

3. RESULTADOS

3.1 LA LOCALIZACIÓN DE LA FUSIÓN *yfeR::MudJ* ES CROMOSÓMICA

En el momento en el que se inicia el trabajo de investigación presentado en esta Memoria, el primer aspecto que se planteó fue el de localizar la inserción del fago *MudJ* bien en el cromosoma o bien en el plásmido de virulencia que contiene la cepa TT1704 de *S. Typhimurium*.

Para examinar la posibilidad que la fusión *yfeR::MudJ* estuviera en el plásmido de virulencia pSLT, se realizó una transducción (apartado 2.3.2 de material y métodos) de la fusión a receptores isogénicos con y sin plásmido de virulencia, seleccionando transductantes resistentes a Km. Las cepas utilizadas en la transducción fueron LT2 (pSLT⁺) y su derivada curada del plásmido de virulencia (SV3081 (pSLT⁻)). Como se muestra en la tabla 3.1.1 la frecuencia de transducción obtenida fue del mismo orden en las dos cepas, y por lo tanto la posibilidad de que la mutación estuviera localizada en el plásmido de virulencia quedaba totalmente descartada, ya que en otro caso el número de transductantes obtenidos sobre la cepa SV3081 hubiese sido nulo.

Tabla 3.1.1. Frecuencia de transducción (n° transductantes/u.f.p lisado) de la fusión *yfeR::MudJ* a las cepas LT2 y SV3081.

	Cepas	
	LT2	SV3081
Frecuencia de transducción	$2,5 \cdot 10^{-6}$	$2,9 \cdot 10^{-6}$

3.2 SECUENCIACIÓN DEL EXTREMO 5' DEL GEN *yfeR*

Como se ha descrito en el apartado de antecedentes, al inicio de este trabajo se disponía de la secuencia nucleotídica del gen *yfeR* desde el codón de inicio de traducción hasta el codón de terminación del gen (fig. 3.2.1).

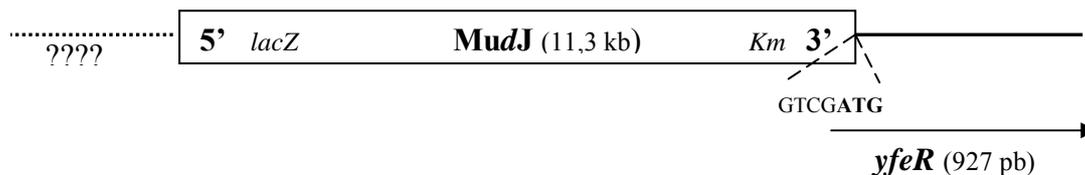


Fig. 3.2.1. Esquema de la fusión *yfeR::MudJ* al inicio de este trabajo. Se conocía la secuencia completa del gen *yfeR*, con su inicio de traducción 4 nucleótidos después del extremo 3' de *MudJ*. Se muestra con una línea discontinua la región adyacente al extremo 5' de *MudJ*, que se procedió a secuenciar.

A continuación se procedió a la secuenciación de su extremo 5' para estudiar la región promotora del gen y el posible gen adyacente. Para hacerlo se utilizaron oligonucleótidos del extremo 5' de *MudJ* pero, tal y como se había descrito con anterioridad (Torreblanca, 1998), fue imposible obtener una secuencia nítida, debido a la estructura secundaria que se forma en esta región del transposón, la cual no permite avanzar a la reacción de secuenciación. Tampoco podían utilizarse oligonucleótidos del cósmido pLA2917 y utilizar como ADN molde el cósmido pLACP (pLA2917+*yfeR*), dado que el fragmento de ADN cromosómico contenido era demasiado grande y no podía saberse la posición exacta del fago *MudJ*, por lo que se podrían requerir muchas reacciones de secuenciación para llegar hasta la inserción. Por estas razones se decidió hacer un subclonaje en un vector pUC19 a partir del cósmido pLACP.

Después de probar varios enzimas de restricción se eligió *Bam*HI, ya que al digerir el ADN del cósmido pLACP con este enzima tan sólo se obtenían cuatro fragmentos, de los cuales se descartaron dos en función de su tamaño, teniendo en cuenta la posición de esta diana en el fago *MudJ* (fig. 3.2.2). El fragmento de 25 kb fue descartado porque era demasiado pequeño para incluir el cósmido (pLA2917, 21 kb) y el fragmento *Bam*HI del fago *MudJ* juntamente con el extremo 5' del gen *yfeR*. El fragmento de 6 kb fue descartado por ser demasiado pequeño. Se seleccionaron fragmentos que se extendiesen desde la diana

*Bam*HI del fago hasta la próxima diana en el ADN cromosómico más cercano al extremo 5' del fago.

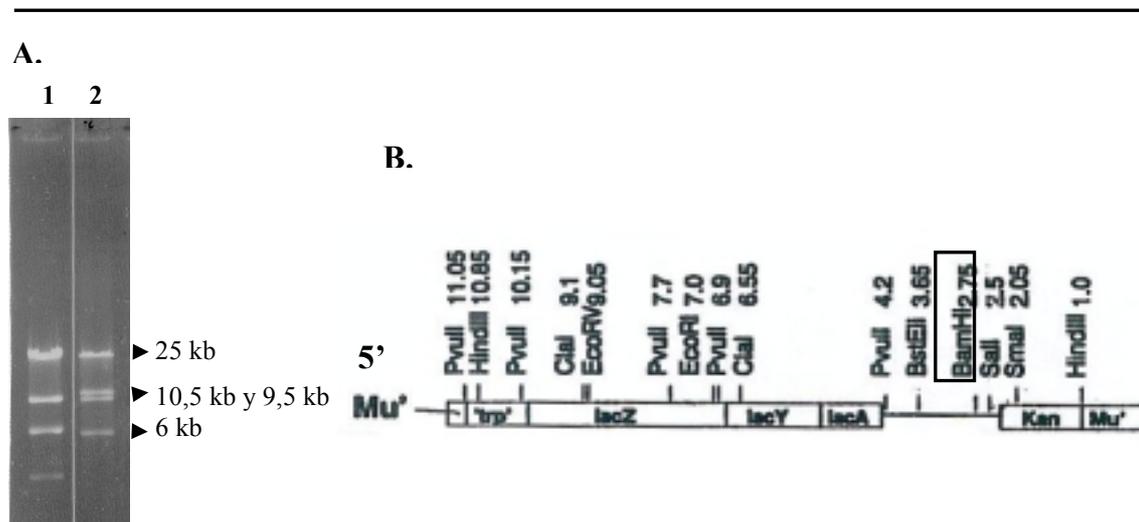


Fig. 3.2.2. A. Restricción *Bam*HI del cósmido pLACP. Carril 1: MPM λ /HindIII; carril 2: pLACP/*Bam*HI. B. Mapa parcial de restricción del fago MudJ. La diana *Bam*HI se encuentra a 8,55 Kb del extremo 5' del fago MudJ.

A partir de una restricción del cósmido pLACP con *Bam*HI se aislaron dos fragmentos de 10,5 kb y 9,5 kb por electroelución, y se ligaron a un vector pUC19 digerido con este mismo enzima. Esta ligación se transformó a la cepa de *E. coli* XL1-BLUE, que permite hacer la selección blanco/azul en placas con IPTG, X-gal, y Ap en un clonaje con el vector pUC19: las colonias que tienen inserto son de color blanco y las que no lo tienen son de color azul. Sin embargo, con la estrategia que se utilizó en nuestro caso, la restricción *Bam*HI del cósmido pLACP cortaba el fago MudJ (fig. 3.2.2), pero no eliminaba el gen *lacZ* ni por lo tanto la capacidad de degradar el sustrato cromogénico y dar color azul, de forma que una colonia que podría ser considerada portadora de un pUC19 sin inserto podía en realidad contener el fragmento que nos interesaba. Por ello, se aisló el ADN plasmídico de algunos clones transformantes de color azul, y se analizó por restricción sencilla y doble con los enzimas *Eco*RI y *Bam*HI. Se escogieron estas enzimas porque la restricción doble *Eco*RI/*Bam*HI del fago MudJ debía liberar un fragmento de tamaño conocido: 4,25 Kb. De esta forma pudo localizarse un clon que contenía el vector pUC19, parte del genoma del fago MudJ y el extremo 5' del gen *yfeR*. Esta construcción fue denominada pUCIR, y en la figura 3.2.3 se muestra el esquema de este plásmido.

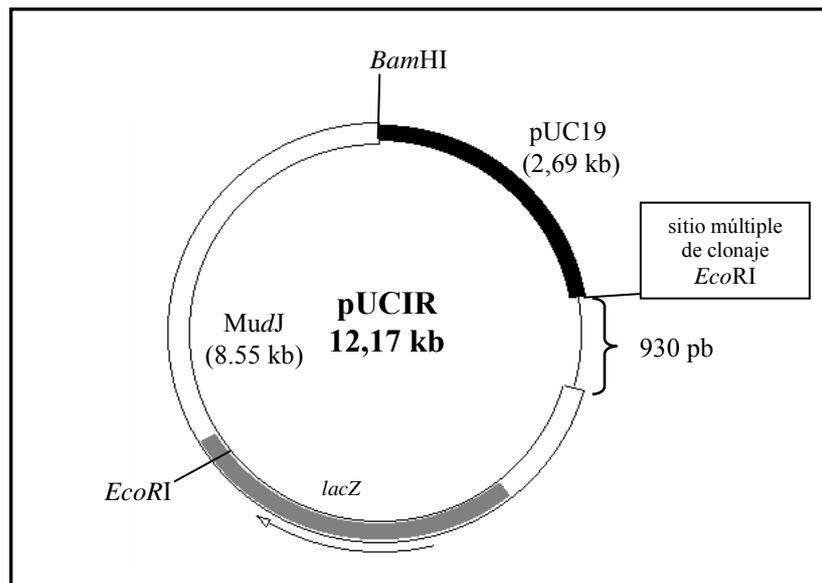


Fig. 3.2.3. Esquema del plásmido pUCIR. Se muestran el vector pUC19 (en negro), parte del fago MudJ (en blanco) con el gen *lacZ* (en gris), y 930 pb de secuencia desconocida donde se encontraría el promotor de *yfeR*. También se han señalado las dianas *EcoRI* y *BamHI* del plásmido.

A partir del plásmido pUCIR y con el oligonucleótido pUC19L, perteneciente al sitio múltiple de clonaje del vector pUC19, se obtuvo una secuencia de 350 pb que se indica en la figura 3.2.4.

```
AAGCCGCATNTACGGGCGACAAANACGTTAATGGCTATGACNATCGCNGCAGTATGAGGCTG
ACCACGACNATAAACANCAGCGATCCCCAGCCGACTTTGTGCCAGATGCCGTTGACCACCGC
TTCGCTGAACGCCGAGTAGACCACCAACNGAATAGAGGTCTGATCCGTTTTCGCGATCCACTT
TTTGTTGCGCGCGACCCAATTGCCGATCCACGGGCGAGACNGGTGTCCCAGCACAAAAGGCA
GCTNCNGTTGCAGCATAATTTGCCNCCTCTTCCAGACTGCCCTGCGCGCCATGAATATTCN
TTACCAGACCGACCAGCAGCGGCGACNGGAAAATGCC
```

Fig. 3.2.4. Secuencia obtenida a partir del plásmido pUCIR con el oligonucleótido pUC19L. En la secuencia se muestran subrayadas las bases del oligonucleótido LIG2 (ver más adelante).

A partir de la secuencia nucleotídica de la figura 3.2.4 se realizó una búsqueda de homologías en la base de datos que incluye los bancos de secuencias GenBank, EMBL, DDJB y PDB, utilizando el programa BLAST_N del NCBI. Se encontró un 80% de homología con la secuencia comprendida entre los nucleótidos 9342 al 9130 de la sección 218 a la 400 del genoma completo de *Escherichia coli* K-12 MG-1655 (gi/2367135 del GenBank). Este intervalo de secuencia pertenece a una hipotética pauta de lectura abierta, descrita en aquel momento como una hipotética citocromo oxidasa, codificada por el gen

yfeH. Este gen es adyacente al gen *yfeR* de *E. coli* y se transcribe de forma divergente, por lo que se dedujo que en *S. Typhimurium* se mantenía esta misma estructura. Muchos reguladores de la familia LysR modulan la expresión de sus genes adyacentes que además suelen transcribirse de forma divergente. En el apartado 3.5 de esta Tesis Doctoral se explica cómo se secuenció el gen *yfeH* y el análisis de su secuencia, pero este apartado se centra en la región promotora del gen *yfeR*, comprendida entre ambos.

Según la homología de secuencia con el gen *yfeH* de *E. coli*, aún quedaban por secuenciar 585 pb hasta llegar al inicio de traducción del gen *yfeR*. Solapando dos reacciones de secuenciación con los oligonucleótidos LIG2 (fig. 3.2.4) y LIG4 (fig. 3.2.5) se consiguió llegar a la región intergénica entre *yfeR* y *yfeH*, y por lo tanto a la región promotora del gen *yfeR*, además de localizar la inserción de MudJ en el gen *yfeR*. Según la secuencia obtenida por el Dr. Prenafeta y Carolina Polo a partir del extremo 3' del MudJ, la inserción estaba localizada 4 nucleótidos antes del inicio de traducción de *yfeR*. Por la secuencia obtenida en este trabajo a partir del plásmido pUCIR con el oligonucleótido LIG4, se comprobó que 9 pb se repetían a ambos lados del transposón, señalados en la figura 3.2.5.

La figura 3.2.5 muestra asimismo la secuencia del gen *yfeR* y la traducción a proteína obtenida utilizando el programa "ORF finder" del NCBI. El hipotético polipéptido para el que codifica *yfeR* presenta una secuencia de 308 aminoácidos, y un peso molecular estimado de 33.980 Da. El posible sitio de unión al ribosoma (RBS) se encuentra 9 pb antes del inicio de traducción de YfeR. También se muestra en la fig. 3.2.5 la secuencia parcial del gen *yfeH*. La traducción a proteína de esta secuencia utilizando el "ORF finder" (no mostrada en esta figura), situó el codón de inicio de traducción del gen *yfeH* a 89 pb del de inicio de *yfeR*. Por tanto los dos genes están separados por una región intergénica de 89 pb y se transcriben de forma divergente. Esta es una característica compartida de muchos genes adyacentes que en muchos casos están regulados por la proteína de la familia LysR. Además, 52 pb antes del inicio de traducción del gen *yfeH* se identificó el motivo AATAA-N₇-TTATT, también señalado en la figura 3.2.5. Este motivo, llamado T-N₁₁-A, con la T y la A formando parte de una repetición invertida, fue propuesto (Goethals *et al.*, 1992) y aceptado en numerosos estudios como la secuencia consenso de unión de las proteínas LysR (Von Lintig *et al.*, 1994; Parke, 1996).

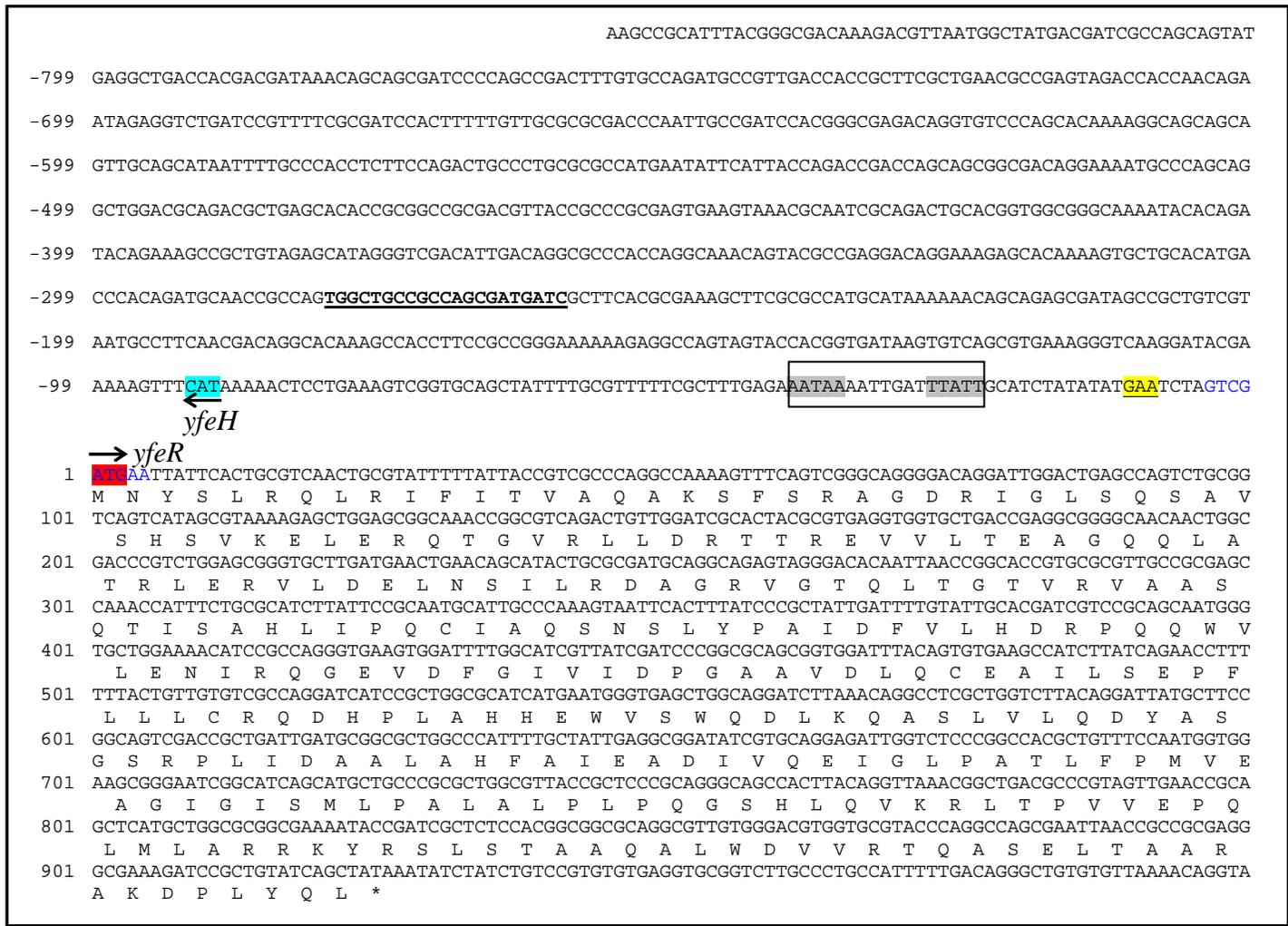


Fig. 3.2.5. Secuencia del gen *yfeR* y de su traducción a proteína. También se muestra la secuencia parcial del gen adyacente *yfeH*, obtenida a partir de la secuenciación del plásmido pUCIR. Se han señalado el inicio de traducción de *yfeR* (■) y de *yfeH* (□), y el posible sitio de unión al ribosoma (■). Se ha recuadrado el dominio de unión de las proteínas LysR, marcando la repetición invertida sobre un fondo gris. El oligonucleótido LIG4 se presenta en negrita y subrayado. Los 9 pb repetidos en ambos extremos del fago MudJ se muestran en letras azules.

3.3 ANÁLISIS DE SECUENCIA DE LA PROTEÍNA YfeR

Tal y como se ha mencionado anteriormente la traducción a proteína de la secuencia nucleotídica de la inserción del fago MudJ en la cepa YFER mediante el programa “ORF finder” del NCBI, reveló una pauta de lectura abierta, que denominamos *yfeR*, con un codón de inicio de la traducción ATG precedido por un posible sitio de unión al ribosoma GAA (RBS) en la posición -9. Esta pauta de lectura abierta codifica para un hipotético polipéptido de 308 residuos aminoácidos con un peso molecular estimado de 33.980 Da.

La búsqueda de homologías utilizando el programa NCBI BLASTP de las bases de datos EXPASY/Uniprot revela un elevado grado de homología con varios miembros de la familia LysR de reguladores transcripcionales, ya sean hipotéticos o caracterizados. En la tabla 3.3.1 se muestran los grados más altos de homología encontrados. Posiblemente los diferentes números de acceso de *Salmonella* o *E. coli* que tienen el mismo porcentaje de similitud corresponden a la misma proteína, secuenciada por vías diferentes. Entre algunas de la proteínas LysR ya caracterizadas como tal con las que encuentra homología están: OxyR de *E. coli* (P11721) con un 51 % de similitud o CynR de *E. coli* con un 47 % de similitud (P27111). En los resultados de búsqueda de homologías YfeR está referido como un hipotético regulador, pero hasta el momento no existen estudios sobre el análisis y la función del gen.

Tabla 3.3.1. Proteínas de más elevado grado de homología con YfeR según el programa BLASTP utilizando las bases de datos EXPASY/UniProt.

AC	DESCRIPCIÓN	I	S
Q83T76	Hipotético regulador transcripcional (T0433) (<i>Salmonella typhi</i>)	98 %	98 %
Q8ZN92	Hipotético regulador transcripcional, familia LysR (YFER) (<i>Salmonella typhimurium</i>)	98 %	98 %
Q8Z4W6	Hipotético regulador transcripcional (STY2660) (<i>Salmonella Typhi</i>)	98 %	98 %
Q8FFC4	Hipotético regulador transcripcional YfeR (YFER) (<i>Escherichia coli</i> O6)	78 %	86 %
P77500	Hipotético regulador transcripcional YfeR HTH-tipo (YFER) (<i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella flexneri</i>)	77 %	85 %
Q8XBM8	Hipotético regulador transcripcional tipo LYSR (YFER_1) (<i>Escherichia coli</i> 0157:H7)	78 %	87 %

AC: número de acceso; I: identidad; S: similitud

Para la búsqueda de dominios estructurales se analizó la secuencia aminoacídica con el “Conserved Domain Search” (CDD) del NCBI (Marchler-Bauer *et al.*, 2003), y Pfam del “Sanger Institute” (Bateman *et al.*, 2004). En la región N-terminal de la proteína YfeR, de los residuos 5 al 64, reconocen un dominio HTH (pfam 00126) (Tyrrell *et al.*, 1997), “helix-turn-helix”, de unión al ADN, característico de las proteínas LysR. En la figura 3.3.1 se muestra el alineamiento de esta región de YfeR con el dominio consenso del “Conserved Domain Search”.

