-metiladenina y 1-metilcitosina directamente en adenina y citosina, sin la necesidad de eliminar las bases, liberando el grupo metilo oxidado como formaldehído. Para realizar esta actividad AlkB requiere oxígeno y 2-oxoglutarato como cosustratos y Fe^{2+} como cofactor. (Trewick *et al.*, 2002; Sedgwick *et al.*, 2007; Sikora *et al.*, 2010). La actividad de AidB en procesos de reparación todavía no está bien establecida. Está descrito que pertenece a la familia de las acil-coenzima A deshidrogenasas y que utiliza FAD para catalizar la α - β deshidrogenación de los conjugados de acil-CoA. Además, se ha reportado que esta enzima no exhibe actividad específica de unión al DNA (Rippa *et al.*, 2010).

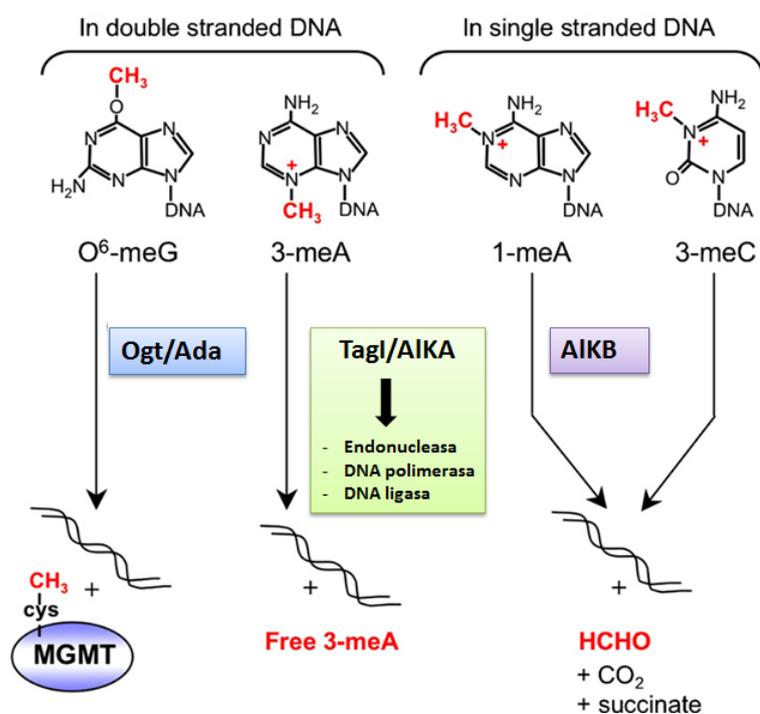


Figura 1.6. Lesiones mayoritarias generadas por agentes alquilantes y sus sistemas de reparación. La exposición de las células a agentes alquilantes genera en el DNA de doble cadena, mayoritariamente, O⁶-metilguanina (O⁶-meG) y 3-metiladenina (3-meA) mientras que en el DNA de cadena sencilla la formación de 1-metiladenina (1-meA) y 3-metilcitosina (3-meC) son más abundantes. O⁶-meG es directamente desmetilada por las O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferasas (MGMT) Ogt y Ada. Las 3-meA son eliminadas por acción de las DNA glicosilasas Tag y AlkA que generan centros abásicos, que posteriormente serán reparados por el sistema de escisión de bases (BER) en el que participan endonucleasas, DNA polimerasas y ligasas. Las 1-meA y 3-meC son directamente desmetiladas por acción de la dioxigenasa AlkB. En esta reacción se oxida el grupo metilo, desestabilizándolo y liberando formaldehído. (Tomado y adaptado de Sedgwick *et al.*, 2007)

Las bases metiladas por MMS en las posiciones *N3* y *N7* no pueden ser reparadas por el sistema directo y tienen que ser reparadas por el sistema BER con la participación de las glicosilasas AlkA y Tag (Sedgwick *et al.*, 2007).

1.4.3. SISTEMA DE ESCISIÓN DE BASES (BER)

Como se ha descrito anteriormente, el DNA celular está constantemente bajo el ataque de agentes genotóxicos. Incluso en condiciones normales del metabolismo pueden generarse mutaciones y lesiones citotóxicas en el DNA, como los centros abásicos. La mayoría del daño generado en el DNA se da en las bases y el sistema BER es probablemente la ruta más utilizada para reparar este tipo de daño (Mol *et al.*, 2000; Ivanov *et al.*, 2007).

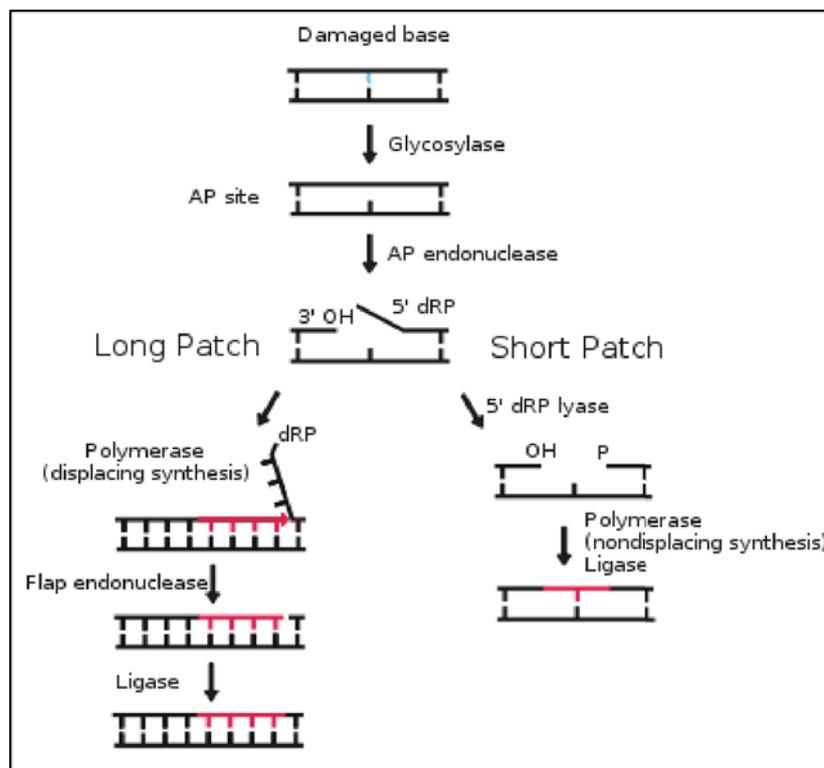


Figura 1.7. Etapas básicas del proceso de reparación por escisión de bases (Base Excision Repair - BER). La base dañada es reconocida y eliminada por DNA glicosilasas específicas para cada lesión, dejando un centro abásico. Las AP endonucleasas rompen los enlaces fosfodiéster (extremo 5') dejando una brecha en la cadena. A partir de este momento las últimas etapas de la reparación se procesarán por *short patch* (cuando un único nucleótido es sustituido) o por *long patch* (cuando 2 o más nucleótidos son reemplazados). En el caso que la reparación proceda mediante *short patch* la DNA polimerasa elimina el 5'-fosfato del azúcar mediante su actividad liasa y sustituye el nucleótido. Posteriormente, la DNA ligasa une la cadena. Mediante el *long patch*, la DNA polimerasa añade más nucleótidos y genera una extensión conteniendo un 5'-fosfato del azúcar que será eliminado por la endonucleasa FEN1. Finalmente, la DNA ligasa une la cadena. (Tomado de http://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/DNA_Repair)

Este sistema de reparación está compuesto básicamente de dos etapas con la finalidad de corregir los daños generados en las bases del DNA resultantes de procesos de oxidación, alquilación, desaminación o pérdida espontánea de la base. En la primera etapa de la respuesta BER las DNA glicosilasas específicas Tag, de expresión constitutiva y AlkA, de expresión inducible, reconocen las bases dañadas del DNA e hidrolizan los enlaces N-glicosídicos, formando los centros AP. Ambas proteínas eliminan los residuos 3-metiladenina (3-meA) y 3-metilguanina (3-meG). Además, los residuos 7-metilguanina (7-meG) y 7-metiladenina (7-meA) son sustratos para AlkA. (Sedgwick, 2004; Sedgwick *et al.*, 2007; Sikora *et al.*, 2010).

La segunda etapa se centra en las AP endonucleasas que se unen a los residuos abásicos y rompen los enlaces fosfodiéster en el extremo 5' del centro AP, dejando un extremo 3'-hidroxilo (Dianov *et al.*, 2003; Carpenter *et al.*, 2007; Fortini y Dogliotti, 2007; Ivanov *et al.*, 2007) En humanos, los centros abásicos son procesados por la exonucleasa APE1, mientras que en *E. coli* son procesados por las AP endonucleasas denominadas Exonucleasa III (Exo III) y Endonucleasa IV (Endo IV). Exo III (codificada por el gen *xth*) es una enzima de expresión constitutiva y presenta como función primaria actividad AP-endonucleasa y 3'-diesterasa. Además, presenta actividad 3'-5'-exonucleasa y 3'-fosfomonoesterasa (Kow y Wallace, 1985; Mol *et al.*, 2000). En cambio, Endo IV (codificada por el gen *nfo*) es de expresión inducida principalmente por ROS y presenta actividad 5'-endonucleasa y 3'-diesterasa eliminando grupos 3'-fosfato, 3'-fosfoglicolato y 3'- α - β -aldehídos insaturados (Levin *et al.*, 1988; Mol *et al.*, 2000; Kerins *et al.*, 2003; Golan *et al.*, 2010). Ambas enzimas comparten algunas actividades (3'-fosfatasa y 3'-fosfodiesterasa) que son responsables de eliminar una multitud de grupos bloqueantes, incluyendo los extremos 3'-fosfoglicolato y 3'-fosfato que están presentes en las rupturas de DNA de cadena sencilla inducidas por agentes oxidantes (Mol *et al.*, 2000). Además, aunque inicialmente se consideró que a diferencia de Exo III, Endo IV prácticamente carecía de actividad exonucleasa, posteriormente se ha visto que bajo condiciones apropiadas de reacción, posee también una actividad intrínseca y significativa, 3'-5'-exonucleasa (Golan *et al.*, 2010). No obstante hasta el presente, se desconoce que función biológica tiene esta actividad exonucleasa que comparten ambas enzimas.

Si bien no han sido motivo de estudio en este trabajo, cabe mencionar que en *E. coli* se han descrito otras enzimas específicas con actividad endonucleasa que participan también en el sistema BER. La Endo III (codificada por el gen *nth*) que elimina los anillos saturados o pirimidinas fragmentadas, la Endo VIII (*nei*) que elimina la glicoltimina, la Endo V (*nfi*) que provoca ruptura de cadena en 3' de hipoxantina y uracilo, y la actividad 5' endonucleasa asociada a la DNA polimerasa I (*polA*) (Morita *et al.*, 2010). Una vez que se han procesado los centros abásicos por acción de las Endonucleasas, la DNA polimerasa I sustituye el nucleótido y posteriormente la DNA ligasa une la cadena. De acuerdo con el número de nucleótidos que deben ser sustituidos, las dos últimas etapas de reparación

pueden ser llevadas a cabo mediante el *short-patch* (cuando se reemplaza un nucleótido) o el *long-patch* (cuando se reemplazan de 2 a 10 nucleótidos) tal como se observa en la figura 1.7 (Carpenter *et al.*, 2007; Liu Y. *et al.*, 2007; Morita *et al.*, 2010).

Cabe destacar que cuando el sistema BER es insuficiente para reparar los daños generados en el DNA, se activan otros sistemas de reparación, como el apareamiento incorrecto de bases, la reparación homóloga o la respuesta SOS (Sikora *et al.*, 2010).

1.4.4. RESPUESTA SOS

La respuesta SOS es una respuesta celular global que actúa ante un daño generalizado en el DNA causado por agentes externos como la radiación ultravioleta, MMS, mitomicina, BM u otros compuestos químicos que rompen el DNA, detienen su replicación o la división celular (Arenson *et al.*, 1999; Mckenzie *et al.*, 2000).

La inducción de la respuesta SOS involucra alrededor de 43 genes que están bajo control directo o indirecto del represor transcripcional LexA (Goodman, 2002). Entre los genes regulados por LexA destacan: *recA*, *recN*, *ruvAB* (implicados en mecanismos de reparación del DNA mediante recombinación homóloga), *uvrAB* y *uvrD* (involucrados en el sistema de reparación por escisión de nucleótidos), *dinB* y *umuDC* (genes que codifican las DNA polimerasas IV y V respectivamente, involucradas en procesos de reparación propensos a error) y *polB* (que codifica la DNA polimerasa II, involucrada en el reinicio de replicación libre de error) (Mckenzie *et al.*, 2000; Goodman, 2002; Krishna *et al.*, 2007; Janion, 2008). La formación de mutaciones dirigidas en el lugar dónde se ha generado el daño en el DNA parece ser la base de la respuesta SOS y solo ocurre en circunstancias en que el proceso no mutagénico es insuficiente para restablecer la replicación (Schlacher *et al.*, 2006). Cabe destacar, la participación de la proteína SSB en la respuesta SOS, puesto que es esencial para la unión de RecA a ssDNA (Bianco *et al.*, 1998; Kuzminov, 1999; Morita *et al.*, 2010) y además, interacciona con las DNA Polimerasas II, III, IV y V estimulando sus actividades (Furukohri *et al.*, 2012).

La respuesta SOS (Figura 1.8) se inicia cuando la proteína RecA se activa por su unión a regiones de cadena sencilla de DNA (ssDNA), generadas por interrupción en la replicación del DNA dañado. El hecho de que RecA presente una fuerte tendencia de formar un filamento nucleoproteico sobre el ssDNA evita su destrucción. La proteína RecA activada (RecA*) actúa como coproteasa en el proceso de autorruptura proteolítica del represor LexA, induciendo así la expresión del regulón que este represor controla (genes SOS). Además, RecA* también facilita la ruptura de un fragmento del extremo aminoterminal de UmuD generando UmuD'. Dos moléculas de UmuD' se combinan con una de UmuC para formar la mutagénica

DNA polimerasa V en la última fase de la inducción de la respuesta SOS (Mckenzie *et al.*, 2000; Goodman, 2002; Krishna *et al.*, 2007; Janion, 2008).

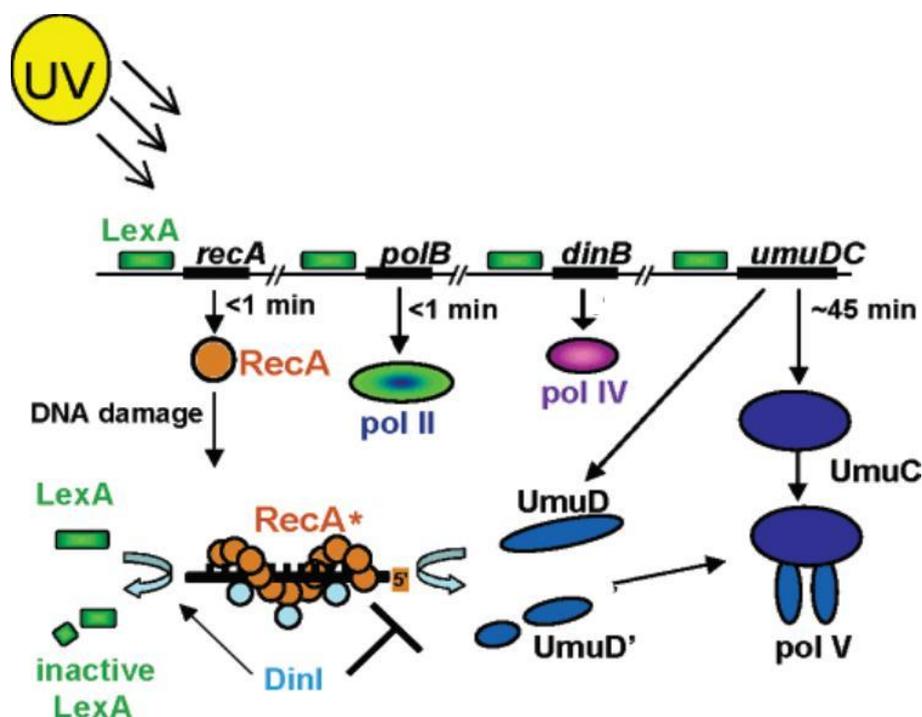


Figura 1.8. Inducción de la respuesta SOS en *E. coli*. La proteína LexA (verde) es un represor de la expresión de genes involucrados en la respuesta SOS. Bajo exposición a agentes genotóxicos como la radiación UV, RecA (naranja) forma un filamento sobre los fragmentos de DNA de cadena sencilla (ssDNA), asumiendo así su forma activa (RecA*). RecA activa cataliza la auto-ruptura del represor LexA, permitiendo la inducción de los genes SOS. Genes con operadores unidos débilmente a LexA son inducidos poco después del daño generado en el DNA, mientras que los genes con operadores unidos fuertemente a LexA son inducidos en la fase tardía de la respuesta SOS. RecA es una de las primeras proteínas inducidas frente al daño en el DNA, mientras que UmuD y UmuC (azul) son inducidas mucho más tarde. RecA* cataliza la proteólisis de UmuD para formar UmuD'. Dos moléculas de UmuD' se combinan con una de UmuC para formar la DNA polimerasa V. La proteína DinI regula la formación tardía de la DNA PolV por inhibición de la ruptura de UmuD para formar UmuD' durante la primera fase de la respuesta SOS. El gen *polB* codifica la DNA polimerasa II, que es expresada al principio (1min después de la exposición a UV) y está involucrada en el reinicio de la replicación libre de error. La DNA polimerasa V, que es mutagénica, sólo es expresada 45 min después de la exposición a UV. (Tomado de Schlacher *et al.*, 2006)

El Papel de la Pol V es catalizar la síntesis de DNA translesión, permitiendo así la duplicación del DNA dañado, con frecuencia, a costa de la fidelidad replicativa, en la que conduce la mutación. Cabe destacar que en la última fase de la inducción de la respuesta SOS también se expresa la proteína Sula, que inhibe la división celular y que tiene como finalidad impedir la segregación de las células hijas con lesiones

en el DNA. La inducción de esta respuesta provoca la filamentación celular aumentando así el período de tiempo en que el DNA puede ser reparado (Janion, 2008).

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo ha sido identificar nuevas funciones de GAPDH en *E. coli*. Para lograrlo nos hemos planteado:

- 1) Estudiar la capacidad de GAPDH de interactuar con DNA y actuar como regulador de la expresión génica, utilizando como modelo el gen *ndh* que codifica la NADH deshidrogenasa-2.
- 2) Abordar estudios de interacción proteína-proteína como aproximación para identificar nuevas funciones de GAPDH.
 - Identificar proteínas que interactúan con GAPDH *in vivo*.
 - Validar por otras metodologías las interacciones identificadas.
 - Caracterizar la interacción entre GAPDH y fosfoglicolato fosfatasa.
- 3) Determinar la participación de GAPDH en los procesos de reparación del DNA.
 - Analizar la respuesta de células silenciadas en GAPDH frente a la exposición a agentes genotóxicos.
 - Analizar la interacción de GAPDH con proteínas involucradas en sistemas de reparación del DNA.
- 4) Profundizar en el estudio de la interacción de GAPDH con la chaperona CesT del sistema de secreción de proteínas T3SS

2

MATERIALES

2. MATERIALES

2.1. CEPAS BACTERIANAS

Todas las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo son derivadas de *Escherichia coli* K-12 (excepto BL21 que es derivada de *E. coli* B). En la tabla 2.1 se detallan las características más importantes de las cepas y su referencia.

Tabla 2.1. Cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo. Para cada cepa se indica su nombre, descripción del genotipo o fenotipo y su referencia.

CEPAS DE LABORATORIO		
CEPA	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
AGI(ME5053)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r_k⁻ m_k⁻) supE44 realA1</i>	NBRP; Kitagawa <i>et al.</i> (2005)
BL21(DE3)	<i>E.coli B, F⁻ ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm λ (DE3)</i>	Amersham Pharmacia
BTH101	<i>F⁻ cya-99 araD139 galE15 galK16 rpsL1 (Str^r) hsdR2 mcrA1 mcrB1</i>	Euromedex
DHM1	<i>F⁻ cya-854 recA endA1 gyrA96 (Nal^r) thi1 hsdR17 spoT1 rfbD1 glnV44(AS)</i>	Euromedex
M15	Nal ^s Str ^s Rif ^s Thi ⁻ Lac ⁻ Ara ⁺ Gal ⁺ Mtl ⁻ F ⁻ RecA ⁺ Uvr ⁺ Lon ⁺	Qiagen
MC4100	<i>F⁻ araD (argF-lac) rpsL(Str^r) relA flhD deoC ptsF rbs</i>	Casadaban (1976)
MC4100Δ <i>gapA</i>	MC4100Δ <i>gapA::tet</i>	Este estudio
JA210	MC4100 <i>gph::Kan</i>	Pellicer <i>et al.</i> (2003)
TE2680	<i>F⁻ λ IN(rrnD-rrnE) 1Δ (lac)X74 rpsL galK2 recD1903::Tn10d-Tet trpDC700::putPA1303::[Kn^s-Cm^r-lac]</i>	Elliot (1992)
TOP10	<i>F⁻ ΔmcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^r) endA1 nupG</i>	Invitrogen
W3CG	<i>F⁻ λ thyA36 deoC2 IN (rrnD-rrnE) (W3110) ΔgapA::tet supE</i>	Ganter and Plückthun (1990)
W3CG ^{Glu+}	<i>F⁻ λ thyA36 deoC2 IN (rrnD-rrnE) (W3110) supE</i>	Este estudio
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lac1^qΔM15Tn10(Tc^r)]</i>	Stratagene

2.2. VECTORES

Para la realización de este trabajo se han utilizado diferentes tipos de vectores, tanto plasmídicos como fágicos. Los vectores plasmídicos fueron utilizados principalmente para el clonaje de genes, así como para la expresión y purificación de proteínas. En algunos casos han sido utilizados también para la construcción de fusiones transcripcionales y ensayos de actividades enzimáticas. Por otro lado, los vectores fágicos han sido utilizados para la transducción de material genético entre cepas bacterianas.

Tabla 2.2. Vectores utilizados en este trabajo. Para cada vector se indica su nombre, la descripción de sus principales características y su origen o referencia.

VECTOR	APLICACIÓN	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
PLÁSMIDOS			
pRS551	Fusiones transcripcionales	Amp ^r Kan ^r <i>LacZYA</i>	Simons <i>et al.</i> (1987)
pBADTOPO	Expresión y purificación de proteínas fusionadas a V5	Tag-V5-His ₆ Amp ^r <i>araC</i>	Invitrogen
pCA24N	Expresión y purificación de proteínas fusionadas a His ₆	His ₆ -Tag Amp ^r <i>lac^q</i>	NBRP; Kitagawa <i>et al.</i> (2005)
pGEX-3X	Expresión y purificación de proteínas fusionadas a GST	GST-Tag Amp ^r <i>lac1^q</i>	Amersham
pGEM-T	Clonaje de fragmentos con extremos 3' dA	Amp ^r α - <i>lacZ</i>	Promega
pHN678	Obtención RNA antisentido	pACYC ori Cm ^r <i>lacI^q</i> P _{trc} <i>lac^o</i> -PT-MCS	Nakashima y Tamura (2009)
pHN1009	Obtención RNA antisentido	pBR322 ori Amp ^r <i>lacI^q</i> P _{trc} <i>lac^o</i> -PT-MCS	Nakashima y Tamura (2009)
pHN1242	Obtención RNA antisentido	pSC101 ori Kan ^r <i>lacI^q</i> P _{trc} <i>lac^o</i> -PT-MCS	Nakashima y Tamura (2009)
pQE30	Expresión y purificación de proteínas fusionadas a His ₆	His ₆ -Tag Amp ^r	Qiagen
pKNT25	Doble híbrido	Kan ^r T25 (1-224 Aa _(s) de CyaA)	Euromedex
pKT25	Doble híbrido	Kan ^r T25 (1-224 Aa _(s) de CyaA)	Euromedex
pUT18	Doble híbrido	Amp ^r T18 (225-399 Aa _(s) de CyaA)	Euromedex
pUT18C	Doble híbrido	Amp ^r T18 (225-399 Aa _(s) de CyaA)	Euromedex
PLÁSMIDOS RECOMBINANTES			
pKT25- <i>zip</i>	Doble híbrido (Control+)	Kan ^r T25 <i>leu-zipper</i>	Euromedex
pUT18C- <i>zip</i>	Doble híbrido (Control+)	Amp ^r T18 <i>leu-zipper</i>	Euromedex

PLÁSMIDOS RECOMBINANTES	APLICACIÓN	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
ASKA JW3712	Expresión y purificación de His ₆ -AtpA	pCA24N- <i>atpA</i>	NBRP; Kitagawa <i>et al.</i> (2005)
ASKA JW3710	Expresión y purificación de His ₆ -AtpD	pCA24N- <i>atpD</i>	NBRP; Kitagawa <i>et al.</i> (2005)
ASKA JW2146	Expresión y purificación de His ₆ -EndoIV	pCA24N- <i>nfo</i>	NBRP; Kitagawa <i>et al.</i> (2005)
ASKA JW4020	Expresión y purificación de His ₆ -SSB	pCA24N- <i>ssb</i>	NBRP; Kitagawa <i>et al.</i> (2005)
ASKA JW3518	Expresión y purificación de His ₆ -Tag	pCA24N- <i>tag</i>	NBRP; Kitagawa <i>et al.</i> (2005)
ASKA JW2201	Expresión y purificación de His ₆ -Ada	pCA24N- <i>ada</i>	NBRP; Kitagawa <i>et al.</i> (2005)
ASKA JW2053	Expresión y purificación de His ₆ -AlkA	pCA24N- <i>alkA</i>	NBRP; Kitagawa <i>et al.</i> (2005)
pGEX- <i>gapA</i>	Expresión y purificación de GST-GAPDH	GST- <i>gapA</i>	Egea <i>et al.</i> (2007)
pGEX- <i>gph</i>	Expresión y purificación de GST-PGPasa	GST- <i>gph</i>	Pellicer <i>et al.</i> (2003)
pGEX- <i>ogt</i>	Expresión y purificación de GST-Ogt	GST- <i>ogt</i>	Este estudio
pHN678- <i>gapA</i> asRNA-1	Obtención RNA antisentido de <i>gapA</i>	<i>gapA</i> -asRNA (-76/+86)	Este estudio
pHN678- <i>gapA</i> asRNA-2	Obtención RNA antisentido de <i>gapA</i>	<i>gapA</i> -asRNA (-97/+70)	Este estudio
pHN1009- <i>gapA</i> asRNA-1	Obtención RNA antisentido de <i>gapA</i>	<i>gapA</i> -asRNA (-76/+86)	Este estudio
pHN1009- <i>gapA</i> asRNA-2	Obtención RNA antisentido de <i>gapA</i>	<i>gapA</i> -asRNA (-97/+70)	Este estudio
pHN1242- <i>gapA</i> asRNA-1	Obtención RNA antisentido de <i>gapA</i>	<i>gapA</i> -asRNA (-76/+86)	Este estudio
pHN1242- <i>gapA</i> asRNA-2	Obtención RNA antisentido de <i>gapA</i>	<i>gapA</i> -asRNA (-97/+70)	Este estudio
<i>gapA</i> -pKNT25	Doble híbrido	<i>gapA</i> -T25	Este estudio
pKT25- <i>gapA</i>	Doble híbrido	T25- <i>gapA</i>	Este estudio
pUT18- <i>gapA</i>	Doble híbrido	T18- <i>gapA</i>	Este estudio
<i>gapA</i> -pUT18C	Doble híbrido	<i>gapA</i> -T18	Este estudio
pUT18- <i>pykF</i>	Doble híbrido	T18- <i>pykF</i>	Este estudio
<i>tufA</i> -pUT18C	Doble híbrido	<i>tufA</i> -T18	Este estudio
pQE30- <i>tnaA</i>	Expresión y purificación de His ₆ -TnaA	His ₆ - <i>tnaA</i>	Este estudio
pQE30- <i>xthA</i>	Expresión y purificación de His ₆ -ExoIII	His ₆ - <i>xthA</i>	Este estudio
pQE30- <i>tufA</i>	Expresión y purificación de His ₆ -EF-Tu	His ₆ - <i>tufA</i>	Este estudio
pQE30- <i>cesT</i>	Expresión y purificación de His ₆ -CesT	His ₆ - <i>cesT</i>	Aguilera <i>et al.</i> (2012)

FAGOS	APLICACIÓN	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
P1	Transducción	P1 <i>vir</i>	Miller (1992)

2.3. OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo como cebadores en reacciones de PCR y secuenciación de DNA han sido suministrados por Sigma-Aldrich. Como norma general, los oligonucleótidos fueron diseñados 100% homólogos a la secuencia a la que debían hibridar, excepto en algunos casos en que se añadieron al extremo 5' secuencias que contenían dianas para endonucleasas de restricción, de tal forma que se facilitase la posterior clonación del producto de PCR resultante.

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se detallan en el ANEXO.1.

2.4. REACTIVOS Y *KITS* COMERCIALES

Los reactivos utilizados en este trabajo fueron adquiridos de la máxima pureza y calidad requerida en cada caso. La conservación (temperatura, humedad, efecto de la luz) y manipulación (esterilidad, toxicidad, preparación extemporánea) se realizaron siguiendo las indicaciones del fabricante.

Los diferentes *kits* utilizados han sido suministrados por diferentes casas comerciales, según se detallará oportunamente y, salvo que se indique lo contrario, se siguieron los protocolos en ellos incluidos.

2.5. SOPORTE INFORMÁTICO

2.5.1. PROGRAMAS INFORMÁTICOS

- **Omiga v2.0:** Programa desarrollado por Oxford Molecular Ltd (GCG, Madison, WI. USA). Este programa permite acceder a bases de datos para recuperar secuencias, conocer posibles marcos de lectura, elaborar mapas de restricción, alinear secuencias, etc. Se ha empleado para analizar secuencias tanto de nucleótidos como de aminoácidos.
- **Chromas Lite v2.01:** Este programa ha sido empleado para procesar los resultados de las reacciones de secuenciación del DNA. Se encuentra disponible en la *web* http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html.

- **BLAST** (*Basic Local Alignment Search Tool*, Altschul *et al.*, 1997): Este programa se encuentra disponible a través de la página web del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, y permite hacer un estudio comparativo de las secuencias obtenidas con las descritas en las bases de datos.
- **WEBCUTTER 2.0**: Este programa ha sido utilizado para localizar dianas de restricción en las secuencias de nucleótidos. Está disponible a través de la página web <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2> (Webcutter 2.0, copyright 1997 Max Heiman).
- **PASW Statistics 17**: Este programa se ha utilizado para analizar la significación estadística de los resultados.

2.5.2. BASES DE DATOS

Las principales bases de datos utilizadas en este trabajo han sido:

- **GENBANK**: Es una base de datos de ácidos nucleicos que está producida y mantenida por el NCBI en colaboración con otros organismos como el EMBL (Benson *et al.*, 1999). Se puede acceder en la dirección: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- **SWISS-PROT**: Base de datos de proteínas que incluye información de diferentes fuentes. Se puede acceder en la dirección <http://www.expasy.ch>.
- **DIP** (Data Base of Interacting Proteins): Base de datos de interacción entre proteínas experimentalmente determinados. Se puede acceder en la dirección: <http://dip.doe-mpi.ucla.edu>.
- **IntAct**: Base de datos de interacción entre proteínas. Acceso: <http://www.ebi.ac.uk>.
- **STRING Interaction Network**: Bases de datos dónde se predicen interacciones entre proteínas. Acceso: <http://string-db.org>.

3

MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

3.1.1. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO BACTERIANO

Los crecimientos bacterianos se realizaron utilizando distintos medios de cultivo, completos o mínimos, a diferentes condiciones de temperatura, en función de la cepa utilizada y el tipo de experimento que se pretendía llevar a cabo.

Se utilizaron medios de cultivo líquidos y sólidos. Para los cultivos líquidos se utilizaron tubos de ensayo o *Erlenmeyers*. El volumen del cultivo era normalmente un 10% del volumen total del recipiente utilizado. En este caso, las cepas bacterianas se cultivaban siempre a una temperatura óptima y en agitación constante a 250rpm, en un agitador orbital. El crecimiento bacteriano se determinaba midiendo la absorbancia de los cultivos a una λ de 600nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV240. Para la preparación de los cultivos sólidos se adicionaba al medio líquido 1.5% (p/v) de agar bacteriológico. Estos cultivos se realizaban en placas de Petri y el crecimiento se llevaba a cabo en un incubador termostatzado a la temperatura deseada.

Los medios de cultivo se esterilizaron a 121°C y una atmosfera de presión durante 30 minutos. Los compuestos termosensibles, fueron esterilizados mediante filtración (tamaño de poro: 0.22 μ m).

Con la finalidad de mantener viables las cepas bacterianas durante largos períodos de tiempo, éstas se almacenaban con 20% de glicerol a una temperatura de -80°C.

3.1.1.2. Composición de los medios de cultivo

Medio de cultivo completo o rico: Este tipo de medio contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de la mayoría de cepas, por lo que no requiere la adición de fuentes de carbono o nitrógeno exógenas. Para este trabajo se ha utilizado el medio LB (*Lysogeny Broth*; Bertani, 2004).

LB	
Triptona	1% p/v
Extracto de levadura	0.5% p/v
NaCl	0.5% p/v

Medio mínimo: En este trabajo se ha utilizado el medio mínimo SM. Este medio consiste en un medio mineral basal (Boronat y Aguilar, 1979), suplementado con una fuente de carbono, a una concentración final de 60mM carbono. Para el mutante *knockout* deficiente en GAPDH se utilizó el medio de cultivo mínimo (SM) suplementado con malato 30mM + glicerol 20mM como fuente de carbono (Ganter y Plückthun, 1990) Cuando se indica, se utilizó el medio SM suplementado con hidrolizado de caseína (CAA) 0.5% + glicerol 20mM.

En algunos experimentos específicos, se ha utilizado el medio mínimo MT con una concentración baja de fosfato (Schurig-Bricio *et al.*, 2008).

SM		MT	
NaH ₂ PO ₄	34mM	NaCl	99mM
K ₂ HPO ₄	64mM	KCl	50mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	20mM	CaCl ₂	1mM
FeSO ₄	0.001mM	Na ₄ Cl	21mM
MgSO ₄	0.3mM	Na ₂ SO ₄	1mM
CaCl ₂	0.01mM	KH ₂ PO ₄	2mM
		Tris	100mM
		FeCl ₃	1.7μM
		MgSO ₄	0.8mM

Para el crecimiento de cepas bacterianas con resistencia a antibióticos, estos se adicionaban al medio de cultivo a las siguientes concentraciones:

Antibióticos	Concentración
Ampicilina	100μg/ml
Tetraciclina	12.5μg/ml
Kanamicina	25μg/ml
Cloranfenicol	30μg/ml

Para el crecimiento de cepas con fusiones transcripcionales, se adicionaba triptófano a una concentración de 0.1mM. Para la selección de determinados clones recombinantes, se añadía X-Gal a una concentración final de 0.30μg/ml. La concentración de IPTG y de otros inductores que se adicionaban al medio, se especificará en los apartados correspondientes a resultados, ya que era variable según la proteína que se quería expresar.

3.1.2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Las células competentes son aquellas que han estado sometidas a un tratamiento que aumenta su capacidad para incorporar DNA circular exógeno. Se pueden obtener células competentes mediante métodos físicos o químicos.

Para la realización de este trabajo se obtuvieron células competentes de distintas cepas de *Escherichia coli*, mediante dos métodos químicos, el del TFB y el del cloruro cálcico.

3.1.2.1. Mediante TFB

Este método fue descrito por Hanahan en 1995. Se basa en la permeabilización de la membrana celular mediante diferentes cationes divalentes presentes en el tampón de transformación (TFB), así como por la presencia de DMSO y DTT.

Las células competentes obtenidas por este método presentan una eficiencia elevada de transformación. Se recomienda utilizarlas en las inmediatas horas después de su obtención, no siendo viable su almacenamiento.

Procedimiento

1. Inocular la cepa que se quiere hacer competente en 2ml de LB e incubar durante 16h a 37°C en constante agitación.
2. Añadir 200µl de este cultivo a un matraz de 10ml de LB. Incubar en agitación constante a 37°C hasta alcanzar una D.O. a 600nm de 0.5.
3. Parar el crecimiento enfriando las células a 4°C durante 10min. (A partir de este punto las células han de mantenerse siempre a esta temperatura).
4. Recoger las células mediante centrifugación a 3.600xg durante 10min.
5. Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 3ml de TFB.
6. Dejar 10min en hielo.
7. Centrifugar 10min a 3.600xg.
8. Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 0.8ml de TFB.
9. Añadir 28µl de DMSO/DTT. Dejar 10min en hielo.
10. Adicionar otros 28µl de DMSO/DTT y dejar en hielo un mínimo de 10min. A partir de este momento las células ya son competentes.

TFB (<i>Transformation Buffer</i>)		Solución DMSO/DTT	
MES-K pH 6.2	10mM	Acetato potásico pH 7.5	10mM
KCl	100mM	DTT	1M
MnCl ₂	10mM	DMSO	90% p/v
		Guardar en alícuotas a -20°C	

3.1.2.2. Mediante CaCl₂

Este procedimiento se basa en el método descrito por Ausubel *et al.*, 1991 en el que la membrana celular se permeabiliza mediante iones Ca²⁺. Este método tiene la ventaja adicional de que las células competentes pueden conservarse a -80°C hasta su utilización.

Procedimiento

1. Inocular la cepa a tratar en LB. Incubar durante 12-16h a 37°C en constante agitación.
2. Reinocular 1ml de este cultivo a un matraz con 100ml de LB. Incubar a 37°C en constante agitación hasta que el cultivo alcance una DO a 600nm igual a 0.4 (por encima de este valor disminuye la eficacia de transformación).
3. Mantener el cultivo durante 10min en hielo para detener el crecimiento
4. Recoger las células por centrifugación a 4.500xg durante 10min a 4°C. A partir de este momento las células han de permanecer a esta temperatura.
5. Resuspender cuidadosamente el sedimento celular en 20ml de solución de CaCl₂ atemperada a 4°C.
6. Centrifugar a 4.000xg durante 5min a 4°C.
7. Resuspender de nuevo el sedimento celular en 20ml de solución de CaCl₂. Incubar las células resuspendidas durante 30min en hielo.
8. Centrifugar a 4.000xg durante 5min a 4°C.
9. Resuspender finalmente el sedimento celular en 4ml de solución de CaCl₂. Incubar durante un mínimo de 1h en hielo.
10. Distribuir en alícuotas de 200µl. Guardar a -80°C hasta el momento de su utilización.

Solución de CaCl₂	
Tris-HCl pH 7.0	10mM
CaCl ₂	60mM
Glicerol	15% v/v

3.1.3. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES POR CHOQUE TÉRMICO

El objetivo de la transformación de células competentes es la internalización de DNA circular exógeno a la célula bacteriana para que este pueda replicarse utilizando la maquinaria celular. Las células que incorporan el DNA circular de interés se seleccionan mediante resistencia al antibiótico que confiere el plásmido.

En este trabajo las células competentes obtenidas por métodos químicos, mediante TFB o CaCl₂ (MÉTODOS 3.1.2.1 y 3.1.2.2) se transformaron por choque térmico.

Este proceso consiste en provocar la entrada de DNA exógeno al someter las células competentes a cambios bruscos de temperatura.

Procedimiento

1. Poner en contacto 200µl de células competentes con 1-500ng del DNA a transformar contenidos en un volumen máximo de 20µl. Mantener la mezcla en hielo durante 30min.
2. Someter la mezcla a un choque térmico por incubación a 37°C durante 5min o 42°C durante 2min, seguido de una nueva incubación de 2min en hielo.
3. Añadir medio de cultivo LB (800µl LB/200µl células). Mezclar suavemente por inversión e incubar durante 1h a 37°C sin agitación.
4. Sembrar en placas de LB a las que se les ha añadido el antibiótico adecuado para seleccionar las células transformantes. Incubar 12-16h a 37°C.

3.1.4. TRANSDUCCIÓN GENERALIZADA CON EL BACTERIÓFAGO P1

Este proceso permite la transferencia de material genético de una cepa donadora a una receptora a través de la acción de un bacteriófago o fago. El método utilizado para la transducción generalizada con el bacteriófago P1 está basado en el descrito por Goldberg, 1974.

3.1.4.1. Preparación de un lisado P1

Los lisados se obtuvieron por crecimiento de la cepa donadora en presencia del fago P1 y Ca^{2+} . Este catión permite la adsorción del fago a la pared bacteriana y la posterior penetración del mismo en la célula huésped. El fago se replica en el interior de la cepa donadora incorporando en su genoma fragmentos de DNA de ésta y produciendo la lisis bacteriana.

Procedimiento

1. Inocular la cepa donadora en un tubo con 2ml de LB suplementado con el antibiótico apropiado e incubar a 37°C durante 12-16h en agitación.
2. Transferir 200µl de este cultivo a varios matraces con 10ml de LB + CaCl_2 5mM. Adicionar a cada matraz diluciones diferentes obtenidas a partir de una solución del bacteriófago P1 salvaje de concentración aproximada 10^9 pfu/ml e incubar a 37°C en agitación. Mantener un cultivo sin adición de fago como control.
3. Tras un período de 5-6 horas, escoger el cultivo que haya lisado por completo. Adicionar a este cultivo unas gotas de cloroformo. Mantener en agitación a 37°C durante 30 minutos.
4. Centrifugar el cultivo durante 15min a 12.000xg a 4°C.
5. Transferir el sobrenadante, que constituye el lisado P1, a un tubo estéril, adicionar unas gotas de cloroformo y guardar a 4°C.

3.1.4.2. Transducción a genoma

Para llevar a cabo el proceso de transducción se sigue un proceso análogo al desarrollado para la obtención del lisado pero impidiendo, en este caso, que se produzca la lisis bacteriana. La infección se detiene mediante la adición de un agente quelante, citrato sódico, que secuestra el catión Ca^{2+} . De esta forma se favorece la lisogenia (incorporación del material fágico al cromosoma bacteriano mediante recombinación homóloga).

Procedimiento

1. Inocular la cepa receptora en 2ml de LB + CaCl_2 5mM. Incubar a 37°C hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial.
2. Mezclar en un tubo estéril, células receptoras y la solución del fago P1 (obtenida sobre la cepa donadora de interés) en proporción 2:1 (v/v).
3. Incubar a 37°C sin agitación durante 30 minutos.
4. Añadir citrato sódico (concentración final de 20mM). Mezclar y sembrar diferentes volúmenes en placas selectivas a las que se ha añadido citrato sódico 20mM.
5. Incubar las placas a 37°C durante 12-16h.
6. Purificar los transductantes obtenidos usando el mismo tipo de placa (3 veces).

3.2. ANÁLISIS Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

3.2.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES

Los extractos celulares se obtuvieron mediante disrupción por ultrasonidos según el procedimiento descrito por Boronat y Aguilar, 1979.

Procedimiento

1. Realizar un cultivo de la cepa de la que se quiere obtener el extracto celular en las condiciones adecuadas para cada experimento.
2. Recoger las células por centrifugación a 4.500xg a 4°C durante 10 min.
3. Resuspender el sedimento celular en un volumen de solución tampón equivalente a 4 veces su peso húmedo (el tampón utilizado dependerá del posterior uso a que se destine el extracto).
4. Someter la suspensión celular a una descarga ultrasónica, a una amplitud de onda de 12-14 micrones, durante 20s, por 4 veces, para cada mililitro de suspensión. Durante este proceso la muestra se mantiene en una mezcla refrigerante compuesta de agua, hielo y NaCl. Para este proceso se utilizó un sonicador MSE de 150W.
5. Centrifugar la mezcla obtenida en el paso anterior a 12.000xg a 4°C durante 30 minutos. Recoger la fracción sobrenadante, que constituye el extracto celular o extracto crudo, y que se corresponde con los espacios periplasmático y citosólico. Estas muestras pueden guardarse a -20°C.

3.2.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE LOWRY

La cuantificación de proteínas en los extractos celulares y en las diferentes fracciones de purificación se determinó siguiendo una modificación del método descrito por Lowry *et al.*, 1951 que permite determinar la concentración de proteínas en el rango de 20-200µg/ml. Las determinaciones se hicieron por duplicado y a partir de diferentes diluciones de la muestra problema. El valor de concentración era la media de los valores obtenidos, siempre que éstos no se diferenciassen de la media en más de un 10%.

Procedimiento

1. Preparar diferentes diluciones de BSA en el rango 20-200µg/ml con NaCl 0.9%. Estas muestras servirán para elaborar la recta patrón.
2. Realizar diferentes diluciones de la muestra problema con NaCl 0.9%.
3. Preparar alícuotas de 200µl de cada dilución patrón y muestra problema.
4. Añadir 200µl de reactivo alcalino. Agitar y dejar en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Añadir 800µl de reactivo de Folin Ciocalteu 0.1N y agitar vigorosamente.

Reactivo alcalino		Folin Ciocalteu	
Tartrato sódico potásico	10% p/v		
CuSO ₄	0.05% p/v		
NaOH	0.5M		
Na ₂ CO ₃	10% p/v		
*Preparar añadiendo los reactivos en el orden establecido en su composición para evitar la formación de un precipitado.		½ del volumen final de Folin-Ciocalteu 2N	
		½ del volumen final de H ₂ O destilada y desionizada	

3.2.3. PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

3.2.3.1. Precipitación con sulfato de amonio

El sulfato de amonio precipita las proteínas de forma diferencial atendiendo al porcentaje de saturación. En este trabajo este método ha sido empleado para purificar la fracción γ -globulina del suero de conejo.

Procedimiento:

1. Precipitar las γ -globulinas adicionando sulfato de amonio a una concentración final del 35%.
2. Incubar a 4°C durante 1h como mínimo.
3. Centrifugar las proteínas precipitadas a 16.000xg a 4°C durante 30 min.
4. Resuspender en el tampón adecuado para cada experimento. Antes de su utilización es recomendable dializar la muestra con el mismo tampón para eliminar los restos de sulfato de amonio.

3.2.3.2. Precipitación con ácido tricloroacético (TCA)

Tanto la precipitación de proteínas con TCA como la precipitación con acetona, que se describe en el siguiente apartado, han sido utilizadas en este trabajo, para analizar las proteínas que co-purificaban con proteínas recombinantes y que no se encontraban en concentraciones suficientes para ser detectadas directamente.

Procedimiento

1. Precipitar las proteínas de la muestra de interés mediante la adición de TCA al 10%.
2. Incubar a 4°C durante 1h como mínimo.
3. Centrifugar las proteínas precipitadas a 16.000xg a 4°C durante 30 min.
4. Descartar el sobrenadante y lavar las proteínas con acetona fría al 90% y centrifugar a 16.000xg durante 30 min.
5. Repetir el paso 4.
6. Descartar la acetona y eliminar los restos de acetona evaporándola a 37°C.
7. Resuspender las proteínas precipitadas con el tampón adecuado para cada experimento.

3.2.3.3. Precipitación con acetona**Procedimiento**

1. Precipitar las proteínas de la muestra de interés mediante la adición de 90% de acetona pura.
2. Incubar a 4°C durante 1h30 minutos como mínimo.
3. Centrifugar las proteínas precipitadas a 16.000xg a 4°C durante 30 min.
4. Descartar el sobrenadante y eliminar por evaporación los restos de acetona a 37°C.
5. Resuspender las proteínas precipitadas con el tampón adecuado para cada experimento.

Normalmente, los tampones utilizados en este trabajo para resuspender las proteínas precipitadas fueron: Tris-HCl 100mM pH 7.4, tampón de carga para electroforesis monodimensional de proteínas o tampón de rehidratación para electroforesis bidimensional.

3.2.4. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para la purificación de las proteínas recombinantes, se llevó a cabo en primer lugar la expresión de estas proteínas siguiendo el protocolo general descrito a continuación. Este protocolo fue adaptado a las condiciones óptimas de expresión para cada proteína tal como se indicará en cada caso.

Procedimiento

1. Clonar el gen que codifica la proteína que se pretende purificar en el vector adecuado. (MÉTODOS 3.6.10)
2. Inocular 1 colonia que contiene el plásmido recombinante en 2ml de LB suplementado con el antibiótico adecuado e incubar a 37°C en constante agitación durante 12-16h.
3. Reinocular en 100ml de LB (dilución 1:100) suplementado con antibiótico e incubar en las mismas condiciones hasta alcanzar una DO a 600nm de 0.5.
4. Añadir el inductor a una concentración adecuada para la expresión de la proteína de interés. Incubar por un determinado período de tiempo (entre 3-16h) y temperatura (20°C o 37°C) adecuados para la expresión de cada proteína. Mantener en constante agitación.
5. Recoger las células por centrifugación a 4.500rpm, a 4°C durante 10min. Descartar el sobrenadante. El sedimento celular puede conservarse a -20°C para su uso posterior.
6. Resuspender el sedimento celular en el tampón apropiado y obtener el extracto celular (MÉTODOS 3.2.1) Comprobar el nivel de expresión de la proteína recombinante mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS (MÉTODOS 3.2.10.1).
7. Proceder a la purificación (MÉTODOS 3.2.5).

3.2.5. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS FUSIONADAS A GST

En este trabajo, el sistema de expresión y purificación de proteínas fusionadas a glutation-S-transferasa (GST) se utilizó para las proteínas gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), fosfoglicolato fosfatasa (PGPasa) y O⁶-metilguanina-DNA-transferasa (Ogt).

3.2.5.1. Expresión

Los genes que codifican estas proteínas fueron clonados en el vector pGEX-3X que permite fusionarlas a un *tag* de GST en su extremo N-terminal. Otra característica de este vector es que presenta un sitio de reconocimiento para el Factor Xa de modo que permite la obtención de la proteína sin el *tag*. En este sistema la expresión de la proteína de fusión está bajo el control del promotor *tac* y el operador *lac*. En ausencia de inducción, el operador *lac* se encuentra ocupado por el represor Lac I, codificado por el propio vector, impidiéndose la expresión de la

proteína de fusión, que sólo tiene lugar cuando se adiciona IPTG al medio de cultivo. Además, este vector presenta resistencia a ampicilina.

Los plásmidos recombinantes para la expresión y purificación de PGPasa y GAPDH fueron obtenidos con anterioridad en nuestro laboratorio (Pellicer *et al.*, 2003; Egea *et al.*, 2007).

En este trabajo se ha obtenido el clon recombinante para la expresión de la proteína GST-Ogt. Para ello el gen *ogt* fue amplificado por PCR a partir de DNA genómico de la cepa MC4100. Los cebadores utilizados fueron diseñados para clonar el gen en las dianas de restricción *BamHI* y *EcoRI* (ANEXO.1), manteniendo el marco de lectura en fase. El fragmento resultante fue clonado en el vector pGEX-3X, y después de transformar la cepa XL1-Blue para la propagación de los plásmidos, se seleccionó un plásmido recombinante (pGEX-*ogt*) el cual fue confirmado mediante secuenciación (MÉTODOS 3.6.8). Para aumentar la eficiencia de expresión de la proteína recombinante se introdujo, mediante transformación, el plásmido pGEX-*ogt* en la cepa BL21.

La expresión de las proteínas GST-GAPDH, GST-PGPasa y GST-Ogt se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo general descrito en MÉTODOS 3.2.4, adaptándolo a las condiciones descritas a continuación.

Condiciones de expresión de las proteínas fusionadas a GST			
	GAPDH	PGPasa	Ogt
IPTG	0.1mM	0.5mM	0.25mM
Tiempo	o/n	3h	o/n
T^a	20°C	37°C	20°C

3.2.5.2. Purificación

La purificación de estas proteínas de fusión se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad utilizando la resina *Glutathione Sepharose™ 4B* (GE Healthcare). En este sistema las proteínas fusionadas a GST son inmovilizadas a la matriz debido a su afinidad por el glutatión (sustrato de GST). Seguidamente, estas proteínas pueden ser fácilmente eluidas de la resina mediante la adición de una solución tampón conteniendo una concentración de 10mM de glutatión. Alternativamente, se puede eluir la proteína de interés utilizando una solución tampón a la que se adiciona la proteasa Factor Xa™ (GE Healthcare), que permite eliminar el *tag* de GST y recuperar la proteína nativa.

Procedimiento

1. Diluir el extracto celular 5 veces con PBS complementado con *Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets*[®] (Roche).
2. Preparar la columna con el volumen apropiado de la resina *Glutathione Sepharose 4B*[™] (GE Healthcare). La cantidad de resina dependerá de la cantidad de proteína de fusión a purificar (10mg/ml de resina).
3. Lavar la resina con 5 volúmenes de PBS conteniendo inhibidores de proteasas.
4. Añadir el extracto celular diluido y mantener en contacto con la resina en un agitador orbital durante 1h 30min a 4°C.
5. Abrir la columna y recoger la fracción de la muestra que no queda retenida a la resina (*Flow-through*).
6. Lavar la resina con 12 volúmenes de PBS conteniendo inhibidores de proteasas. Recoger el último lavado.
7. Eluir la proteína de fusión con el tampón GEB (*Glutathion Elution Buffer*) proveído por *GST Bulk*[™] *Kit* (GE Healthcare). Utilizar el mismo volumen de tampón de elución que de resina. Repetir el proceso de elución dos veces más.
8. Si se quiere obtener la proteína sin el *tag*, lavar la resina con 5 volúmenes de tampón de digestión. Digerir la proteína con la proteasa Factor Xa[™] (GE Healthcare) diluida en el tampón de digestión (1U de Factor Xa/100µg de proteína), durante 12-16h a temperatura ambiente. Conservar todas las muestras recogidas para posterior análisis.
9. Analizar las fracciones en un gel de poliacrilamida-SDS (MÉTODOS 3.2.10.1).
10. Determinar la concentración de proteína de las muestras por el método de *Lowry* (MÉTODOS 3.2.2).

