



Departament de Microbiologia

**Interacción entre proteínas de las familias
H-NS y Hha/YmoA: regulación de la
expresión génica en *Enterobacteriaceae***

**Sonia Rodríguez Rodríguez
Tesis Doctoral
Barcelona, 2005**



Departament de Microbiologia
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

**Interacción entre proteínas de las familias H-NS y Hha/YmoA: regulación de la expresión génica en
*Enterobacteriaceae***

Memoria presentada por Sonia Rodríguez Rodríguez
para optar al grado de Doctor en Biología

Programa de Doctorado:
Microbiología Ambiental y Biotecnología
Bienio 2000-2002

Vº Bº de los Directores

Dr. Antonio Juárez Giménez

Dr. Jose M^a Nieto Marqueño

Agradecimientos:

Quiero agradecer a todas aquellas personas que de una forma u otra han participado en la elaboración de esta memoria, y pido perdón de antemano si me olvido de alguien.

Agradecer al Dr. Antonio Juárez la posibilidad de realizar la tesis doctoral y la dedicación puesta en el trabajo realizado y en la corrección de esta memoria. También al Dr. Jose M^a Nieto por el seguimiento constante de los estudios y de las revisiones de esta Tesis.

A todos mis compañeros de laboratorio por la ayuda recibida en todo momento, sobretodo en aquellos más difíciles. A Cristina, nuestra post-doc, siempre dispuesta a echar una mano con cualquier problema. A Sònia, y esas conversaciones sobre fútbol, aunque no siempre estuviéramos de acuerdo (difícil sí som d'equips diferents). A Rosa, la otra veterana del grupo y compañera de piscina (al final hemos leído casi juntas, pero te has adelantado). A Núria, mi vecina de poyata, por compartir los primeros momentos en el grupo, los largos en la piscina y esas partidas de Catan. A Nacho, el chico del grupo, aunque ahora ya no esta solo, por todo el trabajo que hemos compartido y por esas historias que siempre recordaré. También a la gente que ya no esta, Sandra, Eli, Eva (esas conversaciones al lado de mi poyata justo cuando te tenías que ir) y a los que han llegado hace poco pero no por eso menos importantes y que han hecho más agradable la estancia en el laboratorio, Sonia, Aitziber, Jorge, Sheila.

También recordar y agradecer a los compañeros del departamento. A, Javi, Cristina, Marga, Julia, Jordi, Lida, Núria, Santi, Lluís, Mari, Islem, Néstor, Pili, Sílvia, Ayalke, por todas las comidas y momentos que hemos tenido juntos. Una mención especial para Marc, Quim, Marta, Núria, Xavi, Cristian, Laura y Oscar, porque además de esas comidas hemos compartido diferentes salidas (a que os acordáis de Boi y algunos también de Morella, etc.), cenas (tesis, jornadas gastronómicas, inauguraciones), juegos (civi, pero sobretodo el Catan, ¿verdad Marta?), piscina y

muchas otras cosas, espero que aunque todos vayamos tomando caminos diferentes sigamos realizando actividades juntos y que pueda seguir disfrutando de vuestra compañía.

No puedo olvidarme de mis nuevos compañeros, que me han ayudado a integrarme rápidamente y a superar los nervios de estos últimos meses.

Y como no, agradecer a todos mis amigos por aguantarme tantos años, y por interesarse por mi trabajo aunque alguno de ellos no supiera de que se trataba. Gracias a Raquel, a pesar de la distancia que ahora nos separa, sabes que siempre estaremos ahí para lo que haga falta y que todos los momentos que pasamos juntas durante la carrera no se pueden olvidar. A Edu, el viajero, siempre proponiendo nuevas cosas que hacer y haciendo que disfrutemos de cada momento y "chinchando" que si no serías tú, pero no cambies. A Oliver y Laura (ahora sois como uno), siempre ahí cuando se os necesita, dispuestos a quedar cada fin de semana, a realizar diferentes excursiones ¿os acordáis de todos esos viajes en coche? al Montseny, a Montblanc, y otros tantos sitios. No acabaría si recordará todos los instantes importantes que he pasado con cada uno de vosotros.