YfeR :	5	LRQLRIFITVAQAKSFSRAGDRIGLSQSAVSHSVKELERQ	TGVRLLDRTTREVVLTEAGQ	64
Cons. :	1	LRQLRAFVAVAEEGSFTRAAEELGLSQPAVSRQIRL	EELGVPLFERTGRGLRLTEAGE	60

Fig. 3.3.1. Alineamiento del dominio HTH de YfeR con el dominio HTH consenso según el CDD del NCBI. Los aminoácidos idénticos son de color rojo y los similares azules.

El intervalo comprendido entre los residuos 88 al 294 de la proteína YfeR, corresponde a un dominio de unión a sustrato de las proteínas LysR (pfam 03466) (Tyrrell *et al.*, 1997). La estructura terciaria de este dominio, de una longitud media aproximada de 207 aminoácidos, es similar a la de las proteínas de unión del periplasma (PBP). En la figura 3.3.2 se muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de esta región de YfeR con el dominio consenso del “Conserved Domain Search”.

YfeR :	88	GTQLTGTVRVAASQTISAHLPQCIAQNSNLYPAIDFV	LHDRPQQWVLENIRQGEVDFGI	147					
Cons. :	1	AGGPRGRLRIGAPPTFAAYLLPPLLARFRERYPD	VELELVEGDSAELLDLLAEGELDLAI	60					
YfeR :	148	VIDPGAAVDLQCEAILS	EPFLLLRCQDHPLAHHEWVSWQDLKQASLVLQDYASGSRPLID	207					
Cons. :	61	RRGPPDDPGL	EARPLFEPLVLVAPPDHPLARGE	PVSEDLADEPLILLEPGSGLRDLVD	120				
YfeR :	208	AALAHFAIEADIVQ	EIGLPATLFP	MEAGIGISMLPALAL-PLPQGS	HLQVKRLT-PVVE	265			
Cons. :	121	RALRRAGLE	PRVALEVN	SLEALLALVAAGLGI	ALLPRS	AVARELADGR	LVVLP	LPDPPLP	180
YfeR :	266	PQLMLARRKYRSL	STAAQALWDV	VVRTQAS	294				
Cons. :	181	RP	IYLVYRKGR	RLSPAVRA	FIDFLREALA	209			

Fig. 3.3.2. Alineamiento del teórico dominio de unión a sustrato de YfeR y la secuencia consenso para este dominio de las proteínas LysR según el CDD del NCBI. Los aminoácidos idénticos son de color rojo y los similares azules.

En la figura 3.3.3 se muestra el alineamiento de la región amino-terminal de YfeR y otras proteínas LysR caracterizadas como tal, con la secuencia consenso propuesta por Schell (1993) para el extremo N-terminal de las proteínas LysR, la región más altamente conservada en los miembros de esta familia de reguladores. Además YfeR tiene una longitud de 308 residuos, tamaño característico de las proteínas LysR (muchas de la

3.4 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *yfeR*

3.4.1 OSMOREGULACIÓN DE *yfeR*

Teniendo en cuenta que el gen *yfeR* fue identificado mediante mutagénesis con el fago MudJ, se utilizó la fusión generada *yfeR::lacZ* para cuantificar el efecto de la osmolaridad sobre la expresión de *yfeR*.

3.4.1.1 Valoración de la actividad β -galactosidasa de la cepa YFER en medio LB a baja y elevada osmolaridad

Para evaluar la expresión del gen *yfeR* en función de la osmolaridad del medio se valoró la actividad β -galactosidasa de la cepa YFER (*yfeR::lacZ*) a 37°C en medio LB a diferentes osmolaridades: LB 0 M NaCl (baja osmolaridad), LB y LB 0,5 M NaCl (elevada osmolaridad). El ensayo se realizó en diferentes puntos de la curva de crecimiento: fase exponencial ($DO_{600}=0,5$), inicio fase estacionaria ($DO_{600}=1$) y fase estacionaria (10 h desde el inóculo inicial).

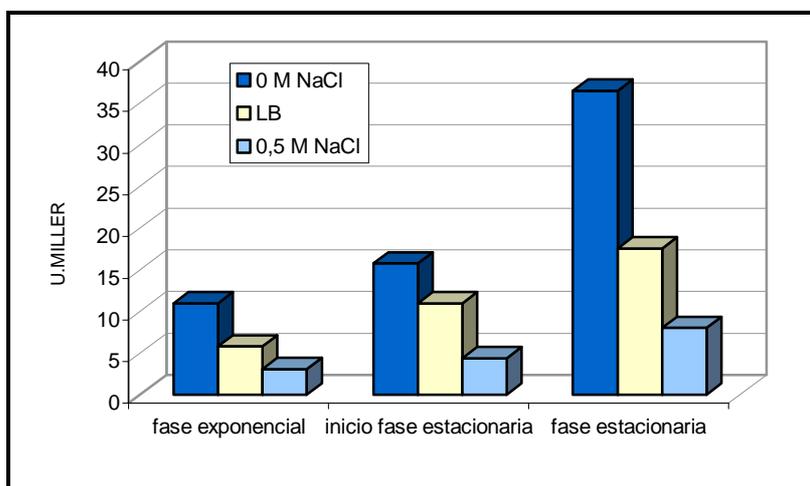


Fig. 3.4.1. Osmoregulación del gen *yfeR*. Actividad β -galactosidasa de la cepa YFER en LB 0M NaCl, LB y LB 0,5 M NaCl en fase exponencial ($DO_{600}=0,5$), inicio de fase estacionaria ($DO_{600}=1$) y fase estacionaria (10 h.).

En la figura 3.4.1 se observa que los valores de actividad β -galactosidasa son unas cuatro veces superiores cuando la cepa crece en medio de baja osmolaridad (LB 0 M

NaCl), respecto a cuando crece en medio de elevada osmolaridad (LB 0,5 M NaCl). Esta diferencia se mantiene en los puntos estudiados de la curva de crecimiento, aunque también es importante señalar que la expresión del gen *yfeR* aumenta en fase estacionaria tanto a baja como a elevada osmolaridad.

3.4.1.2 Valoración de la actividad β -galactosidasa de la cepa YFER en LB con KCl o sacarosa

En función de los datos obtenidos en la valoración de la actividad β -galactosidasa en medio LB a distintas osmolaridades (apartado 3.4.1.1), parecía quedar demostrado que la expresión del gen *yfeR* está regulada por la osmolaridad del medio de cultivo. Sin embargo, se planteó si este efecto sería debido específicamente a la presencia del NaCl o a la osmolaridad del medio, independientemente de qué osmolito la provocara. Así, se decidió estudiar si el incremento de la osmolaridad del medio como consecuencia de la adición de KCl o sacarosa podía provocar el mismo efecto de represión de la transcripción que el causado por el NaCl.

El medio LB de elevada osmolaridad utilizado en este experimento se preparó sin NaCl, substituyéndolo por KCl 0,5 M o sacarosa 0,7 M. La osmolaridad del medio LB sin NaCl con sacarosa 0,7 M (1.020-1.070 mOsm/kg H₂O) es similar a la del medio LB con NaCl 0,5 M (990-1.040 mOsm/kg H₂O); y en el caso del KCl es la misma.

En la figura 3.4.2 se presentan los resultados obtenidos. Es aparente que la presencia en el medio de KCl o sacarosa también presenta un efecto inhibitor de la expresión del gen *yfeR*, por lo que cabe concluir que la transcripción de este modulador perteneciente a la familia LysR se reprime cuando aumenta la osmolaridad del medio.

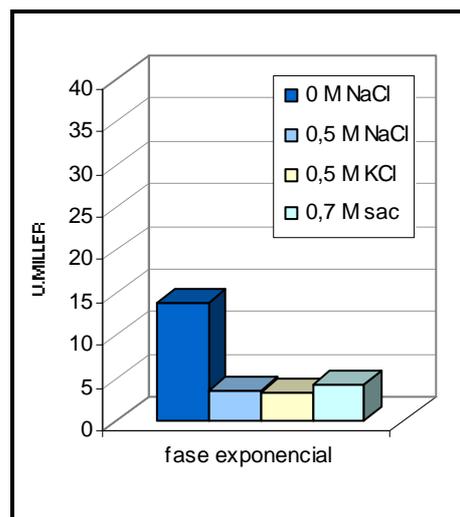


Fig. 3.4.2. Osmoregulación del gen *yfeR*. Actividad β-galactosidasa de la cepa YFER en LB 0 M NaCl, LB 0,5 M NaCl, LB 0,5 M KCl y LB 0,7 M sacarosa, en fase exponencial ($DO_{600}=0,5$).

3.4.1.3 Evaluación de la transcripción del gen *yfeR* mediante un ensayo de protección contra la RNasa ONE™

Los experimentos realizados hasta el momento indicaban que el grado de expresión del gen *yfeR* estaba regulado por la osmolaridad del medio. Sin embargo, los datos obtenidos con la fusión *yfeR*::*MudJ* no eran más que una medida indirecta de la transcripción del gen. Para tener una valoración directa se determinaron los niveles de ARNm del gen *yfeR* en un fondo genético salvaje (*yfeR*⁺), mediante un ensayo de protección contra la RNasa ONE™.

Antes del ensayo propiamente dicho fue necesario obtener una sonda de ARN antisentido marcada radioactivamente (apartado 2.6.3.1 de material y métodos). Esta sonda se obtuvo a partir del clonaje en el vector pET3b del gen *yfeR*, de forma que mediante transcripción *in vitro* se sintetizara una sonda de ARN complementaria al mensajero. Para el clonaje se amplificó por PCR (T^a de hibridación 58°C) con los oligonucleótidos RNA-*Bam*HI y RNA-*Nde*I (fig. 3.4.3) un fragmento del gen *yfeR* de 332 pb. Estos oligonucleótidos introducen en la secuencia las dianas *Bam*HI y *Nde*I, utilizadas para el clonaje en un vector pET3b digerido con estos mismos enzimas. El resultado de una ligación entre el vector y el fragmento de amplificación se transformó a la cepa *E.coli* HB101 seleccionando los clones resistentes a Ap. Para el escrutinio de los transformantes se realizó una reacción de PCR directamente a partir de colonia (T^a de hibridación 52°C)

con los oligonucleótidos PETBAM y PETNDE (fig. 3.4.3), pertenecientes al plásmido pET3b. Una reacción de amplificación con estos oligonucleótidos de un plásmido pET3b con inserto genera un fragmento mayor que la de un plásmido pET3b sin inserto: en nuestro caso de 580 y 248, respectivamente. Finalmente se aisló el ADN plasmídico, y se digirió con los enzimas *Bam*HI y *Nde*I para comprobar que la construcción era la correcta.

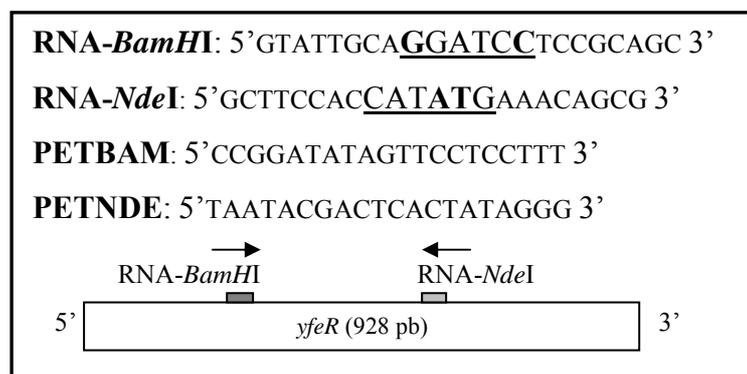


Fig. 3.4.3. Oligonucleótidos utilizados en la construcción del plásmido pETYFER_r. RNA-*Bam*HI y RNA-*Nde*I introducen respectivas dianas *Bam*HI y *Nde*I en el gen *yfeR* necesarias para el clonaje en el vector pET3b. Se han subrayado las dianas y se han marcado en negrita las bases modificadas de la secuencia original. También se ha indicado su posición respecto al gen *yfeR*. PETBAM y PETNDE se utilizaron para el escrutinio de transformantes.

El vector pET3b que contenía el fragmento del gen *yfeR* se denominó pETYFER_r (fig.3.4.4), y una vez linealizado con *Bam*HI fue utilizado como molde para la síntesis de la sonda. Hay que tener en cuenta que en el plásmido pET3b el promotor de T7 se encuentra justo antes de la diana *Nde*I, y si nos fijamos en el esquema de la localización de los oligonucleótidos RNA-*Bam*HI y RNA-*Nde*I (fig. 3.4.3), el fragmento de ADN clonado en el plásmido tendrá la dirección de transcripción a la inversa de la del gen *yfeR*, hecho indispensable para que se obtenga una sonda antisentido.

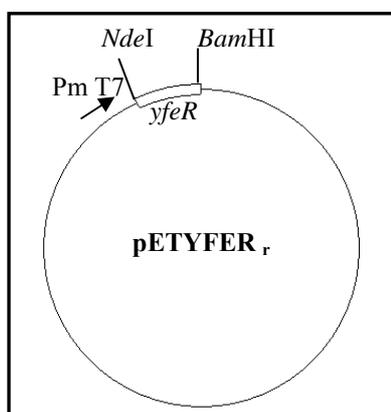


Fig. 3.4.4. Esquema del plásmido pETYFER_r. A continuación del promotor de T7 se encuentra la diana *Nde*I con el fragmento del gen *yfeR* RNA-*Nde*I-RNA-*Bam*HI, y que por lo tanto se transcribe en dirección opuesta a la del gen *yfeR*.

A continuación se procedió al aislamiento del ARN total de la cepa TT1704 (*yfeR*⁺) mediante el método del fenol ácido caliente (apartado 2.6.1.1 de material y métodos), a partir de cultivos en fase exponencial y estacionaria crecidos en LB 0 M y 0,5 M NaCl. El ARN aislado fue finalmente analizado mediante el ensayo de protección de la RNasa ONETM.

En la fig. 3.4.5 se observa, al comparar los niveles de ARNm de la cepa TT1704 según la osmolaridad del medio y la fase de crecimiento, que el gen *yfeR* se transcribe a 0 M y que su expresión es mayor en fase estacionaria que en exponencial. Estos datos corroboran los resultados de actividad β -galactosidasa presentados en los apartados anteriores.

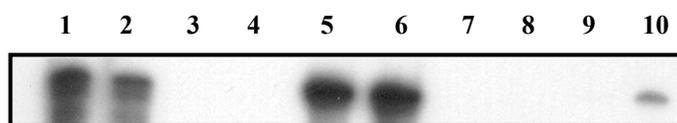


Fig. 3.4.5. Análisis de la transcripción del gen *yfeR*. Se muestra la autoradiografía posterior al análisis electroforético (gel de poliacrilamida al 5 %/urea 7 M) del RNA protegido contra la RNasa ONETM. En cada carril se analizó un RNA extraído de la cepa TT1704 en diferentes condiciones. Carriles 1 y 2: LB 0 M NaCl en fase exponencial; carriles 3 y 4: LB 0,5 M NaCl en fase exponencial; carriles 5 y 6: LB 0 M en fase estacionaria; carriles 7 y 8: LB 0,5 M NaCl en fase estacionaria; carriles 9 y 10: diluciones 1/100 y 1/10 de la sonda radioactiva.

3.4.2 AUTOREGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *yfeR*

Una de las características común a muchos reguladores transcripcionales de la familia LysR es la capacidad de modular su propia transcripción, actuando como represores. Para comprobar si el gen *yfeR* presentaba esta autorregulación se decidió proporcionar a la cepa YFER el producto del gen *yfeR* en *trans*, y valorar a continuación su actividad β -galactosidasa.

3.4.2.1 Clonaje del gen *yfeR* en un vector pLG338-30

Con la finalidad de proporcionar la proteína YfeR en *trans* a la cepa YFER se decidió clonar el gen *yfeR* en el plásmido pLG338-30, que presenta un número bajo de copias. Para obtener el gen *yfeR* entero se utilizaron los oligonucleótidos OSMTE y OSMTB (fig. 3.4.6). El oligonucleótido OSMTE es complementario en dirección 5' a una secuencia localizada a 540 pb del inicio de traducción del gen *yfeR*, pero algunas bases han sido modificadas para introducir una diana *EcoRI*. El oligonucleótido OSMTB es complementario en dirección 3' a una secuencia a 230 pb del final de traducción del gen *yfeR*, aunque también presenta algunas bases modificadas para formar una diana *BamHI*.

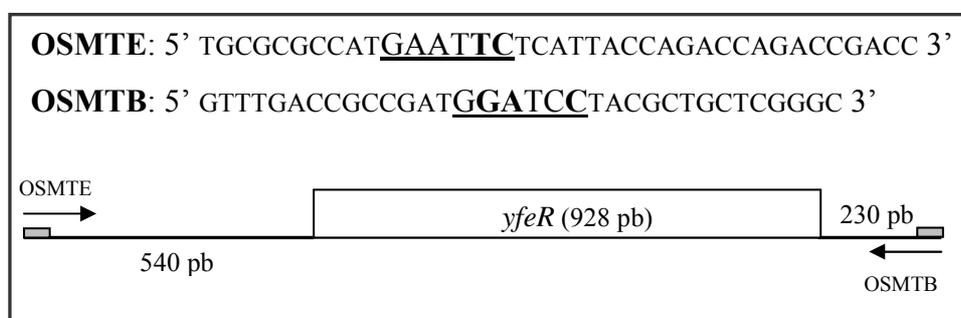


Fig. 3.4.6. Secuencia de los oligonucleótidos OSMTE y OSMTB y esquema de la región que amplifican, así como su localización respecto *yfeR*. Se han subrayado en la secuencia las dianas *EcoRI* (OSMTE) y *BamHI* (OSMTB). También se han marcado en negrita las bases modificadas de la secuencia original para formar la diana.

El producto de amplificación de 1698 pb resultante de una reacción de PCR con los oligonucleótidos OSMTE-OSMTB, fue digerido con los enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*. A continuación se ligó al vector pLG338-30 digerido previamente con los mismos enzimas y posteriormente defosforilado. La ligación se transformó a la cepa de *E.coli* HB101 y se seleccionaron los clones resistentes a Ap. Se aisló el ADN plasmídico de algunos de los transformantes y se comprobó por análisis de restricción que la construcción era la correcta. El plásmido pLG338-30 que contenía el producto de PCR OSMTE-OSMTB, y por lo tanto el gen *yfeR* entero incluyendo su promotor, fue denominado pLGYFER.

3.4.2.2. Valoración de la actividad β -galactosidasa de las cepas YFER, YFER (pLG338-30) y YFER (pLGYFER)

Una vez construido el plásmido pLGYFER se transformó a la cepa YFER. Al introducir en esta cepa un plásmido de bajo número de copias con el gen *yfeR* entero, y por lo tanto proporcionar en *trans* su producto, se podía valorar la actividad β -galactosidasa de la fusión transcripcional cromosómica *yfeR::MudJ* en un fondo genético *yfeR*⁺, y por lo tanto comprobar qué efecto tiene sobre su propia transcripción. También se transformó el vector pLG338-30 a la cepa YFER para descartar cualquier efecto del plásmido sobre los valores de actividad β -galactosidasa. El paso siguiente fue la valoración de la actividad β -galactosidasa de las cepas YFER, YFER (pLG338-30) y YFER (pLGYFER), en diferentes puntos de la curva de crecimiento de cultivos a 37°C en LB a baja y elevada osmolaridad, 0 M y 0,5 M NaCl respectivamente.

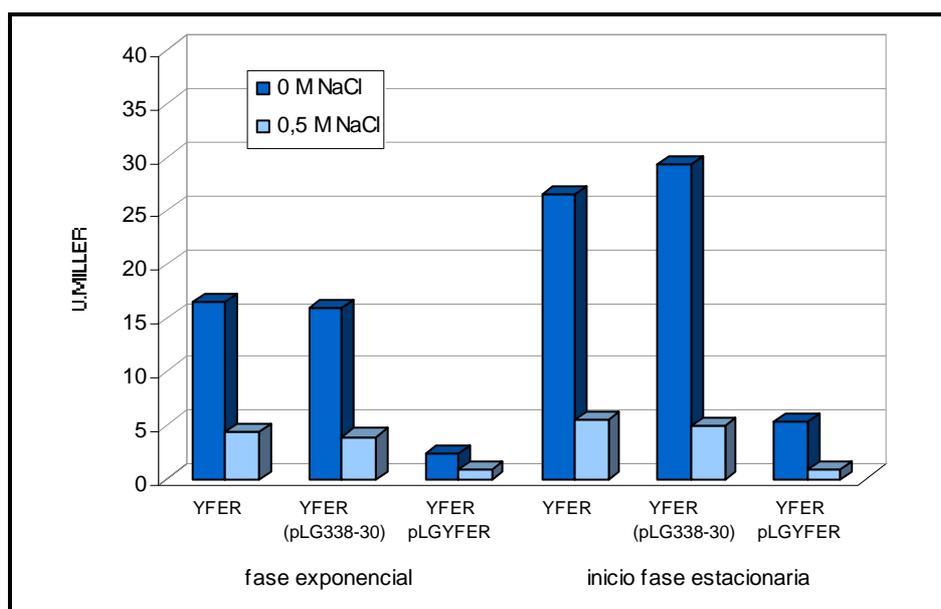


Fig. 3.4.7. Autoregulación de la transcripción del gen *yfeR*. Actividad β -galactosidasa de las cepas YFER, YFER (pLG338-30) y YFER (pLGYFER), crecidas en LB 0 M NaCl y LB 0,5 M NaCl, en fase exponencial ($DO_{600}=0,5$) e inicio fase estacionaria ($DO_{600}=1$).

