

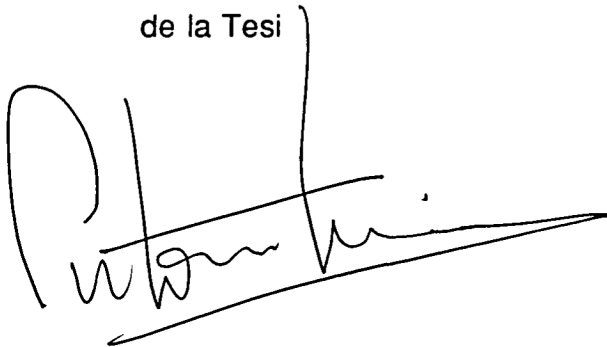
UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE BIOLOGIA

**LES MUTACIONS *hha* I *hap*: INCREMENT DE
L'EXPRESSION DE PROTEÏNES HETERÒLOGUES
CLONADES A *Escherichia coli***

Vist-i-plau del Director

de la Tesi



Dr. Antonio Juárez Giménez

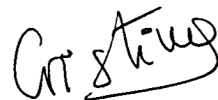
Memòria presentada per

Cristina Madrid Xufre

per optar al Grau de

Doctor en Ciències

Biològiques



Barcelona, Novembre de 1992

3 Resultats

3.1 CARACTERITZACIÓ DEL GEN *hha* MITJANÇANT SONDES DE DNA.

La primera part d'aquest treball va consistir en la complementació dels estudis sobre el gen *hha* pel que fa referència a la seva distribució a la família *Enterobacteriaceae*. També es pretenia analitzar un fenomen observat en intentar transduir la mutació *hha* des de la soca Hha-3 (*hha*::Tn5*phoA*). El percentatge de transductants Hha⁻ Km^r obtinguts des de la soca Hha-3, utilitzant el fag P1 *cm ts* era molt baix; només el 10% dels transductants Km^r mostrava grans halos d'hemolisi i una activitat hemolítica equivalent a la de la soca Hha-3 (Godessart *et al.*, 1988). El mapatge per conjugació amb soques Hfr::Tn10 i cotransducció de marcadors amb P1 indicava que només hi havia una còpia del gen *hha*, ja que el màxim de transconjugants Hha⁺ Tc^r es donava només en un punt. Una hipòtesi per explicar la baixa eficiència de lligament entre el fenotip Hha⁻ i la Km^r podria ser que els transductants Hha⁺ Km^r tinguessin el seu origen en la transducció de transposicions secundàries de Tn5 al genoma del fag P1, fenomen descrit anteriorment (Berg *et al.*, 1983). Tanmateix, tampoc es podia descartar la possibilitat de que el gen *hha* estigués en una sola còpia al cromosoma d'*E.coli*, però flanquejat per seqüències repetides en altres punts del genoma, fet que podria implicar que la recombinació posterior a la transducció no es donés a la regió del gen *hha*, sinó en altres localitzacions cromosòmiques on es trobessin aquestes seqüències.

3.1.1 Construcció d'una sonda del gen *hha*.

Amb el doble objectiu d'aclarir si el gen *hha* es troba flanquejat per seqüències repetides al cromosoma d'*E.coli* i, per una altra banda, estudiar la seva distribució en altres gèneres d'Enterobactèries, es van construir sondes d'aquest gen marcades amb digoxigenina.

Dos dels fragments de DNA que es van utilitzar com a sonda corresponen als inserts dels plàsmids obtinguts durant el clonatge i subclonatge del gen *hha* (Nieto *et al.*, 1991). Es va utilitzar el fragment *EcoRV* de 1,7 Kb del plàsmid pUBM22, i el fragment *BamHI-EcoRI* de 5,8 Kb del plàsmid pUBM20 (Figura 3.1.1). El fragment *BamHI-EcoRI* de 5,8 Kb va ser escollit ja que per la seva mida, molt més gran que el gen *hha* (delimitat en aproximadament 400 pb), podria ser útil per la detecció d'hipotètiques seqüències repetides que podrien flanquejar el gen *hha*. Per obtenir els fragments d'interès, es va digerir el DNA plasmídic, amb *EcoRV* per pUBM22 o amb *BamHI/EcoRI* per pUBM20, i es van separar els fragments, corresponents al vector (pBR322) i a l'insert, en gels d'agarosa de baix punt de fusió, des d'on es va aïllar el DNA corresponent al fragment clonat i es va purificar seguint la metodologia descrita a l'apartat 2.9.7 de Materials i mètodes. Una vegada comprovat per electroforesi que s'havia obtingut el fragment desitjat, es va marcar amb digoxigenina, utilitzant el "kit" de marcatge i detecció d'àcids nucleics no radioactiu de Boehringer Mannheim (Materials i mètodes, apartat 2.9.8).

El fet que els dos fragments anteriors incloquin el gen *hha* i, en major o menor grau, les seqüències adjacents, implica que el seu ús com a sonda per la detecció del gen *hha* pot produir falsos positius. Per això vàrem decidir utilitzar també un altre fragment de DNA que delimita més precisament la seqüència del gen *hha*. Aquest fragment, flanquejat per dianes *BamHI* i *Sall*, estava clonat al plàsmid pUBM90 (Carmona, Tesi Doctoral, 1992). El fet de disposar de la seqüència del gen *hha* va permetre el disseny d'uns "primers" específics (Figura 3.1.2) que permetessin l'amplificació d'aquest gen per tècniques de PCR, de manera que es va poder seguir aquesta estratègia per marcar el fragment de DNA corresponent al gen, utilitzant en la reacció d'amplificació nucleòtids

marcats amb digoxigenina i DNA plasmídic de pUBM90 com a motlle (Materials i mètodes, apartat 2.9.5).

Les sondes utilitzades han estat per tant tres:

- 1) Fragment *EcoRV* de 1,7 Kb del plàsmid pUBM22
- 2) Fragment *EcoRI*- *BamHI* de 5,8 Kb de pUBM20
- 3) Fragment *BamHI*-*SalI* de 300 pb de pUBM90.

Figura 3.1.1 Mapa físic de la regió del minut 10,5 del cromosoma d'*E.coli*, on es troba mapat en gen *hha* (A) i fragments corresponents a pUBM22 i pUBM20, utilitzats com a sondes (B).

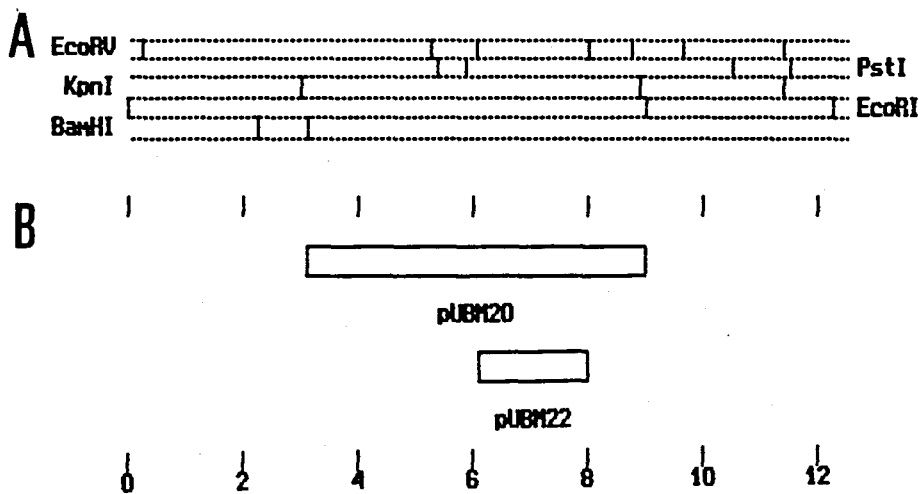


Figura 3.1.2 Seqüència del gen *hha* (subratllada) i "primers" utilitzats per la seva amplificació per PCR (en negreta).

GTT TTG TCA ATG CGA CGA AAG AGA ATC CTG CGA GTT TAT CTT GTT AGA ATT ATT

5' **GG GGA TCC ATG TCC GAA AAA CCT TTA ACG** 3' -->

ACA ACC ATA GGT AGA AGT ATG TCC GAA AAA CCT TTA ACG AAA ACC GAT TAT TTA

ATG CTG TTA CGT CGT TGC CAG ACA ATT GAC ACG CTG GAG CGT GTT ATC GAG AAA

AAT AAA TAC GAA TTA TCA GAT AAT GAA CGT GCG GTA TTT TAC TCA GCC GCA GAT

CAC CGC CTC GCC GAA TTG ACC ATG AAT AAA CTG TAC GAC AAG ATC CCT TCC TCA

GTA TGG AAA TTT ATT CGC TAA TAA ATA ATT CGC TTT CGG AGC TAT ACC CGG CTG

<-- 3' **AAA TAT GAA AAA GCG GTA CTT CAG CTG GG** 5'

TTT ATT AAG AAT TTT ATA CTT TTT CGC CAT GAA GAC ATA CCC TAT GTG ATC TTT

ATC ACA CAG ATG TAA TGG GAA CGT TCT CTT CAC TGA CTT TTC GTC TAA ATG TGT

TGC CG

3.1.2 Detecció del gen *hha* al cromosoma d'*E.coli*, mitjançant hibridacions de tipus "Southern".

Les sondes contruïdes es van utilitzar per hibridar contra DNA cromosòmic d'*E.coli* amb la finalitat de determinar quants fragments donaven una hibridació positiva, i per tant confirmar que només hi havia una còpia del gen *hha*. A més a més, es volia també determinar si la seqüència del gen *hha* estava flanquejada per seqüències repetides al llarg del cromosoma d'*E.coli*.

Per les anàlisis de restricció i la seqüència del gen *hha* (Nieto *et al.*, 1991), sabíem que no hi ha dianes per l'enzim de restricció *EcoRI* dintre de la seqüència corresponent al gen *hha*. Per tant, el DNA cromosòmic de la soca d'*E.coli* C600, la mateixa que es va utilitzar pel clonatge del gen salvatge *hha*, es va digerir totalment amb aquest enzim abans d'utilitzar-lo en la hibridació.

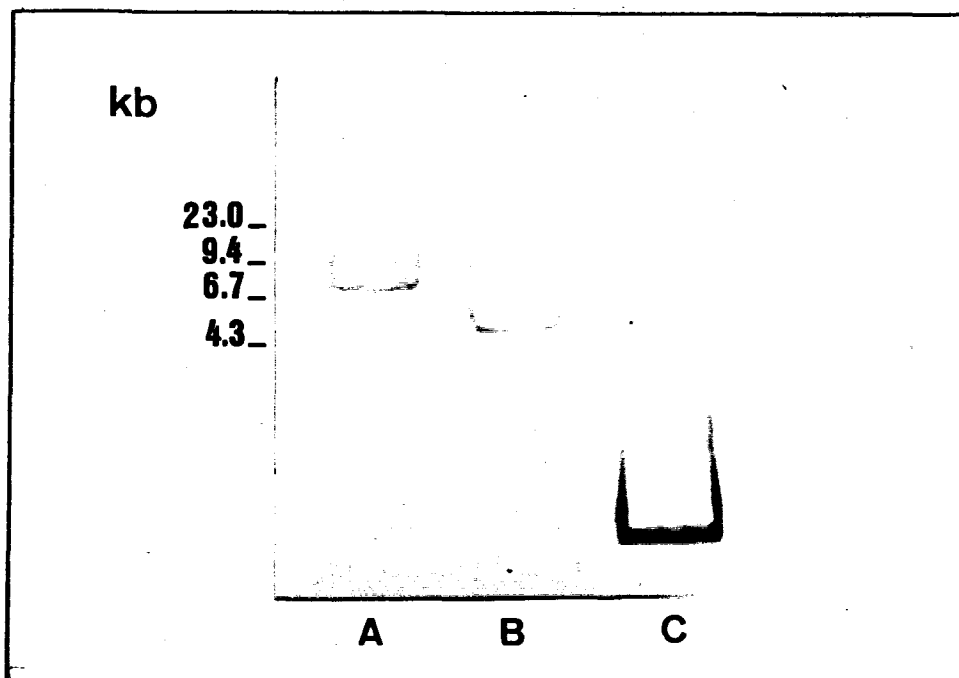
A més a més, donat que podíem establir la correlació del mapatge de la mutació *hha* amb el mapa físic publicat per Kohara (Kohara *et al.*, 1987), vam cercar una diana interna al fragment *EcoRI* en el qual estava situada la mutació, per tal de confirmar per hibridació que es tractava d'aquest fragment. La diana escollida corresponia a l'enzim *KpnI* (Figura 3.1.1). Per tant, el DNA cromosòmic de la soca C600 va ser digerit també amb *EcoRI* i *KpnI*.

La hibridació del DNA cromosòmic de la soca C600 digerit amb *EcoRI* contra la sonda del gen *hha* de 1,7 Kb va proporcionar un únic senyal d'hibridació. El fragment que va hibridar presentava un tamany similar al que es pot deduir del mapa físic del cromosoma d'*E.coli* (Figura 3.1.3). El resultat va ser el mateix utilitzant la sonda de 5,8 Kb (Figura 3.1.4), i també amb la soca 5K i la sonda de 300 pb (Figura 3.1.6). La hibridació amb un únic fragment, utilitzant qualsevol de

les tres sondes, ens permetia saber que al menys en el fragment de 5,8 Kb, molt més gran que el gen pròpiament dit, delimitat en aproximadament 400 pb (Nieto *et al.*, 1991), no hi ha seqüències que estiguin repetides en altres punts del cromosoma. En conseqüència, la manca de lligament entre el marcador de Tn5*phoA* (Km') i la mutació *hha* (Godessart *et al.*, 1988), s'ha d'atribuir bé al fenomen descrit per Berg (Berg *et al.*, 1983), o bé al fet que, a distàncies superiors a aproximadament 3 kb des de cada extrem del gen *hha*, hi hagi seqüències repetides que provocarien que el fragment transduït pel bacteriòfag P1 es recombinés en una regió diferent de la que conté el gen *hha*.

A més a més, la hibridació contra les sondes del gen *hha* del DNA de la soca C600 digerit amb *EcoRI* i *KpnI* va donar una banda més petita, tal com era d'esperar, ja que tant el fragment de 5,8 Kb com el de 1,7 Kb queden englobats dins d'un dels fragments de la digestió doble *EcoRI-KpnI* (Figures 3.1.1 i 3.1.3). D'aquesta manera la regió del gen *hha* quedava totalment situada i correlacionada dins el mapa físic del cromosoma d'*Escherichia coli*.

Figura 3.1.3 Hibridació contra la sonda del gen *hha* de 1,7 Kb. A: DNA cromosòmic d'*E.coli* C600 digerit amb *EcoRI*; B: DNA cromosòmic de C600 digerit amb *EcoRI* i *KpnI*; C: control positiu utilitzant DNA del plàsmid pUBM22 digerit amb *EcoRV*.



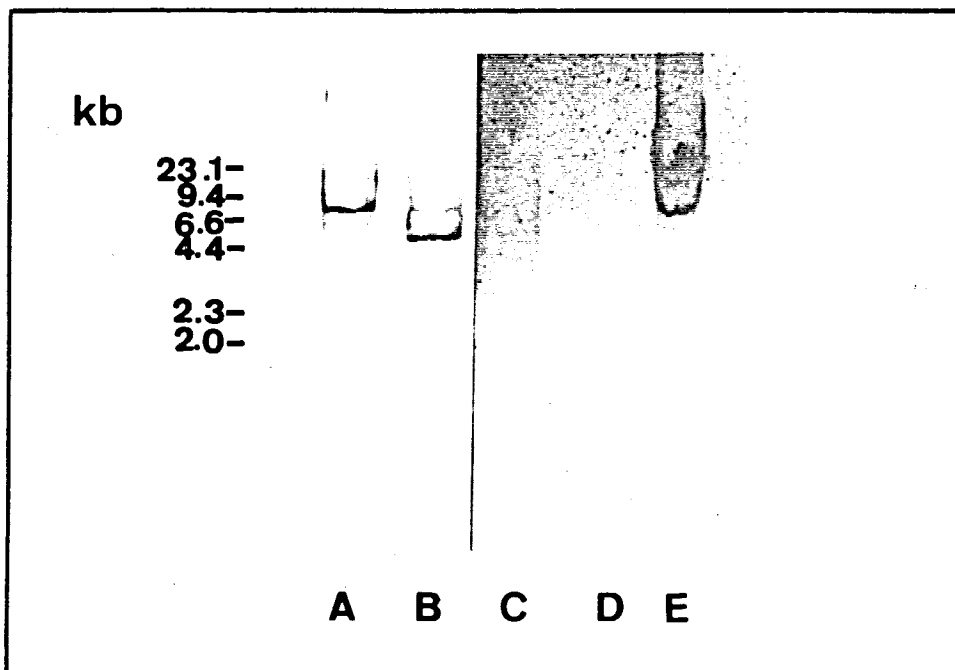
3.1.3 Detecció del gen *hha* al cromosoma d'altres soques d'enterobactèries, mitjançant hibridacions de tipus "Southern".

L'anàlisi de la distribució del gen *hha* entre altres gèneres d'Enterobactèries es va fer utilitzant les mateixes sondes descrites a l'apartat 3.1.1 en hibridacions contra DNA total de diferents soques d'enterobactèries.

Inicialment es van utilitzar les soques: *Salmonella typhimurium* SL3770 (Camprubí *et al.*, 1990), *Serratia marcescens* 2170c (Diaz i Juárez, 1991), i *Klebsiella pneumoniae* C3 (Tomás i Jofre, 1985).

Es va aïllar i digerir el DNA cromosòmic d'aquestes soques amb *EcoRI*, i es va hibridar contra la sonda de 5,8 Kb aïllada del plàsmid pUBM20. L'únic cas en que es va detectar hibridació va ser amb DNA de *Klebsiella pneumoniae* C3 (Figura 3.1.4). El fet, però, d'haver utilitzat una sonda molt més gran que el fragment corresponent al gen *hha*, podia suggerir que la hibridació no era deguda a la presència d'aquest gen sinó que es degués a homologies en seqüències adjacents. Aquest punt va ser aclarit més endavant, en utilitzar directament els "primers" del gen *hha* per la seva detecció, amb les tècniques d'amplificació per PCR.

