

3.- RESULTADOS

3.1.- OBTENCIÓN DE MUTANTES DE LA PROTEÍNA Hha

La proteína H-NS (Histone-like Nucleoid Structuring protein) de *Escherichia coli* es un regulador global del metabolismo bacteriano que participa en la organización y/o función del ADN cromosómico (Spassky *et al.*, 1984). Se ha comprobado la capacidad de esta proteína para interactuar con Hha y que el complejo Hha/H-NS es responsable de la modulación termoosmótica de la expresión del operón de la hemolisina de *E. coli* (Nieto *et al.*, 2000, revisado Madrid *et al.*, 2002b) (introducción 1.3.2.).

La parte inicial de este trabajo se enfocó a obtener más información sobre el funcionamiento de la proteína Hha, en concreto, se intentó aclarar su organización en dominios funcionales, es decir, establecer la región o regiones de esta proteína que pudieran estar implicadas en su interacción con H-NS, los posibles residuos aminoacídicos importantes para realizar dicha función y si existía algún otro dominio funcional en Hha además del responsable de la interacción con H-NS.

3.1.1.- OBTENCIÓN DE MUTACIONES PUNTUALES EN LA PROTEÍNA Hha

El primer paso para intentar obtener más información sobre la proteína Hha, fue la construcción de mutantes que presentaran sustituciones puntuales en diferentes residuos aminoacídicos. Para ello se realizó la mutagénesis química mediante dietilsulfato (DES, apartado 2.5.1.).

La mutagénesis química se realizó sobre la cepa de *E. coli* 5K (pANN202-312). El plásmido del que es portador la cepa permite la selección de los posibles mutantes en la proteína Hha en función del fenotipo hemolítico que presentan cuando se plaquean sobre placas de agar-sangre (mutantes superhemolíticos).

Se analizaron aproximadamente 40.000 colonias resultantes de la mutagénesis. De todas ellas se seleccionaron 45 clones que mostraban un incremento en los halos de hemólisis respecto al fenotipo característico de la cepa salvaje. No todos los clones seleccionados por su incremento en el halo de hemólisis eran necesariamente mutantes en el gen *hha*. Para acotar el número de mutantes superhemolíticos a aquellos que realmente fueran debidos a la mutación en este gen, se hizo una transducción con el bacteriófago P1vir (apartado 2.4.3.) conteniendo fragmentos de la cepa KL743 a los diferentes clones seleccionados. Esta cepa presenta, como particularidad, el gen que codifica la resistencia a

tetraciclina muy próximo al gen *hha*, lo que permite seleccionar aquellos mutantes que tras la transducción con el bacteriófago P1_{vir} presentan una frecuencia de asociación entre la adquisición de la resistencia a tetraciclina y la reversión hacia una producción baja de hemolisina, de aproximadamente un 50 %. Se detectaba la reversión (complementación del fenotipo *hha*) a través de los transductantes que tenían halos de hemólisis muy reducidos cuando se plaqueaban en placas de agar-sangre. De esta forma se obtuvieron seis posibles mutantes del gen *hha* denominados respectivamente 5K H11, H18, H21, H29, H39 y H42.

El resto de mutantes se descartaron por diferentes razones: en algunos casos no era posible estabilizar el fenotipo superhemolítico, en otros no se obtenían unos resultados claros después de realizar la transducción y otros no presentaban reversión asociada a la transducción de la resistencia a tetraciclina.

A continuación se procedió a la secuenciación (apartado 2.6.5.) de los seis clones seleccionados para comprobar que realmente eran mutantes en el gen *hha*. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos Hha2000 y Hha2000R (Apéndice I), que se encuentran flanqueando la secuencia del gen a 5' y 3' respectivamente.

Una vez obtenidos los datos de la secuencia, se pudo ver que todos los clones analizados presentaban mutaciones puntuales en el gen *hha* que tenían como resultado la sustitución de un aminoácido por otro. En la tabla 3.1.1. se indican los cambios producidos en cada uno de ellos y que se sitúan a lo largo de toda la secuencia del gen: los mutantes 5K H11 y 5K H21 son equivalentes y los mutantes 5K H29 y 5K H39 presentan la mutación en el mismo codón pero con una sustitución distinta.

Tabla 3.1.1. Resumen de las mutaciones puntuales producidas en los 6 mutantes del gen *hha*.