Como se puede observar en la figura 3.4.7 los valores de actividad β -galactosidasa disminuyen en la cepa YFER (pLGYFER), lo que sugiere que el gen *yfeR*, como pasa en otros reguladores transcripcionales de la familia LysR, regula su propia transcripción, autoreprimiéndose.

3.5 SECUENCIACIÓN DEL GEN *yfeH* Y ANÁLISIS DE SECUENCIA DE LA PROTEÍNA YfeH

3.5.1 SECUENCIACIÓN DEL GEN *yfeH*

Como se ha descrito en el apartado 3.2 de esta sección, al secuenciar la región promotora del gen *yfeR* desde el sitio múltiple de clonaje del plásmido pUCIR (fig. 3.2.3), se identificó una ORF que se denominó *yfeH* por homología con la secuencia de *E.coli*. Tanto la traducción a proteína de esta secuencia utilizando el programa “ORF finder” del NCBI, como la homología de secuencia con el gen *yfeH* de *E. coli*, situaban el codón de inicio de traducción a 89 pb del inicio del gen *yfeR*, transcribiéndose de forma divergente (fig. 3.2.5). Ésta es una característica compartida de muchos reguladores LysR y sus genes regulados. Sin embargo, con la secuencia obtenida a partir del plásmido pUCIR no se encontró un codón de terminación de la transcripción. El fragmento de ADN a 5' de la inserción *yfeR::MudJ* incluido en el plásmido es tan sólo de 930 pb, mientras que el gen *yfeH* de *E. coli* tiene 999 pb. Por lo tanto, fue necesario diseñar un nuevo oligonucleótido a partir de la secuencia obtenida, denominado CIT1 (fig. 3.5.1), que avanzase en dirección 3' del gen *yfeH* y utilizar como molde de la siguiente reacción de secuenciación el cósmido pLACP. De esta forma se obtuvo la secuencia completa del gen *yfeH*, de 999 pb. En la figura 3.5.1 se muestra la secuencia completa del gen y su traducción a proteína utilizando el programa “ORF finder” del NCBI. En resumen, a 89 pb del inicio de traducción del gen *yfeR* (fig. 3.2.5), se encuentra una ORF de 999 pb, denominada *yfeH*, que se transcribe de forma divergente a *yfeR*, y que codificaría para un polipéptido YfeH de 332 residuos aminoacídicos y un peso molecular estimado de 36.050 Da.

```

1  ATGAAACTTTTTTCGTATCCTTGACCCTTTACGCTGACACTTATCACCGTGGTACTACTGGCCTCTTTTTTC
M K L F R I L D P F T L T L I T V V L L A S F F
72  CCGCGGAAGGTGGCTTTGTGCCTGTGTTGAAGGCATTACGACAGCGGTATCGCTCTGCTGTTTTATG
P A E G G F V P V V E G I T T A A I A L L F F M
144  CATGGCGGAAGCTTTTCGCGTGAAGCGATCATCGCTGGCGGCAGCCACTGGCGGTTGCATCTGTGGGTCTAG
H G A K L S R E A I I A G G S H W R L H L W V M
216  TGCAGCACTTTTGTGCTCTTCCCTGTCCGGCGTACTGTTTGCCTGGTGGGCGCCTGTCAATGTGACCCCT
C S T F V L F P V L G V L F A W W A P V N V D P
288  ATGCTCTACAGCGCTTTCTGTATCTGTGTATTTTCCCGCCACCGTGCAGTCTGCGATTGCGTTTACTTCA
M L Y S G F L Y L C I L P A T V Q S A I A F T S
360  CTCGGGGCGGTAACGTGCGGGCCGGGTGTGCTCAGCGTCTGCGTCCAGCCTGCTGGGCATTTTCTGTGCG
L A G G N V A A A V C S A S A S S L L G I F L S
432  CCGCTGCTGGTGGTCTGGTAATGAATATTATGCGCGCAGGGCAGTCTGGAAGAGTGGGCAAAATATG
P L L V G L V M N I H G A Q G S L E E V G K I M
504  CTGCAACTGCTGCTGCCTTTTGTGCTGGGACACCTGTCTCGCCCGTGGATCGGCAATTGGGTGCGCGCAAC
L Q L L L P F V L G H L S R P W I G N W V A R N
576  AAAAGTGGATCGGAAAACGGATCAGACCTCTATTCTGTTGGTGGTCTACTCGGCGTTCAGCGAAGCGGTG
K K W I A K T D Q T S I L L V V Y S A F S E A V
648  GTC AACGGCATCTGGCACAAAGTCGGCTGGGGATCGTCTGTTTATCGTCGTGGTCAGCCTCATACTGCTG
V N G I W H K V G W G S L L F I V V V S L I L L
720  GCGATCGTCATAGCCATTAACGTCTTTGTGCCCCGTAATGCGGCTTCAATAAAGCCGACGAAATCACTATT
A I V I A I N V F V A R K C G F N K A D E I T I
792  GTCTTCTGCGTTTCGAAAAAAGCCTGGCCAACGGGATCCCGATGCCAAATATTCTGTTTCCGACGTCAGTG
V F C G S K K S L A N G I P M A N I L F P T S V
864  CTGGGTATGATGTATTACCGCTGATGATCTTCCACCAGATCCAACTGATGGTCTGCGCAGGGCTGGCGCGG
L G M M V L P L M I F H Q I Q L M V C A G L A R
936  CGTACAAACGCCAGACCAGAAAGTTACAGGCGCAGCAGGAAAGCCGCGCGGAAAGCTTAA
R Y K R Q T E K L Q A Q Q E S R A A K A *

```

Fig. 3.5.1. Secuencia del gen *yfeH* y traducción a proteína según el “ORF finder” del NCBI. El codón de inicio de traducción y otros codones alternativos están marcados en negrita, y el de terminación de la traducción en negrita y subrayado. El oligonucleótido CIT1 está subrayado.

3.5.2 ANÁLISIS DE SECUENCIA DE YfeH

Una vez obtenida la secuencia aminoacídica de YfeH (fig. 3.5.1), de 332 aminoácidos, se procedió a la búsqueda de homologías utilizando el programa NCBI BLASTP de las bases de datos EXPASY/Uniprot. En la tabla 3.5.1 se muestran los grados más altos de homología encontrados. La proteína YfeH está descrita en *S. Typhimurium* como un hipotético transportador dependiente de Na^+ , y en *E. coli* como una hipotética citocromo oxidasa. Las proteínas con las que YfeH tiene homología no tienen una función conocida, pero la mayoría están descritas como probables o hipotéticos transportadores o proteínas de membrana. Tan sólo una proteína tiene un artículo referenciado, y está descrita como una proteína de *Pseudomonas fluorescens* que se induce después de una limitación de fosfato (Kragelund *et al.*, 1997), con un 46% de identidad y un 64% de similitud. Posiblemente los diferentes números de acceso de *E. coli* o *Yersinia* que tienen el mismo porcentaje de similitud corresponden a la misma proteína, secuenciada por vías diferentes.

Tabla 3.5.1. Proteínas de mayor grado de homología con YfeH según el programa BLASTP utilizando las bases de datos EXPASY/UniProt.

AC	DESCRIPCIÓN	I	S
Q8FFC3	Hipotética proteína YfeH (YFEH) (<i>Escherichia coli</i> O6)	90 %	94 %
Q8XBM6	Hipotética citocromo oxidasa (YFEH) (<i>Escherichia coli</i> O157:H7)	90 %	94 %
Q83K82	ORF, hipotética proteína conservada (hipotética citocromo oxidasa) (YFEH) (<i>Shigella flexneri</i>)	90 %	94 %
P39836	Hipotética proteína YfeH (YFEH) <i>Escherichia coli</i>	90 %	94 %
Q7N4G4	Similar a hipotética citocromo oxidasa (PLU2374) (<i>Photorhabdus luminescens</i> (subsp. laumondii))	63 %	79 %
Q8ZEC0	Hipotética proteína de membrana (Hipotética citocromo oxidasa) (YPO2260)(<i>Yersinia pestis</i>)	62 %	75 %
AAS62269	Hipotética proteína de membrana (YP2056) (<i>Yersinia pestis</i> biovar Mediaevails str. 91001]	62 %	75 %
P39879	Hipotética proteína PA2026 (PA2026) (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	58 %	71 %

AC: número de acceso; I: identidad; S: similitud.

Con el fin de obtener más información sobre la posible función de YfeH, se procedió a la búsqueda de dominios estructurales. Se utilizaron los programas “Conserved Domain Search” (CDD) del NCBI (Marchler-Bauer *et al.*, 2003), y Pfam del “Sanger Institute” (Bateman *et al.*, 2004). El programa CDD del NCBI reconoce tres dominios que se muestran en la figura 3.5.2. El dominio COG0385 está presente en un grupo de proteínas con una predicción de función como probables transportadores dependientes de Na^+ . El tercer dominio, ACR3, forma parte de un grupo de proteínas descritas como bombas de eflujo de arsenito ACR3 y permeasas relacionadas. Estos dominios están relacionados entre ellos, y ambos al mismo tiempo con el dominio SBF (“sodium bile acid symporter family”), reconocido en YfeH también por el programa Pfam del “Sanger Institute”.

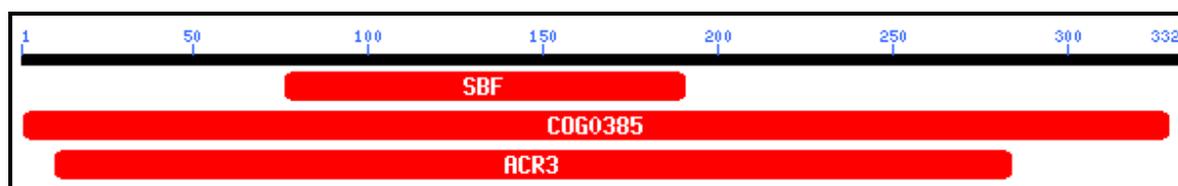


Fig. 3.5.2. Dominios presentes en la proteína YfeH según el CDD del NCBI.

El dominio “pfam 01758” o SBF está presente en cotransportadores de Na^+ /ácidos biliares. Estas proteínas de membrana están presentes en hepatocitos y su función es

facilitar la salida de los ácidos biliares mediante un cotransporte con Na^+ (Hagenbuch *et al.*, 1991). También pertenece a la familia de cotransportadores de Na^+ y ácidos biliares (SBF), la proteína ACR3 de *Saccharomyces cerevisiae*, una hipotética proteína transmembrana implicada en la resistencia a compuestos de arsénico (Bobrowicz *et al.*, 1997). En la figura 3.5.3 se muestra el alineamiento del dominio encontrado en YfeH con el dominio consenso SBF según el programa Pfam.

```

*->allLflmMfsmglkvefedlkellrrvkPKalilgLllqyiImPllm
  a++L + M + l+ e   +++  +r  + +  +++l  +P+l+
41 AIALLFMHGAKLSREAI IAGGSHWRLHLWVMCSTFVL----FPVLG 83

  Filawl1.lrlppedepglavGliLvGcaPgg.amSnvwtylakGdveLs
  ++aw +++ +p    l  G + +++ P + +  +++t la+G+v+ +
84 VLFAWWApVNVDPM----LYSGFLYLCLPATvQSAIAFTSLAGGNVAAA 129

  vvmvalSTLlsillaplvtPLllfllagllvhvdtvegtlaavspislik
  v    S+    ll ++  PLl  l++ +  + +                l+ ++
130 VCSASASS----LLGIFLSPLLVLVLMNIHGAQG-----SLEEVG 165

  svLvyViiPliaGmltryflpkkkGrewfeqkvlpvlspisligllltiv
  + + +++P+ +G l+r ++                + v ++ ++i+ +  +++
166 KIMLQLLLPFVLGHLsrPWIG-----NwVARNKKWIAKTDQTSILL 206

  vifalngeviasl<-*
  v+++  +e +++
207 VVYSAFSEAVVNG      219

```

Fig. 3.5.3. Alineamiento de YfeH con el dominio consenso SBF según el programa Pfam. La secuencia numerada en letras mayúsculas corresponde a YfeH, mientras que en minúsculas se muestra la secuencia consenso. Entre ellas el signo + significa que son aminoácidos similares, y la letra del correspondiente aminoácido cuando son idénticos.

Dado que, por búsqueda tanto de homologías como de dominios estructurales todo parecía indicar que se trataba de una proteína de membrana, se buscó la posible presencia de hélices transmembrana con el programa TMHMM (Krogh *et al.*, 2001). En la figura 3.5.4 se muestra la predicción del programa que asignaría a YfeH 9 hélices transmembrana. Además el programa PSORT-B (Gardy *et al.*, 2003), utilizado para hacer una predicción de la posible localización celular de proteínas en bacterias Gram negativas, describe a YfeH como una proteína de membrana interna.

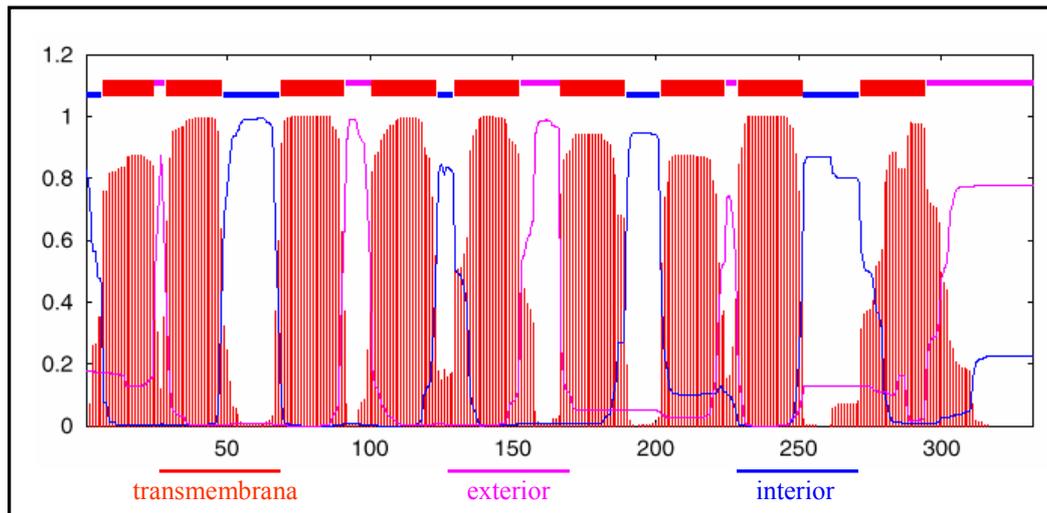


Fig. 3.5.4. Gráfico de la predicción del programa THMM. Se muestra la probabilidad que un segmento esté en el interior/exterior/transmembrana de la hélice. En la parte superior del gráfico (entre 1 y 1,2) se muestra la mejor predicción.

3.6 UNIÓN DE LA PROTEÍNA YfeR AL ADN

Tal y como sucede entre muchos reguladores LysR y sus genes regulados, en la región intergénica entre *yfeR* y *yfeH*, de 89 pb, se identificó una secuencia diana de unión al ADN T-N₁₁-A (apartado 3.2), reconocida por las proteínas LysR. Por tanto, se decidió determinar si YfeR interacciona con dicha secuencia.

3.6.1 SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA YfeR

Como paso previo a los estudios de interacción ADN-proteína se llevaron a cabo una serie de experimentos encaminados a sobreproducir la proteína YfeR. Para ello se utilizó el sistema de expresión de T7 (Studier *et al.*, 1990) en la cepa de *E.coli* BL21 (DE3) (pLysE), como se explica en el apartado 2.7.4 de materiales y métodos. Primero se construyó el plásmido pETYFER. Se amplificó el gen *yfeR* con los oligonucleótidos OSMTNDE (fig. 3.6.1) y OSMTB (fig. 3.4.6), que añaden dianas *NdeI* y *BamHI*, respectivamente. La temperatura de hibridación de la reacción de PCR fue de 50°C. La diana *NdeI* coincidía

con el inicio de traducción del gen *yfeR*, condición indispensable para la expresión de la proteína bajo la polimerasa de T7 en el vector pET3b. Después de la digestión con *NdeI* y *BamHI*, se ligó el fragmento de amplificación a un vector pET3b, digerido con estos mismos enzimas y posteriormente defosforilado. La ligación se transformó a la cepa de *E. coli* HB101. Se comprobaron los clones positivos portadores del plásmido pETYFER mediante una reacción de PCR con los oligonucleótidos KMR-7 y LYSRB (fig. 3.6.1), pertenecientes a la secuencia del gen *yfeR*. La temperatura de hibridación fue de 50°C. Finalmente se aisló el ADN plasmídico de los clones positivos en la reacción de PCR, y se analizó por restricción doble con *NdeI* y *BamHI*. Además del plásmido pETYFER también se transformó a la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) (pLysE) el plásmido pET3b, utilizado como control negativo.

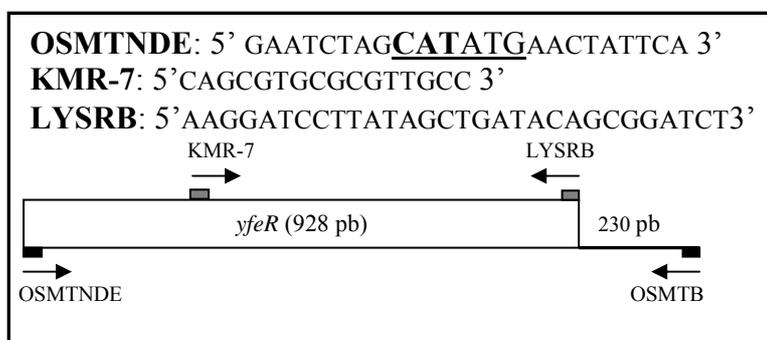


Fig. 3.6.1. Oligonucleótidos utilizados en la construcción del plásmido pETYFER. Se ha subrayado la diana *NdeI* que introduce el oligonucleótido OSMTNDE en la secuencia de *yfeR*, y en negrita las bases modificadas para construirla. Los oligonucleótidos KMR-7 y LYSRB se utilizaron en el escrutinio de transformantes.

La sobreexpresión se realizó como se explica en el apartado 2.7.4 de materiales y métodos. Después de la inducción con IPTG a una DO_{600} de 0,5 el cultivo se incubó a 37°C. Se recogieron extractos proteicos después de la inducción y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida. Como se muestra en la figura 3.6.2 la sobreexpresión de un polipéptido de 34 kDa se correlacionó con la presencia del plásmido pETYFER. El tamaño, además, coincidía con el esperado de la traducción de la secuencia del gen *yfeR* (33,980 kDa).

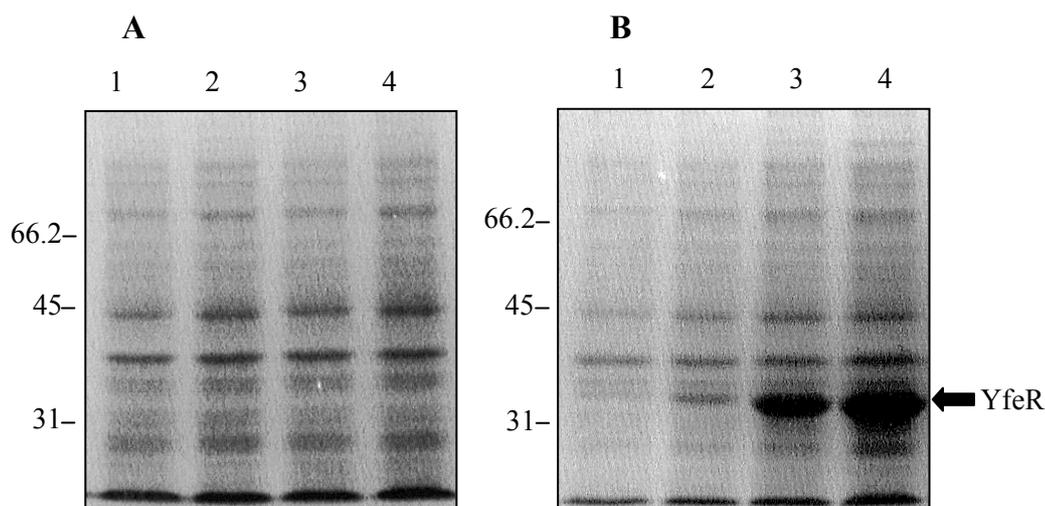


Fig. 3.6.2. Análisis en geles de poliacrilamida al 10% de la sobreexpresión del gen *yfeR* en la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pLysE). Los extractos celulares con el plásmido pET3b (A) o con el plásmido pETYFER (B) se recogieron a tiempo 0, 30 minutos, 90 minutos y 150 minutos (carriles 1, 2, 3 y 4 respectivamente) después de la inducción con IPTG. La flecha indica el tamaño del producto del gen *yfeR* de aproximadamente 34 kDa. A la izquierda se indican los tamaños del marcador de pesos molecular.