También agradecer su paciencia a mi familia, a mis padres y a mi hermano, que siempre han apoyado mis decisiones, que me han ayudado a seguir adelante en todos los momentos difíciles, que aguantado mis momentos de mal humor y también los buenos. Por fin ha llegado al final de este largo camino, gracias por todo vuestro apoyo y vuestras enseñanzas. Y Raúl, ya se han acabado todos esos "problemillas" con el ordenador que sabes que tanto me desesperan y que me has ayudado a solucionar, y tranquilo, que pronto esa habitación será solo para ti.

Y finalmente, gracias Josep, sin ti todo esto seguro que no habría sido lo mismo. Creo que esta Tesis la puedes considerar también un poquito tuya por todo ese apoyo que me has dado, por ayudarme a solventar los problemas técnicos en el laboratorio (el problema de haber estudiado lo mismo) y animarme siempre que lo he necesitado. Ahora comenzaremos una nueva etapa en nuestra vida y podemos ser tan felices o más de lo que lo hemos sido hasta ahora. Nunca olvides que te quiero.

<u>1.- INTRODUCCIÓN</u>	3
<u>1.1.- FACTORES AMBIENTALES Y MODULADORES GLOBALES DE LA EXPRESIÓN GÉNICA</u>	3
1.1.1.- REGULACIÓN EN RESPUESTA A ESTÍMULOS AMBIENTALES DE FACTORES DE VIRULENCIA	4
1.1.2.- REGULACIÓN GÉNICA A NIVEL TRANSCRIPCIONAL	5
1.1.2.1.- ARN polimerasa	5
1.1.2.2.- Factores de transcripción	7
1.1.2.3.- Superenrollamiento del ADN: proteínas asociadas al nucleoide.....	9
<u>1.2.- LA FAMILIA DE PROTEÍNAS H-NS</u>	13
1.2.1.- LA PROTEÍNA H-NS.....	13
1.2.1.1.- Características generales.....	13
1.2.1.2.- Dominios estructurales de la proteína H-NS	15
1.2.1.2.1.- Dominio N-terminal: dominio de oligomerización	16
1.2.1.2.2.- Dominio C-terminal: dominio de unión al ADN	19
1.2.1.3.- Modulación de la expresión génica por H-NS.....	21
1.2.2.- LA PROTEÍNA StpA: PARÁLOGA DE H-NS	25
1.2.3.- H-NS: INTERACCIÓN CON OTRAS PROTEÍNAS	27
<u>1.3.- LA FAMILIA DE PROTEÍNAS HHA/YMOA</u>	28
1.3.1.- LA PROTEÍNA HHA	28
1.3.1.1.- Características generales.....	28
1.3.1.2.- Regulación de la toxina α -hemolisina por parte de la proteína Hha	30
1.3.2.- INTERACCIÓN DE LA PROTEÍNA HHA CON LA PROTEÍNA H-NS PARA MODULAR LA EXPRESIÓN GÉNICA	32
1.3.3. LA PROTEÍNA YmoA.....	36
1.3.3.1.- Regulación de la virulencia en <i>Y. enterocolitica</i>	36
1.3.3.2.- Características generales de la proteína YmoA.....	39
1.3.4.- OTRAS PROTEÍNAS DE LA FAMILIA HHA/YMOA.....	40
<u>1.4.- OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO</u>	42