PBS	
NaCl	140mM
KCl	2.7mM
Na ₂ HPO ₄	10mM
KH ₂ PO ₄	1.8mM
Añadir <i>Complete Protease Inhibitor Cocktail</i> (Roche) (1 comp/ 50ml)	
Ajustar a pH 7.3	

Tampón de digestión	
Tris-HCl	50mM
NaCl	150mM
CaCl ₂	1mM
Ajustar a pH 7.5	

3.2.6. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS FUSIONADAS A HIS₆TAG

Este sistema fue utilizado en este trabajo para las siguientes proteínas: factor de elongación Tu (EF-Tu), piruvato quinasa (PK), triptofanasa A (TnaA), Cest, las subunidades de la ATP sintasa AtpA y AtpD, las enzimas que participan en la

reparación del DNA endonucleasa IV (Endo IV), exonucleasa III (Exo III), *single stranded DNA binding protein* (SSB), 3-metiladenina-DNA-glicosilasa I (Tag), 3-metiladenina-DNA-glicosilasa II (AlkA) y DNA-metiltransferasa (Ada).

3.2.6.1. Expresión

Para la expresión y purificación de las proteínas EF-Tu, PK, TnaA y Exo III, los genes que codifican estas proteínas fueron previamente clonados en el vector pQE30, que permite fusionar al extremo N-terminal de las proteínas un *tag* de 6 histidinas (*His₆-tag*), siguiendo las instrucciones del *The Qiaexpressionist™ Kit* (Qiagen). En este sistema la expresión de la proteína de fusión está bajo regulación del promotor T5 y del represor Lac que es expresado por el plásmido pREP4 presente en la cepa M15 recomendada por el *kit*. La expresión de las proteínas recombinantes se lleva a cabo mediante la adición de IPTG al medio de cultivo. El vector pQE30 confiere resistencia a ampicilina y el pREP4 a kanamicina.

Para la clonación, los genes de interés fueron amplificados por PCR empleando como molde DNA de la cepa MC4100. Los cebadores utilizados fueron diseñados con la finalidad de introducir el gen en las dianas de restricción *BamHI* y *HindIII* (ANEXO.1), manteniendo el marco de lectura en fase. Los fragmentos resultantes de la amplificación fueron clonados en el vector pQE30. Los plásmidos resultantes fueron propagados en la cepa XL1-Blue y confirmados mediante secuenciación (MÉTODOS 3.6.8). Para aumentar la eficiencia de expresión de las proteínas recombinantes, éstos fueron introducidos mediante transformación en la cepa M15[pREP4].

Condiciones de expresión de las proteínas fusionadas a *His₆*

	EF-Tu	PK	TnaA	AtpA	AtpD	CesT
IPTG	0.5mM	0.5mM	0.5mM	0.1mM	0.1mM	0.5mM
Tiempo	3h	3h	3h	3h	o/n	3h
T^a	37°C	37°C	37°C	37°C	20°C	37°C

Condiciones de expresión de las proteínas fusionadas a *His₆*

	Ada	AlkA	Endo VI	Exo III	SSB	Tag
IPTG	0.1mM	0.1mM	0.1mM	0.5mM	0.1mM	0.1mM
Tiempo	o/n	o/n	o/n	o/n	3h	o/n
T^a	20°C	20°C	20°C	20°C	37°C	20°C

Los clones ASKA JW3712, JW3710, JW2146, JW4020, JW3518, JW2053 y JW2201 fueron utilizados para la expresión y purificación de las proteínas recombinantes AtpA, AtpD, Endo IV, SSB, Tag, AlkA y Ada respectivamente. Estos clones fueron proporcionados por *E. coli Strain National BioResource Project (NRBP) Collection* (Kitagawa *et al.*, 2005).

El plásmido recombinante para la expresión de His₆-CesT fue obtenido en el laboratorio con anterioridad a este trabajo (Aguilera *et al.*, 2012).

La expresión de las proteínas fusionadas a His₆ se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo descrito en MÉTODOS 3.2.4, adaptándolo a las condiciones descritas a continuación.

3.2.6.2. Purificación

La purificación de estas proteínas de fusión se llevó a cabo mediante *The Qiaexpressionist™ Kit* (Qiagen). Este *kit* permite purificar las proteínas fusionadas al *tag* de His₆ debido a su afinidad por matrices de níquel como *nickel-nitrilotriacetic acid* (Ni²⁺-NTA). Las proteínas inmovilizadas a la matriz pueden ser fácilmente eluidas mediante la adición de imidazol.

Procedimiento

1. Diluir el extracto celular 5 veces con el tampón de columna.
2. Preparar la columna con el volumen apropiado de resina (Ni²⁺-NTA). La cantidad de resina dependerá de la cantidad de proteína de fusión a purificar. Cada ml de resina tiene capacidad para retener de 5-10mg de proteína de fusión.
3. Equilibrar la resina lavándola con 5 volúmenes de tampón de columna.
4. Añadir el extracto celular diluido y mantener en contacto con la resina en un agitador orbital durante 1h 30min a 4°C.
5. Abrir la columna y recoger una fracción de la muestra que no queda retenida a la resina (*Flow-through*).
6. Lavar la resina con 12 volúmenes de tampón de lavado. Recoger el último lavado.
7. Eluir la proteína de fusión con tampón de elución. Utilizar el mismo volumen de tampón que de resina empleada inicialmente. Repetir el proceso de elución dos veces más.
8. Analizar las fracciones en un gel de poliacrilamida-SDS (MÉTODOS 3.2.10.1).
9. Determinar la concentración de proteínas por el método de *Lowry* (MÉTODOS 3.2.2)

Tampón de columna		Tampón de lavado		Tampón de elución	
NaH ₂ PO ₄	50mM	NaH ₂ PO ₄	50mM	NaH ₂ PO ₄	50mM
NaCl	300mM	NaCl	300mM	NaCl	300mM
Imidazol	10mM	Imidazol	20mM	Imidazol	100-300mM
Ajustar el pH a 8.0		Ajustar el pH a 8.0		Ajustar el pH a 8.0	

3.2.7. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE GAPDH-V5-HIS₆

3.2.7.1. Expresión

Para la expresión y purificación de GAPDH-V5-His₆, el gen *gapA* fue previamente clonado en el vector pBAD-TOPO® (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del *pBAD TOPO® TA Expression Kit* (Invitrogen). Este vector permite fusionar al extremo C-terminal de la proteína de interés el epítipo V5-His₆, que puede ser reconocido tanto por anticuerpos anti-V5 (Southern *et al.*, 1991) como por anticuerpos anti-His (Lindner *et al.*, 1997). En este sistema la expresión de la proteína recombinante está bajo control del promotor araBAD(pBAD) que a su vez es regulado por el producto formado por el gen *araC* (Ogden *et al.*, 1980; Schleif, 2010). *AraC* es un regulador transcripcional que reconoce L-arabinosa como molécula efectora. La expresión de la proteína de fusión se lleva a cabo mediante adición de L-arabinosa.

El clon utilizado para la expresión y purificación de la proteína recombinante GAPDH-V5 había sido construido en nuestro laboratorio (Guzmán, tesis de máster 2008).

La expresión de la proteína recombinante se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo general descrito en MÉTODOS 3.2.4, adaptándolo a las condiciones descritas a continuación.

Condición de expresión de GAPDH fusionada a V5	
L-Arabinosa	0.02%
Tiempo	3h
T ^a	37°C

3.2.7.2. Purificación

La proteína de fusión GAPDH-V5-His₆ fue purificada a partir de extractos celulares de la cepa TOP10 transformada con el plásmido pBAD-GapA empleando el *kit Anti-V5 Agarose Affinity Gel™* (Sigma Aldrich). El anticuerpo monoclonal anti-V5 está inmovilizado sobre la superficie de esferas de agarosa, lo que permite la inmunoprecipitación de proteínas fusionadas al epítipo V5.

En este trabajo la inmunoprecipitación de GAPDH-V5 se ha utilizado para identificar proteínas que co-purifican con GAPDH. En los estudios de *cross-linking in vivo* se ha utilizado el protocolo de purificación en condiciones astringentes.

Procedimiento

1. Diluir el extracto celular 5 veces con PBS conteniendo inhibidores de proteasas (condiciones no astringentes) o con tampón RIPA (condiciones astringentes).
2. Adicionar 40-100µl de la suspensión 1:1 del conjugado Anti-V5 Agarosa en un tubo tipo *ependorff* o columna (capacidad de la resina: 2.5nmoles proteína (120kDa/ml de resina)).
3. Descartar la solución donde se encontraba resuspendida la resina.
4. Lavar la resina 5x1ml de PBS.
5. Añadir el extracto celular diluido y mantener en contacto con la resina en un agitador orbital a 4°C durante 90 minutos como mínimo.
6. Descartar el sobrenadante mediante centrifugación. Recoger una fracción del mismo (*Flow-through*).
7. Lavar la resina con 8x1ml de PBS o tampón RIPA mediante centrifugación. Recoger el último lavado.
8. Eluir la proteína de fusión con Glicina 0.1M pH 2.5 durante 15 min a 37°C. Neutralizar con Tris semisaturado. En algunos experimentos esta fracción fue concentrada mediante precipitación con acetona (MÉTODOS 3.2.3.3).
9. Alternativamente, la elución puede llevarse a cabo con tampón de carga de electroforesis (3x concentrado) (MÉTODOS 3.2.10.1) durante 5 minutos a 95°C.
10. Analizar las fracciones en un gel de poliacrilamida-SDS (MÉTODOS 3.2.10.1).

Tampón RIPA	
Desoxicolato sódico	1%
SDS	0.1%
Triton X-100	1%
Tris-KCl pH 8.0	0.14M

Para algunos ensayos, la purificación de la proteína GAPDH-V5-His₆ se realizó mediante cromatografía de afinidad a través de la resina Ni²⁺-NTA tal como se describe en el apartado 3.2.6.2.

3.2.8. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

La determinación de actividades enzimáticas se hizo por métodos espectrofotométricos o colorimétricos empleando un espectrofotómetro termostatzado Shimadzu UV 1603.

3.2.8.1. Actividad gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

La actividad GAPDH fue determinada según el método descrito por Pancholi y Fischetti, 1992. El método se basa en que GAPDH cataliza la conversión de gliceraldehído-3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato en presencia de fosfato inorgánico generando NADH a partir de NAD⁺. El cofactor reducido puede ser determinado midiendo el incremento de la absorbancia a 340nm.

Procedimiento:

1. Preparar una mezcla que contenga la muestra a ensayar y NAD⁺ 1mM completando el volumen final (1ml) con tampón de ensayo.
2. Iniciar la reacción, a 30°C, mediante adición del sustrato gliceraldehído-3-fosfato a una concentración final de 2mM.
3. Medir en el espectrofotómetro el incremento de absorbancia a una longitud de onda de 340nm.
4. En paralelo llevar a cabo reacciones control en las que no se adiciona sustrato.

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la formación de 1μmol de NADH por minuto.

Tampón de ensayo para GAPDH		Mezcla de Reacción	
Trietanolamina	40mM	Muestra a ensayar (Ext. celular o proteína purificada)	
Na ₂ HPO ₄	50mM	NAD ⁺	1mM
EDTA	5mM	DL-Gliceraldehído-3-fosfato	2mM
		Tampón de ensayo csp	1ml
Ajustar a pH 8.6			

3.2.8.2. Actividad β-galactosidasa

La actividad β-galactosidasa (β-gal) se determinó según el método descrito por Miller, 1972. El método se basa en el incremento de la absorbancia a 420nm producido cuando la enzima, expresada por células en medio de cultivo, hidroliza el sustrato O-nitrofenil-β-D-galactopiranoside (ONPG).

Procedimiento

1. Cultivar las células que contienen las fusiones transcripcionales objeto de estudio hasta alcanzar una densidad óptica a 600nm de aproximadamente 0.5.
2. Añadir 900µl de tampón Z y 100µl de cultivo.
3. Permeabilizar las células mediante la adición de 15µl de cloroformo y 15µl de SDS 0.1%. Agitar vigorosamente.
4. Dejar en reposo durante 15 minutos a temperatura ambiente.
5. Añadir 200µl de una solución de ONPG 4mg/ml. Incubar a 28°C durante un período máximo 20min.
6. Detener la reacción por adición de 500µl de Na₂CO₃ 1M. Anotar el tiempo de reacción.
7. Centrifugar la mezcla de reacción durante 5 minutos a 12.000xg para eliminar los restos celulares.
8. Determinar la absorbancia de la muestra a 420nm y 550nm.
9. Calcular la actividad enzimática, expresada en unidades Miller, según la fórmula:

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

A_{420} = Absorbancia de la mezcla de reacción a 420nm
 A_{550} = Absorbancia de la mezcla de reacción a 550nm
 t = Tiempo de reacción en minutos
 v = Volumen de cultivo ensayado en ml
 A_{600} = Densidad óptica del cultivo a 600nm

Tampón Z	
Na ₂ HPO ₄	60mM
NaH ₂ PO ₄	40mM
KCl	10mM
MgSO ₄	1mM
β-mercaptoetanol	50mM
Ajustar a pH 7.0	

3.2.9. PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-PGPasa MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

En el laboratorio se disponía de una preparación de anticuerpos anti-PGPasa obtenidos por inmunización de conejos albinos (raza *New Zeland*) y posterior purificación de la fracción γ-globulina del suero obtenido mediante precipitación con sulfato de amonio al 35% de saturación (MÉTODOS 3.2.3.1) (Pellicer *et al.*, 2003).

En este trabajo para obtener anticuerpos de pureza más elevada, la fracción γ -globulina anti-PGPasa se purificó por cromatografía de afinidad utilizando Ultralink®EDC/DADPA Immobilization Kit (PIERCE). Para la unión de PGPasa a la resina se empleó el mismo *kit*, que permite la unión covalente de moléculas que contienen grupos -COOH a un soporte de gel (*3M Emphase Biosupport médium AB1 gel*). Para la purificación se siguió el protocolo de la casa comercial, que básicamente consta de dos pasos. En primer lugar, inmovilizar la proteína PGPasa a la columna utilizando 1-etil-3-(3dimetilamino-propil) carbodiimida-HCl. En segundo lugar, aplicar a la columna de afinidad DADPA-PGPasa, la fracción γ -globulina parcialmente purificada. Los anticuerpos retenidos en la columna son finalmente eluidos con tampón de glicina 0.1M (pH 2.5) e inmediatamente neutralizados con una solución Tris-HCl (pH 10).

Los anticuerpos obtenidos fueron dializados frente a PBS 1x previo a su almacenamiento a -20°C.

Este mismo procedimiento fue empleado para la purificación de anticuerpos anti-GAPDH (Egea *et al.*, 2007).

3.2.10. SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

3.2.10.1. Electroforesis monodimensional

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS) (Laemmli, 1970) es una técnica básica utilizada para separar proteínas en función de su masa molecular. Las proteínas desnaturalizadas y cargadas negativamente por la presencia en el medio del detergente aniónico SDS, migran hacia el ánodo en un campo eléctrico.

Para romper las interacciones no covalentes y los puentes disulfuro que pueden formar las proteínas, previo a su aplicación en el gel, se adiciona a las muestras el tampón de carga, que entre otros componentes contiene SDS y β -mercaptoetanol (β -ME) como agente reductor. Seguidamente, se incuban las muestras a 95°C durante 5 minutos, o bien a 37°C durante 10 minutos para las muestras que contienen imidazol.

En este trabajo se han utilizado geles con un porcentaje de acrilamida entre 8-15% en función del peso molecular de la proteína de interés. Para la preparación de los geles se empleó el *kit Mini PROTEAN® 3 Electrophoresis cell* (Bio-Rad).

Como marcador de peso molecular se ha utilizado el BENCHMARK™ *Prestained Protein Ladder* (Invitrogen) formado por una mezcla de proteínas de masa molecular comprendida entre 9.3 y 172.6kDa. Para los geles teñidos tanto por

nitrate de plata como por *Sypro® Ruby Protein Gel Stain* se utilizó como marcador de proteínas el *BENCHMARK™ Protein Ladder* (Invitrogen) que abarca un intervalo comprendido entre 10 y 220kDa.

La composición de las soluciones utilizadas se muestra a continuación:

Gel apilador		Gel separador	
Tris-HCL pH 6.8	0.13M	Tris-HCL pH 8.9	0.375M
SDS	0.1%	SDS	0.1%
Acrilamida:Bisacrilamida(37.5:1)	4%	Acrilamida:Bisacrilamida(37.5:1)	8-15%
Persulfato amónico	0.16%	Persulfato amónico	0.08%
TEMED	0.075%(v/v)	TEMED	0.075%(v/v)

Tampón de carga para proteínas (4x)	
Tris-HCl pH 6.8	0.25M
SDS	8%
Glicerol	40%
β-mercaptoetanol	20%
Azul de Bromofenol	0.08%(v/v)

Tampón de electroforesis	
Tris-HCl pH 8.3	25mM
Glicina	192mM
SDS	0.1%

La electroforesis se realizaba a temperatura ambiente, a 20mA por cada gel de 0.75mm de grosor. Una vez finalizada, las proteínas eran reveladas por tinción con azul brillante de *Coomassie®*, colorante que permite detectar bandas proteicas a partir de 1µg. Los geles teñidos con *Coomassie* se deshidrataban al vacío mediante un desecador *SCIE-PLAS Gel Dryer Model GD4534*.

Procedimiento para tinción por Coomassie

1. Separar el gel de los vidrios utilizados para la electroforesis.
2. Sumergir el gel en la solución de tinción. Mantener en agitación durante 10 min.
3. Sumergir el gel en la solución *destaining I*. Mantener en agitación durante 20min.
4. Sumergir el gel en la solución de *destaining II*. Mantener en agitación durante un mínimo de 20min.
5. Secar el gel al vacío.

	Tinción <i>Destaining I Destaining II</i>		
Ácido acético glacial:Metanol:Agua destilada	1:5:5	1:5:5	1:1:18
Azul brillante de <i>Coomassie</i>	0.10%	--	--

En algunos casos las bandas fueron reveladas mediante tinción con nitrato de plata (*PlusOne Silver Staining Kit, GE Healthcare*) o *Sypro® Ruby Protein Gel Stain* (Molecular Probes), siguiendo la instrucciones de cada fabricante. En otros casos, los geles se procesaron para posterior inmunodetección por *Western Blot* (MÉTODOS 3.2.12) o *Far-Western Blot* (MÉTODOS 3.3.3).

3.2.10.2. Electroforesis bidimensional

La electroforesis bidimensional (2D) es una técnica que permite analizar mezclas complejas de proteínas. La separación se hace en dos etapas consecutivas. En la primera, denominada la primera dimensión, las proteínas son separadas en función de su punto isoeléctrico (pI) a lo largo de un gel con gradiente de pH. Cada proteína avanza bajo la acción del campo eléctrico hasta alcanzar un valor de pH igual a su punto isoeléctrico. En una segunda etapa denominada segunda dimensión, las proteínas son separadas entre sí en función de su masa molecular, en un gel de SDS-PAGE.

Procedimiento

1. Preparar las muestras a analizar en tampón de rehidratación (RHB). La cantidad de proteína aplicada en cada electroforesis puede variar de acuerdo con su procedencia y naturaleza.
2. Aplicar la muestra (125µl) en una tira de IPG (*Immobilized pH Gradiente*) (Bio-Rad) de 4-7cm, de diferentes rangos de pH según cada experimento. Cubrir la tira con aceite mineral e hidratar a 20°C durante 12-16 sobre la placa *Peltier* (Bio-Rad).
3. Desarrollar el electroenfoco utilizando el sistema *Protean IEF-Cell* (Bio-Rad), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.
4. Después del electroenfoco, sumergir la tira IPG en un tampón de equilibrado 1 durante 15 minutos.
5. Incubar la tira con un segundo tampón de equilibrado 2 durante 15 minutos más.
6. Aplicar la tira equilibrada a un gel de poliacrilamida (el porcentaje de acrilamida varía según el experimento) y sellar el gel con solución de agarosa.
7. Visualizar las proteínas mediante métodos de tinción adecuados o por inmunodetección.

Tampón de rehidratación (RHB)	
Urea	9M
CHAPS	4%
DTT	50mM
100x Bio-lyte 3-10 <i>Ampholyte</i>	5%
Trazos de azul de bromofenol	

Tampón de equilibrado 2	
Tris-HCl pH 8.8	0.375M
Iodocetamida	135mM
Urea	6M
Glicerol	20% v/v
SDS	2% p/v

Tampón de equilibrado 1	
Tris-HCl pH 8.8	0.375M
DTT	130mM
Urea	6M
Glicerol	20% v/v
SDS	2% p/v

Solución de agarosa	
Tampón de Electroforesis*	25ml
Agarosa	0.5%
Trazas de azul de bromofenol	

* MÉTODOS 3.2.10.1.
**Antes de sellar la tira calentar esta solución hasta que se funda.

3.2.11. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Después de la electroforesis (mono o bidimensional) y de la visualización de las proteínas mediante el método de tinción más adecuado para cada experimento, se recortaron las bandas o *spots* de interés y se enviaron a la Plataforma de Proteómica en el *Parc Científic* de Barcelona para su posterior identificación.

Procedimiento:

Digestión en gel

Primeramente se realizó una limpieza de la muestra con tampón de bicarbonato de amonio (25mM NH_4HCO_3) y acetonitrilo (ACN). A continuación, la muestra fue sometida a reducción (DTT 10mM; 30 min, 56°C) y alquilación (iodoacetamida 55mM; 21°C, 15 min, en oscuridad). Finalmente las muestras se digirieron con tripsina porcina (Tripsina Gold, Promega; 80ng/muestra; 37°C *overnight* 12h, en el robot automático *Investigator Progest* (Genomic Solutions)). Los péptidos resultantes fueron extraídos de la matriz del gel mediante ácido fórmico al 10% y ACN, y fueron llevados a sequedad mediante el sistema *speed vac*.

Análisis por LC-MS/MS

Los péptidos extraídos de las muestras resultantes del experimento de *cross-linking* con formaldehído fueron analizados por cromatografía líquida combinada con espectrometría de masas (Cap-LC-nano-ESI-Q-TOF) (CapLC, Micromass-Waters). Los datos generados en

archivos PKL fueron enviados para su análisis en las bases de datos en un servidor MASCOT.

Para el resto de experimentos, la identificación de los péptidos se realizó mediante un sistema de HPLC *nanoAcquity* (Waters) acoplado a espectrómetro de masas *OrbitrapVelos* (Thermo Scientific). Mediante el análisis del archivo generado *raw data* se realizó la identificación a través del software *Proteome Discoverer* (v.1.2.0.208) y el motor de búsqueda *Sequest*.

3.2.12. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE *WESTERN BLOT*

Esta técnica permite detectar proteínas presentes en muestras biológicas mediante el empleo de anticuerpos específicos.

Procedimiento:

1. Someter la muestra a una separación electroforética mono o bidimensional (MÉTODOS 3.2.10).
2. Transferir las proteínas a una membrana *HyBond-P Polyvinylidene Difluoride* (PVDF) (GE Healthcare) a 4°C en un aparato de transferencia *Bio-Rad MiniTransblot® Cell* (Bio-Rad), con tampón de transferencia durante 1h 40 min a 400mA a 4°C y en constante agitación.
3. Bloquear la membrana con solución de bloqueo (PBS-Tween®20 0.05%, leche desnatada 5%) a temperatura ambiente durante 1 hora como mínimo.
4. Incubar la membrana con el anticuerpo primario específico para la proteína de interés a 4°C durante 12-16h. Diluir el anticuerpo en la misma solución de bloqueo. La dilución del anticuerpo puede variar según su pureza y especificidad.
5. Eliminar el exceso de anticuerpo primario, lavando la membrana con solución de lavado (PBS-Tween®20 0.1%) durante 4 min, 4 veces.
6. Incubar la membrana con el anticuerpo secundario, conjugado a peroxidasa*. Diluir el anticuerpo en solución de bloqueo (dilución 1/15.000).
7. Eliminar el exceso de anticuerpo secundario lavando la membrana durante 4 min, 4 veces.
8. Finalmente, detectar el complejo proteína-anticuerpo por el *kit ECL™ Plus Western Blot Detection System* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

*Omitir el paso 6 cuando se utilicen anticuerpos primarios conjugados a peroxidasa (*HPR-linked antibodies*)

Tampón de transferencia	
Tris-HCl	25mM
Glicina	0.2M

A continuación se describe una relación de los anticuerpos/dilución empleados en la realización de esta tesis doctoral.

Anticuerpos primario	Especie de procedencia	Dilución empleada
Anti-GAPDH (Egea <i>et al.</i> , 2007)	Conejo	1/5.000
Anti-PGPasa (Pellicer <i>et al.</i> , 2003)	Conejo	1/8.000
Anti-HNS (Cedido por el Dr. A. Juárez)	Conejo	1/5.000
Anti-V5 [HRP] (Sigma-Aldrich)	Ratón	1/5.000
Anti-GST [HRP] (GenScript)	Ratón	1/5.000
Anti-His [HRP] (GenScript)	Ratón	1/5.000
Anticuerpo secundario	Especie de procedencia	Dilución empleada
Donkey Rabbit Ig, HRP linked F (ab') ₂ Fragment (GE Healthcare)	Mono	1/15.000

3.3. ANÁLISIS DE INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA

3.3.1. *CROSS-LINKING* "IN VIVO" CON FORMALDEHÍDO

La metodología de *cross-linking in vivo* con formaldehído (FA) genera enlaces covalentes entre proteínas intracelulares que se encuentran a una distancia inferior a 2Å (Vasilescu *et al.*, 2004), permitiendo analizar las interacciones que ocurren *in vivo* entre diversas proteínas.

En este trabajo nos interesaba estudiar interacciones entre GAPDH con otras proteínas de *E. coli*. Para ello, cultivos de la cepa TOP10 transformada con el plásmido pBAD-*gapA*, que expresa la proteína de fusión GAPDH-V5, fueron tratados con FA 1%. Las proteínas unidas covalentemente a GAPDH-V5 fueron purificadas mediante inmunoafinidad utilizando anti-V5 *Agarose Affinity Gel*[™] (Sigma), en condiciones astringentes. Posteriormente, los complejos formados fueron incubados a 95°C durante 30 minutos para revertir el proceso de *cross-linking*. Las proteínas resultantes fueron separadas mediante SDS-PAGE 10% y teñidas con *Sypro*[®] *Ruby Protein Gel Stain* (Molecular Probes).

Procedimiento:

1. Preparar dos cultivos de la cepa TOP10 transformada con el plásmido pBAD-*gapA* en LB-ampicilina. Cuando el cultivo alcance una D.O_{600nm} de 0.5 adicionar L-arabinosa 0.02% para la inducción de la proteína recombinante (MÉTODOS 3.2.7).
2. Después de 3 horas de incubación añadir a uno de los cultivos FA a una concentración final del 1%. Incubar las células a 37°C, en agitación constante

- durante 20 min. Procesar el otro cultivo paralelamente, omitiendo la adición de FA como control.
3. Parar la reacción con glicina 0.5M e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
 4. Recoger las bacterias por centrifugación y obtener extractos celulares mediante sonicación tal como se describe en MÉTODOS 3.2.1.
 5. Incubar el extracto celular con esferas de agarosa recubiertas con proteína G.
 6. Inmunoprecipitar la proteína de fusión en condiciones astringentes (desnaturalizantes) como se describe en MÉTODOS 3.2.7.2.
 7. Precipitar las muestras con acetona al 90% (MÉTODOS 3.2.3.3) y resuspender en tampón de carga 3x (MÉTODOS 3.2.10.1).
 8. Revertir el *cross-linking* calentando las muestras a 95°C durante 30 min.
 9. Separar las proteínas mediante SDS-PAGE (MÉTODOS 3.2.10.1).
 10. Teñir el gel de poliacrilamida con *Sypro® Ruby Protein Gel Stain* (Molecular Probes) (MÉTODOS 3.2.10.1).
 11. Recortar las bandas de interés y analizar por espectrometría de masas (MÉTODOS 3.2.11).

3.3.2. DOBLE HÍBRIDO (*BACTERIAL ADENILATE CYCLASE TWO HYBRID SYSTEM*)

Para el análisis de las interacciones entre GAPDH y algunas de las proteínas, previamente identificadas por *cross-linking in vivo*, se utilizó el sistema comercial *Bacterial Adenilate Cyclase Two Hybrid System Kit (BACTH System)* (Euromedex, Francia), que se basa en la reconstitución del dominio catalítico de la adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis*. Dicho dominio se compone de dos fragmentos complementarios, T25 y T18, ambos necesarios para la actividad enzimática. Estos dos fragmentos, expresados en *E. coli* como entidades separadas, no son capaces de interactuar entre sí y por tanto no pueden reconstituir la actividad enzimática. Sin embargo, cuando T25 y T18 están fusionados a péptidos o proteínas que interactúan entre sí, la heterodimerización de estos polipéptidos quiméricos da como resultado una complementación funcional entre los dos fragmentos de la adenilato ciclasa, y en consecuencia, de la síntesis de cAMP.

El cAMP formado intracelularmente se une a CAP (proteína activadora del catabolismo). El complejo cAMP-CAP es un regulador pleiotrópico de la transcripción génica en *E. coli*, uniéndose a una secuencia específica localizada en la región promotora de determinados operones catabólicos activando la transcripción de los mismos y permitiendo a la bacteria fermentar carbohidratos como la lactosa o la maltosa.

Este sistema se empleó para el análisis de la interacción de GAPDH con las proteínas TnaA, PK y EF-Tu. Para ello los genes que codifican estas proteínas fueron clonados en los vectores complementarios del *kit BACTH*. Posteriormente,

se transformó con los plásmidos recombinantes células DHM1, deficiente en adenilato ciclasa.

Procedimiento

1. Clonar los genes que codifican las proteínas de interés en los vectores de este sistema (pKNT25, pKT25, pUT18, pUT18C). Dependiendo del vector utilizado se obtienen fusiones en el extremo amino- o carboxi-terminal. Por ejemplo: proteína X-T25 o T25-X y proteína Y-T18 o T18-Y. (MÉTODOS 3.6.10).
2. Co-transformar una cepa deficiente en adenilato ciclasa (cepa DHM1 o cepa BTH101) con los 2 plásmidos recombinantes complementarios (MÉTODOS 3.1.3).
3. Hacer un *screening* sembrando las cepas transformadas en placas de MacConkey-Maltosa o de LB-X-gal. Incubar de 24 a 72h a 30°C. Alternativamente, la selección puede hacerse en placas de SM-maltosa incubando de 4 a 6 días a 30°C.
4. Seleccionar las colonias positivas que serán rojas en placas de MacConkey-Maltosa y azules en placas de LB-Xgal.
5. Evaluar, en extractos bacterianos, la eficiencia de complementación entre los plásmidos recombinantes mediante la cuantificación de los niveles de cAMP o mediante ensayo de la actividad enzimática β -galactosidasa (MÉTODOS 3.2.8.2).

3.3.3. FAR-WESTERN BLOT

La tecnología del *Far-Western Blot* ha sido aplicada para comprobar la interacción de GAPDH con la proteína PGPasa, según se describe a continuación.

Procedimiento:

1. Separar la proteína de interés, en este trabajo GAPDH (2.5-5 μ g de proteína purificada), mediante electroforesis monodimensional o bidimensional.
2. Transferir la proteína a una membrana de PVDF.
3. Bloquear la membrana con solución de bloqueo (TBS-gelatina 1%) durante toda la noche y en constante agitación.
4. Incubar la membrana con la proteína de estudio (PGPasa 2.5 μ g/ml) diluida en el tampón de bloqueo a temperatura ambiente, durante 3h y en constante agitación. Este paso debe ser omitido en una membrana paralela que servirá de control negativo.
5. Hacer cuatro lavados con solución de lavado (TBS-Tween®20 0.1%) durante 10 minutos cada uno.
6. A partir de este momento, seguir el procedimiento de *Western Blot* (MÉTODOS 3.2.12), pero manteniendo la composición de solución de bloqueo y lavado específicos para *Far-Western Blot*. El anticuerpo primario empleado en este trabajo fue anti-PGPasa.

Un procedimiento similar se aplicó para el estudio de la interacción de GAPDH con la chaperona CesT del sistema de secreción T3SS. En este caso, se aplicó 5 μ g de GAPDH a la electroforesis bidimensional y la membrana se incubó con 1 μ g/ml de la proteína His₆-CesT.

3.3.4. PULL-DOWN

La técnica de *Pull-down* es otra de las técnicas utilizadas en este trabajo para analizar *in vitro* la interacción de GAPDH con otras proteínas de *E. coli*. Consiste en que una proteína fusionada a un *tag* es capturada por un ligando específico del *tag* que está inmovilizado en la matriz. La proteína de fusión unida a la resina se convierte en un ligando secundario que por afinidad permitirá purificar otras proteínas que hayan interaccionado con ella, ya sea en el propio extracto celular o posteriormente una vez fijada a la matriz, al adicionar proteínas previamente purificadas.

Se han llevado a cabo distintos ensayos utilizando varias proteínas de fusión recombinantes, entre ellas: GST-Ogt, GST-PGPasa, His₆-AtpA, His₆-AtpD, His₆-EF-Tu, His₆-PK, His₆-TnaA, His₆-EndoIV, His₆-ExoIII, His₆-SSB, His₆-Tag, His₆-AlkA, His₆-Ada y His₆-CesT. Estas proteínas fueron expresadas y purificadas como se describe en el apartado 3.2.4. En las fracciones eluidas de todas estas proteínas se analizaba, mediante *Western Blot* (MÉTODOS 3.2.12), la presencia de GAPDH nativa, expresada por la bacteria a partir del gen cromosómico.

En algunos ensayos de *Pull-down* realizados con GST con GST-PGPasa, una vez inmovilizada la proteína recombinante a la resina de glutatión, se añadía a la columna GAPDH previamente purificada. Este protocolo se aplicó también para las proteínas recombinantes His₆-EF-Tu, His₆-PK y His₆-TnaA.

En el análisis de la interacción de GAPDH con las proteínas GST-Ogt, His₆-ExoIII, His₆-EndoIV, His₆-SSB, His₆-Tag, His₆-AlkA y His₆-Ada, una vez inmovilizadas estas proteínas a la resina de níquel, se aplicó a la columna un extracto celular obtenido a partir de un cultivo de la cepa MC4100 (12mg/ml) tratado durante 1 hora con metilmetanosulfonato (MMS) 10mM. Paralelamente, se procesaron muestras control obtenidas a partir de cultivos no incubados en presencia de MMS.

3.3.5. INTERFEROMETRÍA DE BIOCAPA

La interferometría de biocapa (BLI) se aplica para medir la interacción entre biomoléculas. Esta es una técnica basada en un sensor óptico que analiza el patrón de interferencia de la luz blanca reflejada en dos superficies: una capa de proteínas inmovilizadas en la extremidad de un biosensor, y una capa interna de referencia. Cualquier modificación en el número de moléculas unidas al biosensor provoca un cambio en el patrón de interferencia, que puede ser medido a tiempo real. La unión entre el ligando inmovilizado en la extremidad del biosensor y el analito en solución produce un incremento en el espesor óptico del biosensor, que resulta en un cambio de la longitud de onda $\Delta\lambda$, siendo este proporcional al cambio en el espesor de la biocapa. Las interacciones son analizadas en tiempo real, ofreciendo la posibilidad de monitorizar la especificidad de unión, así como las velocidades de asociación y disociación, con precisión y exactitud.

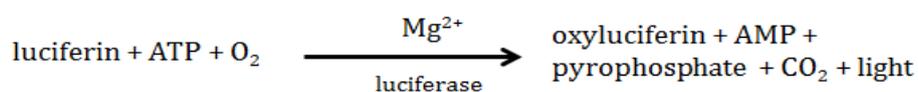
Estos experimentos fueron realizados con la colaboración de la Dra. Marta Taulés del servicio de citometría y análisis de interacciones moleculares de los servicios científico-técnicos de la Universidad de Barcelona.

El análisis cinético de la interacción entre GAPDH y la proteína CesT, se llevó a cabo mediante biosensores con grupos aminos reactivos en el interferómetro *Octet Red* (Fortebio). Para ello, los grupos carboxílicos, presentes en la superficie del sensor, fueron activados por incubación con 0.2M (N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) (EDC): 0.5M (éster N-hidroxisuccinimida) (NHS) por 10 minutos. El ligando CesT diluido en tampón MES, pH 4.0 (concentración final de 50µg/ml), fue cargado sobre los biosensores activados (10 minutos de incubación). Los grupos NHS-ésteres que no interaccionaron fueron inactivados con 0.05M etanolamina por 10 minutos. Todos los experimentos fueron realizados a 30°C con agitación constante (1000rpm) en 10mM HEPES pH 7.5, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.01% (p/v) Tween-20 y 0.1mg/ml BSA. Los biosensores con la proteína CesT inmovilizada fueron expuestos a diferentes concentraciones de GAPDH purificada (0-5.5µM). Después de la inmersión de los sensores con cada concentración de GAPDH, se regeneró la superficie con 0.1% SDS durante 30 segundos. Los datos fueron analizados utilizando el *software ForteBio Data Analysis* versión 6.3 proveído por el fabricante. Las constantes cinéticas fueron obtenidas por ajuste de los datos a un modelo 1:1 después de sustracción de un sensor de referencia paralelo.

3.4. DETERMINACIÓN DE NIVELES DE ATP

Para determinar los niveles de ATP celular se ha empleado el *ATP Determination Kit* (Molecular Probes) según las recomendaciones del fabricante. Este *kit* se basa el requerimiento de ATP por parte de la luciferasa para la producción de bioluminiscencia.

Reacción:



Para la cuantificación de los niveles de ATP se cultivaron las células de interés hasta alcanzar D.O de 0.5. Se retiraron alícuotas de los cultivos y se hicieron diluciones seriadas hasta obtener 2×10^8 células/ml. Para la curva patrón se procedió a la dilución del ATP *standard* en un rango de concentración de 1×10^{-4} a 1×10^{-10} M. Posteriormente, se incubaron todas las muestras con luciferasa y se procedió la cuantificación de la luminiscencia generada en un *Modulus™ Microplate Luminometer* (Turner Biosystems).

3.5. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

3.5.1. TINCIÓN DE GRAM DE CÉLULAS BACTERIANAS

La tinción de Gram se aplica principalmente para identificar las bacterias en dos grupos según la composición de su pared celular: Gram-positivos y Gram-negativos.

La tinción de Gram requiere agua desionizada y cuatro soluciones diferentes: un colorante básico (cristal violeta), un mordiente (lugol), un decolorante (alcohol o una mezcla de alcohol y acetona) y un colorante de contraste (safranina).

Un mordiente es una sustancia que incrementa la afinidad entre la célula y el colorante y por tanto mejora la fijación del colorante a la célula.

El colorante de contraste es un colorante básico con un color distinto al del primer colorante empleado. Se utiliza para teñir las células que no han retenido el primer colorante después de ser desteñidas con alcohol.

De los cultivos en medio sólido se recogieron muestras al cabo de 16h y de los cultivos en medio líquido se recogieron muestras en fase exponencial (6 horas) y estacionaria (24 horas) para posteriormente, proceder a la tinción de Gram.

Las preparaciones han sido evaluadas por microscopía (Modelo Leica DM1000) en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Barcelona.

Procedimiento

1. Cultivar las células bacterianas en las condiciones de interés.
2. Para cultivos sólidos, poner una gota de agua en el portaobjetos, transferir una pequeña cantidad de cultivo con el asa de Kolle estéril y extender la suspensión. Para cultivos líquidos poner dos o tres gotas de cultivo con el asa en el portaobjetos y extender.
3. Sujetar el portaobjetos a un extremo con una pinza y fijar la preparación pasando el portaobjetos rápidamente por la llama de Bunsen diversas veces hasta que se observe que la preparación este completamente seca.
4. Empezar la tinción cubriendo la muestra con el colorante cristal violeta durante 1 minuto. Lavar con agua.
5. Cubrir la muestra con lugol durante 1 minuto. Lavar con agua.
6. Decolorar con etanol (10-20 segundos). Lavar con agua.
7. Teñir con safranina durante 1 minuto. Lavar nuevamente con agua.
8. Secar la preparación.
9. Analizar las preparaciones mediante microscopia.

3.6. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA

Se siguieron los protocolos estándar descritos por Sambrook y Rusell, 2001.

3.6.1. OBTENCIÓN DE DNA GENÓMICO

Para la obtención de DNA genómico se ha utilizado el *kit* comercial *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega). La obtención del DNA genómico fue efectuada partiendo de 2ml de cultivo de la cepa de interés, en fase estacionaria, siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial para bacterias Gram negativas.

3.6.2. OBTENCIÓN DE DNA PLASMÍDICO

Para obtener DNA plasmídico a pequeña y media escala se utilizaron respectivamente, el *kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* y el *kit Wizard™Plus SV Midipreps DNA Purification System* (Promega), tal como se describe en el protocolo de la casa comercial.

3.6.3. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DEL DNA

La digestión del DNA se llevó a cabo mediante enzimas de restricción siguiendo las indicaciones de las casas comerciales y utilizando tampones específicos para cada enzima. Se recomienda la utilización de 1U de enzima por 1µg de DNA, incubando como mínimo durante 1 hora a la temperatura adecuada. Las endonucleasas de restricción utilizadas en este trabajo son termosensibles por lo que se inactivaban a 65°C durante 15min.

Los productos de la reacción se comprobaron mediante electroforesis en geles de agarosa, tal y como se describe en MÉTODOS 3.6.9.

3.6.4. LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA

Consiste en la unión de los fragmentos de DNA mediante una reacción enzimática. Se utiliza DNA ligasa del bacteriófago T4, enzima que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los grupos 5'-fosfato y el grupo 3'-hidroxilo terminales de fragmentos de DNA, en presencia de ATP y Mg²⁺.

Procedimiento

1. Preparar convenientemente tanto el vector como el inserto para la ligación (digestión, defosforilación si procede).
2. Determinar la concentración de vector e inserto.
3. Preparar la reacción de ligación según las siguientes proporciones:

Mezcla de reacción

DNA vector variable⁽¹⁾DNA inserto variable⁽²⁾

T4 DNA ligasa 1U

Tampón de ligación 1x

⁽¹⁾Normalmente 100ng⁽²⁾La cantidad de inserto a ligar se calcula según la siguiente fórmula:

$$ng \text{ inserto} = \text{tamaño de inserto}(kb) \times \frac{ng \text{ vector}}{\text{tamaño del vector} (Kb)} \times \text{relación molar} \frac{\text{inserto}}{\text{vector}}$$

(Habitualmente se utilizó una relación molar vector: inserto de 1:3)

4. Incubar la mezcla de reacción durante toda la noche a temperatura ambiente.

3.6.5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La técnica de PCR (Saiki *et al.*, 1988) se utiliza para amplificar fragmentos de DNA a partir de un DNA molde. La zona a amplificar queda limitada por dos oligonucleótidos (sentido y antisentido) que son complementarios a una secuencia conocida. Estos oligonucleótidos funcionan como cebadores para la síntesis del DNA por la DNA polimerasa.

La secuencia de los cebadores utilizados depende del fragmento que se desea amplificar. De forma general, los cebadores han de ser específicos, deben de tener de 18 a 25 nucleótidos, presentar entre 50-70% de residuos G/C y no formar dímeros o estructuras secundarias. En algunos casos, para facilitar la clonación dirigida del fragmento de PCR, los cebadores contenían en su extremo 5', la secuencia específica de reconocimiento para una enzima de restricción.

Se utilizan polimerasas termoestables. En este trabajo se ha utilizado de forma general la *taq Biotools DNA Polymerase* (Biotools), excepto cuando se requería una alta fidelidad o que los fragmentos de DNA amplificados tuviesen los extremos romos; en estos casos se utilizó la *Pfu Turbo™ DNA Polymerase* (Stratagene). Las reacciones de PCR son muy susceptibles al tipo de DNA molde utilizado, así como a la concentración de Mg²⁺, cebadores y dNTPs. Por este motivo, no existe un protocolo generalizado, sino que cada reacción necesita ser puesta a punto. Básicamente se siguió el protocolo descrito por Sambrook *et al.*, 2001.

Procedimiento:

Preparar la mezcla de reacción en tubos de 0.5ml de capacidad y colocar en el termociclador.

Mezcla de reacción	
DNA molde	variable ⁽¹⁾
<i>Primer forward</i>	0.025mM
<i>Primer reverse</i>	0.025mM
dNTPs	0.2mM
DNA polimerasa	2.5U
Tampón de amplificación	1x
Mg ²⁺ ⁽²⁾	1.5-4mM
H ₂ O desionizada	csp ⁽³⁾

⁽¹⁾ 2ng de DNA genómico, 50ng de DNA plasmídico o una colonia bacteriana.

⁽²⁾ Siempre y cuando no estuviese incluido en el tampón de reacción.

⁽³⁾ Volumen final de 100µl para la obtención de fragmentos de DNA y 20µl para el análisis de clones recombinantes.

1. Desnaturalizar el DNA molde a 94°C (1min para DNA plasmídico y 5min para DNA genómico o colonia celular).
2. Aplicar un número variable de ciclos (20-30) con los siguientes pasos:
 - a) Desnaturalización del DNA: 94°C, durante 45s.
 - b) Unión de los cebadores: 45s a la T_m óptima (específica para cada pareja de cebadores).
 - c) Extensión: 72°C durante el tiempo necesario (1min por cada 1Kb excepto cuando se utiliza la *Pfu* que amplifica 1Kb cada 2min aproximadamente).
3. Aplicar un último ciclo de extensión durante 10min y a 72°C.
4. Purificar el DNA obtenido por alguna de las técnicas descritas en MÉTODOS 3.6.9.

Las reacciones se realizaron en dos modelos diferentes de termociclador: *Eppendorf Mastercycler 5330* (Eppendorf) y *MiniCycler™* (MJ Research).

La técnica de PCR se ha utilizado en este trabajo con diferentes finalidades que se detallan en los siguientes apartados.

3.6.6. OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA

La técnica de PCR se utilizó tanto para la obtención de fragmentos de DNA que posteriormente fueron clonados en diferentes plásmidos, como para la obtención de sondas de DNA utilizadas en experimentos de retardo de la movilidad electroforética en geles de poliacrilamida.

Para comprobar que durante el proceso de amplificación la DNA polimerasa no hubiese introducido mutaciones, todos los fragmentos obtenidos mediante esta técnica fueron secuenciados (MÉTODOS 3.6.8).

3.6.7. SELECCIÓN DE CLONES RECOMBINANTES

La técnica de PCR también permite la selección de clones recombinantes que provienen de la ligación entre un fragmento de DNA y un vector de clonación. Para ello se utiliza una pareja de cebadores pertenecientes al vector de clonación, o bien, un cebador del vector y otro del fragmento clonado.

Esta técnica no requiere la obtención previa del DNA plasmídico recombinante, ya que es posible llevarla a cabo directamente utilizando colonias bacterianas (MÉTODOS 3.6.2).

3.6.8. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DEL DNA

Para la secuenciación automática de los fragmentos de DNA se ha seguido el protocolo descrito en el *kit ABI Prism Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v3.1* (PE Biosystems). En este sistema, se añaden cuatro ddNTPs a la mezcla de PCR, donde cada ddNTPs está marcado con un fluoróforo que emite a diferente longitud de onda. La fluorescencia incorporada a las cadenas de DNA sintetizadas fue determinada por el secuenciador *377 DNA Sequencer, ABI Prism de Perkin Elmer* (*Serveis Científico-tècnics* de la Universidad de Barcelona).

Mezcla de reacción		Condiciones de PCR	
<i>Mix terminator (Kit)</i>	1.5µl	1.	96°C 1 min 30 seg
Oligonucleótidos (10µM)	0.5µl (5pmol)	2.	96°C 30 seg
DNA a secuenciar	0.5µg	3.	50°C 30 seg
H ₂ O desionizada	csp 10µl	4.	60°C 4 min
		5.	30 ciclos (Paso 2 a 4)

3.6.9. RESOLUCIÓN Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA

3.6.9.1. Separación de fragmentos de DNA en geles de agarosa mediante electroforesis

La electroforesis en geles de agarosa permite la separación de fragmentos de DNA en función de su tamaño. El DNA es una molécula cargada negativamente y se desplaza hacia el ánodo en la matriz de agarosa al aplicar una corriente eléctrica. La concentración de agarosa del gel determina la resolución de los fragmentos de DNA a separar. La movilidad del DNA es inversamente proporcional al logaritmo

de su tamaño. En este trabajo se han utilizado geles de agarosa preparados entre el 0.8 y el 1% (p/v).

La visualización de los fragmentos de DNA se ha llevado a cabo mediante la incorporación de bromuro de etidio (1µg/ml; Sigma Aldrich) al gel de agarosa y la posterior detección en un transiluminador con luz UV. Como marcador de tamaño se utilizó DNA del fago λ digerido con *HindIII* (MBI Fermentas) para bandas mayores de 2Kb, o el marcador de 100pb (Invitrogen Life Technologies) para tamaños inferiores.

Antes de aplicar las muestras se les adicionaba tampón de carga que contiene glicerol y que aporta la densidad adecuada para depositarlas en los pocillos del gel. Además, contiene un colorante que permite seguir el frente de la electroforesis. La electroforesis se desarrolló a 80-90V y a temperatura ambiente.

Tampón de electroforesis (TAE 50x)		Tampón de carga	
Tris base	5M	Glicerol	5%
Ácido acético glacial	1M	Azul de bromofenol	5%
EDTA	50mM		
Ajustar pH a 8.0			

3.6.9.2. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

Las bandas de interés separadas en un gel de agarosa eran recortadas y el DNA purificado con el *QIAquick™ Gel Extraction Kit* (QIAGEN) siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial.

3.6.9.3. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de poliacrilamida

Los fragmentos de DNA destinados a su uso como sondas en los experimentos de retardo de la movilidad electroforética fueron separados en geles de poliacrilamida. La separación en este tipo de geles se llevó a cabo en aquellos casos que interesaba separar o purificar fragmentos de DNA de tamaños muy similares ya que los geles de poliacrilamida presentan una mayor resolución que los geles de agarosa.

La concentración de poliacrilamida depende del tamaño del fragmento de DNA que se quiere separar o purificar (Sambrook *et al.*, 2001). En este trabajo, todos los

geles de poliacrilamida fueron preparados a una concentración del 5%, adecuada para separar fragmentos con un tamaño comprendido entre 30 y 400pb.

Antes de aplicar las muestras, el gel se sometía a electroforesis durante 30min a 20mA. Pasado este tiempo, las muestras eran preparadas por adición de tampón de carga 6x y aplicadas a los pocillos del gel. La electroforesis se desarrollaba a 20mA.

Finalizada la electroforesis, se teñía el gel para visualizar las bandas. Para ello, se sumergía el gel en una solución de bromuro de etidio (4µg/ml) y se mantenía en agitación durante 30min. Seguidamente, se eliminaba el exceso de bromuro de etidio lavando el gel con agua destilada, en agitación, durante 30min.

Tampón de electroforesis (TBE5x)		Gel de poliacrilamida 5%	
Tris-HCl	450mM	Acrilamida:Bisacrilamida(29:1)	5%
Ácido bórico	450mM	Glicerol	5%
EDTA	10mM	Tampón de electroforesis TBE	1x
		Persulfato amónico	0.07% p/v
		TEMED	0.07% p/v
Ajustar a pH 8.0		Desgasificar filtrando al vacío (tamaño de poro 0.45µm)	

Tampón de carga 6x	
Azul de bromofenol	1mg/ml
Xilencianol	1mg/ml
Glicerol	50% v/v

A continuación, bajo iluminación con luz ultravioleta, se procedía a recortar el fragmento del gel que contenía la banda a purificar. Para extraer el DNA de la matriz de acrilamida, se le adicionaban 400µl de una solución de acetato amónico 2M en tampón TE (MÉTODOS 3.8.1) y se dejaba en agitación a 37°C un mínimo de 48h. Seguidamente, se recuperaba el DNA de la muestra como si se tratara de un producto de PCR.

3.6.9.4. Purificación de fragmentos de DNA obtenidos por PCR

Para eliminar los cebadores, nucleótidos, sales y DNA polimerasa de los fragmentos de DNA amplificados por PCR se empleaba el *kit QIAquick™ PCR Purification Kit* (QIAGEN), tal como describe el fabricante.

3.6.10. CONSTRUCCIÓN DE MOLÉCULAS HÍBRIDAS DE DNA (OBTENCIÓN DE DNA RECOMBINANTE)

El primer paso consiste en la obtención del vector de clonación y del inserto que se desea clonar. El inserto puede obtenerse mediante la técnica de PCR (MÉTODOS 3.6.5) o por digestión a partir de otro plásmido recombinante (MÉTODOS 3.6.3) y posterior purificación. A continuación, inserto y vector, deben ser digeridos con las enzimas de restricción adecuadas para la obtención de moléculas con extremos compatibles. Seguidamente se procede a la ligación de ambos DNAs por acción de la T4 DNA ligasa (*Fast-Link™ Ligase*) (MÉTODOS 3.6.4) y posteriormente, el producto de ligación es introducido en células de *E. coli* competentes (MÉTODOS 3.1.2) preparadas a partir de la cepa adecuada. Entre las colonias crecidas en placas de selección, se identifican los clones recombinantes mediante PCR y se obtiene el DNA plasmídico (MÉTODOS 3.6.2) que se analiza mediante secuenciación automática (MÉTODOS 3.6.8).

3.7. CARACTERIZACIÓN DE PROMOTORES

3.7.1. FUSIÓN DE PROMOTORES AL GEN *lacZ*

La fusión de promotores al gen *lacZ* es una técnica que permite estudiar la regulación de la transcripción de genes. Mediante esta técnica es posible analizar la expresión del gen o genes en estudio a través de la expresión del gen marcador *lacZ*, que codifica la enzima β -galactosidasa, cuantificable mediante un ensayo sencillo y sensible.

En este trabajo, se procedió a obtener fusiones del promotor del gen *ndh* al gen *lacZ* con la finalidad de estudiar *in vivo* la implicación de GAPDH en el control transcripcional del gen *ndh*.

En primer lugar se obtuvieron las fusiones de promotor en forma de multicopia en los vectores de la familia pRS (Simons *et al.*, 1987) y a continuación se transfirieron al genoma de diferentes cepas Δlac en forma de monocopia (Elliot, 1992).

Obtención de la fusión *ndh-lacZ* en vector multicopia

El vector utilizado para obtener la fusión del promotor *ndh* al gen *lacZ* pertenece a la familia pRS descrita por Simons *et al.*, 1987. En concreto se utilizó el plásmido multicopia pRS551.

El fragmento del promotor *ndh* cuya actividad promotora se quería estudiar (- 254 a + 129) fue amplificado mediante PCR (MÉTODOS 3.6.5). Para ello se utilizó una pareja de cebadores que incorporaban las dianas para las endonucleasas de

restricción *Bam*HI y *Eco*RI en sus respectivos extremos 5'. De esta forma se facilitaba la posterior clonación que podía realizarse de forma dirigida. El plásmido recombinante fue secuenciado (MÉTODOS 3.6.8) para descartar mutaciones introducidas durante el proceso de amplificación.