Figura 3.1.4 Hibridació de DNA cromosòmic d'*E.coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* i *Klebsiella pneumoniae* contra la sonda de 5,8 Kb del gen *hha*. A: DNA d'*E.coli* C600 digerit amb *EcoRI*; B: DNA d'*E.coli* C600 digerit amb *EcoRI* i *KpnI*; C: DNA de *S.typhimurium* SL3770 digerit amb *EcoRI*; D: DNA de *S.marcescens* 2170c digerit amb *EcoRI*; i E: DNA de *K.pneumoniae* C3 digerit amb *EcoRI*.



3.1.4 Homologia del gen *hha* amb el gen *ymoA* de *Yersinia enterocolitica*. Hibridació de DNA de *Yersinia enterocolitica* contra la sonda del gen *hha*.

Recentment, la publicació de la seqüència del gen *ymoA* de *Yersinia enterocolitica* (Cornelis *et al.*, 1991), va fer possible trobar una elevada homologia (82%) entre la seqüència d'aminoàcids de la proteïna codificada per aquest gen i la proteïna Hha, codificada pel gen *hha* (De la Cruz *et al.*, 1992; Figura 3.1.5). L'homologia en la seqüència d'aminoàcids és superior a l'homologia a nivell de seqüència de nucleòtids, que és d'un 64%. La constatació de l'homologia entre els productes dels gens *hha* i *ymoA* ens va induir a utilitzar les sondes del gen *hha* per hibridar contra DNA total de diferents soques de *Yersinia*, per veure si aquestes sondes eren útils per la detecció del gen *ymoA* a aquest microorganisme. Es van utilitzar 15 soques de *Yersinia enterocolitica* i 2 soques de *Yersinia intermedia* (Taula 3.1.1).

Es va realitzar la hibridació de tipus "Southern", utilitzant tant el DNA cromosòmic digerit, separat per electroforesi i transferit a membranes, com el mateix DNA sense digerir aplicat directament a membranes (hibridació tipus "dot"). La hibridació, utilitzant la sonda de 300 pb corresponent al gen *hha*, no va donar senyal en cap dels casos (Figures 3.1.6 i 3.1.7)

Figura 3.1.5 Homologia de nucleòtids i d'aminoàcids entre el gen *hha* i el gen *ymoA*. En negreta estan indicats els "primers" utilitzats per la detecció del gen *ymoA*.

```

hha      AGG ATC TTC AGA AAT GGC GGA AGT CAG GTA ATC GAC TAT TCC GTT
ymoA ..... GAC CGT TTA TTC AGA

GTT TTG TCA ATG CGA CGA AAG AGA ATC CTG CGA GTT TAT CTT GTT AGA ATT
CTT TTC TCA GGG GAA TAC ATC ATA CCC TGA TGA AAA CTT AGG GGA TAG TTT

ATT ACA ACC ATA GGT AGA AGT ATG TCC GAA AAA CCT TTA ACG AAA ACC GAT
                               M S E K P L T K T D
                               M T K T D
CCC TAT ATT ATT TTT ATA TGG AGA AGA AAA AAC ACC ATG ACA AAA ACT GAC
                               5' AAA ACT GAC

TAT TTA ATG CTG TTA CGT CGT TGC CAG ACA ATT GAC ACG CTG GAG CGT GTT
Y L M R L R R C Q T I D T L E R V
Y L M R L R K C T T I D T L E R V
TAC CTG ATG CGT TTA AGA AAA TGT ACG ACT ATT GAT ACA TTG GAA CGT GTA
TAC CTG ATG CGT TTA 3' -->

ATC GAG AAA AAT AAA TAC GAA TTA TCA GAT AAT GAA CGT GCG GTA TTT TAC
I E K N K Y E L S D N E L A V F Y
I E K N K Y E L S D D E L E L F Y
ATT GAA AAA AAT AAG TAC GAA CTT TCT GAC GAT GAG CGT GAA TGG TTT TAC
                               <--3' AAA ATG

TCA GCC GCA GAT CAC CGC CTC GCC GAA TTG ACC ATG AAT AAA CTG TAC GAC
S A A D H R L A E L T M N K L Y D
S A A D H R L A E L T M N K L Y D
TCA GCA GCA GAT CAC CGC TTA GCT GAA CTC ACA ATG AAT AAA CTT TAT GAT
AGT CGT CGT CTA GTG GCG 5'

AAG ATC CCT TCC TCA GTA TGG AAA TTT ATT CGC TAA TAA ATA ATT CGC TTT
K I P S S V W K F I R * *
K I P P S V W Q H V K *
AAA ATT CCA CCA ACT GTA TGG CAA CAT GTG AAA TAG TCT GTC TAA CGC TGG

```

Taula 3.1.1 Soques de *Y. enterocolitica* i *Y. intermedia* utilitzades en aquest estudi.

Soca	Serotip	Origen
<i>Y. enterocolitica:</i>		
Y270	09	Aïllament clínic
Y340	03	"
Y66	03	"
Y336	03	"
Y339	03	"
Y329	03	"
Y338	03	"
Y334	03	"
Y335	03	"
Y333	03	"
Y327	03	"
Y342	03	"
Y326	03	"
Y500	03	CECT
Y754	09	CECT
<i>Y. intermedia:</i>		
Y201	03	Aïllament clínic
Y257	03	"

CECT: Col.lecció Espanyola de Cultius Tipus.

Figura 3.1.6 Hibridació de DNA cromosòmic de diferents soques d'*E.coli* (A: 5K; B: C600) i *Y. enterocolitica* (C: Y500; D: Y754) digerit amb *EcoRI*, amb la sonda de 300 pb del gen *hha*.

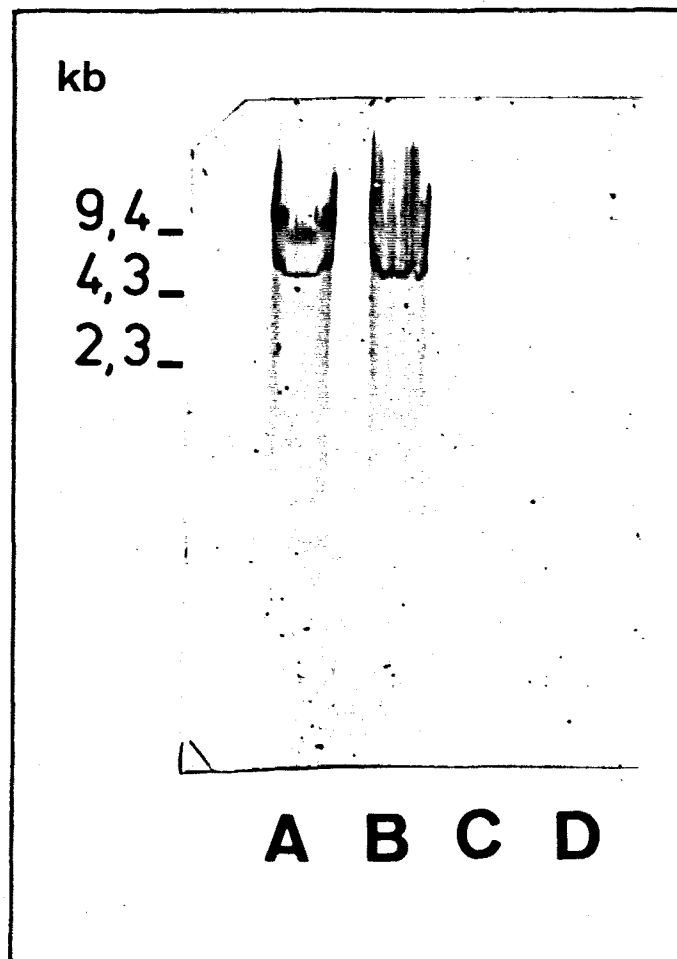
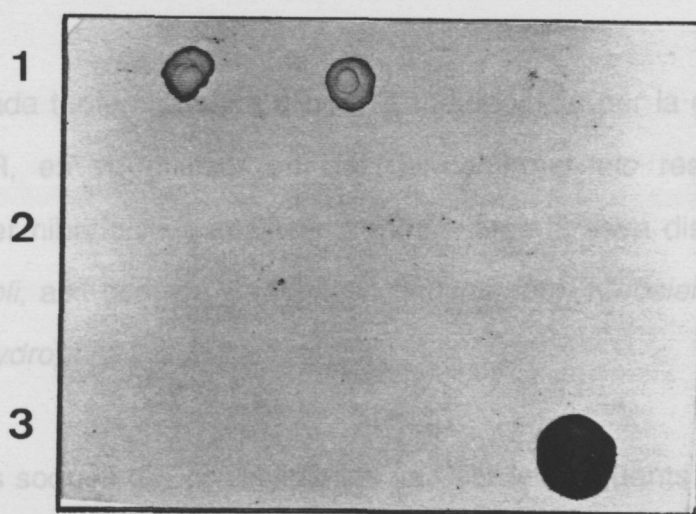
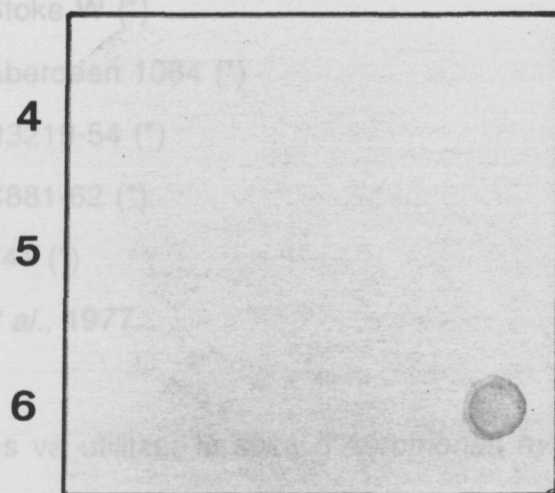


Figura 3.1.7 Hibridació de tipus "dot" de DNA cromosòmic de diferents soques contra la sonda de 300 pb del gen *hha*. I) *E.coli* (1A: 5K; 1B: C600); *S. marcescens* (1C: 2170c, utilitzat com a control negatiu); *Y. enterocolitica* (2A: Y66; 2B: Y270; 2C: Y336; 2D: Y339; 3A: Y340); *Y. intermedia* (3B: Y201; 3C: Y257); i DNA plasmídic de pUBM90, utilitzat com a control positiu (3D). II) *Y. enterocolitica* (4A: Y339; 4B: Y338; 4C: Y334; 5A: Y335; 5B: Y333; 5C: Y327; 6A: Y342; 6B: Y326) i control positiu utilitzant DNA cromosòmic d'*E.coli* 5K com a motlle (6C).

I)



II)



3.1.5 Detecció del gen *hha* per la tècnica de la PCR.

La disponibilitat de la seqüència del gen *hha* va permetre el disseny d'oligonucleòtids específics per aquest gen (Figura 3.1.2), de manera que ens permetia aplicar la tecnologia de la PCR per la detecció del gen *hha* a diferents soques bacterianes, utilitzant com a motlle el corresponent DNA cromosòmic. Si la reacció conduïa a la síntesi d'un fragment de DNA, podíem dir que el gen *hha* era present a les soques analitzades.

Una vegada teníem posada a punt la metodologia per la detecció del gen *hha* per PCR, es va utilitzar per tal de confirmar els resultats obtinguts prèviament per hibridació, i analitzar a més a més la seva distribució a altres soques d'*E.coli*, així com de *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* i *Aeromonas hydrophila*.

Les altres soques d'*E.coli* utilitzades van ser les següents:

- 536 (Hacker *et al.*, 1983)
- Stoke W (*)
- Aberdeen 1064 (*)
- H3219-54 (*)
- C881-62 (*)
- F41 (*)

(*): Orskov *et al.*, 1977.

També es va utilitzar la soca d'*Aeromonas hydrophila* A3 (Merino *et al.*, 1989), 5 aïllaments alimentaris de *Salmonella typhimurium* (C1, C2, C4, C5 i C6), i 5 soques més de *Klebsiella pneumoniae*:

- DL1 (Williams *et al.*, 1983)
- 52145 (Riottot *et al.*, 1981)
- KT760 (*)
- KT798 (*)
- KT771 (*)

(*): I. Orskov. International *Escherichia* and *Klebsiella* Center. Copenhagen. Denmark.

Pel que fa als resultats obtinguts prèviament per hibridació, es va confirmar la detecció del gen *hha* a la soca de *Klebsiella pneumoniae* C3, pel que podíem dir que la hibridació positiva no era fruit d'homologies amb seqüències adjacents al gen pròpiament dit. Així mateix, es van repetir els resultats negatius amb *Salmonella typhimurium* SL3770 i *Serratia marcescens* 2170c (Figura 3.1.8).

En totes les soques d'*E.coli* utilitzades, a més dels controls positius realitzats amb les soques 5K i C600, va ser possible detectar el gen *hha*, amb l'excepció de la soca Aberdeen 1064 (Figura 3.1.8)

Amb la resta de soques de *Salmonella typhimurium*, *Aeromonas hydrophila* i *Klebsiella pneumoniae*, no es va detectar en cap cas el gen, amb l'excepció ja citada de *Klebsiella pneumoniae* C3 (Figura 3.1.9).

Figura 3.1.8 Anàlisi electroforètica de l'amplificació obtinguda per PCR utilitzant els "primers" del gen *hha*, i DNA cromosòmic de diferents soques com a motlle. A: Marcador de pesos moleculars (està indicada amb una fletxa la banda corresponent a 298 pb); B-I: *E.coli* C600, 5K, 536-06, Stoke W, C881-62, DH3219-54, Aberdeen 1064, F41, respectivament; J: *A.hydrophila*; K: *S.typhimurium* SL3770; L: *S.marcescens* 2170c; M: *K.pneumoniae* C3; N-R: *Y.enterocolitica* Y754, Y329, Y338, Y327, Y326, respectivament.

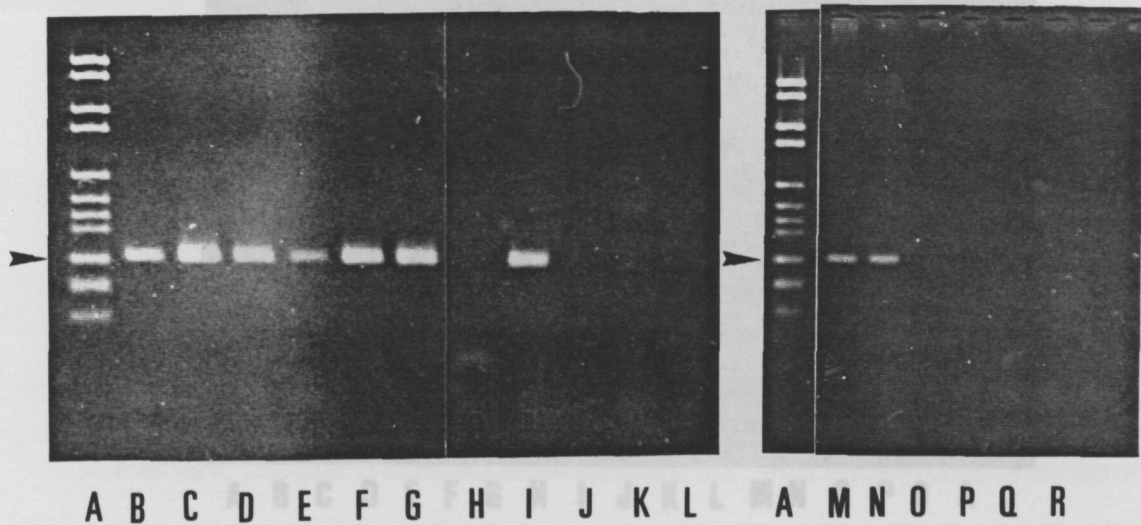


Figura 3.1.9 Anàlisi electroforètica del resultat de l'amplificació per PCR utilitzant els primers del gen *hha* i DNA cromosòmic de diferents soques com a motlle. A: marcador de pesos moleculars (està indicada amb una fletxa la banda corresponent a 310 pb); B: *E.coli* C600; E-I: *K.pneumoniae* DL1, 52145, KT798, KT771 i KT760 respectivament; J: *E.coli* C600; L-Q: *S.typhimurium* SL3770, C1, C2, C4, C5 i C6 respectivament. A les butxaques C, D i K no s'hi va carregar cap mostra.



Malgrat els resultats obtinguts per hibridació de tipus "Southern" per tal de detectar el gen *hha* a *Y. enterocolitica* i *Y. intermedia* van ser negatius, es va tornar a intentar la seva detecció per PCR, ja que aquesta tècnica implica menys regions d'elevada homologia (només les corresponents als "primers"). Les anàlisis de les amplificacions obtingudes van donar resultats positius només amb una de les soques utilitzades de *Y. enterocolitica*, la soca Y754 (Figures 3.1.8 i 3.1.10).

Per una altra banda, es va intentar la detecció del gen *ymoA* a *Escherichia coli* utilitzant uns "primers" específics per la seqüència descrita del gen *ymoA* (Cornelis *et al.*, 1990), però cobrint les zones d'homologia més elevada respecte a la seqüència de nucleòtids del gen *hha* (Figura 3.1.5). Segons les condicions de PCR utilitzades anteriorment, es va demostrar que aquests "primers" permetien la detecció del gen *ymoA* a soques de *Y. enterocolitica*, però que no era possible detectar cap amplificació quan s'utilitzava com a motlle el DNA cromosòmic d'*E.coli*, *S.typhimurium*, *S.marcescens* o *K.pneumoniae* (Figura 3.1.11).

Per tant, malgrat l'homologia (64%) entre els gens *hha* i *ymoA*, ni les sondes del gen *hha* semblen útils per la detecció del gen *ymoA* per tècniques d'hibridació, ni tampoc ha estat possible trobar, dins de la seqüència d'ambdós gens, seqüències que utilitzades com a "primers" permetin amplificar-los indistintament.