<u>2.- MATERIAL Y MÉTODOS</u>	45
<u>2.1.- MICROORGANISMOS UTILIZADOS</u>	45
<u>2.2.- MEDIOS DE CULTIVO Y ANTIBIÓTICOS</u>	48
2.2.1.- MEDIOS DE CULTIVO.....	48
2.2.2.- ANTIBIÓTICOS	52
<u>2.3.- MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS</u>	53
2.3.1.- ESTERILIZACIÓN	53
2.3.2.- MANTENIMIENTO DE MICROORGANISMOS.....	53
2.3.3.- INOCULACIÓN Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS	54
<u>2.4.- SISTEMAS DE TRANSFERENCIA DEL MATERIAL GENÉTICO</u>	54
2.4.1.- TRANSFORMACIÓN BACTERIANA.....	54
2.4.1.1.- Transformación bacteriana de células competentes obtenidas por tratamiento con CaCl ₂	54
2.4.1.2.- Transformación por electroporación.....	55
2.4.1.2.1.- <i>Electroporación de Escherichia coli</i>	55
2.4.1.2.2.- <i>Electroporación de Y. enterocolitica</i>	56
2.4.2.- CONJUGACIÓN	57
2.4.2.1.- Conjugación en medio sólido	57
2.4.2.2.- Conjugación en medio líquido.....	57
2.4.3.- TRANSDUCCIÓN CON EL BACTERIOFAGO P1 <i>vir</i>	58
2.4.3.1.- Obtención de lisados de P1 <i>vir</i>	58
2.4.3.2.- Titulación de lisados de P1 <i>vir</i>	58
2.4.3.3.- Transducción con P1 <i>vir</i>	59
2.4.4.- CURADO DE PLÁSMIDOS	59
<u>2.5.- MUTAGÉNESIS</u>	60
2.5.1.- MUTAGÉNESIS QUÍMICA CON DES	60
2.5.2.- MUTAGÉNESIS POR REEMPLAZAMIENTO ALÉLICO CON pKO3	61
2.5.3.- MUTAGÉNESIS POR INSERCIÓN CON pUTmini-Tn5	61
2.5.4.- MUTAGÉNESIS CON pUT <i>hns</i> -Sm	62

2.6.- ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DEL ADN	63
2.6.1.- AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO	63
2.6.1.1.- Aislamiento de ADN plasmídico por lisis alcalina.....	63
2.6.1.1.1.- <i>Desproteización del ADN por precipitación con cloruro de litio</i>	64
2.6.1.1.2.- <i>Desproteización del ADN por extracción con fenol</i>	64
2.6.1.1.3.- <i>Tratamiento del ADN con RNasa A</i>	65
2.6.1.2.- Aislamiento de ADN plasmídico a través de “kits” comerciales	65
2.6.2.- AISLAMIENTO DE ADN CROMOSÓMICO.....	66
2.6.3.- RESTRICCIÓN, LIGACIÓN Y MODIFICACIÓN DEL ADN	66
2.6.4.- AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	67
2.6.4.1.- Técnica del “mega-primer” PCR	68
2.6.5.- SECUENCIACIÓN	69
2.6.6.- RECOMBINACIÓN DE PROTEÍNAS INDEPENDIENTE DE SECUENCIA (SIPR).....	71
2.6.7.- ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.....	71
2.6.7.1.- Electroforesis en geles de agarosa	72
2.6.7.2.- Marcadores de tamaño molecular	72
2.6.7.3.- Tinción con bromuro de etidio	72
2.6.8.- AISLAMIENTO DE BANDAS DE ADN DE GELES DE AGAROSA: ELECTROELUCIÓN	73
2.6.9.- CUANTIFICACIÓN DEL ADN	73
2.6.10.- ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ADN-PROTEÍNA: ENSAYOS DE RETARDO EN GEL.....	74
2.7.- ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DEL ARN	75
2.7.1.- EXTRACCIÓN DE ARN CELULAR TOTAL	75
2.7.2.- CUANTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DEL ARN.....	75
2.7.3.- ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA Y TINCIÓN CON BROMURO DE ETIDIO.....	76