3.6.2 ENSAYO DE RETARDO EN GEL

Una vez obtenido un sistema de sobreexpresión de la proteína YfeR, se buscaron las condiciones más apropiadas para la obtención de un extracto proteico que fuese útil en los experimentos de retardo en gel. Al obtener extractos proteicos totales (apartado 2.7.1.2 de materiales y métodos) después de la inducción con IPTG, la proteína YfeR quedaba acumulada mayoritariamente en la fracción insoluble. Para obtener una mejor solubilidad de la proteína, y por lo tanto, una mayor cantidad de proteína funcional, se modificaron algunas condiciones. Se cambió la temperatura de incubación del cultivo después de la inducción con IPTG de 37°C a 18°C, para minimizar la formación de agregados proteicos insolubles, al disminuir la actividad transcripcional. El cultivo se incubó a 18°C durante 2 horas después de la inducción. Además, al tampón de resuspensión de las células después de la centrifugación del cultivo se le añadió NaCl 500 mM, para evitar la unión de la proteína al ADN. Teniendo en cuenta que esta concentración de NaCl impide la unión proteína-ADN, fue necesario dializar la fracción soluble de los extractos proteicos totales para el ensayo de retardo en gel. El tampón utilizado en la diálisis, Tris-HCl 40 mM EDTA 1mM, tenía la misma concentración de estos componentes que el tampón de ensayo del

retardo (apartado 2.5.8 de material y métodos). También se obtuvieron extractos proteicos de la cepa que presentaba el plásmido pET3b, utilizados como control negativo.

El ADN diana utilizado para el retardo se obtuvo mediante una reacción de PCR con los oligonucleótidos LIG4 (fig. 3.2.3) y OSMT5 (fig. 3.6.3). Este fragmento de 308 pb contenía la región intergénica entre *yfeR* y *yfeH* (89 pb), 191 pb del gen *yfeH* y 28 del gen *yfeR* desde sus respectivos inicios de traducción. Como control negativo de la unión específica se utilizó un fragmento de ADN de tamaño aproximado, 284 pb, generado también por PCR con los oligonucleótidos A1 y D2 (fig. 3.6.3), a partir del ADN del plásmido pANN202-312. La temperatura de hibridación en ambas reacciones de amplificación fue de 52°C.

OSMT5: 5' TACGCAGTTGACGCAGTG 3'
A1: 5' AAGCTTAGTCAGCCGTTGTC 3'
D2: 5' TACAGCAGGTTTTTCGCTCAA 3'

Fig. 3.6.3. Oligonucleótidos utilizados para obtener los fragmentos de ADN diana del retardo. OSMT5 tiene su extremo 5' a 28 pb del inicio de traducción de *yfeR*.

Una vez obtenidos los extractos y marcados radioactivamente los fragmentos de ADN (apartado 2.5.8.1 de material y métodos), se realizó el ensayo de retardo en gel como se explica en el apartado 2.5.8.2 de material y métodos.

Como se puede observar en la figura 3.6.4, el fragmento de ADN correspondiente a la región promotora *yfeH-yfeR*, muestra una movilidad alterada cuando se incubaba con extractos proteicos que contienen la proteína YfeR sobreexpresada. Este fenómeno, en cambio, no se observó cuando los extractos proteicos provenían de la cepa con el plásmido pET3b. De la misma forma, no se observaron modificaciones de la movilidad cuando el ADN utilizado fue el fragmento de 284 pb (no mostrado en la figura).

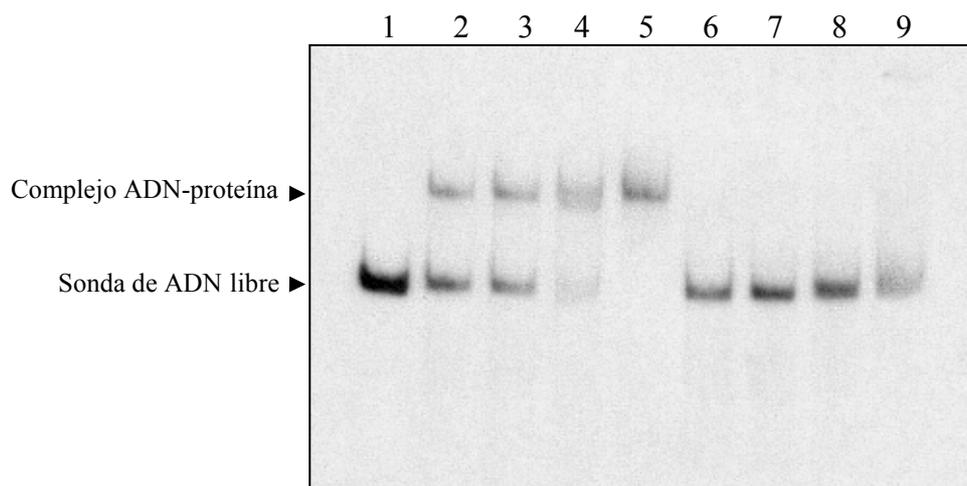


Fig. 3.6.4. Autoradiografía (gel poliacrilamida al 5 % en TBE x 0,5) que muestra la unión de YfeR a una sonda radioactiva ($\gamma^{32}\text{P}$) de ADN que contiene la región intergénica *yfeR-yfeH*. Carril 1: sonda de ADN libre. Carriles 1-5: sonda más 0,1-0,25-0,5-1 μg respectivamente, de la fracción soluble del extracto celular de cultivos inducidos con IPTG de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pLysE) (pETYFER) (plásmido que sobreexpresa YfeR). Carriles 6-9: sonda más 0,1-0,25-0,5-1 μg respectivamente, de la fracción soluble del extracto celular de cultivos inducidos con IPTG de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pLysE) (pET3b), como control negativo.

3.7 CONSTRUCCIÓN DE UN MUTANTE *yfeR*

Como se ha descrito en apartados anteriores la inserción del fago MudJ en la cepa YFER se encuentra en la región promotora del gen, y el inicio de traducción de *yfeR* está tan sólo a 4 nucleótidos del extremo 3' del fago MudJ. Aunque teóricamente la inserción del transposón impedía la transcripción del gen al faltarle su promotor, se decidió obtener un nuevo mutante *yfeR* por delección. Para la mutagénesis se utilizó el sistema de inactivación de genes cromosómicos utilizando fragmentos de PCR descrito en el apartado 2.4.1 de material y métodos.

Para la primera reacción de PCR, la cual genera el fragmento de ADN que se recombina con el cromosoma permitiendo la inserción del gen de resistencia a Km del plásmido pKD4 (apartado 2.4.1.1 de material y métodos), se diseñaron los oligonucleótidos YFERP1 y YFERP2 (fig. 3.7.1). El extremo 5' del oligonucleótido YFERP1 es homólogo a un nucleótido aguas arriba del inicio de traducción de *yfeR*, y el extremo 5' del oligonucleótido YFERP2 se encuentra 34 nucleótidos después del final de

traducción de *yfeR*. De esta forma se consiguió delecionar por completo el gen *yfeR* sin afectar a su región promotora y por lo tanto dejar intacto el promotor de *yfeH*. La temperatura de hibridación de la PCR fue de 52°C y se alargó el tiempo de hibridación a 45 segundos ya que los oligonucleótido tenían una secuencia de 61 pb.

YFERP1: 5' GATGAATTATTCACCTGCGTCAACTGCGTATTTTTATTACCG**G**TGTAGGCTGGAGCTGCTTC**** 3'
YFERP2: 5' GAAGACCGCACCTCACACACGGACAGATAGATATTTATAG**CATATGAATATCCTCCTTAGT** 3'

Fig. 3.7.1. Secuencia de los oligonucleótidos YFERP1 y YFERP2. Se muestran en negrita y subrayadas las bases correspondientes a las regiones P1 y P2 del plásmido pKD4, respectivamente.

Una vez obtenido el fragmento de PCR YFERP1-YFERP2, se electroporó a la cepa TT1704 previamente transformada con el plásmido pKD46, siguiendo las condiciones indicadas en el apartado 2.4.1.2 de material y métodos. Se hizo un escrutinio por PCR de los posibles mutantes a partir de las colonias que crecieron en la electroporación. Se utilizaron dos combinaciones de oligonucleótidos (fig. 3.7.2) para las reacciones de PCR del escrutinio: CIT3-YFERH2, K2-YFERH2. El oligonucleótido CIT3 es homólogo a la región 3' del gen *yfeH*, a 928 pb del inicio de traducción del gen *yfeR*. El oligonucleótido YFERH2 coincide con las 20 primeras bases del oligonucleótido YFERP2, y el oligonucleótido K2 pertenece a la resistencia a Km de plásmido pKD4. La temperatura de hibridación de las dos reacciones de PCR fue de 54°C.

CIT3: 5' CTGCGCAGACCATCAGTTG 3'
YFERH2: 5'GAAGACCGCACCTCACACAC 3'
K2: 5' CGGTGCCCTGAATGAACTGC 3'

Fig. 3.7.2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la comprobación por PCR de los posibles mutantes.

Una vez comprobada por PCR la inserción de la resistencia a Km del plásmido pKD4 y por lo tanto la delección de *yfeR*, y completo el curado del plásmido pKD46, se procedió a la eliminación de la resistencia al antibiótico (apartado 2.4.1.3 de material y métodos). En la figura 3.7.3 se muestran los distintos tamaños de amplificación de la reacción de PCR con los oligonucleótidos CIT3 y YFERH2: el nuevo mutante *yfeR* (fragmento de amplificación de 1.140 pb), el mutante *yfeR* con la inserción del gen de

resistencia a Km (fragmento de amplificación de 2.533 pb), y la cepa salvaje (fragmento de 1.979 pb). Al nuevo mutante se le denominó YFER2.

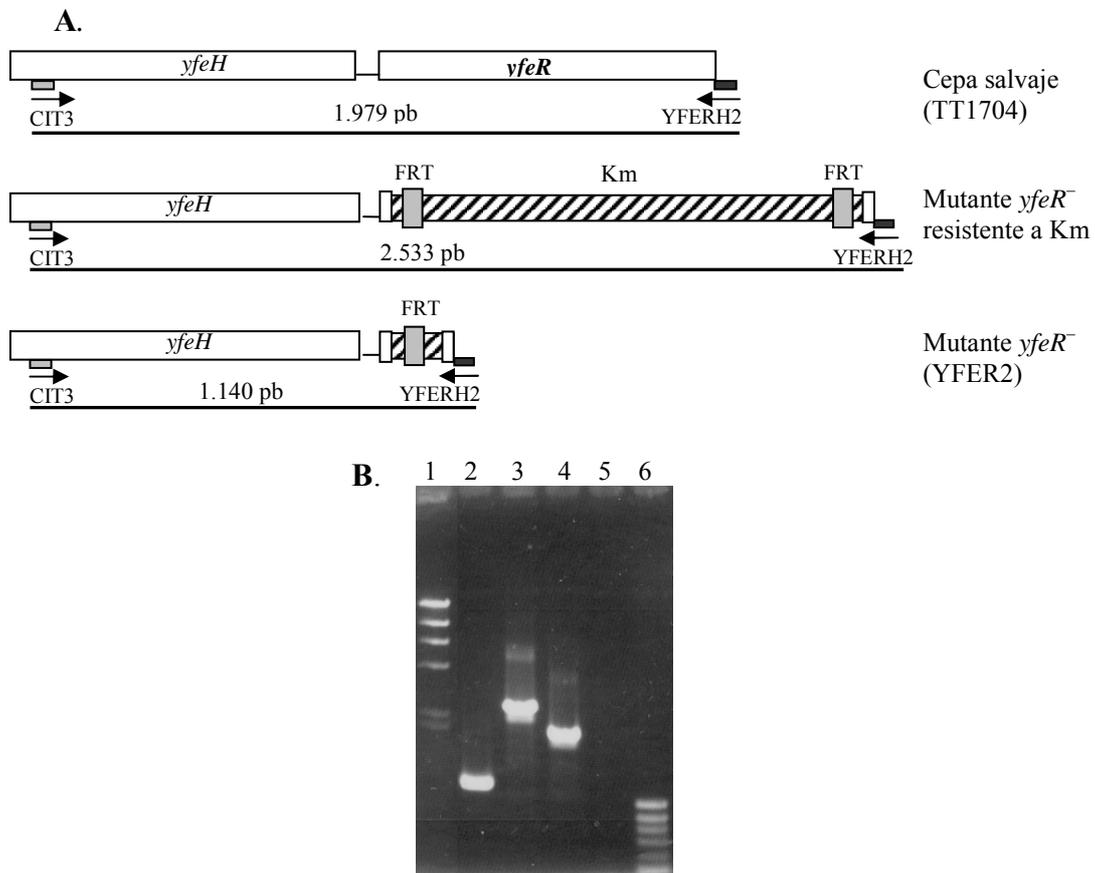


Fig. 3.7.3. A. Esquema del proceso de mutagénesis del gen *yfeR*. **B.** Separación electroforética (gel de agarosa TBE x 0,5 al 0,8%) de los distintos tamaños de amplificación en el proceso de mutagénesis con los oligonucleótidos CIT3 y YFERH2. Carril1: marcador de PM (λ /*Hind*III); carril 2: producto de amplificación del nuevo mutante *yfeR*; carril 3: producto de amplificación del mutante *yfeR* con la resistencia a Km; carril 4: producto de amplificación de la cepa salvaje; carril 5: control negativo de la reacción de PCR; carril 6: marcador de PM 100 pb ladder.

3.8 LA EXPRESIÓN DE *yfeH* ES INDEPENDIENTE DE YfeR

En este punto del trabajo se sabía que *yfeR* y *yfeH* se transcribían de forma divergente, como es común entre muchos reguladores LysR y sus genes regulados, y que la proteína YfeR se unía a la región intergénica *yfeR-yfeH*, reforzando la hipótesis que la proteína YfeR debería ser un modulador de la expresión del gen *yfeH*. Para comprobarlo se analizó la expresión de *yfeH* en los fondos genéticos *yfeR*⁺ e *yfeR*⁻ (cepa YFER2).

3.8.1 CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pLGYFEHLAC (*yfeH::lacZ*)

A fin de evaluar la expresión del gen *yfeH* se decidió construir una fusión *yfeH::lacZ* en un plásmido de bajo número de copias. Para ello, el casete *lacZ* se obtuvo a partir de una restricción *Bam*HI del plásmido pMC931, que contiene el gen *lacZ* modificado: carece de los primeros doce nucleótidos de la secuencia codificante y contiene cinco nucleótidos para introducir una diana *Bam*HI. Con la finalidad de obtener la correspondiente fusión génica, se diseñó el oligonucleótido CITBIII de tal forma que introducía una diana *Bam*HI en el gen *yfeH* permitiendo conservar la pauta de lectura con el casete *lacZ*, tal y como se muestra en la figura 3.8.1.

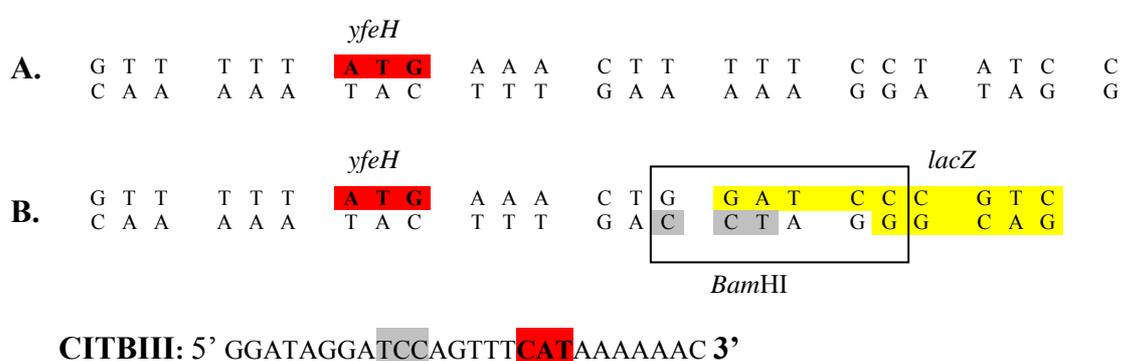


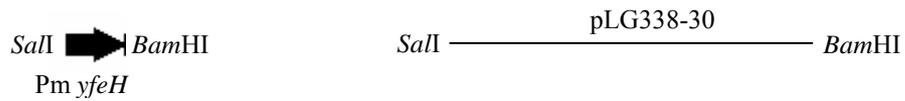
Fig. 3.8.1. **A.** Secuencia codificante del gen *yfeH*, con el triplete de inicio de la traducción sobre un fondo rojo. **B.** Fusión generada entre el gen *yfeH* y el gen *lacZ*: las bases modificadas en el oligonucleótido CITBIII para introducir una diana *Bam*HI se muestran sobre un fondo gris, y las bases correspondientes al gen *lacZ* sobre un fondo amarillo.

El otro oligonucleótido utilizado para amplificar el gen *yfeH* fue OSMTB (fig. 3.4.6), que se encuentra a 230 pb del final de traducción de *yfeR*. Con la pareja de oligonucleótidos CITBIII-OSMTB se obtuvo un fragmento de amplificación de 1266 pb,

que contenía los seis primeros tripletes desde el inicio de traducción del gen *yfeH*, la región intergénica *yfeH-yfeR* donde se encuentran los promotores de ambos genes, más el gen *yfeR* al completo. A continuación se digirió este fragmento de 1266 pb con el enzima de restricción *Sall*, diana interna del gen *yfeR*, dando lugar a dos fragmentos de 718 y 548 pb. Se aisló por electroelución a partir de un gel de agarosa la banda de 718 pb, en la que se había eliminado parte del gen *yfeR*, pero se mantenía intacta la región promotora del gen *yfeH* y los seis primeros tripletes de traducción del gen *yfeH*. Este fragmento de ADN se digirió con el enzima *Bam*HI, de forma que los tripletes tercero al quinto del gen *yfeH* formaban parte de un extremo cohesivo de la diana *Bam*HI, que al unirse posteriormente con el casete *lacZ*, daría lugar a una fusión *yfeH::lacZ*.(fig. 3.8.1).

Una vez digerido el fragmento de amplificación CITBIII-OSMTB con los enzimas *Bam*HI y *Sall*, se ligó a un vector pLG338-30 digerido con los mismos enzimas. La ligación se transformó a la cepa HB101 de *E. coli* y se seleccionaron los clones resistentes a Ap. Se aisló el ADN plasmídico de algunos de los transformantes y se comprobó por análisis de restricción con los enzimas *Bam*HI y *Sall* que la construcción era correcta. El plásmido pLG338-30 que contenía el promotor del gen *yfeH* fue denominado pLGYFEH. A continuación el plásmido pLGYFEH fue digerido con *Bam*HI y posteriormente defosforilado, para ligarlo finalmente al casete *lacZ* (fig. 3.8.2). Esta ligación se transformó a la cepa HB101 de *E. coli* y se seleccionaron los clones resistentes a Ap y que formaban colonias azules al estar suplementado el medio con X-Gal. Se aisló el ADN plasmídico de los transformantes de color azul y se comprobó que la construcción era correcta por análisis de restricción: se hicieron digestiones únicas con los enzimas *Eco*RI y *Bam*HI, y doble con los enzimas *Bam*HI y *Sall*. La restricción *Eco*RI era muy importante para saber si la orientación del casete *lacZ* era la correcta para generar una fusión traduccional. Sólo podía ser la orientación correcta si se liberaba un fragmento de 3,8 kb con la restricción *Eco*RI (fig. 3.8.2). El plásmido pLG338-30 que contenía la fusión traduccional del gen *yfeH* y el casete *lacZ* fue denominado pLGYFEHLAC. En la figura 3.8.2 se muestra todo el proceso de construcción de este plásmido.

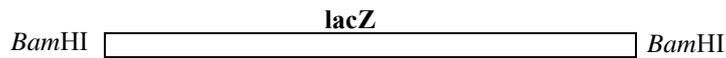
1. Digestión doble *Bam*HI / *Sal*I plásmido pLG338-30 y banda PCR CITBIII-OSMTB



2. Ligación



3. Digestión *Bam*HI *pLGYFEH* y casete *lacZ*



4. Ligación

pLGYFEHLAC

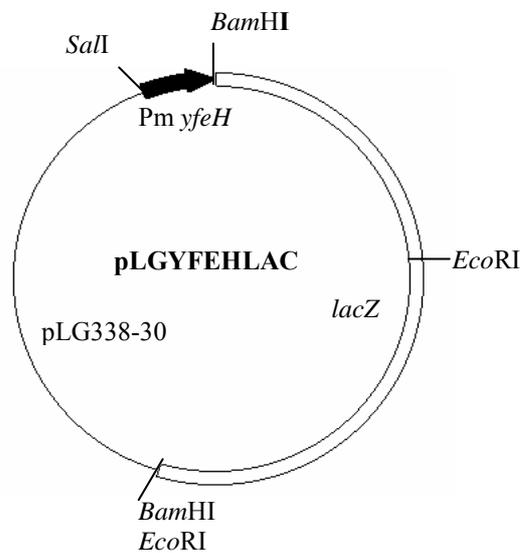
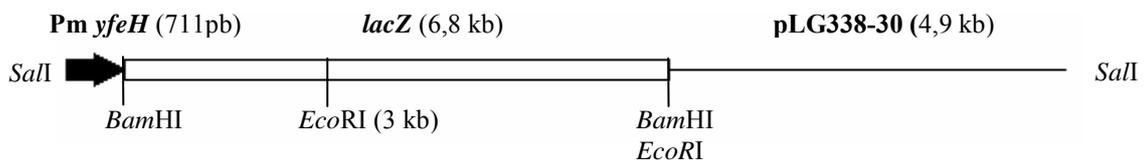


Fig. 3.8.2. Esquema del proceso de formación del plásmido *pLGYFEHLAC*. Se ha destacado la posición de las dianas utilizadas en el clonaje para comprobar la correcta construcción del plásmido.