Transferencia de fusiones de promotor de plásmido a genoma bacteriano

Las fusiones de promotor al gen *lacZ* fueron transferidas de plásmido a genoma bacteriano según el método descrito por Elliot, 1992. En primer lugar la fusión se transfirió al genoma de la cepa TE2680 para a continuación transferirla, mediante un lisado P1, a la cepa en cuyo fondo genómico se quería estudiar la actividad promotora.

Las cepas de *E. coli* mutantes *recD* (como la TE2680) permiten una eficiente recombinación de DNA lineal con regiones homólogas presentes en su cromosoma. En concreto, la cepa TE2680 contiene, insertado a nivel del operón triptófano, el gen de resistencia al antibiótico cloranfenicol, flanqueado en 5' por el gen de resistencia a kanamicina (aunque con una mutación que produce un fenotipo Kn^s) y en 3' por los genes *lacZ* y *lacY*. De esta forma, cuando se transforma la cepa TE2680 con DNA de un plásmido recombinante derivado de pRS551, previamente linealizado, se produce la recombinación homóloga entre los genes *kan* y *lacZ* del plásmido y del cromosoma bacteriano, de manera que el gen de resistencia a cloranfenicol es sustituido por la fusión de promotor presente en el vector. La selección de las cepas recombinantes se lleva a cabo analizando su fenotipo según la siguiente pauta:

Kan^r : Las cepas recombinantes son resistentes al antibiótico kanamicina ya que el gen *kan* mutado presente en la cepa TE2680 ha sido sustituido por el gen funcional procedente del plásmido pRS.

Cm^s : Puesto que el gen que codifica la resistencia al antibiótico cloranfenicol se ha perdido al producirse la recombinación homóloga, las cepas recombinantes son sensibles a este antibiótico.

Amp^s : Las cepas recombinantes son sensibles al antibiótico ampicilina ya que el gen *bla* presente en el plásmido pRS551 no recombina.

Hemos tenido en cuenta que todas las cepas portadoras en su genoma de una fusión de promotor presentaban auxotrofia para triptófano, ya que la construcción se localiza interrumpiendo la región cromosómica donde se localizan los genes implicados en la biosíntesis de este aminoácido.

Para la obtención de la fusión primeramente se linealizó el DNA del plásmido que contiene la fusión *ndh-lacZ* con la endonucleasa de restricción *Xho*I. La secuencia reconocida por esta enzima de restricción está situada fuera de la región delimitada por los genes *kan* y *lacZ* (la región donde ha sido clonado el promotor

objeto de estudio y que ha de recombinar con el cromosoma de la cepa TE2680). Se transformó la cepa TE2680 con el DNA lineal (MÉTODOS 3.1.3) y se sembró en placas de LB-Kan. Se comprobó el fenotipo de las colonias recombinantes en placas conteniendo Amp y Cm. Se seleccionaron colonias con fenotipo Kan^r, Cm^s, Amp^s. A partir de una de estas colonias se realizó un lisado P1 (MÉTODOS 3.1.4.1) para poder transferir la fusión a la cepa en cuyo fondo genómico se pretendía estudiar la actividad del promotor.

3.8. ENSAYOS DE RETARDO DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA

Los ensayos de la retardo de la movilidad electroforética (*gel shift* o *electrophoretic mobility shift assay*, EMSA) permiten analizar interacciones DNA -proteína *in vitro*. La técnica se basa en la diferente movilidad electroforética que presenta un fragmento de DNA cuando interacciona con una proteína: el complejo DNA-proteína ve retardada su movilidad respecto al mismo fragmento de DNA libre.

En este trabajo se han llevado a cabo ensayos de EMSA con proteína recombinante GAPDH purificada y el fragmento de DNA que corresponde a la región promotora del gen *ndh* comprendida entre las posiciones (-220 a -20). Este fragmento fue obtenido por PCR, purificado a partir de geles de poliacrilamida (MÉTODOS 3.6.9.3) y marcado tal como se describe en MÉTODOS 3.8.1.

La proteína GAPDH fue purificada a partir de la proteína recombinante GST-GAPDH digerida con Factor Xa tal como se describe en MÉTODOS 3.2.5. Adicionalmente, se empleó también la proteína recombinante GAPDH-V5-His₆ que fue purificada como se detalla en MÉTODOS 3.2.6.

3.8.1. MARCAJE DEL FRAGMENTO DE DNA UTILIZADO COMO SONDA

En este trabajo se ha utilizado el marcaje radioactivo 5'-terminal. Este método permite obtener fragmentos de DNA marcados radiactivamente sólo en su extremo 5'. Para este tipo de marcaje se utilizó la T4 polinucleótido quinasa (T4PNK), enzima que cataliza la transferencia del fosfato en posición γ del ATP a los extremos 5'-fosfato del DNA y del RNA. Como donador de grupos fosfato marcados radiactivamente se utilizó [γ -³²P]-ATP (3000mCi/mmol) y para purificar la sonda marcada se realizó una cromatografía de gel filtración en una columna de Sephadex® G-25.

En este trabajo se marcaron fragmentos de DNA correspondientes al promotor del gen *ndh* (posiciones -220 a -20) para utilizarlos como sonda.

Procedimiento:

1. Preparar la siguiente mezcla en un tubo de microcentrífuga:

DNA 1 μ g
 [γ - 32 P]ATP 20 μ Ci
 T4 PNK 20U
 Tampón T4PNK 1x
 H₂O csp 40 μ l

2. Incubar a 37°C durante 1h.
3. Parar la reacción añadiendo 60 μ l de TE y congelar la muestra a -20°C.
4. Purificar la sonda marcada mediante gel filtración en una columna de Sephadex® G-25:
 - a) Preparar una columna con 2ml de una suspensión de Sephadex® G-25 en TE (0.2g/ml). Encajar la columna en un tubo de microcentrífuga.
 - b) Centrifugar a 500xg durante 15min para compactar el Sephadex®.
 - c) Retirar el tubo de microcentrífuga de la columna y sustituirlo por uno nuevo.
 - d) Aplicar la muestra que contiene la sonda marcada a la columna. Centrifugar a 500xg durante 15min.
 - e) Extraer el tubo de microcentrífuga, que contiene la sonda purificada, de la columna y guardarlo a -20°C (la sonda marcada es estable a esta temperatura durante 2 semanas). Asumiendo que no hay pérdida en el proceso de purificación, la concentración de la sonda marcada es de 10ng/ μ l.

Tampón TE	
Tris-HCl	10mM
EDTA	1mM
Ajustar a pH 8.0	

3.8.2. REACCIÓN DE UNIÓN DNA-PROTEÍNA

La reacción de unión DNA-proteína (*binding*) se llevó a cabo tal y como describieron Lane *et al.*, 1992. Las mezclas de reacción tenían un volumen final de 20 μ l y su composición era la siguiente:

Mezcla de reacción	
Tris-HCl pH 7.4	10mM
KCl	100mM
DTT	2mM
Glicerol	10%
MgCl ₂	10mM
Poly[d(I-C)]	1µg
DNA	8ng
Proteína	16µg

Para facilitar el ensayo, se tenía preparado un tampón de reacción 5x que contenía todos los elementos de la mezcla de reacción excepto el DNA y la proteína. Las mezclas de reacción se incubaron a 30°C durante 30 minutos.

Paralelamente, se realizaron reacciones control de unión en presencia de un exceso de sonda no marcada, preincubando durante 45 min, a 4°C antes de la adición de la sonda marcada. Para verificar la especificidad de unión de la proteína al DNA, también se realizaron reacciones de súper retardo (*super-shift*), adicionando anticuerpo específico para la proteína de interés que da lugar a un nuevo complejo, anticuerpo-proteína-DNA. Este complejo puede aparecer más retardado en gel, o bien bloquear la unión proteína-DNA. En estos ensayos se adicionaron 4µg del anticuerpo anti-GAPDH y se preincubó durante 45 min a temperatura ambiente antes de adicionar la sonda marcada.

Una vez finalizadas las reacciones, éstas se mantuvieron en hielo y se procedió a su separación electroforética en geles de poliacrilamida, en condiciones no desnaturalizantes.

3.8.3. SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE LAS SONDAS Y LOS COMPLEJOS DE RETARDO

Los geles de poliacrilamida utilizados para llevar a cabo la electroforesis de las mezclas de reacción se prepararon al 5%, de forma similar a los utilizados para la purificación de fragmentos de DNA, tal y como se describe en MÉTODOS 3.6.9.3, aunque con ligeras variaciones. Para evitar la distorsión de las uniones DNA-proteína a causa de las sales presentes en el medio, estos geles fueron preparados con tampón TBE 0.5x (MÉTODOS 3.6.9.3). Además, para evitar la dispersión de los complejos retardados a lo largo del carril de siembra, los geles contenían glicerol a una concentración idéntica a la de las muestras.

Gel de poliacrilamida (ensayos de la retardo electroforética)	
Acrilamida:Bisacrilamida (29:1)	5%
Glicerol	5%
TBE	0.5x
Persulfato amónico	0.07%
TEMED	0.07% v/v
Desgasificar filtrando al vacío (tamaño poro 0.45µm)	

El desarrollo de la electroforesis se llevó a cabo a 4°C (en una cámara fría). El gel y el tampón de electroforesis TBE 0.5x (MÉTODOS 3.6.9.3) eran preparados con antelación y atemperados a 4°C.

Los geles eran sometidos a electroforesis, antes de aplicar las muestras, durante una hora a una intensidad de 20mA. Las muestras eran aplicadas en el gel sin la adición previa de tampón de carga. El tampón de carga era aplicado a un carril libre para poder seguir el desarrollo de la electroforesis. La duración de la electroforesis variaba en función del tamaño de la sonda utilizada. Una vez acabada, el gel era deshidratado en un secador de geles y puesto en contacto con una película de autorradiografía, a -80°C y con la ayuda de una pantalla intensificadora (HyperScreen™ Amersham).

3.9. CUANTIFICACIÓN DE CENTROS ABÁSICOS (*AP SITES*)

La cuantificación de centros AP se llevó a cabo empleando el *Oxiselect™ Oxidative DNA Damage Quantification Kit (AP sites)* (Cell Biolabs). Este *kit* se basa en una sonda de aldehído reactiva (ARP) que interacciona específicamente con un grupo aldehído sobre la región del centro abásico. Esto permite etiquetar los sitios abásicos con una biotina que posteriormente será detectada por un conjugado de estreptavidina.

Para la cuantificación de los centros abásicos espontáneos, se prepararon cultivos de las cepas de interés crecidos a 37°C y en constante agitación. Una vez en fase exponencial (OD₆₀₀ de 0.5), se recogieron las células mediante centrifugación y se aisló el DNA genómico mediante el *DNAzol® Kit* (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, se procedió a la cuantificación del DNA mediante *NanoDrop®ND-100 Spectrophotometer* (NanoDrop Technologies) y se inició el marcaje del DNA (100µg/ml) con la sonda ARP biotinilada tal como describe el *kit*. Posteriormente, se diluyó el DNA marcado hasta una concentración de 1µl/ml. Para la curva patrón, se hicieron diluciones seriadas del DNA-ARP *standard* en un rango de 0-40 ARP/100.000pb de modo que todas las diluciones quedaran con una concentración final de 1µg/ml. Finalmente, todas las muestras

fueron incubadas con el conjugado de estreptavidina y los centros abásicos fueron cuantificados comparando las absorbancias obtenidas en la reacción colorimétrica asociada a la sonda aldehído-reactiva respecto al DNA *standard* proporcionado por el *kit* (que contenía un número determinado de centros AP).

3.10. CONSTRUCCIÓN DE RNA ANTISENTIDO PARA EL GEN *gapA*

El silenciamiento de genes mediante RNAs antisentido (asRNA) es una aproximación muy útil para llevar a cabo estudios funcionales *in vivo* de proteínas, en especial las que presentan funciones alternativas. El silenciamiento puede ser parcial y reversible por lo que resulta especialmente útil para el estudio de genes esenciales, para los que la disrupción génica (mutantes *knockout*) no es posible.

El silenciamiento del gen *gapA* se llevó a cabo según el método basado en la utilización de PTasRNA descrito por Nakashima y Tamura, 2009 y en colaboración con la Dra. Laura Aguilera Gil.

En procariotas, se utilizan RNAs antisentido de cadena simple (asRNA) expresados a partir de vectores, pero la eficacia de silenciamiento es particularmente baja en *E. coli*. La adición de secuencias complementarias entre sí (PT, *Paired termini*) en las regiones flanqueantes al asRNA (PTasRNA) lo estabiliza en forma de horquilla, mejorando el silenciamiento.

En este trabajo con el fin de silenciar GAPDH se han diseñado dos PTasRNAs (posiciones -76/+86 y -97/+70) complementarios a la región que comprende el *Ribosome Binding Site* (RBS) y el codón AUG del mRNA de *gapA*. Los oligonucleótidos usados para amplificar las secuencias de asRNA a partir de DNA genómico de *E. coli* MC4100 se muestran en el ANEXO.1. Todos los fragmentos de PCR fueron clonados en primer lugar en el vector pBlueScript para facilitar la posterior digestión con las enzimas *NcoI* y *XhoI*. Los fragmentos obtenidos fueron clonados en los plásmidos pHN1009, pHN678 y pHN1242 de diferente número de copias y son inducibles por IPTG. Posteriormente, se transformó con estas construcciones la cepa de *E. coli* MC4100 (MÉTODOS 3.1.2.1).

El silenciamiento se confirmó mediante el ensayo de la actividad enzimática GAPDH (MÉTODOS 3.2.8.1) y la técnica de *Western Blot* (MÉTODOS 3.2.12) utilizando anticuerpos anti-GAPDH. El efecto del silenciamiento sobre el crecimiento bacteriano se evaluó mediante medición de la absorbancia de los cultivos a 600nm.

3.11. TRATAMIENTO DE CULTIVOS BACTERIANOS CON AGENTES GENOTÓXICOS

Con el fin de estudiar la implicación de GAPDH en los procesos de reparación del DNA, células deficientes o silenciadas en *gapA* y células tipo salvaje fueron tratadas con agentes que dañan el DNA como bleomicina (BM), metilmetanosulfonato (MMS) o peróxido de hidrógeno.

En primer lugar, se realizaron cultivos de las cepas de interés en medio SM-CAA 0.5%. Una vez en fase exponencial (OD_{600} de 0.5), los cultivos fueron tratados durante distintos períodos de tiempo, con BM (10 μ g/ml) en presencia de FeSO₄ (50 μ M/ml), MMS (10mM) o H₂O₂ (2.5mM). En los experimentos de interacción entre GAPDH y PGPasa la concentración final de BM fue de 8 μ g/ml. A continuación, las células eran recogidas por centrifugación y lavadas con SM para eliminar restos de estos compuestos. Posteriormente, se separaban alícuotas para evaluar la respuesta celular determinando la actividad enzimática GAPDH y la viabilidad celular.

La actividad enzimática de GAPDH fue determinada después de 2 horas de tratamiento con estos agentes, tal como se describe en (MÉTODOS 3.2.8.1.).

Para evaluar la viabilidad celular, se diluyeron las células en el mismo medio de cultivo y se sembraron en placas SM-CAA 0.5%. Después de 16 horas de incubación a 37°C se realizó el recuento de las unidades formadoras de colonias (CFUs).

3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para el análisis de los resultados se utilizó el programa PASW *Statistic* 17. La diferencia entre dos grupos se analizó mediante el test de la *t* de Student. Los análisis de las diferencias entre más de dos grupos, se llevaron a cabo mediante el análisis de la varianza “*one-way ANOVA*” seguido del test de Tukey. Un valor de $P < 0.05$ ha sido considerado estadísticamente significativo. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de la media (D.E).

4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ANÁLISIS DE GAPDH COMO REGULADOR DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *ndh* EN *E. coli*

Tal como se ha comentado anteriormente (INTRODUCCIÓN 1.2.2.2), algunos estudios realizados en *Streptococcus pyogenes* sugieren que GAPDH podría estar implicada en la regulación transcripcional de determinados genes en bacterias (Boël *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2011). En este sentido, en *E. coli* K-12, la enzima GAPDH fue aislada e identificada como proteína capaz de interactuar con el promotor del gen que codifica NADH deshidrogenasa-2 (*ndh*), aunque los autores no llevaron a cabo ningún tipo de caracterización ni análisis de su papel como regulador de la transcripción de este gen *in vivo* (Green *et al.*, 1997).

Basados en estos estudios nos planteamos analizar la posible función de GAPDH como regulador transcripcional del gen *ndh* en *E. coli*. Dicho estudio fue abordado mediante dos aproximaciones. Por un lado, se analizó la expresión de la fusión transcripcional del gen *ndh* al gen reportero *lacZ* en mutantes deficientes en GAPDH (MÉTODOS 3.2.8.2). Por otro, se analizó la interacción de GAPDH con el promotor *ndh* mediante ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) (MÉTODOS 3.8).

4.1.1. ANÁLISIS *IN VIVO* DE LA EXPRESIÓN DE $\Phi(\textit{ndh-lacZ})$ EN MUTANTES DEFICIENTES EN GAPDH

Para este análisis se procedió en primer lugar a la construcción de la fusión transcripcional $\Phi(\textit{ndh::lacZ})$ correspondiente a la región -254 a +129 del promotor del gen *ndh*. Dicha región fue amplificada por PCR a partir de DNA genómico de la cepa MC4100 utilizando los oligonucleótidos descritos en el ANEXO.1. Posteriormente, el fragmento amplificado fue clonado en el vector pRS551. La fusión fue transferida en forma de copia única al fondo genómico de dos cepas: (i) la cepa W3CG, la cual presenta una delección en el gen *gapA* ($\Delta\textit{gapA}::\text{Tn10}$) y por tanto es deficiente en GAPDH (Ganter y Plückthun, 1990) y (ii) a su cepa isogénica W3CG^{Glu+}, que contiene el gen *gapA* tipo salvaje y por tanto expresa GAPDH.

La cepa W3CG^{Glu+} fue obtenida en este trabajo a partir de la cepa W3CG $\Phi(\textit{ndh-lacZ})$ mediante transducción con el bacteriófago P1 con la finalidad de sustituir por recombinación homóloga su gen *gapA* mutado por el gen *gapA wild type*. La selección de los transductantes fue realizada en placas de medio mínimo con glucosa como fuente de carbono (los mutantes deficientes en GAPDH son incapaces de crecer en este medio). Siguiendo este protocolo se seleccionó un clon aislado, la cepa W3CG^{Glu+}. En esta cepa, la correcta recombinación del gen *gapA* y la expresión de GAPDH fueron corroboradas por determinación de la actividad

GAPDH y ensayos de *Western Blot* empleando anticuerpos anti-GAPDH (resultados no mostrados).

A continuación se procedió al análisis de la expresión de la fusión transcripcional $\phi(ndh::lacZ)$ en cultivos de las cepas W3CG y W3CG^{Glu+} en medio mínimo con malato 15mM y glicerol 20mM como fuentes de carbono ya que este es el único medio en el que el mutante deficiente en GAPDH puede crecer (Ganter y Plückthun, 1990). Puesto que está descrito que en *E. coli* la expresión del gen *ndh* está regulada por niveles de fosfato en fase estacionaria (Schurig-Briccio *et al.*, 2008), se emplearon dos tipos de medio mínimo, uno de ellos a una concentración de fosfato de 100mM (medio SM) (MÉTODOS 3.1.1.2) y el otro a una concentración final de 2mM (medio MT) (MÉTODOS 3.1.1.2).

Tabla 4.1 Actividad β -galactosidasa de la fusión transcripcional $\phi(ndh::lacZ)$ en distintas cepas y condiciones de cultivo. Las cepas indicadas se cultivaron en medio SM o MT suplementados con malato 15mM y glicerol 20mM como fuentes de carbono a distintos periodos de tiempo a 37°C. Los resultados son la media \pm D.E (n=3).

$\Phi(ndh-lacZ)$ β -Galactosidasa (Unidades Miller)				
Medio de Cultivo	W3CG ^{Glu+}		W3GC	
	7h	48h	7h	48h
SM	233.2 \pm 5.2	222.0 \pm 8.2	225.5 \pm 8.5	220.0 \pm 3.5
MT	452.0 \pm 10.4	443.5 \pm 7.5	453.5 \pm 6.3	429.0 \pm 8.0

Los resultados de la determinación de la actividad β -galactosidasa (Tabla 4.1) no muestran diferencias significativas en la expresión del operón *ndh* en la cepa que expresa GAPDH (W3CG^{Glu+}) con respecto al mutante (W3GC) a los distintos tiempos y medios de cultivos ensayados. En ambas cepas se observa un incremento en la expresión de *ndh* en medio de cultivo MT (baja concentración de fosfato) con respecto al medio SM (alta concentración de fosfato), tanto en cultivos en fase exponencial como en fase estacionaria tardía. Estos resultados son diferentes a los descritos con anterioridad donde se reportaba una disminución de la expresión del gen *ndh* en fase estacionaria en medio MT con glicerol como única fuente de carbono (Schurig-Briccio *et al.*, 2008). Estos autores relacionan este efecto con una reducción en los niveles intracelulares de NAD⁺ en estas

condiciones. Cabe destacar que la fuente de carbono utilizada en este trabajo es distinta. El mutante *gapA* no puede crecer en medios con glicerol como única fuente de carbono. La adición de malato abre nuevas vías metabólicas y proporciona reacciones enzimáticas alternativas que permiten compensar a nivel metabólico la deficiencia en GAPDH. En estas condiciones metabólicas pueden no darse cambios en los niveles intracelulares de NAD⁺ responsables del efecto descrito. De hecho, el análisis en este trabajo de la fusión $\phi(ndh::lacZ)$ en cultivos en MT o SM con glicerol + malato de la cepa MC4100, la misma cepa utilizada por Schurig-Briccio *et al.*, 2008, mostró un patrón de expresión equiparable al obtenido en la cepa W3GC^{Glu+}. Así pues, en estas condiciones de crecimiento, GAPDH no parece estar implicada en la regulación del gen *ndh*. Sin embargo, no se puede descartar su participación en otras condiciones. Cabe destacar la incapacidad del mutante *gapA* de crecer en otros medios de cultivos convencionales como por ejemplo el medio LB, limitando así, las condiciones de estudio *in vivo*.

4.1.2. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE GAPDH CON EL PROMOTOR DEL GEN *ndh*

El análisis de la interacción entre GAPDH y el promotor del gen *ndh* se llevó a cabo mediante EMSA como se describe en MÉTODOS 3.8. Para la reacción de unión DNA-proteína (MÉTODOS 3.8.2), el fragmento de DNA correspondiente al promotor del gen *ndh* utilizado como sonda (posiciones -220 a -20) fue amplificado por PCR, purificado y seguidamente marcado con ³²P (MÉTODOS 3.8.1). Como fracción proteica se empleó GAPDH purificada a partir de la proteína de fusión GST-GAPDH (MÉTODOS 3.2.5) tras digestión con factor Xa para la obtención de la proteína nativa (Figura 4.1A) o GAPDH-V5-His₆ purificada mediante cromatografía de afinidad en resina de níquel como se describe en MÉTODOS 3.2.6 (Figura 4.1B). Para verificar la especificidad de unión de la proteína al DNA, se llevaron a cabo ensayos de *Super Shift* en los que se adicionaron a la mezcla de incubación anticuerpos anti-GAPDH tal como se describe detalladamente en MÉTODOS 3.8.2.

Los resultados presentados en la figura 4.1C muestran la formación de un complejo DNA-proteína (CR). La intensidad de la banda es proporcional a la concentración de proteína GAPDH utilizada en las reacciones de *binding*. Sin embargo, el complejo formado no parece ser específico de la interacción directa entre GAPDH y secuencias presentes en el promotor del gen *ndh*, ya que la adición de anticuerpos anti-GAPDH a la mezcla de reacción no modificó su formación ni tampoco alteró su movilidad. Además, no se observó la formación del complejo de retardo cuando los ensayos de EMSA se llevaron a cabo con la otra preparación de GAPDH recombinante, la proteína GAPDH-V5-His₆.

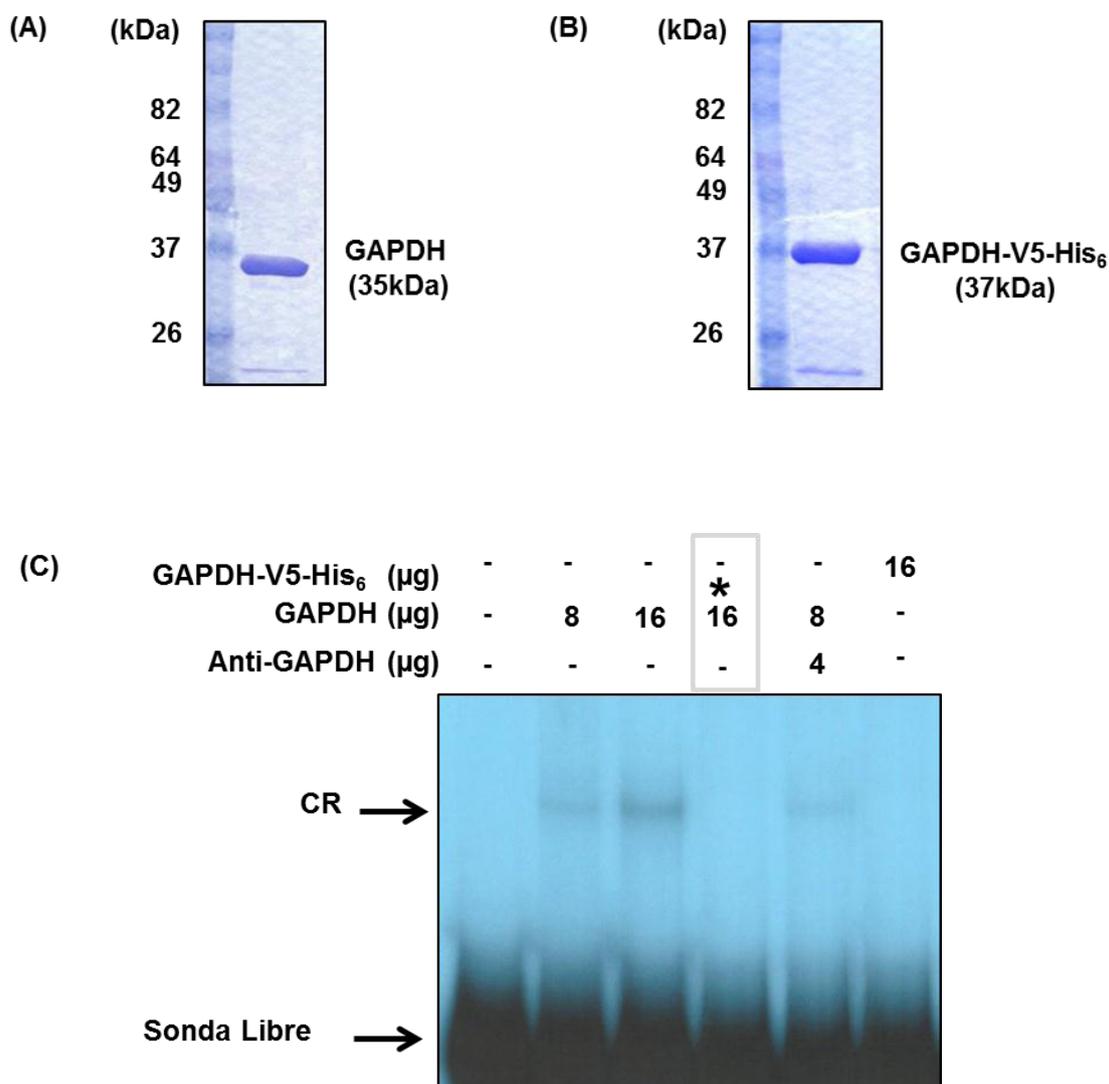


Figura 4.1 Análisis mediante EMSA de la unión de GAPDH al promotor del gen *ndh*. (A) Fracción purificada de GAPDH a partir de un extracto celular de la cepa BL21 transformada con el plásmido recombinante pGEX-*gapA*, que expresa GST-GAPDH. La proteína retenida a la resina de fue tratada con Factor Xa para la obtención de la proteína en su forma nativa. (B) GAPDH-V5-His₆ purificada a partir de un extracto celular de la cepa TOP10 pBAD-*gapA*, que expresa GAPDH fusionada a V5-His₆, por cromatografía de afinidad en una resina de Ni²⁺-NTA. (C) EMSA realizado con una sonda correspondiente al promotor *ndh* (posiciones -220 a -20) y las preparaciones purificadas de GAPDH recombinantes indicadas. Las reacciones de unión contenían poli(di-dC) 500mM como competidor no específico y fueron incubadas a 30°C durante 45 minutos. La incubación con el anticuerpo se hizo durante 45 min a temperatura ambiente. * Sonda no marcada con ³²P.

Estos resultados sugieren que el complejo de retardo formado puede ser debido a alguna proteína asociada a la preparación de GAPDH recombinante. Las dos preparaciones de GAPDH utilizadas en estos ensayos procedían de diferentes proteínas de fusión (GST-GAPDH o GAPDH-V5-His₆), y por tanto fueron purificadas

mediante columnas de afinidad y condiciones de tampón y pH diferentes. La proteína responsable de la formación del complejo no co-purificaría con GAPDH en la columna de níquel y elución con imidazol. Esta hipótesis es compatible con estudios masivos de *screening* realizados en *E. coli* para identificar interacciones entre proteínas. En estos estudios GAPDH aparece como candidata a interactuar con diversas proteínas relacionadas con el inicio de la transcripción como son las diferentes subunidades de la RNA polimerasa, entre ellas la subunidad σ^{70} , o reguladores transcripcionales como CpxR (Butland *et al.*, 2005).

El gen *ndh* codifica la NADH deshidrogenasa II. Esta proteína junto con la NADH deshidrogenasa I constituyen las deshidrogenasas iniciales en la cadena respiratoria. La NADH deshidrogenasa II presenta además actividad Cu (II) reductasa, mejora el crecimiento de *E. coli* en medios con alto contenido de cobre y mejora la resistencia al daño causado por cobre y peróxido de hidrógeno (Rodríguez-Montelongo *et al.*, 2006). El gen *ndh* está sometido a un complejo sistema de regulación. Es reprimido en condiciones de anaerobiosis por el regulador global FNR, si bien en estas condiciones y medios de cultivo ricos, es activado por la presencia de aminoácidos a través de un regulador inicialmente denominado Arr (*amino acid response regulator*). La expresión de este gen varía a lo largo de la fase de crecimiento y en esta regulación está implicada la proteína Fis (Green *et al.*, 1996). Más recientemente se ha descrito su regulación por PdhR, el represor del sistema génico que codifica el complejo multienzimático de la piruvato deshidrogenasa (Ogasawara *et al.*, 2007). Con el objetivo de aislar el factor Arr y caracterizar su mecanismo de regulación, Green *et al.*, 1997 utilizaron la metodología de *Dynabeads* que permite aislar proteínas que quedan retenidas al promotor en estudio (en este caso el del gen *ndh*) previamente biotinilado y unido a esferas recubiertas de estreptavidina. Siguiendo esta aproximación, estos autores identificaron proteínas que modulan la curvatura del DNA como IHF y HU y además encontraron GAPDH como proteína mayoritaria en la fracción con actividad Arr. En este estudio se descartó que GAPDH fuera el propio factor regulador Arr, ya que la actividad de unión a DNA asociada a esta fracción se observaba también en mutantes deficientes en GAPDH. Cabe destacar que dicho factor no ha sido todavía aislado, y en las bases de datos referentes a genes y/o proteínas de *E. coli* no existe ninguna entrada asociada a Arr.

En base a nuestros resultados y los de otros autores (Butland *et al.*, 2005), la interacción de GAPDH con la subunidad σ^{70} de la RNA polimerasa o con alguno de los múltiples reguladores que controlan la expresión de *ndh* explicaría la asociación de GAPDH al promotor de este gen. Así pues la interacción no sería directa por afinidad con una secuencia de DNA concreta, sino a través de su interacción con proteínas implicadas en el inicio y/o control de la transcripción. No obstante, no se puede descartar que a través de estas interacciones GAPDH pueda ejercer una función moduladora del inicio de la transcripción. Ya hemos comentado que el estudio funcional de la deficiencia de GAPDH en la expresión del

gen *ndh* queda limitado por la incapacidad de estos mutantes de crecer en la mayoría de los medios de cultivo habituales. Aunque *gapA* no puede considerarse un gen esencial, la incapacidad de los mutantes *gapA* de crecer en medio LB determina incluso la ausencia de un mutante de este tipo en la colección denominada “*Keio collection*” (Baba *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 2009; *National BioResource Project E. coli Strain NBRP*).

En conjunto estos resultados nos han llevado a abordar una aproximación distinta para la caracterización de nuevas funciones de GAPDH en *E. coli* a través de la identificación de proteínas capaces de interactuar con esta enzima.

4.2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON GAPDH EN *E. coli*

En la actualidad y desde una perspectiva de biología de sistemas, la identificación de interacciones proteína-proteína en las células resulta de gran importancia para entender los procesos biológicos a nivel molecular. Así, cada vez tiene mayor importancia el estudio de las proteínas, no de manera individual sino a través de las interacciones que establecen con otras proteínas o biomoléculas ya que estas asociaciones son fundamentales para el desarrollo de las funciones celulares. De hecho, las diferentes funciones de GAPDH en humanos fueron identificadas a través de la detección de GAPDH como componente de complejos proteicos implicados en los procesos celulares en estudio (Sirover 2005).

En este trabajo nos hemos planteado explorar nuevas funciones de GAPDH a nivel intracelular en *E. coli* mediante la utilización de metodologías que permiten identificar y evaluar interacciones proteína-proteína.

4.2.1. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON GAPDH MEDIANTE *CROSS-LINKING IN VIVO* CON FORMALDEHÍDO

Existen publicaciones anteriores a este trabajo sobre estudios masivos en *E. coli* encaminados a identificar interacciones entre proteínas, basados en el uso de proteínas fusionadas a un *tag* o etiqueta que permiten la purificación de los complejos proteicos por cromatografía de afinidad (Butland *et al.*, 2005; Arifuzzman *et al.*, 2006). Con este tipo de metodología, las interacciones débiles o transitorias pueden perderse durante el proceso de lavado. Por ello nos planteamos en este trabajo abordar, como primera aproximación al estudio de nuevas funciones de GAPDH en *E. coli*, la metodología del *cross-linking in vivo* con formaldehído (FA) (MÉTODOS 3.3.1) acoplada a espectrometría de masas (MÉTODOS 3.2.11). Esta metodología permite fijar covalentemente las proteínas que interactúan *in vivo* dentro de las células evitando así la pérdida de componentes específicos del complejo durante la purificación. Mediante esta

técnica se pueden identificar interacciones débiles, incluso transitorias, difíciles de detectar mediante purificación o inmunoprecipitación directa (Sinz, 2010).

El FA es un agente altamente reactivo que reacciona con los grupos amino de los aminoácidos tales como lisina o arginina, generando enlaces covalentes entre proteínas intracelulares que se encuentran interaccionando. El FA presenta algunas características que lo hacen adecuado para la detección de interacciones proteína-proteína: (i) este compuesto penetra a través de la membrana celular, (ii) no altera la estructura de las proteínas, (iii) es capaz de producir uniones covalentes entre moléculas que se encuentran a una distancia inferior de 2Å, (iv) es compatible con procedimientos de purificación en condiciones altamente astringentes, i (v) las uniones generadas por FA son reversibles (Vasilescu *et al.*, 2004; Qin y Wang, 2009). Por todo ello, los componentes individuales de los complejos purificados pueden ser separados por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y analizados por espectrometría de masas.

En los últimos años la metodología del *cross-linking in vivo* con FA ha sido ampliamente empleada en experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina, sin embargo su uso en estudios de interacción proteína-proteína es todavía limitado (Sinz, 2010). Ejemplos de este tipo de aproximación son la identificación de nuevas proteínas que interaccionan con la forma activa constitutiva de M-Ras (Vasilescu *et al.*, 2004) o la identificación de glutamato deshidrogenasa como una proteína que interacciona con el regulador GltC en *Bacillus subtilis* (Herzberg *et al.*, 2007).

4.2.1.1. *Cross-linking in vivo* con formaldehído

Para la identificación de proteínas que interaccionan con GAPDH en *E. coli* se partió de cultivos en LB de la cepa TOP10 transformada con el plásmido pBAD-*gapA* que expresa la proteína GAPDH fusionada en su extremo C-terminal al epítipo V5 (GAPDH-V5) tras inducción por L-arabinosa. Cultivos inducidos de esta cepa fueron tratados con formaldehído al 1% durante 20 minutos (MÉTODOS 3.3.1). Los complejos formados *in vivo* fueron analizados a partir de los extractos celulares por *Western Blot* utilizando anticuerpos anti-V5 o anticuerpos anti-GAPDH. Como control, células TOP10 fueron procesadas en paralelo. Los resultados se muestran en la figura 4.2 dónde se observan bandas de distintos tamaños (70 a 160kDa), por encima de la banda correspondiente al monómero de GAPDH-V5 recombinante (37kDa), sólo en células tratadas con FA. Es conocido que GAPDH es capaz de formar un tetrámero estable. Por ello, las bandas de masa molecular inferior a 160kDa pueden ser atribuidas a complejos proteicos formados por la unión covalente de otras formas oligoméricas o monoméricas de GAPDH-V5 con proteínas intracelulares de *E. coli* después de la reacción de *cross-linking*.

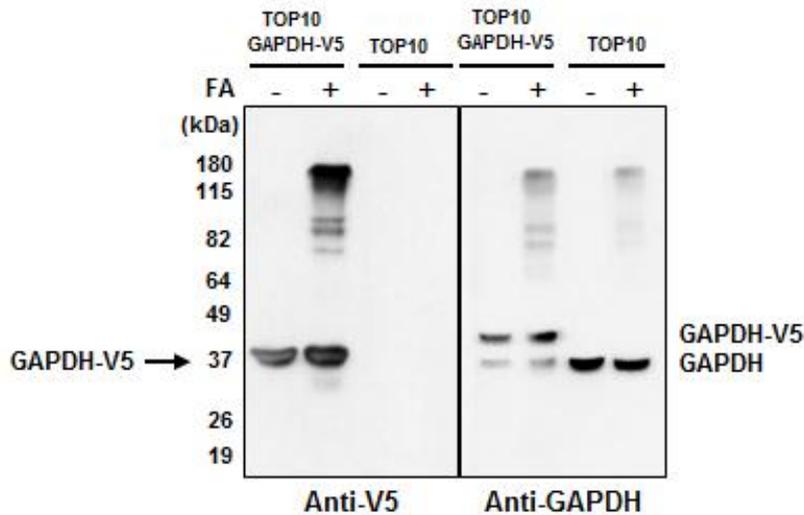


Figura 4.2 Análisis mediante *Western Blot* de los complejos proteicos formados con GAPDH-V5 después del *cross-linking in vivo*. Análisis de los complejos proteicos formados en presencia o ausencia de formaldehído (FA) mediante *Western Blot* empleando anticuerpos anti-V5 o anticuerpos anti-GAPDH en extractos celulares de la cepa TOP10(pBAD-*gapA*) que expresa GAPDH-V5 y de la cepa TOP10 como control.

Para determinar las mejores condiciones de reversión de las uniones cruzadas (*cross-linking*) se añadió a los extractos celulares tampón de carga de electroforesis (MÉTODOS 3.2.10.1) y posteriormente se incubó estas muestras a 65°C ó 95°C a diferentes períodos de tiempo. La reversión de la reacción de *cross-linking* fue evaluada mediante *Western Blot* utilizando anticuerpos anti-V5 (Figura 4.3).

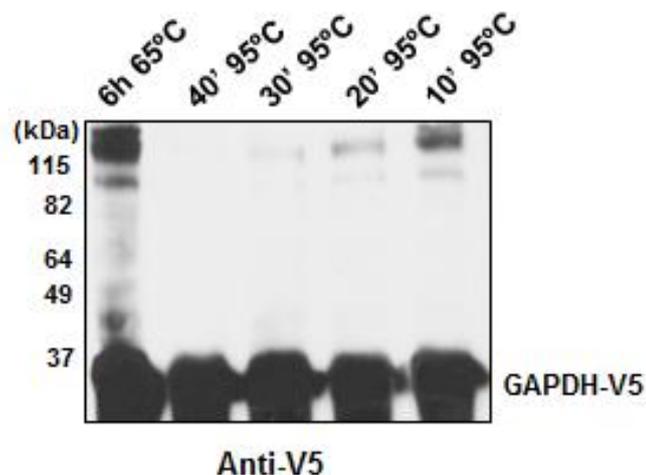


Figura 4.3 Análisis de la reversión del *cross-linking* mediante *Western Blot*. Extractos celulares obtenidos de cultivos de la cepa TOP10(pBAD-*gapA*) tratados con FA fueron incubados a las temperaturas y tiempos indicados. La reversión de la reacción de *cross-linking* fue analizada mediante *Western Blot* empleando anticuerpos anti-V5.

Tal como se observa en la figura 4.3, los complejos de alto peso molecular son todavía visibles después de incubar las muestras durante 6h a 65°C o 20 minutos a 95°C. En cambio la reversión es completa cuando las muestras se incuban durante 30 minutos a 95°C. Por tanto, estas condiciones fueron seleccionadas para posteriores experimentos.

4.2.1.2. Purificación mediante inmunoafinidad de los complejos formados con GAPDH-V5

Para identificar proteínas unidas a GAPDH-V5 después de la reacción de *cross-linking*, los extractos celulares obtenidos de cultivos incubados con FA de la cepa TOP10(pBAD-*gapA*) fueron primeramente pre-tratados con esferas de agarosa-proteína G, y los complejos generados por unión covalente a la proteína recombinante GAPDH-V5 fueron purificados por inmunoafinidad utilizando esferas de agarosa recubiertas de anticuerpos anti-V5. Para reducir las interacciones inespecíficas, las etapas de unión a la resina y lavados fueron realizados en condiciones astringentes con tampón RIPA (MÉTODOS 3.2.7.2). Después de extensos lavados, los complejos fueron eluidos por incubación con glicina 0.1M (pH 2.5) durante 15 min a 37°C e inmediatamente neutralizados con solución de Tris base. La muestra resultante fue concentrada mediante precipitación con acetona (MÉTODOS 3.2.3.3). Los complejos precipitados fueron resuspendidos en tampón de muestra de electroforesis e incubados durante 30 minutos a 95°C para revertir las uniones cruzadas. Las proteínas liberadas fueron separadas mediante SDS-PAGE 10% y visualizadas por tinción con *Sypro® Ruby Protein Gel Stain* (MÉTODOS 3.2.10.1). En paralelo se procesaron extractos celulares de la misma cepa procedentes de cultivos no tratados con FA como control. Los resultados se presentan en la figura 4.4. En la muestra procedente de *cross-linking* se observan varias bandas que corresponden a proteínas unidas a GAPDH-V5 en presencia de FA. En la muestra no tratada con FA se observa la copurificación de GAPDH nativa con GAPDH-V5 recombinante. Teniendo en cuenta las condiciones astringentes empleadas durante el proceso (SDS 0.1%, Desoxicolato sódico 1%, Tritón X-100 1% y Tris-KCl 0.14M), este resultado indica una fuerte interacción de los monómeros de GAPDH compatible con la estructura tetramérica estable reportada para esta proteína.

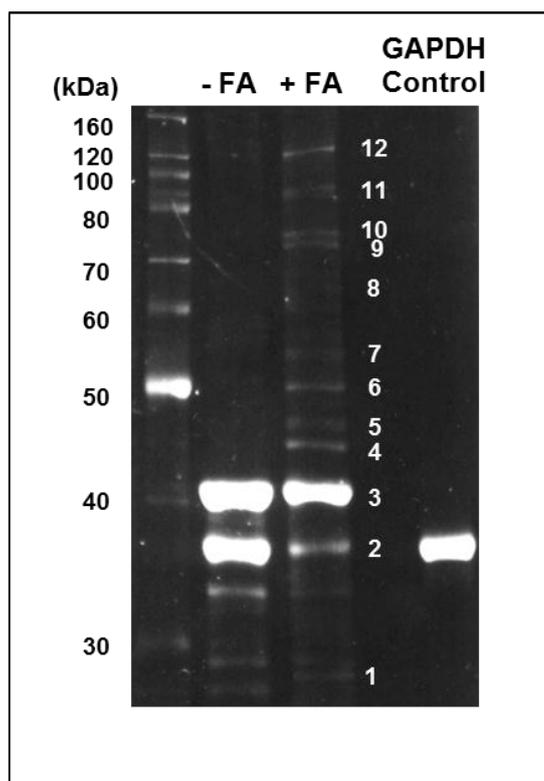


Figura 4.4. Purificación y separación electroforética de las proteínas unidas a GAPDH-V5 durante el proceso de *cross-linking in vivo*. Los complejos formados por interacción de GAPDH-V5 con proteínas intracelulares de *E. coli* tras la adición de FA a cultivos de la cepa TOP10 (pBAD-*gapA*) fueron purificados a partir de los extractos celulares utilizando esferas de agarosa-anti-V5 en condiciones astringentes. Como control se procesaron en paralelo muestras procedentes de cultivos de la misma cepa no tratados con FA. Después de revertir las uniones covalentes, las proteínas liberadas fueron separadas mediante SDS-PAGE 10% y visualizadas por tinción con Sypro® Ruby Protein Gel Stain (Molecular Probes). Las bandas numeradas fueron recortadas para posterior identificación mediante espectrometría de masas. M: Marcador de proteínas *Benmark™ Prestaneid Protein Ladder* (Invitrogen). - FA: Muestra procedente de cultivos no tratados con FA. + FA: Muestra procedente de cultivos tratados con FA. Último carril: GAPDH purificada control.

4.2.1.3. Identificación de las proteínas unidas a GAPDH-V5

A partir de la muestra procedente de *cross-linking* se recortaron 12 bandas, de las cuales 10 no estaban presentes en la muestra no tratada con FA (Figura 4.4, carril 3). Estas muestras fueron sometidas a digestión con tripsina y procesadas para análisis mediante cromatografía líquida combinada con espectrometría de masas (Cap-LC-nano-ESI-Q-TOF) en la Plataforma de Proteómica del *Parc Científic* de Barcelona (MÉTODOS 3.2.11). Los péptidos secuenciados permitieron identificar en las bases de datos 16 proteínas candidatas a interactuar con GAPDH (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Proteínas identificadas por espectrometría de masas, co-purificadas con GAPDH-V5 post-tratamiento con FA en condiciones astringentes.

Banda	Proteína (gen)	Swiss-Prot	kDa	Score	Péptidos	Función	Localización subcelular
1	<i>D-ribose binding protein (rbsB)</i>	P02925	28.5	236	5	Transporte	Periplasma
1	PGPasa (<i>gph</i>)	P32662	27.4	70	3	Enzima Metabólica	Citoplasma
2	GAPDH (<i>gapA</i>)	P0A9B2	36.1	447	11	Enzima metabólica	Citoplasma
2	OmpC (<i>ompC</i>)	P06996	40.4	91	3	Porina	Mem. externa
3	GAPDH-V5	--	--	347	12	Prot. Recombinante	--
4	EF-Tu (<i>tufA</i>)	P0CE47	43.3	503	14	Síntesis de proteínas	Citoplasma
5	Enolasa (<i>eno</i>)	P0A6P9	45.6	238	5	Enzima metabólica	Citoplasma
6	Triptofanasa (<i>tnaA</i>)	P0A853	53.1	183	5	Enzima metabólica	Citoplasma
6	Subunidad β -ATP sintasa (<i>atpD</i>)	P0ABB4	50.3	98	3	Síntesis de ATP	Asociada a membrana plasmática
7	Aldehído deshidrogenasa A (<i>aldA</i>)	P25553	52.4	284	6	Enzima metabólica	Citoplasma
7	Trigger factor (<i>tig</i>)	P0A850	49.0	115	4	Chaperona	Citoplasma
7	Piruvato quinasa (<i>pykF</i>)	P0AD61	51.6	97	3	Enzima metabólica	Citoplasma
7	Dihidrolipoil deshidrogenasa (<i>lpdA</i>)	P0A9P2	50.7	42	2	Enzima metabólica	Citoplasma
7	Subunidad α -ATP sintasa (<i>atpA</i>)	P0ABB0	55.2	49	2	Síntesis de ATP	Asociada a membrana plasmática
8	No identificada	--	--	--	--	--	--
9	DnaK (<i>dnaK</i>)	P0A6Y8	69.1	510	10	Chaperona	Citoplasma
10	Transcetolasa (<i>tktA</i>)	P27302	72.4	105	5	Enzima metabólica	Citoplasma
11	Aconitasa (<i>acnA</i>)	P25516	94.0	135	3	Enzima metabólica	Citoplasma
12	No identificada	--	--	--	--	--	--

Dos de las bandas más intensas (2 y 3) fueron identificadas como GAPDH (*score* de 447 y 347). La banda 2 corresponde a GAPDH nativa y la banda 3 a GAPDH-V5. Entre las proteínas identificadas se han encontrado varias enzimas metabólicas como la piruvato quinasa (PK), fosfoglicolato fosfatasa (PGPasa), aldehído

deshidrogenasa (AldA) y triptofanasa (TnaA), subunidades de la ATP sintasa, chaperonas como DnaK y *trigger factor*, factores involucrados en la síntesis de proteínas como el factor de elongación Tu (EF-Tu), componentes periplasmáticos de sistema de transporte de carbohidratos como la D-Ribosa *binding protein*, y proteínas de membrana externa como la porina OmpC.

Cuatro de las proteínas identificadas, DnaK, *trigger factor*, PGPasa y AldA aparecen también como proteínas candidatas a interactuar con GAPDH en otros estudios realizados en *E. coli* siguiendo otras aproximaciones o en distintas bases de datos como DIP (*Data Base of Interacting Proteins*) o *IntAct* (MATERIALES 2.5.2). Por ejemplo, en *E. coli* las chaperonas *trigger factor* (P0A850) y DnaK (P0A6Y8) fueron identificadas en estudios masivos de interacción proteína-proteína basados en la utilización de proteínas fusionadas a un *tag* y posterior purificación por cromatografía de afinidad de las proteínas que interactúan (Butland *et al.*, 2005; Arifuzzaman *et al.*, 2006).

El *trigger factor* interactúa con la subunidad grande del ribosoma cerca del canal de salida de péptidos y se une a los polipéptidos que están siendo sintetizados. De hecho, esta proteína ha sido propuesta como la primera chaperona que interactúa con las cadenas polipeptídicas nacientes y asiste al plegamiento co-traduccional de las mismas. Por lo tanto, la interacción de GAPDH-V5 con esta chaperona puede tener lugar durante la síntesis de esta proteína recombinante. Además, se ha reportado que la actividad de *trigger factor* previene la agregación y promueve el plegamiento *in vitro* de GAPDH desnaturalizada (Huang *et al.*, 2000). Cabe mencionar que tanto *trigger factor* como DnaK comparten el mismo *pool* de sustratos *in vivo*. De hecho, GAPDH ha sido identificada como sustrato de DnaK (Deuerling *et al.*, 2003). Adicionalmente, existen evidencias genéticas que indican que *trigger factor* coopera con DnaK para asegurar el correcto plegamiento de proteínas citosólicas. Así, la doble delección de los genes *tig* y *dnaK* causa la agregación de un gran número de proteínas citosólicas sintetizadas en *E. coli* (Deuerling *et al.*, 1999; Deuerling *et al.*, 2003). Por todo ello, la interacción entre la proteína recombinante GAPDH-V5 sintetizada y las dos chaperonas es esperable en células crecidas a 37°C. Además, esta interacción podría incrementar en situaciones de estrés tales como el tratamiento con formaldehído.

Tal como se ha mencionado anteriormente, GAPDH fue identificada como una posible candidata a interactuar con PGPasa (P32662) en estudios masivos de interacción proteína-proteína en *E. coli* (Arifuzzaman *et al.*, 2006). En este caso, la interacción entre las dos proteínas fue identificada en ensayos de *Pull-down* utilizando His₆-PGPasa inmovilizada en una columna de níquel.

Respecto la interacción de GAPDH con AldA (P25553), la información disponible en la base de datos *IntAct* corrobora nuestros resultados. Ambas proteínas han

sido identificadas formando un complejo proteico conjuntamente con L-asparaginasa-2 (P00805) mediante PAGE en condiciones nativas.

Las demás proteínas identificadas en este trabajo como posibles candidatas a interactuar con GAPDH (Tabla 4.2) no han sido experimentalmente encontradas interactuando con GAPDH en estudios anteriores. Sin embargo, algunas de ellas, como enolasa y transcetolasa, están propuestas como probables *partners* funcionales de GAPDH en la base *STRING Interaction Network* (MATERIALES 2.5.2). En otros casos, podría tratarse de: (i) proteínas que interactúan de manera indirecta con GAPDH a través de su asociación en complejos multiproteicos, o (ii) proteínas que establecen interacciones débiles o transitorias con GAPDH. En ambos supuestos, las condiciones de *cross-linking* utilizadas en este trabajo pueden haber favorecido la detección de estas proteínas.

Así pues, estos resultados nos sugieren que GAPDH, a través de múltiples interacciones directas o indirectas, podría estar participando o modulando procesos metabólicos, de transporte y de síntesis de proteínas.

4.2.2. PROTEÍNAS QUE INMUNOPRECIPITAN CON GAPDH EN AUSENCIA DE *CROSS-LINKING*

A continuación nos planteamos aplicar el proceso de inmunoprecipitación con anticuerpos anti-V5 a muestras procedentes de cultivos no incubados con formaldehído con la finalidad de identificar proteínas capaces de co-purificar con GAPDH-V5 en ausencia de *cross-linking*. Para ello se partió de un extracto celular obtenido a partir de cultivos inducidos de la cepa TOP10(pBAD-*gapA*) y se siguió el proceso de purificación con esferas de agarosa-anti-V5, en este caso bajo condiciones no astringentes. Las etapas de unión a la resina y lavados sucesivos se realizaron en tampón PBS (MÉTODOS 3.2.7.2). La elución de las proteínas retenidas se llevó a cabo con glicina 0.1M (pH 2.5) y, tras neutralización con solución de Tris base, dicha fracción fue concentrada por precipitación con TCA (MÉTODOS 3.2.3.2). Las proteínas precipitadas fueron resuspendidas en tampón de rehidratación y separadas a través de electroforesis bidimensional (MÉTODOS 3.2.10.2). La separación por isoelectroenfoque se llevó a cabo con un gradiente de pH de 3-10 (primera dimensión), seguida de separación a través de SDS-PAGE en geles al 12.5%. Posteriormente, se revelaron las proteínas por tinción del gel con Sypro® Ruby Protein Gel Stain (MÉTODOS 3.2.10.1). Los resultados se presentan en la figura 4.5. Además de los *spots* mayoritarios correspondientes a diferentes formas de GAPDH-V5 recombinante y GAPDH nativa, se observan otras proteínas que co-purifican con GAPDH-V5 en estas condiciones (indicadas con números blancos en la figura 4.5).