Figura 3.1.10 Anàlisi electròforètica de l'amplificació per PCR utilitzant els "primers" del gen *hha* i diferents DNAs cromosòmics com a motlle. A: marcador de pesos moleculars (està indicada amb una fletxa la banda corresponent a 298 pb); C: *S.marcescens* 2170c; D-I: *Y.enterocolitica* Y270, Y66, Y257, Y336, Y201 i Y340, respectivament; J i K: *E.coli* 5K; L-N: *Yersinia enterocolitica* Y334, Y335 i Y342, respectivament; O: *E.coli* C600; P: *S.typhimurium* SL3770; B i Q: control negatiu sense DNA motlle.

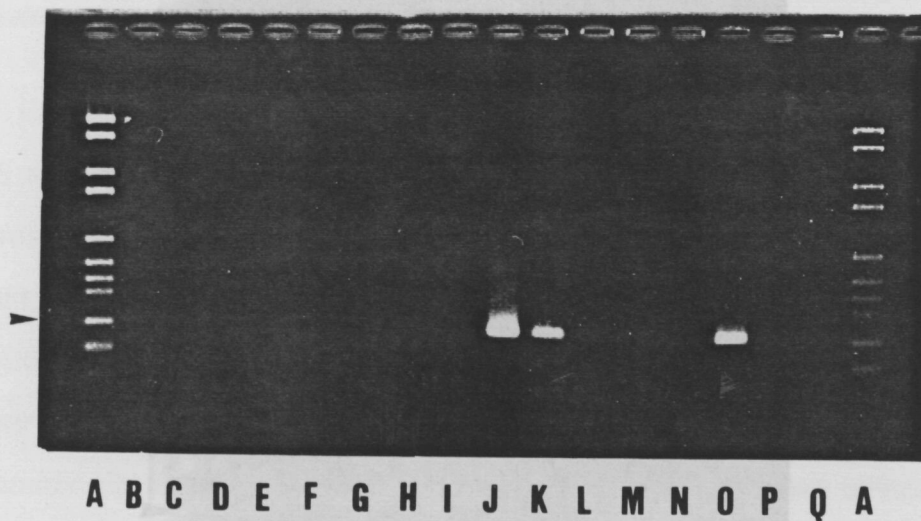
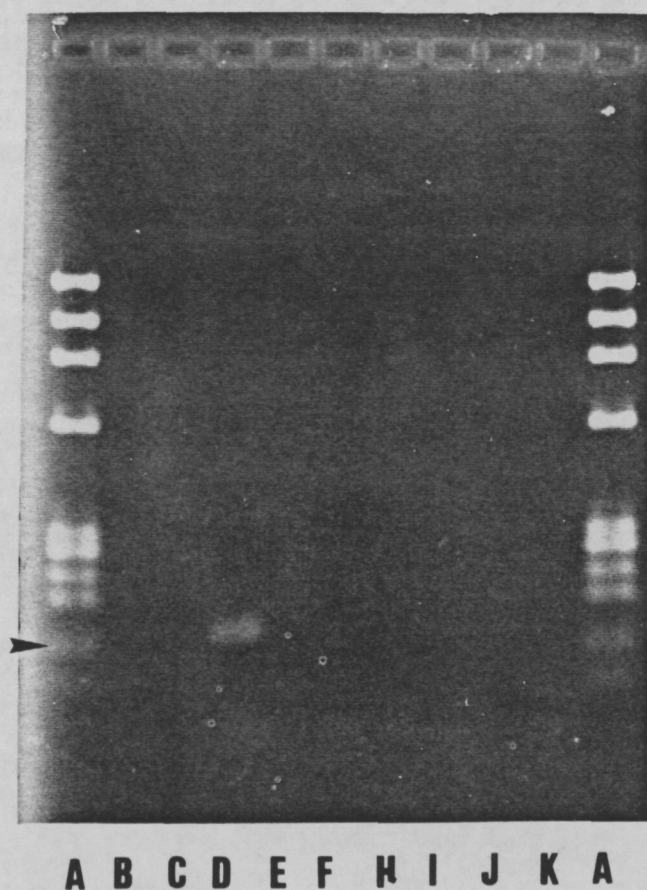


Figura 3.1.11 Anàlisi electroforètica de l'amplificació per PCR utilitzant DNA de diferents soques com a motlle, i els "primers" corresponents a *ymoA* (Figura 3.1.5). A: marcador de pesos moleculars (la senyal correspon a la banda de 194 pb); B: *E.coli* C600; D: *Y.enterocolitica* Y754; F: *S.typhimurium* SL7330; H: *K.pneumoniae* C3; I: *S.marcescens* 2170c; K: control negatiu sense DNA motlle. A les butxaques C, E i J no s'hi va carregar cap mostra.



3.2 OBTENCIÓ D'UN MUTANT Hha⁻ A *E.coli* HB101: DETECCIÓ DE LA INESTABILITAT DE Tn5 EN EL GEN *hha*.

Una vegada coberts els objectius de posar a punt tècniques de detecció del gen *hha* per hibridació de tipus "Southern" i amplificació per PCR, i estudiada la seva distribució a *E.coli* i a altres enterobactèries, la resta dels objectius del treball es van dirigir cap a aspectes relacionats amb la utilització de la mutació *hha* per tal d'incrementar l'expressió de proteïnes heteròlogues a *E.coli*, així com cap a la recerca de noves mutacions que modulin l'expressió gènica, amb la finalitat de construir una soca portadora de diferents mutacions que influeixin positivament en l'expressió de proteïnes heteròlogues clonades a *E.coli*.

La utilització de la mutació *hha* per la sobreexpressió de proteïnes clonades a *E.coli* implica la transformació de soques Hha⁻ amb diferents plàsmids, corresponents al clonatge de les proteïnes que es volen expressar. En aquest sentit, el genotip de la soca 5K d'*E.coli*, amb la que es va obtenir la mutació *hha*, planteja un problema: aquesta soca no és *recA*, fet que possibilita que es puguin donar fenòmens de recombinació, tant entre plàsmids com entre el DNA plasmídic i el cromosoma. Això, per tant, pot dificultar la seva utilització.

Per tal d'obtenir la mutació *hha* a una soca RecA⁻, i donat que aquest genotip impossibilita la transducció de la mutació des d'una soca Hha⁻, es va plantejar la possibilitat de mutagenitzar una altra soca d'*E.coli* amb la finalitat d'obtenir mutacions *hha* i expressar proteïnes clonades, però evitant al mateix temps els possibles fenòmens de recombinació. Amb aquest objectiu es va utilitzar la soca d'*E.coli* HB101, una soca amb un fons genètic recA⁻.

3.2.1 Obtenció de mutants Hha⁻ a *E.coli* HB101.

L'obtenció de mutants Hha⁻ a la soca HB101 s'havia de fer per mutagènesi, ja que el seu genotip *recA* impedeix la transducció de la mutació des d'una soca Hha⁻.

Per tal d'obtenir mutants Hha⁻ a la soca HB101, es va transformar primer aquesta soca amb el plàsmid pANN202-312, i es van seleccionar els transformants en plaques d'agar-sang suplementades amb cloramfenicol (marcador de pANN202-312). D'aquesta manera, es va comprovar que les colònies presentaven un reduït halo d'hemòlisi (Hly⁺), característic de les soques d'*E.coli* que porten el plàsmid pANN202-312 (veure figura 1.2.1, pàg. 25).

La soca HB101 (pANN202-312) es va mutagenitzar amb Tn5, per infecció amb un lisat de lambda::Tn5, tal com es descriu a l'apartat 2.5.1.1 de Materials i mètodes. Es van aïllar clons que presentaven un halo d'hemòlisi gran (Hly⁺⁺⁺) amb una freqüència de 10⁻³ sobre el total de colònies Km^r (Madrid *et al.*, 1990). Aquesta freqüència contrastava amb l'obtinguda en mutagenitzar la soca 5K (pANN202-312) amb Tn5*PhoA* amb la mateixa finalitat. En aquest darrer cas, tan sols es va obtenir un mutant Hha⁻ d'entre un total de 20.000 colònies (Juárez, comunicació personal).

Es van seleccionar alguns dels clons que presentaven grans halos d'hemòlisi i es va comprovar que corresponien a mutacions *hha*, ja que l'efecte de la mutació era complementat amb el gen salvatge. Per realitzar aquesta complementació, els clons mutants portadors del plàsmid hemolític pANN202-312 es van transformar amb el plàsmid pUBM22, derivat de pBR322 que conté clonat el gen *hha* d'*E.coli* (Nieto *et al.*, 1991). En tots els casos provats, es va confirmar

que els clons aïllats, seleccionats per presentar grans halos d'hemòlisi en agar-sang (veure figura 1.2.1, pàg. 25), corresponien a mutacions *hha* ja que el fenotip hemolític revertia al de la soca parental quan el plàsmid pUBM22 era present.

A més de l'elevada freqüència en l'obtenció de mutants Hha⁻ a la soca HB101, es va poder observar un altre fenomen que ja havia estat observat en obtenir mutants Hha⁻ a la soca 5K: la segregació d'un elevat percentatge de colònies amb fenotip Hly⁻ a partir dels mutants Hha⁻ obtinguts.

3.2.2 Estabilitat de la mutació *hha*.

Els mutants Hha⁻ obtinguts per mutagènesi amb Tn5 a la soca HB101 (pANN202-312) van ser purificats per ressebra en plaques d'agar-sang. Es va observar que la major part d'aquests clons, el 80%, segregaven entre la seva descendència colònies negatives (Hly⁻) pel que fa referència als halos d'hemòlisi. El percentatge d'aparició de colònies negatives era d'aproximadament un 10%.

La ressebra de colònies Hly⁻ no segregava mai colònies Hly⁺⁺⁺, i en canvi, la ressebra de colònies Hly⁺⁺⁺ seguia segregant colònies Hly⁻, tot i que el seu percentatge anava disminuint progressivament. Successives ressebres van possibilitar l'aïllament de colònies Hly⁺⁺⁺ que ja havien perdut la capacitat de segregar colònies Hly⁻, raó per la qual es van considerar "estables" i van ser utilitzades per la posterior caracterització. Aquests clons no es diferencien, pel que fa al seu fenotip Hha⁻, d'altres mutants *hha* estables, com la soca Hha-2 (*recA*⁺, *hha::Mud1*).

3.2.3 Origen dels clons negatius derivats de mutants Hha^r.

Aquest fenomen d'aparent "inestabilitat" dels mutants *hha* ja havia estat observat quan es va obtenir la soca Hha-3 (*hha*::Tn5*phoA*; Juárez, comunicació personal). Per això, i en trobar el mateix fenomen en l'obtenció de mutants *hha* a la soca HB101, vàrem decidir estudiar quin era l'origen de les colònies amb fenotip Hly⁻.

L'aparició de mutants no productors d'hemolisina podia tenir el seu origen en una mutació cromosòmica que causés el bloqueig de la producció de la toxina, o en una mutació en algun dels gens *hly* del plàsmid pANN202-312.

Com a primera aproximació es va analitzar el DNA plasmídic d'aquests clons negatius, per tal de determinar si els gens *hly* havien sofert alguna modificació. Es va aïllar DNA plasmídic dels clons negatius, i es va utilitzar per transformar la soca HB101 lliure de DNA plasmídic. Totes les colònies transformades, seleccionades per la resistència a cloramfenicol, eren negatives pel que fa a la producció d'halos d'hemòlisi en plaques d'agar-sang. A més a més, aquestes colònies eren sempre Km^r, resistència codificada pel transposó utilitzat a la mutagènesi. Cal recordar que el gen *hha* és cromosòmic, i que els mutants es van seleccionar per insercions del transposó en aquest gen.

Per una altra banda, es van curar els clons negatius del DNA plasmídic (Materials i mètodes, 2.8.3). La pèrdua de la resistència a cloramfenicol, utilitzada com a indicatiu de la pèrdua del plàsmid, només es podia aconseguir si els subcultius es feien en absència de cloramfenicol i de kanamicina, fet que confirmava la presència de la resistència a Km al DNA plasmídic dels clons negatius. Quan els clons negatius curats del DNA plasmídic van ser

retransformats amb el plàsmid pANN202-312, les colònies obtingudes presentaven un reduït halo d'hemòlisi (Hly+), fenotip idèntic al de la soca parental HB101 (pANN202-312). Aquest fet suggeria que en aquests clons s'havia restaurat la funció del gen *hha*.

El fet que el DNA plasmídic aïllat de clons Hly- codifiqués per la resistència a Km, i que una vegada transformat a la soca HB101 no codifiqués per la producció d'hemolisina, suggeria que aquest plàsmid contenia una còpia del transposó Tn5, i que la seva inserció inactivava algun dels gens *hly*. Per tal de poder confirmar la presència de Tn5 al plàsmid pANN202-312, així com per localitzar el punt d'inserció, es va procedir a la caracterització física del DNA plasmídic aïllat a partir de clons Hly-.

L'anàlisi de restricció del DNA plasmídic aïllat de dos clons negatius derivats de diferents mutants *Hha* va mostrar un patró de restricció diferent al del plàsmid pANN202-312. Es va determinar un increment en el pes molecular de 5,8 Kb, que és el pes molecular del transposó Tn5 (De Bruijn i Lupski, 1984). L'anàlisi de restricció amb *Hind*III va permetre detectar la presència d'un fragment addicional de 3,6 Kb, corresponent al fragment *Hind*III intern de Tn5 (Figura 3.2.1).

Per determinar la situació del transposó al plàsmid, es van realitzar digestions amb *Hind*III, *Eco*RI (enzim que no té dianes a Tn5, però sí a pANN202-312) i la doble *Hind*III/*Eco*RI. Es van localitzar dues insercions en dos punts diferents del gen *hlyA*, gen estructural de l'operó de l'hemolisina codificat pel plàsmid pANN202-312 (Figura 3.2.2). Per tant, el fenotip Hly- dels clons estudiats està causat per la inactivació del gen *hlyA* degut a la inserció de Tn5 a la seva seqüència.

Figura 3.2.1 Patró de restricció amb *Hind*III de DNA plasmídic aïllat de dos clons Hly- (a i c), i del plàsmid pANN202-312 (b).

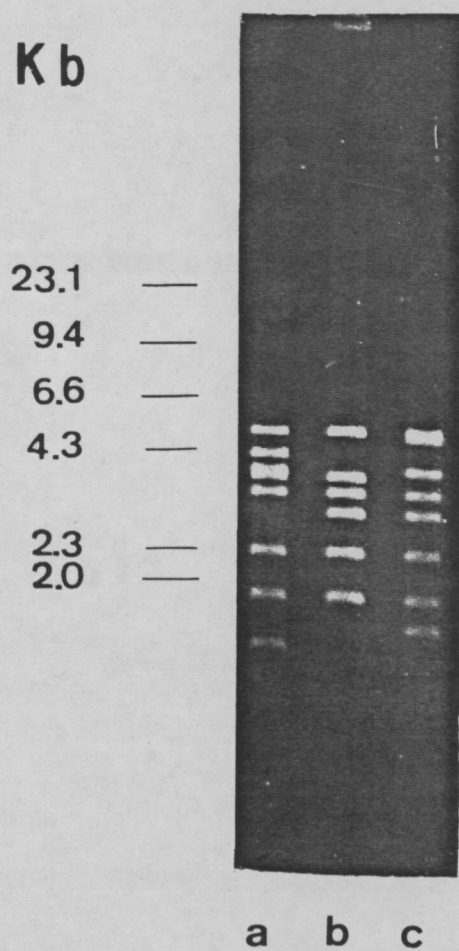
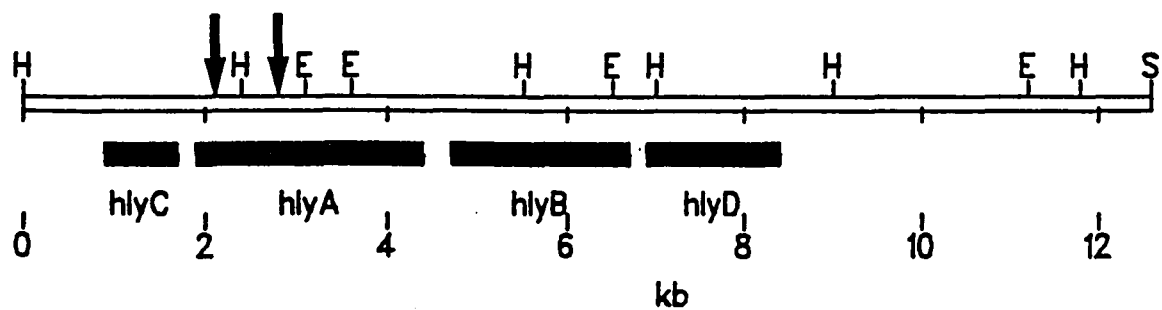


Figura 3.2.2 Mapa físic i genètic de l'operó de l'hemolisina clonat al plàsmid pANN202-312, i insercions de Tn5 localitzades en dos clons Hly- (indicades per fletxes). E: *EcoRI*, H: *HindIII*, S: *SaI*.