3.8.2 VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA EN LAS CEPAS TT1704 e YFER2

Una vez construido el plásmido pLGYFEHLAC se transformó a las cepas TT1704 (*yfeR*⁺) e YFER2 (*yfeR*⁻) (apartado 3.7). Se valoró la actividad β -galactosidasa de cultivos de las dos cepas crecidos en medio LB a diferentes osmolaridades, LB 0 M NaCl, LB y LB 0,5 M NaCl, para comprobar si el gen *yfeH*, tal y como se había observado para el gen *yfeR*, respondía a la osmolaridad del medio. También se valoraron diferentes puntos de la curva de crecimiento (fig. 3.8.3).

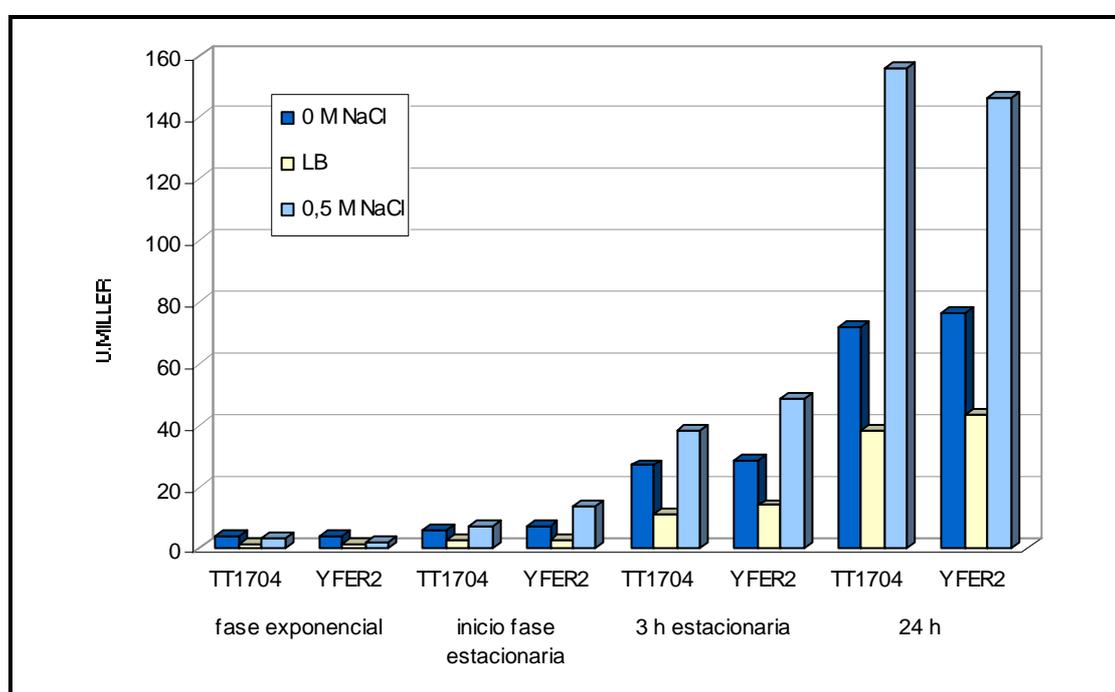


Fig. 3.8.3. Actividad β -galactosidasa de las cepas TT1704 (pLGYFEHLAC) e YFER2 (pLGYFEHLAC). Los cultivos crecieron en LB a diferentes osmolaridades y se escogieron diferentes puntos de la fase de crecimiento: exponencial ($DO_{600}=0,5$), inicio estacionaria ($DO_{600}=1$), 3 horas en estacionaria y 24 h desde el inóculo inicial.

Los resultados obtenidos muestran un incremento de la expresión de la actividad β -galactosidasa a medida que avanza la fase estacionaria. Sin embargo, los valores de actividad entre las cepas TT1704 e YFER2 son muy similares, por lo que se deduce que, en las condiciones en las que se llevaron a cabo los experimentos la expresión del gen *yfeH* no se ve afectada por la ausencia de la proteína YfeR. Asimismo, a diferencia del gen *yfeR*, la expresión del gen *yfeH* no se induce específicamente en condiciones de baja osmolaridad.

3.9 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *yfeH*

Una vez constatada la expresión dependiente de fase estacionaria del gen *yfeH*, y la independencia del mismo de la regulación por *yfeR* se decidió estudiar la expresión del gen *yfeH* en la cepa TT1704 en toda una serie de condiciones de crecimiento para obtener nuevos datos que ayudasen a definir la función de este gen.

3.9.1 FASE ESTACIONARIA

Se había observado un incremento de la expresión del gen *yfeH* en fase estacionaria, y se realizaron experimentos para analizar con más detalle la expresión en esta fase de crecimiento.

3.9.1.1 Dilución de un cultivo en fase estacionaria en medio fresco

Como complemento a los estudios descritos en el apartado anterior, se analizó también cómo afecta a la expresión del gen *yfeH* el paso de fase estacionaria a fase exponencial. Para ello, se hizo una dilución 1/10 de un cultivo en fase estacionaria en medio rico fresco a diferentes osmolaridades (LB 0 M NaCl, LB y LB 0,5 M NaCl), puesto que también se partió de tres cultivos a diferentes osmolaridades que llevaban a 37°C 24 horas. Se valoró la actividad después de 1 h y 3h de incubación a 37°C, comprobando que ésta disminuía considerablemente, como se muestra en la figura 3.9.1.

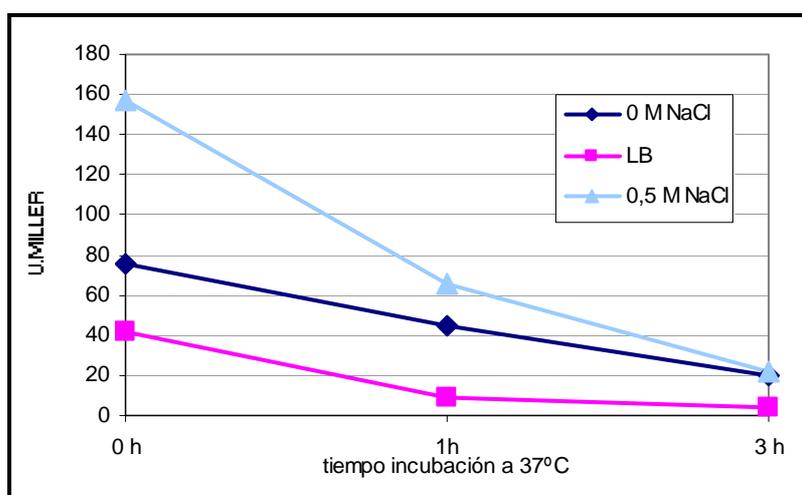


Fig. 3.9.1. Actividad β -galactosidasa de la cepa TT1704 (pIGYFEHLAC) después de una dilución 1/10 de tres cultivos a diferentes osmolaridades en fase estacionaria. El tiempo 0 h de incubación a 37°C son los valores de actividad antes de la dilución en medio fresco.

3.9.1.2 Expresión de *yfeH* en una cepa *rpoS*⁻

El gen *rpoS* en *S. Typhimurium* codifica para el factor σ^S , directamente implicado en la expresión selectiva de un gran número de genes en fase estacionaria. Como el gen *yfeH* se inducía en fase estacionaria se decidió construir una cepa *rpoS*⁻, para analizar su expresión en este fondo genético. Teniendo en cuenta que la cepa de *S. Typhimurium* TT1704 es una derivada de la LT2, y por lo tanto está atenuada para la expresión de *rpoS* (Lee *et al.*, 1995), también se valoró la expresión de la fusión del plásmido pLGYFEHLAC en otra cepa salvaje de *S. Typhimurium*: ATCC 14028.

En primer lugar se transdujo con el bacteriófago P22 (apartado 2.3.2 de material y métodos) la mutación *rpoS* de la cepa C52 a las cepas TT1704 y ATCC 14028. Se seleccionaron los transductantes resistentes a cloranfenicol y se obtuvieron las cepas TTRPOS Y ATCRPOS, respectivamente. A continuación se valoró la expresión de *yfeH* en LB 0,5 M NaCl en varios puntos de la curva de crecimiento, como se muestra en la figura 3.9.2.

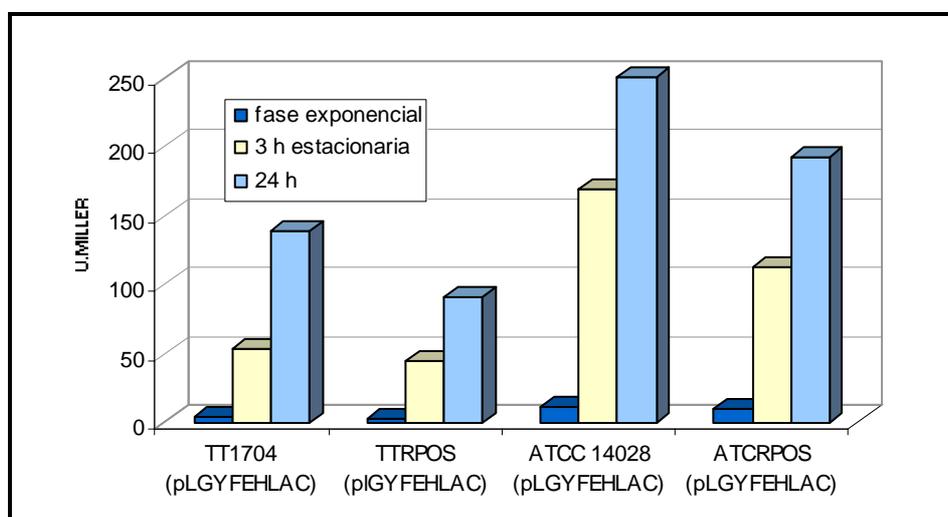


Fig. 3.9.2. Actividad β -galactosidasa de las cepas TT1704 y ATCC 14028 y sus correspondientes mutantes *rpoS* (TTRPOS y ATCRPOS), transformadas con el plásmido pLGYFEHLAC. Los cultivos crecieron en LB 0,5 M NaCl y se escogieron diferentes puntos de la curva de crecimiento: fase exponencial ($DO_{600}=0,5$), 3 h en fase estacionaria y 24 h desde el inóculo inicial.

Como se puede observar en la figura 3.9.2 la actividad de las cepas mutantes *rpoS*, aunque ligeramente inferior a las cepas salvajes, también se induce en fase estacionaria. Asimismo, aunque los valores de actividad son ligeramente más altos en la cepa ATCC

14028, no se ve una diferencia significativa. Estos resultados sugieren que la expresión del gen *yfeH* no está bajo el control del factor σ^S .

3.9.2 pH BÁSICO

Como el pH del medio LB se alcaliniza en fase estacionaria y el gen *yfeH* se induce precisamente en esta fase de crecimiento, se decidió comprobar si podía existir una relación directa entre el pH del medio y la inducción de la expresión del gen. Se había observado experimentalmente que el pH del medio LB a las 3 h desde la entrada en fase estacionaria y a las 24 desde el inóculo inicial, puntos de la fase de crecimiento a las que se solía valorar la actividad β -galactosidasa, era de aproximadamente 7,7 y 8,5, respectivamente. Teniendo en cuenta este rango de pH, se valoró la actividad β -galactosidasa de la fusión *yfeH::lacZ* a lo largo de la curva de crecimiento en medio LB 0,5 M NaCl tamponado con 60 mM BTP (1,3-bis(tris(hidroximetil)-metilamino)propano) (Dover *et al.*, 1996), para conseguir un pH de 8 y 8,5 desde el momento del inóculo inicial. Se escogió LB 0,5 M NaCl porque los valores de actividad son ligeramente más altos a esta osmolaridad. El medio de cultivo tamponado se preparó añadiendo al medio LB el volumen correspondiente para diluir 10 veces una solución madre de BTP concentrada a 0,6 M. El pH se ajustó con HCl al valor deseado. En la gráfica 3.9.3 se muestran los valores de actividad de 3 cultivos a diferente pH en fase exponencial ($DO_{600}=0,5$) y entrada en fase estacionaria ($DO_{600}=1$). No se muestran los valores de actividad en fase estacionaria, ya que el pH del medio LB sin tamponar ya se había alcalinizado.

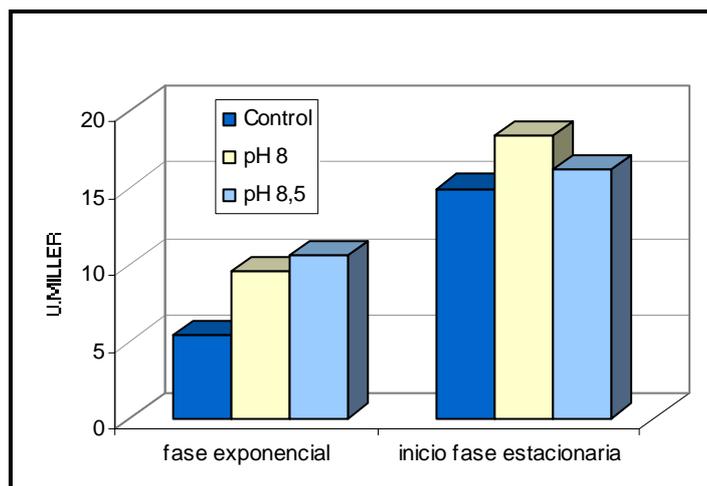


Fig. 3.9.3. Actividad β -galactosidasa de la cepa TT1704 pLGYFEHLAC en LB 0,5 M NaCl sin tamponar (control), a pH=8 y pH=8,5, en fase exponencial ($DO_{600}=0,5$) e inicio fase estacionaria ($DO_{600}=1$).

Como se puede deducir de los datos de actividad mostrados en el gráfico 3.9.3 no hay una inducción de la expresión del gen *yfeH* en fase exponencial e inicio de estacionaria al alcalinizarse el medio de cultivo. Sin embargo, no se puede concluir que no haya un efecto combinado de fase estacionaria y pH básico en la inducción del gen en esta fase de crecimiento.

Para profundizar más en esta posible combinación de factores se sometió un cultivo en fase estacionaria a un choque a pH básico. El experimento se diseñó de la siguiente forma: 4 cultivos crecidos en LB 0,5 M NaCl que llevaban en fase estacionaria 2 h, se centrifugaron y se resuspendieron en el mismo volumen de un tampón dietanolamina-HCl, a pH 8, 9, 9,5 y 10. También se incluyó un cultivo control al que no se le realizó ningún tratamiento. El tampón dietanolamina- HCl se preparó de la siguiente forma: 25 ml de una solución 0,2 M dietanolamina + x ml de una solución 0,2 N de HCl (tabla 3.9.1) + H₂O hasta un volumen final de 100 ml.

Tabla 3.9.1. Volumen de 0,2 N HCl a añadir a 25 ml de dietanolamina 0,2 M para preparar 100 ml del tampón a un pH determinado.

Tampón dietanolamina-HCl	
pH	x ml de 0,2 N HCl
8	22,95
8,9	13,55
9,5	5,55
10	1,8

Se valoró la actividad β -galactosidasa de la cepa TT1704 (pLGYFEHLAC) de los diferentes cultivos justo después de la resuspensión y tras incubarlos 15 minutos a 37°C. Según los datos de la figura 3.9.4 parece que existe una correlación entre el aumento de pH del medio y la actividad.

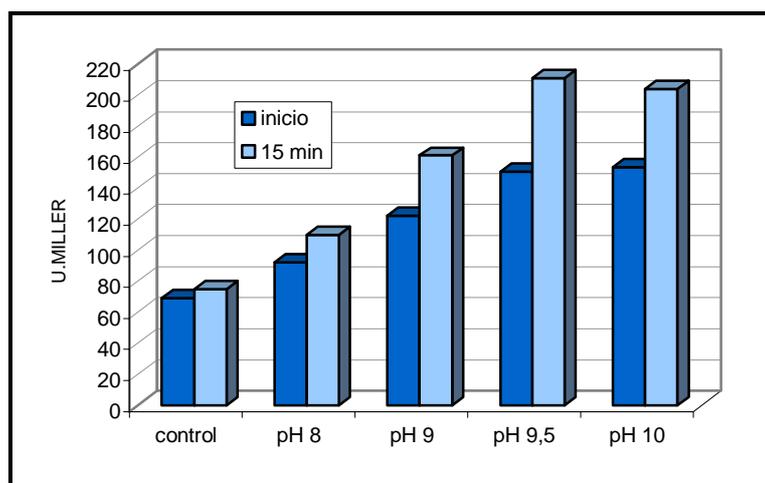


Fig. 3.9.4. Actividad β -galactosidasa de la cepa TT1704 (pLGYFEHLAC) de cultivos crecidos en LB 0,5 M NaCl sometidos a un choque a pH básico. Se distinguen los valores de actividad de los cultivos en el inicio (justo después del choque) y a los 15 min tras una incubación a 37°C.

3.9.3 pH ÁCIDO

El hecho de que el medio LB se basificara en fase estacionaria cuando precisamente se inducía la expresión del gen *yfeH*, de la misma forma que podía plantear la hipótesis de una inducción al aumentar el pH, se pensó que una acidificación del medio de cultivo

podía causar el efecto contrario: una represión del sistema. Para comprobar esta posibilidad se valoró la actividad β -galactosidasa de la cepa TT1704 (pLGYFEHLAC) a lo largo de la curva de crecimiento, en medio LB a diferentes osmolaridades tamponado con MES (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid) 0,1 M a pH 5,5. Sin embargo, los datos de actividad volvieron a repetir lo que ya se había observado anteriormente: un aumento de la expresión del gen en fase estacionaria (datos no mostrados). En este experimento, al medir el pH del medio de cultivo a las 24 h desde el inóculo inicial, se comprobó que era de 6. Aunque este pH está por debajo de la neutralidad, no es excesivamente ácido, por lo que se diseñó un nuevo experimento: un choque a pH ácido a un cultivo en fase estacionaria. Se incubaron 4 cultivos a 37°C en LB 0,5 M NaCl (se escogió esta osmolaridad porque los valores de actividad son más altos), y después de 3 h en fase estacionaria se les adicionó HCl a 3 de ellos para bajar el pH a 4, 4,5 y 5. Se incubaron a 37°C durante 3 h, y se hicieron medidas de actividad β -galactosidasa, recuento de células viables y medición de pH, antes del choque, y tras 1 y 3 h de incubación a 37°C. En la figura 3.9.5 se muestra la progresión de los valores de actividad después del choque. No se muestran los datos del cultivo a pH 4 porque el número de células viables disminuyó drásticamente tras la adición de HCl.

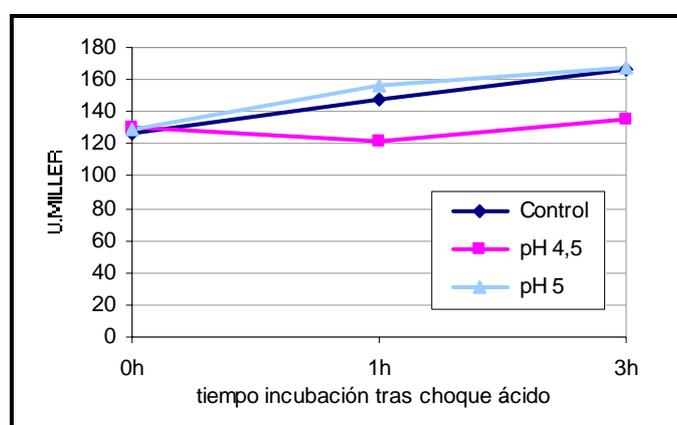


Fig. 3.9.5. Actividad β -galactosidasa de la cepa TT1704 (pLGYFHLAC) tras un choque a pH ácido con HCl 1 M.

En la figura 3.9.5 se puede observar que los valores de actividad son más bajos en el cultivo a pH 4,5 que en el control, manteniéndose en cambio prácticamente iguales en el cultivo a pH 5,5. En la tabla 3.9.2 se muestra la medición del pH de los diferentes cultivos tras el choque. A medida que aumenta el tiempo de incubación también lo hace el pH de todos los cultivos, manteniéndose más ácido en el cultivo a pH 4,5. Ésta podría quizás ser

la explicación del estancamiento de los valores de actividad en este cultivo, por influencia del pH ácido.

Tabla 3.9.2. Medición del pH del cultivo tras choque ácido con HCl 1 M.

pH medio de cultivo		
Cultivo	Tiempo tras choque ácido	
	1 h	3 h
Control	7,86	7,86
pH 4,5	4,71	6,06
pH 5	5,4	7,05

Tras este resultado de estancamiento de la actividad β -galactosidasa al disminuir el pH del cultivo se planteó otro experimento: disminuir el pH del medio como resultado de la acumulación de productos ácidos tras una fermentación de azúcares. Para conseguirlo se añadió glucosa a una concentración de 10 g/l al medio LB a 0 M NaCl y 0,5 M NaCl. Se valoró la actividad β -galactosidasa y se midió el pH del medio de cultivo 3 h después de haber entrado en fase estacionaria. El pH del medio de cultivo era aproximadamente de 4,5 en los cultivos con exceso de glucosa. En la tabla 3.9.3 se puede observar que los valores de actividad son claramente inferiores en los cultivos con exceso de glucosa, demostrando que el pH ácido del medio de cultivo provocado por la acumulación de productos de la fermentación inhibe la expresión del gen *yfeH*.

Tabla 3.9.3 Actividad β -galactosidasa de la cepa TT1704 (pLGYFEHLAC) a las 3 h en fase estacionaria de cultivos con exceso de glucosa a 10 g/l. Los cultivos con exceso de glucosa presentaban un pH de 4,5, mientras que los cultivos sin glucosa presentaban un pH de aproximadamente 7,5.