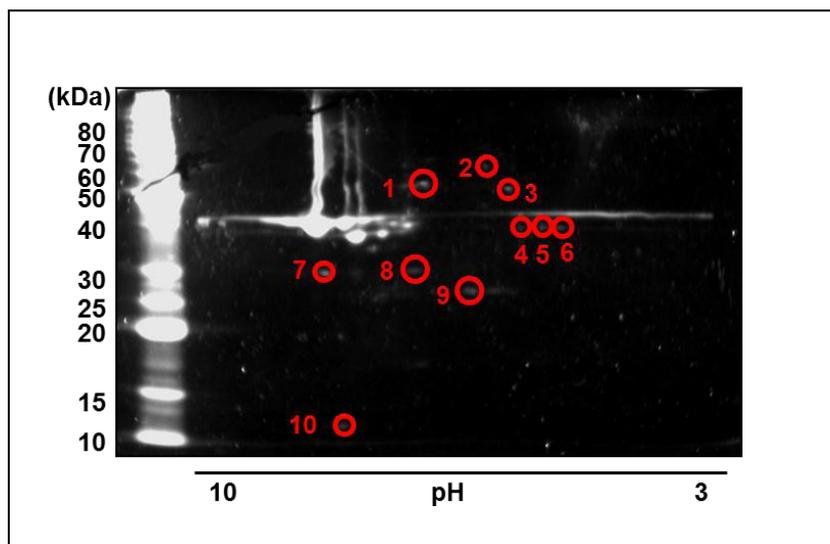


Figura 4.5. Análisis por electroforesis bidimensional de proteínas que inmunoprecipitan con GAPDH-V5 en ausencia de *cross-linking*. La muestra aplicada corresponde a la fracción purificada mediante inmunoafinidad con esferas de agarosa-anti-V5 a partir de un extracto celular de la cepa TOP10(pBAD-*gapA*) que expresa GAPDH-V5. Las proteínas fueron visualizadas con *Sypro® Ruby Protein Gel Stain*. Se recortaron diez *spots* (numerados en blanco) para su análisis por espectrometría de masas.

Cabe mencionar que se llevó a cabo en paralelo el mismo experimento partiendo de un extracto celular obtenido de cultivos en LB de la cepa TOP10 como control. En este caso, en ausencia de proteína fusionada al epítipo V5, el revelado del gel no mostró ninguna proteína (resultado no mostrado). Este resultado permite descartar la co-purificación de proteínas a través de interacciones inespecíficas con las esferas de agarosa-anti-V5.

Tal como se observa en la figura 4.5, se recortaron diez *spots* correspondientes a proteínas que co-purificaron con GAPDH-V5 en ausencia de *cross-linking* y condiciones no astringentes, para proceder su posterior identificación por espectrometría de masas. En este caso la separación e identificación de los péptidos se realizó mediante HPLC *nanoAcquity* (Waters) acoplado al espectrómetro de masas *OrbitrapVelos* (Thermo Scientific) (MÉTODOS 3.2.11).

Las proteínas identificadas se presentan en la tabla 4.3. Entre estas se encuentran proteínas también identificadas anteriormente interaccionando con GAPDH-V5 en presencia de formaldehído (Tabla 4.2). En concreto, las subunidades α y β de la ATP-sintasa, la porina OmpC y la enzima dihidrolipoil deshidrogenasa (LpdA), las tres primeras con *scores* bastante altos respecto a las demás.

Tabla 4.3. Proteínas que co-purificaron con GAPDH-V5 en ausencia de *cross-linking*.

Banda	Proteína (gen)	Swiss-Prot	kDa	pI	Score	Cobertura (%)	Péptidos	Función	Localización subcelular
1	Subunidad α -ATP sintasa (<i>atpA</i>)	P0ABB0	55.2	6.13	608.6	61.79	29	Síntesis de ATP	Asociada a membrana plasmática
1	Antranilato sintasa componente II(<i>trpD</i>)	P00904	56.8	6.52	74.04	36.53	10	Biosíntesis de Triptófano	Citoplasma
1	Arabinose import ATP binding protein (<i>araG</i>)	P0AAF3	55.0	6.38	59.09	28.79	10	Transporte de L-Arabinosa	Citoplasma
1	Ribose import (<i>rbsA</i>)	P04983	55.0	6.14	50.91	30.54	11	Transporte de D-Ribosa	Citoplasma
1	Dihidrolipoil deshidrogenasa (<i>lpdA</i>)	P0A9P0	50.7	6.15	49.10	29.32	11	Componente E3 de la Piruvato DH	Citoplasma
2	No identificada	--	--	--	--	--	--	--	--
3	Subunidad β -ATP sintasa (<i>atpD</i>)	P0ABB4	50.3	5.01	1150	85.87	40	Síntesis de ATP	Asociada a membrana plasmática
4	OmpF (<i>ompF</i>)	P02931	39.3	4.96	156.9	72.10	19	Porina	Membrana
5	OmpC (<i>ompC</i>)	P06996	40.3	4.82	445.0	72.21	31	Porina	Membrana
5	GAPDH (<i>gapA</i>)	P0A9B2	35.5	7.11	154.0	69.18	19	Enzima metabólica	Citoplasma
6	GAPDH (<i>gapA</i>)	P0A9B2	35.5	7.11	629.1	12.91	29	Enzima metabólica	Citoplasma
7/9/10	GAPDH (<i>gapA</i>) proteólisis	P0A9B2	--	--	--	--	--	Enzima metabólica	Citoplasma
8	D-tagatose -1.6-bisfosfoaldolasa-subunidad GatY (<i>gatY</i>)	P0C8J6	30.8	6.34	259.5	72.18	21	Enzima metabólica	Citoplasma

Otra proteína identificada, por otros autores, interaccionando con GAPDH en ausencia de *cross-linking* es GatY (31kDa), la subunidad catalítica de la D-tagatosa-1,6-bisfosfato aldolasa. La actividad y estabilidad de esta enzima están reguladas por la subunidad GatZ (Brinkkötter *et al.*, 2002). GatZ fue identificada interaccionando con GAPDH en estudios masivos de proteómica realizados por Butland *et al.*, 2005. Por tanto, la interacción de GAPDH con la enzima D-tagatosa-1,6-bisfosfato aldolasa en su forma heterodimérica ha sido evidenciada a través de dos aproximaciones experimentales independientes. En los experimentos de *cross-linking in vivo*, realizados en este trabajo, no se identificaron GatY o GatZ como proteínas candidatas a interaccionar con GAPDH (Tabla 4.2). Sin embargo, es importante destacar que en estos experimentos sólo se analizaron por MS las proteínas que estaban presentes específicamente en las muestras tratadas con FA. En este caso GatY podría ser una de las bandas no escindidas del gel, con una masa molecular alrededor de 30kDa, visible también en la muestra control, procedente de células no tratadas con FA.

La proteína con mayor *score* en este análisis resultó ser la subunidad β de la ATP sintasa (AtpD), con 40 péptidos identificados que cubren el 85.87% de la secuencia (Tabla 4.3). Esta subunidad interacciona con la subunidad α (AtpA) para formar el dominio catalítico implicado en la síntesis de ATP. La subunidad AtpA también co-purifica con GAPDH-V5, aunque el análisis por espectrometría de masas muestra un menor *score*. En este caso, se han secuenciado 29 péptidos que cubren el 61.79% de la secuencia (Tabla 4.3). La co-purificación de AtpA con GAPDH-V5 puede ser por interacción directa entre estas proteínas, o por interacción indirecta a través de la unión de AtpA a la subunidad AtpD de la ATP sintasa.

Es de destacar que en el *spot* 1 se han identificado, además de AtpA, otras proteínas con capacidad de unir ATP, como AraG y RbsA. Todas las proteínas identificadas en el *spot* 1 presentan un pI y una masa molecular similares, lo que es compatible con su inclusión en el mismo *spot*. El hecho que 3 de las 5 proteínas presentes en este *spot* presenten dominios de unión a ATP sugiere que GAPDH puede tener afinidad por tales dominios. En este sentido, el análisis proteómico masivo realizado en *E. coli* por Butland *et al.*, 2005 identificó a GAPDH como una proteína candidata a interactuar con ATPasas como YjeE (ATPasa con gran afinidad para ADP, esencial para la integridad del nucleoide; P0AF67), o GTPasas como YjeQ (GTPasa asociada al ribosoma; P39286). Este tipo de interacciones puede sugerir un papel regulador de GAPDH en procesos dependientes de energía. Uno de estos procesos es el de motilidad celular. En este contexto se ha sugerido que GAPDH puede tener un papel importante en la motilidad del alga *Dunaliella salina*. En ésta, GAPDH forma parte del proteoma del flagelo y, además, el silenciamiento de la expresión de GAPDH mediante RNAi provoca una reducción de su motilidad (Jia *et al.*, 2009). Si bien en *E. coli* no hay estudios sobre la implicación de GAPDH en los procesos de motilidad, en la base de datos DIP (*Database of Interacting Proteins*) la ATP sintasa específica de flagelo (P52612) aparece como proteína candidata a establecer complejos con GAPDH.

La relación entre GAPDH y procesos celulares involucrados en la producción y conversión de energía ha sido postulada recientemente en *Streptococcus pyogenes* (Jin *et al.*, 2011). En este patógeno, la secreción de GAPDH hacia la superficie bacteriana es esencial para su virulencia. Mutantes incapaces de exportar esta proteína, y por tanto con niveles intracelulares de GAPDH superiores a los de la cepa tipo salvaje, presentan concentraciones intracelulares de ATP incrementadas. Además, el análisis por *microarrays* de este mutante mostró niveles de expresión reducidos para genes que codifican ATPasas dependientes de Na^+ pero niveles de expresión incrementados de genes que codifican ATPasas acopladas a la translocación de protones, entre ellas la ATP sintasa (denominada también F_0F_1 ATPasa) (Jin *et al.*, 2011). En este contexto, la interacción observada en este trabajo entre GAPDH y las subunidades de la ATP sintasa estaría en esta línea, y podría indicar funciones reguladoras de GAPDH en procesos dependientes de ATP a

través de mecanismos distintos (control de la expresión génica y control de la actividad enzimática mediante interacciones proteína-proteína).

4.2.3. VALIDACIÓN POR OTRAS METODOLOGÍAS DE LAS INTERACCIONES IDENTIFICADAS

Las interacciones proteína-proteína deben confirmarse mediante otra metodología. En este trabajo se han abordado metodologías basadas en el sistema del doble híbrido y en ensayos de tipo *Pull-down*, los cuales analizan la co-purificación de proteínas (*prey proteins*) con una proteína inmovilizada en una matriz de afinidad (*bait protein*).

4.2.3.1. Sistema de doble híbrido basado en la reconstitución de la adenilato ciclasa en *E. coli*.

Para confirmar la funcionalidad de las interacciones de GAPDH evidenciadas en presencia de formaldehído, nos planteamos analizar algunas de estas interacciones mediante el sistema bacteriano de doble híbrido BACTH (MÉTODOS 3.3.2).

Este sistema de doble híbrido permite la identificación de interacciones proteína-proteína mediante un test genético de *screening* y/o selección. La asociación *in vivo* de dos proteínas que interactúan se acopla a la producción de una molécula señalizadora reguladora, cAMP, que a su vez induce la expresión de genes específicos, dando lugar a un fenotipo seleccionable.

Para dicho análisis se seleccionaron las proteínas identificadas mediante *cross-linking* EF-Tu, piruvato kinasa (PK) y triptofanasa (TnaA). En primer lugar se procedió a clonar los genes que codifican estas proteínas (*tufA*, *pykF* y *tnaA*), así como el gen que codifica GAPDH (*gapA*) en los vectores de este sistema, generando diferentes versiones de las proteínas fusionadas a los dominios T18 o T25 de la adenilato ciclasa, en su extremo amino- y/o carboxi-terminal. Para ello los genes *gapA*, *tufA*, *pykF* y *tnaA* fueron amplificados por PCR a partir de DNA genómico de la cepa MC4100. Los cebadores utilizados fueron diseñados para clonar los genes en las dianas de restricción *BamHI* y *EcoRI*, y en fase con los marcos de lectura de los dominios T18 y T25 de los plásmidos de este sistema de doble híbrido (ANEXO.1). Concretamente, se clonó el gen *gapA* en los vectores de alta expresión pUT18 y pUT18C y en los vectores de baja expresión pKT25 y pKNT25 de modo que pudiéramos obtener fusiones de GAPDH con ambos dominios de la adenilato ciclasa (T18 y T25) tanto en su extremo amino- como carboxi-terminal. Los genes *pykF* y *tnaA* fueron clonados en el vector pUT18 generando la fusión de las proteínas PK y TnaA en el extremo amino-terminal de T18, mientras que el gen *tufA* fue clonado en el vector pUT18C generando la fusión de EF-Tu en el extremo carboxi-terminal de T18. Los plásmidos recombinantes seleccionados fueron confirmados mediante secuenciación. Posteriormente, se procedió a la co-

transformación de parejas de plásmidos recombinantes complementarios en la cepa deficiente en adenilato ciclasa DHM1 según se relaciona en la tabla 4.4.

Tabla 4.4. Esquema de las co-transformaciones llevadas a cabo en la cepa de *E. coli* DHM101, deficiente en adenilato ciclasa. Se indica el número de referencia de los resultados de complementación presentados en la figura 4.6.

Plásmidos		Resultado figura 4.6	Tipo de ensayo
pKT25- <i>zip</i>	pUT18C- <i>zip</i>	1	Control positivo del <i>kit</i>
pKT25	pUT18C	2	Control negativo
pKT25- <i>gapA</i>	pUT18C	3	Control negativo
pKT25- <i>gapA</i>	pUT18C- <i>tufA</i>	4	Construcción problema
<i>gapA</i> -pKTN25	pUT18C- <i>tufA</i>	5	Construcción problema
pKT25- <i>gapA</i>	<i>pykF</i> -pUT18	6	Construcción problema
<i>gapA</i> -pKTN25	<i>pykF</i> -pUT18	7	Construcción problema
pKT25- <i>gapA</i>	<i>tnaA</i> -pUT18	--	Construcción problema
<i>gapA</i> -pKTN25	<i>tnaA</i> -pUT18	--	Construcción problema
pKT25- <i>gapA</i>	pUT18C- <i>gapA</i>	8	Control de homodimerización
<i>gapA</i> -pKTN25	pUT18C- <i>gapA</i>	9	Control de homodimerización

Como controles negativos de la interacción se ensayaron las co-transformaciones de los plásmidos vectores que expresan sólo T25 o T18, y la co-transformación de la construcción *gapA* fusionada a T25 con la que expresa sólo T18. Este último ensayo sirve de control negativo de la interacción inespecífica de GAPDH al fragmento T18. Así, cualquier heterodimerización positiva será debida a la interacción entre las proteínas objeto de estudio. Asimismo, puesto que GAPDH es un tetrámero *in vivo*, la co-transformación de las construcciones de T25-*gapA* y T18-*gapA* debería de comportarse como un control positivo de la interacción entre subunidades de GAPDH. En el control positivo de interacción suministrado por el *kit*, cada dominio de la adenilato ciclasa está fusionado a una dominio de cremallera de leucinas. La interacción de T25 y T18 a través de este dominio restaura la actividad de síntesis de cAMP y la consiguiente activación de los sistemas génicos *lac* y *mal*.

Las células transformadas según el esquema que se muestra en la tabla 4.4, se sembraron en medios LB-Xgal-IPTG (medio para evaluar la expresión del operón lactosa) y en McConkey-maltosa-IPTG (medio para evaluar la fermentación de maltosa). El IPTG actúa como inductor de la expresión de las proteínas quiméricas.

Las placas se incubaron a una temperatura de 30°C durante un máximo de 4 días. En la figura 4.6 se muestran los resultados de estos ensayos realizados en el fondo de la cepa DMH1. Cabe destacar que este mismo *screening* se llevó a cabo en la cepa BHM101, también deficiente en adenilato ciclasa y suministrada en el mismo *kit*, con iguales resultados (no mostrado).

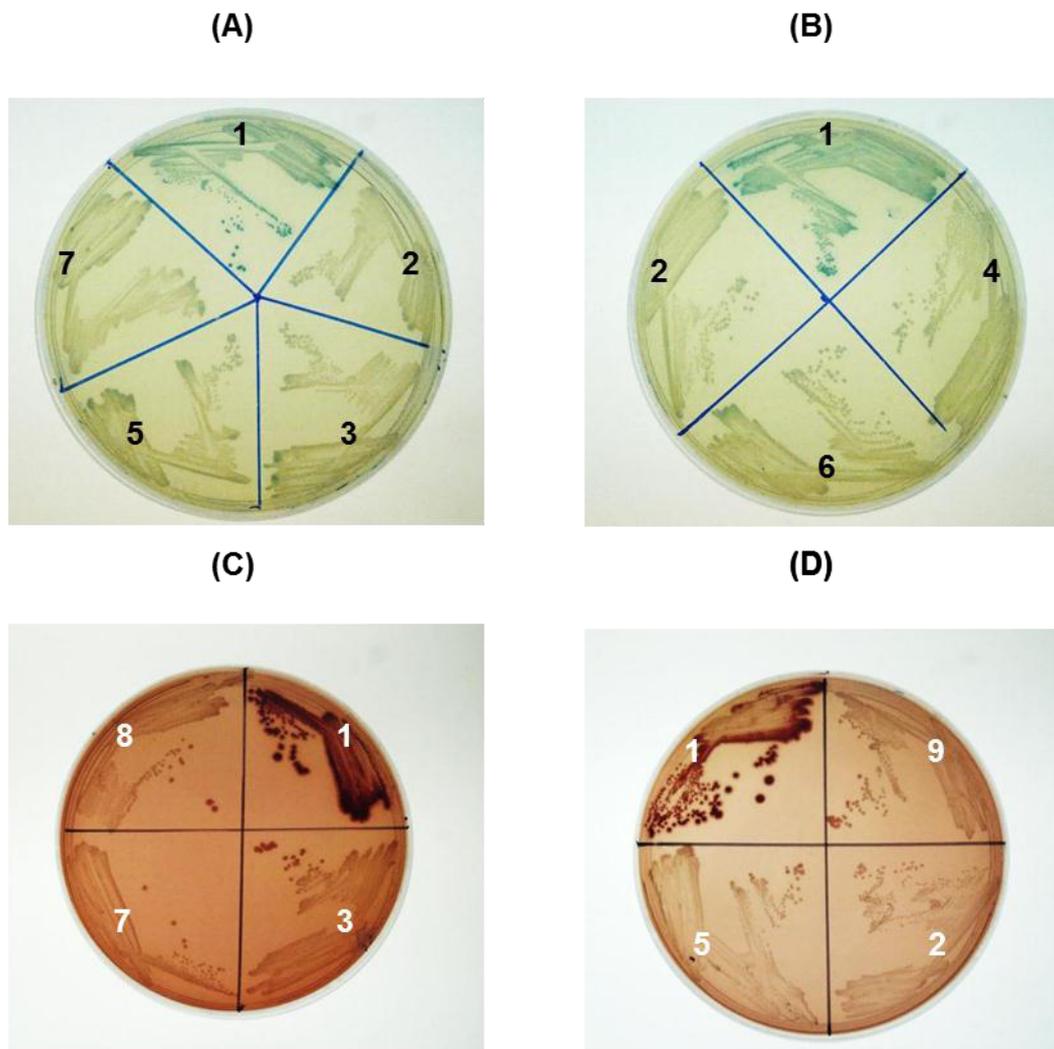


Figura 4.6. Análisis de la interacción de GAPDH con las proteínas EF-Tu y PK mediante el sistema de doble híbrido BACTH. A) y B) Selección en placas de LB-XGal-IPTG; C) y D) selección en placas de McConkey-maltosa-IPTG. Las numeraciones corresponden a las combinaciones de los plásmidos recombinantes utilizadas en la transformación de la cepa DHM1, detalladas en la tabla 4.4.

Como era de esperar los controles negativos anteriormente especificados aparecían como colonias blancas tanto en las placas de LB-Xgal-IPTG como en las de McConkey-maltosa-IPTG (Figura 4.6, paneles 2-3). En estos casos, la ausencia de interacción no restaura la actividad adenilato ciclasa y por tanto no tiene lugar la expresión de los operones *lac* y *mal*. La transcripción de estos sistemas génicos sí que tiene lugar en el control positivo resultante de la interacción entre las construcciones T25-*zip* y T18-*zip* (paneles 1) lo que se traduce en colonias azules

en LB-Xgal-IPTG y colonias rojas en McConkey-maltosa-IPTG. La aparición del color era evidente a las 24-48 horas.

Las construcciones problema *gapA-tufA* (paneles 4-5) y *gapA-pykF* (paneles 6-7) generaron colonias blancas como los controles negativos. Si se dejaba incubar hasta los 4 días empezaba a observarse un cierto color pálido que resultaba similar al desarrollado también por los controles negativos. El mismo resultado se obtuvo en el análisis de la interacción de GAPDH con TnaA (resultado no mostrado).

Según el protocolo de *screening* del sistema de doble híbrido BACTH, estos resultados indicarían que no hay interacción entre GAPDH y las proteínas EF-Tu, PK o TnaA, o bien que esta es muy débil y/o transitoria. Además hay que tener en cuenta que la construcción de proteínas de fusión (en este caso a dominios de la adenilato ciclasa) puede alterar la conformación de la proteína en estudio o enmascarar el dominio de unión con la proteína *partner*, lo que se traduciría en un resultado de complementación negativo. Para reducir la posibilidad de interferencias de este tipo, en este trabajo se han ensayado fusiones a T25 o T18 tanto en el extremo amino- como carboxi-terminal de GAPDH y de las proteínas en estudio. Aun así todas las combinaciones analizadas han dado resultados negativos. Cabe destacar, que la interacción propia de GAPDH consigo misma para formar el tetrámero activo (combinaciones T25-*gapA* + *gapA*-T18 y *gapA*-T25 + *gapA*-T18) (Figura 4.6, paneles 8-9) tampoco resultó funcional. Las colonias eran blancas al igual que los controles negativos. Esto puede sugerir una falta de expresión de alguna de estas fusiones de GAPDH a los fragmentos de la adenilato ciclasa. Está descrito que la sobre-expresión de algunas fusiones puede ser perjudicial para la bacteria o determinadas proteínas fusionadas no consiguen alcanzar niveles adecuados de expresión (Karimova *et al.*, 2005).

Además del *screening* en placa del fenotipo de las complementaciones, se llevó a cabo en paralelo el ensayo de la actividad β -galactosidasa de cultivos en LB + IPTG, en fase exponencial, de la cepa DHM1 transformada con las combinaciones antes indicadas. En este sistema de doble híbrido los controles negativos rinden valores de actividad β -galactosidasa entre 150-200 UMiller, y se considera interacción cuando se alcanzan valores superiores a 700 UMiller. El valor final de la actividad β -galactosidasa es un reflejo directo de la interacción entre las proteínas en estudio. Interacciones fuertes como la del control positivo del *kit* producen valores de actividad del orden de 6000 UMiller.

Los resultados obtenidos en el ensayo de la actividad β -galactosidasa en la cepa DMH1 para cada una de las combinaciones de las construcciones en estudio se presentan en la tabla 4.5. Como puede observarse, sólo se obtienen valores de actividad indicativos de interacción en el control positivo del *kit* (construcciones fusionadas a *zip*), mientras que los niveles de actividad β -galactosidasa son del mismo orden para los controles negativos y para las construcciones problema.

Aunque GAPDH forma un tetrámero estable *in vivo* (y por tanto sería de esperar interacción en este modelo), la co-transformación de diversas versiones de *gapA*-T25 y *gapA*-T18 no incrementa el nivel de actividad β -galactosidasa respecto a los controles negativos. Estos resultados corroboran los del *screening* en placas de selección e indican que la expresión de las construcciones quiméricas de GAPDH (o alguna de ellas) es deficiente o no funcional.

Tabla 4.5. Análisis de las interacciones proteína-proteína indicadas a través de la determinación de la actividad β -galactosidasa. La actividad enzimática fue determinada en cultivos en fase exponencial de la cepa DMH1 en LB+IPTG 0.5mM. Los resultados son la media \pm D.E de la media (n=3).

Actividad β -galactosidasa		
Construcciones		Unidades Miller
pKT25- <i>zip</i>	pUT18C- <i>zip</i>	7083 \pm 200
pKT25	pUT18C	163.5 \pm 10
pKT25- <i>gapA</i>	pUT18C	167.5 \pm 9
pKT25- <i>gapA</i>	pUT18- <i>tnaA</i>	160.5 \pm 15
pKT25- <i>gapA</i>	pUT18C- <i>tufA</i>	179 \pm 12
pKTN25- <i>gapA</i>	pUT18- <i>tnaA</i>	174 \pm 10
pKTN25- <i>gapA</i>	pUT18C- <i>tufA</i>	174 \pm 8
pKTN25- <i>gapA</i>	pUT18C- <i>gapA</i>	158.5 \pm 15
pKT25- <i>gapA</i>	pUT18C- <i>gapA</i>	144.5 \pm 11

Para analizar el nivel de expresión de las construcciones T18-*gapA* y T25-*gapA* se llevaron a cabo ensayos de *Western Blot* en extractos celulares de las dos cepas mutantes *cya* (deficientes en adenilato ciclasa) recomendadas por la casa comercial que suministra el *BACTH System* (cepas DHM1 y BHM101) y también comparativamente en la cepa XL1Blue. Para ello se prepararon cultivos en LB-IPTG de estas cepas transformadas con cada una de las construcciones quiméricas de GAPDH de manera individual. Al final de la fase exponencial se recogieron las células por centrifugación y se procesaron para obtener los extractos celulares, los cuales fueron analizados mediante *Western Blot* con anticuerpos anti-GAPDH. En la figura 4.7 se muestra el resultado obtenido para la construcción T18-*gapA*.

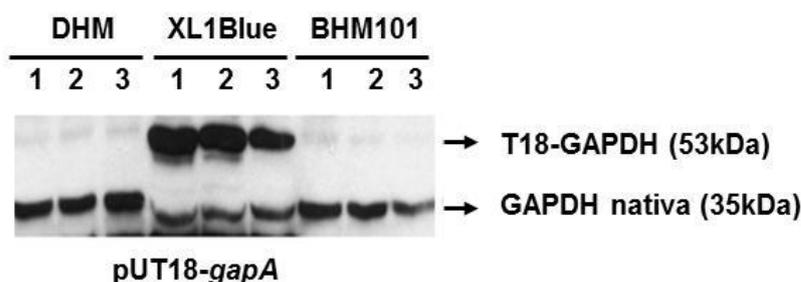


Figura 4.7. Análisis por *Western Blot*, utilizando anticuerpos anti-GAPDH, de la expresión de pUT18-*gapA* en las cepas de *E. coli* indicadas. Las muestras analizadas corresponden a extractos celulares obtenidos a partir de cultivos de las cepas indicadas en LB en presencia de diferentes concentraciones de IPTG: 5mM (carriles 1), 10mM (carriles 2) y 20mM (carriles 3). Se indica la banda correspondiente a la proteína quimérica GAPDH-T18 de 53kDa y la correspondiente a la GAPDH nativa de 35kDa, codificada en el genoma de las cepas en estudio.

Los resultados obtenidos mostraron la expresión de una proteína de 53kDa que corresponde a la quimera T18-GAPDH en la cepa XL1Blue, sin embargo, no se observó expresión de dicha construcción en las cepas deficientes en adenilato ciclasa suministradas en el *Kit*, a ninguna concentración de IPTG ensayada. El mismo resultado se obtuvo en el análisis de la expresión de la construcción T25-GAPDH (resultado no mostrado). La ausencia de expresión de estas construcciones quiméricas en ambas cepas mutantes *cya* explica los resultados negativos obtenidos en los ensayos de complementación fenotípica y actividad β -galactosidasa realizados en estas cepas, y en consecuencia descarta o limita el uso de este sistema de doble híbrido para el análisis de las interacciones de GAPDH en *E. coli*. Hay que tener presente que la cepa XL1Blue presenta el gen *cya*, que codifica la adenilato ciclasa, funcional y por tanto no resulta adecuada para este estudio.

Aunque este sistema de doble híbrido ha sido utilizado con éxito en el estudio de diversas interacciones entre proteínas implicadas en la división celular en *E. coli*, algunas de las construcciones planteadas no pudieron ser analizadas por diversos motivos (Karimova *et al.*, 2005). Para algunas proteínas quiméricas la sobreexpresión resultó tóxica para la bacteria (como en el caso de FtsZ-T18), o conducía a la inestabilidad del plásmido recombinante que la codifica (como en el caso de T18-FtsQ) (Karimova *et al.*, 2005). En el caso de las quimeras de GAPDH obtenidas y analizadas en este trabajo, es probable que su sobreexpresión lleve a la inestabilidad del plásmido en determinadas cepas o genere una proteína recombinante altamente insoluble, precipitada en forma de cuerpos de inclusión. Estos efectos serían más o menos acusados según la cepa analizada. Otros intentos llevados a cabo en nuestro grupo de investigación para obtener derivados recombinantes de GAPDH fusionada a otra proteína *reporter* (como β -lactamasa) han resultado también en un muy bajo nivel de expresión de la proteína

recombinante soluble e incluso favorecen la aparición de formas truncadas, lo que indicaría un cierto grado de inestabilidad de la proteína quimérica.

4.2.3.2. Ensayos de *Pull-down* con proteínas fusionadas a His₆-tag

Como el sistema de doble híbrido resultó inadecuado para la validación de las interacciones de GAPDH, nos planteamos como método alternativo abordar ensayos *in vitro* de *Pull-down* (MÉTODOS 3.3.4) empleando proteínas recombinantes fusionadas en su extremo N-terminal a His₆-tag. Se seleccionaron para este estudio las mismas proteínas analizadas anteriormente mediante el sistema del doble híbrido (factor de elongación EF-Tu, piruvato quinasa y triptofanasa) y además las subunidades α y β de la ATP sintasa (AtpA y AtpD). Destacar que ambas proteínas, AtpA y AtpD, fueron identificadas como posibles *partners* de interacción en los dos ensayos de inmunoprecipitación realizados con GAPDH-V5 (acoplado o no a *cross-linking in vivo*). Además, nos planteamos abordar dos modalidades de ensayos de *Pull-down*: (i) análisis de la interacción de GAPDH purificada con proteínas recombinantes inmovilizadas en la resina de Ni²⁺-NTA, y (ii) análisis de la interacción de GAPDH nativa presente en extractos celulares con proteínas recombinantes inmovilizadas en la resina de Ni²⁺-NTA.

4.2.3.2.1. Ensayos de *Pull-down* con proteínas inmovilizadas a resina de níquel y GAPDH purificada

Esta aproximación fue utilizada para el estudio de las interacciones de GAPDH con PK, EF-Tu y TnaA. Para ello, en primer lugar se procedió a clonar los genes que codifican estas proteínas en el vector pQE30, que permite obtener las proteínas fusionadas en su extremo N-terminal a un tag de His₆. Los genes fueron amplificados por PCR con *primers* diseñados para clonar en fase utilizando las dianas de restricción *Bam*HI y *Hind*III del vector (ANEXO.1). Las proteínas recombinantes fueron expresadas por inducción con IPTG tal como se describe en MÉTODOS 3.2.6 y a continuación inmovilizadas en una resina de níquel. La resina fue extensamente lavada con tampón conteniendo 20mM imidazol para eliminar las proteínas no específicas, y posteriormente incubada durante 90 minutos con GAPDH purificada (0.5ml de una solución 2mg/ml en tampón con 20mM imidazol). La fracción de GAPDH utilizada en estos ensayos fue purificada a partir de la proteína de fusión GST-GAPDH tras digestión con factor Xa (MÉTODOS 3.2.5; Egea *et al.*, 2007). Después de este período de incubación, la resina fue lavada de nuevo en presencia de 20mM imidazol y finalmente, las proteínas inmovilizadas fueron eluidas con distintas concentraciones de imidazol (entre 100 y 200mM). Las distintas fracciones de este proceso (*flow-through*, lavado y elución) fueron sometidas a electroforesis y visualizadas por tinción con azul de *Coomassie*. Paralelamente, se procesó un experimento control incubando la resina de Ni²⁺-NTA directamente con GAPDH purificada (en ausencia de proteínas inmovilizadas). Los resultados se muestran en la figura 4.8.

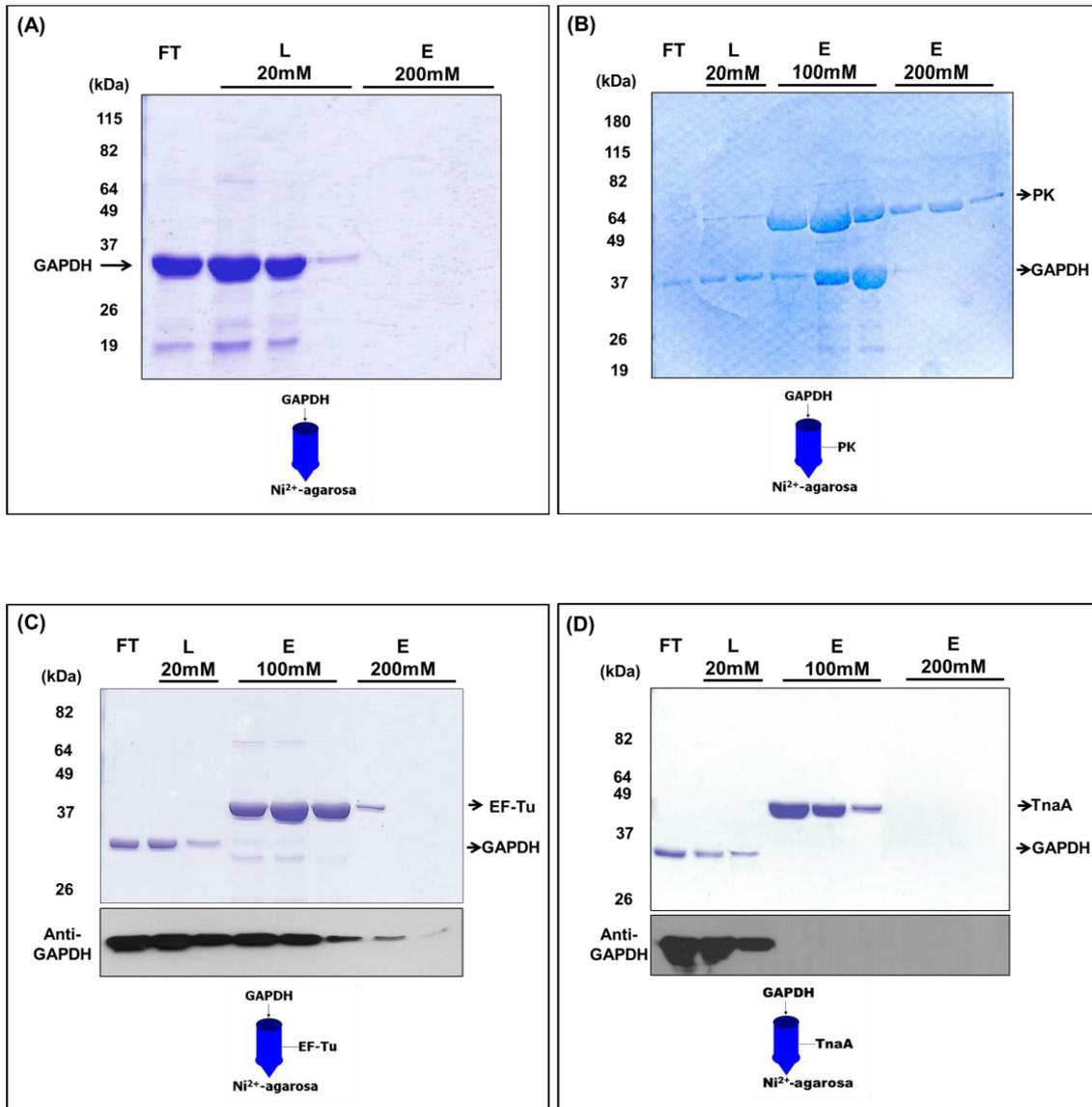


Figura 4.8. Análisis de la interacción entre GAPDH purificada y las proteínas PK, EF-Tu y TnaA mediante ensayos de Pull-down. Las proteínas recombinantes His₆-PK (B), His₆-EFTu (C) y His₆-TnaA (D) fueron previamente inmovilizadas en resina de níquel (Ni²⁺-NTA) y posteriormente incubadas con GAPDH purificada (0.5ml, 2mg/ml) durante 90 min en tampón con 20mM imidazol. En paralelo se incubó resina Ni²⁺-NTA directamente con GAPDH purificada como control (A). Después de extensos lavados las proteínas inmovilizadas fueron eluidas con 100 y 200mM imidazol. Las fracciones resultantes de este proceso (FT, *flow-through*; L, lavado; E100mM y E200mM, elución y concentración de imidazol) fueron analizadas mediante SDS-PAGE y tinción con azul de *Coomassie*. En el caso de las proteínas EF-Tu y TnaA (C y D), las fracciones fueron también analizadas mediante *Western Blot* con anticuerpos anti-GAPDH.

Como se observa en la figura 4.8A, GAPDH no queda retenida de manera inespecífica a la resina de níquel. El lavado en presencia de 20mM imidazol elimina totalmente la proteína aplicada a la resina, lo que representa un buen control para validar cualquier resultado positivo obtenido en este sistema.

La interacción de GAPDH con piruvato quinasa se muestra en el panel B de la figura 4.8. En este caso las dos proteínas co-purifican en las fracciones eluidas con 100mM de imidazol, donde se observan niveles elevados de ambas. Puesto que ambas proteínas son enzimas de la glicólisis y actúan en etapas no secuenciales de esta vía metabólica, cabe la posibilidad que esta interacción forme parte de un complejo proteico en que diversos enzimas de la vía se asocien para aumentar su eficiencia metabólica.

Respecto a la interacción entre GAPDH y el factor de elongación EF-Tu (Figura 4.8C), aunque la mayoría de la GAPDH aplicada es eliminada durante el lavado, en el gel teñido con azul de *Coomassie* se observa una débil banda de GAPDH co-purificando con EF-Tu en la fracción correspondiente a la elución con 100mM imidazol. Se observa además la presencia de otras bandas que pueden ser atribuidas a proteínas presentes en el extracto de *E. coli* con capacidad de interactuar con EF-Tu. De hecho en las bases de datos de interacción de proteínas (IntAct y Dip) EF-Tu aparece como candidata a interactuar con un gran número de proteínas en *E. coli*. Para confirmar que la proteína de 35kDa presente en la fracción de 100mM imidazol es efectivamente GAPDH se llevó a cabo el análisis por *Western Blot* de las diferentes fracciones del proceso utilizando anticuerpos anti-GAPDH (C, panel inferior). Los resultados obtenidos confirmaron la presencia de GAPDH en todas las fracciones eluidas. El bajo nivel de GAPDH observado en este caso podría sugerir una interacción indirecta entre ambas proteínas a través de su asociación con otras proteínas retenidas también durante el proceso. En este sentido, en el estudio masivo realizado por Butland *et al.*, 2005, GAPDH y EF-Tu fueron identificadas junto con otras 50 proteínas como posibles *partners* de interacción con las proteínas GreA o LysU. Alternativamente, se puede especular que la interacción entre GAPDH y EF-Tu sea de naturaleza débil y se vaya perdiendo de manera gradual durante el lavado.

Respecto a la enzima triptofanasa (Figura 4.8D), los ensayos de *Pull-down* llevados a cabo con GAPDH purificada no mostraron interacción alguna entre estas proteínas. Tanto el revelado del gel con azul de *Coomassie* como el análisis por *Western Blot* de las fracciones eluidas indican que GAPDH purificada no es retenida en absoluto por TnaA inmovilizada a la resina de níquel, lo que descarta una interacción directa entre estas proteínas en las condiciones de ensayo. En caso de existir una interacción directa esta podría ser de tipo lábil o transitorio, y por tanto haberse perdido durante el lavado exhaustivo, o bien depender de algún ligando o modificación de la(s) proteína(s). Podría también tratarse de una interacción indirecta a través de otras proteínas constituyentes de un complejo multiprotéico. Así por ejemplo, TnaA, al igual que GAPDH, es una de las 50 proteínas identificadas que co-purifica con LysU en el estudio realizado por Butland *et al.*, 2005. Ambas situaciones, unión lábil o indirecta, podrían explicar que la interacción GAPDH-TnaA observada en el experimento de *cross-linking in vivo*, no se observe en el ensayo de *Pull-down* llevado a cabo con las proteínas purificadas.

4.2.3.2.2. Ensayos de *Pull-down* con proteínas inmovilizadas a resina de níquel y GAPDH nativa presente en extractos celulares

Puesto que algunas de las interacciones proteína-proteína pueden depender de algún ligando, factor o condición, se realizaron ensayos de *Pull-down* en los que la fuente de GAPDH era la propia proteína nativa presente en el extracto celular de la cepa de *E. coli* que expresa la proteína de fusión. Si la interacción requiere un factor del extracto, este estaría presente y se uniría conjuntamente con GAPDH a la proteína inmovilizada en la resina de afinidad.

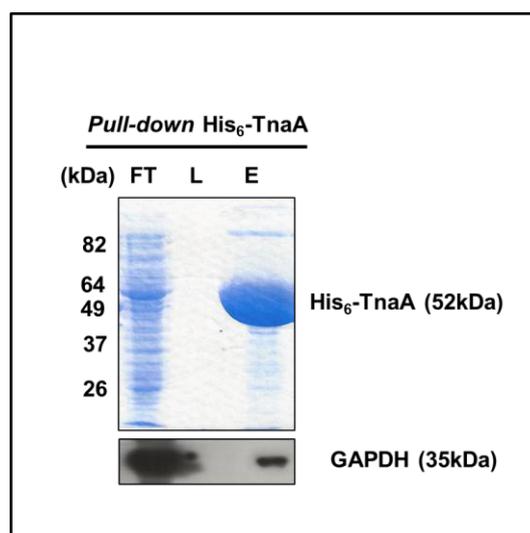


Figura 4.9. Análisis de la interacción de GAPDH con triptofanasa mediante ensayos de *Pull-down* seguidos de *Western Blot*. La proteína His₆-TnaA fue expresada en la cepa M15[pREP4] a partir del plásmido recombinante pQE30-TnaA mediante inducción con IPTG. El extracto celular obtenido fue aplicado a una columna de Ni²⁺-NTA. Después de lavados exhaustivos en presencia de 20mM imidazol se procedió la elución de la proteína inmovilizada en presencia de 300mM imidazol. Las fracciones resultantes del proceso de purificación (FT, *flow-through*; L, lavado; E, elución) fueron separadas mediante SDS-PAGE, visualizadas por tinción con azul de *Coomassie* (panel superior) y analizadas por *Western Blot* con anticuerpos anti-GAPDH (panel inferior). En la parte izquierda se indica la localización de los marcadores de peso molecular en kDa.

Esta aproximación fue aplicada al análisis de la interacción con TnaA, ya que la estrategia utilizando proteínas purificadas había resultado negativa. Para ello un extracto celular obtenido de la cepa M15[pREP4] transformada con el plásmido que expresa His₆-TnaA fue incubado con resina Ni²⁺-NTA. Tras el lavado con imidazol 20mM, la proteína recombinante fue eluida con imidazol 300mM. Las diferentes fracciones del proceso fueron analizadas mediante SDS-PAGE y tinción con azul de *Coomassie* y por *Western Blot* con anticuerpos anti-GAPDH. El resultado de este análisis se presenta en la figura 4.9. En este caso, se observa que una fracción muy pequeña de GAPDH co-purifica con His₆-TnaA. Este resultado sería

compatible con una interacción indirecta, favorecida por la presencia del factor conector aportado en el extracto celular.

El mismo procedimiento se utilizó para validar la interacción de GAPDH con las subunidades α y β de la ATP sintasa (AtpA y AtpD). En este caso las proteínas fusionadas a His₆-tag fueron expresadas en la cepa AG1 a partir de los clones ASKA JW3710 (His₆-AtpD) y ASKA JW3712 (His₆-AtpA) proporcionados por el *E. coli* Strain National BioResource Project (Kitagawa *et al.*, 2005). Las condiciones de inducción para cada proteína se detallan en MÉTODOS 3.2.6. Cabe destacar que la expresión de la proteína His₆-AtpD a 37°C producía una gran cantidad de proteína insoluble, por lo que se ajustaron las condiciones de inducción a 20°C y a una concentración final de IPTG de 0.1mM. Los extractos celulares obtenidos de cultivos inducidos fueron incubados con la resina Ni²⁺-NTA, seguido de excesivos lavados con 20mM imidazol y finalmente elución de las proteínas recombinantes con 300mM imidazol. Las fracciones eluidas fueron separadas mediante electroforesis, visualizadas por tinción con azul de *Coomassie*. Seguidamente, las muestras fueron analizadas mediante *Western Blot* utilizando anticuerpos anti-GAPDH.

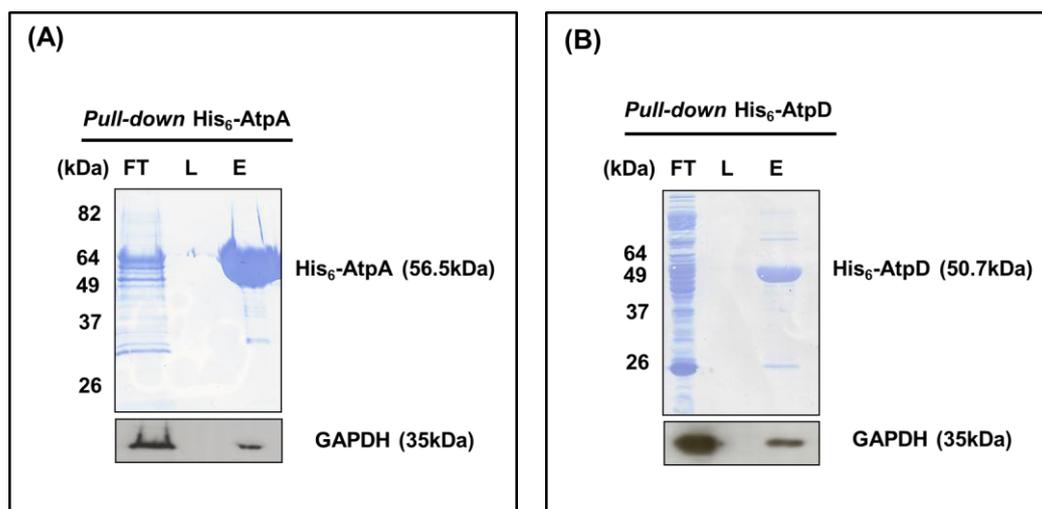


Figura 4.10. Análisis de la interacción de GAPDH con las subunidades de la ATP sintasa AtpA (A) y AtpD (B) mediante ensayos de Pull-down seguidos de Western Blot. Las proteínas His₆-AtpA y His₆-AtpD fueron respectivamente expresadas a partir de los clones ASKA JW3710 y ASKA JW3712 mediante inducción con IPTG. Los extractos obtenidos fueron aplicados a una columna de Ni²⁺-NTA. Después de lavados exhaustivos en presencia de 20mM imidazol se procedió la elución de las proteínas inmovilizadas en presencia de 300mM imidazol. Las fracciones del proceso de purificación (FT, *flow-through*; L, lavado; E, elución) fueron analizadas mediante SDS-PAGE y tinción con azul de *Coomassie* (paneles superiores) y por *Western Blot* con anticuerpos anti-GAPDH (paneles inferiores). En la parte izquierda de cada panel se indica la localización de los marcadores de peso molecular en kDa.

Tal como se observa en los resultados presentados en la figura 4.10, GAPDH co-purifica con AtpA y AtpD. Cabe destacar que la interacción de GAPDH con AtpA parece ser menor que la observada para AtpD. A partir de las intensidades de las bandas inmunodetectadas en las fracciones de elución se deduce que la fracción de GAPDH retenida por His₆-AtpA es mucho menor que la retenida por His₆-AtpD, aún cuando la cantidad de proteína inmovilizada es de 3 a 5 veces menor. Estos resultados son concordantes con el análisis por espectrometría de masas del ensayo de inmunoprecipitación con GAPDH-V5 presentado anteriormente (Apartado 4.2.2). Si bien las dos subunidades de la ATP sintasa inmunoprecipitaron con GAPDH, fue AtpD la que presentó el mayor *score*. Así pues, la interacción entre GAPDH y estas proteínas ha sido evidenciada a través de dos estrategias diferentes. Es probable que GAPDH interactúe con la subunidad β (AtpD) y la interacción con AtpA sea indirecta a través de la interacción entre subunidades de la ATP sintasa presentes en la unidad catalítica F1. Cabe destacar que aunque ambas subunidades unen nucleótidos solamente la subunidad β participa en la catálisis (Walker *et al.*, 1982).

Se podría especular que GAPDH podría actuar como sensor del estado energético de la célula, por ejemplo según la relación de los niveles intracelulares de NAD⁺/NADH. La interacción con AtpD podría depender de la unión de GAPDH a una de estas formas de la coenzima NAD⁺. A través de esta interacción GAPDH podría modular la actividad de síntesis de ATP en función de las necesidades energéticas de la célula. En este sentido, estudios realizados con células humanas de riñón (células COS-7) demuestran que GAPDH interactúa con el receptor del inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) localizado en la membrana del retículo endoplásmico (Patterson *et al.*, 2005). Se sabía que el NADH era un factor regulador de la liberación de calcio a partir del retículo endoplasmático promovida por IP₃, sin embargo se desconocía el mecanismo. Estos autores demostraron que es precisamente GAPDH, a través de su interacción con el receptor de IP₃, la que está implicada en este efecto. Así, en presencia de NAD⁺, GAPDH cataliza la oxidación del gliceraldehído-3-fosfato lo que lleva a la producción de NADH a nivel local, cerca del receptor del IP₃. Se genera así la señal de activación para la salida del calcio del retículo endoplasmático (Patterson *et al.*, 2005). Este es un ejemplo de cómo GAPDH, a través de su interacción con otras proteínas (en este caso el receptor de IP₃) puede actuar como modulador de procesos celulares (en este caso la señalización por calcio) según cambios asociados al estado energético de la célula.

En conjunto, los ensayos de *Pull-down* presentados hasta el momento han permitido corroborar algunas de las interacciones identificadas en los experimentos de *cross-linking in vivo* y en general indican, que se trata de interacciones en las que sólo una fracción de GAPDH está implicada. Es probable que cada interacción esté asociada a una conformación determinada y esta esté

modulada por la unión a un ligando concreto o a una modificación post-traducciona l de la proteína. De hecho estos mecanismos son la base de la multiplicidad de funciones en el caso de las proteínas *moonlighting*.

4.2.4. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE GAPDH Y PGPasa

Entre las proteínas identificadas en nuestro estudio de *cross-linking in vivo* se encuentra la fosfoglicolato fosfatasa (PGPasa). Nuestro grupo había demostrado la implicación de esta proteína en el metabolismo del 2-fosfoglicolato, producto generado intracelularmente en la reparación de los extremos terminales 3'-fosfoglicolato de las cadenas del DNA dañadas por agentes genotóxicos como la bleomicina (Povirk, 1996). Por acción de la PGPasa, el 2-fosfoglicolato es convertido en glicolato y posteriormente incorporado al metabolismo general. Esta vía permite la recuperación de los carbonos de los productos de la reparación del DNA (Pellicer *et al.*, 2003). En este contexto, la interacción de GAPDH con PGPasa, identificada en este trabajo, sugería un posible papel de GAPDH en procesos celulares relacionados con los mecanismos de reparación del DNA en *E. coli*. Hasta el momento la participación de GAPDH en estos procesos sólo había sido descrita en humanos. Por ello nos planteamos analizar con más detalle la interacción de GAPDH con PGPasa.

La interacción se validó mediante ensayos de *Pull-down* con PGPasa fusionada a GST (MÉTODOS 3.3.4), ya que en nuestro laboratorio se disponía de esta construcción (Pellicer *et al.*, 2003). Para ello se partió de un extracto celular obtenido a partir de la cepa BL21 transformada con el plásmido pGEX-*gph* que expresa GST-PGPasa tras inducción con IPTG. A partir de este extracto celular se procedió a purificar la proteína GST-PGPasa mediante cromatografía de afinidad en una columna de *glutathione-sepharose* 4B. Extractos celulares que expresan sólo GST (obtenidos a partir de la cepa BL21 transformada con el plásmido vector PGEX-3x) fueron procesados en paralelo como control. Después de un exhaustivo lavado con PBS, las proteínas GST o GST-PGPasa fueron eluidas con tampón de elución conteniendo 10mM glutatión. Las fracciones de este proceso de purificación fueron analizadas por SDS-PAGE seguida de tinción con azul de *Coomassie* o *Western Blot* con anticuerpos anti-GAPDH. Los resultados se presentan en la figura 4.11A. La inmunodetección de GAPDH en la fracción de elución de GST-PGPasa, pero no en la fracción de elución de GST control, confirma la interacción específica de GAPDH con PGPasa.

En un experimento paralelo, la elución de PGPasa de la resina de *glutathione-sepharose* 4B se llevó a cabo por digestión de la proteína de fusión con factor Xa. El análisis por *Western Blot* de las fracciones eluidas confirmó la co-elución de GAPDH con PGPasa (Figura 4.11B). En la tinción con azul de *Coomassie* de las fracciones eluidas, además de la proteína mayoritaria PGPasa (27kDa), se observan dos bandas adicionales. La proteína de 34kDa es una de las subunidades del factor

Xa. La banda de 35kDa fue escindida del gel e identificada como GAPDH por espectrometría de masas (se identificaron 5 péptidos con alto score de 183).