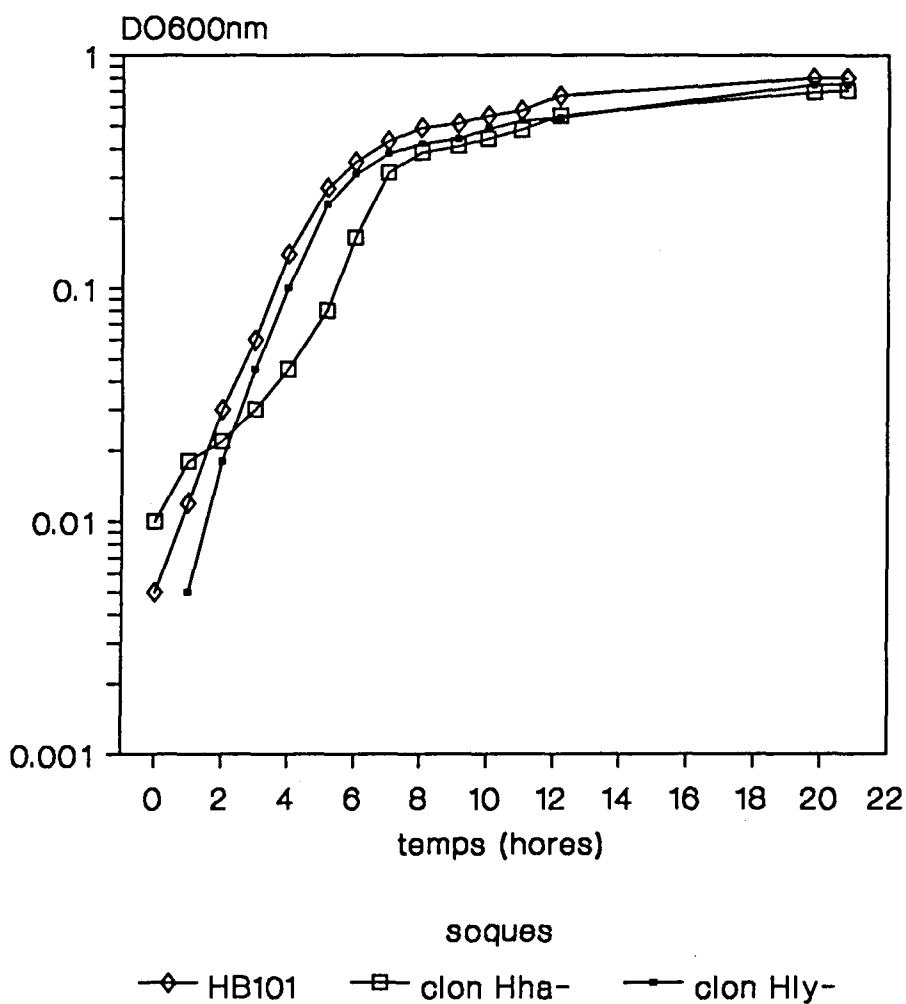


Aquests resultats clarament confirmen que el transposó Tn5 estava present als plàsmids aïllats dels clons Hly-, posant-se de manifest que Tn5 es trobava inserat en localitzacions diferents en els dos clons Hly- analitzats.

L'elevada freqüència d'aparició, en mutants *hha*, d'insercions secundàries de Tn5 en el gen *hlyA* podia ser deguda a una elevada freqüència de transposició de Tn5 des del gen *hha* al gen *hlyA*, o a que insercions espontànies de baixa freqüència de Tn5 en el gen *hlyA* es seleccionessin positivament. Fins el moment no han estat descrits mai punts d'elevada freqüència d'inserció o "hotspots" de Tn5 en el gen *hlyA* quan aquest transposó ha estat utilitzat com a agent mutagènic per la caracterització dels gens *hly* (Wagner *et al.*, 1983).

Per tal de determinar si la inactivació del gen *hlyA* proporciona algun avantatge selectiu a les soques Hha⁻, vàrem procedir a l'anàlisi de la cinètica de creixement de clons Hly+++ estables i de derivats Hly-. Es va poder demostrar que els clons negatius tenen una taxa de creixement més elevada, fet que explicaria la seva selecció positiva en una població mixta (Figura 3.2.3).

Figura 3.2.3 Cinètica de creixement de la soca HB101 (pANN202-312), un mutant Hha⁻ (pANN202-312), i un clon Hly⁻ derivat del mateix clon Hha⁻.



L'aparició amb elevada freqüència de derivats Hly- a partir de clons Hha⁻ (Hly⁺⁺⁺) i l'estudi del seu origen com a transposicions secundàries de Tn5, ens va induir a pensar que el transposó Tn5 està sotmés a certa inestabilitat quan es troba insertat en el gen *hha* d'*E.coli*. Aquesta inestabilitat es podria traduir en transposicions secundàries a altres localitzacions del genoma bacterià. Addicionalment, la restauració de la funció del gen *hha* donaria un avantatge selectiu a aquests clons, fet que facilitaria la seva proliferació.

D'altra banda, cal considerar que en general s'accepta que les insercions de Tn5 al genoma d'*E.coli* són estables, i de fet, la seva utilització com a agent mutagènic no ha conduït fins el moment a la descripció de transposicions secundàries (De Bruijin, 1987; De Bruijin i Lupski, 1984), a excepció d'un cas publicat (Harayama *et al.*, 1979).

L'interès del fenomen descrit en aquest treball, tenint en compte que el gen *hha* està associat a canvis en la topologia del DNA, i que és coneguda la influència de l'estat de superenrotllament del DNA sobre l'eficiència de transposició de Tn5 (Isberg i Syvaenen, 1985), ha provocat que els estudis iniciats tinguin continuació en una línia d'investigació independent amb la que estan relacionats altres investigadors del mateix Departament.

3.3 RECERCA D'ALTRES MUTACIONS QUE PODEN AFECTAR L'EXPRESSIÓ DE PROTEÏNES HETERÒLOGUES A *E.coli*: ESTRATÈGIA PER LA IDENTIFICACIÓ DE GENS QUE CODIFIQUIN PER PROTEASES INTRACEL·LULARS.

La recerca de mutacions que afectin l'expressió de proteïnes clonades a *E.coli* no ha d'implicar necessàriament mutacions que causin un augment o una disminució de la síntesi. La proteolisi de proteïnes heteròlogues clonades a *E.coli* és un problema freqüent quan es planteja la seva expressió en aquest microorganisme (Gold, 1990). Els mecanismes pels quals les proteïnes que són degradades són reconegudes, però, no es coneixen. Varies evidències suggereixen que l'inici del procés de proteolisi és dependent d'energia. Per tant, mutacions que afectin a aquestes proteases dependents d'energia proporcionarien la millor manera d'estabilitzar proteïnes heteròlogues clonades (Gottesman, 1990). Fins ara s'han descrit mutacions en alguns gens que causen pèrdua d'activitat proteolítica: *lon*, responsable de la síntesi d'una proteasa ATP-dependent (Gottesman, 1987), *htpR* que codifica pel factor σ^{32} , necessari per la resposta al xoc tèrmic (Baker *et al.*, 1984), *clpA* que codifica per una altra proteasa ATP-dependent (Gottesman, 1990), o *ptr*, que codifica per la proteasa periplasmàtica Pi (Miller, 1987).

Malgrat que a *E.coli* es coneixen diferents proteases (Miller, 1987), se'n sap molt poc sobre la seva funció i el paper que juguen en la degradació de proteïnes heteròlogues. A més a més, en molts casos no s'han localitzat els gens del cromosoma que les codifiquen. Probablement això és degut a la dificultat en la selecció de mutants deficients per alguna de les proteases, ja que el seu fenotip, en cas de ser visible, és difícilment seleccionable. Per això es va decidir posar a punt una metodologia que ens permetés cercar altres mutacions que

afectin la proteolisi de proteïnes heteròlogues clonades a *E.coli*. La darrera finalitat seria combinar en una mateixa soca mutacions que provoquin un augment en l'expressió de proteïnes clonades, amb mutacions que disminueixin la seva degradació.

Per tal d'intentar l'aïllament de mutacions que afectin la síntesi de proteases intracel·lulars, calia partir d'un model en que una proteïna estigués sotmesa a una elevada degradació intracel·lular quan s'expressés a *E.coli*. També era necessari disposar d'un sistema de detecció quantitatiu de la proteïna i de la seva degradació.

Aprofitant que la mutació *hha* afecta la síntesi de determinades proteïnes, incloent-ne algunes d'heterològues (Carmona, Tesi Doctoral, 1992), i que la sobreproducció condueix a una acumulació intracel·lular i a un increment en la proteolisi, es va utilitzar aquest sistema per sobreproduïr una proteïna.

La proteïna utilitzada en aquests estudis com a model d'expressió va ser una proteïna quimèrica formada per la fusió de la interleuquina-2 i un fragment N-terminal de 485 aminoàcids de la toxina diftèrica, la proteïna ABI508 (Bishai *et al.*, 1987). Aquesta proteïna, que en la seva forma madura té un pes molecular de 68 kDa, té un comportament similar al de la toxina diftèrica quan s'expressa a *E.coli*, acumulant-se al periplasma (Murphy *et al.*, 1989).

La proteïna ABI508 havia estat clonada al plàsmid pJMKam4 (Km^r), sota el control del promotor Ptox, promotor del gen de la toxina diftèrica a *Corynebacterium diphtheriae*. Aquest promotor, que és induïble a *C.diphtheriae* per manca de ferro, és constitutiu a *E.coli*.

Es tenien dades de que la pleotropia de la mutació *hha* també afectava l'expressió de la proteïna ABI508 (Juárez, resultats no publicats; Carmona, Tesi Doctoral, 1992). Un augment en l'expressió de la proteïna facilitaria lògicament la detecció de la seva degradació.

L'anàlisi per electroforesi, transferència a membrana i immunodetecció de la proteïna ABI508 en extractes cel·lulars totals de la soca Hha-2 (pJMKam4), mostra un elevat grau de degradació de la proteïna quimèrica, ja que es detecten nombroses bandes de pes molecular inferior al corresponent a la proteïna ABI508 (Figura 3.3.2).

L'estratègia utilitzada va ser mutagenitzar la soca Hha-2 (pJMKam4), i analitzar el patró de degradació de la proteïna ABI508 en els mutants obtinguts. Utilitzant com a referència l'expressió de la proteïna ABI508 a la soca Hha-2 (pJMKam4), preteníem cercar mutants en els que es detectés menys degradació. Per facilitar la detecció d'aquest tipus de mutants, tenint en compte que no disposàvem de cap criteri d'identificació directa, es va desenvolupar una metodologia que permetés una ràpida selecció.

3.3.1 Mutagènesi de la soca *E.coli* Hha-2 (pJMKam4) amb Tn10.

El plàsmid pJMKam4, que conté clonat el fragment de DNA que codifica per la proteïna ABI508, presenta resistència a kanamicina, de manera que quedava descartat l'intent de mutagenitzar amb Tn5, degut a la incompatibilitat de resistències en la selecció dels mutants. Es va intentar, per tant, la mutagènesi amb Tn10, transposó que codifica per la resistència a tetraciclina.

La soca *E.coli* Hha-2 (pJMKam4), incubada a 30°C (per la presència de Mud1, que li confereix fenotip termosensible), es va mutagenitzar per infecció amb lambda::Tn10 (apartat 2.5.2.2.c de Materials i mètodes). La selecció dels mutants es va fer en plaques de YM-agar suplementades amb pirofosfat sòdic 1,25 mM, Ap (marcador cromosòmic de la soca Hha-2), Km (marcador del plàsmid pJMKam4) i tetraciclina, per seleccionar les insercions de Tn10.

3.3.2 Anàlisi de la degradació de la proteïna ABI508 en els mutants obtinguts.

Per estudiar quin era el nivell de degradació de la proteïna en cadascun dels mutants obtinguts, es va analitzar el contingut en proteïna ABI508 dels corresponents extractes cel·lulars totals. Per l'obtenció d'aquests extractes es seguia un mètode ràpid consistent en:

- Centrifugar 0,5 ml d'un cultiu de tota la nit durant 5 min en una microcentrífuga.
- Ressuspendre en 40 µl de tampó de mostres per proteïnes x 1 (Materials i mètodes, 2.12).
- Bullir les mostres durant 5 min a 100°C i tornar a centrifugar durant 1 min 30 s en una microcentrífuga, per tal d'eliminar les bacteries que no s'han lisat.

Els extractes obtinguts eren separats directament en gels de SDS-PAGE al 11% i transferits a membranes de nitrocel·lulosa (Materials i mètodes, 2.13). Sobre aquestes membranes es procedia a la detecció de la proteïna ABI508 i de la seva degradació, utilitzant anticossos específics contra la toxina diftèrica.

Com a marcador de pesos moleculars es va utilitzar, en aquest cas, una digestió parcial amb tripsina de la toxina diftèrica, que dóna 3 productes de diferent pes molecular (Bishai *et al.*, 1987):

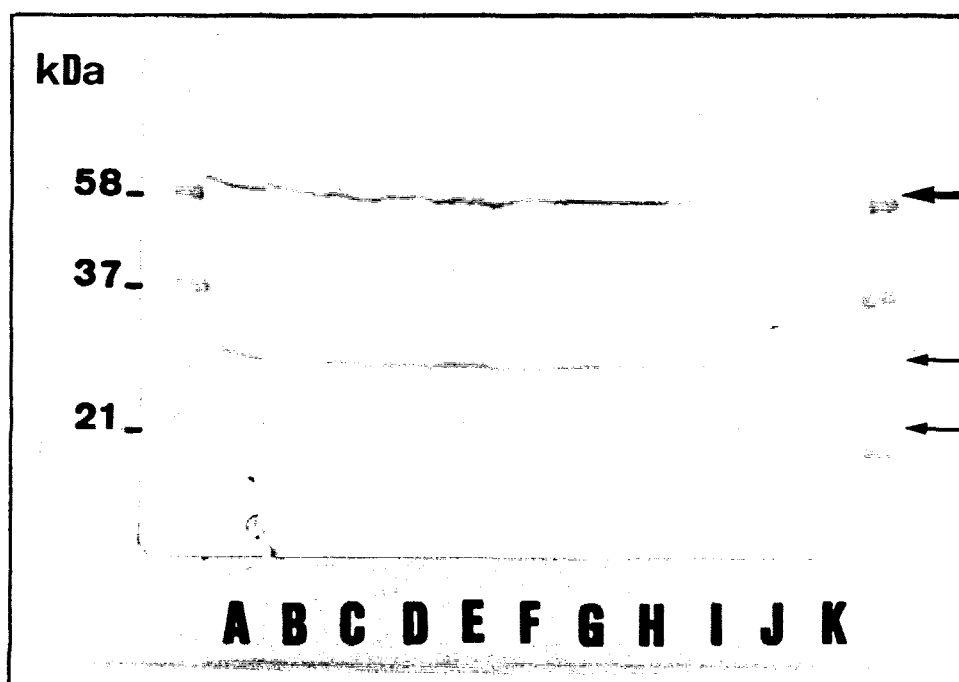
- . la proteïna total no digerida (58 kDa)
- . el fragment B (37 kDa)
- . el fragment A (21 kDa)

Aquestes bandes es visualitzen en el moment de la immunodetecció amb anticossos contra la toxina diftèrica.

Les anàlisis inicials dels extractes totals dels clons mutants ens permetien determinar si hi havia algun clon que mostrava menys degradació. Cal dir que aquestes anàlisis no eren sempre tant clares com caldria desitjar (Figura 3.3.1). En alguns casos, l'anàlisi inicial de l'extracte total va mostrar que alguns mutants tenien la característica justament contrària a la que ens interessava, és a dir, un grau de degradació de la proteïna superior al de la soca parental.

D'entre tots els clons analitzats, es van seleccionar aquells que semblava que mostraven menys degradació per tal d'analitzar-los més detalladament.

Figura 3.3.1 Anàlisi de la degradació de la proteïna ABI508 a diferents mutants obtinguts, utilitzant la mètodica posada a punt en aquest treball per caracteritzar un gran nombre de mutants simultàniament. La fletxa superior indica la proteïna ABI508. Les inferiors corresponen a productes de degradació.



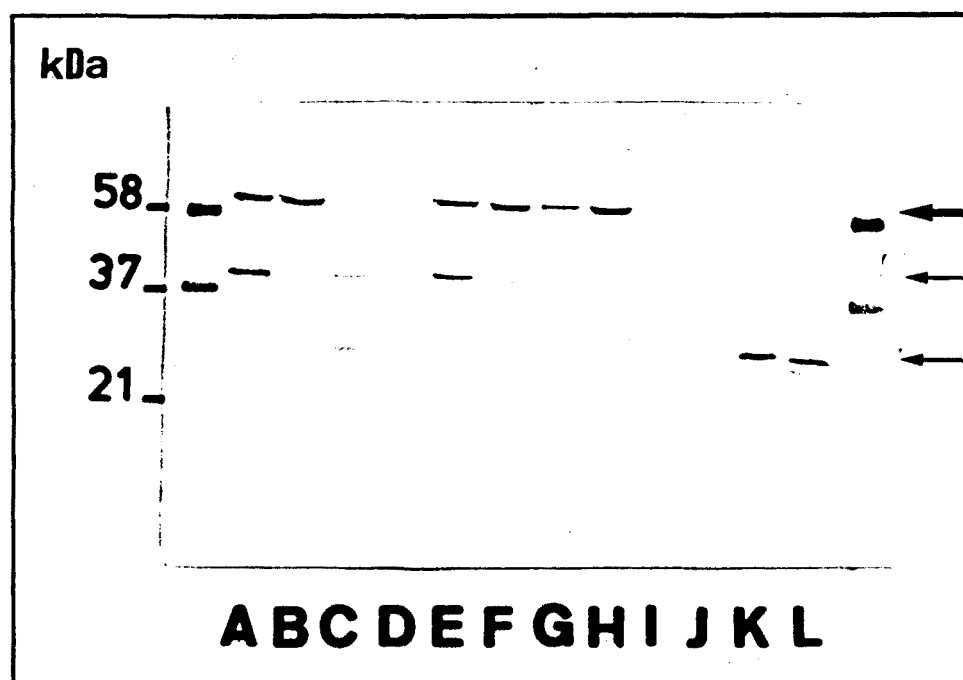
Per tal d'analitzar més detalladament el contingut en proteïna ABI508 dels clons seleccionats, es van obtenir extractes cel·lulars (periplasmàtic i citoplasmàtic), seguint la metodologia descrita a l'apartat 2.10.1 de Materials i mètodes. Com a control, es fraccionava al mateix temps un cultiu de la soca Hha-2 (pJMKam4). El contingut en proteïna ABI508 de cada fracció era detectat de la mateixa manera que en els extractes totals.

Els resultats obtinguts no van donar cap resultat positiu pel que fa referència a la recerca de mutacions que causin menys proteolisi de la proteïna ABI508. El que si es va trobar van ser mutants que tenien un efecte proteolític més elevat que el de la soca parental (Figura 3.3.2).

La utilització de Tn10 en l'obtenció de mutants va proporcionar un rendiment baix, potser degut a la utilització del transposó salvatge. Una manera d'intentar solventar aquest problema seria la utilització de mini-Tn10 per l'obtenció de mutants, és a dir, transposons modificats que són més estables (Kleckner *et al.*, 1991).