U.MILLER			
0M NaCl	0M NaCl 10g/l glucosa	0,5M NaCl	0,5M NaCl 10g/l glucosa
72	12.61	60	18

3.9.4 ANAEROBIOSIS Y TEMPERATURA

Para crear las condiciones de anaerobiosis los cultivos se incubaron a 37°C estáticamente en tubos de tapón de rosca completamente llenos. La actividad β -galactosidasa de la cepa TT1704 (pLGYFEHLAC) también se indujo en fase estacionaria pero no existieron diferencias significativas ni por lo que hace referencia al efecto de la presión parcial de oxígeno o de la temperatura (23°C).

3.9.5 LIMITACIÓN DE FÓSFORO

Una de las proteínas con las que YfeH presenta homología (apartado 3.5.2) está descrita como una proteína que se induce tras un crecimiento con limitación de fósforo (Kragelund *et al.*, 1997). Por esta razón se decidió realizar un crecimiento en los medios MShiPCN y MSloP (apartado 2.2.1 de material y métodos), este último con una concentración de fósforo limitante para el crecimiento, y valorar la actividad β -galactosidasa de la cepa TT1704 (pLGYFEHLAC) a lo largo de la curva de crecimiento. En la figura 3.9.6 sólo se han representado los valores de actividad correspondientes a las 2 h en fase estacionaria y a las 24 h, ya que los de fase exponencial e inicio de estacionaria eran muy bajos. Como se puede observar en la figura 3.9.6 la expresión del gen *yfeH* presenta una mayor inducción en fase estacionaria al crecer en un medio con una concentración limitante de fósforo (MSloP).

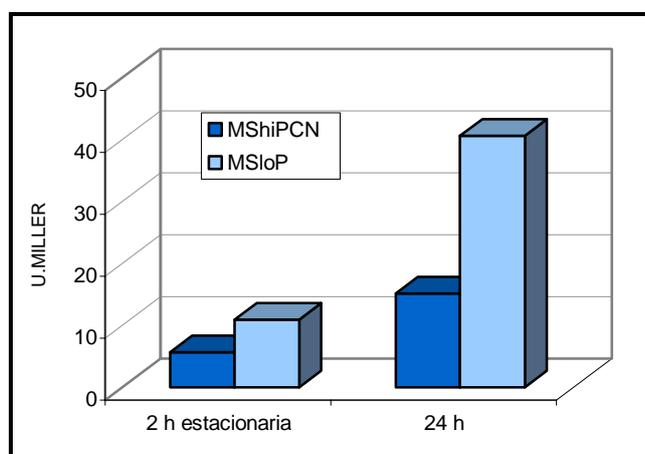


Fig. 3.9.6. Actividad β -galactosidasa de la cepa TT1704 (pLGYFEHLAC) en medio MShiPCN y MSloP, a las 2h de entrada en fase estacionaria y a las 24 horas.

3.10 OBTENCIÓN DE UN MUTANTE *yfeH*

Se decidió obtener un mutante del gen *yfeH* y estudiar su fenotipo, a fin de obtener más datos sobre la función de la proteína YfeH. El método de mutagénesis utilizado fue el de mutagénesis dirigida por doble recombinación (apartado 2.4.2 de material y métodos).

Para sintetizar por PCR una copia del gen *yfeH* con una deleción en pauta, se diseñaron dos parejas de oligonucleótidos (fig. 3.10.1) para las dos primeras reacciones asimétricas de PCR. La pareja CTX-B y LYSRB (fig. 3.6.1) daban lugar a un fragmento de 1083 pb que incluía los 8 primeros tripletes completos del gen *yfeH*, la región intergénica *yfeH-yfeR*, y el gen *yfeR* al completo. La pareja CTX-C y *LIG-SmaI* amplificaba un fragmento de 601 pb que incluía 321 pb desde el extremo 3' del gen *yfeH* y los 86 tripletes finales del gen *yfeH*. Los oligonucleótidos CTX-B y CTX-C contenían una cola de 21 pb complementarias que no existían en el gen. En estas dos primeras reacciones de PCR se utilizó una concentración de oligonucleótidos diferente a la habitual con una relación 10:1 de los oligonucleótidos externos (*LYSRB*, *LIG-SmaI*) respecto a los internos (CTX-B, CTX-C). La temperatura de hibridación fue de 44°C para CTX-B-LYSRB y de 54°C para la otra reacción de PCR. El tiempo de hibridación se alargó a 45''.

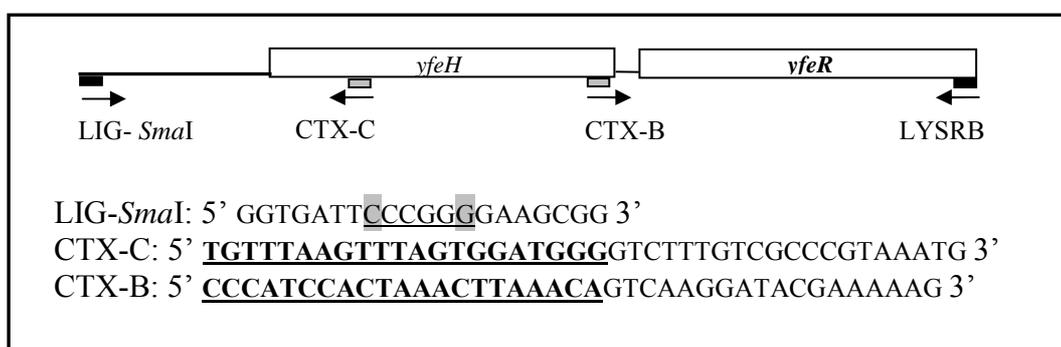


Fig. 3.10.1. Esquema de la localización y secuencia de los oligonucleótidos utilizados en las dos primeras reacciones de PCR. La secuencia complementaria de 21pb de los oligonucleótidos CTX-C y CTX-B se muestra en negrita y subrayada. Las bases modificadas en el oligonucleótido *LIG-SmaI* para formar una diana *SmaI* (subrayada) se muestran sobre un fondo gris.

El producto de amplificación de estas dos reacciones de PCR se utilizó como molde de una nueva reacción con los oligonucleótidos externos (*LIG-SmaI* y *LYSRB*). De esta forma las 21 pb homólogas de los oligonucleótidos internos podrían hibridar creando una

delección de 717 pb, correspondientes a 239 aminoácidos de la proteína YfeH. En esta reacción de PCR no se obtuvo un único fragmento de amplificación, por lo que fue necesario aislar por electroelución a partir de un gel de agarosa la banda correspondiente, de 1663 pb. A continuación, este fragmento de ADN con la delección del gen *yfeH* se digirió con los enzimas *Sall*, diana interna del gen *yfeR* que eliminó 322 pb, y *SmaI*, diana presente en el oligonucleótido LIG-*SmaI*. El fragmento resultante de esta digestión doble, de 1341 pb fue ligado a un vector pKO3 digerido con estos mismos enzimas. La ligación se transformó a la cepa de *E. coli* HB101 y se seleccionaron los clones resistentes a Cm a 30°C. Para el escrutinio de transformantes que hubiesen incorporado el gen *yfeH* mutado se utilizaron los oligonucleótidos CIT3 (fig. 3.7.2) y OSMT5 (fig. 3.6.3). El plásmido formado por el vector pKO3 más la delección en pauta del gen *yfeH* se denominó pKYFEH.

El plásmido pKYFEH se transformó a la cepa de *S. Typhimurium* TT1704 y se siguió el protocolo de selección de mutantes detallado en el apartado 2.4.2. Primero se sembró a 42°C con Cm, para seleccionar la integración del plásmido en el cromosoma (primera recombinación), y los resistentes se repicaron a 30°C con sacarosa 5% (p/v), para seleccionar la escisión del plásmido (segunda recombinación). De las colonias que crecieron a 30°C con sacarosa pero eran sensibles a Cm se realizó una reacción de PCR con los oligonucleótidos CIT3-OSMT5 para comprobar que se hubiese delecionado el gen *yfeH*. La amplificación en la cepa TT1704 fue de 1027 pb y en el mutante *yfeH* de 330 pb, como se muestra en la figura 3.10.2.

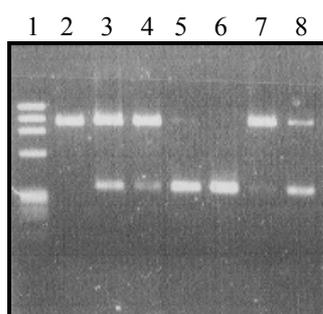


Fig 3.10.2. Gel agarosa TBE x 0,5 al 2% con algunas reacciones de PCR del escrutinio de mutantes. Carril 1: MPM Φ X174 / *HaeIII*; 2: cepa TT1704; carriles 3-6: colonias resistentes a sacarosa y sensibles a Cm. Sólo la colonia correspondiente al carril 6 tiene el gen *yfeH* mutado. La mayoría de colonias sobre las que se hizo el escrutinio tenían las dos copias del gen: salvaje y mutada.

Una vez obtenido el mutante *yfeH*, al que se le denominó YFEH, se comprobó que la delección fuera en pauta y evitar así que afectara a la traducción de genes a 3' de *yfeH*. Para hacerlo se secuenció el producto de PCR CIT3-OSMT5 con estos mismos oligonucleótidos. La secuencia obtenida se introdujo en el programa "ORF finder" del

NCBI: la proteína YfeH pasó a tener 100 aminoácidos después de la mutagénesis (fig. 3.10.3)

```

1  atgaaactttttcgtatccttgactgtttaagtttagtggatggg
   M K L F R I L D C L S L V D G
46  gtctttgtcgcccgtaaagcggttcaataaagccgacgaaatc
   V F V A R K C G F N K A D E I
92  actattgtcttctgcggttcgaaaaaaagcctggccaacgggatc
   T I V F C G S K K S L A N G I
138 ccgatggccaatattctgtttccgacgtcagtgctgggtatgatg
   P M A N I L F P T S V L G M M
184 gtattaccgctgatgatcttccaccagatccaactgatggctctgc
   V L P L M I F H Q I Q L M V C
230 gcagggctggcgcgctacaaacgccagaccgagaagttacag
   A G L A R R Y K R Q T E K L Q
276 gcgcagcaggaaagccgcgcccgaaagcttaa
   A Q Q E S R A A K A *

```

Fig. 3.10.3. Traducción de la proteína YfeH después de la mutagénesis utilizando el programa ORF Finder del NCBI. Se muestra en negrita los 7 aminoácidos introducidos con la mutagénesis, que sustituyen a 239 de la secuencia original.

3.11 CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO DEL MUTANTE *yfeH*

Una vez obtenido el mutante *yfeH* se realizaron experimentos para encontrar un fenotipo que aportase nuevos datos sobre la función de la proteína YfeH.

3.11.1 SUPERVIVENCIA Y SALIDA DE FASE ESTACIONARIA

Los datos de actividad β -galactosidasa de la fusión *yfeH::lacZ* (apartado 3.9) indican que la expresión del gen *yfeH* se induce en fase estacionaria. En una primera aproximación se analizó si el gen *yfeH* juega un papel significativo en la supervivencia de *S. Typhimurium* en esta fase de crecimiento y en la capacidad para salir de ella, en comparación con la cepa salvaje.

- Después del crecimiento en medio LB a 37°C de la cepas TT1704 e YFEH, a las 10, 24 y 48 horas desde el momento del inóculo inicial se realizó un recuento de células viables. Como se muestra en la tabla 3.11.1 no se observaron diferencias en el recuento de células viables de ambas cepas en los puntos analizados.

Tabla 3.11.1. Recuento de células viables (UFC/ml) de las cepas TT1704 e YFEH tras una incubación a 37°C de 10, 24 y 48 horas.

Tiempo incubación a 37°C	Recuento de viables (UFC/ml)	
	TT1704	YFEH
10 h	$2,7 \cdot 10^9$	$2,3 \cdot 10^9$
24 h	$3,9 \cdot 10^9$	$3,9 \cdot 10^9$
48 h	$2,5 \cdot 10^9$	$2,5 \cdot 10^9$

A partir de este mismo cultivo, incubado en agitación a 37°C durante 48 horas, se valoró la capacidad de reiniciar el crecimiento en medio rico fresco. Se hicieron dos inóculos diferentes, con diluciones 1:50 y 1:25, y se siguió la DO_{600} cada 15 minutos para comprobar la capacidad de salida de fase estacionaria. Según los datos de DO_{600} mostrados en la figura 3.11.1 no se observaron diferencias en el tiempo de latencia antes de reiniciar el crecimiento.

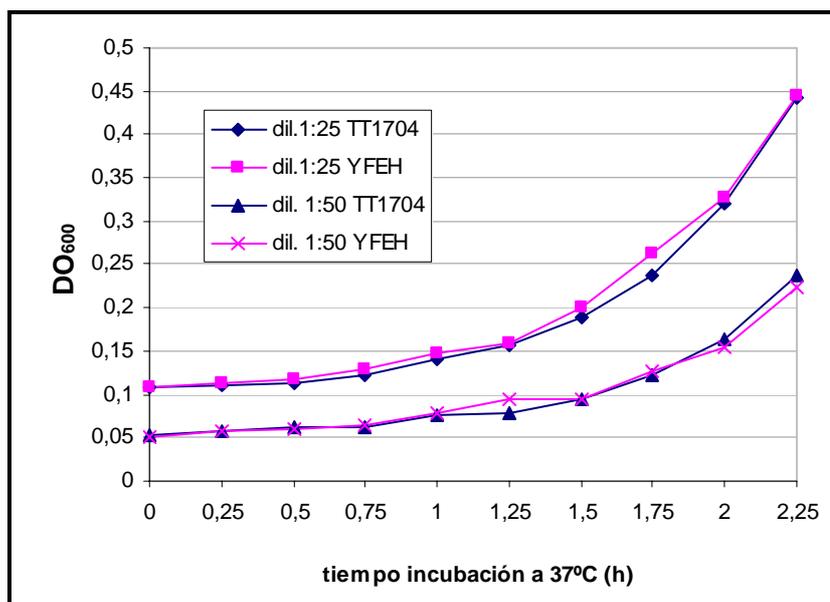


Fig. 3.11.1. Seguimiento del crecimiento de cultivos de las cepas TT1704 e YFEH durante el inicio de la fase exponencial. Se hicieron dos inóculos en medio LB fresco para cada cepa, una dilución 1:50 y otra 1:25 a partir de cultivos incubados previamente durante 48 h a 37°C en medio LB.

- Al no observarse diferencias en el recuento de células viables a las 48 horas se analizó la supervivencia de las dos cepas durante un periodo de tiempo más largo: a partir de cultivos crecidos en LB a 37°C durante 24 horas se realizó un recuento de células viables, y a continuación se incubaron los cultivos a temperatura ambiente y a 4°C,

haciendo un recuento de células viables cada 48 horas. Después de 6 días de incubación a estas dos temperaturas no se observaron diferencias en la supervivencia de las dos cepas como se muestra en la figura 3.11.2.

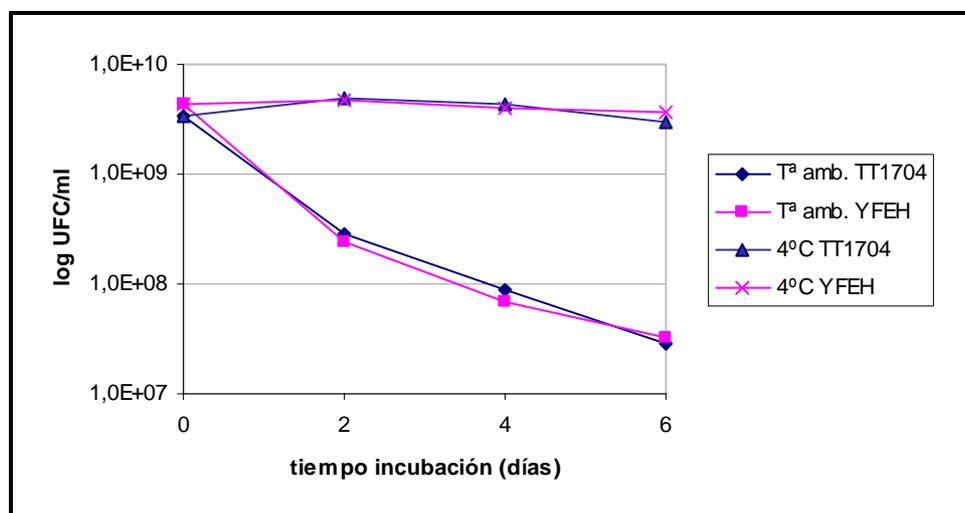


Fig. 3.11.2. Supervivencia de las cepas TT1704 e YFEH a temperatura ambiente y 4°C de cultivos en fase estacionaria. El número de células viables se expresa como el log de las UFC/ml y el tiempo de incubación en días.

- Teniendo en cuenta los valores de actividad β -galactosidasa de la fusión *yfeR::lacZ* en medio MSloP (limitación de P), en los que se observaba una inducción de la expresión de *yfeH* en comparación con el medio MShiPCN, se realizó un experimento de supervivencia en estos dos medios. Para hacerlo se incubaron cultivos a 37°C de las cepas TT1704 e YFEH en medio MSloP y MShiPCN durante 8 días, haciendo un recuento de células viables cada 24 horas. No se encontraron diferencias entre las dos cepas. También se determinó la capacidad de salida de fase estacionaria de los diferentes cultivos con inóculos 1:50 en medios LB y MShiPCN, y se siguió la DO_{600} hasta que se reinició el crecimiento. No se apreciaron diferencias en la fase de latencia de las dos cepas, ni en los cultivos provenientes del medio MSloP ni en los del MShiPCN.

- Dentro de este grupo de experimentos encaminados a encontrar algún fenotipo en fase estacionaria se realizó un experimento de supervivencia relacionado con las citocromo oxidasa. Una de las entradas en las bases de datos del homólogo de la proteína YfeH en *E. coli* la describe como una hipotética citocromo oxidasa. Mutantes de la citocromo *d* oxidasa de *E. coli*, la cual se expresa preferentemente en condiciones de microaerofilia y fase estacionaria, presentan un defecto de salida de fase estacionaria dependiente de temperatura (Siegele *et al.*, 1996). Para determinar este fenotipo característico de los

mutantes *cydC* en la literatura consultada, se realizó un cálculo del índice EOP (“efficiency of plating”), número resultante del cociente UFC/ml 37°C / UFC/ml 25°C. En las cepas mutantes de esta citocromo oxidasa el índice es mucho menor a 1, dado que les cuesta salir de fase estacionaria a 37°C, pero no a 25°C. A partir de cultivos de las cepas TT1704 e YFEH crecidos en medio mínimo NCE, e incubados a dos temperaturas diferentes, 37°C y 25°C, se hizo un recuento de células viables a las 48 h para calcular el índice EOP. Los recuentos de los cuatro cultivos se sembraron en dos medios diferentes, medio mínimo NCE y medio rico LB, y fueron incubados a 37°C y 25°C durante 48 h. En la tabla 3.11.2 se puede observar que el índice EOP fue el mismo para las dos cepas.

Tabla 3.11.2. Cálculo del índice EOP de cultivos incubados a 25°C y 37°C durante 48 horas en medio NCE de las cepas TT1704 e YFEH. Los recuentos de viables se sembraron en medio mínimo (NCE) y medio rico (LB).

Temperatura incubación cultivo	EOP (UFC/ml 37°C / UFC/ml 25°C)			
	TT1704		YFEH	
	NCE	LB	NCE	LB
25°C	1,2	0,96	1,15	0,98
37°C	0,96	1,06	0,98	1

3.11.2 RESISTENCIA A COMPUESTOS TÓXICOS

La búsqueda de dominios conservados de la proteína YfeH (apartado 3.5.2) permite relacionarla con proteínas transportadoras de ácidos biliares o compuestos derivados del arsénico, ambas sustancias tóxicas para la célula. En este contexto se pensó que la proteína YfeH podría tener una relación directa o indirecta en el transporte de estos compuestos o bien de otras sustancias tóxicas para la célula.

3.11.2.1 Antibióticos

Para evaluar la resistencia a antibióticos de la cepa YFEH en comparación con la cepa TT1704, se realizó un ensayo en medio líquido para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) a partir de cultivos en fase estacionaria. En la tabla 3.11.3 se

muestran los antibióticos ensayados y el rango de concentraciones analizadas de cada uno. No se encontraron diferencias entre las dos cepas en la resistencia a los antibióticos ensayados.

Tabla 3.11.3. MIC líquida de los antibióticos ensayados para las cepas TT1704 e YFEH.

MIC líquida	
Antibiótico	Concentración (µg/ml)
Ampicilina	0-10
Kanamicina	25-100
Cloranfenicol	1-5
Tetraciclina	2,5-10
Estreptomina	100-175
Espectinomicina	125-225
Ac. Nalidíxico	20-80
Rifampicina	50-100

3.11.2.2 Sales biliares

- A partir de cultivos incubados en medio LB a 37°C en fase estacionaria (16-18 h), se repartieron 10 ml en tubos que contenían ya los ácidos biliares (Bile bovine acids 50%, Sigma) para ensayar la resistencia a diferentes concentraciones: 100, 200 y 400 mg/ml. De esta forma se quería comprobar cómo podía afectar un cambio a un medio con elevadas concentraciones de ácidos biliares a un cultivo en fase estacionaria, condiciones en las que la expresión de *yfeH* es máxima. Inmediatamente se hizo un recuento de células viables y se incubaron a 37°C los diferentes tubos con estas tres concentraciones para las dos cepas, haciendo un recuento de células después de 3 y 6 horas de incubación. Como se muestra en la figura 3.11.4 no se encontraron diferencias en el recuento de células viables entre las dos cepas. No se muestran los viables de los cultivos con 100 mg/ml de ácidos biliares porque sus valores coincidieron con los de los cultivos control.