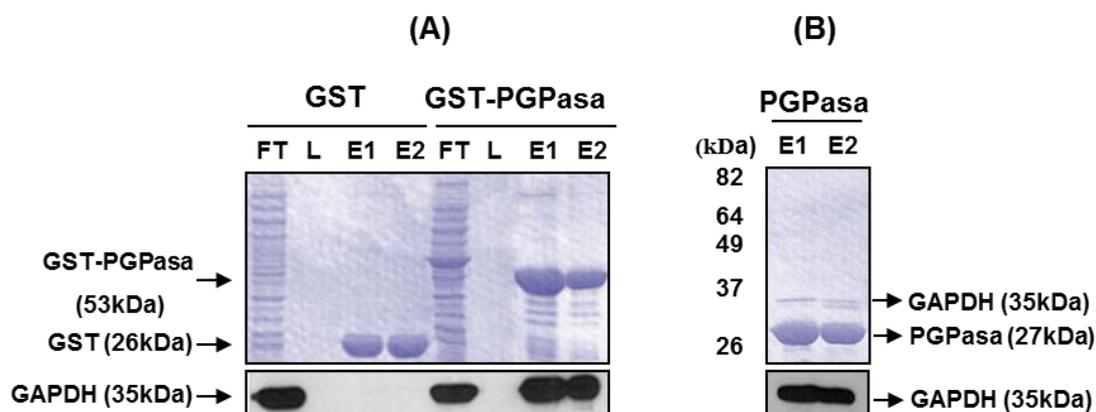


Figura 4.11. Análisis de la interacción entre GAPDH y PGPasa mediante *Pull-down* seguido de *Western Blot*. (A) Análisis por SDS-PAGE de la purificación de GST y GST-PGPasa mediante cromatografía de afinidad en una columna de *glutathione-sepharose* 4B tal como se describe en MÉTODOS 3.2.5. La purificación de GST se llevó a cabo en paralelo como control de la especificidad de interacción. La elución de GST y GST-PGPasa se llevó a cabo con glutatión 10mM. Las fracciones del proceso de purificación (FT, *flow-through*; L, lavado; E1 y E2, primera y segunda elución) fueron también analizadas por *Western Blot* con anticuerpos anti-GAPDH (panel inferior) (B) Análisis por SDS-PAGE y *Western Blot* con anticuerpos anti-GAPDH de la purificación de PGPasa mediante cromatografía de afinidad en una columna de *glutathione-sepharose* 4B y elución tras digestión de la proteína de fusión dentro de la columna con factor Xa.

Cabe destacar que la co-purificación específica de GAPDH con PGPasa se obtuvo también cuando se realizaron experimentos de *Pull-down* con His₆-PGPasa expresada a partir del clon ASKA JW3348 siguiendo un protocolo similar al descrito para los ensayos de *Pull-down* con His₆-AtpA y His₆-AtpD (resultados no mostrados).

En conjunto estos resultados confirman la interacción de GAPDH con PGPasa. Sin embargo, cuando se aplicó GAPDH purificada a la columna donde estaba inmovilizada GST-PGPasa no se observó incremento en la interacción entre ambas proteínas (resultados no mostrados). Una gran cantidad de GAPDH aparecía en la fracción correspondiente al *flow-through*, sugiriendo que la interacción entre las dos proteínas podría depender de otros factores celulares (proteínas o ligandos) o modificaciones post-traduccionales de estas proteínas.

La presencia de múltiples formas de GAPDH atribuidas a diversas modificaciones post-traduccionales con diferentes puntos isoeléctricos (pI) (Egea *et al.*, 2007; Aguilera *et al.*, 2009), nos llevó a analizar si la capacidad de interacción con PGPasa estaba asociada de manera específica a alguna de estas formas de GAPDH. Por ello

llevamos a cabo experimentos de *Far-Western* (MÉTODOS 3.3.3). Una preparación de GAPDH purificada (2.5µg/ml) fue separada mediante electroforesis bidimensional (MÉTODOS 3.2.10.2) y posteriormente transferida a una membrana de PVDF e incubada con 5µg/ml de PGPasa purificada. Después de eliminar, mediante lavados, el exceso de PGPasa no unida se reveló la interacción de GAPDH con PGPasa utilizando anticuerpos específicos para PGPasa. En paralelo se llevó a cabo otro experimento control sin incubar la membrana con PGPasa, para descartar así reacciones inespecíficas de los anticuerpos anti-PGPasa con GAPDH. Cabe comentar que para llevar a cabo este tipo de ensayo y con la finalidad de incrementar la especificidad de la preparación de anticuerpos anti-PGPasa, la fracción γ -globulina disponible en el laboratorio (Pellicer *et al.*, 2003) fue purificada mediante afinidad a través de una resina a la cual se había unido covalentemente PGPasa purificada (MÉTODOS 3.2.9).

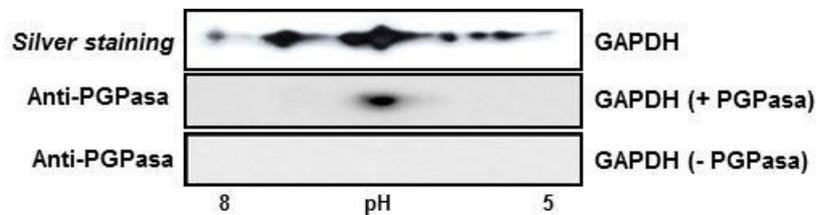


Figura 4.12. Análisis mediante *Far-Western Blot* de la interacción de PGPasa soluble con GAPDH inmovilizada. La proteína recombinante GAPDH (2.5µg/ml) fue sometida a electroforesis bidimensional. El panel superior corresponde a una tinción del gel por nitrato de plata. El panel central corresponde a la proteína transferida a una membrana de PVDF, incubada con PGPasa (5µg/ml) y revelada con anticuerpos anti-PGPasa. El panel inferior corresponde a un experimento control en el que la membrana de PVDF no fue incubada con PGPasa.

Los resultados se presentan en la figura 4.12. En el gel bidimensional teñido con nitrato de plata se observan varios *spots* correspondientes a diferentes formas de GAPDH. Después de la incubación con PGPasa, sólo una de estas formas de GAPDH fue visualizada con anticuerpos anti-PGPasa, lo que indica que la interacción entre GAPDH y PGPasa depende de una forma específica de GAPDH. Estos resultados demuestran que existe una interacción directa entre ambas proteínas y dicha interacción puede depender de alguna modificación post-traducciona de GAPDH.

4.2.4.1. Efecto de la bleomicina en la interacción entre GAPDH y PGPasa

Puesto que diversos estudios asignan a GAPDH un papel en procesos de reparación del DNA en humanos (Sirover *et al.*, 1999) y concretamente en la reparación del daño generado por bleomicina (BM) (Azam *et al.*, 2008) nos planteamos analizar si la interacción observada entre GAPDH y PGPasa podría estar incrementada al

someter las células a un estrés por tratamiento con BM, condición que genera 2-fosfoglicolato, sustrato de la enzima PGPasa. (Pellicer *et al.*, 2003).

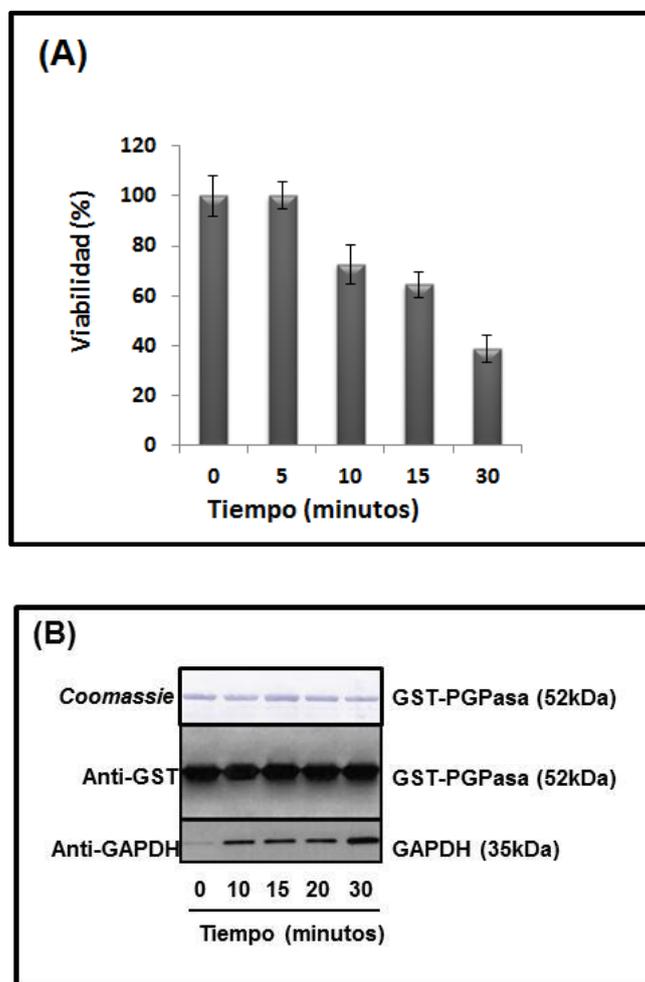


Figura 4.13. Análisis de la interacción GAPDH - PGPasa en células tratadas con bleomicina. Cultivos en SM-CAA de la cepa JA210(pGEX-*gph*) en fase exponencial fueron incubados a distintos períodos de tiempo con 8 μ g/ml BM y 50 μ M FeSO₄. **(A)** La viabilidad celular se determinó por recuento de las unidades formadoras de colonia (CFUs). Los resultados son la media \pm D.E (n=3) y se expresó en porcentaje respecto al control. **(B)** Ensayos de *Pull-down* a partir de extractos celulares obtenidos de las células tratadas con BM a los tiempos indicados. Las muestras fueron incubadas con resina *glutathione-sepharose* 4B y después de lavados sucesivos, la elución se llevó a cabo con tampón de carga 1x de SDS-PAGE. Las fracciones fueron analizadas por tinción con azul de *Coomassie* (panel superior) y por *Western Blot* con anticuerpos anti-GAPDH (panel inferior) o anti-GST (panel medio).

Para evaluar *in vivo* la interacción de GAPDH y PGPasa en condiciones de estrés por BM, se escogió la cepa JA210(pGEX-*gph*). Esta cepa es un mutante *knockout* del gen que codifica PGPasa (gen *gph*) y expresa la forma recombinante GST-PGPasa a partir del plásmido pGEX-*gph*. Cultivos en SM-CAA en fase exponencial de esta cepa fueron tratados a 37°C con 8 μ g/ml BM y 50 μ M FeSO₄ a distintos períodos de tiempo (entre 0 y 30 min). A los tiempos indicados alícuotas de los cultivos fueron

procesadas para la obtención de los extractos celulares. El daño celular fue evaluado por conteo de CFUs. A los 30 minutos de tratamiento con BM, el porcentaje de células viables se estimó en 30% (Figura 4.13A). La interacción entre GAPDH y PGPasa en estas condiciones fue evaluada mediante ensayos de *Pull-down* seguidos de *Western Blot* con anticuerpos anti-GAPDH. Para ello, los extractos celulares se incubaron con la resina *glutathione-sepharose* 4B en tampón PBS. Después de lavados exhaustivos, la elución de GST-PGPasa se llevó a cabo con tampón de carga 1x de SDS-PAGE, y la presencia de GAPDH en esta fracción fue evaluada mediante *Western Blot* con anticuerpos anti-GAPDH. Para normalizar los resultados, las mismas fracciones fueron analizadas en paralelo con anticuerpos anti-GST (Figura 4.13B).

En estos experimentos, se aplicaron cantidades inferiores de proteína respecto a los ensayos iniciales de *Pull-down* (presentados en la figura 4.11) con la finalidad de evitar efectos de saturación en el revelado del *Western Blot* y poder analizar mejor las diferencias en la interacción entre ambas proteínas a los distintos tiempos ensayados. Se observa que la fracción de GAPDH que interacciona con PGPasa respecto al control (tiempo 0) es mayor cuando las células son tratadas con BM a todos los tiempos ensayados, siendo este incremento superior a los 30 minutos de exposición.

Estos resultados sugieren que GAPDH puede estar participando conjuntamente con PGPasa en la formación de complejos moleculares relacionados con la reparación del DNA.

4.3. ESTUDIO FUNCIONAL DE LA PARTICIPACIÓN DE GAPDH EN LOS PROCESOS DE REPARACIÓN DEL DNA EN *E. coli*

4.3.1. OBTENCIÓN DE RNA ANTISENTIDO PARA EL GEN *gapA*

La utilización de mutantes *knockout* deficientes en una determinada proteína resulta muy útil para el estudio de su función *in vivo*. Aunque *gapA* no es un gen esencial, la deficiencia en GAPDH determina en los mutantes la incapacidad de crecer en la mayoría de los medios de cultivo convencionales, entre ellos el medio LB o el medio SM-CAA utilizado en los tratamientos con bleomicina. Esto limita en gran medida las condiciones para el estudio *in vivo* de la implicación funcional de GAPDH en los procesos celulares, por lo que nos planteamos abordar la estrategia del silenciamiento del gen *gapA*.

El silenciamiento de genes puede ser aplicado a genes esenciales o a aquellos que resultan cruciales para el crecimiento, como *gapA*. Además existen métodos para un silenciamiento condicional o reversible. El silenciamiento génico a través de RNAi (RNA de interferencia) es una técnica muy utilizada en eucariotas, sin

embargo el mecanismo del RNAi está ausente en bacterias. En este caso se ha venido utilizando RNA antisentido de cadena lineal (asRNA) expresado a partir de vectores plasmídicos. Los asRNAs en bacterias suelen estar diseñados para hibridar con secuencias que abarcan el codón de inicio y la secuencia de unión al ribosoma (*Ribosome binding site* o RBS) del mRNA diana. De este modo evitan la unión del ribosoma y por tanto inhiben la traducción (Nakashima *et al.*, 2006).

En general, la eficacia del silenciamiento en *E. coli* es muy baja cuando se utilizan RNAs antisentido de cadena simple. Para solucionar esta problemática, se ha diseñado una colección de plásmidos (PTasRNA) en los que el *polylinker* para la clonación de la secuencia del RNA antisentido (asRNA) está flanqueado por secuencias autocomplementarias (PT). En este sistema, el asRNA expresado dentro de las células se estabiliza formando una estructura en horquilla (PTasRNA), siendo así más resistente a la acción de nucleasas celulares. La expresión del PTasRNA es inducible por IPTG lo que permite un silenciamiento condicional por adición del inductor al medio de cultivo. Existen plásmidos PTasRNA de diferentes números de copias (alto, medio y bajo) que permiten obtener varios niveles de expresión del asRNA y poder así ajustar el grado de silenciamiento del gen diana compatible con la viabilidad celular (Nakashima *et al.*, 2006; Nakashima y Tamura, 2009). Una ventaja adicional de esta colección de plásmidos es su compatibilidad. Pueden ser utilizados para transformar una misma cepa y obtener así la expresión reducida de más de un gen.

Para el silenciamiento condicional del gen *gapA* se siguió el protocolo descrito en MÉTODOS 3.10. Se diseñaron oligonucleótidos para obtener dos asRNA complementarios a las posiciones (-76/+86) o (-97/+70) del gen. En ambos casos, las construcciones abarcan la secuencia de unión del ribosoma y el codón AUG del mRNA de *gapA*. Estas regiones fueron amplificadas a partir de DNA genómico de la cepa MC4100 con los oligonucleótidos diseñados que se detallan en el ANEXO.1 y clonadas en las dianas *NcoI* y *XhoI* de los plásmidos pHN1009 (alto número de copias), pHN678 (medio número de copias) y pHN1242 (bajo número de copias) de tal modo que el silenciamiento de GAPDH pudiera ser modulado.

El nivel de silenciamiento del gen *gapA* obtenido con estas construcciones fue evaluado en cultivos en LB de la cepa MC4100 en presencia de IPTG 1mM como inductor de la expresión de los PTasRNAs. Cabe recordar que los mutantes con una deficiencia absoluta de GAPDH no pueden crecer en este medio de cultivo. El análisis se llevó a cabo determinando varios parámetros: (i) curvas de crecimiento, y (ii) cuantificación de GAPDH en los extractos celulares mediante ensayo de la actividad enzimática y experimentos de *Western Blot* utilizando anticuerpos anti-GAPDH. Los resultados de la cuantificación de los niveles de GAPDH se presentan en la figura 4.14.

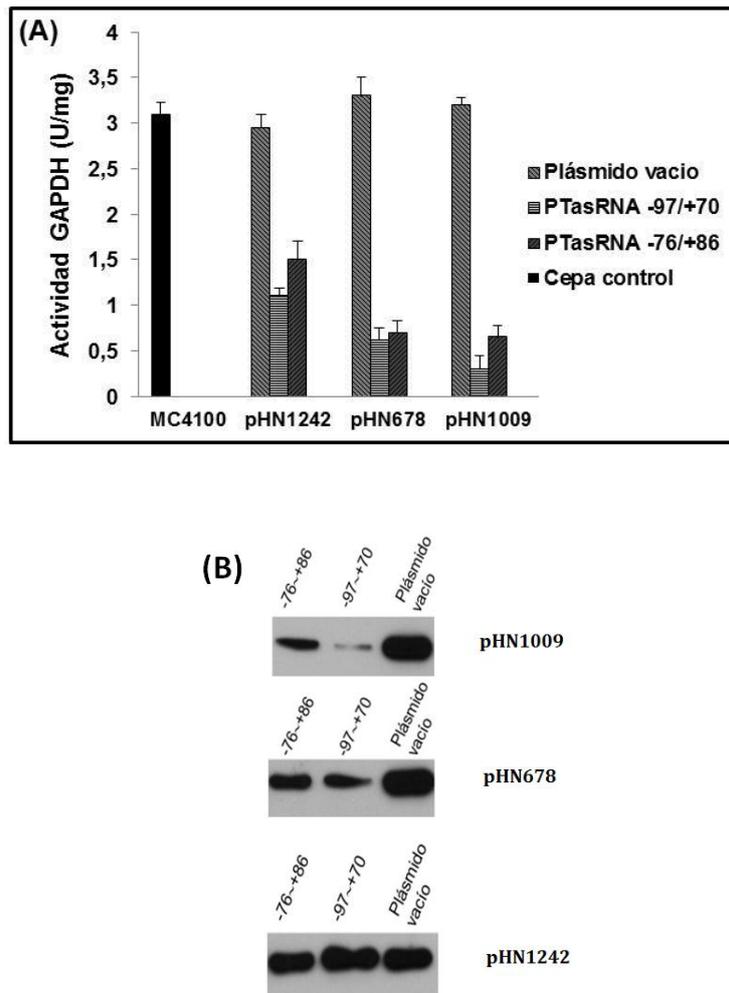


Figura 4.14. Cuantificación de los niveles de GAPDH en células silenciadas mediante determinación de la actividad enzimática (A) e inmunodetección por *Western Blot* (B). Los ensayos fueron realizados utilizando extractos celulares obtenidos a partir de cultivos en LB de la cepa MC4100 transformada con las diferentes construcciones en estudio (PTasRNA -97/+70 o PTasRNA -76/+86) clonadas en los plásmidos indicados de diferente número de copias. Los cultivos se incubaron a 37°C en agitación en presencia de 1mM IPTG como inductor de la expresión de los asRNAs. En los ensayos de *Western Blot* se aplicaron 5µg de cada extracto celular. Los resultados son la media ± D.E (n=3).

Respecto a los ensayos de actividad enzimática se observa que todas las construcciones producen una disminución significativa en los niveles de actividad GAPDH, entre el 40% y el 90%. La reducción en los niveles de actividad es siempre proporcional al número de copias del vector siendo más acusada en la cepa transformada con el plásmido recombinante de alto número de copias, pHN1009. Para un mismo vector, y por tanto con el mismo número de copias, la construcción -97/+70 genera siempre un mayor nivel de silenciamiento de GAPDH que la construcción -76/+86. Los niveles de actividad enzimática se correlacionan con los niveles de proteína detectados por *Western Blot*. La proteína es apenas inmunodetectada con la construcción PTasRNA (-97/+70) clonada en el vector de alto número de copias pHN1009, resultado concordante con el nivel residual del

5% de actividad enzimática. Los niveles de GAPDH (actividad y proteína inmunodetectada) son muy similares entre la construcción PTasRNA (-97/+70) en pHN678 (número medio de copias) y la construcción PTasRNA (-76/+86) en pHN1009 (alto número de copias).

Respecto el efecto del silenciamiento de *gapA* sobre el crecimiento en el medio de cultivo restrictivo LB, los resultados se presentan en la figura 4.15. Se observa que la construcción PTasRNA (-97/+70) expresada a partir del plásmido de alto número de copias pHN1009 produce un grado de silenciamiento tan alto que afecta el crecimiento celular (Figura 4.15A). Esta construcción reduce considerablemente tanto el tiempo de duplicación en fase exponencial como el rendimiento del cultivo en fase estacionaria con respecto a células control (sin plásmido o transformadas con el plásmido vector vacío). Sin embargo, este marcado efecto no se observa para la construcción -76/+86 clonada en el mismo plásmido. Estos resultados indican que una reducción en los niveles de GAPDH superior al 90% compromete la viabilidad y el crecimiento de *E. coli* en medio LB.

Los efectos sobre el crecimiento observados con las construcciones expresadas a partir del plásmido pHN678 (Figura 4.15B) son congruentes con los resultados de silenciamiento obtenidos en base a los valores de actividad enzimática e inmunodetección de GAPDH (Figura 4.14). Niveles de expresión de GAPDH del 20% respecto a los niveles control no son limitantes para el crecimiento de *E. coli* en medio LB. La construcción PTasRNA (-76/+86) apenas afecta al crecimiento celular, mientras que este se ve ligeramente retardado con la construcción PTasRNA (-97/+86). En este caso se observa también una reducción en el rendimiento del cultivo en fase estacionaria, aunque mucho menor que la obtenida cuando este RNA antisentido se expresa en alto número de copias (Figura 4.15A).

En el caso de las construcciones efectuadas en el plásmido pHN1242 de bajo número de copias no se observan diferencias significativas entre las células transformadas con las diferentes construcciones respecto a células control (Figura 4.15C). Las células silenciadas con estas construcciones de bajo número de copias presentan niveles de actividad GAPDH entre el 40-50% (Figura 4.14).

Tras esta primera caracterización de las construcciones antisentido y en base a los resultados obtenidos se seleccionó la construcción PTasRNA (-76/+86) clonada en el vector pHN1009 de alto número de copias para llevar a cabo estudios funcionales *in vivo*. Como se ha comentado anteriormente esta construcción genera un nivel de silenciamiento de GAPDH similar al de la construcción PTasRNA (-97/+70) en el vector pHN678, estimado en una reducción del 80%. Puesto que este grado de silenciamiento no limita el crecimiento en medio LB, la construcción antisentido seleccionada (PTasRNA (-76/+86) en pHN1009) parece adecuada para analizar la implicación funcional de GAPDH en los procesos de reparación de DNA.

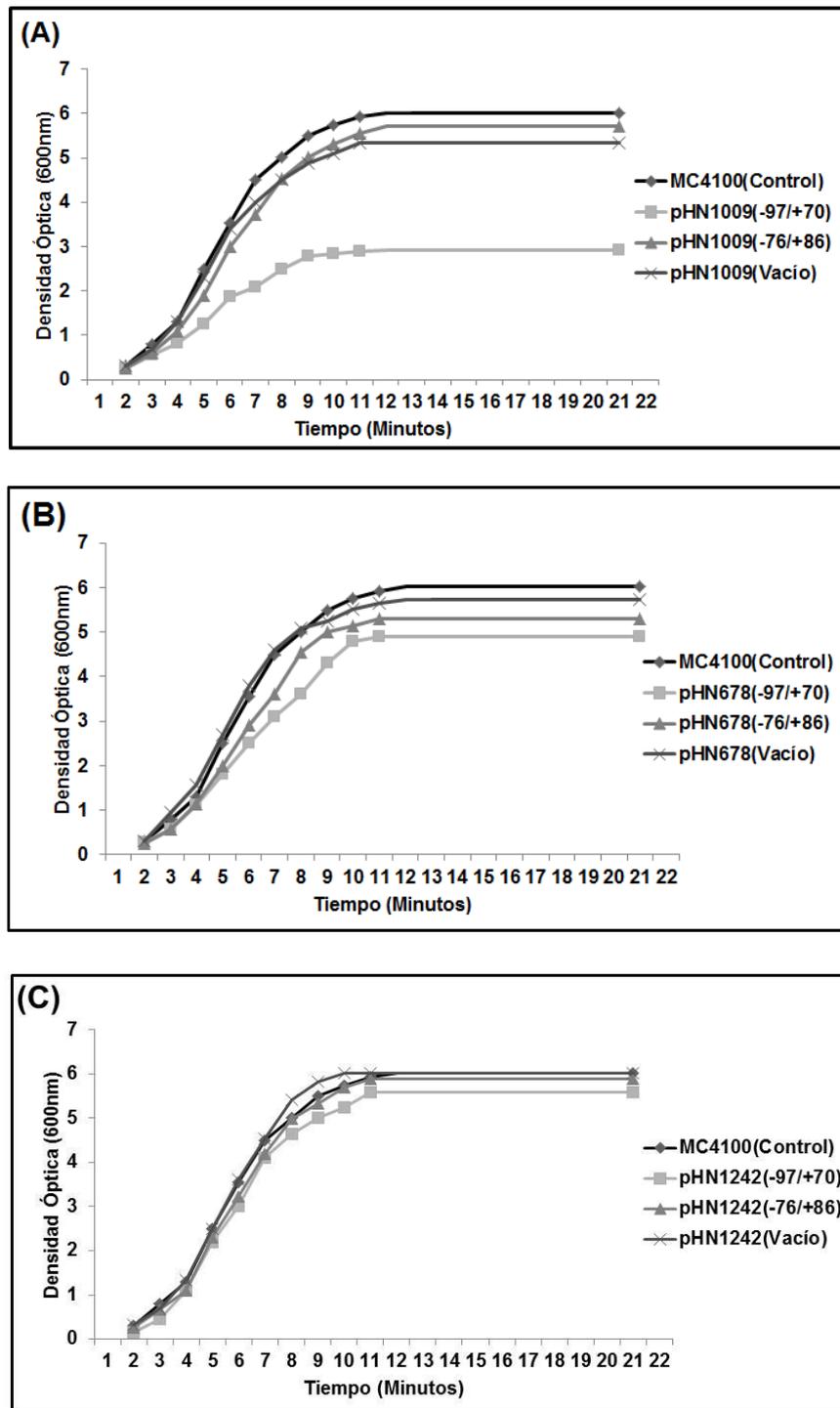


Figura 4.15. Curvas de crecimiento de células MC4100 silenciadas para GAPDH con las construcciones (PTasRNA -97/+70 o PTasRNA -76/+86) clonadas en diferentes plásmidos: (A) plásmido pHN1009 (alto número de copias), (B) plásmido pHN678 (número medio de copias) y (C) plásmido pHN1242 (bajo número de copias). En todos los casos los cultivos se realizaron en agitación a 37°C en medio LB en presencia de 1mM IPTG como inductor de la expresión del asRNA.

A partir de ahora nos referimos a las células silenciadas con esa construcción como pHN1009-1. Las células transformadas con el plásmido vacío utilizadas como control serán denominadas pHN1009.

4.3.1.1. Análisis de la respuesta de células silenciadas al tratamiento con agentes genotóxicos

La interacción de GAPDH con la enzima PGPasa implicada en el metabolismo del 2-fosfoglicolato, producto generado en la reparación del DNA dañado por BM, sugería una posible función de GAPDH en los procesos de reparación del DNA. En este contexto, nos planteamos analizar la respuesta de células silenciadas en GAPDH tratadas con agentes que provocan distintos daños en el DNA: (i) la BM, fármaco radiomimético que quelata el hierro formando una pseudoenzima que ataca la molécula del DNA generando superóxido y radicales libres que provocan rupturas de cadenas y centros abásicos (Povirk, 1996; Xu *et al.*, 2012), (ii) el MMS, agente alquilante que metila las bases del DNA (Rebeck *et al.*, 1991; Sikora *et al.*, 2010), y (iii) H₂O₂, agente oxidante que rompe la molécula de DNA generando radicales hidroxilos (Imlay *et al.*, 1988).

Previo a este estudio, se analizó el crecimiento de las células silenciadas en medio mínimo SM-CAA 0.5% para confirmar que el silenciamiento no afectaba el tiempo de duplicación en este medio de cultivo, que recordemos es el habitual en los experimentos de incubación con BM (Pellicer *et al.*, 2003). Tal como se muestra en la figura 4.16A, no se observan diferencias de crecimiento en medio SM-CAA entre las células silenciadas (pHN1009-1) y las células control (pHN1009).

Además, en estas condiciones de crecimiento se analizó también el nivel de silenciamiento de GAPDH mediante ensayo de la actividad enzimática GAPDH e inmunodetección de la proteína por *Western Blot*. Los resultados muestran que las células silenciadas presentan en estas condiciones de cultivo una reducción del orden del 90% en los niveles de GAPDH con respecto a las células control (Figura 4.16B). De nuevo se observa una buena correlación entre los niveles de actividad enzimática y los de proteína inmunodetectada.

Una vez establecido que un nivel de silenciamiento de GAPDH del orden del 90% no afecta la viabilidad celular ni la capacidad de crecimiento en medio SM-CAA se procedió a analizar la respuesta de las células silenciadas frente al tratamiento con los agentes genotóxicos antes mencionados. Para ello células silenciadas de *E. coli* MC4100 (pHN1009-1) y de MC4100 (pHN1009) como control fueron cultivadas en SM-CAA 0.5%. Una vez alcanzada la fase exponencial (0.5 de absorbancia a 600nm de D.O), las células fueron tratadas a distintos períodos de tiempo (entre 30 y 120 minutos) con BM (10µg/ml), MMS (10mM) o H₂O₂ (2.5mM) (MÉTODOS 3.11). A los tiempos indicados se retiraban alícuotas de los cultivos y después de realizar diluciones seriadas se procedía a evaluar el número de bacterias viables por recuento de colonias en placas de SM-CAA incubadas a 37°C o/n. Al tiempo final de incubación (120 minutos), los cultivos fueron centrifugados y las bacterias procesadas para obtener los extractos celulares en los que se procedió a determinar la actividad GAPDH. Puesto que GAPDH es diana de diversos tipos de

oxidación y la oxidación de la Cys catalítica (C149) comporta la inactivación de la enzima (Cabisco y Ros, 2006), consideramos de interés evaluar el efecto de los tratamientos efectuados sobre la actividad enzimática de GAPDH.

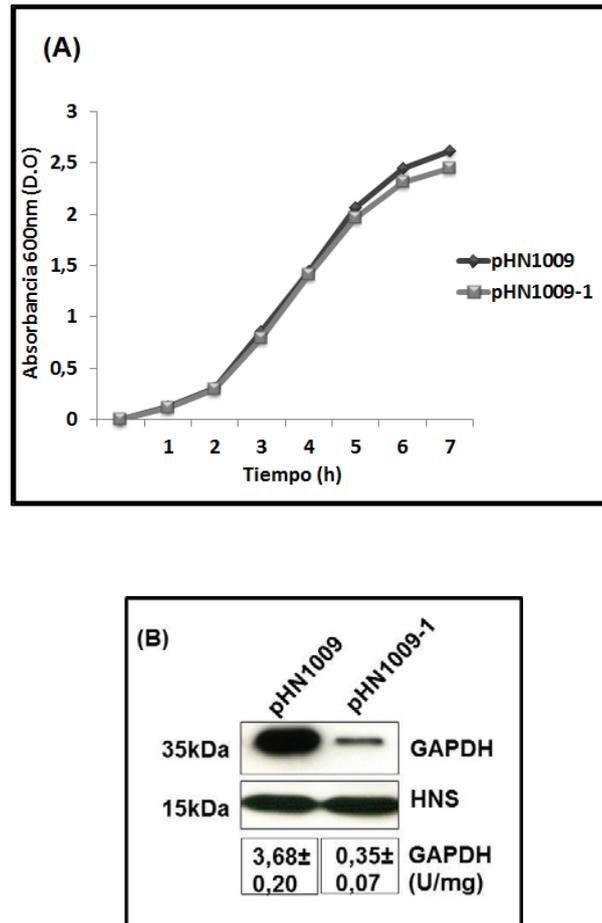


Figura 4.16. (A) Curva de crecimiento de células MC4100 silenciadas para GAPDH (pHN1009-1) respecto a células control (pHN1009) en medio SM-CAA. Los cultivos se incubaron a 37°C y en agitación en presencia de 1mM IPTG como inductor de la expresión del asRNA. Los resultados son la media \pm D.E (n=3) **(B) Cuantificación de los niveles de GAPDH mediante determinación de la actividad enzimática e inmunodetección por Western Blot.** Los ensayos fueron realizados en extractos celulares obtenidos a partir de los cultivos en SM-CAA mostrados en el panel A. En los ensayos de *Western Blot* se aplicaron 5 μ g de cada extracto celular. Las membranas de PVDF fueron incubadas con anticuerpos anti-GAPDH y anti-HNS como control para normalización.

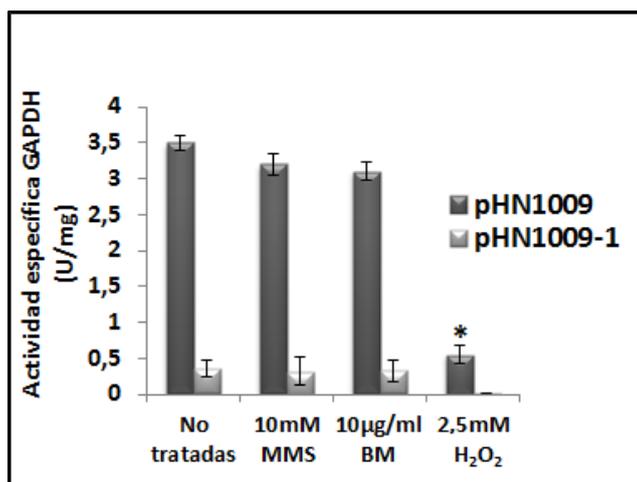


Figura 4.17. Actividad enzimática GAPDH en células control MC4100 (pHN1009) y células silenciadas MC4100 (pHN1009-1) post-tratamiento con MMS, BM o H₂O₂. La actividad enzimática GAPDH fue determinada en los extractos celulares obtenidos después de dos horas de tratamiento con estos agentes a las concentraciones indicadas. Los resultados son la media \pm D.E (n=3). * $P < 0.000$ respecto a células control no tratadas.

Los resultados del análisis de la actividad GAPDH en las células tratadas con los distintos agentes se presentan en la figura 4.17. Se observa que el tratamiento con BM o MMS no modifica la actividad enzimática de GAPDH. Las células control, no silenciadas (pHN1009), mantienen el mismo nivel de actividad GAPDH cuando son tratadas con estos agentes. Asimismo, el bajo nivel de actividad enzimática de las células silenciadas (pHN1009-1) (10% de las células control) se mantiene también en estas condiciones. Sin embargo, en las células tratadas con peróxido de hidrógeno, se observa una marcada reducción en la actividad GAPDH. La actividad enzimática en las células control representa sólo el 15% de la observada en células no tratadas, mientras que es indetectable en las células silenciadas.

Está descrito que el peróxido de hidrógeno oxida la cisteína catalítica de GAPDH (C149) de modo que forma un puente disulfuro con la C153, y dicha oxidación conduce a la inactivación de la enzima (Leichert *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos en este trabajo son compatibles con los descritos en la bibliografía para H₂O₂ (Leichert *et al.*, 2008) y además indican que GAPDH mantiene su actividad catalítica en células sometidas a BM o MMS.

Podemos concluir que estos agentes (BM y MMS) no modifican el estado de reducción de los residuos del centro activo C149 y C153. El MMS es un agente alquilante cuya diana principal son las bases del DNA. Respecto a la BM, dado su mecanismo de acción, el estrés oxidativo y la generación de radicales a través de este compuesto parecen estar restringidos a nivel local en el DNA.

Respecto al análisis de la viabilidad de las células silenciadas frente a estos tratamientos, los resultados se presentan en la figura 4.18. Las células silenciadas

presentan una reducción significativa de la viabilidad con respecto a células control no silenciadas en respuesta a BM (Figura 4.18A) y MMS (Figura 4.18B), especialmente a tiempos cortos de tratamiento. Así se observa (Figura 4.18A) que a los 30 minutos de tratamiento con BM la viabilidad de la cepa control es del 65% mientras que en la cepa silenciada ha descendido al 30%. En ambas cepas, el tratamiento de 1h con estos agentes provoca una disminución acusada en la viabilidad. En este caso, la cepa control presenta 40% de viabilidad y un 10% la cepa silenciada. No obstante tanto en el tratamiento de 30 minutos como en el de 1h, la diferencia relativa de viabilidad entre ambas cepas se mantiene y es aproximadamente del 35%.

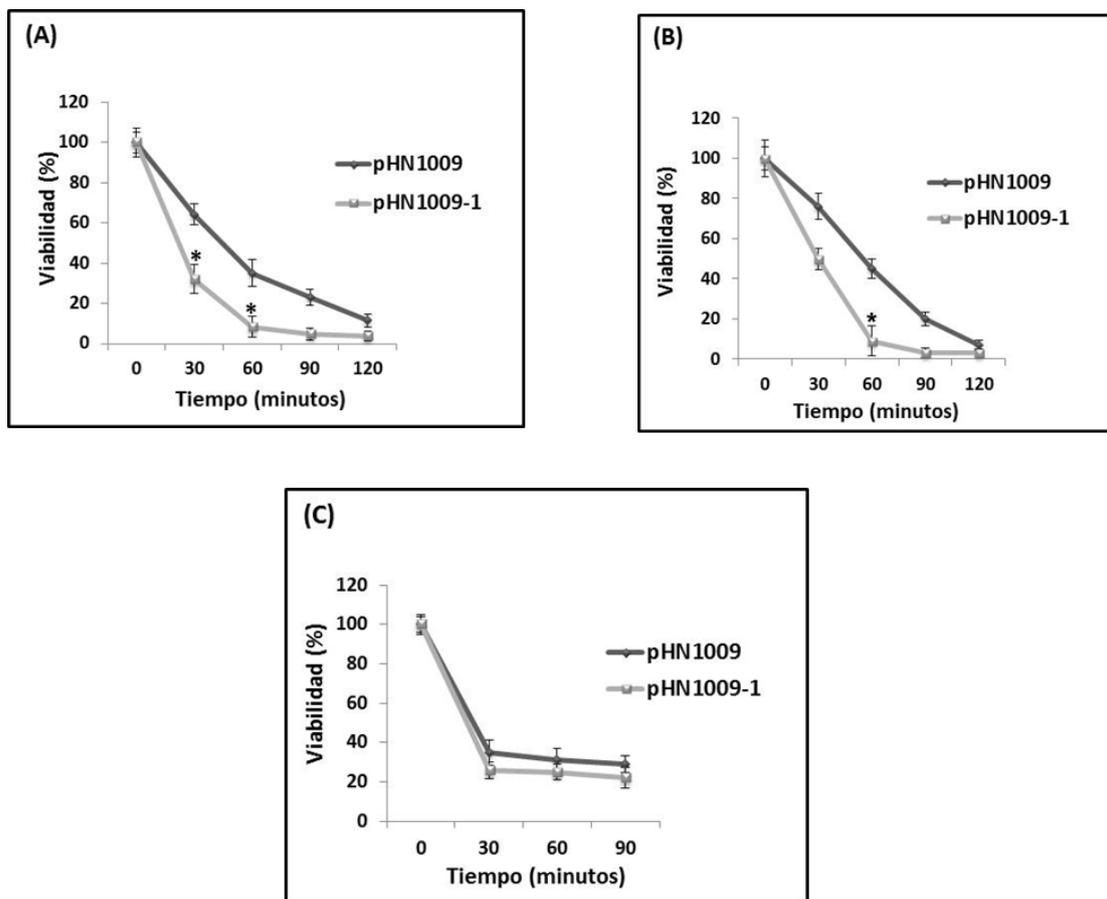


Figura 4.18 Análisis de la viabilidad de células control MC4100(pHN1009) y células silenciadas MC4100(pHN1009-1) frente al tratamiento con BM, MMS y H₂O₂. **(A)** Tratamiento con BM (10 µg/ml) a 37°C. **(B)** Tratamiento con MMS (10 mM) a 37°C. **(C)** Tratamiento con H₂O₂ (2.5 mM) a 37°C. A los tiempos indicados se retiraron alícuotas de los cultivos y después de realizar diluciones seriadas se procedió al conteo de bacterias viables (CFU: unidades formadoras de colonias) en placas de SM-CAA incubadas a 37°C o/n. Los resultados son la media ± D.E (n=3) y se expresan en porcentaje (%) de células viables respecto al tiempo 0. *P<0.05 respecto a los correspondientes controles.

El efecto observado en el tratamiento con MMS (Figura 4.18B) es similar al de la BM. Aunque a los 30 minutos la cepa silenciada presenta una viabilidad del 50% que es algo superior a la producida por la BM (30%), la diferencia de viabilidad entre esta cepa y la cepa control es también aproximadamente del 35%.

Cuando el tratamiento con BM y MMS se prolonga durante tiempos más largos, la viabilidad de la cepa control tiende a equipararse a la de la silenciada ya que a los 120 min desciende, en ambos casos, hasta aproximadamente el 10%. Probablemente a tiempos más largos de incubación el daño en el DNA es muy extenso y supera la capacidad de reparación de las células control. En estas condiciones, GAPDH mantiene su actividad enzimática y por tanto conserva el residuo catalítico Cys149 en estado reducido.

Contrariamente, no se observan diferencias significativas entre la cepa silenciada y la cepa control cuando el daño es generado por H₂O₂ (Figura 4.18C). Se observa que a los 30 min ambas cepas, control y silenciada, presentan la misma viabilidad de aproximadamente el 30%, que se mantiene incluso cuando el tratamiento se prolonga hasta los 90 min.

El H₂O₂ tal como habíamos observado (Figura 4.17) provoca un estrés oxidativo que conduce a la inactivación de GAPDH por oxidación de la Cys149. Esta inactivación deja a las células control en una situación de baja respuesta equiparable a la de las células silenciadas. El hecho de que tiempos más largos de tratamiento no provoquen mayores descensos de la viabilidad en ambas cepas, puede ser debido a que el H₂O₂ es muy lábil y su concentración en el medio de incubación descienda considerablemente con el tiempo.

Estos resultados, sugieren la participación de GAPDH en procesos de reparación del DNA *in vivo*, y además indican que dicha función depende del estado reducido de la Cys catalítica.

En humanos hay estudios que demuestran la implicación funcional de GAPDH en la reparación del DNA a través de su efecto reactivador de la endonucleasa APE1, implicada en la reparación de centros abásicos (centros AP) (Azam *et al.*, 2008). Esta función de GAPDH depende de la funcionalidad de la cisteína catalítica. Nuestros resultados son similares a los descritos en modelos de células humanas de carcinoma de colon transfectadas con un RNAi específico para GAPDH. En este caso, las células silenciadas (reducción de 80% en el nivel de GAPDH respecto a células control) presentaban una menor supervivencia a los tratamientos de 1 hora con BM (15% de reducción en la viabilidad celular respecto a células no silenciadas) y a los tratamientos de 30 min con MMS (30% de reducción en la viabilidad celular respecto a células control) (Azam *et al.*, 2008). Sin embargo en este estudio no se evaluó la viabilidad celular en presencia de peróxido de hidrógeno.

4.3.2. DETERMINACIÓN DE CENTROS ABÁSICOS EN EL DNA EN CÉLULAS DEFICIENTES EN GAPDH

Si bien la BM y el MMS son agentes que provocan distinto tipo de lesiones en el DNA, en ambos casos se generan centros abásicos o AP (apurínicos y apirimidínicos) a través de rupturas del enlace glucosídico y pérdida de bases. Los centros AP constituyen una de las lesiones inducidas por BM directamente sobre el DNA (Povirk, 1996), sin embargo se generan también en la reparación por escisión de bases del DNA dañado por agentes alquilantes como el MMS. La generación de centros AP forma parte de los mecanismos celulares de reparación del DNA. Estos centros se generan también de forma habitual en la reparación del DNA en células no sometidas a ningún tipo de estrés con la finalidad de mantener la integridad del genoma (Rebeck *et al.*, 1991).

La menor supervivencia al tratamiento con BM o MMS de las células silenciadas con el PTasRNA de *gapA* (Figura 4.18) sugería la implicación funcional de GAPDH en los procesos de reparación del DNA también en *E. coli*. En este contexto nos planteamos cuantificar el número de centros AP en el DNA de células deficientes en GAPDH respecto a células tipo salvaje. Puesto que las células silenciadas contienen DNA plasmídico que podría interferir en la obtención y análisis del DNA genómico, este tipo de estudio se llevó a cabo en el mutante MC4100 $\Delta gapA$.

Con la finalidad de llevar a cabo el estudio en el mismo fondo genómico utilizado en el análisis de células silenciadas, se procedió en primer lugar a transferir la mutación $\Delta gapA::tet$ presente en la cepa W3GC al fondo genómico de la cepa MC4100 mediante transducción con fago P1. Puesto que la cepa W3GC no puede crecer en LB, el medio adecuado para la infección con P1, como cepa donadora para la obtención del lisado se utilizó la cepa W3GC transformada con el plásmido pBAD-*gapA*. La expresión de GAPDH-V5 a partir de este plásmido complementaba la deficiencia de GAPDH de la cepa mutante. Una vez obtenido el lisado de P1 se infectó la cepa MC4100 y se seleccionaron colonias resistentes a tetraciclina en placas de SM-glicerol-malato-tetraciclina. La incorporación de la mutación $\Delta gapA::tet$ en estos transductantes fue comprobada por el fenotipo glucosa negativo en placas de SM-glucosa 0.4%. La deficiencia de GAPDH en uno de los transductantes seleccionados (MC4100 $\Delta gapA::tet$) fue comprobada mediante ensayos de la actividad enzimática GAPDH y *Western Blot* utilizando anticuerpos anti-GAPDH.

Para mantener las condiciones de cultivo similares a las utilizadas en los ensayos realizados con las cepas silenciadas con PTasRNA *gapA*, se analizó el crecimiento del mutante MC4100 $\Delta gapA::tet$ en medio SM-CAA 0.5% en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de glicerol (resultados no mostrados). Finalmente se seleccionó el medio SM-CAA 0.5% suplementado con glicerol 20mM ya que en este

medio no se observaron diferencias de crecimiento entre el mutante MC4100 $\Delta gapA$ y la cepa parental MC4100 (Figura 4.19).

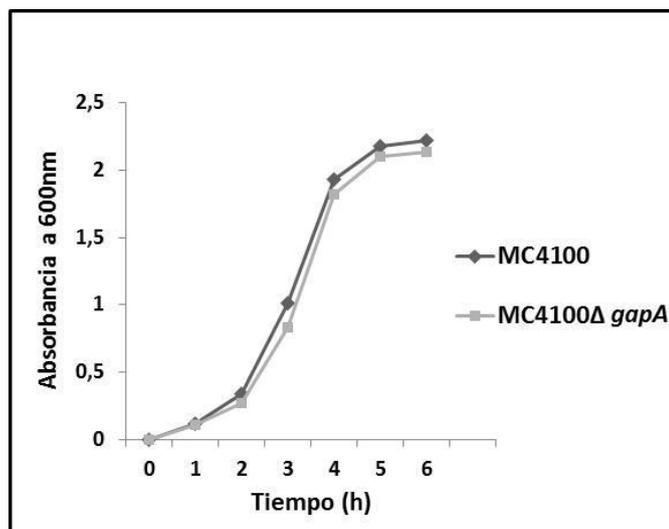


Figura 4.19. Curva de crecimiento del mutante *knockout* MC4100 $\Delta gapA$ y de la cepa parental MC4100 en medio SM-CAA 0.5% + glicerol 20mM. Los cultivos se incubaron a 37°C en constante agitación. A intervalos de 1h se determinó el crecimiento midiendo la absorbancia a 600nm. Los resultados son la media \pm D.E (n=3).

A continuación se analizó la respuesta del mutante MC4100 $\Delta gapA$ frente al tratamiento con BM (5 μ g/ml). En este caso se utilizó una dosis inferior de BM que en el análisis de células silenciadas con RNA antisentido ya que la deficiencia en GAPDH es total en el mutante *knockout*. Además, en las células silenciadas, la presencia de DNA plasmídico en alto número de copias proporciona moléculas adicionales de DNA diana lo que puede traducirse en un menor daño a nivel cromosómico. La BM fue adicionada a cultivos en fase exponencial del mutante MC4100 $\Delta gapA$ y de la cepa parental MC4100 en medio SM-CAA 0.5% + glicerol 20mM. Se tomaron alícuotas de los cultivos a los 30, 60 y 90 minutos después de la adición de BM y se evaluó el grado de supervivencia por recuento de CFU en placas de SM-CAA + glicerol. Los resultados se presentan en la figura 4.20.

Tal como se observa en la figura 4.20 las células que carecen de GAPDH presentan una menor supervivencia que las células control, sobretudo a períodos cortos de tratamiento. Esta dosis de BM produce una marcada reducción en la viabilidad del mutante *knockout gapA*, que a los 30 minutos es aproximadamente del 50%. Sin embargo durante este tiempo la cepa tipo salvaje puede incluso duplicarse. Este resultado está en la línea de los resultados obtenidos con células silenciadas y confirma la hipótesis sobre la participación de GAPDH en procesos de reparación de DNA en *E. coli*, al menos en la reparación de las lesiones generadas por BM y MMS.

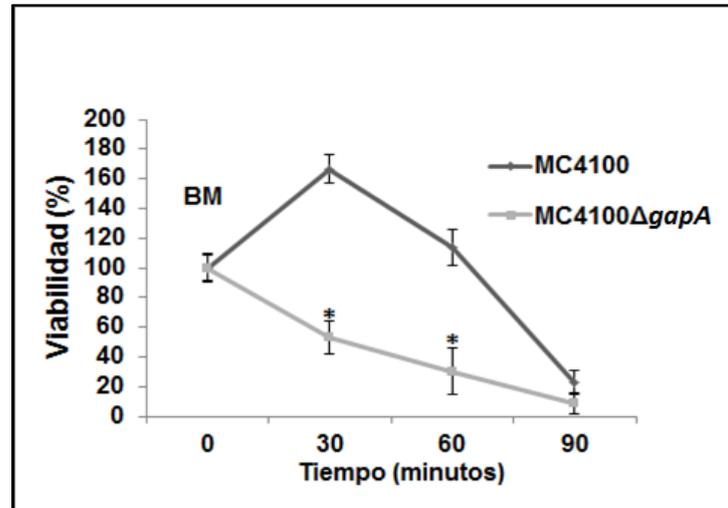


Figura 4.20. Análisis de la viabilidad del mutante MC4100ΔgapA frente al tratamiento con BM. La BM (5μg/ml) fue añadida a cultivos en fase exponencial (OD_{600nm} de 0.5) en SM-CAA 0.5% + glicerol 20mM de las cepas MC4100 tipo salvaje y MC4100ΔgapA. A los tiempos indicados se retiraron alícuotas de los cultivos y después de realizar diluciones seriadas se procedió al conteo de bacterias viables (CFU) en placas de SM-CAA + glicerol incubadas a 37°C o/n. Se representa el porcentaje de células viables respecto al tiempo 0. *P<0.000 respecto a la cepa control. Los resultados son la media ± D.E (n=3).

Como se ha comentado anteriormente, un denominador común a ambos tipos de agentes genotóxicos es la formación de centros AP. Puesto que estos centros se generan también de forma habitual en la reparación de lesiones espontáneas en el DNA, nos planteamos analizar si las células deficientes en GAPDH acumulaban mayor número de centros abásicos que las células con niveles normales de esta enzima. Para ello, se procedió a cuantificar el número de centros abásicos, generados de modo espontáneo, en el mutante *knockout gapA* (MC4100ΔgapA) y en la cepa tipo salvaje (MC4100).

Ambas cepas se cultivaron en medio SM-CAA 0.5% suplementado con glicerol 20mM, a 37°C. Una vez alcanzada la fase exponencial (DO_{600nm} de 0.5), se recogieron las células mediante centrifugación y se procedió a la obtención del DNA genómico mediante el *DNAzol*[®] Kit de Invitrogen para garantizar la calidad de la preparación. Para evitar interferencias en la cuantificación de centros AP, el método de obtención de DNA no puede incorporar tratamientos que oxiden o modifiquen el DNA, por lo que el método del *DNAzol* resulta de elección en este caso. La cuantificación de centros AP se llevó a cabo siguiendo el protocolo del *kit Oxiselect™ Oxidative DNA Damage Quantification Kit (AP Sites)* (MÉTODOS 3.9).

Tabla 4.6. Cuantificación de centros AP en el DNA genómico de la cepa mutante MC4100Δ *gapA* y de la cepa parental MC4100. El número de centros AP se determinó en muestras de DNA genómico (purificado a partir de cultivos de estas cepas en fase exponencial a una D.O_{600nm} de 0.5) Los resultados son la media ± D.E (n=3) y se expresan mediante la relación de número de centros abásicos por cada 100.000pb. **P*<0.005.

Centros AP/100.000pb	
MC4100	8.5±0.4
MC4100Δ <i>gapA</i>	12.8±0.8*

Los resultados presentados en la tabla 4.6 muestran un incremento significativo en el número de centros abásicos espontáneos en el mutante *gapA* respecto a la cepa tipo salvaje, sugiriendo la participación de GAPDH en los procesos de reparación de estas lesiones. Este resultado obtenido en células de *E. coli*, es coincidente con el de otros autores obtenido en líneas celulares humanas de carcinoma de colon (HCT 116 y DLD1) silenciadas para GAPDH. Los autores de este estudio (Azam *et al.*, 2008) demostraron la existencia de una interacción entre GAPDH y la endonucleasa APE1 del sistema BER, y además, que dicha interacción modula la función reparadora de la endonucleasa sobre los centros abásicos. Observaron que en las células silenciadas en GAPDH el número de centros AP espontáneos en el DNA genómico incrementaba alrededor de 1.5 veces respecto a las células control, factor similar al obtenido en nuestro resultados con el mutante *gapA* de *E. coli*.