2.7.4.- ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL ARN POR RT-PCR.....	76
2.7.4.1.- Digestión con DNasa I.....	76
2.7.3.2.- RT-PCR.....	77
<u>2.8.- ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS</u>	78
2.8.1.- PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	78
2.8.1.1.- Inducción de la expresión de proteínas	78
2.8.1.2.- Obtención de extractos celulares.	79
2.8.1.3.- Purificación por Ni^{2+} -NTA agarosa	80
2.8.2.- VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD (Microensayo).....	80
2.8.3.- TÉCNICAS DE ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS	81
2.8.3.1.- Geles de poliacrilamida.....	81
2.8.3.1.1.- Geles de poliacrilamida en Tris-Glicina-SDS.....	81
2.8.3.1.2.- Geles de poliacrilamida en Tris-Tricina-SDS	83
2.8.3.2.- Marcadores de tamaño molecular	84
2.8.3.3.- Tinción de proteínas con Azul de Coomassie.....	85
2.8.4.- INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS TRANSFERIDAS A MEMBRANA (Western blot).....	85
2.8.4.1.- Electrotransferencia de proteínas a membrana	85
2.8.4.2.- Revelado de membranas por fosfatasa alcalina	86
2.8.5.- PREPARACIÓN DE PROTEÍNAS PARA EL MÉTODO DE DEGRADACIÓN DE EDMAN	87
2.8.5.1.- Transferencia de las proteínas a la membrana de PVDF	88
2.8.5.2.- Secuenciación N-terminal.....	89
2.8.6.- VALORACIONES ENZIMÁTICAS	89
2.8.6.1.- Valoración de la actividad hemolítica en la fracción externa.	89
2.8.6.2.- Determinación de la actividad CAT (Cloranfénicol acetil transferasa).....	90
2.8.6.2.1.- Preparación del extracto celular.....	90
2.8.6.2.2.- Ensayo de la actividad CAT	91
2.8.6.2.3.- Cálculo de la actividad CAT	92
2.8.6.3.- Determinación de la actividad β -galactosidasa.....	93

<u>3.- RESULTADOS</u>	97
<u>3.1.- OBTENCIÓN DE MUTANTES DE LA PROTEÍNA Hha</u>	97
3.1.1.- OBTENCIÓN DE MUTACIONES PUNTUALES EN LA PROTEÍNA Hha	97
3.1.2.- OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS TRUNCADAS DE Hha	99
3.1.3.- CAPACIDAD DE LAS DIFERENTES PROTEÍNAS MODIFICADAS DE Hha DE INTERACCIONAR CON H-NS.....	100
3.1.4.- OBTENCIÓN DE MUTACIONES SUPRESORAS INTERGÉNICAS	106
<u>3.2.- OBTENCIÓN DE UNA PROTEÍNA HÍBRIDA ENTRE HHA Y H-NS</u>	108
3.2.1.- OBTENCIÓN DE UNA PROTEÍNA HÍBRIDA A TRAVÉS DE LA TÉCNICA DE LA “MEGAPRIMER” PCR.....	108
3.2.1.1.- Construcción de la proteína híbrida (de forma dirigida)	108
3.2.1.2.- Expresión de la proteína híbrida en mutantes <i>hns</i> y <i>hha</i> de <i>E. coli</i>	111
3.2.2.- OBTENCIÓN DE UNA PROTEÍNA HÍBRIDA Hha-HNS A TRAVÉS DE LA RECOMBINACIÓN DE PROTEÍNAS INDEPENDIENTE DE SECUENCIA (SIPR)	114
3.2.2.1.- Construcción del plásmido pUCHhaHnsHyb	114
3.2.2.2.- Recombinación de las proteínas Hha y H-NS independiente de secuencia (SIPR).....	117
3.2.2.3.- Secuenciación de los fragmentos de ADN potencialmente codificadores de las proteínas híbridas	120
3.2.2.4.- Clonaje del gen de la proteína híbrida en el plásmido pLG388-30	123
3.2.3.- ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS PROTEÍNAS HÍBRIDAS	124
3.2.3.1.- Complementación del fenotipo β -glucósido.....	124
3.2.3.2.- Complementación del fenotipo hemolítico.....	128
3.2.3.3.- Complementación del fenotipo de un mutante <i>hns</i> en medio mínimo con serina	131
3.2.3.4.- Unión de la proteína híbrida al ADN.....	132
3.2.3.4.1.- Sobreexpresión de la proteína híbrida	133
3.2.3.4.2.- Retardo en geles de agarosa	135
3.2.3.5.- Efecto de la proteína HhaHnsHyb2 sobre la expresión del gen <i>stpA</i>	139