Malgrat que els resultats obtinguts no van ser els esperats, possiblement en part degut als pocs clons analitzats, aproximadament 250, es va posar a punt una metodologia ràpida que s'ha demostrat útil per la detecció de mutacions que modifiquin, incrementant o disminuint, la degradació de proteïnes heteròlogues que s'expressen a *E.coli* i que s'acumulen a l'interior de la cèl·lula.

Figura 3.3.2 Immunodetecció de la proteïna ABI508 en extractes periplasmàtics i citoplasmàtics de la soca Hha-2 (pJMKam4) (A i B), i de diferents clons mutants obtinguts amb Tn10 (C i D; E i F; G i H; I i J; K i L). La fletxa superior indica la banda corresponent a la proteïna no degradada, i les inferiors indiquen productes de la seva degradació.



3.4 RECERCA D'ALTRES MUTACIONS QUE PODEN AFECTAR L'EXPRESSIÓ DE PROTEÏNES HETERÒLOGUES A *E.coli*: IDENTIFICACIÓ DE LES MUTACIONS *hap*.

La identificació de la proteïna Hha, codificada pel gen *hha*, com una proteïna relacionada amb els mecanismes de regulació de l'expressió gènica per canvis en la topologia del DNA a *E.coli* (Nieto *et al.*, 1991; Carmona, Tesi Doctoral, 1992), juntament amb el fet que només es coneixen una tercera part de les proteïnes codificades pels gens del cromosoma d'*E.coli*, ens va induir a pensar que fóra possible la identificació d'altres gens implicats en els processos de regulació de l'expressió gènica en aquest microorganisme.

Seguint una estratègia similar a la que va permetre la caracterització de la proteïna Hha (cercant una mutació que sobreproduís l'hemolisina d'*E.coli* clonada al plàsmid pANN202-312), es va decidir intentar l'obtenció d'altres mutacions en gens que poguessin estar relacionats amb l'expressió de proteïnes heteròlogues clonades a *E.coli*. Com a model per la recerca d'aquestes mutacions es va utilitzar l'expressió de l'aerolisina d'*Aeromonas hydrophila* AH2 a la soca 5K d'*E.coli*. L'aerolisina és una proteïna secretable per *Aeromonas hydrophila* seguint la via de la seqüència senyal. Quan és expressada a *E.coli*, igual com succeeix amb moltes altres proteïnes heteròlogues secretables, l'aerolisina queda acumulada al periplasma. Per tant, es va decidir utilitzar aquest sistema per la recerca de mutacions a *E.coli* que provoquessin bé un augment de la síntesi o bé la seva secreció al medi extern. Les característiques d'aquest model que ens van fer decidir per la seva utilització van ser per una part, el fet que l'aerolisina s'acumuli al periplasma, amb el que hipotèticament seria possible identificar mutacions que possibilitessin la seva alliberació al medi extern. I per una altra banda, el fet que aquesta proteïna pugui detectar-se fàcilment gràcies a la seva

activitat hemolítica, produint les colònies de cèl.lules que la sintetitzen halos d'hemòlisi en plaques d'agar-sang. Això facilita notablement la identificació de mutacions que incrementin la seva síntesi o facilitin la seva secreció al medi. Les soques d'*E.coli* productores d'aquesta toxina, que s'acumula al periplasma sense alliberar-se al medi, produeixen halos d'hemòlisi molt reduïts en plaques d'agar-sang (Figura 3.4.1, pàg. 139).

L'aerolisina d'*Aeromonas hydrophila* és una exotoxina amb activitat hemolítica (Chakraborty *et al.*, 1986), que presenta un pes molecular de 52 kDa. Els gens que codifiquen per les funcions de secreció al medi extern d'aquesta proteïna estan separats dels gens que codifiquen per la seva síntesi (gens *aer*). El producte del gen *aerA* codifica per un pèptid, considerat com un precursor, la preprotoxina. La seva translocació al periplasma, amb l'escisió de la seqüència senyal, condueix a la formació de la protoxina, una proteïna de 54 kDa. La protoxina, forma menys activa que la toxina madura, és secretada per *Aeromonas hydrophila* al medi extern, on pateix llavors una degradació proteolítica a l'extrem carboxil, amb l'eliminació de 25 aminoàcids, donant la proteïna activa, de 52 kDa (Howard i Buckley, 1985). Els dos productes, la protoxina i la toxina madura, es poden trobar als sobrenedants de cultius d'*Aeromonas hydrophila*. Sembla ser que els altres dos gens de l'operó de l'aerolisina clonat al plàsmid pHPC3-700, *aerC* i *aerB*, actuen en el control de l'expressió del gen estructural *aerA* (Chakraborty *et al.*, 1986). Quan l'aerolisina és expressada sota el control del seu propi promotor a *E.coli*, és translocada al periplasma per la via de la peptidasa senyal de forma eficient. A diferència del que succeeix a *A.hydrophila*, la proaerolisina no és secretada al medi extern, i s'acumula al periplasma (Chakraborty *et al.*, 1986; Howard i Buckley, 1986). Sembla ser que les metodologies utilitzades pel fraccionament cel.lular provoquen una proteolisi parcial de la proaerolisina, de manera que són

evidenciables ambdues proteïnes en extractes citoplasmàtics i periplasmàtics d'*E.coli* (Howard i Buckley, 1986).

3.4.1 Mutagènesi d'*E.coli* 5K (pHPC3-700) amb Tn5. Obtenció de mutants *hap*.

La soca *E.coli* 5K (pHPC3-700) produeix halos d'hemòlisi molt reduïts quan creix sobre plaques d'agar-sang després de més de 24 hores d'incubació a 37°C, ja que a *E.coli* aquesta proteïna queda retinguda al periplasma (Figura 3.4.1, pàg. 139). Es va mutagenitzar aquesta soca amb Tn5, per infecció amb un lisat fàgic de lambda::Tn5 (Materials i mètodes, apartat 2.5.2.1.c). La selecció dels mutants es va fer en plaques d'agar-sang suplementades amb Tc i/o Ap, resistències codificades pel plàsmid pHPC3-700, i Km (25 µg/ml), resistència codificada pel transposó. El criteri de selecció utilitzat va ser la mida dels halos d'hemòlisi produïts per les colònies.

Es van obtenir aproximadament unes 6.000 colònies, sobre les que es va fer un escombrat inicial per tal de seleccionar aquelles que mostraven grans halos d'hemòlisi, indicatiu d'un augment en l'expressió de l'aerolisina (síntesi o secreció), sempre en comparació amb la soca parental. Van ser seleccionats inicialment 6 mutants, que es van anomenar CM201, CM202, CM203, CM204, CM206 i CM209. La mutació va ser anomenada *hap*, per "high aerolysin production".

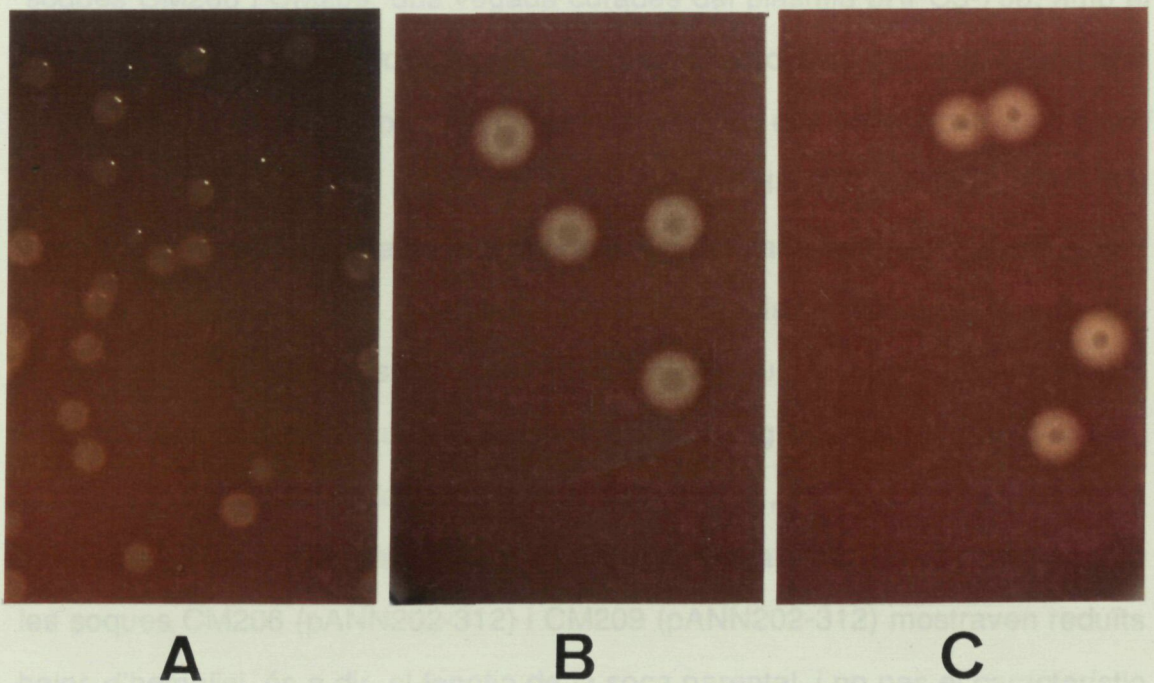
Cadascun dels mutants va ser llavors aïllat en plaques d'agar-sang per observar-ne el fenotip. Una vegada ressebrats, els clons CM202 i CM204 van mostrar un fenotip idèntic al de la soca parental pel que fa als halos d'hemòlisi, fet que suggeria que el fenotip inicial era inestable. Per una altra banda, el

fenotip del clon CM203 es mostrava extremadament heterogeni, de manera que aquests tres clons van ser descartats. Els posteriors estudis de caracterització es van realitzar amb els clons CM201, CM206 i CM209 (mutacions *hap-1*, *hap-6* i *hap-9* respectivament).

3.4.2 Les insercions de Tn5 es localitzen al cromosoma.

Per comprovar que la mutació per inserció de Tn5 havia afectat algun locus cromosòmic, i no pas al plàsmid, es van curar del DNA plasmídic els mutants obtinguts, i es van retransformar amb pHPC3-700 per tal d'observar si es mantenia el fenotip seleccionat inicialment. Els tres mutants que s'analitzaren no es van poder curar per subcultius en absència dels marcadors del plàsmid, i va ser necessari utilitzar la coumermicina per suplementar el medi de cultiu (Materials i mètodes, 2.8.3). La retransformació dels mutants CM206 i CM209 amb el plàsmid pHPC3-700 va donar el resultat esperat, és a dir, recuperació del fenotip en plaques d'agar-sang de grans halos d'hemòlisi. El mutant CM201, però, no va recuperar el fenotip hemolític. La caracterització inicial dels mutants obtinguts va aconsellar estudiar només els clons CM206 (mutació *hap-6*) i CM209 (mutació *hap-9*) (Figura 3.4.1).

Figura 3.4.1 Fenotip hemolític de colònies de les soques 5K (pHPC3-700) (A), CM206 (pHPC3-700) (B) i CM209 (pHPC3-700) (C) sobre plaques d'agar-sang.



3.4.3 Les mutacions *hap-6* i *hap-9* no corresponen a mutacions en el gen *hha*.

La mutació *hha* afecta l'expressió de l'aerolisina d'*Aeromonas hydrophila* AH2 (Nieto *et al.*, 1987). Les soques amb mutacions en el gen *hha* i portadores del plàsmid pHPC3-700, produeixen grans halos d'hemòlisi en plaques d'agar-sang. Per tant, calia comprovar en primer lloc que les mutacions *hap* obtingudes no corresponien a mutacions en el gen *hha*.

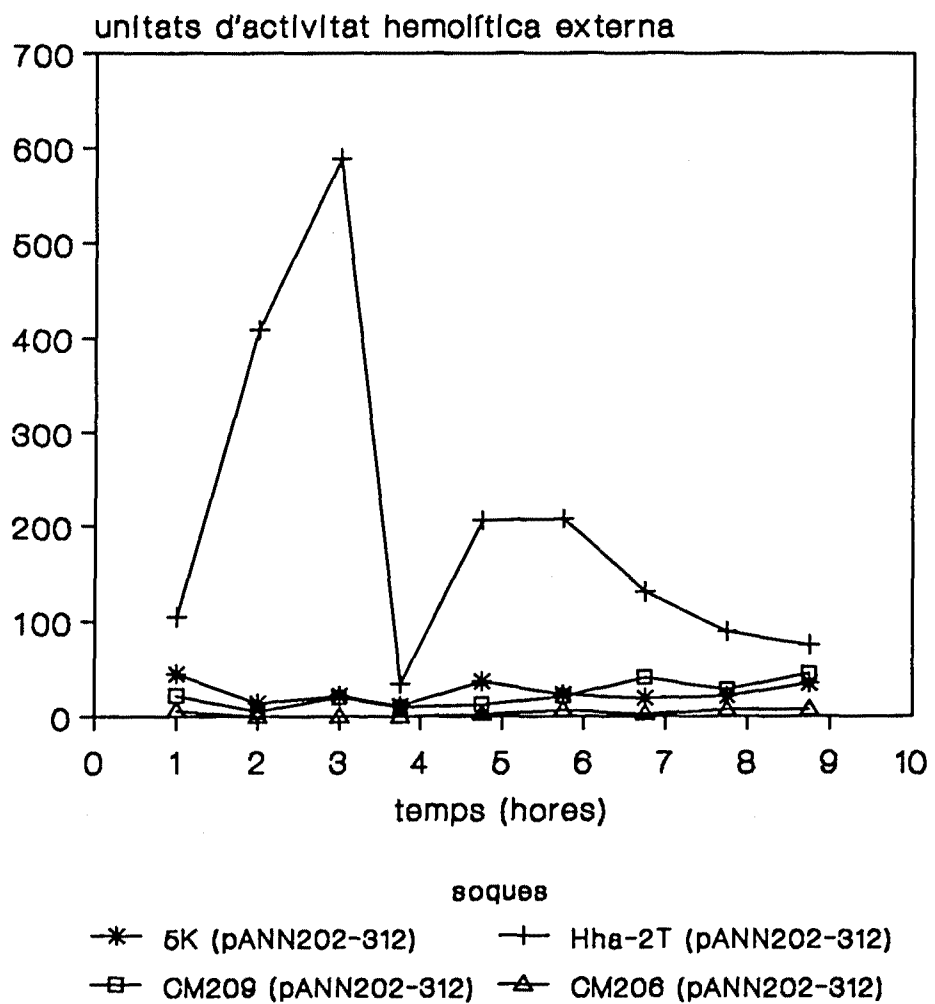
La primera aproximació va ser realitzar experiments de transformació de les soques CM206 i CM209, una vegada curades del plàsmid pHPC3-700, amb el plàsmid pANN202-312 (portador de l'operó de l'hemolisina d'*E.coli*), i comparar el seu grau d'hemòlisi en plaques d'agar-sang amb el que presenta la soca *E.coli* 5K (pANN202-312) i una soca *hha*, la soca *E.coli* Hha-2T (pANN202-312). La soca *E.coli* Hha-2T és una soca termoresistent derivada de la soca *E.coli* Hha-2 (*hha*::*Mud1*; Nieto, Tesi Doctoral, 1991). L'aerolisina és una toxina que s'expressa a 37°C, i la soca *E.coli* Hha-2 mostra un fenotip de sensibilitat a aquesta temperatura degut a la presència del profag *Mud1* en el seu genoma, utilitzat per l'obtenció de la mutació (Godessart *et al.*, 1988). La utilització de la soca Hha-2T permetia realitzar tots els experiments a 37°C. Es va observar que les soques CM206 (pANN202-312) i CM209 (pANN202-312) mostraven reduïts halos d'hemòlisi, és a dir, el fenotip de la soca parental, i no pas el característic de mutants pel gen *hha*. Això suggeria que cap de les dues mutacions *hap* era una mutació *hha*.

Cal recordar que la secreció de l'hemolisina d'*E.coli* no segueix la mateixa via de transport que les proteïnes amb seqüència senyal, que són exportades inicialment a l'espai periplasmàtic per mecanismes generals seguint la via de la

seqüència senyal, i posteriorment al medi extern per mecanismes específics de cada proteïna o grups de proteïnes secretades. L'hemolisina d'*E.coli* presenta un mecanisme específic de secreció al medi extern que té lloc sense l'existència d'un intermediari periplasmàtic.

La valoració en assajos líquids de l'activitat hemolítica externa de les soques CM206 (pANN202-312) i CM209 (pANN202-312) va confirmar que les mutacions d'aquestes soques no afectaven l'expressió de l'hemolisina, ja que presentaven un baix nivell d'activitat hemolítica externa (Figura 3.4.2), en cap cas comparable al de la soca Hha-2T (pANN202-312). En el cas de la soca CM206, aquesta activitat era encara menor que la mostrada per la soca parental 5K (pANN202-312).

Figura 3.4.2 Valoració de l'activitat hemolítica externa corresponent a cultius de les soques 5K (pANN202-312), CM206 (pANN202-312), CM209 (pANN202-312) i Hha-2T (pANN202-312).



Els resultats anteriors suggerien que les mutacions *hap-6* i *hap-9* no es corresponien a mutacions en el gen *hha*. La confirmació d'aquest fet es va obtenir evidenciant que el gen salvatge *hha* no complementa l'efecte de les mutacions *hap* sobre l'expressió de l'aerolisina.

Per poder realitzar aquesta complementació calia construir un plàsmid que tingués clonat el fragment de DNA corresponent al gen salvatge *hha* i codifiqués per resistències a antibiòtics que fossin diferents de Tc, Ap (resistències de pHPC3-700) i Km (marcador de Tn5). El plàsmid pUBM22, portador d'un fragment *EcoRV* de 1,7 Kb que conté el gen *hha* salvatge, és un derivat de pBR322, amb resistència a Ap. Calia construir un altre plàsmid que ens permetés la seva selecció en soques portadores del plàsmid pHPC3-700. A més, i donat que l'haviem de construir, es va utilitzar un vector amb un origen de replicació compatible amb derivats de ColE1. Amb aquest objectiu es va construir el plàsmid pUBM120 clonant el fragment *EcoRV* de 1,7 Kb del plàsmid pUBM22 a la diana *EcoRV* de pACYC184. D'aquesta manera queda anul·lada la resistència a tetraciclina de pACYC184, i el plàsmid resultant és Cm^r i compatible amb pHPC3-700 (Figura 3.4.3).