4.3.3. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ATP EN CÉLULAS DEFICIENTES EN GAPDH

Dado que GAPDH es una enzima de la glicólisis que participa activamente en el metabolismo energético, era necesario comprobar que la menor tasa de reparación de centros AP y de supervivencia de las células deficientes en GAPDH tratadas con agentes genotóxicos no era debida a una disminución en los niveles intracelulares de ATP. Hay que tener en cuenta que en *S. pyogenes*, se ha descrito que la sobreexpresión de GAPDH a nivel intracelular va acompañada de un incremento en los niveles intracelulares de ATP (Jin *et al.*, 2011). Además, en este trabajo hemos evidenciado la interacción de GAPDH con la subunidad catalítica (AtpD) de la ATP sintasa (RESULTADOS 4.2.3.2.2). Aunque se desconoce su implicación funcional, dicha interacción podría regular o modular la actividad de síntesis del ATP.

Por ello nos planteamos cuantificar los niveles intracelulares de ATP en la cepa MC4100 como control, y en la cepa mutante MC4100 Δ gapA. Se prepararon cultivos en medio SM-CAA 0.5% suplementado con glicerol 20mM, que fueron incubados a 37°C hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.5 (fase exponencial). En este punto se retiraron alícuotas de los cultivos que fueron procesadas para la cuantificación de los niveles de ATP, por bioluminiscencia, según el protocolo descrito para el *ATP Determination Kit* (Molecular Probes) (MÉTODOS 3.4).

Tabla 4.7. Niveles de ATP en células MC4100 tipo salvaje y MC4100 Δ gapA en fase exponencial de crecimiento. Los niveles de ATP se determinaron por bioluminiscencia siguiendo el protocolo descrito en el *ATP Determination Kit* (Molecular Probes) en células cultivadas en SM-CAA 0.5% hasta D.O_{600nm} de 0.5. Los resultados son la media \pm DE (n=3) y se expresan en μ molATP/ μ g de proteína.

μmol ATP /μg proteína		
D.O_{600nm}	MC4100	MC4100ΔgapA
0.5	7.44 \pm 0.55	8.97 \pm 0.23

Los resultados se presentan en la tabla 4.7. No se observan diferencias significativas en los niveles de ATP entre ambas cepas en cultivos en fase exponencial. Estos niveles son similares a los publicados por otros autores (Naseem *et al.*, 2009).

Estos resultados indican que la deficiencia de GAPDH no provoca una disminución en los niveles intracelulares de ATP en células en fase exponencial de crecimiento, al menos en medio SM-CAA 0.5% + glicerol 20mM. Estas condiciones son las mismas que las utilizadas en los tratamientos con BM y MMS, por lo que la menor viabilidad y capacidad de reparación de centros AP de las células deficientes en GAPDH frente al tratamiento con estos agentes genotóxicos no puede ser atribuida a una limitación en la disponibilidad de ATP. En conjunto, estos resultados apuntan a una función directa de GAPDH en el mecanismo de reparación del DNA.

4.3.4. ANÁLISIS MEDIANTE *PULL-DOWN* DE LA INTERACCIÓN DE GAPDH CON PROTEÍNAS QUE PARTICIPAN EN LOS SISTEMAS DE REPARACIÓN DEL DNA

Los resultados obtenidos hasta el momento apuntaban a una participación directa de GAPDH en los mecanismos de reparación del DNA. Sería este un escenario similar al descrito en células humanas en cultivo (Azam *et al.*, 2008). La base de la multifuncionalidad de GAPDH puede residir en su capacidad de establecer

interacciones con otras proteínas y participar en la formación de complejos proteicos con funciones determinadas a nivel celular, en este caso complejos implicados en mecanismos de reparación del DNA. Por ello, como primera aproximación al estudio del mecanismo de acción de GAPDH nos planteamos analizar su interacción con proteínas involucradas en sistemas de reparación del DNA. Con esta finalidad se realizaron ensayos de *Pull-down* seguidos de *Western Blot* con anticuerpos anti-GAPDH, utilizando como proteínas inmovilizadas algunas de las que participan en la reparación de las lesiones provocadas por BM y MMS. Concretamente, se estudió la interacción con proteínas del sistema BER (las nucleasas Endo IV y Exo III, y las glicosilasas Tag y AlkA), las enzimas del sistema de reparación directa de bases (Ogt y Ada), y la proteína de unión a DNA de cadena sencilla (SSB) implicada en la recombinación homóloga y respuesta SOS.

Previo a los ensayos de *Pull-down*, se procedió al clonaje de los genes *xth* (codifica Exo III) y *ogt* (codifica Ogt). Ambos genes fueron amplificados mediante PCR a partir de DNA molde de la cepa de *E. coli* MC4100. Los oligonucleótidos empleados en la amplificación están descritos en el ANEXO.1. El gen *xth* fue clonado en el vector pQE30 que permite fusionar la proteína a una cola de His₆ facilitando su posterior purificación mediante una resina de níquel (Ni⁺²-NTA). En cambio, el gen *ogt* fue clonado en el vector de expresión pGEX-3X que permite fusionar la proteína a un *tag* de GST, ya que la sobre-expresión de la versión recombinante de esta proteína fusionada al *tag* de His₆ producía una elevada toxicidad a nivel celular (información disponible en la web de NRBP, <http://www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/strain/top/top.jsp>).

Cabe mencionar que los clones para la expresión y purificación de las demás proteínas fueron proporcionados por *E. coli Strain National BioResource Project (NRBP) Collection* (Kitagawa *et al.*, 2005).

En este estudio, la selección de las nucleasas Exo III y Endo IV (AP-endonucleasas implicadas en la respuesta BER) se fundamentó principalmente en dos hechos. En primer lugar, en líneas celulares humanas se había descrito previamente que la actividad de la AP-endonucleasa APE1 era modulada al interaccionar con GAPDH (Azam *et al.*, 2008). En segundo lugar, en nuestros resultados con el mutante deficiente en GAPDH habíamos observado un incremento en la generación de centros AP de forma espontánea.

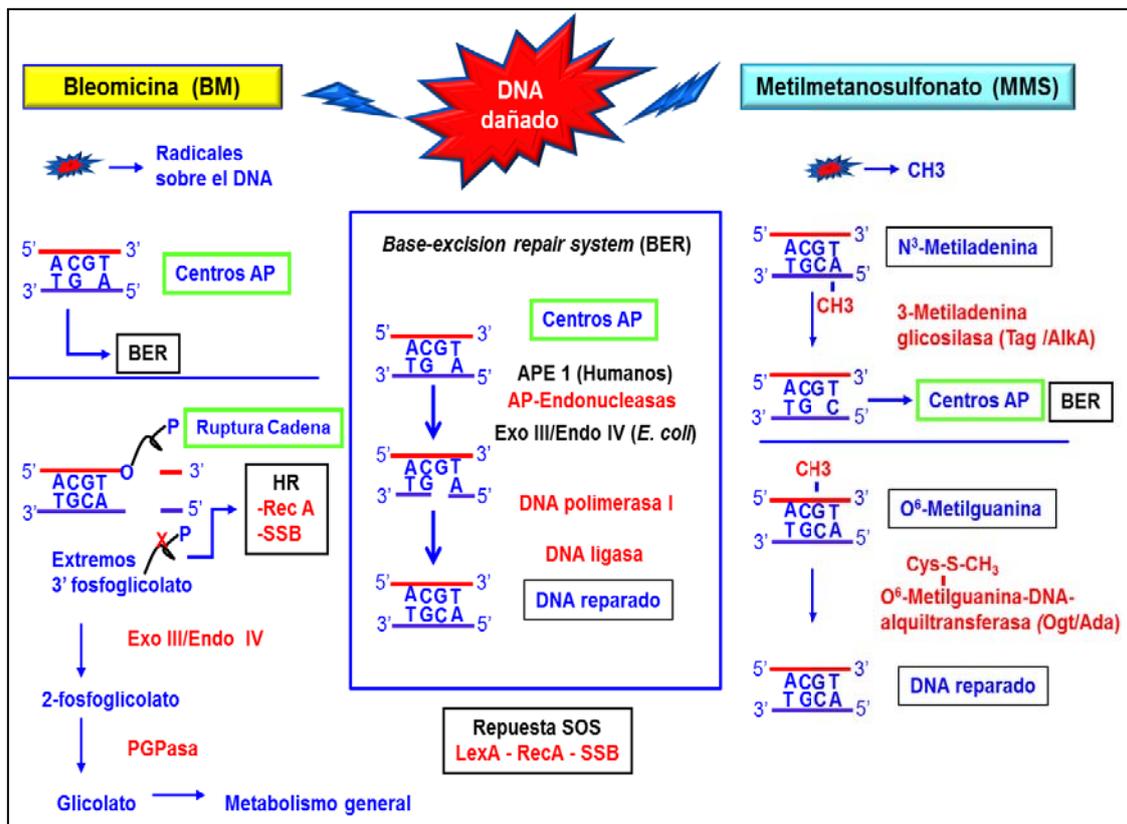


Figura 4.21. Mecanismos de reparación activados frente al tratamiento con BM y MMS. La BM en presencia de Fe²⁺ promueve la ruptura de doble cadena y la formación de centros abásicos. Las rupturas de doble cadena pueden ser reparadas por el sistema de recombinación homóloga (HR) después de la eliminación del extremo 3' fosfoglicolato por acción de las nucleasas Exo III y Endo IV. Los centros abásicos son reparados por el sistema de escisión de bases (BER), por acción de las AP endonucleasas, y posterior participación de la DNA polimerasa I y la DNA ligasa. El MMS genera como producto mayoritario N3-metiladenina (3-meA) y O⁶-metilguanina (O⁶-meG). Cuando se forma 3-meA las glicosilasas Tag y AlkA eliminan la base metilada formando un centro AP que posteriormente será reparado por la respuesta BER. La O⁶-meG es reparada por las metiltransferasas Ogt y Ada que incorporan el grupo metilo a sus residuos de cisteína causando su propia inactivación y recuperando la base. La respuesta SOS es activada como consecuencia del daño extenso generado tanto por BM como por MMS. La proteína SSB participa activamente en el reclutamiento de proteínas involucradas en la reparación homóloga y respuesta SOS.

Exo III es la proteína ortóloga de la APE1 humana y ambas, Exo III y Endo IV, son las principales enzimas responsables de la reparación de los centros AP en *E. coli*. Se ha descrito que Exo III representa el 80-90% de la actividad AP-endonucleasa bacteriana (Saporito y Cunningham, 1988) y Endo IV, alrededor de un 5-10% (Saporito *et al.*, 1988). Aunque la actividad AP-endonucleasa de Endo IV contribuya en menor proporción que Exo III, esto no significa que su función celular tenga menor importancia. Se ha descrito que mutantes deficientes en Endo IV (mutantes *nfo*) son hipersensibles a BM y t-butilhidroperóxido, modestamente hipersensibles a MMS y mitomicina C, y no son sensibles a H₂O₂, luz UV o rayos γ (Cunningham *et al.*, 1986). Además, la hipersensibilidad a muchos de estos agentes

(H₂O₂, rayos γ , MMS o mitomicina C) que también presentan los mutantes deficientes en Exo III (mutantes *xth*), se ve mucho más incrementada en el doble mutante *xth nfo*. Estos estudios sugieren que Endo IV contribuye conjuntamente con Exo III en la reparación de las lesiones del DNA generadas por dichos agentes. En cambio, las lesiones causadas por BM y t-butilhidroperóxido, requieren de forma más específica la Endo IV para ser reparadas de modo eficiente (Cunningham *et al.*, 1986). Estos resultados indican que las AP-endonucleasas Exo III o Endo IV podrían ser inducidas o bien ser más específicas para determinados agentes genotóxicos (Cunningham *et al.*, 1986; Levin y Demple, 1996; Motta *et al.*, 2010). En este sentido, estudios recientes demuestran que Endo IV es más importante que Exo III en la prevención de mutaciones transcripcionales causadas por la formación de centros AP (espontáneos o inducidos) y rupturas de cadena en el DNA (Clauson *et al.*, 2010).

En cuanto a las proteínas involucradas de forma más directa en la respuesta a los agentes alquilantes, como el MMS, se seleccionaron dos glicosilasas, Tag y AlkA, que eliminan bases metiladas, frecuentemente 3-metiladenina, generando centros abásicos, que posteriormente son reparados por el resto de los componentes del sistema BER (Krokan *et al.*, 1997; Sikora *et al.*, 2010). También se ensayaron las metiltransferasas Ogt y Ada que preferentemente reparan de forma directa las bases O⁶-metiladas (Sedgwick, 2004; Sikora *et al.*, 2010) (Figura 4.21).

Por último, también se estudió una posible interacción de GAPDH con SSB, proteína indispensable para la supervivencia de los organismos porque interacciona de manera directa con DNA de cadena sencilla (ssDNA), previniendo la formación de estructuras secundarias y su degradación por nucleasas (Greipel *et al.*, 1989, Dabrowski *et al.*, 2002; Furukohri *et al.*, 2012). Además, SSB tiene un papel muy importante en el reclutamiento de proteínas involucradas en los procesos de reparación del DNA como la recombinación homóloga (INTRODUCCIÓN 1.4.1) y la respuesta SOS (INTRODUCCIÓN 1.4.4) (Furukohri *et al.*, 2012).

Debido a las funciones celulares de SSB, los efectos fisiológicos de sus mutaciones pueden afectar todos los aspectos del metabolismo del DNA, replicación, reparación y recombinación. Se han descrito diversas mutaciones en el gen *ssb* de *E. coli* (Meyer y Laine, 1990). La primera mutación identificada en este gen fue designada *exrB*. Este mutante resultó ser extremadamente sensible a la radiación y a los agentes alquilantes como 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina, MMS y etil metanosulfonato (Greenberg *et al.*, 1974; Greenberg *et al.*, 1975). Entre otros mutantes descritos, los que presentaban la mutación *ssb-114* resultaron ser muy sensibles no solo a MMS sino también a las radiaciones UV (Johnson, 1984). Aunque principalmente se han caracterizado mutaciones de SSB que afectan a la reparación de lesiones generadas por agentes alquilantes, SSB puede ser

considerada como una proteína que participa activamente en la reparación de las lesiones generadas por BM o de cualquier otro agente oxidante.

Para llevar a cabo los ensayos de *Pull-down* con las proteínas seleccionadas, se expresaron las proteínas de fusión y se inmovilizaron en una resina de níquel (His₆-ExoIII, His₆-EndoIV, His₆-Tag, His₆-AlkA, His₆-Ada y His₆-SSB) o de *glutathione-sepharose* (GST-Ogt), según el procedimiento descrito en MÉTODOS 3.3.4. Seguidamente, se pusieron en contacto estas proteínas inmovilizadas con un extracto celular obtenido a partir de un cultivo exponencial de la cepa MC4100, y paralelamente, con un extracto de un cultivo de la misma cepa tratada durante 1 hora con 10mM MMS. El tratamiento con MMS tenía por finalidad estudiar si la interacción de estas proteínas con GAPDH podía depender o incrementar en condiciones de daño en el DNA. Se decidió utilizar MMS porque, tal como se ha descrito anteriormente, en la reparación de las lesiones inducidas por este agente alquilante participan de manera más o menos directa todas las proteínas seleccionadas para este estudio.

En los ensayos de *Pull-down* se obtuvieron varias fracciones: la fracción excluida de la resina, correspondiente a las proteínas del extracto que no se unían a la proteína inmovilizada (*flow-trough*, FT), la última fracción de lavado, para comprobar que ya no se detectaban restos de proteínas excluidas, y la fracción de elución (300mM imidazol), que contenía la proteína de fusión liberada de la resina y en su caso, las proteínas del extracto que estuvieran interaccionando con ella. Estas fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE y sometidas a posterior análisis por *Western Blot*, utilizando anticuerpos anti-GAPDH. Paralelamente con las mismas muestras se desarrolló un gel de poliacrilamida que fue teñido con azul de *Coomassie*, para visualizar las bandas correspondientes a las proteínas eluidas. Las proteínas detectadas en la fracción eluida mediante tinción por *Coomassie* o por *Western Blot* se consideraban específicamente unidas a la proteína de fusión, si en la fracción de lavado no se observaba ninguna banda.

En ausencia de tratamiento con MMS, de las siete proteínas fusionadas a histidinas, GAPDH únicamente co-eluía con His₆-EndoIV y His₆-SSB (Figura 4.22), indicando la existencia de una interacción entre estas proteínas y GAPDH. Cabe mencionar que estas interacciones son específicas puesto que ensayos control de *Pull-down* realizados con el mismo tipo de resina descartaron la interacción inespecífica de GAPDH con la matriz Ni²⁺-NTA (Figura 4.8A-RESULTADOS 4.2.3.2.1). Si bien comparativamente, la banda correspondiente a His₆-SSB observada en la tinción con azul de *Coomassie* era mucho más débil que la banda correspondiente a His₆-EndoIV, la intensidad relativa de la banda de GAPDH en el *Western Blot* indica que la interacción entre GAPDH y SSB (Figura 4.22C) puede ser tan o más significativa que la interacción entre GAPDH y Endo IV (Figura 4.22A).

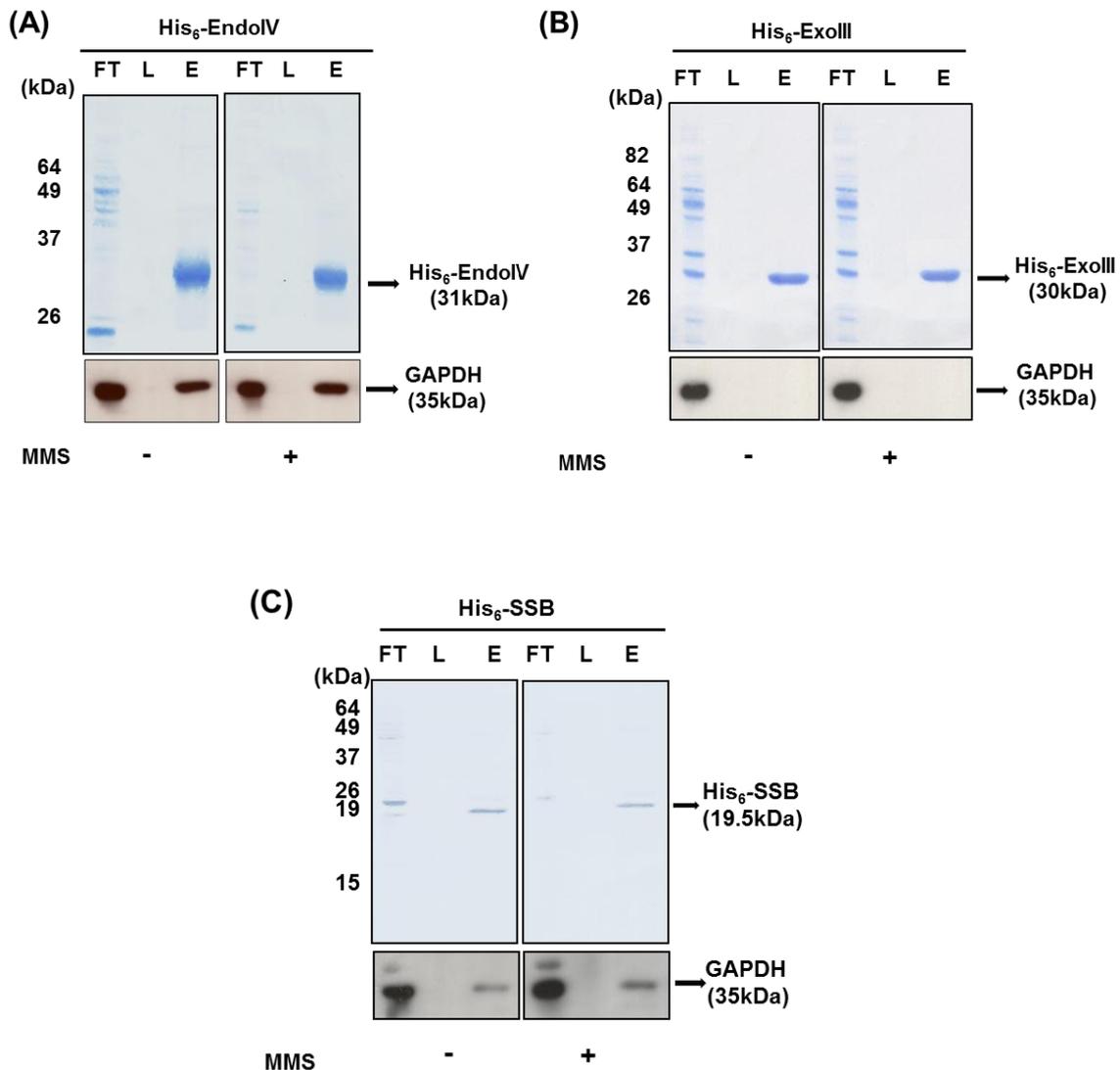


Figura 4.22. Análisis de la interacción entre GAPDH y proteínas involucradas en los procesos de reparación del DNA mediante ensayos de *Pull-down* seguidos de *Western Blot*. Las fracciones obtenidas (FT, *flow-through*; L, lavado; E, elución) de los ensayos de *Pull-down* con las proteínas inmovilizadas en la resina de Ni²⁺-NTA **(A)** His₆-EndoIV, **(B)** His₆-ExoIII y **(C)** His₆-SSB, fueron evaluadas mediante tinción con azul de *Coomassie* (paneles superiores) y *Western Blot* (paneles inferiores) empleando anticuerpos anti-GAPDH. Las proteínas inmovilizadas fueron incubadas con extractos celulares obtenidos a partir de cultivos en SM-CAA 0.5% de la cepa MC4100 en fase exponencial en ausencia de MMS, u obtenidas a partir de cultivos de la misma cepa tratados con 10mM MMS durante 1 hora.

Del resto de las proteínas estudiadas que no interaccionaron con GAPDH, únicamente se muestra el resultado del ensayo con His₆-ExoIII (Figura 4.22B). En este caso, GAPDH no co-purifica asociada a la proteína de fusión His₆-ExoIII. El análisis de la fracción eluida por *Western Blot* no detectó la presencia de GAPDH en esta fracción lo que descarta la interacción entre estas proteínas.

Aunque habíamos considerado que, por sus características, Exo III podría ser equiparable a la APE1 humana en cuanto a su capacidad de interaccionar con

GAPDH, los resultados de *Pull-down* indicaron que en *E. coli* no es Exo III la que interacciona con GAPDH sino Endo IV. La nucleasa Exo III de *E. coli* presenta un 52% de similitud con APE1. La principal diferencia entre ambas proteínas ortólogas se centra en el extremo amino-terminal. En concreto, APE1 tiene 39 residuos en la región N-terminal que no están presentes en Exo III (*Protein BLAST*). Esta diferencia puede determinar capacidades de interacción diferentes entre estas proteínas.

La interacción observada con Endo IV, la otra AP-endonucleasa de la respuesta BER, estaría de acuerdo con los resultados obtenidos en la respuesta de las células silenciadas para GAPDH frente al tratamiento con BM y MMS, y corrobora la implicación de GAPDH en mecanismos de reparación del DNA. Si bien la BM y el MMS son agentes que provocan distinto tipo de lesiones en el DNA, en ambos casos se generan centros AP, ya sea de manera directa (BM) o durante la reparación por escisión de bases del DNA dañado (MMS). Recordemos, que la participación de Endo IV en la reparación de las lesiones causadas por ambos agentes genotóxicos ha sido demostrada por la mayor sensibilidad mostrada por los mutantes *nfo* frente al tratamiento con estos agentes (Cunningham *et al.*, 1986).

Cabe destacar que la interacción entre GAPDH y Endo IV ha sido observada en condiciones basales (extractos celulares obtenidos a partir de crecimientos aeróbicos exponenciales, que no han sido dañados con agentes oxidantes o alquilantes). Hay que tener en cuenta que los centros AP se generan también de forma habitual en la reparación del DNA en células no sometidas a ningún tipo de estrés con la finalidad de mantener la integridad del genoma (Rebeck *et al.*, 1991). Estos resultados de interacción Endo IV-GAPDH, junto con el mayor número de centros AP espontáneos en el DNA de un mutante deficiente en GAPDH, confirman la implicación de GAPDH en la reparación de estas lesiones en el DNA, probablemente a través de su acción e interacción con Endo IV.

Respecto a la interacción de GAPDH con SSB, hasta el presente no se había descrito tal interacción. No obstante cabe mencionar que previamente a este trabajo se publicó un estudio sobre la caracterización de una nueva actividad exonucleasa en *E. coli*, la Exonucleasa IX, la cual co-purificaba con SSB y GAPDH entre otras proteínas (Hodskinson *et al.*, 2007). La Exonucleasa IX, que ya había sido descrita con anterioridad por otros autores (Shafritz *et al.*, 1998), resultó ser en realidad la proteína YgdG, de función desconocida. Más tarde esta proteína aparece en las bases de datos como la proteína de unión a SSB. La actividad exonucleasa que se le había atribuido a esta proteína correspondía a la Exonucleasa III que contaminaba sus fracciones purificadas (Hodskinson *et al.*, 2007). Independientemente de la función que desempeñe esta proteína, la interacción descrita entre YgdG y las proteínas SSB y GAPDH es congruente con la interacción entre GAPDH y SSB observada en este trabajo. Cabe mencionar que en estudios masivos de interacción proteína-proteína llevados a cabo en *E. coli* se han encontrado ambas proteínas

(GAPDH y SSB) asociadas a las subunidades de la RNA-polimerasa RpoA, RpoB y RpoC (Butland *et al.*, 2005), lo que sugiere la participación de GAPDH y SSB en la formación de complejos multiproteicos implicados en diversos procesos relacionados con el metabolismo del DNA como son transcripción o recombinación. En este sentido, la interacción con GAPDH observada en condiciones basales (en ausencia de exposición a MMS) es congruente con la importancia de estos procesos y la función esencial de SSB en ellos. Así pues, la interacción de GAPDH con SSB permitiría reclutar GAPDH a los centros de reparación del DNA.

Tal como se observa en la figura 4.22, la incubación con un extracto celular obtenido a partir de células expuestas a MMS, no modificó los resultados de interacción de GAPDH con ninguna de las proteínas ensayadas. Así, en estas condiciones tampoco se observó interacción con las proteínas Exo III, AlkA, Tag, Ada u Ogt. En el caso de Ogt, los ensayos de *Pull-down* fueron realizados con la proteína recombinante GST-Ogt (resultados no mostrados). Si bien las glicosilasas Tag y AlkA y las metiltransferasas Ada y Ogt participan directamente en la reparación de las bases metiladas, el análisis por *Western Blot* de la fracción eluida no detectó la presencia de GAPDH co-purificando con ninguna de estas proteínas, ni siquiera en las muestras tratadas con el agente alquilante MMS. De entre estas proteínas, sólo Ogt había sido identificada como proteína candidata a interactuar con GAPDH en estudios masivos de interacción proteína-proteína (Butland *et al.*, 2005). Sin embargo, nuestros resultados no corroboran dicha interacción.

Respecto a SSB y Endo IV, el tratamiento con MMS no provocó un incremento en la interacción de GAPDH con estas proteínas. Por una parte es posible que la metodología utilizada no permita apreciar un cambio cuantitativo en estas condiciones. La formación del complejo puede depender de alguna modificación, o requerir algún factor que sea limitante en los ensayos o cuya asociación sea débil o transitoria. Podemos especular que la interacción de estas proteínas con GAPDH sea un mecanismo de regulación. Simplemente la unión puede provocar cambios conformacionales en las proteínas que modifiquen su actividad. Así pues, el mecanismo funcional de la interacción podría estar basado en cambios funcionales de la(s) proteína(s) sin suponer necesariamente un incremento en la fracción de GAPDH que forma el complejo.

4.3.5. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE MUTANTES DEFICIENTES EN GAPDH

Los microorganismos presentan una gran variedad de herramientas para soportar una gran cantidad de adversidades. En muchos casos, la exposición a elementos que generan daño a la célula resulta en la producción de enzimas específicas para aliviar el estrés y permitir la supervivencia o crecimiento (Justice *et al.*, 2008). Así, frente a condiciones de daño extenso en el DNA, *E. coli* induce la respuesta SOS (Janion, 2008). Esta respuesta actúa como mecanismo de defensa que permite

sobrevivir a las células dañadas cuya replicación y división celular ha quedado detenida. Ello lleva por un lado a activar la expresión de determinados genes implicados en reparación de DNA, replicación y mutagénesis tal como se ha descrito en el apartado 1.4.4 de la introducción, pero también se producen cambios morfológicos a nivel celular. Las células son más largas y crecen en forma de filamentos. Este tipo de crecimiento es debido a la expresión de *sula*, gen de inducción tardía en la respuesta SOS, que codifica un inhibidor de la división celular cuyo mecanismo es interferir con la proteína FtsZ, GTPasa implicada en la formación del anillo en el centro de división. El retraso en la división celular permite la reparación del DNA expuesto a la acción de agentes genotóxicos (Kuzminov, 1999; Janion *et al.*, 2002).

La capacidad de formar células filamentosas después de un tratamiento con agentes genotóxicos como por ejemplo el MMS es mucho más marcada en mutantes del sistema BER (*xthA* (Exo III), *nfo* (endo IV), *nth* (endo III)) (Janion *et al.*, 2003; Sikora *et al.*, 2010). El triple mutante por ejemplo exhibía como fenotipo una fuerte filamentación. Se ha reportado además, que determinados mutantes del sistema de reparación BER y de la dioxigenasa AlkB presentan un crecimiento filamentosos en medios de cultivo habituales, incluso en ausencia de tratamiento con agentes genotóxicos (Sikora *et al.*, 2010). Este efecto puede ser atribuible a una menor capacidad de reparación de las lesiones espontáneas, lo que activa la respuesta SOS para inhibir la división celular mientras el DNA es reparado, previniendo así la transmisión de mutaciones a células hijas.

Los resultados presentados en este trabajo hasta el momento aportan evidencias de la implicación de GAPDH en procesos de reparación del DNA en *E. coli*. Por ello nos planteamos analizar la morfología de células deficientes en GAPDH como un estudio adicional que aportara nuevos datos que corroboren la función de GAPDH en el mantenimiento de la integridad del genoma.

El análisis de la morfología celular se llevó a cabo en distintos fondos genéticos: (i) en los mutantes *knockout* de *gapA*, las cepas MC4100 Δ *gapA* y W3CG en comparación con sus cepas parentales *wild-type*, MC4100 y W3CG^{Glu+} respectivamente, y (ii) en células MC4100 silenciadas con PTasRNA (pHN1009-1) con respecto a células que no expresan el RNA antisentido (pHN1009). Las células fueron cultivadas en medio líquido SM-CAA 0.5% + glicerol 20mM e incubadas a 37°C en agitación durante 24 horas. Posteriormente se realizó la tinción Gram de las células tal como se describe en el apartado MÉTODOS 3.5 y se analizaron los resultados por microscopía confocal. Los resultados obtenidos a las 24 horas de crecimiento se presentan en la figura 4.23.

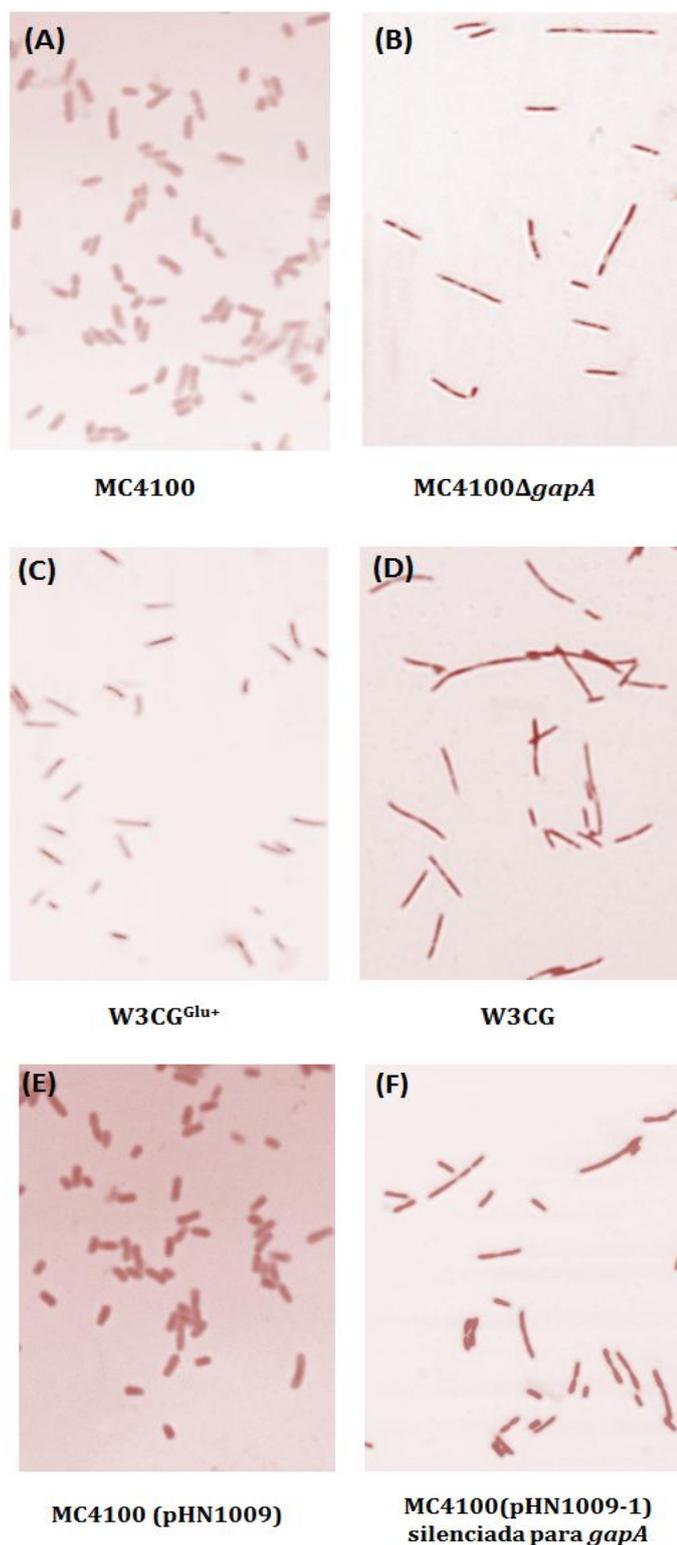


Figura 4.23. Morfología de células de *E. coli* en fase estacionaria. Las células indicadas fueron cultivadas en SM-CAA 0.5% suplementado con glicerol 20mM a 37°C durante 24h. Las células fueron visualizadas mediante tinción Gram. **A)** MC4100, **B)** MC4100Δ*gapA*, **C)** W3CG^{Glu+}, **D)** W3CG (mutante *knockout gapA*), **E)** MC4100 transformada con el plásmido vector (pHN1009), **F)** MC4100 transformada con el plásmido (pHN1009-1) silenciada para *gapA*.

En todos los casos se observa una morfología filamentosa en las células deficientes o silenciadas en GAPDH (no así en las respectivas cepas parentales), lo que es compatible con la inducción de la respuesta SOS en ausencia de GAPDH funcional en las condiciones de crecimiento ensayadas. El crecimiento filamentoso es más acusado en el fondo de la cepa W3CG. De hecho, en este fondo genético, las células que expresan GAPDH (W3CG^{Glu+}) son de entrada más largas de lo habitual. Esta morfología es compatible con el genotipo de esta cepa, la cual contiene una mutación en el gen *thyA* (MATERIALES 2.1). En la página web del NBRP (<http://www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/strain/top/top.jsp>) hay información disponible sobre la morfología de los mutantes de *E. coli* que constituyen la colección Keio en cultivos en LB en medio líquido. Dentro de los mutantes que muestran un fenotipo de células alargadas está precisamente el mutante *thyA*. El gen *thyA* codifica la timidilato sintetasa, enzima implicada en la biosíntesis de nucleótidos. La deficiencia conjunta de GAPDH y ThyA en la cepa W3CG se traduce en una mayor capacidad de filamentación que las células deficientes sólo en GAPDH (MC4100Δ*gapA* o MC4100 (pHN1009-1)). Es de destacar que entre los mutantes de la colección Keio que presentan una morfología celular muy alargada (filamentos) en medio LB, se encuentran varios mutantes deficientes en proteínas implicadas en la reparación del DNA. Podemos encontrar mutaciones en genes de la respuesta SOS (*ruvA*, *ruvC*), genes relacionados con la función de la DNA polimerasa III (*dnaQ*, *HolC*), recombinación (*recF*) o metilación de DNA (*dam*). Nuestros resultados sobre el crecimiento filamentoso de los mutantes *gapA* (mutantes *knockout* y células silenciadas) en ausencia de daño inducido por agentes genotóxicos confirma la implicación de GAPDH en procesos de reparación del DNA. GAPDH podría estar modulando la actividad de algunas de las proteínas involucradas en estos procesos y los resultados sobre la interacción de GAPDH con Endo IV y SSB refuerzan esta hipótesis.

Cabe destacar que el estudio morfológico de las cepas ensayadas se llevó a cabo también en cultivos en fase exponencial en el mismo medio SM-CAA 0.5% + glicerol 20mM, no observándose en este caso la formación de filamentos en los cultivos de las células deficientes en GAPDH. Tampoco se observaron diferencias de crecimiento con respecto a las cepas parentales en cultivos en medio sólido realizados en placa. Se ha descrito que la respuesta SOS, y por tanto la formación de filamentos, se activa en *E. coli* en condiciones de privación de nutrientes (*starvation*), en concreto este estudio se llevó a cabo en condiciones de privación de arginina (Janion *et al.*, 2002). El crecimiento filamentoso se manifiesta cuando estas células privadas de arginina son cultivadas en medios con glicerol, pero no en medios con glucosa. Los autores proponen una activación de la respuesta SOS dependiente de cAMP en estas condiciones que permitiría la reparación de las mutaciones acumuladas durante las condiciones de *starvation* (Janion *et al.*, 2002). Los niveles intracelulares de este mediador dependen de la fuente de carbono; así el glicerol produce altos niveles intracelulares de cAMP, mientras que la glucosa

inhibe su síntesis (Buettner *et al.*, 1973). Teniendo en cuenta estos datos, podemos especular que en cultivos de 24 horas en medio líquido SM-CAA 0.5% + glicerol 20mM (fase estacionaria muy avanzada) las células deficientes en GAPDH habrían ido acumulando lesiones en el DNA que en condiciones de limitación de determinados aminoácidos o nutrientes (fase estacionaria tardía) dispararían la respuesta SOS, especialmente en este medio con glicerol, donde los niveles de cAMP son elevados. Esto se traduce en un crecimiento filamentososo en fase estacionaria, pero no en fase exponencial donde no hay limitación de factores esenciales para el crecimiento. En cambio, las células parentales que expresan niveles normales de GAPDH pueden reparar las lesiones espontáneas en el DNA producidas durante el crecimiento por lo que no disparan la respuesta SOS, aún en fase estacionaria. Así pues nuestros resultados de morfología corroboran que la deficiencia en GAPDH puede dificultar la reparación de las lesiones generadas en el DNA durante el crecimiento.

4.4. INTERACCIÓN DE GAPDH CON LA CHAPERONA CesT DEL SISTEMA DE SECRECIÓN T3SS

El trabajo presentado hasta el momento hace referencia a funciones de GAPDH en el entorno intracelular. Sin embargo, en procariotas, GAPDH desempeña también funciones a nivel extracelular. En este sentido uno de los mecanismos que permite a las proteínas multifuncionales exhibir diferentes funciones es su localización subcelular. Estas proteínas, una vez secretadas, pueden presentar en el entorno extracelular una función alternativa. En el caso de GAPDH, la proteína secretada por bacterias patógenas y probióticos está relacionada con funciones en los procesos de interacción y adhesión al huésped (apartado 1.2.2.1). Nuestro grupo de investigación ha contribuido al estudio de la localización extracelular de GAPDH en cepas de *Escherichia coli* patógenas, EPEC y EHEC. Hemos demostrado la interacción de GAPDH con las proteínas humanas plasminógeno y fibrinógeno, así como su asociación a células Caco-2 después de la infección (Egea *et al.*, 2007). La proteína GAPDH no es secretada por cepas de laboratorio ni por cepas comensales aisladas de microbiota intestinal de individuos sanos, pero sí por la cepa probiótica *E. coli* Nissle 1917 (Aguilera *et al.*, 2012).

Así pues un paso importante en el desempeño de esta función es la secreción de la proteína al medio extracelular. Tal como se ha comentado en la introducción, en bacterias Gram-negativas existen varios sistemas que permiten la secreción de proteínas a través de las dos membranas que constituyen la envuelta celular. Estudios realizados en nuestro grupo han evidenciado que en el patógeno EPEC, GAPDH es secretada por al menos dos vías alternativas dependiendo de las condiciones de crecimiento: (i) a través del sistema T3SS, específico de patógenos, en células crecidas en DMEM, y (ii) a través de un sistema todavía por identificar

en células crecidas en LB. Este último sistema no está restringido a patógenos ya que también es operativo en la cepa probiótica Nissle 1917 (Aguilera *et al.*, 2012).

El estudio de la secreción de GAPDH en mutantes deficientes en componentes del sistema T3SS (mutantes *escN*, deficientes en la ATPasa y mutantes *sepD*, deficientes en una de las proteínas que controla la secreción de efectores) mostró un patrón de secreción compatible con el de los efectores de este sistema. Además, ensayos de *Pull-down* y *Far-Western* demostraron la interacción de GAPDH con la chaperona CesT, específica de este sistema de secreción (Aguilera *et al.*, 2012).

Mi contribución a este estudio se centró en aplicar técnicas de interacción de proteínas para confirmar dicha interacción. Una primera aproximación a este estudio fue abordar estudios de *Far-Western Blot* (MÉTODOS 3.3.3) acoplados a electroforesis bidimensional de GAPDH con la finalidad de identificar si la interacción con CesT dependía de alguna modificación post-traducciona. Para ello, una preparación de GAPDH purificada (5µg/ml) fue separada mediante electroforesis bidimensional (MÉTODOS 3.2.10.2) y posteriormente transferida a una membrana de PVDF e incubada con 1µg/ml de His₆-CesT purificada. Después de eliminar, mediante lavados, el exceso de His₆-CesT no unida, la interacción de GAPDH con esta chaperona fue revelada utilizando anticuerpos anti-His conjugados a peroxidasa. En paralelo se llevó a cabo un experimento control sin incubar la membrana con la proteína recombinante His₆-CesT, para descartar así reacciones inespecíficas de los anticuerpos utilizados con GAPDH. Los resultados se presentan en la figura 4.24. La tinción con nitrato de plata reveló, como era de esperar, la separación de varias formas de GAPDH en función de su pI. En el panel central se observa la presencia de varios *spots* reactivos frente a los anticuerpos anti-His lo que indica que la interacción de GAPDH con CesT no es estrictamente dependiente de una modificación post-traducciona concreta.

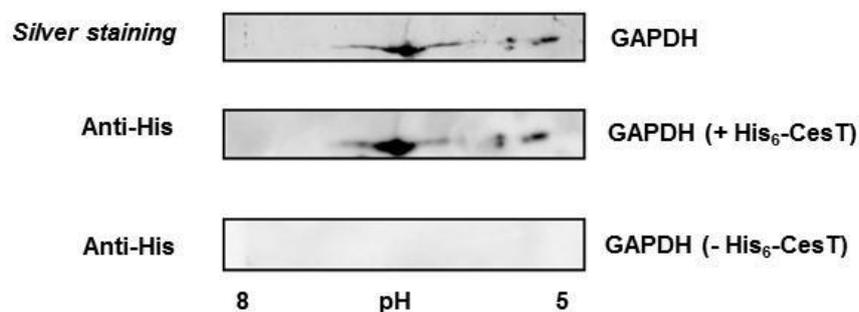


Figura 4.24. Análisis mediante *Far-Western Blot* de la interacción de CesT soluble con GAPDH inmovilizada. La proteína recombinante GAPDH (5µg/ml) fue sometida a electroforesis bidimensional. El panel superior corresponde a una tinción del gel por nitrato de plata. El panel central corresponde a la proteína transferida a una membrana de PVDF, incubada con His₆-CesT (1µg/ml) y revelada con anticuerpos anti-His. El panel inferior corresponde a un experimento control en el que la membrana de PVDF no fue incubada con His₆-CesT.

A continuación, y utilizando preparaciones purificadas de las proteínas recombinantes GAPDH y His₆-CesT se procedió a determinar los parámetros de afinidad de dicha interacción mediante interferometría de biocapa (BLI). Esta técnica permite la cuantificación de interacciones moleculares y proporciona las constantes de afinidad y disociación del complejo formado. Estos experimentos fueron realizados con la colaboración de la Dra. Marta Taulés del servicio de citometría y análisis de interacciones moleculares de los servicios científico-técnicos de la Universidad de Barcelona.

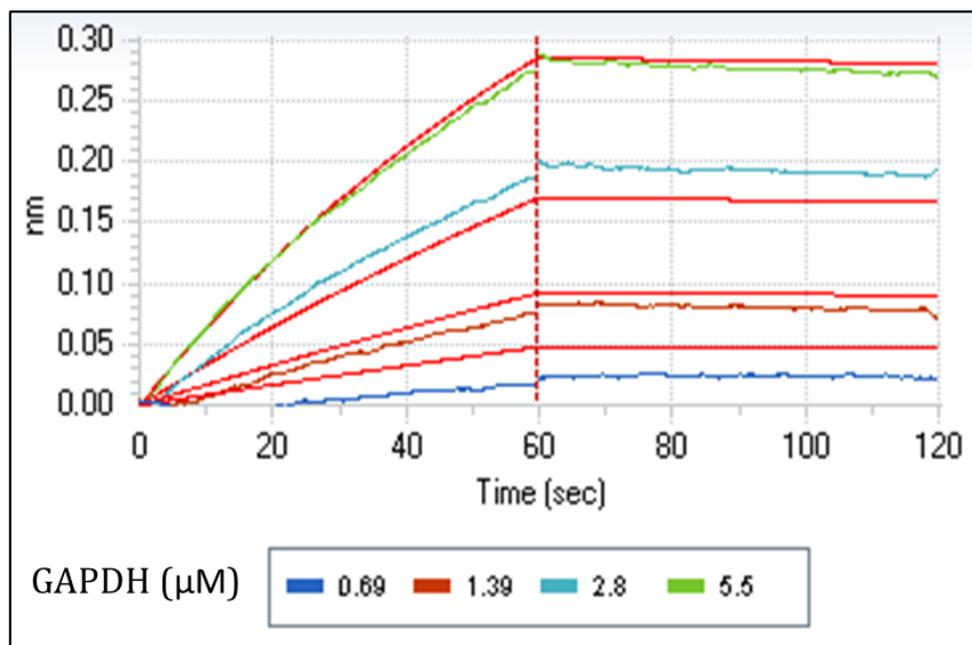


Figura 4.25. Análisis mediante BLI de la interacción de CesT con GAPDH. La proteína CesT (50μg/ml) fue inmovilizada en un biosensor a través de grupos aminos reactivos. Posteriormente, los biosensores unidos a CesT fueron expuestos a diferentes concentraciones de GAPDH purificada (0-5.5μM) a 30°C en constante agitación. Los datos fueron analizados utilizando el *software ForteBio Data Analysis V. 6.3* Las constantes cinéticas fueron obtenidas por ajuste de los datos a un modelo 1:1 después de sustracción de un sensor paralelo de referencia. Las líneas rojas representan el ajuste teórico de los datos experimentales.

El ensayo se realizó utilizando como proteína inmovilizada His₆-CesT. El detalle experimental y las concentraciones de proteína utilizadas en estos experimentos se detallan en MÉTODOS 3.3.5. Los resultados obtenidos con His₆-CesT inmovilizada y cantidades crecientes de GAPDH en solución se presentan en la figura 4.25. A partir de los valores obtenidos, y utilizando el *software ForteBio Data Analysis* versión 6.3 proporcionado por la casa comercial del equipo, se determinó la afinidad del complejo GAPDH-CesT. Se obtuvo una K_D de 560nm y una velocidad de disociación (K_{off}) del complejo de 0,0015 s⁻¹. Estos parámetros indican que la interacción entre ambas proteínas es fuerte y la disociación del complejo muy lenta. Sin embargo, en esta cinética de concentración no se observó un patrón de

saturación. Este hecho puede deberse a que sólo una fracción de GAPDH, probablemente monomérica, es competente para la unión con CesT. Cabe destacar que el experimento contrario, es decir la utilización de GAPDH inmovilizada y CesT como analito en solución, no pudo realizarse ya que la inmovilización de GAPDH a través de grupos amino comporta la inactivación de los centros de interacción con CesT (ver discusión más adelante).

Hasta el presente no se ha reportado ninguna estructura de la chaperona CesT formando complejo con alguna de sus proteínas sustrato, sin embargo existen en las bases de datos, estructuras de otras chaperonas bacterianas de clase I (altamente conservadas en estructura) en complejo con su efector, constituyentes de sistemas de secreción tipoT3SS de otras enterobacterias patógenas. Este es el caso del complejo chaperona SycE-efector YopE de *Yersinia spp* (PDB ID:1L2W) (Birtalan *et al.*, 2002) y del complejo chaperona SycP-efector SptP de *Salmonella typhimurium* (PDB ID:1JYO) (Stebbins y Galán, 2001). Estos efectores interaccionan con cuatro centros hidrofóbicos de la chaperona a través de su extremo N-terminal (Figura 4.26A). Con esta información nos propusimos identificar los residuos y determinantes estructurales implicados en la interacción de estos efectores con su chaperona y analizar si estos están presentes en la región N-terminal de GAPDH (residuos 1-120). Este análisis estructural fue realizado en colaboración con el grupo de la Dra. Cristina Vega del CID-CSIC de Madrid.

El modelaje del extremo N-terminal de GAPDH mostró que esta proteína adopta en esta región (residuos 23-40) una conformación similar a la de los efectores YopE y SptP que permitiría su interacción con los centros hidrofóbicos de la chaperona CesT. A pesar de la considerable degeneración de la secuencia aminoacídica de esta región, en GAPDH se conservan los elementos de estructura secundaria (hélice- α y hoja- β) así como el patrón de residuos hidrofóbicos y residuos cargados positivamente implicados en la interacción con la chaperona (Figura 4.26B). El número de residuos necesario para cubrir la superficie de interacción con la chaperona depende de la conformación del efector. Cuando el efector está predominantemente en conformación extendida (YopE), la región entre la primera Arg/Lys conservada y el último residuo de la última hoja- β comprende entre 31-35 residuos. Por el contrario, la estructura en hélice- α más condensada de SptP permite ajustar 71 residuos en contacto la chaperona SicP. Esta región de GAPDH se asemeja más a la del efector YopE.

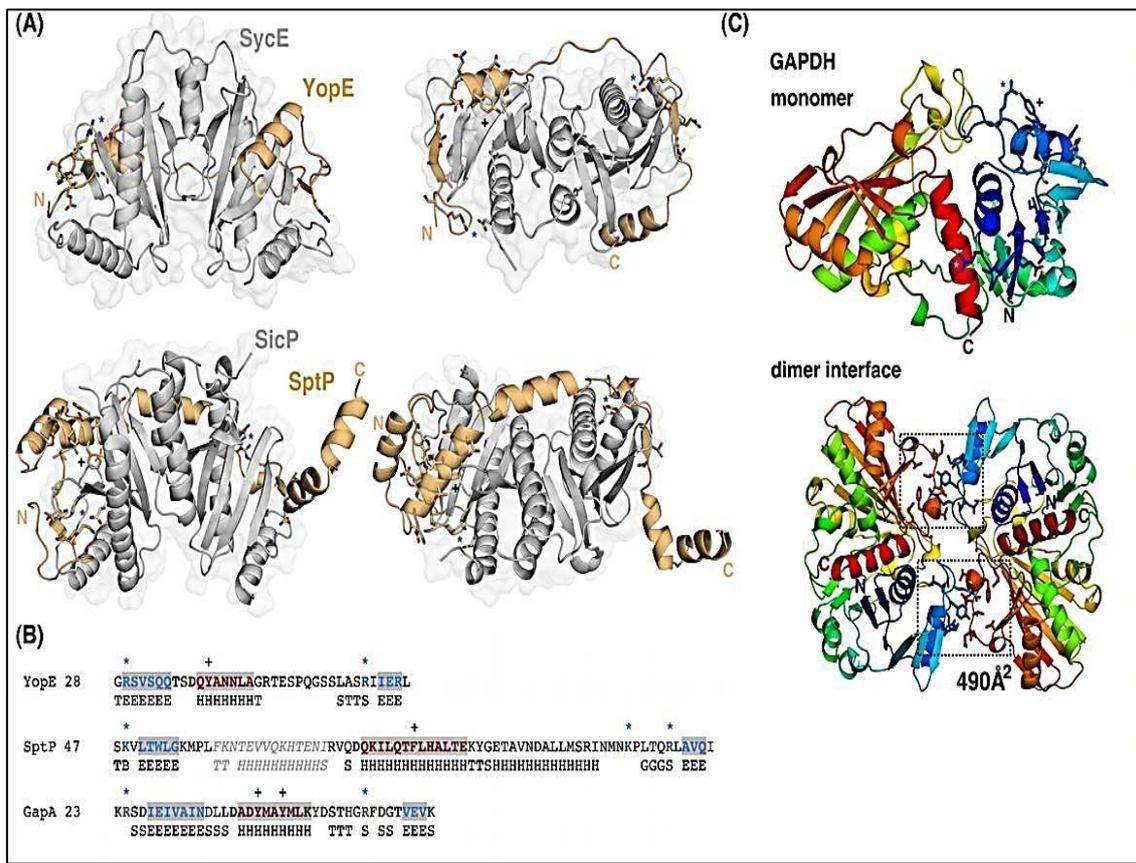


Figura 4.26. Determinantes estructurales para la interacción CesT-GAPDH. (A) Representación de las estructuras cristalinas de YopE-SycE (PDB ID: 1L2W) y SicP-SptP (PDB ID: 1JYO). Se muestran dos vistas relacionadas por una rotación de 90° alrededor del eje horizontal. Las chaperonas (SycE y SicP) se muestran en color gris y los efectores (YopE y SptP) en marrón claro. Las cadenas laterales en forma de bastón corresponden a residuos relevantes para la interacción chaperona-efector; concretamente se detallan, un residuo conservado de ácido glutámico en las chaperonas (E115 y E118), las hojas-β de los efectores (precedidas por un residuo conservado de arginina/lisina) y la α-hélice centrales (precedidas por un residuo conservado de ácido aspártico). (B) Secuencia amino terminal de los efectores YopE y SptP, y de GAPDH *E. coli* empezando en los residuos 28, 47, y 23, respectivamente, con los elementos de estructura secundaria determinados experimentalmente indicados en la parte inferior (H = hélices-α; E = hojas-β extendidas; B = puente-β aislada; T = giro estabilizado por enlaces de hidrógeno; S = giro; G = 3₁₀ hélice). Las estructuras secundarias importantes se muestran en azul (hojas-β) o rojo (hélices-α) frente a un *background* en gris. Los residuos clave conservados, no necesariamente presentes en estructuras secundarias, están coloreados y marcados con un asterisco (R/K, en azul), signo + (Y/F, en rojo), o en rojo (aspártico que precede a la hélice-α central en los efectores). La secuencia y motivos de estructura secundaria identificados en GAPDH se marcan del mismo modo. (C) Estructuras de GAPDH en forma de monómero y dímero (PDB ID: 1DC5) (Yun *et al.*, 2000). Los asteriscos azules y los signos + tienen el mismo significado que en (A) and (B). Los residuos del extremo N-terminal de GAPDH predecibles a interactuar con CesT se muestran en barras. En concreto, la región 41-51 forma parte de la interfase del dímero.