3.3.- IDENTIFICACIÓN DEL GEN H-NS DE <i>Yersinia enterocolitica</i> ...	142
3.3.1.- UNIÓN DE HisYmoA A H-NS DE <i>E. coli</i>	142
3.3.2.- UNIÓN DE HisYmoA A H-NS DE <i>Y. enterocolitica</i>	145
3.3.3.- CLONAJE DEL GEN <i>hns</i> DE <i>Y. enterocolitica</i>	148
3.3.4.- COMPLEMENTACIÓN DE LOS FENOTIPOS β -GLUCÓSIDO Y HEMOLÍTICO DE UN MUTANTE <i>hns</i> DE <i>E. coli</i> POR EL GEN <i>hns</i> DE <i>Y. enterocolitica</i>	153
3.4.- MUTAGÉNESIS EN EL GEN <i>hns</i> DE <i>Y. enterocolitica</i>.....	154
3.4.1.- MUTAGÉNESIS A TRAVÉS DEL PLÁSMIDO pKO3.....	154
3.4.2.- MUTAGÉNESIS A TRAVÉS DEL PLÁSMIDO pUThns-Sm.....	159
3.4.2.1.- Construcción del plásmido pUThns-Sm.....	159
3.4.2.2.- Mutagénesis con el plásmido pUThns-Sm.....	163
3.4.3.- INSERCIÓN EN UN PUNTO	164
3.4.4.- OBTENCIÓN DE CEPAS MUTANTES EN EL GEN <i>hns</i> DE <i>Y. enterocolitica</i> POR COMPLEMENTACIÓN EN <i>trans</i>	165
3.4.4.1.- Obtención de la mutación <i>hns</i> previa complementación con el plásmido salvaje R27	166
3.4.4.1.1.- Complementación con R27 y R27 <i>hns</i> : :Km.....	166
3.4.4.1.2.- Detección de H-NS de R27 en un mutante <i>hns</i> de <i>Y. enterocolitica</i>	168
3.4.4.2.- Utilización de diferentes plásmidos de expresión o replicación controlada para la complementación en <i>trans</i> de la mutación <i>hns</i> de <i>Y. enterocolitica</i>	170
3.4.4.3.- Obtención de la mutación <i>hns</i> a través del plásmido pJOB101	175
3.4.4.4.- Obtención del plásmido pJOB1acO4	177
3.4.4.5.- Obtención del plásmido pBR-stpA	180
3.4.5.- CRECIMIENTO DE LA CEPA W22703-18 DE <i>Y. enterocolitica</i> EN PRESENCIA DE LOS PLÁSMIDOS pJOB1acO4 Y Pbr-StpA	182
3.4.5.1.- Crecimiento en presencia del plásmido pJOB1acO4	182
3.4.5.2.- Obtención y crecimiento del mutante <i>hns</i> complementado con el plásmido pBR-StpA	183
3.4.6.- Efecto de la mutación <i>hns</i> en <i>E. coli</i> sobre el gen <i>virF</i> de <i>Y. enterocolitica</i>	184
3.4.7.- Efecto de la mutación <i>hns</i> en <i>Y. enterocolitica</i> sobre el gen <i>virF</i>	185

<u>4.- DISCUSIÓN</u>	189
<u>4.1.- DOMINIOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LA PROTEÍNA HHA</u>	189
<u>4.2.- LAS PROTEÍNAS DE LA FAMILIA Hha/YmoA SON FUNCIONALMENTE EQUIVALENTES AL EXTREMO AMINO TERMINAL DE LAS PROTEÍNAS DE LA FAMILIA H-NS</u>	191
<u>4.3.- INTERACCIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS YMOA Y H-NS DE <i>Y. enterocolitica</i></u>	196
<u>4.4.- LA PROTEÍNA H-NS DE <i>Y. enterocolitica</i>: UN MODULADOR GLOBAL EN ESTE MICROORGANISMO?</u>	198
<u>5.- CONCLUSIONES</u>	203
<u>6.- BIBLIOGRAFÍA</u>	207
<u>APÉNDICE I</u>	I
<u>ARTÍCULOS</u>	