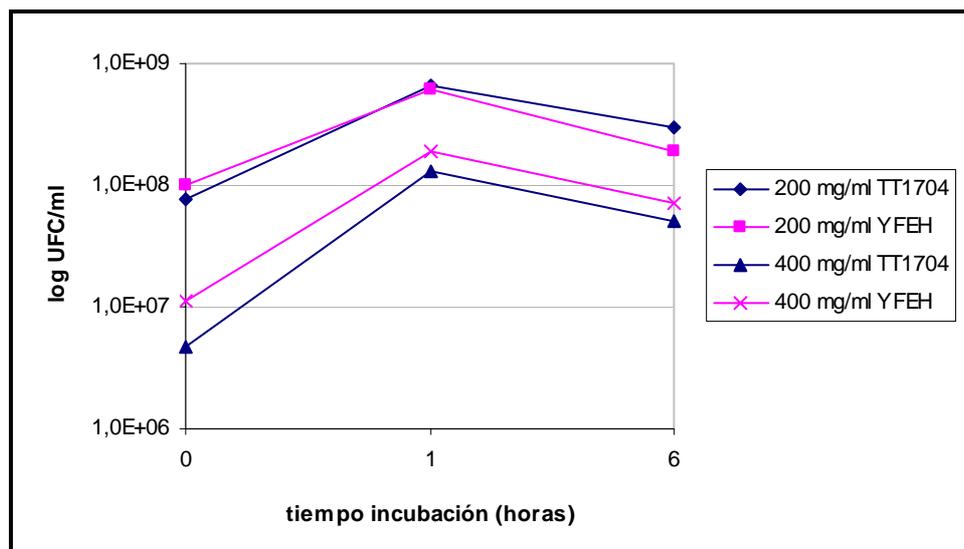


Fig. 3.11.4. Resistencia a ácidos biliares de cultivos en fase estacionaria de las cepas TT1704 e YFEH. Se muestran los recuentos de viables como el log UFC/ml y el tiempo de incubación a 37°C tras la adición de los ácidos biliares en horas.

- MIC sólida: a partir de cultivos de las cepas TT1704 e YFEH en fase estacionaria en medio LB a 37°C se sembró un banco de diluciones en placas de LB agar con diferentes concentraciones de sales biliares (0-5-10-15-20 mg/ml) para determinar si había diferencias en la concentración mínima inhibitoria en medio sólido. Después de 24 horas de incubación a 37°C se hizo un recuento de células viables observando también la morfología colonial. No se observaron diferencias entre las dos cepas (tabla 3.11.4).

Tabla 3.11.4. MIC sólida de sales biliares de las cepas TT1704 e YFEH expresada en % de supervivencia respecto al recuento de células viables de las placas sin sales biliares.

	MIC sólida (% supervivencia)				
	0 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	15 mg/ml	20 mg/ml
TT1704	100	62	13	14	4
YFEH	100	54	14	14	3

3.11.2.3. Resistencia a arsenato/arsenito

A partir de cultivos en fase estacionaria de las cepas TT1704 e YFEH (16-18 h de incubación) en medio LB a 37°C se sembró un banco de diluciones en placas de LB agar con diferentes concentraciones de arsenato (12,5-25-50-100 µg/ml) y arsenito (2,5-5-10-20 µg/ml). Se incubaron las placas a 37°C durante 48 horas y se realizó un recuento de células viables, observando también la morfología y el tamaño colonial. La concentración mínima inhibitoria (MIC) fue la misma para las dos cepas: 100 µg/ml y 20 µg/ml para arsenato y arsenito, respectivamente.

3.11.3 ANÁLISIS DEL PATRÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE LA CEPA YFEH

Con independencia de la función de la proteína YfeH los datos obtenidos del análisis de su secuencia (apartado 3.5.2) sugieren que YfeH es una proteína de membrana. Al obtener el mutante YFEH se decidió aislar las proteínas de membrana externa e interna (apartado 2.7.1.1 de material y métodos) en comparación con la cepa salvaje, para examinar la posibilidad de un cambio en el patrón electroforético, dada la ausencia de la proteína YfeH. Se aislaron las proteínas de membrana de cultivos de las cepas TT1704 e YFEH crecidos en LB a 37°C en fase exponencial ($DO_{600}=0,5$) y estacionaria. Los extractos se analizaron en geles de poliacrilamida al 10% (apartado 2.7.3.1). No se observó ningún cambio en el patrón electroforético.

3.12 LA PROTEÍNA YfeR INTEGRADA EN UNA RED DE REGULACIÓN GLOBAL

3.12.1 ANÁLISIS COMPARATIVO POR ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DEL PROTEOMA DE LAS CEPAS TT1704 E YFER(pLGYFER) (*yfeR*⁺), YFER E YFER(pIG338-30) (*yfeR*⁻)

Hasta el momento no se habían podido obtener datos experimentales que demostrasen una regulación del gen *yfeH* por parte de la proteína YfeR (apartado 3.8). Asimismo, el gen *yfeH* no presentaba una regulación transcripcional dependiente de osmolaridad, a diferencia del gen *yfeR*, su teórico regulador LysR. En base a estas razones se estudió la posibilidad de que la proteína YfeR, al igual que sucede con otras proteínas LysR, regulase la expresión de otros genes alternativos al adyacente.

La aproximación que se realizó fue la de analizar los extractos celulares mediante geles de dos dimensiones (2D). Se obtuvieron extractos celulares (apartado 2.7.1.3 de material y métodos) a partir de cultivos de las cepas TT1704, YFER, YFER (pLG338-30) e YFER (pLGYFER). La primera dimensión consistió en un isoelectroenfoque de las proteínas utilizando un rango de anfólitos de 3-10 (apartado 2.7.3.1.2). En la segunda dimensión, se separaron las proteínas por el tamaño molecular mediante un gel de poliacrilamida al 12% en Tris-Glicina-SDS (apartado 2.7.3.2.2). Posteriormente los geles se tiñeron con nitrato de plata (apartado 2.7.3.4.2).

En la figura 3.12.1 (A,B,C,D) se muestran los geles obtenidos para cada extracto, obtenidos a partir de cultivos crecidos hasta una $DO_{600} = 0,7$ (fase exponencial) en LB 0 M NaCl, condiciones en las que se induce la expresión del gen *yfeR*.

Para el análisis de las imágenes y la comparación de los geles se utilizó el programa ImageMaster v 3.0 de Amersham Biosciences. Se observaron algunos “spots” diferenciales entre las cepas TT1704 e YFER, pero en ningún caso fueron diferencias de ausencia o presencia, sino de nivel de expresión. Los “spots” sobreexpresados en la cepa TT1704 respecto a la cepa YFER se han marcado con un círculo (fig. 3.12.1.A), y los

sobreexpresados en la cepa YFER con un cuadrado (fig.3.12.1.B). Estas diferencias también se observaron en los geles obtenidos a partir de las cepas YFER (pLG338-30) (fig.3.12.1.C), con el mismo patrón de expresión que la cepa YFER, y en la cepa YFER (pLGYFER) (fig. 3.12.1.D), que al contener el gen *yfeH* entero clonado en un plásmido pLG33830 complementa la mutación, y por lo tanto presenta el mismo patrón de expresión proteica que la cepa TT1704.

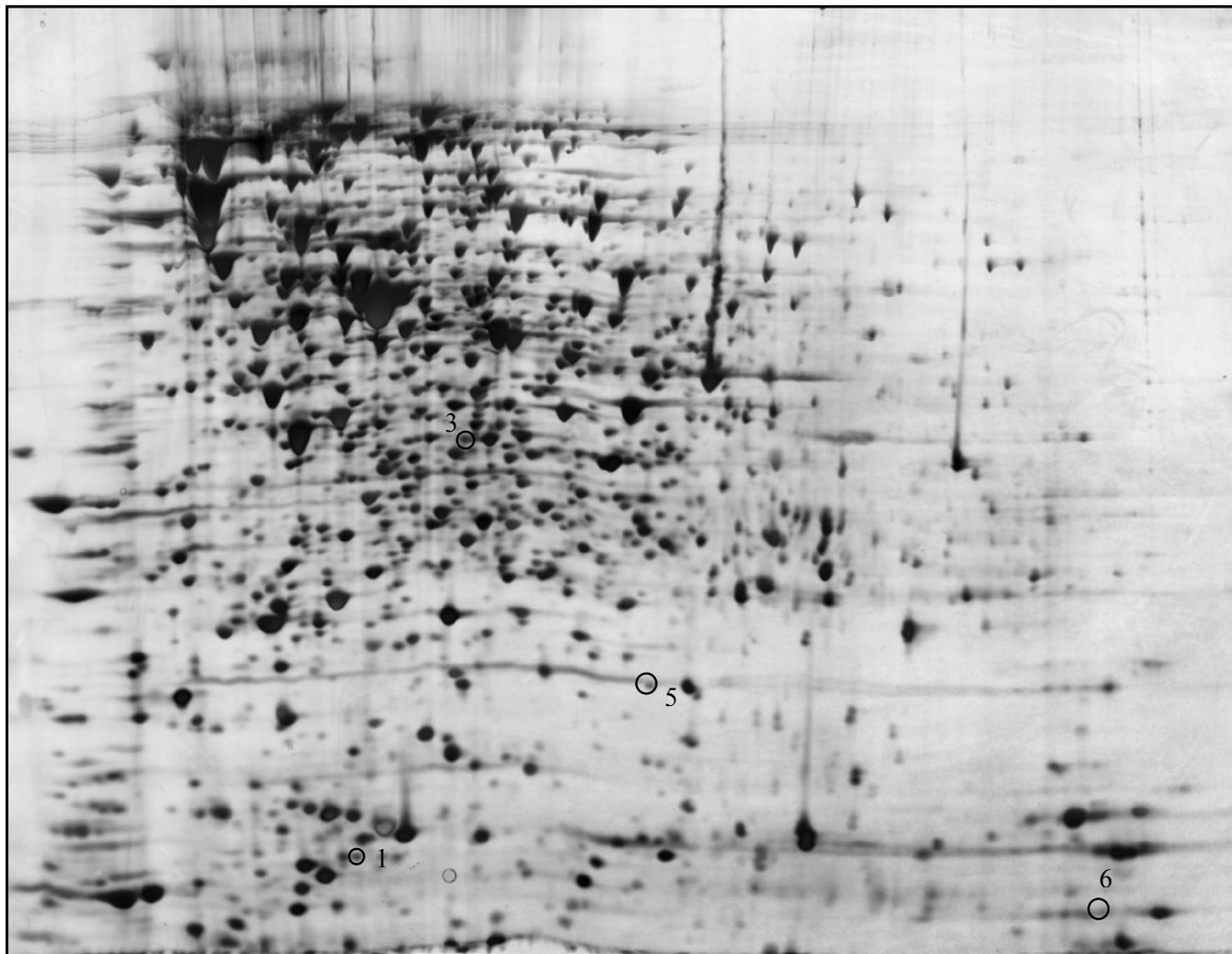


Fig 3.12.1.A. Análisis electroforético mediante 2D-PAGE de un extracto celular de la cepa TT1704.

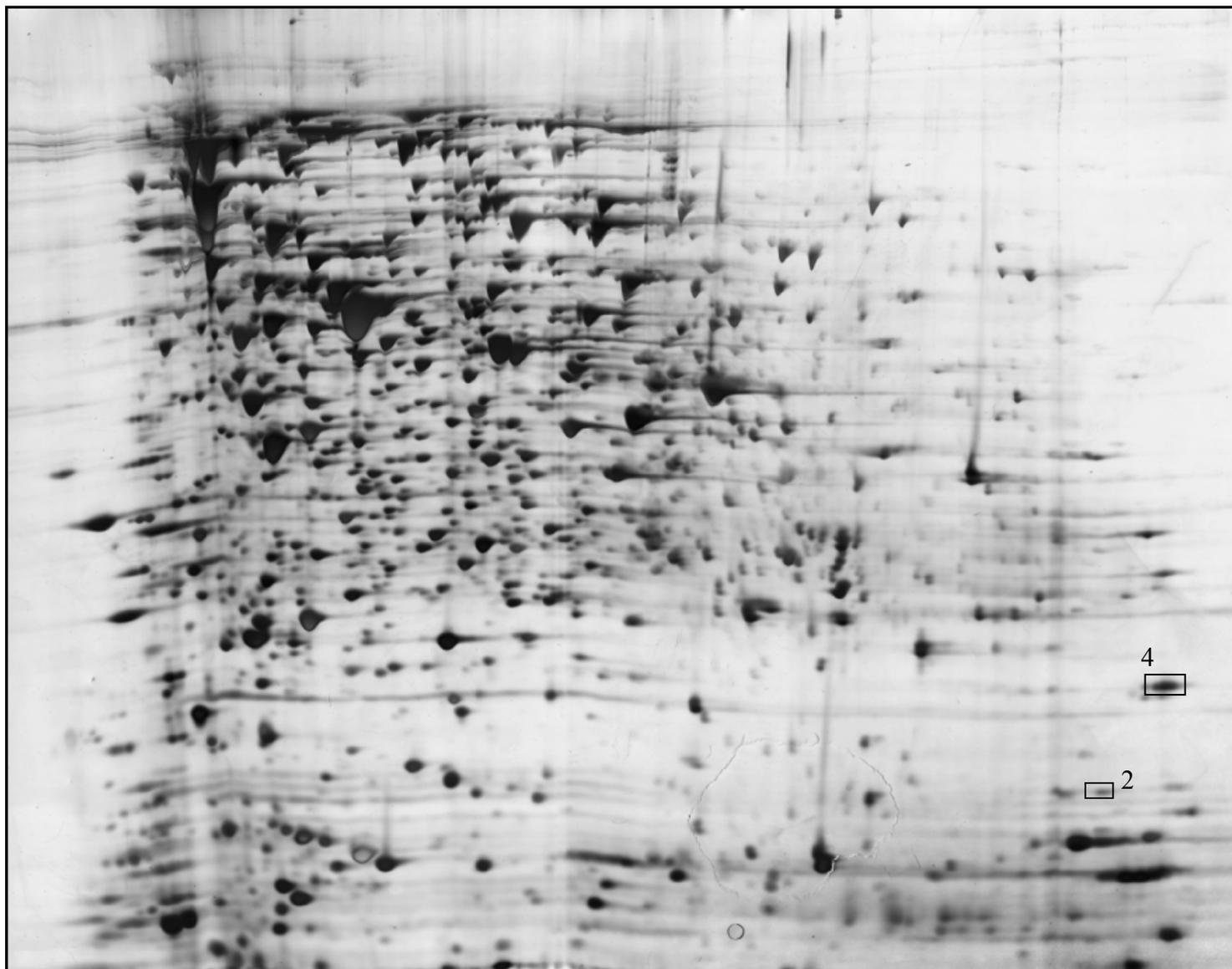


Fig 3.12.1.B. Análisis electroforético mediante 2D-PAGE de un extracto celular de la cepa YFER.

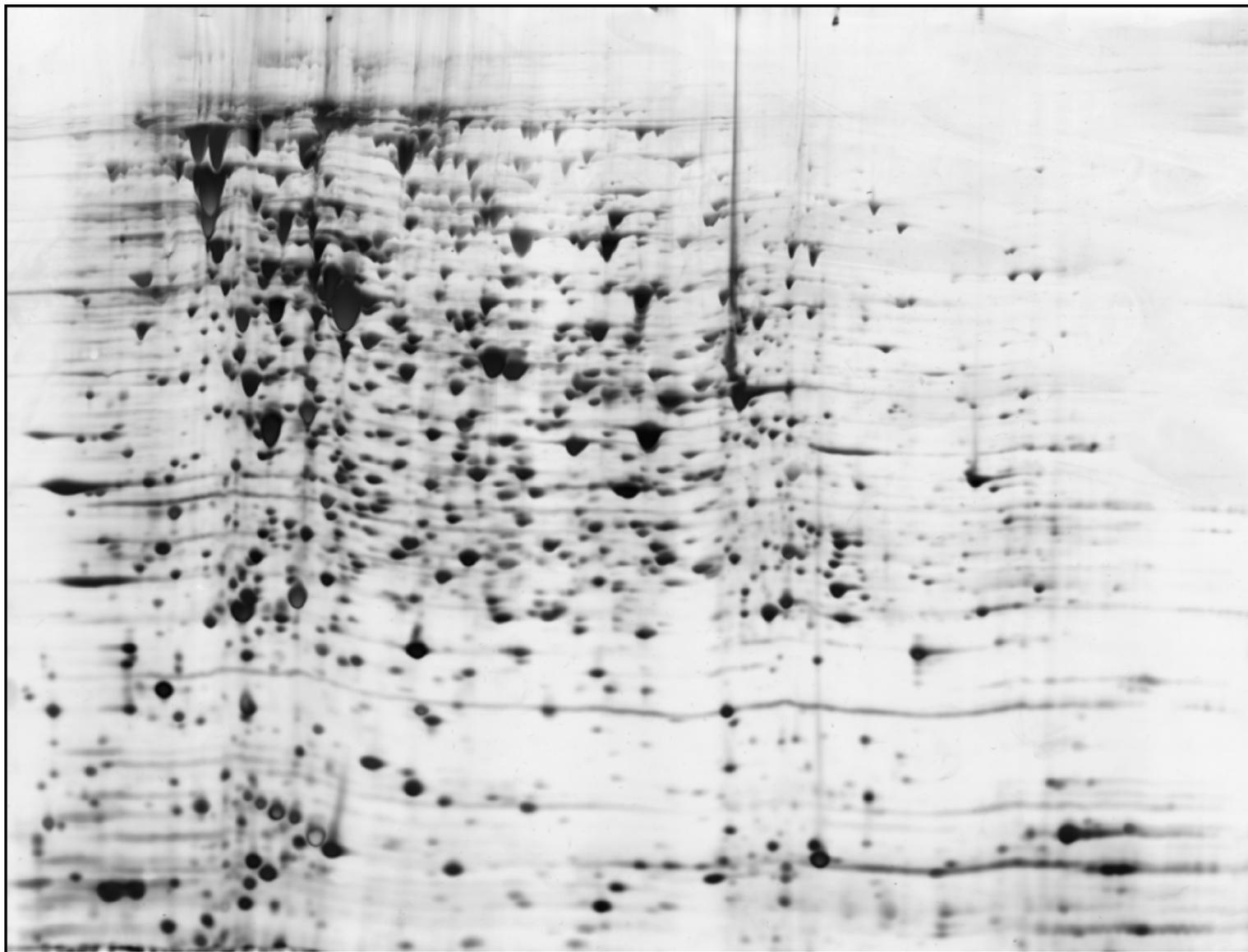


Fig 3.12.1.C. Análisis electroforético mediante 2D-PAGE de un extracto celular de la cepa YFER (pLG338-30).

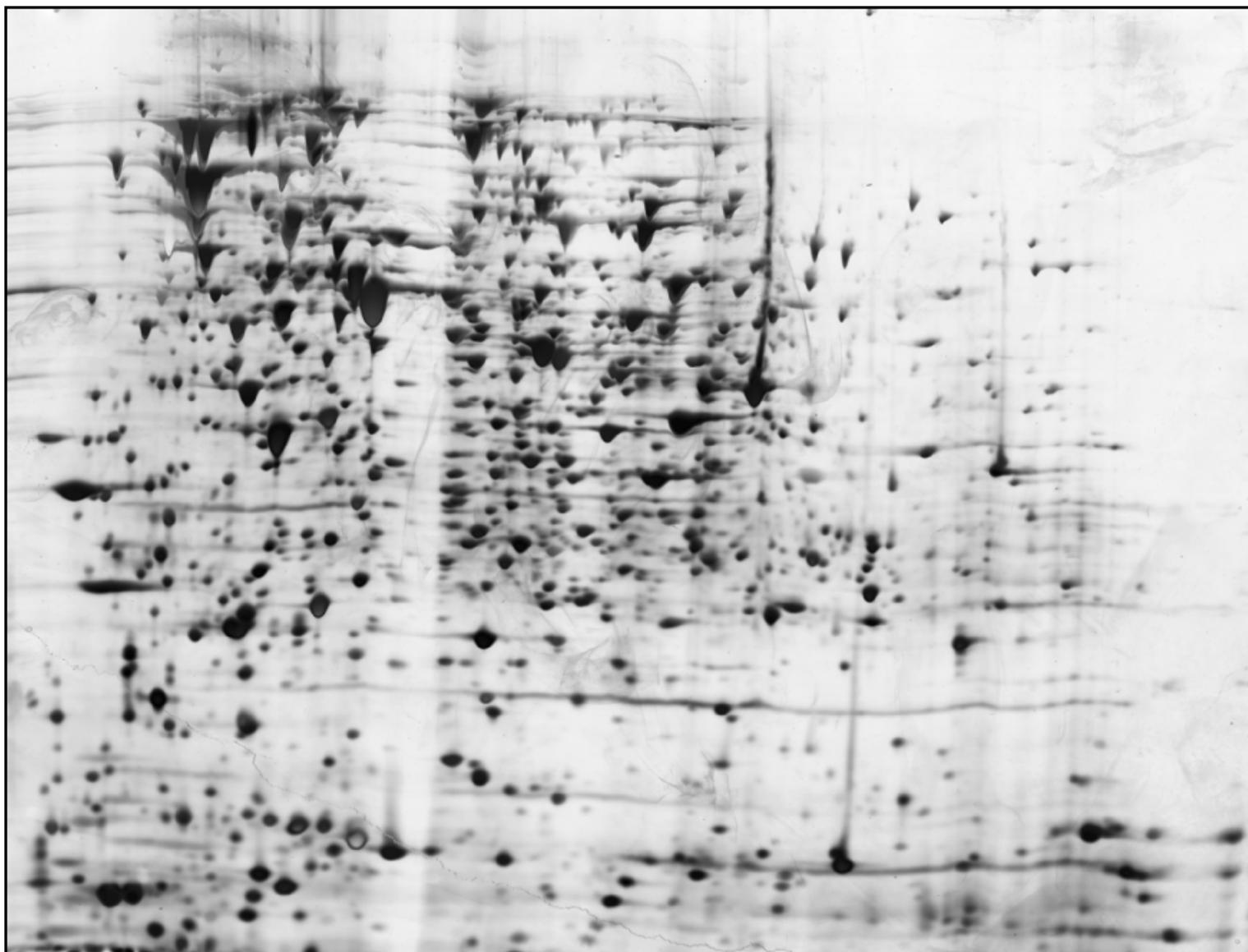


Fig 3.12.1.D. Análisis electroforético mediante 2D-PAGE de un extracto celular de la cepa YFER (pLGYFER).