Mutante	Posición del aminoácido	Codón en el gen <i>hha</i>	Codón en el gen mutante	Aminoácido en el gen <i>hha</i>	Aminoácido en el gen mutante
5K H11	50	CGC	CAC	R (Arginina)	H (Histidina)
5K H18	16	CGT	TGT	R (Arginina)	C (Cisteína)
5K H21	50	CGC	CAC	R (Arginina)	H (Histidina)
5K H29	64	CCT	TCT	P (Prolina)	S (Serina)
5K H39	64	CCT	CTT	P (Prolina)	L (Leucina)
5K H42	13	ATG	ATA	M (Metionina)	I (Isoleucina)

3.1.2.- OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS TRUNCADAS DE Hha

Adicionalmente a la obtención de diferentes cepas portadoras de mutaciones puntuales en el gen *hha*, para obtener más información sobre esta proteína, se decidió realizar la construcción de proteínas truncadas de Hha, es decir, proteínas a las que le falten determinadas regiones de la proteína salvaje. En concreto, se construyeron tres proteínas truncadas de Hha que se denominaron respectivamente HhaT1, HhaT2 y HhaT3. La construcción de estas proteínas truncadas se realizó utilizando varios oligonucleótidos que permitían la amplificación del fragmento de interés y además creaban en los extremos de estos fragmentos las dianas *NdeI* y *BamHI*, para permitir su posterior clonado en el vector pET3b (y facilitar su posterior sobreexpresión). La temperatura de hibridación utilizada fue de 50 °C.

En la figura 3.1.1. se indica la posición de los oligonucleótidos utilizados en la secuencia del gen *hha*. La secuencia de dichos oligonucleótidos y la diana presente en cada uno de ellos se muestran en la tabla del apéndice I.

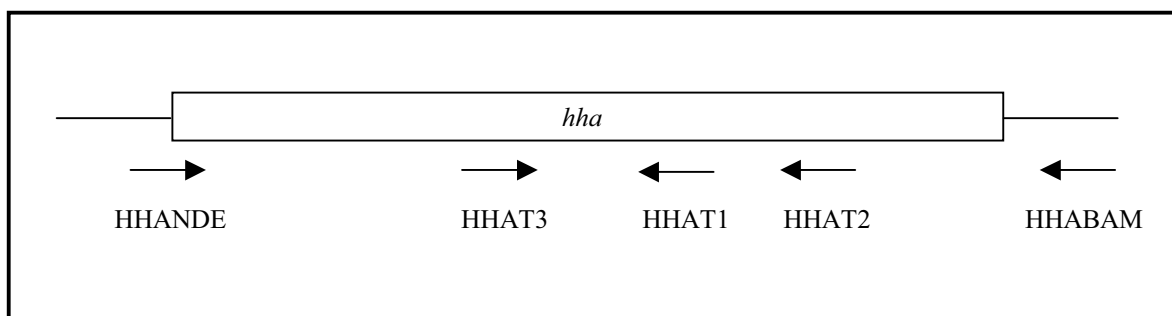


Figura 3.1.1. Situación en la secuencia del gen *hha* de los oligonucleótidos utilizados para obtener las proteínas truncadas HhaT1, HhaT2 y HhaT3.

En el caso de HhaT1, la proteína se construyó amplificando el gen *hha* por PCR con los oligonucleótidos HHANDE y HHAT1 (este último incluía un codón de finalización de la traducción) obteniendo una proteína Hha' a la que le faltan los últimos 28 aminoácidos, es decir, el extremo C-terminal de la proteína. El producto de PCR, de 148 pb, fue cortado con los enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* y clonado dentro del plásmido pET3b cortado con los mismos enzimas, dando lugar al plásmido pETHhaT1.

La proteína HhaT2 se obtuvo de una forma similar pero los oligonucleótidos utilizados en este caso fueron HHANDE y HHAT2. Este último, igual que HHAT1, incorpora un codón de finalización de la traducción. En este caso, la secuencia de la proteína obtenida era mayor, faltándole únicamente los últimos 14 aminoácidos y el plásmido obtenido después del clonaje en pET3b se denominó pETHhaT2.

A diferencia de las dos proteínas anteriores, a la proteína truncada HhaT3, le faltan los primeros 28 aminoácidos, es decir, el extremo N-terminal de Hha y fue utilizando en el proceso de amplificación por PCR los oligonucleótidos HHAT3 y HHABAM. El plásmido obtenido fue denominado pETHhaT3.

En la figura 3.1.2. se indica la secuencia de estas tres proteínas truncadas en comparación con la proteína Hha salvaje.

Hha	MSEKPLTKTDYLMRLRRCQTIDTLERVIEKNKYELSDNELAVFYSAADHRLAELTMNKLYDKIPSSVWFIR
HhaT1	MSEKPLTKTDYLMRLRRCQTIDTLERVIEKNKYELSDNELAVF.....
HhaT2	MSEKPLTKTDYLMRLRRCQTIDTLERVIEKNKYELSDNELAVFYSAADHRLAELTMN.....
HhaT3MEKNKYELSDNELAVFYSAADHRLAELTMNKLYDKIPSSVWFIR

Figura 3.1.2. Secuencia de las tres proteínas truncadas de Hha comparadas con la secuencia de la proteína Hha salvaje.