La transformació de les soques mutants CM206 (pHPC3-700) i CM209 (pHPC3-700) amb el plàsmid pUBM120 va donar el fenotip esperat per les evidències anteriors. El gen *hha* no complementa l'efecte de la mutació en cap de les dues soques (Figura 3.4.4). La mateixa transformació es va fer amb la soca Hha-2T (pHPC3-700) com a control, comprovant-se en aquest cas una reversió al fenotip de la soca parental (*E.coli* 5K (pHPC3-700)).

Figura 3.4.3 Plàsmid pUBM120 i anàlisi electroforètica dels fragments resultants de la seva digestió amb diferents enzims de restricció. a, e: marcador de pesos moleculars (λ -HindIII); b: digestió amb *EcoRV*; c: digestió amb *EcoRV* i *BglII*; d: digestió amb *BglII*.

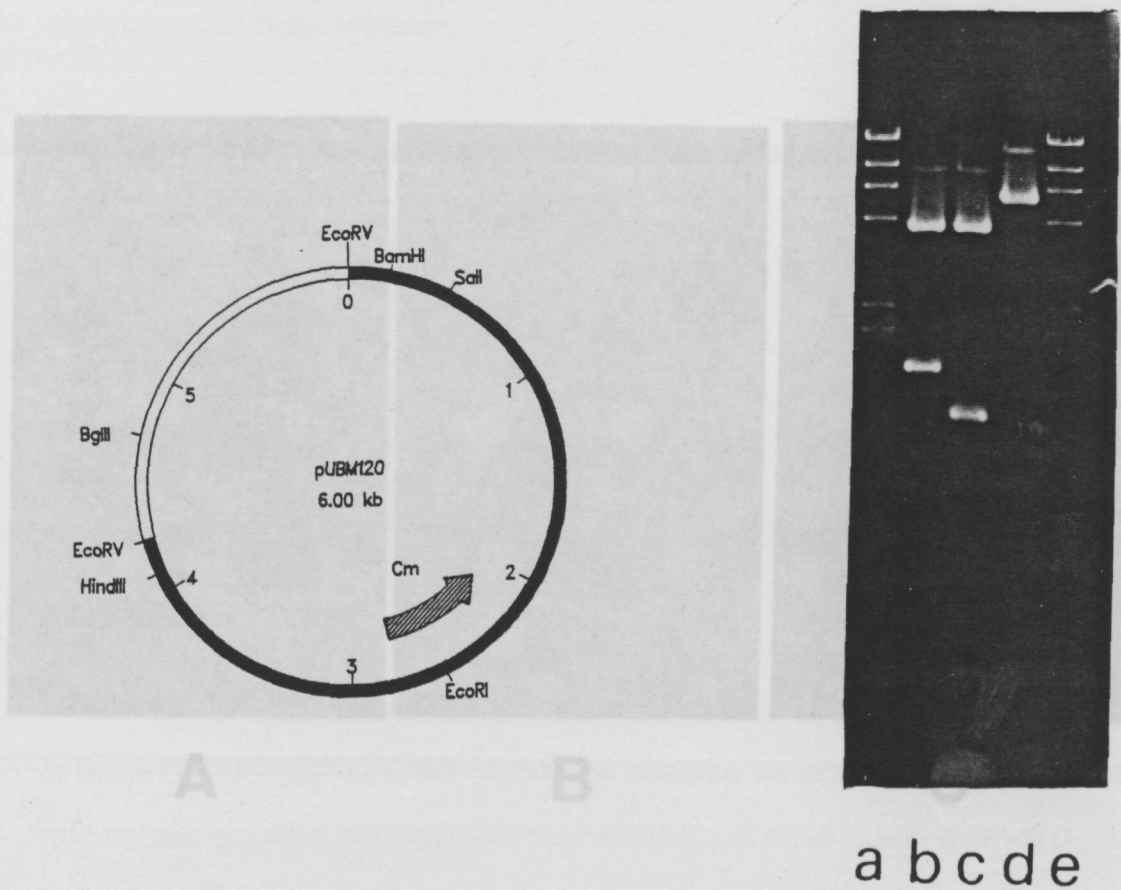
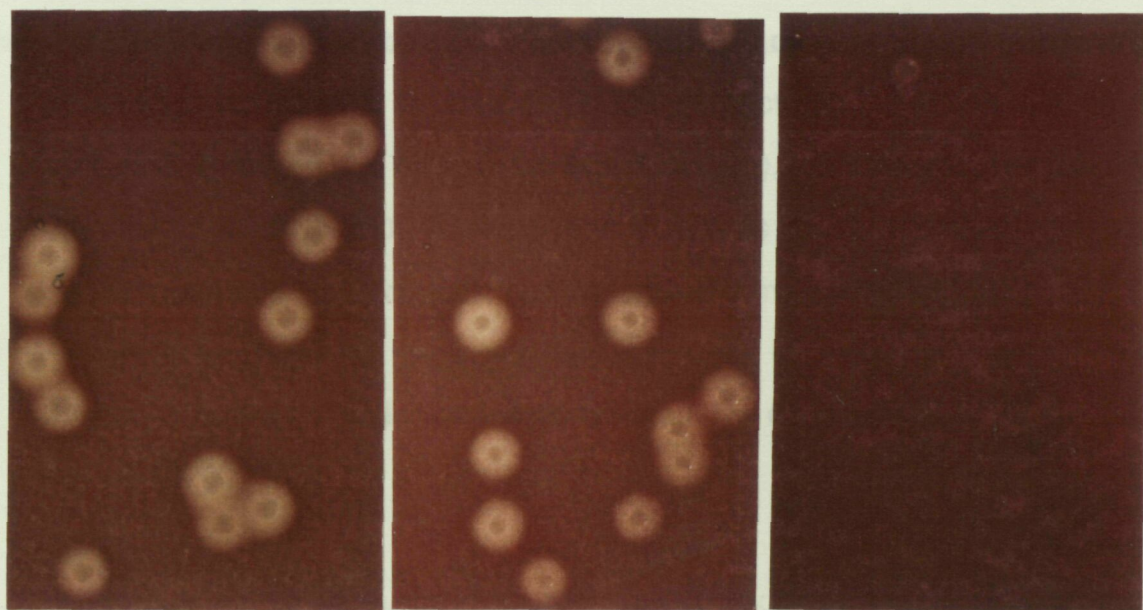


Figura 3.4.4 Fenotip de colònies de les soques CM206 (A), CM209 (B) i Hha-2T (C), transformades amb els plàsmids pHPC3-700 i pUBM120, sobre plaques d'agar-sang.

**A****B****C**

3.4.4 Quantificació de la producció d'aerolisina de les soques CM206 i CM209.

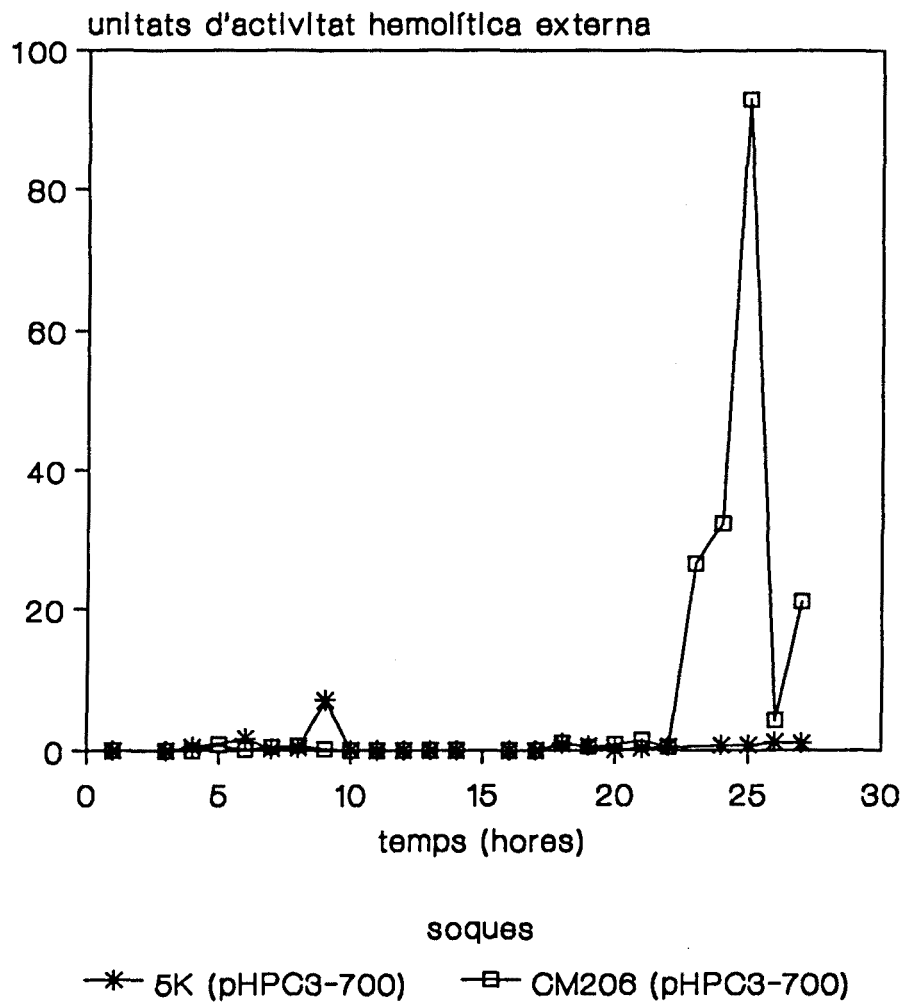
Una vegada descartada la possibilitat de que les mutacions *hap-6* i *hap-9* obtingudes fossin mutacions en el gen *hha*, es va iniciar la seva caracterització. En primer lloc, amb la finalitat d'entendre millor a quin nivell actuen aquestes mutacions, es va quantificar la producció d'aerolisina als diferents compartiments cel·lulars d'ambdós mutants.

Com a primera aproximació a la quantificació de la producció d'aerolisina, es van fer valoracions en assajos líquids de l'activitat de l'aerolisina de les soques CM206 (pHPC3-700) i CM209 (pHPC3-700), en comparació amb la soca parental 5K (pHPC3-700). Aquestes valoracions es van fer utilitzant la propietat de l'aerolisina de lisar eritròcits, comportant-se com una hemolisina.

3.4.4.1 Valoració de la producció d'aerolisina de la soca CM206 (pHPC3-700).

Inicialment es va realitzar el seguiment de l'activitat hemolítica externa de la soca CM206 (pHPC3-700) al llarg de la corba de creixement, constatant-se que només es podia detectar activitat hemolítica al medi extern quan el cultiu es trobava en fase estacionària, a més de 24 hores d'incubació, moment en que la soca parental no mostrava cap activitat externa (Figura 3.4.5).

Figura 3.4.5 Valoració de l'activitat hemolítica externa corresponent a cultius de les soques CM206 (pHPC3-700) i 5K (pHPC3-700).



Per determinar si la presència d'aerolisina al medi extern era deguda o no a una autèntica secreció, es van valorar les activitats d'alguns enzims periplasmàtics al medi extern. La detecció d'activitat per enzims com la β -lactamasa o la fosfatasa alcalina va demostrar que l'activitat hemolítica observada no pot ser considerada una autèntica secreció de l'aerolisina (Taula 3.4.1).

Pel que fa a la mesura de l'activitat a les fraccions internes (la fracció interna no va ser, en aquest cas, desdoblada a periplasma i citoplasma), la valoració va mostrar que la soca CM206 (pHPC3-700) presentava més activitat hemolítica que la soca parental (Figura 3.4.6).

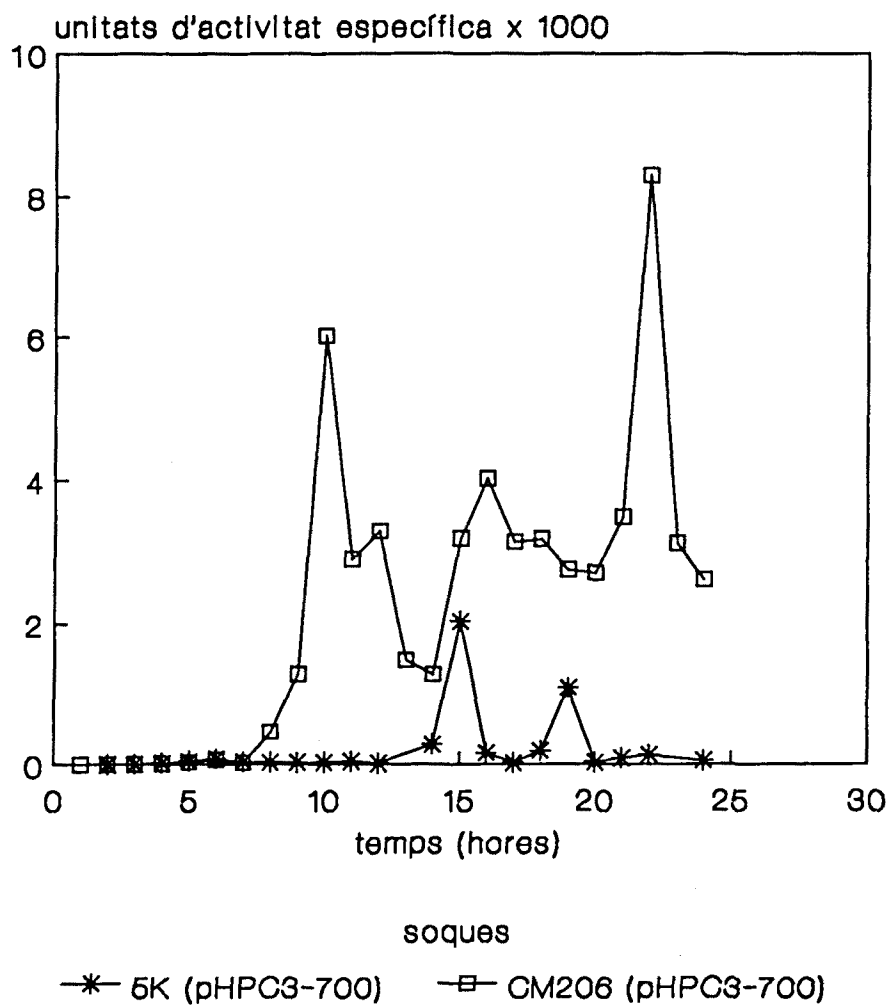
Taula 3.4.1 Activitat dels enzims β -lactamasa i fosfatasa alcalina valorada en fraccions externes de cultius de les soques CM206 (pHPC3-700) i 5K (pHPC3-700).

	5K (pHPC3-700)	CM206 (pHPC3-700)
β -lactamasa:		
1)	0	0
2)	0	0.037
fosfatasa alcalina:		
1)	0.017	0.017
2)	0.023	0.23

Els punt 1) i 2) corresponen a:

- 1) mostres en que cap de les dues soques presenta activitat hemolítica externa (11 hores d'incubació)
- 2) mostres en que la soca CM206 (pHPC3-700) presenta activitat externa (24 hores d'incubació).

Figura 3.4.6 Valoració de l'activitat hemolítica corresponent a fraccions internes de les soques CM206 (pHPC3-700) i 5K (pHPC3-700).

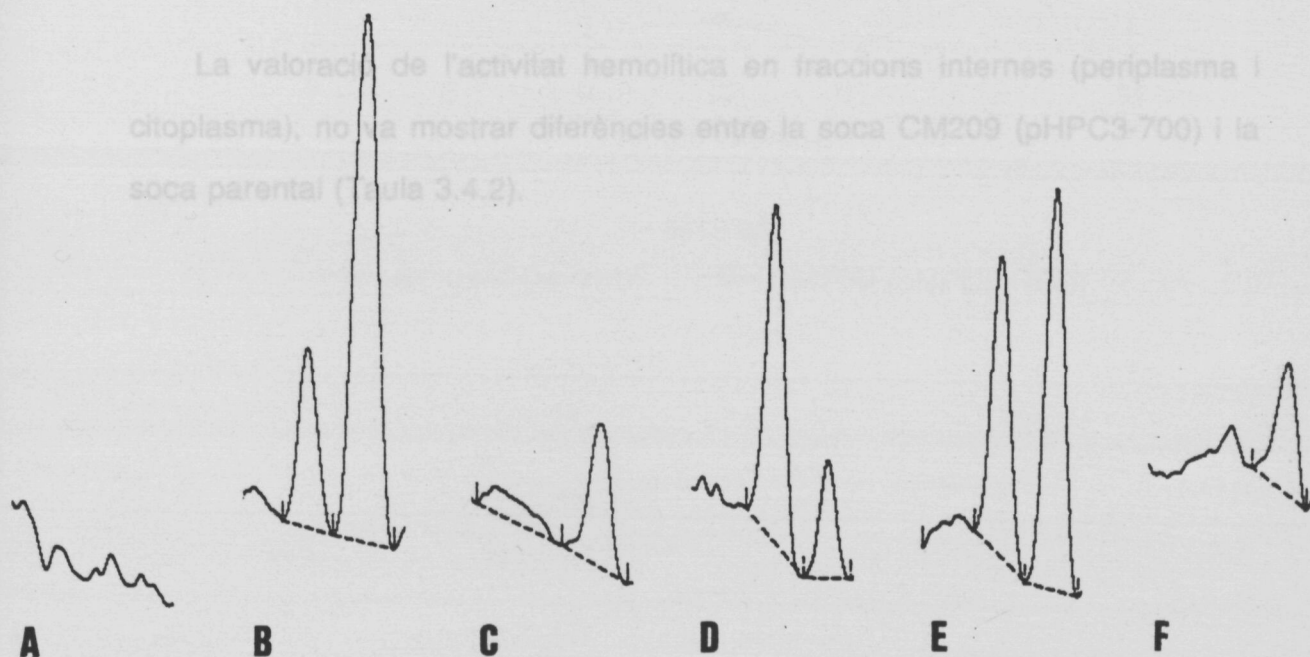
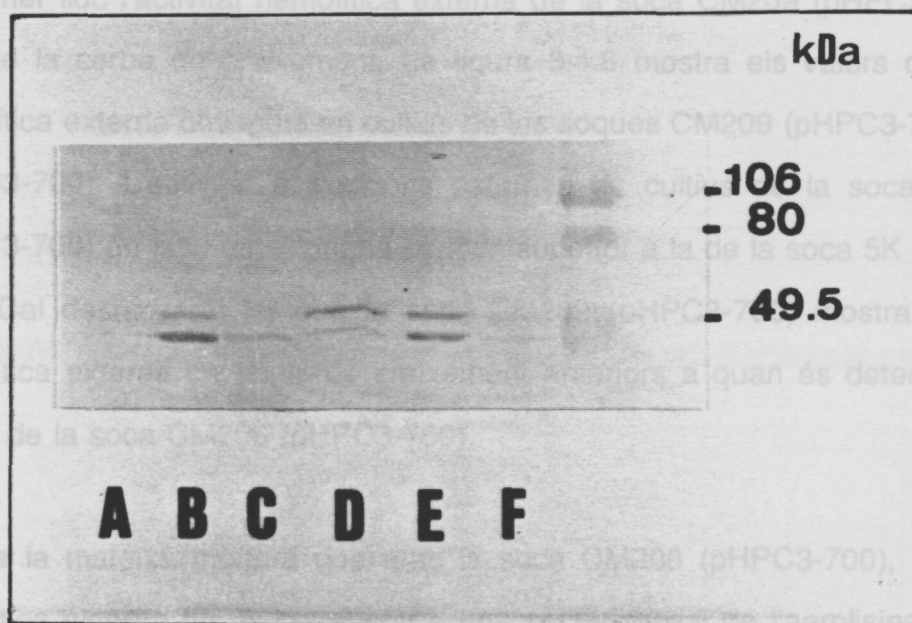