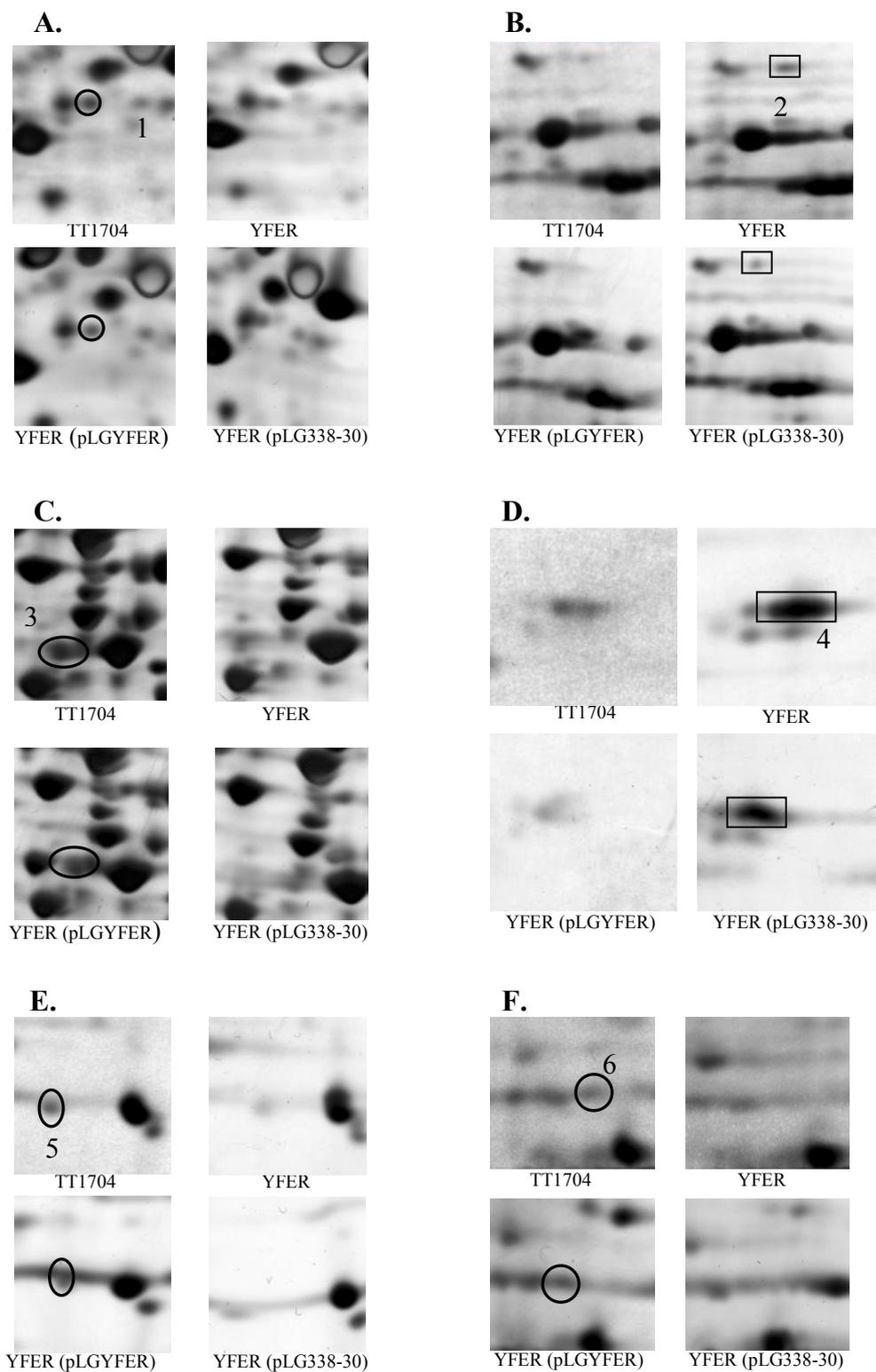


Fig. 3.12.2. Región ampliada de los “spots” diferenciales numerados en la figura anterior.

Todos los “spots” marcados en las figuras 3.12.2.A y B se recortaron de los geles, se digirieron con tripsina para analizar los espectros obtenidos por MALDI-TOF, y en caso de no obtener resultados, por CUT-OFF. Tanto la tripsinización como los posteriores análisis fueron realizados en la Unitat de Proteòmica dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

De las proteínas analizadas fue posible identificar dos, que se han marcado con un número en los geles correspondientes y se describen a continuación en la tabla 3.12.1:

Tabla 3.12.1. Proteínas identificadas mediante los análisis por MALDI-TOF Y CUT-OF de los “spots” obtenidos en los geles de 2D-PAGE de las cepas TT1704 e YFER.

Nº spot	Proteína identificada/Gen	M _r (kDa)/pI	Nº Acceso SwissProt
1	“Heat-shock protein A” IbpA/ <i>ibpA</i>	15,7/5,57	Q7CPF1
2	Regulador transcripcional de respuesta a leucina Lrp/ <i>lrp</i>	18,9/8,9	P37403

Una de las proteínas identificadas es IbpA que, como se puede observar en la figura 3.12.2 (A), se encuentra más expresada en la cepa TT1704 que en YFER. No se ha comprobado experimentalmente la función de esta proteína en *S. Typhimurium*, pero si la de su homóloga en *E. coli*. El gen *ibpA* se encuentra conjuntamente con el gen *ibpB* formando parte de un operón. IbpA y IbpB son proteínas de 16 kDa pertenecientes a la familia de las sHsps (“small heat shock proteins”). Se asocian con proteínas endógenas de *Escherichia coli* que forman agregados tras un choque por temperatura (Laskowska *et al.*, 1996). Recientemente se ha comprobado que también están implicadas en la protección frente a un estrés por superóxidos (Kitagawa *et al.*, 2000).

Otra de las proteínas identificadas es Lrp (“leucine-responsive regulatory protein”) que, como se puede observar en la figura 3.12.2 (B) se expresa más en la cepa YFER que en TT1704. Lrp es un regulador global implicado en la modulación de una gran variedad de funciones metabólicas, incluyendo el catabolismo y anabolismo de aminoácidos así como la síntesis del “pili”.

3.12.2 EFECTO DE LA MUTACIÓN *yfeR* SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *ibpA* y *lrp*

Como en el análisis de proteómica del mutante *yfeR* descrito en el apartado anterior fueron identificadas las proteínas IbpA y Lrp por su expresión diferencial entre las cepas TT1704 e YFER, se comprobó si la cantidad de proteína era el reflejo de una transcripción diferencial. Para hacerlo se utilizó el método de la RT-PCR, descrito en el apartado 2.6.4.2 de material y métodos.

En primer lugar se aisló el ARN de las cepas TT1704 e YFER mediante el Kit de Qiagen (apartado 2.6.1.2 de material y métodos) en las mismas condiciones de crecimiento en las que se obtuvieron los extractos para los geles 2D: en LB 0 M NaCl y a $DO_{600}=0,7$. Después del aislamiento se realizó un tratamiento con DNasa para eliminar posibles restos de ADN, y se cuantificó espectrofotométricamente la cantidad de ARN (apartados 2.6.4.1 y 2.6.1.3, respectivamente). A continuación, se buscó la concentración de ARN apropiada que no saturase la reacción de RT-PCR, utilizando para cada gen oligonucleótidos específicos de su secuencia de ADN, descritos en la figura 3.13.1. La cantidad de ARN adecuada para medir la transcripción de *ibpA* fue de 12,5 ng y en el caso de *lrp* de 3ng. En las reacciones de RT-PCR además de un control para demostrar la inexistencia de ADN en la muestra (inactivación de la retrotranscriptasa durante 10 minutos a 95°C), se incluyó un control interno con el RNA 16S, para asegurar la calidad del ARN.

<p>IBPA5: 5' CTTTGATTTATCCCCGCTGTA 3'</p> <p>IBPA3: 5' CGATACGGCGCGGTTTGT 3'</p> <p>LRP5: 5' CCCTGGCAAAGATCTCGAC 3'</p> <p>LRP3: 5' ACCTCTTCCATCACTACGTAA 3'</p> <p>16SR: 5' TTCCTCCAGATCTCTACGCA 3'</p> <p>16SF: 5' CCTCAGCACATTGACGTTAC 3'</p>
--

Fig. 3.13.1. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la reacción de RT-PCR. IBPA5 e IBPA 3 para el gen *ibpA*; LRP5 y LRP3 para el gen *lrp*; y 16SR y 16SF para el gen del RNA 16S.

En el análisis por RT-PCR de la transcripción de los genes *ibpA* y *lrp*, sólo se encontraron diferencias entre la cepa TT1704 e YFER para el gen *ibpA*. Además esta transcripción diferencial (figura 3.13.2) se correspondía con la cantidad de proteína: mayor

transcripción del gen *ibpA* en la cepa TT1704 respecto a la cepa YFER y mayor cantidad de proteína (fig. 3.12.2 apartado anterior).

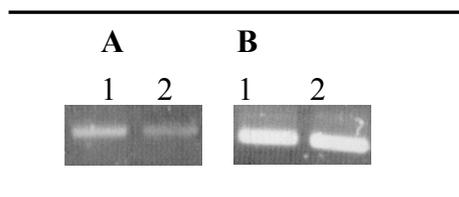


Fig. 3.13.2. Producto de amplificación del análisis por RT-PCR del gen *ibpA* (A) y el gen del ARN 16S (B) en las cepas TT1704 (carril 1) y YFER (carril 2).

En cambio para el gen *lrp* no se encontraron diferencias en el nivel de transcripción, usando el sistema de RT-PCR.

3.12.3 RELACIÓN ENTRE LOS GENES *ygdP* e *yfeR*

3.12.3.1 Antecedentes

Una vez obtenida la colección de cepas osmoreguladas mediante la inserción del transposón *MudJ*, descritas en el primer apartado de antecedentes, se realizó una segunda mutagénesis mediante *Tn10dCam*. El objetivo de este nuevo proceso de mutagénesis era identificar mediante la inserción del transposón genes cuyos productos estuviesen implicados en la represión de la expresión génica a elevada osmolaridad de los genes mutados anteriormente con las fusiones génicas *lacZ*. Así, en el proceso de selección de mutantes por inserción de *Tn10dCam* se escogieron las cepas que presentaban color azul (Lac^+) en placas con X-Gal a elevada osmolaridad (0,5 M NaCl), además de ser resistentes a Km (marcador de *MudJ*) y Cm (marcador del *Tn10dCam*). De esta forma se obtuvo la cepa mutante YFER-F, que presentaba una desregulación de la expresión del gen *yfeR* a elevada osmolaridad (Polo, 2000)

En la valoración de la actividad β -galactosidasa en medio líquido LB a baja y alta osmolaridad (0 M NaCl y 0,5 M NaCl, respectivamente), se obtuvieron valores de actividad de la cepa YFER-F tres veces más altos que en la cepa YFER en las dos osmolaridades. Estos resultados demostraron que la expresión del gen *yfeR* sufría una desrepresión en la cepa YFER-F, aunque parecía independiente de la osmolaridad.

Con el objetivo de identificar el gen afectado por la inserción del Tn10dCam en la cepa YFER-F Eva M. Urós (2003) se propuso clonar y secuenciar dicho gen.

Después del clonaje en el cósmido pLA2917 y la posterior secuenciación con oligonucleótidos de los extremos del Tn10dCam, se identificó el gen mutado por la inserción del transposón. Se trata del gen *ygdP* de *S. Typhimurium*, que codifica para una proteína miembro de una subfamilia de hidrolasas Nudix, que actúan sobre los dinucleósidos polifosfatos: diadenosina tetrafosfato (Ap₄A), diadenosina pentafofosfato (Ap₅A), y diadenosina hexafofosfato (Ap₆A). Se ha demostrado que los mutantes *ygdP* presentan un incremento en la concentración intracelular de Ap_xN, y la pérdida de su capacidad de invasión (Ismail *et al.*, 2003).

Una vez conocida la identidad de la inserción de Tn10dCam en la cepa YFER el doble mutante YFER-F se denominó YFERYGDP.

3.12.3.2 Análisis del patrón de proteínas de los mutantes *ygdP*, *yfeR ygdP* y *lrp*

Al relacionar la proteína YfeR con procesos de regulación global que implican también a las proteínas Lrp e IbpA se decidió también considerar la posibilidad de que existiese un nexo entre el sistema *ygdP*, el acúmulo de dinucleósido tetra o pentafofosfato y los sistemas IbpA y Lrp. Es importante mencionar que el acúmulo de dinucleósidos tetra o pentafofosfato ha sido asociado a respuesta a diferentes tipos de situaciones de estrés celular. Como se explica en el apartado anterior la mutación *ygdP* provoca un aumento de la expresión del gen *yfeR* tanto a baja como a elevada osmolaridad. El análisis de expresión de extractos celulares en geles de poliacrilamida de la cepa YFER (apartado 3.12) no mostró diferencias respecto a la cepa TT1704. Teniendo en cuenta la relación entre las proteínas YgdP e YfeR se decidió relizar un análisis comparativo por electroforesis unidimensional de las cepas TT1704, YFER, YFERYGDP (doble mutante *yfeR ygdP*) e YGDP (mutante *ygdP*, obtenido por transducción con P22 a la cepa TT1704). Como en el análisis comparativo por electroforesis bidimensional (apartado 3.12.1) se observó que la proteína Lrp se sobreexpresaba en un fondo genético *yfeR*⁻, se quiso comprobar si en extractos obtenidos a partir de una cepa *lrp*⁻ se producía alguna variación en el patrón electroforético que estuviese relacionado con YfeR. Por ello, también se incluyeron en el experimento una cepa mutante para el gen *lrp* (SV4280) y su cepa isogénica (ATCC

14028). Los cultivos se incubaron a 37°C en LB 0M NaCl y se recogieron en fase exponencial ($DO_{600}=0,5$).

Como se muestra en la figura 3.13.1 los patrones electroforéticos de las cepas TT1704 e YFER son iguales. En cambio, se observa tanto en la cepa YFERYGDP como en la cepa YGDP la sobreexpresión de una proteína, diferentes entre ellas, en comparación con el resto de cepas. Por otro lado en la cepa mutante *lrp* (SV4280), también se observa la sobreexpresión de la misma proteína que en la cepa YFERYGDP.

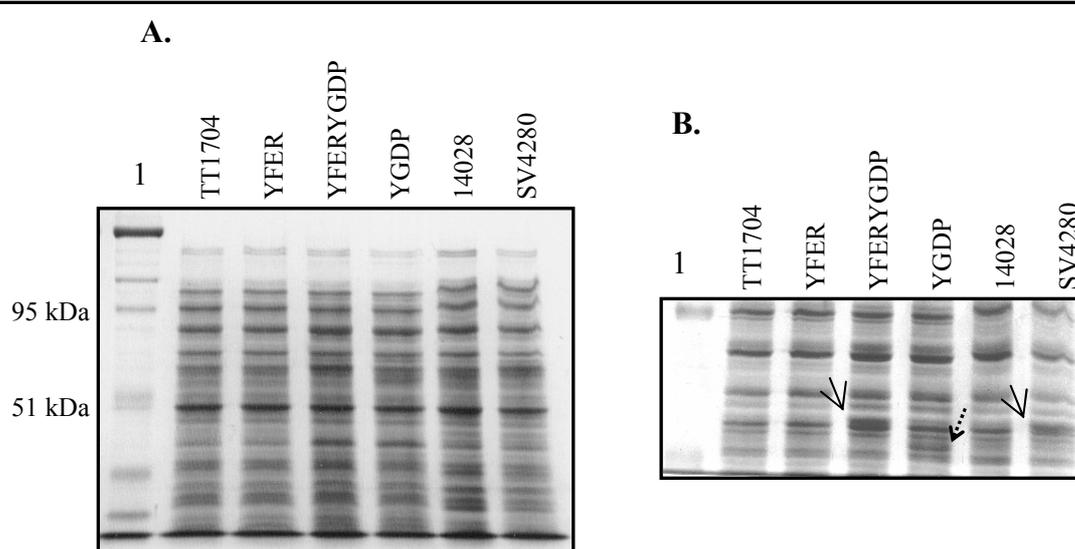


Fig. 3.12.1. Análisis electroforético de extractos con 20 μ g de proteína en geles de poliacrilamida al 10% teñidos con azul de Coomassie. Cepas TT1704, YFER, YFERYGDP, YGDP, 14028 y SV4280. Carril 1: marcador de pesos molecular preteñido. Las figuras A y B son los mismos extractos pero en A se observan todos los rangos de peso molecular; y en B se ve ampliada la región comprendida entre las bandas 51 kDa y 95 kDa del marcador de pesos molecular preteñido, además de que el gel corrió más para ampliar la resolución de la zona. Se ha marcado con una flecha discontinua la proteína sobreexpresada en el mutante *ygdp* (YGDP); con una flecha continua la sobreexpresada en el doble mutante *yfeR ygdp* (YFERYGDP) y en el mutante *lrp* (SV4280).

Se recortaron las bandas señaladas en la figura 3.13.1 del gel de poliacrilamida con el fin de identificarlas. Se digirieron con tripsina y los espectros obtenidos se analizaron por MALDI-TOF, y en caso de ser necesario por CUT-OFF. Tanto la tripsinización como los posteriores análisis fueron realizados en la Unitat de Proteòmica dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona. La proteína sobreexpresada en la cepa YGDP resultó ser FliC, la flagelina de fase I, de 489 AAs y un peso molecular de 51.210

Da. Esta proteína es la subunidad estructural que polimeriza para formar los filamentos del flagelo.

La proteína sobreexpresada en las cepas YFERYGDP y SV4280 fue identificada como FljB, o flagelina de fase II, de 505 AAs y un peso molecular de 52.404 Da. Esta proteína también es la subunidad estructural del flagelo. Todas las especies de *Salmonella* tienen dos genes, en diferentes localizaciones del cromosoma, que codifican para la proteína que forma el filamento del flagelo, la flagelina. FliC y FljB están altamente conservadas en sus extremos amino y carboxi terminal, y es la parte central de la secuencia lo que les da distinta antigenicidad (Okazaki *et. al*, 1993). Cabe señalar que las diferencias en el patrón electroforético respecto a las flagelinas no son de presencia o ausencia: en todas las cepas se observan tanto FliC como FljB, pero en la cepa YGDP se sobreexpresa la flagelina de fase I FliC, mientras que en las cepas YFERYGDP y SV4280 se sobreexpresa la de fase II, FljB.

3.12.3.3 Regulación de la expresión del gen *ygdP* según la osmolaridad del medio

Dado que el gen *yfeR* está osmoregulado y en el mutante *ygdP* hay un aumento de la expresión de *yfeR*, se decidió analizar la expresión del gen *ygdP* según la osmolaridad del medio por RT-PCR (apartado 2.6.4). Con esta finalidad se aisló el ARN de la cepa TT1704 mediante el Kit de Qiagen (apartado 2.6.1.2) en fase exponencial ($DO_{600}=0,7$) de cultivos crecidos en LB 0M NaCl y LB 0,5M NaCl. La concentración de ARN apropiada para no saturar la reacción de RT-PCR fue de 100 ng.

En la figura 3.12.2 se muestran los oligonucleótidos utilizados en la reacción de RT-PCR.

<p>YGDP5: 5' GATTGATGACGATGGCTACC3'</p> <p>YGDPDOWN: 5' CCTCTTTTACGTCGATAAGCA 3'</p>
--

Fig. 3.12.2. Oligonucleótidos específicos del gen *ygdP* utilizados en la reacción de RT-PCR

Como se puede observar en la figura 3.12.3 la expresión del gen *ygdP* en fase exponencial en la cepa TT1704 es mayor cuando la osmolaridad del medio es elevada (LB

0,5 M NaCl), es decir, se reprime a baja osmolaridad (LB 0M NaCl), modelo de regulación contrapuesto al observado para el gen *yfeR*. Estos resultados son coherentes con el hecho de que la pérdida de la función de, y por lo tanto, el acúmulo de Ap_NA, incrementa la expresión de *yfeR* de forma diferencial a alta y baja osmolaridad.

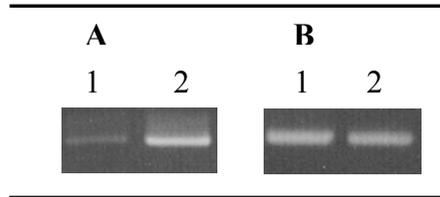


Fig. 3.13.2. Producto de amplificación del análisis por RT-PCR del gen *ygdP*(A) y el gen del ARN 16S (B) en la cepa TT1704 crecida en LB 0M NaCl (carril 1) y LB 0,5M NaCl (carril 2).