Hay que tener presente que la síntesis de proteínas en los ribosomas se inicia a partir del extremo N-terminal. Ya que la cadena monomérica nascente de GAPDH cuando emerge del ribosoma interacciona con varias chaperonas, como *trigger factor* (Liu *et al.*, 2010) y GroEL/GroES (Houry *et al.*, 1999), es probable que CesT compita con estas chaperonas en su unión al extremo N-terminal de una pequeña fracción de GAPDH nascente, interfiriendo así con su estabilización y plegamiento. De esta forma GAPDH quedaría marcada para su secreción a través del sistema T3SS, en cuyo caso su correcto plegamiento y oligomerización tendrían lugar después de la translocación. La unión del fragmento N-terminal de GAPDH con CesT implicaría la disrupción parcial del tetrámero formado por GAPDH, ya que los residuos 41–51 contribuyen a estabilizar la interfase de oligomerización (Figura 4.26C). Esta observación está de acuerdo con la propuesta que las proteínas dirigidas para su secreción a través de T3SS han de ser translocadas en un estado desplegado o al menos parcialmente plegado (no globular) a través del complejo proteico que constituye la aguja protuberante cuyo diámetro es 25-Å (Stebbins y Galán, 2003).

Este análisis *in silico* referente a los determinantes estructurales para la unión a CesT conservados en el extremo N-terminal de GAPDH refuerza los resultados experimentales de interacción entre GAPDH y CesT. La evidencia de la formación de un complejo estable entre la chaperona CesT y GAPDH, en una conformación particular desplegada, explica la redirección de una fracción de GAPDH citosólica hacia el aparato T3SS para su secreción. Este estudio supone la primera descripción de la interacción de una proteína *housekeeping* con la chaperona del T3SS CesT.

4.5. APORTACIONES DE ESTE TRABAJO AL CARÁCTER MULTIFUNCIONAL DE GAPDH EN *E. coli*.

Los estudios proteómicos orientados a identificar interacciones entre proteínas tienen un gran potencial de cara a asignar nuevas funciones a una proteína en concreto, especialmente en proteínas *moonlighting*. De hecho, la presencia de una proteína formando parte de un complejo multiprotéico puede indicar que esta proteína tiene una nueva función (Jeffrey, 2009). En este contexto, el trabajo desarrollado en esta tesis doctoral aporta claros indicios sobre nuevas funciones de GAPDH en *E. coli*, que han sido deducidas a partir de las interacciones identificadas (resumen integrativo en la página 149, figura 4.27). Entre ellas, se aportan evidencias experimentales sobre la implicación funcional de GAPDH en los procesos de reparación de DNA. Así se ha evidenciado:

(A) Interacción de GAPDH con enzimas de la glicólisis, como piruvato quinasa o enolasa. Dicha interacción sugiere su asociación en complejos multienzimáticos

que mejoran la eficiencia en la transformación de los intermediarios de esta vía metabólica.

(B) Interacción con chaperonas. La interacción con DnaK y *Trigger Factor* confirma la implicación de estas chaperonas en el plegamiento asistido de GAPDH citosólica (Deuerling *et al.*, 2003). Este trabajo ha contribuido también a establecer la interacción de GAPDH con la chaperona CesT del sistema de secreción T3SS. En cepas patógenas, esta chaperona competiría con las chaperonas celulares DnaK y *Trigger Factor* por su unión al extremo N-terminal de la cadena polipeptídica de GAPDH recién sintetizada, y todavía desplegada. Esta interacción contribuiría a estabilizar y dirigir una fracción de moléculas de GAPDH hacia la maquinaria de translocación del T3SS para su secreción. Así, la interacción con CesT permite a GAPDH acceder al medio extracelular donde, a través de su interacción con componentes del huésped, facilita la colonización del tracto intestinal por parte del patógeno.

(C) Interacción con las subunidades alfa y beta de la ATP sintasa. La interacción con estas subunidades (AtpA y AtpD), así como con la subunidad dependiente de ATP de varios sistemas de transporte de azúcares (RbsA, AraG) permite especular funciones de GAPDH relacionadas con el control de procesos celulares acoplados a la producción de energía. Puesto que algunas funciones de las proteínas *moonlighting* dependen de la unión a ligandos, GAPDH podría actuar como un sensor del estado energético y, en función de los niveles intracelulares de NAD⁺/NADH de la célula, establecer interacción con estas proteínas.

(D) Interacción con proteínas relacionadas con mecanismos de reparación del DNA. La interacción de GAPDH con PGPasa sugiere una posible función de GAPDH en procesos relacionados con la reparación de DNA. Es en relación a esta función donde se han llevado a cabo estudios funcionales en cepas deficientes o silenciadas en GAPDH, los cuales han permitido confirmar la implicación de GAPDH en la reparación de lesiones generadas por BM o MMS, así como en la reparación de centros AP generados de modo espontáneo. La interacción de GAPDH con SSB y Endo IV es compatible con la participación de GAPDH en complejos dedicados a reparación de DNA. La interacción con SSB serviría para reclutar GAPDH a los centros de reparación, donde a través de su interacción con Endo IV podría modular la función de esta nucleasa de manera similar a la acción de GAPDH humana sobre la endonucleasa APE 1 (Azam *et al.*, 2008). Es de destacar que en *E. coli*, Endo IV participa tanto en la reparación de centros AP (sistema BER) como en la reparación de los extremos 3'-fosfoglicolato generados por BM. La morfología filamentosa de las cepas deficientes en GAPDH en cultivos en fase estacionaria es congruente con una inducción de la respuesta SOS (inhibición de la división) por acúmulo de lesiones no reparadas.

(E) Otras funciones. La interacción de GAPDH con PGPasa puede sugerir también funciones alternativas de GAPDH en procesos de señalización por *quorum sensing*, ya que en enterobacterias el 2-fosfoglicolato (sustrato de PGPasa) es generado como producto de degradación del 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona, compuesto precursor de AI-2 (Taga, 2007; Xavier *et al.*, 2007). Esta función no ha sido explorada en este trabajo.

Puesto que las funciones celulares dependen de la asociación y disociación entre proteínas de forma regulada y equilibrada, la disrupción selectiva de estas interacciones puede ser utilizada para descubrir moléculas inhibitoras, con potencial para ser utilizadas como fármacos orientados a interferir en funciones concretas (Mai *et al.*, 2011).

Actualmente uno de los principales problemas en la salud humana es el incremento de la resistencia a antibióticos que han experimentado las bacterias patógenas, lo que ha llevado a plantear el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas basadas en el conocimiento integrativo de los procesos celulares y de los mecanismos de patogénesis bacteriana.

Una estrategia es el diseño de inhibidores de las interfaces de interacción entre proteínas. Aunque las superficies de contacto entre proteínas son extensas, hay regiones “calientes” de estas interacciones que son específicamente adecuadas para diseñar moléculas inhibitoras. Estas regiones consisten en residuos hidrofóbicos conservados que definen la interfase de contacto entre las proteínas. Como resultado de estos estudios, se han diseñado por ejemplo nuevos inhibidores del ensamblaje de las subunidades de la RNA polimerasa procarionota (Andre *et al.*, 2004; Andre *et al.*, 2006), de la interacción ZipA-FtsZ de *E. coli* (Tsao *et al.*, 2006) o de la dimerización de ToxT de *Vibrio cholerae* (Shakhnovich *et al.*, 2007).

Otra estrategia es seleccionar dianas a partir de redes de interacción entre proteínas (interactomas bacterianos). El análisis del interactoma de 608 proteínas de una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), ha permitido identificar la enzima piruvato quinasa (PK) como una diana potencial de nuevos agentes antimicrobianos (Zoraghi *et al.*, 2011). La PK es un enzima esencial para la viabilidad celular puesto que es uno de los enzimas reguladores de la glicólisis y su inhibición conlleva a la interrupción del metabolismo de carbohidratos y a la depleción de energía. Es un homotetrámero de idénticas subunidades y el sitio activo se encuentra en la interfase entre dos dominios de cada una de las cuatro subunidades. La comparación estructural de esta proteína en diferentes especies de bacterias, levaduras y mamíferos revela la existencia de una estructura conservada. No obstante el alineamiento entre las secuencias de la piruvato quinasa de MRSA y la humana ha permitido a estos autores identificar una secuencia divergente en un dominio que participa en la unión de sus subunidades.

Esta secuencia ha sido utilizada para el diseño de inhibidores virtuales selectivos que actúen específicamente contra la PK de bacterias (Zoraghi *et al.*, 2011).

Dado el carácter esencial y además multifuncional de GAPDH en *E. coli*, esta proteína podría ser considerada una diana potencial de nuevos agentes antimicrobianos. El conocimiento de las interacciones que esta proteína establece es de gran importancia en este sentido.

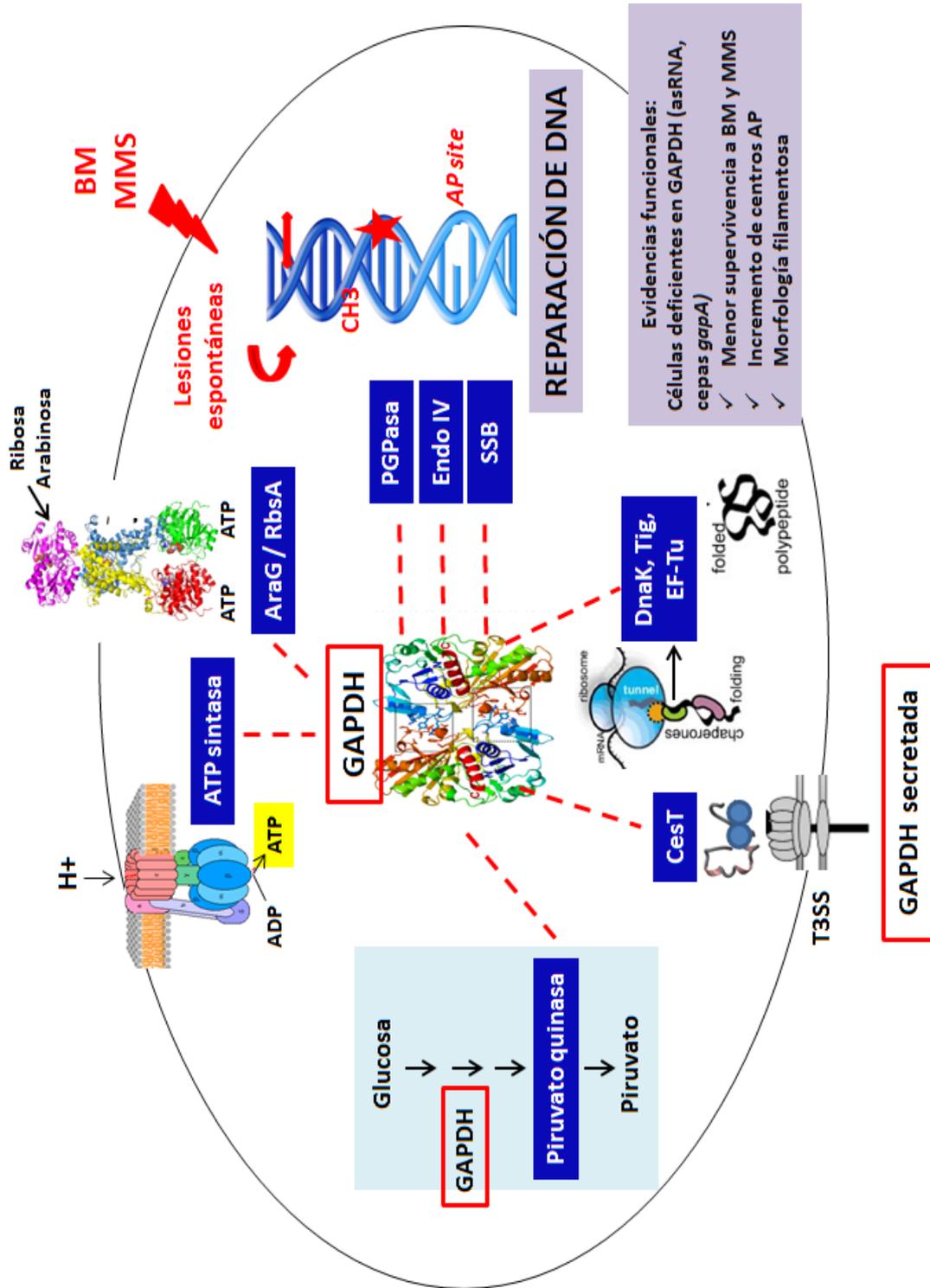


Figura 4.27. Resumen integrativo de la multifuncionalidad de GAPDH en *E. coli*

5

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

- Respecto a la implicación de GAPDH en la regulación transcripcional del gen *ndh*:

1. La deficiencia en GAPDH no altera el patrón de expresión de la fusión transcripcional del gen *ndh* en las condiciones de cultivo ensayadas (medio mínimo suplementado con malato y glicerol como fuente de carbono).
2. Ensayos de EMSA realizados en presencia de anticuerpos anti-GAPDH y con distintas preparaciones de GAPDH recombinante indican que el complejo de retardación formado no es debido a la interacción directa entre GAPDH y secuencias presentes en el promotor de *ndh*. La interacción puede ser indirecta a través de proteínas implicadas en el inicio de la transcripción asociadas a GAPDH.

- Respecto a la identificación de nuevas funciones intracelulares de GAPDH:

3. Mediante *cross-linking in vivo* con formaldehído seguido de espectrometría de masas se han identificado 16 proteínas capaces de interactuar con GAPDH. Estas interacciones pueden ser directas o indirectas a través de asociaciones en complejos multiproteicos.
4. Las proteínas AtpA y AtpD (subunidades α y β de la ATP sintasa), OmpC y LpdA (dihidrolipoil deshidrogenasa) han sido también identificadas en ensayos de inmunoprecipitación con GAPDH-V5 en ausencia de *cross-linking*.
5. Mediante ensayos de *Pull-down* seguidos de *Western Blot* se han validado las interacciones de GAPDH con piruvato quinasa, EF-Tu, triptofanasa, subunidades α y β de la ATP sintasa y PGPasa. La interacción de GAPDH con triptofanasa depende de algún factor o proteína presente en el extracto celular.
6. La interacción entre GAPDH y PGPasa depende de una modificación post-traduccional de GAPDH y la formación del complejo incrementa en respuesta al tratamiento con BM, sugiriendo la participación de GAPDH en procesos de reparación del DNA.
7. La construcción antisentido PTasRNA (-76/+86) en el vector de alto número de copias pHN1009 provoca un 90% de silenciamiento del gen *gapA*, no afecta el crecimiento en medio SM-CAA 0.5% y por tanto resulta adecuada para estudiar la implicación funcional de GAPDH en mecanismos de reparación del DNA.
8. La cepa silenciada presenta una menor supervivencia frente a la exposición a BM y MMS que la cepa control.
9. No se observan diferencias en la viabilidad entre la cepa silenciada y la cepa control frente al tratamiento con peróxido de hidrógeno. En estas condiciones GAPDH es inactivada, lo que indica que la función de GAPDH en

los procesos de reparación del DNA *in vivo* depende del estado reducido de su Cys catalítica.

10. El mutante *knockout gapA* presenta en su genoma un mayor número de centros AP espontáneos que la cepa parental (1.5x), lo que involucra a GAPDH en la reparación de estas lesiones.
 11. La menor capacidad de reparación de centros AP en el mutante $\Delta gapA$ no va asociada a una menor disponibilidad de ATP en las condiciones y medios de cultivos ensayados.
 12. Ensayos de *Pull-down* seguidos de *Western Blot* evidencian la interacción de GAPDH con proteínas involucradas en procesos de reparación del DNA, en concreto la proteína SSB (*single stranded DNA binding protein*) y Endo IV, una de las AP-endonucleasas del sistema de reparación BER. No se ha observado interacción con las proteínas Exo III, AlkA, Tag, Ada y Ogt.
 13. Células deficientes o silenciadas en GAPDH presentan una morfología filamentosa en cultivos en fase estacionaria, fenotipo compatible con la inhibición de la replicación por acúmulo de mutaciones no reparadas cuando hay déficit de GAPDH.
- Respecto al estudio de la interacción de GAPDH con CesT, chaperona que participa en la secreción de proteínas efectoras a través del sistema T3SS:
14. Los parámetros cinéticos del complejo GAPDH-CesT determinados mediante interferometría de biocapa ($K_D=560$ nM y $K_{off}=0,0015$ s⁻¹) indican que la interacción entre ambas proteínas es fuerte y la disociación del complejo lenta.
 15. El análisis *in silico* del extremo N-terminal de GAPDH muestra que esta proteína presenta en esta región (residuos 23-40) características estructurales conservadas en los efectores del T3SS implicadas en la unión a los centros hidrofóbicos de la chaperona.
 16. La formación de un complejo estable entre la chaperona CesT y GAPDH (en una conformación particular desplegada) es la base del mecanismo por el cual una fracción de GAPDH citosólica es dirigida hacia la maquinaria de translocación del T3SS para su secreción.

6

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

A

André, E., Bastide, L., Villain-Guillot, P., Latouche, J., Rouby, J., Leonetti, J. P. A multiwell assay to isolate compounds inhibiting the assembly of the prokaryotic RNA polymerase. *Assay Drug Dev Technol.* 2(6):629-35 (2004).

André, E., Bastide, L., Michaux-Charachon, S., Gouby, A., Villain-Guillot, P., Latouche, J., Bouchet, A., Gualtiéri, M., Leonetti, J. P. Novel synthetic molecules targeting the bacterial RNA polymerase assembly. *J Antimicrob Chemother.* 57(2):245-51 (2006).

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

Aguilera, L., Ferreira, E., Giménez, R., Fernández, F. J., Taulés, M., Aguilar, J., Vega, M. C., Badia, J., Baldomà, L. Secretion of the housekeeping protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by the LEE-encoded type III secretion system in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Int J Biochem Cell Biol.* 44(6):955-62 (2012).

Altieri, F., Grillo, C., Maceroni, M., Chichiarelli, S. DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal.* 10(5):891-937 (2008).

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-402 (1997).

Arenson, T. A., Tsodikov, O. V., Cox, M. M. Quantitative analysis of the kinetics of end-dependent disassembly of RecA filaments from ssDNA. *J Mol Biol.* 288(3):391-401 (1999).

Arifuzzaman, M., Maeda, M., Itoh, A., Nishikata, K., Takita, C., Saito, R., Ara, T., Nakahigashi, K., Huang, H. C., Hirai, A., Tsuzuki, K., Nakamura, S., Altaf-Ul-Amin, M., Oshima, T., Baba, T., Yamamoto, N., Kawamura, T., Ioka-Nakamichi, T., Kitagawa, M., Tomita, M., Kanaya, S., Wada, C., Mori, H. Large-scale identification of protein-protein interaction of *Escherichia coli* K-12. *Genome Res.* 16(5):686-91 (2006).

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. Current protocols in molecular biology. Ed. John Wiley & Sons, New York (1991).

Azam, S., Jouvét, N., Jilani, A., Vongsamphanh, R., Yang, X., Yang, S., Ramotar, D. Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase plays a direct role in reactivating oxidized forms of the DNA repair enzyme APE1. *J Biol Chem.* 283(45):30632-41 (2008).

B

- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., Mori, H.** Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol.* 2:2006.0008 (2006).
- Benson, D. A., Boguski, M. S., Lipman, D. J., Ostell, J., Ouellette, B. F., Rapp, B. A., Wheeler, D. L.** GenBank. *Nucleic Acids Res.* 27(1):12-7 (1999).
- Bertani, G.** Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *J Bacteriol.* 186(3):595-600 (2004).
- Bianco, P. R., Tracy, R. B., Kowalczykowski, S. C.** DNA strand exchange proteins: a biochemical and physical comparison. *Front Biosci.* 3:D570-603 (1998).
- Birtalan, S. C., Phillips, R. M., Ghosh, P.** Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Mol Cell.* 9(5):971-80 (2002).
- 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.* 73(10):6237-48 (2005).
- Boronat, A., Aguilar, J.** Rhamnose-induced propanediol oxidoreductase in *Escherichia coli*: purification, properties, and comparison with the fucose-induced enzyme. *J Bacteriol.* 140(2):320-6 (1979).
- Bowater, R., Doherty, A. J.** Making ends meet: repairing breaks in bacterial DNA by non-homologous end-joining. *PLoS Genet.* 2(2):e8 (2006).
- Brinkkötter, A., Shakeri-Garakani, A., Lengeler, J. W.** Two class II D-tagatose-bisphosphate aldolases from enteric bacteria. *Arch Microbiol.* 177(5):410-9 (2002).
- Brown, E. J.** The molecular basis of streptococcal toxic shock syndrome. *N Engl J Med.* 350(20):2093-4 (2004).
- Brüne, B., Lapetina, E. G.** Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a target for nitric oxide signaling. *Adv Pharmacol.* 34:351-60 (1995).
- Buettner, M. J., Spitz, E., Rickenberg, H. V.** Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 114(3):1068-73 (1973).
- Butland, G., Peregrín-Alvarez, J. M., Li, J., Yang, W., Yang, X., Canadien, V., Starostine, A., Richards, D., Beattie, B., Krogan, N., Davey, M., Parkinson, J., Greenblatt, J., Emili, A.** Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature.* 433(7025):531-7 (2005).

C

Cabiscol, E., Ros, J. Redox proteomics. From protein modifications to cellular dysfunction and diseases. Oxidative damage to proteins structural modifications and consequences in cell function. *John Wiley & Sons, Inc.* New Jersey, USA. 399-454 (2006).

Carpenter, E. P., Corbett, A., Thomson, H., Adacha, J., Jensen, K., Bergeron, J., Kasampalidis, I., Exley, R., Winterbotham, M., Tang, C., Baldwin, G. S., Freemont, P. AP endonuclease paralogues with distinct activities in DNA repair and bacterial pathogenesis. *EMBO J.* 26(5):1363-72 (2007).

Casadaban, M. J. Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol.* 104(3):541-55 (1976).

Clauson, C. L., Oestreich, K. J., Austin, J. W., Doetsch, P. W. Abasic sites and strand breaks in DNA cause transcriptional mutagenesis in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(8):3657-62 (2010).

Cunningham, R. P., Saporito, S. M., Spitzer, S. G., Weiss, B. Endonuclease IV (*nfo*) mutant of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 168(3): 1120-1127 (1986).

D

Dabrowski, S., Olszewski, M., Piatek, R., Brillowska-Dabrowska, A., Konopa, G., Kur, J. Identification and characterization of single-stranded-DNA-binding proteins from *Thermus thermophilus* and *Thermus aquaticus* - new arrangement of binding domains. *Microbiology.* 148(Pt 10):3307-15 (2002).

Dean, P., Kenny, B. The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Curr Opin Microbiol.* 12(1):101-9 (2009).

Demple, B., Harrison, L. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem.*63:915-48 (1994).

Deng, W., Li, Y., Hardwidge, P. R., Frey, E. A., Pfuetzner, R. A., Lee, S., Gruenheid, S., Strynakda, N. C., Puente, J. L., Finlay, B. B. Regulation of type III secretion hierarchy of translocators and effectors in attaching and effacing bacterial pathogens. *Infect Immun.* 73(4):2135-46 (2005).

Deng, W., de Hoog, C. L., Yu, H. B., Li, Y., Croxen, M. A., Thomas, N. A., Puente, J. L., Foster, L. J., Finlay, B. B. A comprehensive proteomic analysis of the type III secretome of *Citrobacter rodentium*. *J Biol Chem.* 285(9):6790-800 (2010).

Desvaux, M., Hébraud, M., Talon, R., Henderson, I. R. Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends Microbiol.* (4):139-45 (2009).

Deuerling, E., Schulze-Specking, A., Tomoyasu, T., Mogk, A., Bukau, B. Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. *Nature*. 400(6745):693-6 (1999).

Deuerling, E., Patzelt, H., Vorderwülbecke, S., Rauch, T., Kramer, G., Schaffitzel, E., Mogk, A., Schulze-Specking, A., Langen, H., Bukau, B. Trigger Factor and DnaK possess overlapping substrate pools and binding specificities. *Mol Microbiol*. 47(5):1317-28 (2003).

Dianov, G. L., Sleeth, K. M., Dianova, I. I., Allinson, S. L. Repair of abasic sites in DNA. *Mutat Res*. 531(1-2):157-63 (2003).

E

Eaton, P., Wright, N., Hearse, D. J., Shattock, M. J. Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase oxidation during cardiac ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 34(11):1549-60 (2002).

Egea, L., Aguilera, L., Giménez, R., Sorolla, M. A., 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*. 39(6):1190-203 (2007).

Elliott, T. A method for constructing single-copy *lac* fusions in *Salmonella typhimurium* and application to the *hemA-prfA* operon. *J Bacteriol*. 174(1): 245-53 (1992).

F

Fortini, P., Dogliotti, E. Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA Repair (Amst)*. 6(4):398-409 (2007).

Furukohri, A., Nishikawa, Y., Tatsumi Akiyama, M., Maki, H. Interaction between *Escherichia coli* DNA polymerase IV and single-stranded DNA-binding protein is required for DNA synthesis on SSB-coated DNA. *Nucleic Acids Res*. 40(13):6039-48 (2012).

G

Ganter, C., Plückthun, A. Glycine to alanine substitutions in helices of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: effects on stability. *Biochemistry*. 29(40):9395-402 (1990).

Giloni, L., Takeshita, M., Johnson, F., Iden, C., Grollman, A. P. Bleomycin-induced strand-scission of DNA. Mechanism of deoxyribose cleavage. *J Biol Chem*. 256(16):8608-15 (1981).

Golan, G., Ishchenko, A. A., Khassenov, B., Shoham, G., Saparbaev, M. K. Coupling of the nucleotide incision and 3'→5' exonuclease activities in *Escherichia coli* endonuclease IV: Structural and genetic evidences. *Mutat Res.* 685(1-2):70-9 (2010).

Goldberg, R. B., Bender, R. A., Streicher, S. L. Direct selection for P1-sensitive mutants of enteric bacteria. *J Bacteriol.* 118(3):810-4 (1974).

Goodman, M. F. Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Biochem.* 71:17-50 (2002).

Green, J., Anjum, M. F., Guest, J. R. The *ndh*-binding protein (Nbp) regulates the *ndh* gene of *Escherichia coli* in response to growth phase and is identical to Fis. *Mol Microbiol.* 20(5):1043-55 (1996).

Green, J., Anjum, M. F., Guest, J. R. Regulation of the *ndh* gene of *Escherichia coli* by integration host factor and a novel regulator, Arr. *Microbiology.* 143 (Pt 9):2865-75 (1997).

Greenberg, J., Berends, L. J., Donch, J., Green, M. H. *exrB*: a *malB*-linked gene in *Escherichia coli* B involved in sensitivity to radiation and filament formation. *Genet Res.* 23(2):175-84 (1974).

Greenberg, J., Donch, J., Berends, L. The dominance of *exrB* over *exrB+* in heterodiploids of *Escherichia coli*. *Genet Res.* 25(1):39-44 (1975).

Greipel, J., Urbanke, C., Maass, G. The single-stranded DNA binding protein of *Escherichia coli*. Physicochemical properties and biological functions. In protein-nucleic acid interaction. *W. Saenger & U. Heinemann.* London: Macmillan. 61-86 (1989).

H

Hanahan, D. Techniques for transformation of *Escherichia coli* en "DNA cloning: a practical approach". Editado por Glover D. M. y Hames B. D. 2nd Edition. *IRL Press, Oxford* 1:1-35 (1995).

Hendriks, W., Mulders, J. W., Bibby, M. A., Slingsby, C., Bloemendal, H., de Jong, W. W. Duck lens epsilon-crystallin and lactate dehydrogenase B4 are identical: a single-copy gene product with two distinct functions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(19):7114-8 (1988).

Herzberg, C., Weidinger, L. A., Dörrbecker, B., Hübner, S., Stülke, J., Commichau, F. M. SPINE: A method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions *in vivo*. *Proteomics.* 7(22):4032-5 (2007).

Hodskinson, M. R., Allen, L. M., Thomson, D. P., Sayers, J. R. Molecular interactions of *Escherichia coli* ExoIX and identification of its associated 3'-5' exonuclease activity. *Nucleic Acids Res.* 35(12):4094-102 (2007).

Houry, W. A., Frishman, D., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Hartl, F. U. Identification of *in vivo* substrates of the chaperonin GroEL. *Nature.* 402(6758):147-54 (1999).

Huang, G. C., Li, Z. Y., Zhou, J. M., Fischer, G. Assisted folding of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by trigger factor. *Protein Sci.* 9(6):1254-61 (2000).

Huberts, D. H., van der Klei, I. J. Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking. *Biochim Biophys Acta.* 1803(4):520-5 (2010).

Hwang, N. R., Yim, S. H., Kim, Y. M., Jeong, J., Song, E. J., Lee, Y., Lee, J. H., Choi, S., Lee, K. J. Oxidative modifications of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase play a key role in its multiple cellular functions. *Biochem J.* 423(2):253-64 (2009).

I

Imlay, J. A., Chin, S. M., Linn, S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. *Science.* 240(4852):640-2 (1988).

Ivanov, I., Tainer, J. A., McCammon, J. A. Unraveling the three-metal-ion catalytic mechanism of the DNA repair enzyme endonuclease IV. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(5):1465-70 (2007).

Izoré, T., Job, V., Dessen, A. Biogenesis, regulation, and targeting of the type III secretion system. *Structure.* 19(5):603-12 (2011).

J

Janion, C., Sikora, A., Nowosielska, A., Grzesiuk, E. Induction of the SOS response in starved *Escherichia coli*. *Environ Mol Mutagen.* 40(2):129-33 (2002).

Janion, C., Sikora, A., Nowosielska, A., Grzesiuk, E. *E. coli* BW535, a triple mutant for the DNA repair genes *xth*, *nth*, and *nfo*, chronically induces the SOS response. *Environ Mol Mutagen.* 41(4):237-42 (2003).

Janion, C. Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. *Int J Biol Sci.* 4(6):338-44 (2008).

Jeffery, C. J. Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci.* 24(1):8-11 (1999).

Jeffery, C. J. Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks. *Trends Genet.* 19(8):415-7 (2003).

Jeffery, C. J. Moonlighting proteins--an update. *Mol Biosyst.* 5(4):345-50 (2009).

Jia, Y., Xue, L., Liu, H., Li, J. Characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene from the halotolerant alga *Dunaliella salina* and inhibition of its expression by RNAi. *Curr Microbiol.* 58(5):426-31(2009).

Jin, H., Song, Y. P., 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.* 350(1):27-41 (2005).

Jin, H., Agarwal, S., Agarwal, S., Pancholi, V. Surface export of GAPDH/SDH, a glycolytic enzyme, is essential for *Streptococcus pyogenes* virulence. *MBio*. 2(3):e00068-11 (2011).

Johnson, B. F. Two-dimensional electrophoretic analysis of the regulation of SOS proteins in three *ssb* mutants. *Arch Microbiol*. 138(2):106-12 (1984).

Justice, S. S., Hunstad, D. A., Cegelski, L., Hultgren, S. J. Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. *Nat Rev Microbiol*. 6(2):162-8 (2008).

K

Karimova, G., Dautin, N., Ladant, D. Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J Bacteriol*. 187(7):2233-43 (2005).

Kerins, S. M., Collins, R., McCarthy, T. V. Characterization of an endonuclease IV 3'-5' exonuclease activity. *J Biol Chem*. 278(5):3048-54 (2003).

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*. 104(6):1667-74 (2008a).

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*. 159(9-10):685-91 (2008b).

Kitagawa, M., Ara, T., Arifuzzaman, M., Ioka-Nakamichi, T., Inamoto, E., Toyonaga, H., Mori, H. Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res*. 12(5):291-9 (2005).

Kow, Y. W., Wallace, S. S. Exonuclease III recognizes urea residues in oxidized DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82(24):8354-8 (1985).

Krishna, S., Maslov, S., Sneppen, K. UV-induced mutagenesis in *Escherichia coli* SOS response: a quantitative model. *PLoS Comput Biol*. 3(3):e41 (2007).

Krokan, H. E., Standal, R., Slupphaug, G. DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem J*. 325(Pt 1): 1-16 (1997).

Krynetski, E. Y., Bianchi, M. E., Evans, W. E. A nuclear protein complex containing high mobility group proteins B1 and B2, heat shock cognate protein 70, ERp60, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in the cytotoxic response to DNA modified by incorporation of anticancer nucleoside analogues. *Cancer Res*. (1):100-6 (2003).

Kumar, J. K., Tabor, S., Richardson, C. C. Proteomic analysis of thioredoxin-targeted proteins in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(11):3759-64 (2004).

Kuo, M. H., David, A. *In vivo* cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods*. 19(3):425-33 (1999).

Kuzminov, A. Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiol Mol Biol Rev*. 63(4):751-813 (1999).

L

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259):680-5 (1970).

Landini, P., Volkert, M. R. Regulatory responses of the adaptive response to alkylation damage: a simple regulon with complex regulatory features. *J Bacteriol*. 182(23):6543-9 (2000).

Lane, D., Prentki, P., Chandler, M. Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions. *Microbiol Rev*. 56(4):509-28 (1992).

Leichert, L. I., Gehrke, F., Gudiseva, H. V., Blackwell, T., Ilbert, M., Walker, A. K., Strahler, J. R., Andrews, P. C., Jakob, U. Quantifying changes in the thiol redox proteome upon oxidative stress *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(24):8197-202 (2008).

Levin, J. D., Johnson, A. W., Demple, B. Homogeneous *Escherichia coli* endonuclease IV. Characterization of an enzyme that recognizes oxidative damage in DNA. *J Biol Chem*. 263(17):8066-71 (1988).

Levin, J. D., Demple, B. *In vitro* detection of endonuclease IV-specific DNA damage formed by bleomycin *in vivo*. *Nucleic Acids Res*. 24(5):885-9 (1996).

Lindahl, T., Sedgwick, B., Sekiguchi, M., Nakabeppu, Y. Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents. *Annu Rev Biochem*. 57:133-57 (1988).

Lindner, P., Bauer, K., Krebber, A., Nieba, L., Kremmer, E., Krebber, C., Honegger, A., Klinger, B., Mocikat, R., Plückthun, A. Specific detection of his-tagged proteins with recombinant anti-His tag scFv-phosphatase or scFv-phage fusions. *Biotechniques*. 22(1):140-9 (1997).

Liu, Y., Prasad, R., Beard, W. A., Kedar, P. S., Hou, E. W., Shock, D. D., Wilson, S. H. Coordination of steps in single-nucleotide base excision repair mediated by apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 and DNA polymerase β . *J Biol Chem*. 282(18):13532-41 (2007).

Liu, C. P., Zhou, Q. M., Fan, D. J., Zhou, J. M. PPIase domain of trigger factor acts as auxiliary chaperone site to assist the folding of protein substrates bound to the crevice of trigger factor. *Int J Biochem Cell Biol*. 42(6):890-901 (2010).

Lottenberg, R., Broder, C. C., Boyle, M. D., Kain, S. J., Schroeder, B. L., Curtiss, R. 3rd. Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of a streptococcal plasmin receptor. *J Bacteriol*. 174(16):5204-10 (1992).

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1):265-75 (1951).

Luo, W., Donnenberg, M. S. Analysis of the function of enteropathogenic *Escherichia coli* EspB by random mutagenesis. *Infect Immun.* 74(2):810-20 (2006).

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.* 178(3):1379-87(2007).

Mai, D., Jones, J., Rodgers, J. W., Hartman, J. L., Kutsch, O., Steyn, A. J. A screen to identify small molecule inhibitors of protein-protein interactions in mycobacteria. *Assay Drug Dev Technol.* 9(3):299-310 (2011).

Marlovits, T. C., Kubori, T., Lara-Tejero, M., Thomas, D., Unger, V. M., Galán, J. E. Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome. *Nature.* 441(7093):637-40 (2006).

Matta, S. K., Agarwal, S., Bhatnagar, R. Surface localized and extracellular glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Bacillus anthracis* is a plasminogen binding protein. *Biochim Biophys Acta.* 1804(11):2111-20 (2010).

McDaniel, T. K., Kaper, J. B. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol Microbiol.* 23(2):399-407 (1997).

McKenzie, G. J., Harris, R. S., Lee, P. L., Rosenberg, S. M. The SOS response regulates adaptive mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(12):6646-51(2000).

Meyer, R. R., Laine, P. S. The single-stranded DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.* 54(4):342-80 (1990).

Meyer-Siegler, K., Mauro, D. J., Seal, G., Wurzer, J., de Riel, J. K., Sirover, M. A. A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(19):8460-4 (1991).

Miller, J. H. Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York* (1972).

Mol, C. D., Hosfield, D. J., Tainer, J. A. A basic site recognition by two apurinic/apyrimidinic endonuclease families in DNA base excision repair: the 3' ends justify the means. *Mutat Res.* 460(3-4):211-29 (2000).

Morita, R., Nakane, S., Shimada, A., Inoue, M., Iino, H., Wakamatsu, T., Fukui, K., Nakagawa, N., Masui, R., Kuramitsu, S. Molecular mechanisms of the whole DNA repair system: A comparison of bacterial and eukaryotic systems. *J Nucleic Acids.* 179594 (2010).

Motta, E. S., Souza-Santos, P. T., Cassiano, T. R., Dantas, F. J., Caldeira-de-Araujo, A., De Mattos, J. C. Endonuclease IV is the main base excision repair enzyme involved in DNA damage induced by UVA radiation and stannous chloride. *J Biomed Biotechnol.* 2010:376218 (2010).

N

Nakashima, N., Tamura, T., Good, L. Paired termini stabilize antisense RNAs and enhance conditional gene silencing in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 34(20):e138 (2006).

Nakashima, N., Tamura, T. Conditional gene silencing of multiple genes with antisense RNAs and generation of a mutator strain of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 37(15):e103 (2009).

Naseem, R., Wann, K. T., Holland, I. B., Campbell, A. K. ATP regulates calcium efflux and growth in *E. coli*. *J Mol Biol.* 391(1):42-56 (2009).

O

O'Connell, C. B., Creasey, E. A., Knutton, S., Elliott, S., Crowther, L. J., Luo, W., Albert, M. J., Kaper, J. B., Frankel, G., Donnenberg, M. S. SepL, a protein required for enteropathogenic *Escherichia coli* type III translocation, interacts with secretion component SepD. *Mol Microbiol.* 52(6):1613-25 (2004).

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.* 189(15):5534-41 (2007).

Ogden, S., Haggerty, D., Stoner, C. M., Kolodrubetz, D., Schleif, R. The *Escherichia coli* L-arabinose operon: binding sites of the regulatory proteins and a mechanism of positive and negative regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77(6):3346-50 (1980).

Ostrovsky de Spicer, P., Maloy, S. PutA protein, a membrane-associated flavin dehydrogenase, acts as a redox-dependent transcriptional regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(9):4295-8 (1993).

P

Page, A. L., Parsot, C. Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. *Mol Microbiol.* 46(1):1-11 (2002).

Pancholi, V., Fischetti, V. A. A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with multiple binding activity. *J Exp Med.* 176(2):415-26 (1992).

Pancholi, V., Chhatwal, G. S. Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. *Int J Med Microbiol.* 293(6):391-401 (2003).

Parsot, C., Hamiaux, C., Page, A. L. The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr Opin Microbiol.* 6(1):7-14 (2003).

Patterson, R. L., van Rossum, D. B., Kaplin, A. I., Barrow, R. K., Snyder, S. H. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/GAPDH complex augments Ca²⁺ release via locally derived NADH. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(5):1357-9 (2005).

Pellicer, M., Nuñez, M., Aguilar, J., Badia, J., Baldoma, L. Role of 2-phosphoglycolate phosphatase of *Escherichia coli* in metabolism of the 2-phosphoglycolate formed in DNA repair. *J Bacteriol.* 185(19):5815-21 (2003).

Povirk L. F. DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes. *Mutat Res.* 355(1-2):71-89 (1996).

Q

Qin, H., Wang, Y. Exploring DNA-binding proteins with *in vivo* chemical cross-linking and mass spectrometry. *J Proteome Res.* (4):1983-91 (2009).

R

Rebeck, G. W., Samson, L. Increased spontaneous mutation and alkylation sensitivity of *Escherichia coli* strains lacking the *ogt* O⁶-methylguanine DNA repair methyltransferase. *J Bacteriol.* 173(6):2068-76 (1991).

Rippa, V., Amoresano, A., Esposito, C., Landini, P., Volkert, M., Duilio, A. Specific DNA binding and regulation of its own expression by the AidB protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 192(23):6136-42 (2010).

Rodríguez-Montelongo, L., Volentini, S. I., Farías, R. N., Massa, E. M., Rapisarda, V. A. The Cu(II)-reductase NADH dehydrogenase-2 of *Escherichia coli* improves the bacterial growth in extreme copper concentrations and increases the resistance to the damage caused by copper and hydroperoxide. *Arch Biochem Biophys.* 451(1):1-7 (2006).

S

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239(4839):487-91 (1988).

Sambrook, J., Rusell, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd edition. *Ed. Cold Spring Harbor Laboratory.* Cold Spring Harbor, New York (2001).

- Sánchez, B., Bressollier, P., Urdaci, M. C.** Exported proteins in probiotic bacteria: adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular cross-talking with the host. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 54(1):1-17 (2008).
- Sánchez, B., Schmitter, J. M., Urdaci, M. C.** Identification of novel proteins secreted by *Lactobacillus plantarum* that bind to mucin and fibronectin. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 17(3):158-62 (2009a).
- Sánchez, B., Schmitter, J. M., Urdaci, M. C.** Identification of novel proteins secreted by *Lactobacillus rhamnosus* GG grown in de Mann-Rogosa-Sharpe broth. *Lett Appl Microbiol.* 48(5):618-22 (2009b).
- Sander, M., Ramotar, D.** Partial purification of Pde1 from *Saccharomyces cerevisiae*: enzymatic redundancy for the repair of 3'-terminal DNA lesions and abasic sites in yeast. *Biochemistry.* 36(20):6100-6 (1997).
- Sandigursky, M., Franklin, W. A.** Exonuclease IX of *Escherichia coli* removes 3' phosphoglycolate end groups from DNA. *Radiat Res.* 150(6):609-11 (1998).
- Saget, B. M., Walker, G. C.** The Ada protein acts as both a positive and a negative modulator of *Escherichia coli*'s response to methylating agents. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(21):9730-4 (1994).
- Saporito, S. M., Cunningham, R. P.** Nucleotide sequence of the *nfo* gene of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 170(11):5141-5 (1988).
- Saporito, S. M., Smith-White, B. J., Cunningham, R. P.** Nucleotide sequence of the *xth* gene of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 170(10):4542-7 (1988).
- Sarkar, N., Lemaire, S., Wu-Scharf, D., Issakidis-Bourguet, E., Cerutti, H.** Functional specialization of *Chlamydomonas reinhardtii* cytosolic thioredoxin h1 in the response to alkylation-induced DNA damage. *Eukaryot Cell.* 4(2):262-73 (2005).
- Schäferjohann, J., Yoo, J. G., Kusian, B., Bowien, B.** The *cbb* operons of the facultative chemoautotroph *Alcaligenes eutrophus* encode phosphoglycolate phosphatase. *J Bacteriol.* 175(22):7329-40 (1993).
- Schärer, O. D.** Chemistry and biology of DNA repair. *Angew Chem Int Ed Engl.* 42(26):2946-74 (2003).
- Schaumburg, J., Diekman, O., Hagendorf, P., Bergmann, S., Rodhe, M., Hammerschmidt, S.** The cell wall proteome of *Listeria monocytogenes*. *Proteomics.* 4(10):2991-3006 (2004).
- Schlacher, K., Pham, P., Cox, M. M., Goodman, M. F.** Roles of DNA polymerase V and RecA protein in SOS damage-induced mutation. *Chem Rev.* 106(2):406-19 (2006).
- Schleif, R.** AraC protein, regulation of the L-arabinose operon in *Escherichia coli*, and the light switch mechanism of AraC action. *FEMS Microbiol Rev.* 34(5):779-96 (2010).

- Schurig-Briccio, L. A., Rintoul, M. R., Volentini, S. I., Farías, R. N., Baldomà, L., Badía, J., Rodríguez-Montelongo, L., Rapisarda, V. A.** A critical phosphate concentration in the stationary phase maintains *ndh* gene expression and aerobic respiratory chain activity in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 284(1):76-83 (2008).
- Sedgwick, B.** Repairing DNA-methylation damage *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(2):148-57 (2004).
- Sedgwick, B., Bates, P. A., Paik, J., Jacobs, S. C., Lindahl, T.** Repair of alkylated DNA: recent advances *DNA Repair (Amst).* 6(4):429-42 (2007).
- Seifert, K. N., McArthur, W. P., Bleweis, A. S., Brady, J.** Characterization of group B streptococcal gliceradehyde-3-phosphate dehydrogenase: Surface localization, enzymatic activity, and protein-protein interactions. *Can J of Microbiol.* 49(5):350-56 (2003).
- Shafritz, K. M., Sandigursky, M., Franklin, W. A.** Exonuclease IX of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 26(11):2593-7 (1998).
- Shakhnovich, E. A., Hung, D. T., Pierson, E., Lee, K., Mekalanos, J. J.** Virstatin inhibits dimerization of the transcriptional activator ToxT. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(7):2372-7. (2007).
- Sikora, A., Mielecki, D., Chojnacka, A., Nieminuszczy, J., Wrzesinski, M., Grzesiuk, E.** Lethal and mutagenic properties of MMS-generated DNA lesions in *Escherichia coli* cells deficient in BER and AlkB-directed DNA repair. *Mutagenesis.* 25(2):139-47 (2010).
- Simons, R. W., Houman, F., Kleckner, N.** Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene.* 53(1):85-96 (1987).
- Sinz, A.** Investigation of protein-protein interactions in living cells by chemical crosslinking and mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 397(8):3433-40 (2010).
- Sirover, M. A.** New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta.* 1432(2):159-84 (1999).
- Sirover, M. A.** New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. *J Cell Biochem.* 95(1):45-52 (2005).
- Sirover, M. A.** On the functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: biochemical mechanisms and regulatory control. *Biochim Biophys Acta.* 1810(8):741-51 (2011).
- Southern, J. A., Young, D. F., Heaney, F., Baumgärtner, W. K., Randall, R. E.** Identification of an epitope on the P and V proteins of simian virus 5 that distinguishes between two isolates with different biological characteristics. *J Gen Virol.* 72 (Pt 7):1551-7 (1991).
- Stebbins, C. E., Galán, J. E.** Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature.* 414(6859):77-81 (2001).

Stebbins, C. E., Galán, J. E. Priming virulence factors for delivery into the host. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(9):738-43 (2003).

Sutherland, B. W., Toews, J., Kast, J. Utility of formaldehyde cross-linking and mass spectrometry in the study of protein-protein interactions. *J mass Spectrom.* 43(6):699-715 (2008).

T

Taga, M. E. Bacterial signal destruction. *ACS Chem Biol.* 2(2):89-92 (2007).

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.* 281(20):14215-23 (2006).

Thomas, N. A., Deng, W., Puente, J. L., Frey, E. A., Yip, C. K., Strynadka, N. C., Finlay, B. B. CesT is a multi-effector chaperone and recruitment factor required for the efficient type III secretion of both LEE- and non-LEE-encoded effectors of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 57(6):1762-79 (2005).

Thomas, N. A., Deng, W., Baker, N., Puente, J., Finlay, B. B. Hierarchical delivery of an essential host colonization factor in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 282(40):29634-45 (2007).

Trewick, S. C., Henshaw, T. F., Hausinger, R. P., Lindahl, T., Sedgwick, B. Oxidative demethylation by *Escherichia coli* AlkB directly reverts DNA base damage. *Nature.* 419(6903):174-8 (2002).

Tsao, D. H., Sutherland, A. G., Jennings, L. D., Li, Y., Rush, T. S. 3rd., Alvarez, J. C., Ding, W., Dushin, E. G., Dushin, R. G., Haney, S. A., Kenny, C. H., Malakian, A. K., Nilakantan, R., Mosyak, L. Discovery of novel inhibitors of the ZipA/FtsZ complex by NMR fragment screening coupled with structure-based design. *Bioorg Med Chem.* 14(23):7953-61 (2006).

V

Vasilescu, J., Xuecui, G., Kast, J. Identification of protein-protein interactions using *in vivo* cross-linking and mass spectrometry. *Proteomics.* 4(12):3845-54 (2004).

W

Walker, G. C. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.* 48(1):60-93 (1984).

Wistow, G. J., Lietman, T., Williams, L. A., Stapel, S. O., de Jong, W. W., Horwitz, J., Piatigorsky, J. Tau-crystallin/alpha-enolase: one gene encodes both an enzyme and a lens structural protein. *J Cell Biol.* 107(6 Pt 2):2729-36 (1988).

Wyatt, M. D., Pittman, D. L. Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. *Chem Res Toxicol.* 19(12):1580-94 (2006).

X

Xavier, K. B., Miller, S. T., Lu, W., Kim, J. H., Rabinowitz, J., Pelczar, I., Semmelhack, M. F., Bassler, B. L. Phosphorylation and processing of the quorum-sensing molecule autoinducer-2 in enteric bacteria. *ACS Chem Biol.* 2(2):128-36 (2007).

Xu, Y. J., Kim, E. Y., Demple, B. Excision of C-4'-oxidized deoxyribose lesions from double-stranded DNA by human apurinic/apyrimidinic endonuclease (Ape1 protein) and DNA polymerase beta. *J Biol Chem.* 273(44):28837-44 (1998).

Xu, T., Brown, W., Marinus, M. G. Bleomycin sensitivity in *Escherichia coli* is medium-dependent. *PLoS One.* 7(3):e33256 (2012).

Y

Yamamoto, N., Nakahigashi, K., Nakamichi, T., Yoshino, M., Takai, Y., Touda, Y., Furubayashi, A., Kinjyo, S., Dose, H., Hasegawa, M., Datsenko, K. A., Nakayashiki, T., Tomita, M., Warner, B. L., Mori, H. Update on the Keio collection of *Escherichia coli* single-gene deletion mutants. *Mol Syst Biol.* 5:335 (2009).

Yun, M., Park, C. G., Kim, J. Y., Park, H. W. Structural analysis of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli*: direct evidence of substrate binding and cofactor-induced conformational changes. *Biochemistry.* 39(35):10702-10 (2000).

Z

Zoraghi, R., See, R. H., Axerio-Cilies, P., Kumar, N. S., Gong, H., Moreau, A., Hsing, M., Kaur, S., Swayze, R. D., Worrall, L., Amandoron, E., Lian, T., Jackson, L., Jiang, J., Thorson, L., Labriere, C., Foster, L., Brunham, R. C., McMaster, W. R., Finlay, B. B., Strynadka, N. C., Cherkasov, A., Young, R. N., Reiner, N. E. Identification of pyruvate kinase in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a novel antimicrobial drug target. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(5):2042-53 (2011).