La valoració de l'activitat hemolítica de l'aerolisina, però, reflecteix únicament la fracció de proteïna activa, és a dir, la fracció que ha estat processada de proaerolisina a aerolisina, menys la fracció d'aerolisina que ha estat degradada o inactivada. La determinació de la quantitat real d'aerolisina sintetitzada pels mutants es va fer per immunodetecció en membranes ("Western blotting"). Es van fraccionar cultius de les soques CM206 (pHPC3-700) i 5K (pHPC3-700) en fase estacionària (a 24 hores d'incubació, ja que és el punt de màxima activitat detectada a sobrenedants de la soca CM206), i els extractes obtinguts (fracció externa, periplasmàtica i citoplasmàtica) es van separar en SDS-PAGE i transferir a una membrana de nitrocel·lulosa. Posteriorment es va realitzar el revelat de la membrana per immunodetecció amb anticossos contra l'aerolisina. Els resultats obtinguts van permetre extreure les següents conclusions (Figura 3.4.7):

- a) És detectable l'aerolisina a la fracció externa corresponent a la soca CM206 (pHPC3-700), i no es detecta a la mateixa fracció de la soca parental 5K (pHPC3-700).
- b) La quantificació de l'aerolisina als compartiments interns mostra que hi ha una quantitat equivalent a les dues soques.
- c) La presència d'aerolisina a fraccions externes de la soca CM206 (pHPC3-700) no implica una disminució del seu contingut periplasmàtic d'aerolisina en comparació a la soca parental. La comparació del contingut periplasmàtic de la soca 5K i la soca CM206, mostra que aquest és equivalent (tenint en compte les dues formes de la proteïna).

Aquests resultats es van confirmar amb l'anàlisi densitomètrica de les membranes, arribant a la conclusió de que la soca CM206 sintetitza en total 1,4 vegades més aerolisina que la soca parental 5K. Cal tenir present, però, que l'anàlisi densitomètrica no reflecteix exactament la quantitat de proteïna, ja que no té en compte paràmetres com l'amplada de les bandes.

Figura 3.4.7 Immunodetecció d'aerolisina a fraccions cel.lulars corresponents a mostres de cultius de 24 hores de les soques 5K (pHPC3-700) i CM206 (pHPC3-700). A, B, C: fraccions externa, periplasmàtica i citoplasmàtica de la soca 5K (pHPC3-700). D, E, F: fraccions externa, periplasmàtica i citoplasmàtica de la soca CM206 (pHPC3-700). A la part inferior es representen els densitogrames corresponents.



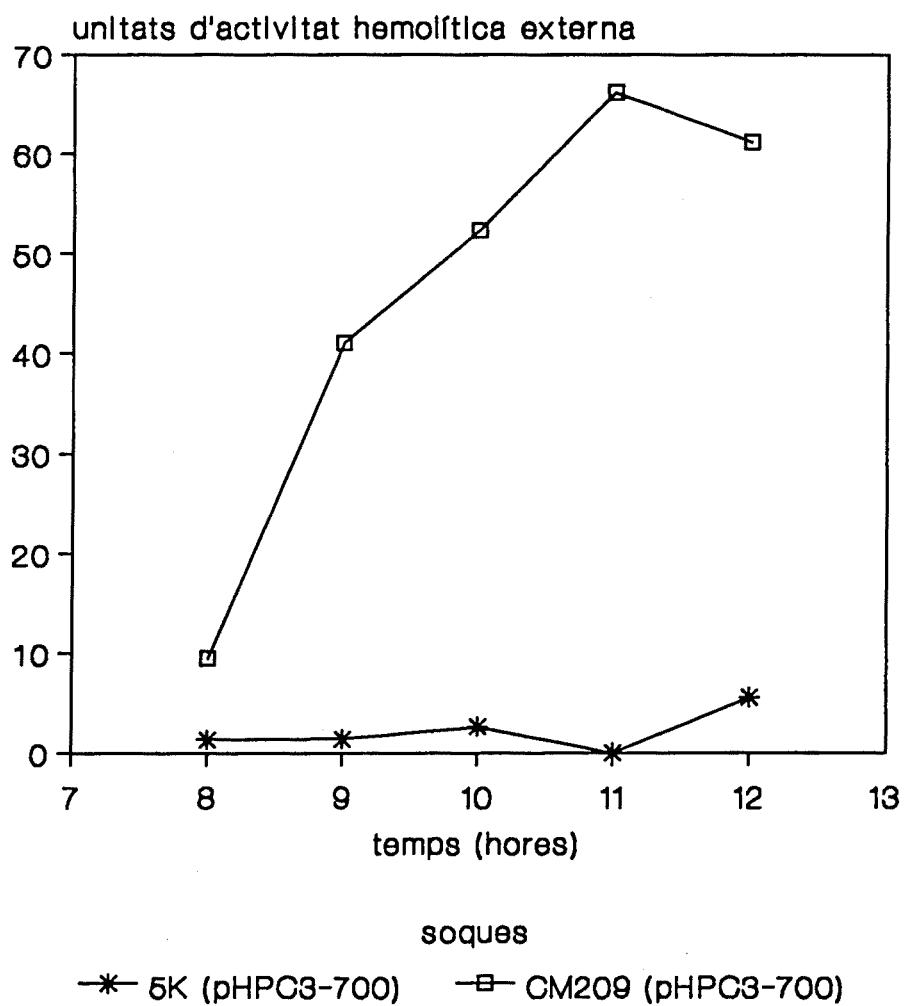
3.4.4.2 Valoració de la producció d'aerolisina de la soca CM209 (pHPC3-700).

Seguint una pauta similar a la utilitzada amb la soca CM206, es va valorar en primer lloc l'activitat hemolítica externa de la soca CM209 (pHPC3-700) al llarg de la corba de creixement. La figura 3.4.8 mostra els valors d'activitat hemolítica externa obtinguts en cultius de les soques CM209 (pHPC3-700) i 5K (pHPC3-700). L'activitat a fraccions externes de cultius de la soca CM209 (pHPC3-700) en fase estacionària és molt superior a la de la soca 5K (pHPC3-700). Cal destacar el fet que la soca CM209 (pHPC3-700) mostra activitat hemolítica externa en fases de creixement anteriors a quan és detectada en cultius de la soca CM206 (pHPC3-700).

De la mateixa manera que amb la soca CM206 (pHPC3-700), l'activitat hemolítica externa no es correspon a una secreció real de l'aerolisina, ja que també es poden detectar al medi extern activitats d'enzims periplasmàtics (Taula 3.4.3).

La valoració de l'activitat hemolítica en fraccions internes (periplasma i citoplasma), no va mostrar diferències entre la soca CM209 (pHPC3-700) i la soca parental (Taula 3.4.2).

Figura 3.4.8 Valoració de l'activitat hemolítica externa corresponent a cultius de les soques 5K (pHPC3-700) i CM209 (pHPC3-700).



Taula 3.4.2 Valoració de l'activitat hemolítica a fraccions internes (periplasmàtiques i citoplasmàtiques) de les soques 5K (pHPC3-700) i CM209 (pHPC3-700) corresponents a 8 i 11 hores d'incubació (punt 8 i 11 respectivament).

Fracció	5K (pHPC3-700)	CM209 (pHPC3-700)
Punt 8:		
. Periplasma	7,7	8,6
. Citoplasma	1,18	1,5
Punt 11:		
. Periplasma	5,3	4,7
. Citoplasma	0,85	1,3

Taula 3.4.3 Unitats d'activitat hemolítica (Hly), β -lactamasa (β -lac.) i fosfatasa alcalina (F.A.) a fraccions externes corresponents a cultius de les soques 5K (pHPC3-700) i CM209 (pHPC3-700). Les mostres corresponen a cultius de 11 hores d'incubació.

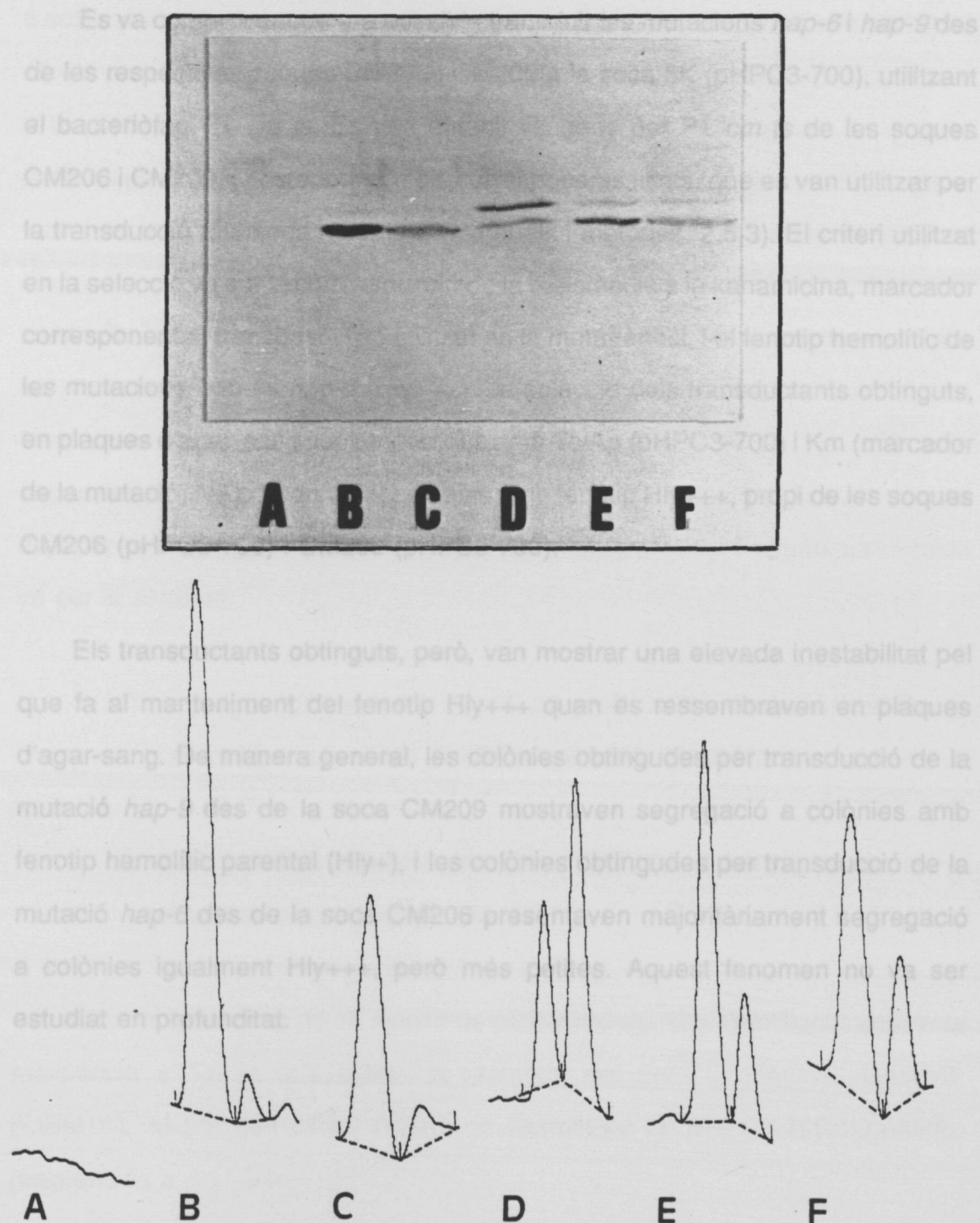
Activitat	5K (pHPC3-700)	CM209 (pHPC3-700)
Hly	0	66,0
β -lac.	0	0,31
F.A.	0,065	0,48

També amb la soca CM209 es va quantificar per immunodetecció la producció d'aerolisina als diferents compartiments cel·lulars, fracció externa, periplasmàtica i citoplasmàtica, obtingudes a partir de cultius en fase estacionària (Figura 3.4.9). Els resultats obtinguts van permetre extreure les següents conclusions:

- a) l'aerolisina és detectada a la fracció externa corresponent a la soca CM209 (pHPC3-700), i no es detecta a la fracció externa de la soca 5K (pHPC3-700).
- b) També és observable que no hi ha importants diferències quantitatives pel que fa als compartiments interns (periplasma i citoplasma).
- c) La presència d'aerolisina al medi extern de cultius de la soca CM209 no suposa una disminució de la quantitat detectable al periplasma, respecte a la soca parental.

L'anàlisi densitomètrica de la membrana va confirmar els resultats, obtenint-se una diferència en la quantitat d'aerolisina total entre les dues soques de 1,35 vegades. Cal tornar a mencionar les limitacions de les determinacions densitomètriques, pel que fa a una quantificació acurada.

Figura 3.4.9 Immunodetecció d'aerolisina a fraccions cel.lulars de les soques 5K (pHPC3-700) i CM209 (pHPC3-700), corresponents a mostres obtingudes de cultius de 11 hores d'incubació. A, B i C: fraccions externa, periplasmàtica i citoplasmàtica de la soca 5K (pHPC3-700); D, E i F: fraccions externa, periplasmàtica i citoplasmàtica de la soca CM209 (pHPC3-700). A la part inferior es representen els densitogrames corresponents.



3.4.5 Caracterització genètica de les mutacions *hap-6* i *hap-9*.

3.4.5.1 Cotransducció del marcador de resistència del transposó (Km) i el fenotip hemolític de les mutacions *hap-6* i *hap-9*.

Es va comprovar que era possible transduir les mutacions *hap-6* i *hap-9* des de les respectives soques CM206 i CM209 a la soca 5K (pHPC3-700), utilitzant el bacteriòfag P1 *cm ts*. Es van obtenir lisògens per P1 *cm ts* de les soques CM206 i CM209, i posteriorment els corresponents lisats, que es van utilitzar per la transducció a la soca receptora (Materials i mètodes, 2.5.3). El criteri utilitzat en la selecció va ser la cotransducció de la resistència a la kanamicina, marcador corresponent al transposó Tn5 utilitzat en la mutagènesi, i el fenotip hemolític de les mutacions *hap-6* i *hap-9* (Hly+++). La selecció dels transductants obtinguts, en plaques d'agar-sang suplementades amb Tc/Ap (pHPC3-700) i Km (marcador de la mutació), va proporcionar colònies amb fenotip Hly+++ , propi de les soques CM206 (pHPC3-700) i CM209 (pHPC3-700).

Els transductants obtinguts, però, van mostrar una elevada inestabilitat pel que fa al manteniment del fenotip Hly+++ quan es ressebraven en plaques d'agar-sang. De manera general, les colònies obtingudes per transducció de la mutació *hap-9* des de la soca CM209 mostraven segregació a colònies amb fenotip hemolític parental (Hly+), i les colònies obtingudes per transducció de la mutació *hap-6* des de la soca CM206 presentaven majoritàriament segregació a colònies igualment Hly+++ , però més petites. Aquest fenomen no va ser estudiat en profunditat.

3.4.5.2 Mapatge de les mutacions *hap-6* i *hap-9*.

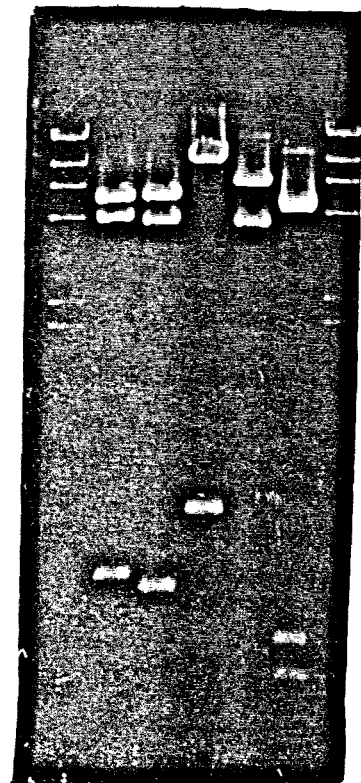
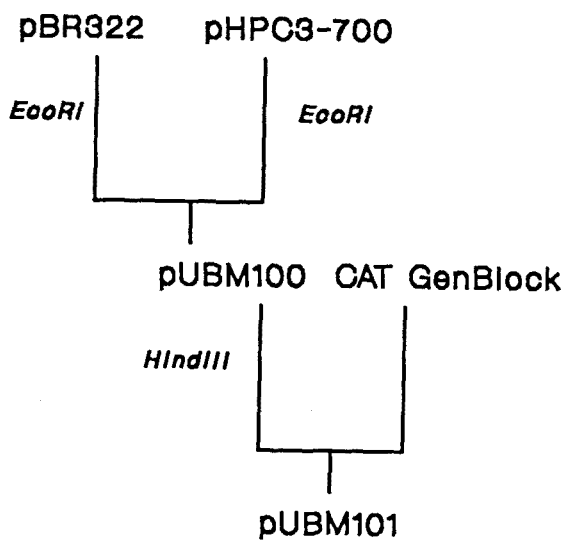
3.4.5.2.a Construcció del plàsmid pUBM101.