3.1.3.- ANÁLISIS DE LAS DIFERENTES PROTEÍNAS MODIFICADAS DE Hha DE INTERACCIONAR CON H-NS

Una vez se habían obtenido las diferentes versiones modificadas de la proteína Hha de *E. coli*, tanto las proteínas con mutaciones puntuales como las truncadas, se procedió a estudiar si las mismas conservaban una de las principales características de la proteína salvaje, la capacidad para unirse a la proteína H-NS.

Se comenzó realizando las construcciones necesarias para sobreproducir las proteínas modificadas. En el caso de las proteínas con mutaciones puntuales se comenzó amplificando los genes mutados. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos HHANDE y HHABAM (Apéndice I) que flanquean la secuencia de *hha* (Figura 3.1.1.) y que además introducen las dianas *NdeI* y *BamHI* en los extremos. Los diferentes fragmentos fueron cortados con los enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* y clonados dentro del plásmido pET3b cortado con los mismos enzimas de restricción.

A continuación se colocó una cola de 6 histidinas justo antes del inicio de traducción de todos los mutantes obtenidos de la proteína Hha (tanto de las proteínas truncadas como de las proteínas con mutaciones puntuales) con la finalidad de facilitar la purificación de las proteínas mediante cromatografía de afinidad a níquel. Los oligonucleótidos utilizados para obtener una secuencia del gen *hha* con la cola de histidinas en el extremo N-terminal fueron HISC, HISCR (Figura 3.1.3.).

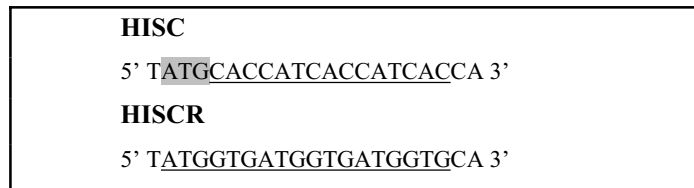


Figura 3.1.3. Oligonucleótidos utilizados para la introducción de la cola de histidinas en el extremo 5'. Subrayados se muestran los 6 codones que codifican para las histidinas (CAC y CAT, que se corresponden con GTG y ATG en la cadena inversa). En gris se indica el inicio de traducción.

Se formó un oligonucleótido de doble cadena a partir de una mezcla equimolar en agua bidestilada de HISC y HISCR a 70 °C y se dejó enfriar lentamente. A continuación se realizó la ligación de este oligonucleótido de doble cadena junto con los plásmidos que contienen los genes mutagenizados de Hha linealizados previamente por la diana *NdeI*. Los plásmidos obtenidos se denominaron pETHisH11, pETHisH18, pETHisH29, pETHisH39, pETHisH42, pETHisHhaT1, pETHisHhaT2 y pETHisHhaT3.

A continuación (Figura 3.1.4.) se muestra de forma simplificada la región de incorporación del oligonucleótido en las construcciones:

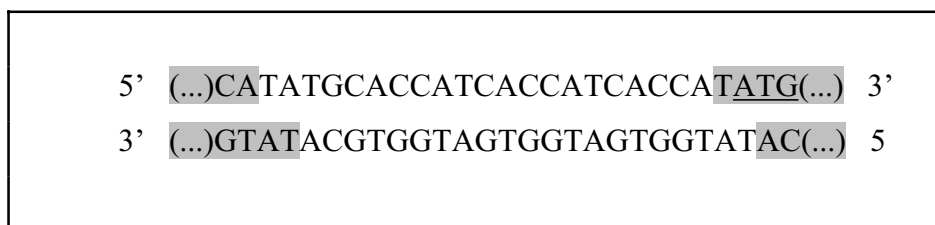


Figura 3.1.4. Secuencia simplificada de las construcciones. En gris se muestra parte de la secuencia de los plásmidos linealizados con *NdeI*, en blanco los oligonucleótidos: HISC en la parte superior y HISCR en la inferior. Subrayado se encuentra el codón de inicio del gen *hha*.

Para comprobar que realmente se había incorporado la cola de histidinas en todas estas construcciones, se realizaron reacciones de amplificación específicas. En el caso de las proteínas de Hha con mutaciones puntuales y de la proteína truncada HisHhaT3 se utilizaron los oligonucleótidos ya mencionados HISC y HHABAM. En el caso de las proteínas HisHhaT1 y HisHhaT2 además de HISC, el otro oligonucleótido utilizado fue HHAT1 y HHAT2 respectivamente.