7

ANEXO

ANEXO.1: OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS COMO CEBADORES

Cebadores empleados en el estudio del promotor *ndh*

Cebadores	Secuencias
<i>ndh</i> Fw (Sonda para EMSA) (-220)	CAGTCGAGCATCAATGCCTG
<i>ndh</i> Rv (Sonda para EMSA)(-20)	AATGGTGCATTGGTCATACC
<i>ndh</i> Fw ϕ (<i>ndh::lacZ</i>) (-254)	GCTGAATTCGTGGGTCGGAT
<i>ndh</i> Rv ϕ (<i>ndh::lacZ</i>) (+129)	GCTGGATCCGCCGACAATCAC

Cebadores empleados en el doble híbrido

Cebadores	Secuencias
<i>gapA</i> (pKNT25/pUT18) Fw	ATTGGATCCACTATCAAAGTAGGTATCAACGG
<i>gapA</i> (pKT25/pKT18C) Fw	TGAGGATCCCATGACTATCAAAGTAGGTATCAAC
<i>gapA</i> (pKNT25) Rv	GTGGAATTCGATTTGGAGATGTGAGTGATCAGGT
<i>gapA</i> (pKT25) Rv	GTGGAATTCATTATTTGGAGATGTGAGTGATCAGGT
<i>gapA</i> (pUT18) Rv	GGGGAATTCGATTTGGAGATGTGAGCGATCAGGT
<i>gapA</i> (pUT18C) Rv	GTCGAATTCATTATTTGGAGATGTGAGCGATCAGGT
<i>pykF</i> (pUT18) Fw	TAAAGGATCCCTCCAGAAGGCTTCGCAGAAC
<i>pykF</i> (pUT18) Rv	AAGGAATTCCTACTCTACCGTTAAAATACGC
<i>rbsB</i> (pUT18) Fw	TAGGGATCCAAAAAACTGGCTACCCTGGTTTC
<i>rbsB</i> (pUT18) Rv	TTCGAATTCGCTGCTTAACAACCAGTTTCAGATC
<i>tufA</i> (pUT18C) Fw	CAGGGATCCCGTGTCTAAAGAAAAATTTGAACGTAC
<i>tufA</i> (PUT18C) Rv	ATTGAATTCCTAGCCCAGAACTTTAGCAACAACGC
pKNT25/pUT18 Fw	GAGTTAGCTCACTCAATTAGG
pKNT25 Rv	ATGTGGCGTTTTTTTTCTTC
pUT18 Rv	TCGTAGCGGAACTGGCGTCG
pKT25 Fw	CGACATGTTCCGCCATTATGC
pKT25 Rv	CTCTTGGCTATTACGCCAGC
pUT18C Fw	TGGGCTGGGAGCCGCGCCCG
pUT18C Rv	ATGCCGGGAGCAGACAAGCC

Cebadores empleados para el clonaje de genes en vectores de expresión (pGEX-3x y pQE30)

Cebadores	Secuencias
<i>ogt</i> Fw	GAGGGATCCAGATGCTGAGATTAAGGAAAAAATTGC
<i>ogt</i> Rv	GCCGAATTCCTACAGCAAAAGATAACCTTCATG
<i>pykF</i> Fw	TAAAGGATCCCTCCAGAAGGCTTCGCAGAAC
<i>pykF</i> Rv	AAGAAGCTTTACTCTACCGTTAAAATACGC
<i>tnaA</i> Fw	AGCGGATCCGAAAACTTTAAACATCTCCCTGAACC
<i>tnaA</i> Rv	AGCAAGCTTTTAAACTTCTTTAAGTTTTGCGGTGAAG
<i>xthA</i> Fw	CGCGGATCCAAATTTGTCTCTTTTAATAT
<i>xthA</i> Rv	TGTAAGCTTTTAGCGGCGGGAAGGTCG

Cebadores empleados para la obtención del RNA antisentido para *gapA*

Cebadores	Secuencias
RNA Antisense (-76+86) Fw	CCGCTCGAGGGCACAGGATTGATTTGTCTG
RNA Antisense (-76+86) Rv	CATGCCATGGACAATGCGACCGATACGGCC
RNA Antisense (-97+70) Fw	CCGCTCGAGGAGTCAGTCGCGTAATGCTTAGG
RNA Antisense (-97+70) Rv	CATGCCATGGGGCCAAAACCGTTGATACCTAC

Varios

Cebadores

M13
pGEX1
pGEX2
pQE30 Fw
pQE30 Rv
T7
SP6

Secuencias

AGTAAAACGACGGCCAGT
GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG
GCGGTATCACGAGGCCTTTCG
CATTACTGGATCTATCAACAGG
TAATACGACTCACTATAGGG
TAAATCCACTGTGATATCTT

8

PUBLICACIONES



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biocel

Secretion of the housekeeping protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by the LEE-encoded type III secretion system in enteropathogenic *Escherichia coli*

Laura Aguilera^a, Elaine Ferreira^a, Rosa Giménez^a, Francisco José Fernández^b, Marta Taulés^c, Juan Aguilar^a, M. Cristina Vega^b, Josefa Badia^a, Laura Baldomà^{a,*}

^a Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

^b Structural and Quantitative Biology Department, Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain

^c Scientific and Technological Centres, Universitat de Barcelona, Baldiri Reixac, 10-12, 08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 November 2011

Received in revised form 2 March 2012

Accepted 2 March 2012

Available online xxx

Keywords:

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Protein secretion
T3SS effector
Chaperone CesT
Escherichia coli

ABSTRACT

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a multifunctional housekeeping protein secreted by pathogens and involved in adhesion and/or virulence. Previously we reported that enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* secrete GAPDH into the culture medium. This bacterial protein binds human plasminogen and fibrinogen and remains associated with Caco-2 cells upon infection. In these pathogens, GAPDH secretion is not linked to outer membrane vesicles and depends on growth conditions, although the secretion mechanism is still unknown. EPEC is an attaching and effacing pathogen able to secrete and translocate multiple effector proteins into infected cells through a type III secretion system (T3SS). The secretion process is often dependent on a bacterial chaperone. The chaperone CesT displays broad substrate specificity and plays a central role in the recruitment of multiple type III effectors to the T3SS apparatus. Here we provide genetic evidences on GAPDH secretion through T3SS by EPEC grown in DMEM. Secretion of GAPDH is increased in $\Delta sepD$ mutants and abolished in mutants defective in the type III ATPase EscN. Complementation with *escN* gene restores GAPDH secretion. In addition, we prove by means of pull down experiments, overlay immunoblotting and biolayer interferometry a novel interaction between GAPDH and the chaperone CesT. This interaction, which is strong and slow dissociating, may stabilize a population of GAPDH molecules in a secretion competent-state and target them to the type III secretion apparatus. This is the first description of CesT interaction with a housekeeping protein and its export through T3SS.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, EC 1.2.1.12), a key enzyme in the glycolytic pathway, is considered

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; BLI, biolayer interferometry; EHEC, enterohemorrhagic *Escherichia coli*; EPEC, enteropathogenic *Escherichia coli*; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EDC, N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GST, glutathione-S-transferase; IPTG, isopropyl- β -thiogalactoside; LB, Luria-Bertani broth; LEE, locus of enterocyte effacement; MES, 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid; NHS, N-hydroxysuccinimide ester; NTA, nitrilotriacetic acid; PVDF, polyvinylidene difluoride; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; TCA, trichloroacetic acid; T3SS, type III secretion system.

* Corresponding author at: Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 643, E-08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 934034496; fax: +34 934024520.

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

a multifunctional protein involved in numerous cellular processes in mammalian cells (reviewed in Sirover, 2005, 2011). In bacteria, non-glycolytic GAPDH functions have been associated with its extracellular location. GAPDH is one of the housekeeping proteins secreted by pathogens that interact with different host components, being involved in adhesion and/or virulence (Alvarez-Dominguez et al., 2008; Jin et al., 2005; Lama et al., 2009; Pancholi and Chhatwal, 2003; Schaumburg et al., 2004; Seifert et al., 2003; Terao et al., 2006).

In Gram-negative pathogens, GAPDH was shown to be secreted into the medium in a soluble and active form by enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC). In these pathogens, secretion is not linked to outer membrane vesicles and depends on growth conditions. The protein is secreted at 37 °C by cells grown in LB or in eukaryotic culture media such as DMEM or Ham's F-12, but not in glucose-minimal medium (Egea et al., 2007). *E. coli* GAPDH binds human plasminogen and fibrinogen and remains associated with Caco-2 cells upon infection (Egea et al.,

2007). In addition, we have shown that the secreted protein can act as a target of oxidation and may therefore protect bacteria against host oxidative response (Aguilera et al., 2009).

Although descriptions of GAPDH on the surface of Gram-positive bacteria or yeast can be traced back more than 15 years, the mechanism that directs its secretion is still unknown. In Gram-negative bacteria eight major protein secretion systems have been described so far and named from T1SS to T8SS (Desvaux et al., 2009). The type III secretion system (T3SS) is a key determinant of virulence in many Gram-negative bacteria, including animal and plant pathogens. T3SS is a complex protein export apparatus composed of a multi-ring base, an inner rod and a protruding needle, which facilitates direct delivery of bacterial virulence proteins (effectors) into host cells (Izoré et al., 2011; Marlovits et al., 2006). T3SS effectors play important roles in infection by modulating or disrupting cellular structures and functions or host immune responses (reviewed by Dean and Keny, 2009).

EPEC and EHEC are members of a closely related family that intimately attach to intestinal epithelial cells and induce characteristic attaching and effacing (A/E) lesions on the host cell, causing diarrhea (Dean et al., 2005; Kaper et al., 2004). The A/E phenotype consists of the loss of microvilli and the accumulation of actin filaments and other cytoskeletal proteins beneath adherent bacteria. In EPEC, the ability to induce the A/E effects is encoded in a 41-gene pathogenicity island, called the locus of enterocyte effacement (LEE) (McDaniel and Kaper, 1997). The components of the type III secretion system are encoded in this locus together with associated transcriptional regulators, chaperones and effector proteins.

A large number of proteins are secreted by T3SS into culture media (Deng et al., 2010). These protein substrates can be divided into several categories based on their secretion hierarchy. Early substrates are components of the needle and inner rod. The needle complex secretes the LEE-encoded translocators EspA, EspB and EspD (intermediate substrates) before the effectors (late substrates). Translocators are needed for translocation of the effectors into host cells (Luo and Donnenberg, 2006). To date multiple type III effectors have been identified in EPEC, some of them are encoded within the LEE whereas others are encoded in distinct pathogenicity islands through the chromosome (reviewed by Dean and Keny, 2009). The secretion hierarchy of translocators and effectors is regulated by SepL and SepD (Deng et al., 2005; O'Connell et al., 2004).

Type III effectors from many pathogens usually have an associated chaperone that is not secreted (class I chaperones) (Izoré et al., 2011; Parsot et al., 2003). These chaperones are generally small soluble proteins (15–20 kDa) with an acidic pI that form

homodimers that bind to the amino-terminal region of effectors and remain in the bacterial cell after translocation of the effectors into the host cell. However, in many cases, chaperones are not absolutely required for effector secretion (Parsot et al., 2003). Chaperone–effector interactions occur mainly between secondary structured elements of the effector and hydrophobic patches present on the chaperone dimer (Parsot et al., 2003). Multiple roles have been attributed to these chaperones such as substrate stabilization, prevention of substrate premature interactions with other partners in the bacterial cytoplasm or regulation of virulence gene expression (Page and Parsot, 2002).

In EPEC, the LEE-encoded chaperone CesT was shown to interact with several type III effectors encoded within and outside the LEE pathogenicity island (Thomas et al., 2005, 2007). Through its interaction with the type III ATPase EscN, CesT promotes the recruitment of the cognate effectors to the T3SS apparatus for efficient secretion (Thomas et al., 2005).

Here we report that T3SS mediates GAPDH secretion in EPEC cells grown in DMEM. In addition, we provide experimental evidence on a novel interaction between GAPDH and the general T3SS chaperone CesT. This interaction may stabilize a small population of GAPDH molecules in a secretion competent-state and target them to the type III secretion apparatus. This is the first description on CesT interaction with a housekeeping protein and its export through T3SS.

2. Materials and methods

2.1.1. Bacterial strains and growth conditions

E. coli strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Bacterial cells were routinely grown at 37 °C in Luria–Bertani broth (LB). When indicated cells were grown without shaking at 37 °C in LB or Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) in a CO₂ incubator. Growth was monitored by measuring the optical density at 600 nm (OD₆₀₀). When indicated, 5 mM IPTG was added to the medium as inducer of chromosome encoded-*lacZ* expression. When required, ampicillin (100 µg/ml) or kanamycin (50 µg/ml) was added to the medium.

2.2. Protein secretion assays

Isolation of secreted proteins was performed as previously described (Egea et al., 2007). Briefly, overnight cultures in LB were diluted 1:50 in the indicated culture media and incubated

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^q lacZ</i> ΔM15 Tn10)	Stratagene
M15 [pREP4]	F ⁻ <i>Nal^s Str^r rif^s lac⁻ mtl⁻ recA⁻</i> [pREP4 Kan ^r]	Qiagen
E2348/69	Wild type EPEC O127:H6 Str ^r	B.B. Finlay
CVD452	E2348/69 <i>escN::aphA3</i>	Jarvis et al. (1995)
UMD864	E2348/69 Δ <i>espB</i>	Donnenberg et al. (1993)
Δ <i>escN</i>	Non-polar deletion of <i>escN</i> in EPEC E2348/69	Gauthier and Finlay (2003)
Δ <i>sepD</i>	Non-polar deletion of <i>sepD</i> in EPEC E2348/69	Deng et al. (2005)
Δ <i>cesT</i>	Non-polar deletion of <i>cesT</i> in EPEC E2348/69	Abe et al. (1999)
EcoR12	Human stool isolate	Ochman and Selander (1984)
EcoR26	Human stool isolate	Ochman and Selander (1984)
EcoR41	Human stool isolate	Ochman and Selander (1984)
Nissle 1917	Non-pathogenic probiotic isolate (O6:K5:H1)	Ardeypharm
Plasmids		
pCVD446	BglIII DNA fragment of strain E2348/69 containing <i>escN</i> in pHC79, Ap ^r	Jarvis et al. (1995)
pGEX-GapA	pGEX-3x expressing GST-GAPDH, Ap ^r	Egea et al. (2007)
pQE30	Vector for expression of N-terminal His ₆ -tag proteins, Ap ^r	Qiagen
pQE-CesT	pQE30 expressing His ₆ -CesT	This study

without shaking at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. After 6–8 h of growth (OD₆₀₀ of 0.8) bacteria were collected 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 h with 10% trichloroacetic acid (TCA). When indicated, 0.1% bovine serum albumin (BSA) was added to the filtered supernatant before TCA precipitation. 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). Collected bacteria were resuspended in loading buffer and kept for SDS-PAGE analysis.

2.3. DNA manipulation

Bacterial genomic DNA was obtained using the Wizard Genomic DNA purification kit (Promega), and plasmid DNA was prepared using the Wizard Plus SV Midipreps DNA purification system (Promega). DNA manipulations *in vitro* were performed according to standard protocols (Sambrook and Russell, 2001). DNA fragments were amplified by PCR using chromosomal DNA as template. When necessary, specific restriction sites were incorporated at the 5'-end of the primers to facilitate the cloning of the fragments in the appropriate vector. PCR reactions were performed with *Pfu* DNA polymerase in standard conditions. DNA was sequenced using an automated ABI 377 DNA sequencer and fluorescent dye termination methods.

To obtain a plasmid construct expressing His₆-CesT, the *cesT* gene was amplified by PCR using EPEC E2348/69 genomic DNA and primers CesT-pQE30-bam.fw (5'-CGC-GGATCCATGTCATCAAGATCTGAAC-3') and CesT-pQE30-hind.rv (5'-CGC-AAGCTTTTATCTCCGGCGTAATAATG-3') and cloned into BamHI/HindIII digested plasmid pQE30 (Qiagen), yielding pQE-CesT. Restriction sites incorporated at the 5'-end of the primers are underlined. The forward primer was designed to fuse the His₆-tag in frame with *cesT*. Plasmid DNA was sequenced to ensure that no mutations have been introduced during the amplification reaction.

2.4. Pull-down experiments with His₆-CesT

Overproduction of His₆-tagged CesT was achieved in transformed cells of strain M15 [pREP4] bearing the recombinant plasmid pQE-CesT after isopropyl-β-thiogalactoside (IPTG) induction (0.3 mM) in LB-ampicillin-kanamycin medium for 16 h at 37 °C. The protein was purified under native conditions with Ni²⁺-nitrilotriacetic acid (NTA) resin (Qiagen). Centrifugations were performed at 4 °C, and column chromatography was carried out at room temperature. The cell pellet from a 15 ml culture of strain M15 [pREP4] bearing plasmid pQE-CesT was suspended in 1 ml of 50 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0, containing 10 mM imidazole and 300 mM NaCl (binding buffer), and sonicated on ice. The cell lysate was centrifuged at 15,000 × g, and the supernatant was incubated with 0.1 ml of Ni²⁺-NTA resin for 1 h at 4 °C with gentle shaking. After loading the mixture into a column, the resin was washed with 50 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0, containing 20 mM imidazole and 300 mM NaCl (wash buffer).

Column-bound His₆-CesT was equilibrated with binding buffer, followed by the addition of 0.5 ml of an EPEC cell extract (10 mg/ml) in binding buffer obtained from cells grown in DMEM by sonic disruption as described above. The flow-through fraction was kept for analysis. The column was washed with 4 × 5 ml of wash buffer. A last 0.1 ml wash was performed and kept for gel analysis. Recombinant His₆-CesT and interacting proteins were then eluted with 0.1 ml of elution buffer (50 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0, containing 300 mM imidazole and 300 mM NaCl) followed by SDS-PAGE and immunoblotting analysis.

2.5. Immunoblotting analysis

For Western blot analysis, protein samples were separated on 10% SDS-PAGE and transferred to a HyBond-P polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane by using a Bio-Rad MiniTransblot apparatus. Equal numbers of bacteria were used to prepare samples (whole cell lysates or secreted proteins) for analysis. The membrane was blocked in PBS-0.05% Tween-20 and 5% skimmed milk (blocking solution) for 1 h at room temperature, and then incubated with specific antibodies against GAPDH (1:5000 dilution in blocking solution) (Egea et al., 2007) or with antibodies against β-galactosidase (Abcam, 1:10,000 dilution) for 16 h at 4 °C. The secondary antibody was donkey anti-rabbit immunoglobulin horseradish peroxidase-linked, diluted 1:15,000 in blocking solution. Incubation with the secondary antibody was omitted when anti-His horseradish peroxidase-linked antibody (GenScript; 1:5000 dilution) was used as primary antibody. The protein-antibody complex was visualized by using the ECL Plus Western blotting detection system (Amersham Pharmacia Biotech). Control gels were stained with Sypro[®] Ruby or Coomassie Brilliant Blue R-250.

Binding of GAPDH to CesT was analyzed by Far-Western assays (overlay immunoblotting). For these experiments 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 (Egea et al., 2007). Purified GAPDH was further purified by affinity chromatography with anti-factor Xa-agarose resin (Sigma) to remove factor Xa.

For mono-dimensional Far-Western experiments, purified GAPDH (2.5 μg) was separated on 10% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. 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 His₆-CesT (1 or 5 μg/ml) diluted in TBS-0.05% Tween-20 for 3 h and then washed four times in the same buffer. To visualize the interaction of GAPDH with CesT, the membrane was incubated with anti-His specific antibodies (1:5000 dilution TBS-1% gelatin-0.05% Tween-20) for 16 h at 4 °C, and processed as described above using the ECL Western blotting kit to visualize the reactive spots. The incubation step with purified His₆-CesT was omitted as negative control. When indicated, purified GAPDH (5 μg) was subjected to two-dimensional gel electrophoresis before being blotted onto the PVDF membrane, which was then incubated with purified His₆-CesT (1 μg/ml) and processed as described above.

2.6. Two-dimensional gel electrophoresis

2D gel electrophoresis was performed using the Protean IEF-Cell (Bio-Rad). Purified recombinant GAPDH (5 μg) was diluted in 125 μl of rehydration buffer (9M urea, 4% CHAPS, 50 mM dithiothreitol, 0.5% immobilized pH gradient buffer and traces of bromophenol blue). Isoelectric focusing was performed in immobilized pH 5–8 gradient strips (BioRad). Second dimension SDS-PAGE was performed on 12.5% acrylamide gels that were processed for immunoblotting analysis. Parallel gels were silver-stained to visualize total protein.

2.7. Biolayer interferometry

Octet Red (Fortebio) instrument with amine reactive biosensors was used to study kinetics of GAPDH-CesT interaction. Carboxylic groups on the sensor surface were activated by incubation with 0.2 M [N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide] (EDC):0.05 M [N-hydroxysuccinimide ester] (NHS) for 10 min. The ligand CesT diluted in MES buffer, pH 4.0 (final concentration of

50 µg/ml) was then loaded on activated biosensors (10 min incubation). The unreacted NHS-esters were quenched with 0.05 M ethanolamine for 10 min. All experiments were conducted at 30 °C with agitation set to 1000 rpm in 10 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.01% (w/v) Tween-20 and 0.1 mg/ml BSA. Biosensors with immobilized CesT were exposed to different concentrations of purified GAPDH (0–5.5 µM). After dipping the biosensor with each concentration of the analyte GAPDH, the surface was regenerated with 0.1% SDS during 30 s. This allowed it to return at the baseline. Data analysis and curve fitting were done using the ForteBio Data Analysis software version 6.3 provided by the manufacturer. Kinetic constants were obtained by fitting data to a 1:1 model after parallel reference sensor subtraction.

3. Results and discussion

3.1. GAPDH secretion through the LEE-encoded T3SS in EPEC

Secretion of GAPDH by EPEC in culture media known to induce the expression of LEE-encoded genes (Egea et al., 2007) prompted us to examine whether the LEE-encoded T3SS is involved in GAPDH secretion in this pathogen. To this end, GAPDH secretion was analyzed in *escN* or *espB* mutant strains. It is well known that mutations in *escN*, the gene encoding the T3SS ATPase, abolish the secretion of both translocator and effector proteins through this system. In contrast, mutations in *espB*, the gene encoding a hydrophobic translocon protein that is thought to form with EspD a translocation pore through the host membrane, disrupt translocation of effector proteins into host cells during infection but do not impair secretion of these proteins into the extracellular medium (Deng et al., 2004; Luo and Donnenberg, 2006, 2011).

Cells of wild-type EPEC E2348/69 and the derived mutant strains CVD452 (*escN::aphA3*) and UMD864 (Δ *espB*) were grown statically at 37 °C in DMEM or LB (a medium that promotes down-regulation of LEE-encoded T3SS) to an OD₆₀₀ of 0.8. When indicated, cultures were incubated overnight. Proteins in the cell-free culture supernatants were collected by TCA precipitation and the presence of secreted GAPDH in these fractions was analyzed by Western blot. To rule out cytosolic contamination due to cell lysis, immunoblots were revealed with antibodies against the intracellular protein β -galactosidase (Fig. 1). Expression of β -galactosidase was achieved by addition of 5 mM IPTG to the culture medium. Gels run in parallel were stained with Sypro® Ruby to visualize the total secreted protein.

In cells grown in LB, no significant changes in the secretion profiles of the three strains were observed (Fig. 1A). In these growth conditions GAPDH was secreted by all strains at the same extent. The absence of β -galactosidase in culture supernatants ruled out cell lysis phenomena, and indeed proves GAPDH secretion by LB-grown EPEC through a non-dependent T3SS mechanism.

Regarding DMEM-cultured cells, as expected from the mutant phenotypes, the secretion profiles of wild-type EPEC and Δ *espB* mutant were very similar, except for the 34 kDa-protein band (EspB) that is absent from the UMD864 cell-free supernatant. The secretion profile was clearly different for the *escN* mutant. In this case, almost no secreted proteins were apparent in cell-free supernatants (Fig. 1A). The *espB* mutant UMD864 displayed reduced GAPDH secretion in DMEM compared with the wild-type strain. In this mutant, GAPDH was immunodetected in supernatants of overnight DMEM cultures (Fig. 1A). In contrast, secretion of GAPDH was completely abolished in the *escN* insertion mutant CVD452 grown in DMEM at any incubation time (Fig. 1A). The lack of GAPDH secretion in EPEC cells defective in the T3SS ATPase was confirmed with a non-polar Δ *escN* mutant (Gauthier and Finlay, 2003) (Fig. 1B). To normalize the protein precipitation efficiency,

TCA precipitation of cell free-supernatants was also performed in the presence of 0.1% BSA as a carrier. Immunoblotting analysis also failed to detect secreted GAPDH in both *escN* mutants in these conditions (not shown). GAPDH secretion was restored in the *escN* mutants by plasmid pCVD446 bearing the wild-type *escN* gene (Fig. 1B). Overall, these results indicate that GAPDH may be secreted by the LEE-encoded T3SS in EPEC grown in DMEM.

In EPEC cells defective in SepD function, the secretion of type III translocon components is reduced while the T3SS-dependent secretion of several effectors is highly increased, hence aiding the identification of previously unrecognized type III secreted proteins (Deng et al., 2004, 2005; O'Connell et al., 2004). Therefore, we set out to evaluate GAPDH secretion in DMEM cultures of a Δ *sepD* mutant strain (Deng et al., 2005). Equal numbers of bacteria were used to obtain the secreted proteins for Western blot analysis. As shown in Fig. 1C, GAPDH secretion was enhanced in the Δ *sepD* mutant when compared with the wild-type strain.

Results obtained with the *espB*, *escN* and *sepD* mutants show that GAPDH secretion profile follows that of the bonafide T3SS effectors thereby pointing to GAPDH as a putative type III effector protein in EPEC.

3.2. Interaction of GAPDH with the general type III chaperone CesT

Although CesT was first described as a specific chaperone for the type III effectors Tir and Map, Thomas et al. (2005, 2007) showed, through an elegant work, that CesT is required for efficient secretion of many other type III effectors, some of them not encoded in the LEE pathogenicity island. We therefore set out to evaluate whether CesT can bind GAPDH. To this end, His₆-tagged CesT was purified and bound to a Ni²⁺-NTA column followed by the addition of wild-type EPEC cell extract (0.5 ml; 10 mg/ml) in binding buffer obtained from cultures grown in DMEM. In this experiment, proteins that interact with CesT are retained on the column and then can be co-eluted with CesT. After extensive washing, His₆-CesT was eluted with elution buffer. The purification fractions were then subjected to SDS-PAGE followed by Western blot analysis with antibodies against GAPDH. Parallel samples were revealed by Coomassie blue staining. As shown in Fig. 2 the final wash fraction did not contain any detectable protein. In the eluted fraction, in addition to the dominant protein His₆-CesT, other proteins were visible. These proteins may correspond to EPEC effectors interacting with CesT (Thomas et al., 2005). Immunoblotting of the column fractions with anti-GAPDH antibodies indicated that a fraction of this protein was bound and co-eluted with His₆-CesT (Fig. 2, left panel). In a control experiment, the EPEC cell extract was directly applied to the Ni²⁺-NTA column and processed in parallel. Immunoblotting of the eluted fraction showed that the Ni²⁺-NTA resin did not bind GAPDH to any extent (Fig. 2, right panel).

Since some type III effectors such as Tir directly bind EscN (Gauthier and Finlay, 2003), and this ATPase binds CesT, we set out to examine whether the observed GAPDH–CesT interaction was dependent on EscN. Thus, the CesT column binding experiment was also performed with Δ *escN* cell extracts obtained from DMEM cultures (Fig. 2, middle panel). Immunoblotting of the eluted fractions with anti-GAPDH antibodies revealed that GAPDH was bound on the column and co-eluted with His₆-CesT, thus indicating that EscN is not necessary for CesT and GAPDH interaction. Retention of GAPDH on the CesT-affinity column was also observed with cell extracts of the laboratory strain *E. coli* M15[pREP4]. This result indicates that GAPDH interaction with CesT cannot be attributed to other bridging T3SS proteins and suggests direct GAPDH–CesT interaction.

Direct binding of GAPDH to CesT was confirmed by mono-dimensional Far-Western assays in which purified GAPDH was

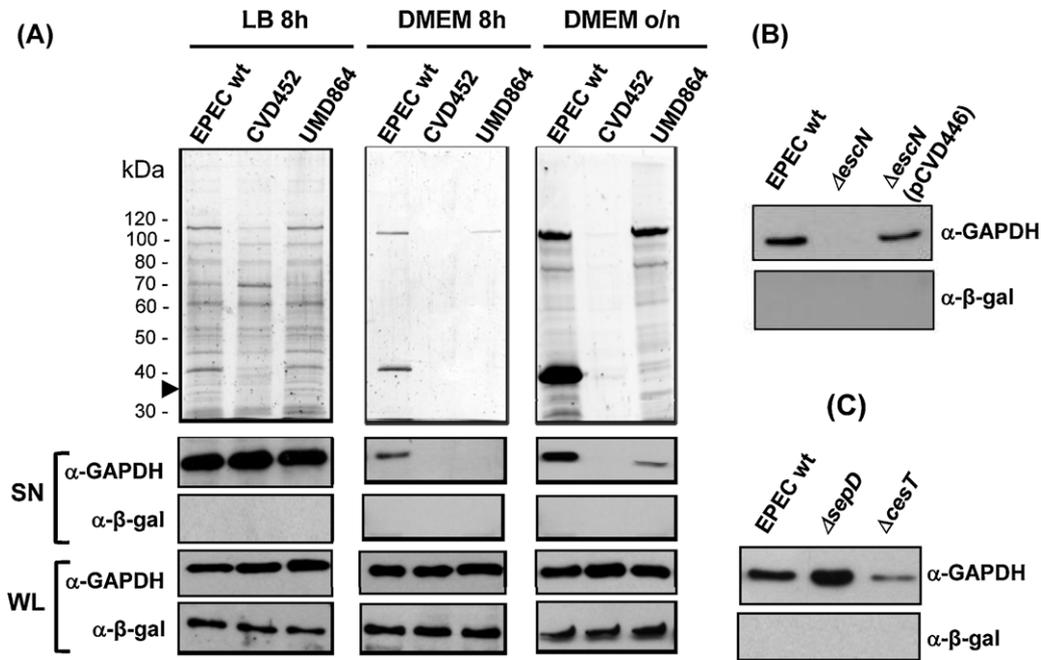


Fig. 1. Immunoblot analysis of GAPDH secretion by T3SS mutant derivatives of EPEC E23448/69. (A) The mutant strains UMD864 ($\Delta espB$), CVD452 (*escN::aphA3*) and the parental wild-type strain EPEC E23448/69 were grown statically in LB or DMEM to an OD_{600} of 0.8 (6–8 h). When indicated cultures were grown overnight (o/n), IPTG was added at 5 mM concentration to induce *lacZ* expression. Aliquots of the culture supernatants (SN) were precipitated with TCA and analyzed by Western blot using anti-GAPDH specific antibodies, or anti- β -galactosidase as a control of cytosolic contamination. Parallel gels were stained with Sypro[®] Ruby to visualize total secreted protein. An arrowhead next to the molecular mass marker indicates the position of GAPDH (35 kDa). Whole cell lysates (WL) were prepared from the same samples and analyzed with the indicated antibodies. (B) Complementation of $\Delta escN$ with plasmid pCVD446 expressing EscN. Cell-free supernatants from exponentially grown DMEM cultures (OD_{600} of 0.8) were precipitated with TCA and analyzed by Western blot using anti-GAPDH or anti- β -galactosidase specific antibodies. (C) GAPDH secretion profile of $\Delta sepD$ and $\Delta cesT$ mutants compared with wild-type EPEC. Supernatants were collected from exponentially grown DMEM cultures (OD_{600} of 0.8) and processed as described above. Equal numbers of bacteria were used to prepare samples for analysis. The molecular mass of β -galactosidase is 116 kDa.

subjected to SDS-PAGE, transferred to PVDF membrane and reacted with soluble purified His₆-CesT (Fig. 3A). Since GAPDH is a target of multiple post-translational modifications we set out to analyze whether CesT binding 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. Purified GAPDH yielded several spots that interacted with CesT (Fig. 3B), thus providing evidence that this binding is not strictly dependent on a GAPDH form.

The dissociation constants of GAPDH–CesT interaction were measured by biolayer interferometry (BLI), a technique that quantitates molecular interactions and provides the on/off rates. When we immobilized CesT and measured the affinity of the GAPDH–CesT complex (Fig. S1, supplemental material), we obtained a K_D of 560 nM and a dissociation rate (k_{off}) of the complex of $0.0015 s^{-1}$. Saturation kinetics with GAPDH could not be observed because only a minor fraction of GAPDH, presumably monomeric, was competent for CesT binding. The reverse experiment could not be

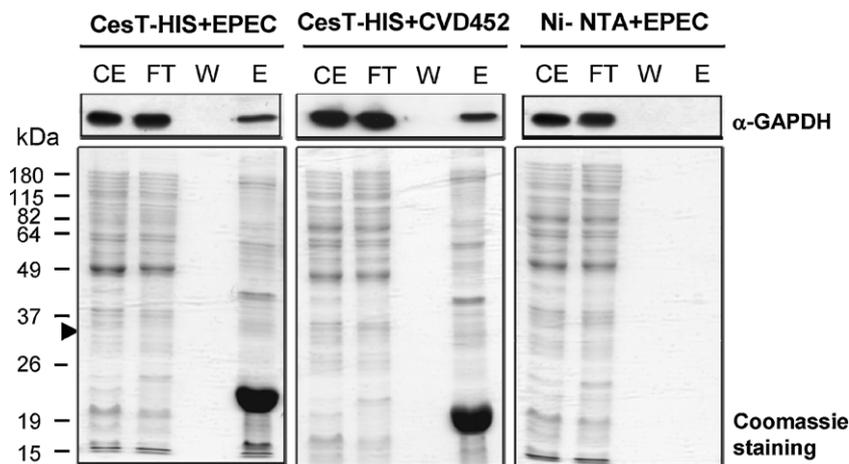


Fig. 2. Pull-down experiments showing binding of GAPDH to CesT. Cell extracts obtained from wild-type strain EPEC E23448/69 (left panel) or from the *escN* mutant strain CVD452 (middle panel) grown in DMEM were passed over Ni-NTA column immobilized His₆-CesT. Column fractions were analyzed either by Western blot with anti-GAPDH antibodies or by Coomassie blue staining. An arrowhead next to the molecular mass marker indicates the position of GAPDH (35 kDa). As a control, the EPEC cell extract was directly applied to the Ni-NTA column and processed in parallel (right panel). CE, cell extract; FT, flow-through; W, final wash; E, eluted fraction.

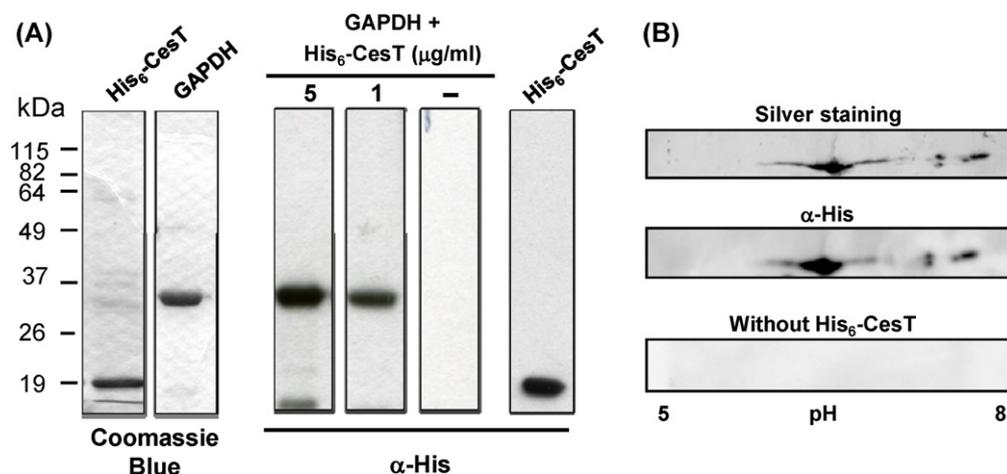


Fig. 3. Far-Western analysis of binding of soluble CesT to PVDF-immobilized GAPDH. (A) Mono-dimensional Far-Western analysis. Samples containing 2.5 µg protein (purified His₆-CesT or GAPDH) were subjected to 10% SDS-PAGE, and the gel was either Coomassie blue-stained or electroblotted. The PVDF membrane was reacted with recombinant His₆-CesT (1 µg/ml or 5 µg/ml), subsequently incubated with antibodies anti-His horseradish peroxidase-linked antibody and processed to visualize the reactive bands. As a control, the panel labeled as (-) shows the result of this analysis when the incubation step with purified His₆-CesT was omitted. (B) Bi-dimensional Far-Western analysis. Samples containing 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 purified His₆-CesT (5 µg/ml), subsequently incubated with antibodies anti-His and processed to visualize the reactive bands (second panel). The third panel shows the result of this analysis when the incubation step with recombinant CesT was omitted.

performed because immobilization of GAPDH using amine chemistry led to the inactivation of GAPDH–CesT binding motifs.

Even though the structural basis for GAPDH–CesT interaction is not yet known (nor is there a structure of CesT in complex with any of its effector proteins), the requirements for class I chaperone binding are likely to play important roles in shaping the interaction with GAPDH. In particular, the putative degenerate CesT-interacting amino-terminal domain proposed for type III effectors of EPEC (Thomas et al., 2007) spans a stretch of 60–120 amino acids. If the GAPDH–CesT interaction surface resembles the extended complexes described for analogous chaperone–effector interactions, such as SicP–SptP (35–139) (PDB ID: 1JYO) (Stebbins and Galán, 2001) and SycE–YopE (17–85) (PDB ID: 1L2W) (Birtalan et al., 2002) (Fig. 4A), the 120 N-terminal amino-acid residues of GAPDH could adopt a similarly extended conformation to bind the four canonical hydrophobic patches exposed across the chaperone dimer. Indeed, the secondary structure and the pattern of conserved hydrophobic and positively charged residues that are thought to mediate the interaction of T3SS effectors and their cognate chaperones are discernable, despite considerable degeneracy, along the GAPDH amino terminus (Fig. 4B). Since the nascent, monomeric chain of GAPDH has been shown to interact with various chaperones and chaperonins as it emerges from the ribosome, like Trigger factor (Liu et al., 2010) and GroEL/GroES (Houry et al., 1999), it becomes plausible for CesT to compete for a small fraction of nascent GAPDH amino termini thereby interfering with its intracellular stabilization and folding, and targeting GAPDH instead for T3SS-mediated secretion, with proper folding and oligomerization taking place after translocation. The engagement of the GAPDH N-terminal segment in the interaction with CesT would imply the partial disruption of the GAPDH tetramer, since residues 41–51 contribute to the stabilization of the oligomerization interface (Fig. 4C). This would be in keeping with the proposal that proteins targeted for secretion via T3SS should translocate in an unfolded, or partially folded, non-globular state through the 25-Å wide inner diameter of the needle complex (Stebbins and Galán, 2003). Taken together, these results indicate that a stable complex exists between the T3SS chaperone CesT and a particular GAPDH conformation, thereby providing a solid experimental underpinning for the redirection of a fraction of cytosolic GAPDH through the T3SS secretion system.

To analyze whether CesT function is essential for GAPDH secretion, immunoblotting experiments were performed with cell-free supernatants of DMEM cultures of a $\Delta cesT$ mutant strain (Abe et al., 1999). Equal numbers of bacteria (wild type EPEC and the $\Delta cesT$ mutant) were used to obtain secreted proteins for analysis. As shown in Fig. 1C, GAPDH secretion was not abolished but reduced in the $\Delta cesT$ mutant. The fact that the cognate chaperone is not absolutely required for protein secretion seems to be rather common for type III effectors in several pathogens (Parsot et al., 2003). Actually, there is evidence that Tir secretion is not strictly dependent on CesT as low levels of Tir can be detected in culture supernatants of *cesT* mutants (Elliot et al., 1999).

This study describes for the first time the interaction of a house-keeping protein with the type III chaperone CesT. Interaction of GAPDH with this chaperone may provide the way by which GAPDH is targeted to the type III secretion apparatus and reinforce the idea that GAPDH is secreted by the LEE-encoded T3SS in EPEC cells grown in DMEM.

3.3. A T3SS-independent GAPDH secretion pathway is operative in EPEC and probiotic *E. coli* strains grown in LB

Immunodetection of GAPDH in cell-free supernatants of the *escN* mutant strain CVD452 grown in LB (Fig. 1) indicated that a secretion system other than T3SS is responsible for GAPDH secretion in EPEC grown in this rich bacteriological medium. At this point we set out to study whether this alternative secretion system may also be active in non-pathogenic *E. coli* strains. In fact, in the last years several reports describe the GAPDH secretion by some Gram-positive probiotic strains of the genus *Lactobacillus* (Hurmalainen et al., 2007; Sánchez et al., 2008, 2009a, 2009b). Thus, we decided to analyze GAPDH secretion in cultures of some gut microbiota *E. coli* strains: (i) strains isolated from stool of healthy people (EcoR12, EcoR26 and EcoR42) available from the Selander collection (Ochman and Selander, 1984) and (ii) the probiotic *E. coli* strain Nissle 1917 (serotype O6:K5:H1). These bacterial cells were grown statically at 37 °C in DMEM or LB to an OD₆₀₀ of 0.8. Presence of secreted GAPDH in the culture supernatants was analyzed by Western blot. None of the strains analyzed secreted GAPDH when grown in DMEM (Fig. 5). These strains do not contain in their chromosome the T3SS-encoding genes. Therefore, this result

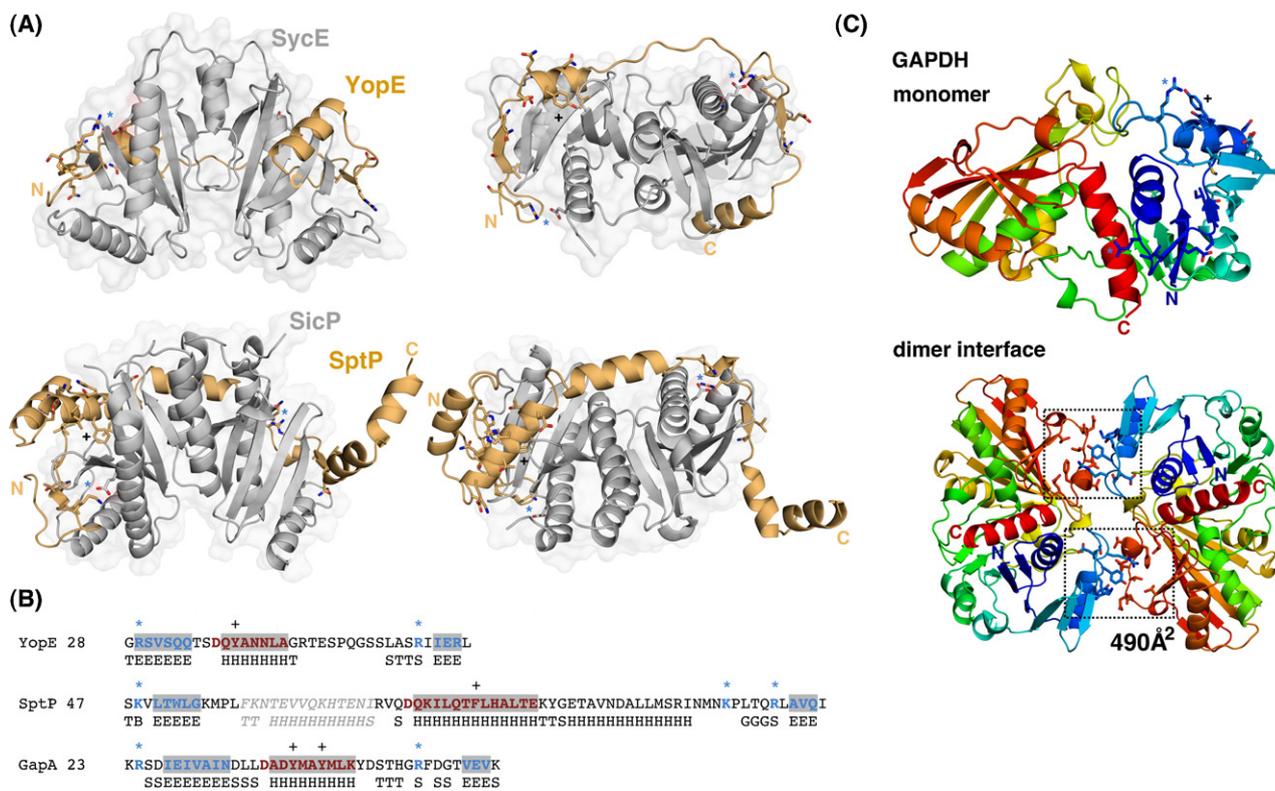


Fig. 4. Structural requirements for CesT–GAPDH interaction. (A) Cartoon representation of the YopE–SycE (PDB ID: 1L2W) and SicP–SptP (PDB ID: 1JYO) crystal structures shown in two views related by a 90° rotation around a horizontal axis. Chaperones (SycE and SicP) are colored in gray surrounded by their semi-transparent molecular surface and effectors (YopE and SptP) in light orange. Side chains in sticks (CPK colors) correspond to amino acid residues relevant for the chaperone–effector interaction; in particular, a conserved glutamic acid residue on the chaperones (E115 and E118) and the effector β-strands (and preceding conserved arginine/lysine residues) and central α-helix (and preceding conserved aspartic acid), are highlighted. (B) Annotated amino terminal sequences of YopE and SptP effector proteins and *E. coli* GAPDH (GapA) starting at residues 28, 47, and 23, respectively, with the experimentally determined secondary structure underneath (H, α-helix; E, extended β-strand; B, isolated β-bridge; T, hydrogen-bonded turn; S, bend; G, 3₁₀ helix). Important secondary structures are shown in blue (β-strands) or red (α-helices) against a gray background. Key conserved residues lying not necessarily in secondary structures are colored and marked with an asterisk (R/K, in blue), a plus sign (Y/F, in red), or shown in red (aspartic acid preceding central α-helix in effectors). The number of residues required for fully covering the chaperone's interaction surface depends on the conformation of the effector. When the effector is mostly in an extended conformation (YopE), the region between the first conserved arginine/lysine and the last residue in the last β-strand ranges from 31 to 35 residues. In contrast, the more condensed α-helical structure of SptP (with a non-interacting, grayed-down α-helical insertion and a third α-helix) allows fitting 71 residues over the SicP chaperone. The effector sequence and secondary-structure motifs recognizable in GAPDH are labeled accordingly. (C) GAPDH monomer and dimer structure (PDB ID: 1DC5) (Yun et al., 2000) shown in cartoons and colored in rainbow colors. Blue asterisks and plus signs have the same meaning as in (A) and (B). N-terminal GAPDH residues predicted to interact with CesT are shown in sticks and CPK colors. In particular, the amino acid stretch 41–51 forms a part of a dimeric interface involving a patch of C-terminal residues (shown also in sticks) that is framed by dashed lines. The two symmetric interfaces bury a combined 980 Å² surface area stabilized by two symmetric sets of 6 hydrogen bonds and 1 salt bridge.

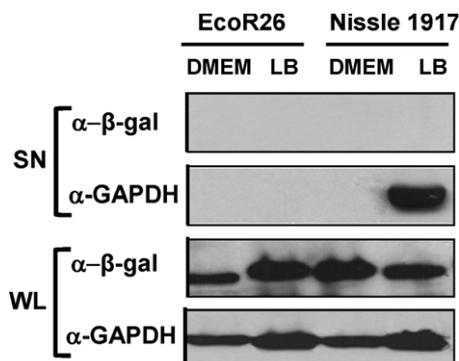


Fig. 5. Immunoblot analysis of GAPDH secretion by several non-pathogenic *E. coli* strains. The indicated strains were grown in DMEM or LB to an OD₆₀₀ of 0.8 in the presence of 5 mM IPTG to induce *lacZ* expression. Aliquots of the culture supernatants (SN) were precipitated with TCA and analyzed by Western blot. Whole cell lysates (WL) were prepared from the same samples and analyzed in parallel. GAPDH (35 kDa), β-galactosidase (116 kDa).

is in accordance with the involvement of the LEE-encoded T3SS in GAPDH secretion in EPEC grown in DMEM. In contrast, great differences in GAPDH secretion among strains were observed in LB cultures. Extracellular GAPDH was detected in the supernatant of the probiotic strain Nissle 1917, but not in the supernatants of the natural isolates EcoR26 (Fig. 5), EcoR12 and EcoR41 (not shown). These results indicate that the secretion mechanism responsible for GAPDH export in LB is active in both pathogenic and probiotic *E. coli* strains. It may be hypothesized that GAPDH secretion may confer to these strains an advantage in the context of gut colonization with respect to other components of the intestinal microbiota. In fact, GAPDH secretion and its interaction with extracellular host components such as mucin or extracellular matrix proteins are rather common among diverse pathogens and probiotic microorganisms (Hurmalainen et al., 2007; Kinoshita et al., 2008; Lama et al., 2009; Pancholi and Chhatwal, 2003).

Results presented in this study indeed prove that secretion of GAPDH in EPEC is mediated by at least two alternative pathways depending on the growth conditions: (i) the pathogen specific T3SS in cells grown in DMEM, and (ii) a system not yet identified in cells grown in LB, which is not restricted to pathogens but also operative in probiotic *E. coli* strains. The widespread presence of multiple

GAPDH secretion pathways is compatible with GAPDH roles in colonization and infection processes.

Acknowledgments

This study was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation grants BFU 2007-63090 and BFU2010-22260-C02-01 to LB and PET2008_0101, BIO2009-11184 and BFU2010-22260-C02-02 to MCV and by the EC project ComplexINC (Framework Programme 7 (FP7) under grant agreement no. 279039) to MCV. We thank Michael S. Donnenberg for providing strains CVD452 and UMD864 as well as plasmid pCVD446. We also acknowledge B. Brett Finlay for providing wild-type EPEC E2348/69 streptomycin resistant, and the derived $\Delta sepD$ and $\Delta cesT$ mutants. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 was provided by Ardeypharm GmbH, Herdecke, Germany. We also thank W. Deng for technical suggestions.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.biocel.2012.03.002.

References

- Abe A, Degrade M, Pfuertner RA, Sanchez-Sanmartín C, Devinney R, Puente JL, et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* translocated intimin receptor, Tir, requires a specific chaperone for stable secretion. *Mol Microbiol* 1999;33:1162–75.
- Alvarez-Dominguez C, Madrazo-Toca F, Fernandez-Prieto L, Vandekerckhove J, Pareja E, Tober R, et al. Characterization of a *Listeria monocytogenes* protein interfering with Rab5a. *Traffic* 2008;9:325–37.
- Aguilera L, Giménez R, Badía J, Aguilar J, Baldoma L. NAD⁺-dependent post-translational modification of *Escherichia coli* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Int Microbiol* 2009;12:187–92.
- Birtalan SC, Phillips RM, Ghosh P. Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Mol Cell* 2002;9:971–80.
- Dean P, Maresca M, Kenny B. EPEC's weapons of mass subversion. *Curr Opin Microbiol* 2005;8:28–34.
- Dean P, Keny B. The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Curr Opin Microbiol* 2009;12:101–9.
- Deng W, Puente JL, Gruenheid S, Li Y, Váyanse BA, Vázquez A, et al. Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:3597–602.
- Deng W, Li Y, Hardwidge PR, Frey EA, Pfuertner RA, Lee S, et al. Regulation of type III secretion hierarchy of translocators and effectors in attaching and effacing bacterial pathogens. *Infect Immun* 2005;73:2135–46.
- Deng W, Hoog CL, Yu HB, Li Y, Croxen MA, Thomas NA, et al. A comprehensive proteomic analysis of the type III secretome of *Citrobacter rodentium*. *J Biol Chem* 2010;285:6790–800.
- Desvaux M, Hébraud M, Talon R, Henderson IR. Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness. *Trends Microbiol* 2009;17:139–45.
- 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.
- Egea L, Aguilera L, Giménez R, Sorolla MA, Aguilar J, Badía J, et al. 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;39:1190–203.
- Elliot SJ, Hutcheson SW, Dubois MS, Mellies JL, Wainwright LA, Batchelor M, et al. Identification of CesT, a chaperone for the type III secretion of Tir in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1999;33:1176–89.
- Gauthier A, Finlay B. Translocated intimin receptor and its chaperone interact with ATPase of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2003;185:6747–55.
- Houry WA, Frishman D, Eckerskorn C, Lottspeich F, Hartl FU. Identification of *in vivo* substrates of the chaperonin GroEL. *Nature* 1999;402:147–54.
- Hurmalainen V, Edelman S, Antikainen J, Baumann M, Lähteenmäki K, Korhonen TK. Extracellular proteins of *Lactobacillus crispatus* enhance activation of human plasminogen. *Microbiology* 2007;153:1112–22.
- Izore T, Jov V, Dessen A. Biogenesis, regulation and targeting of the type III secretion system. *Structure* 2011;19:603–12.
- 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;92:7996–8000.
- 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;350:27–41.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2004;2:123–40.
- Kinoshita H, Uchida H, Kawai Y, Kawasaki T, Wakahara N, Matsuo H, et al. Cell surface *Lactobacillus plantarum* LA 318 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) adheres to human colonic mucin. *J Appl Microbiol* 2008;104:1667–74.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;222:680–5.
- Lama A, Kucknoor A, Mundodi V, Alderete JF. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a surface associated, fibronectin-binding protein of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 2009;77:2703–11.
- Liu CP, Zhou QM, Fan DJ, Zhou JM. PPIase domain of trigger factor acts as auxiliary chaperone site to assist the folding of protein substrates bound to the crevice of trigger factor. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42:890–901.
- Luo W, Donnenberg MS. Analysis of the function of enteropathogenic *Escherichia coli* EspB by random mutagenesis. *Infect Immun* 2006;74:810–20.
- Luo W, Donnenberg MS. Interactions and predicted host membrane topology of the enteropathogenic *Escherichia coli* translocator protein EspB. *J Bacteriol* 2011;193:2972–80.
- Marlovits TC, Kubori T, Lara-Tejero M, Thomas D, Unger VM, Galan JE. Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome. *Nature* 2006;441:637–40.
- McDaniel TK, Kaper JB. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on K-12 *E. coli*. *Mol Microbiol* 1997;23:399–407.
- 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, Elliot S, Crowther LJ, Luo W, et al. SepL, a protein required for enteropathogenic *Escherichia coli* type III translocation, interacts with secretion component SepD. *Mol Microbiol* 2004;52:1613–25.
- Page A-L, Parsot C. Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. *Mol Microbiol* 2002;46:1–11.
- Pancholi V, Chhatwal GS. Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. *Int J Med Microbiol* 2003;293:391–401.
- Parsot C, Hamiaux C, Page A-L. The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr Opin Microbiol* 2003;6:7–14.
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.
- 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;54:1–17.
- Sánchez B, Schmitter JM, Urdaci MC. Identification of novel proteins secreted by *Lactobacillus rhamnosus* GG grown in Mann–Rogosa–Sharpe broth. *Lett Appl Microbiol* 2009a;48:618–22.
- Sánchez B, Schmitter JM, Urdaci MC. Identification of novel proteins secreted by *Lactobacillus plantarum* that bind to mucin and fibronectin. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2009b;17:158–62.
- Schaumburg J, Diekmann O, Hagendorf P, Bergmann S, Rodhe M, Hammer-schmidt S, et al. The cell wall proteome of *Listeria monocytogenes*. *Proteomics* 2004;4:2991–3006.
- Seifert KN, McArthur WP, Bleiweis AS, Brady J. Characterization of group B streptococcal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: surface localization, enzymatic activity, and protein-protein interactions. *Can J Microbiol* 2003;49:350–6.
- Sirover MA. New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. *J Cell Biochem* 2005;95:45–52.
- Sirover MA. On the functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: biochemical mechanisms and regulatory control. *Biochim Biophys Acta* 2011;1810:741–51.
- Stebbins CE, Galán JE. Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature* 2001;414(6859):77–81.
- Stebbins CE, Galán JE. Priming virulence factors for delivery into the host. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:738–43.
- 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;281:14215–23.
- Thomas NA, Deng W, Puente JL, Frey EA, Yip CK, Strynadka NCJ, et al. CesT is a multi-effector chaperone and recruitment factor required for the efficient type III secretion of both LEE- and non-LEE encoded effectors of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2005;57:1762–79.
- Thomas NA, Deng W, Baker N, Puente JL, Finlay BB. Hierarchical delivery of an essential host colonization factor in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2007;282:29634–45.
- Yun M, Park CG, Kim JY, Park HW. Structural analysis of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli*: direct evidence of substrate binding and cofactor-induced conformational changes. *Biochemistry* 2000;39:10702–10.