L'estratègia de mapatge de mutacions per conjugació amb soques Hfr::Tn 10 o cotransducció d'insercions de Tn 10 amb el bacteriòfag P1, implica la utilització d'insercions del transposó Tn 10 i la utilització de la resistència a tetraciclina com a marcador del transposó. Es pretenia realitzar el mapatge sobre les soques mutants portadores d'un plàsmid que codifiqués per l'aerolisina, ja que aquest fet facilitaria l'observació de la reversió al fenotip hemolític parental en plaques d'agar-sang. El plàsmid pHPC3-700 presenta com a marcadors les resistències a Ap i Tc, de manera que no es podia utilitzar amb l'objectiu esmentat. Calia construir un plàsmid que tingués clonat l'operó de l'aerolisina, però que al mateix temps no presentés resistència a Tc (marcador de Tn10), ja que això impossibilitaria la selecció dels transconjugants o cotransductants. Amb aquest objectiu es va construir el plàsmid pUBM101 (Figura 3.4.10). L'estratègia seguida va ser la següent:

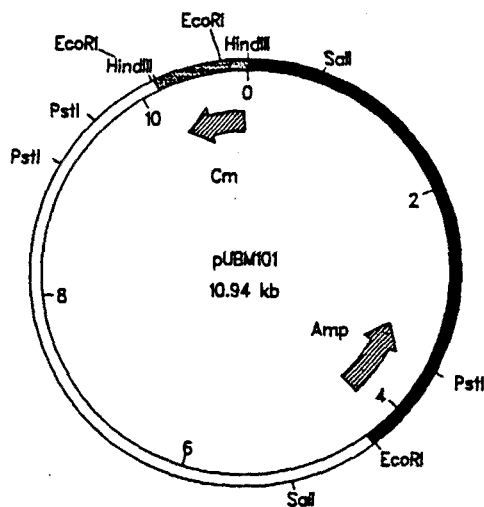
- 1) clonatge del fragment *EcoRI* de pHPC3-700 (determinant de l'aerolisina) a la diana *EcoRI* de pBR322: **pUBM100**.
- 2) clonatge d'un cassette per Cm ("CAT GenBlock") a la diana *HindIII* de pUBM100: **pUBM101**.

La introducció a la diana *HindIII* de pUBM100 de "Cat GenBlock" anul·la la resistència a Tc, ja que afecta el promotor del gen. El plàsmid resultant, pUBM101, té per tant clonat l'operó de l'aerolisina de pHPC3-700 i presenta resistències a Ap i Cm.

Figura 3.4.10 Esquema de la construcció i anàlisi de restricció del plàsmid pUBM101. a, g: lambda-*HindIII*, b: digestió amb *EcoRI*, c: digestió amb *EcoRI* i *HindIII*, d: digestió amb *HindIII*, e: digestió amb *SalI*, i f: digestió amb *PstI*.



a b c d e f g



3.4.5.2.b Mapatge de les mutacions *hap-6* i *hap-9* per conjugació amb soques Hfr::Tn10.

Per tal d'obtenir la situació aproximada dins el mapa de lligament d'*E.coli* de les mutacions *hap-6* i *hap-9*, es van fer experiments de conjugació entre les soques CM206 (*hap-6*) i CM209 (*hap-9*), transformades amb el plàsmid pUBM101, i les diferents soques Hfr::Tn10 (Materials i mètodes, 2.6.1).

La selecció dels transconjugants es va fer en plaques d'agar-sang suplementades amb Tc (Tn10) i Ap/Cm (pUBM101), a més de Sm com a marcador de la soca receptora (CM206 o CM209, derivades de 5K), per tal d'evitar el creixement de les soques donadores (sensibles a Sm).

D'aquesta manera es van seleccionar totes les colònies que havien rebut material cromosòmic de les soques donadores Hfr::Tn10, integrant el transposó a la mateixa regió on es trobava dins el cromosoma de la soca donadora.

Es va calcular la freqüència de transconjugants que havien revertit al fenotip hemolític de la soca parental, és a dir, halos d'hemòlisi reduïts (Hly+), sobre el total de colònies Tc^r obtingudes de cadascuna de les conjugacions. La situació de la inserció de Tn10 a la soca donadora que produeix a la conjugació la màxima freqüència de colònies Tc^r Hly+ indica la localització aproximada de la mutació.

Per la soca CM206 (pUBM101), les freqüències de transconjugants Tc^r i Hly+ més elevades es van obtenir quan s'utilitzaven com a donadores les soques BW6163 (*zed*::Tn10) (71%) i BW7620 (*zed*::Tn10) (56%). En canvi, per la soca CM209 (pUBM101), les freqüències de transconjugants Tc^r i Hly+ més elevades

es van obtenir utilitzant com a donadores les soques BW7623 (*purE::Tn10*) (75%) i BW7622 (*trp::Tn10*) (15%).

El mapatge aproximat indicava que les dues mutacions afecten gens diferents, ja que es localitzen a dues regions diferents del cromosoma. Mentre que la mutació de la soca CM209 (*hap-9*) quedava localitzada aproximadament entre els minuts 10 i 20, la mutació de la soca CM206 (*hap-6*) es localitzava cap a la regió del minut 40-50.

Teòricament, la reversió al fenotip hemolític parental per recombinació amb un material genètic no portador de la mutació hauria d'anar acompanyada de la pèrdua de la resistència a Km, marcador de la mutació obtinguda per inserció de Tn5, al mateix temps que es produeix la incorporació de la resistència a Tc, marcador del material genètic donador. La repicació de les colònies revertents obtingudes (Tc^r, Hly⁺) a medis amb Tc o Tc/Km, va permetre observar que no totes les colònies Tc^r Hly⁺ presentaven sensibilitat a kanamicina, el marcador de les mutacions. Només el 40% dels transconjugants Tc^r Hly⁺ obtinguts per conjugacions entre CM209 i BW7623 eren Km^s, i el percentatge era del 60% utilitzant com a donadora la soca BW7622. Aquest fenomen va ser igualment observat per la soca CM206.

Tant la inestabilitat del fenotip Hap⁻ als experiments de transducció de les mutacions *hap* (veure apartat 3.4.5.1) com el fenomen anteriorment comentat de que els transconjugants que recuperen el fenotip Hap⁺ mantenen la resistència a Km, suggereixen que en aquests processos de transferència de material genètic s'estan produint fenòmens de recombinació que no són explicables en funció dels coneixements dels que actualment es disposa sobre els processos d'intercanvi genètic i recombinació a procariotes.

Ja que les dues mutacions afecten gens diferents i que la caracterització de qualsevol d'elles implica un esforç important, es va considerar apropiat escollir una de les dues soques per tal de realitzar la seva caracterització completa. Tenint en compte que un dels objectius del treball era obtenir mutacions que optimitzessin l'expressió de proteïnes heteròlogues a *E.coli*, vàrem decidir escollir la soca CM209, ja que la mutació *hap-9* indueix un major augment de la producció externa d'aerolisina.

3.4.5.2.c Mapatge fi de la mutació *hap-9* per cotransducció de marcadors.

Per tal de localitzar amb més precisió la mutació *hap-9* al cromosoma d'*E.coli*, es van fer transduccions, utilitzant el bacteriòfag P1 *cm ts*, des de soques portadores d'insercions de Tn10 localitzades a la regió on teníem mapada de manera aproximada la mutació, a la soca CM209 (pUBM101) (Materials i mètodes, 2.6.2).

Després de la transducció, la selecció es va fer en plaques d'agar-sang suplementades amb Tc (marcador de Tn10) i Ap/Cm (marcadors de pUBM101). Es van calcular les freqüències de cotransducció del fenotip parental (Hly⁺) i la resistència a Tc sobre el total de colònies Tc^r obtingudes. Aquesta freqüència es va utilitzar per calcular la distància entre el marcador de la soca donadora (localització de la inserció de Tn10) i la mutació *hap-9*, segons la fórmula definida per Wu (Wu, 1966). Els resultats obtinguts (Taula 3.4.4), van donar les majors freqüències de transductants amb fenotip Hly⁺ Tc^r quan s'utilitzaven com a donadores les soques NK6033 (*nadA50::Tn10*), amb un 86,8%, i N3030 (*gal76::Tn10*), amb un 75,3%. El càlcul de la distància entre marcadors localitzava la mutació *hap-9* al minut 16,7 del mapa de lligament d'*E.coli*.

Taula 3.4.4 Freqüències de cotransducció de la resistència a tetraciclina i fenotip hemolític parental (Hly+) obtingudes en els experiments de mapatge.

Soca donadora	Posició de Tn10 (min)	Freqüència de cotransducció
KL743 (<i>zba-3000::Tn10</i>)	10	0,026
JW1071 (<i>zbf-507::Tn10</i>)	15	0,066
NK6033 (<i>nadA50::Tn10</i>)	16,8	0,868
N3030 (<i>gal76::Tn10</i>)	17	0,753
S1316 (<i>zbh-428::Tn10</i>)	17,8	0,137
RW1230 (<i>zbj-1230::Tn10</i>)	19	0,055

3.4.6 Anàlisi de les proteïnes de membrana de la soca CM209.

Dins l'estratègia de caracterització de la soca CM209, i tenint en compte que la mutació *hap-9* afecta l'alliberament de proteïnes periplasmàtiques, vàrem decidir analitzar la composició proteica de les membranes, per tal de veure si es troba modificada a la soca CM209.

Es van obtenir els extractes corresponents a les proteïnes de membrana interna i externa (Materials i mètodes, 2.10.2) de les soques 5K i CM209, i es van analitzar en gels de poliacrilamida.

L'anàlisi de les proteïnes de membrana interna no va mostrar clares diferències entre la soca mutant CM209 i la soca parental 5K (Figura 3.4.11).

Pel que fa a les proteïnes de membrana externa, els patrons obtinguts mostraven una diferència en una proteïna d'aproximadament 46 kDa, que no era detectable en els extractes de la soca CM209. El pes molecular d'aquesta proteïna feia pensar que es tractava de LamB, proteïna de membrana externa codificada per l'operó de la maltosa. Aquest operó és induïble per la presència de maltosa al medi. Es va confirmar que es tractava de LamB quan les proteïnes de membrana externa es van obtenir a partir de cultius que s'havien suplementat amb maltosa, per tal d'induir l'expressió del gen *lamB* i fer més visible la presència de la proteïna LamB als extractes obtinguts. Mentre que als extractes de proteïnes de membrana externa obtinguts de cultius de la soca 5K s'observava clarament la banda corresponent a aquesta proteïna, seguia sense visualitzar-se a les preparacions obtingudes de cultius de la soca CM209 (Figura 3.4.12).

Donada la funció de LamB com a receptor de la superfície bacteriana pel bacteriòfag lambda, es va assajar la resistència a aquest fag mitjançant un test de la gota plaquejat sobre les soques CM209 i 5K. Aquest test, fet amb lambda vir, va evidenciar la resistència de la soca CM209 al bacteriòfag, mentre que la soca parental és clarament sensible. Aquests resultats es correlacionen amb l'observació de que la proteïna LamB no és present a la membrana externa de la soca mutant CM209.

L'efecte sobre l'expressió del gen *lamB* no és degut a una mutació en aquest gen, ja que la mutació *hap-9* es va mapar al minut 16,7 (veure apartat 3.4.8.3) i el gen *lamB* es situa al minut 92 (Bachmann, 1990). A més a més, es va comprovar que no hi ha relació entre els dos gens per complementació. Per això, es va transformar la soca CM209 amb els plàsmids pHPC3-700 i pTROY. El plàsmid pTROY és portador d'un gen *lamB* constitutiu (LamB^c; De Vries *et al.*, 1984). Aquest plàsmid confereix resistència a Ap, i pHPC3-700 ho fa per a Ap i Tc. Per poder seleccionar ambdós plàsmids al mateix temps, es va transformar primer amb pTROY, seleccionant per Ap, i després amb pHPC3-700, seleccionant per Ap i Tc. Malgrat tots dos plàsmids pertanyen al mateix grup d'incompatibilitat, és possible mantenir-los temporalment a la mateixa cèl·lula, encara que a la llarga es segreguen. El fenotip de les colònies obtingudes amb la transformació de la soca CM209 amb els dos plàsmids, sobre plaques d'agar-sang, demostrava que el gen *lamB* no complementa l'efecte de la mutació, ja que les colònies seguien mostrant el fenotip hemolític característic de la soca CM209 (pHPC3-700).

Figura 3.4.11 Anàlisi electroforètica en SDS-PAGE al 13% de preparacions de proteïnes de membrana interna de les soques 5K (A) i CM209 (B). Preparats amb maltosa al 0,2% de les soques 5K (A) i CM209 (B).

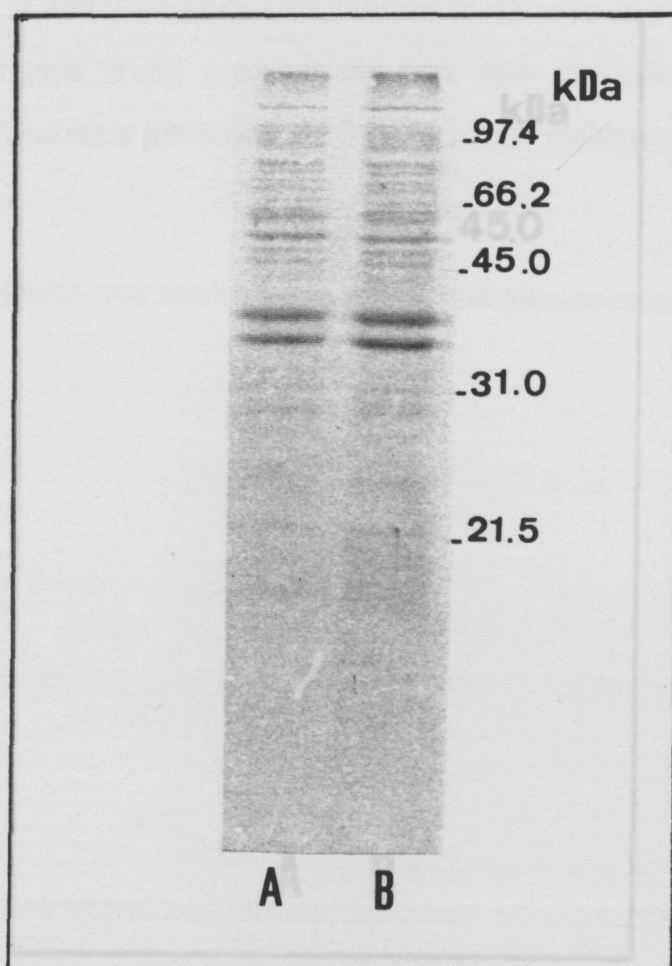
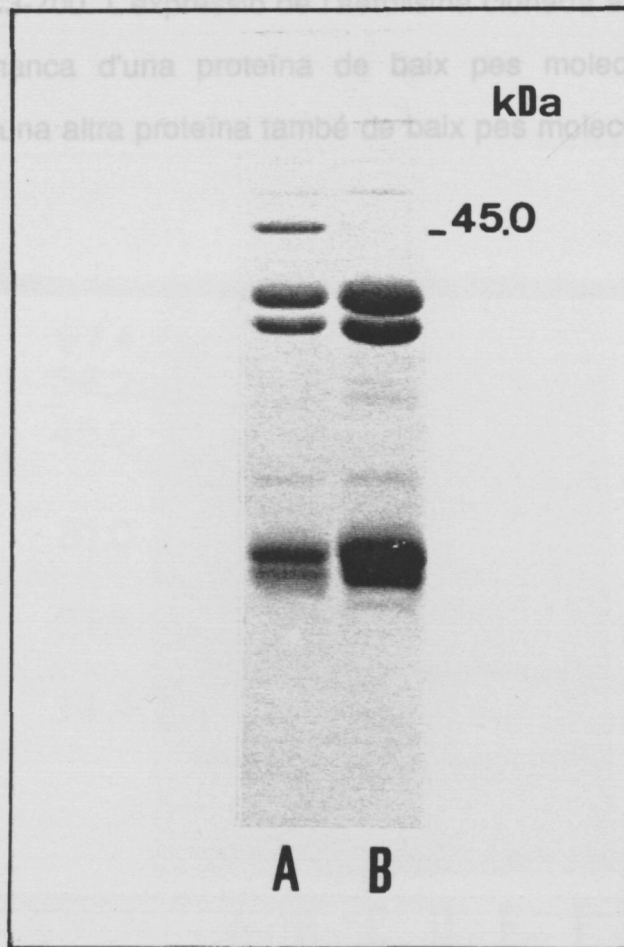


Figura 3.4.12 Anàlisi electroforètica en SDS-PAGE al 13% de preparacions de proteïnes de membrana externa obtingudes a partir de cultius suplementats amb maltosa al 0,2% de les soques 5K (A) i CM209 (B).



Es van obtenir també els extractes de proteïnes de membrana externa a partir de cultius de les soques CM209 i 5K curades o transformades amb el plàsmid pHPC3-700. L'anàlisi en gels de poliacrilamida d'aquestes preparacions va permetre determinar que la soca CM209 presenta algunes diferències en el seu patró de proteïnes de membrana externa que depenen de la presència del plàsmid pHPC3-700. L'expressió de l'aerolisina clonada al plàsmid pHPC3-700 provoca la manca d'una proteïna de baix pes molecular i la disminució quantitativa d'una altra proteïna també de baix pes molecular (Figura 3.4.13).

Figura 3.4.13 Anàlisi electroforètica en SDS-PAGE al 15% de preparacions de proteïnes de membrana externa obtingudes a partir de cultius de soques curades o transformades amb pHPC3-700. A: 5K; B: 5K (pHPC3-700); C i E: CM209; i D i F: CM209 (pHPC3-700).