Una vez obtenidas las construcciones con la cola de histidinas, se realizó una reacción de secuenciación con el oligonucleótido pET-Bam (Apéndice I) para comprobar que no se había introducido ningún error.

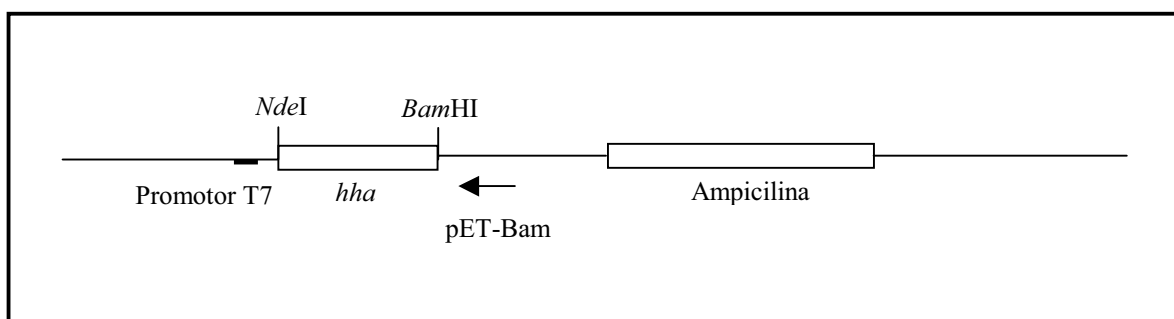


Figura 3.1.5. Situación del oligonucleótido pET-Bam dentro de las diferentes construcciones mutantes de *hha* que se muestran linealizadas. En la figura, aparte del oligonucleótido pET-Bam y del gen *hha*, también se indican por una parte el promotor de T7 típico de los vectores de la línea pET y el gen de resistencia a ampicilina.

En el análisis de la capacidad de las proteínas mutantes de Hha para unirse a la proteína H-NS, también se realizaron una serie de controles. Se utilizaron las proteínas HisHha, HisYmoA y Hha-C-His. Esta última proteína es equivalente a la proteína Hha pero con la cola de histidinas situada en el extremo C-terminal de la misma. Hha-C-His se obtuvo a través de los oligonucleótidos HHANDE y HHACHis (Figura 3.1.6.). HHACHis es un oligonucleótido de unas 40 bases, que permite la amplificación del gen *hha* incorporando directamente la cola de histidinas y la diana de restricción *Bam*HI adecuada para el clonaje del gen dentro del vector pET3b. La temperatura de hibridación utilizada en las amplificaciones con HHACHis fue de 45 °C y el tiempo de hibridación de 1 minuto.

HHACHis

5' CGGGATCC TATTAATGGTGATGGTGATGGTGGCGAATAAATTCC 3'

Figura 3.1.6. Oligonucleótido utilizado para la construcción de la proteína Hha-C-His. En gris se resalta la diana de restricción *Bam*HI y subrayados se encuentran los codones que, invertidos y complementados, codifican para la cola de histidinas.

Una vez comprobadas todas las construcciones, se procedió a la sobreexpresión de las diferentes proteínas, su purificación por afinidad a níquel (apartado 2.8.1.1.) y al análisis de las proteínas que pudieran copurificar con ellas (apartados 2.8.1.2 y 2.8.1.3.). Se partió del modelo de interacción entre las proteínas H-NS e HisHha (Nieto *et al.*, 2000).

Cada uno de los plásmidos conteniendo las proteínas alteradas recombinantes y los controles fueron transformados en la cepa BL21 DE3 (pLysE) de *E. coli*. Los transformantes (cada uno por separado) fueron recogidos e inoculados en 1L de LB. La sobreexpresión de los diferentes derivados de Hha fue inducida a través de IPTG y la purificación se realizó mediante el sistema de Ni²⁺-NTA-agarosa. Finalmente, se analizaron los extractos en geles de SDS-Tricina-PAGE (2.8.3.1.2.).

En la figura 3.1.7. (A) se muestran las diferentes proteínas derivadas de Hha y también las proteínas que copurifican con ellas. Como se puede ver, ninguna de las proteínas modificadas era capaz de retener la proteína H-NS, excepto la proteína HisH42. Tampoco la proteína Hha-C-His era capaz de retenerla aunque en la figura se observa una banda, pero esta banda se corresponde con el dímero de Hha que tiene un tamaño similar al de H-NS y se comprueba a través de la inmunodetección de H-NS con anticuerpos específicos (Figura 3.1.7. (B)). En cambio H-NS si copurificaba con las proteínas HisHha y HisYmoA.

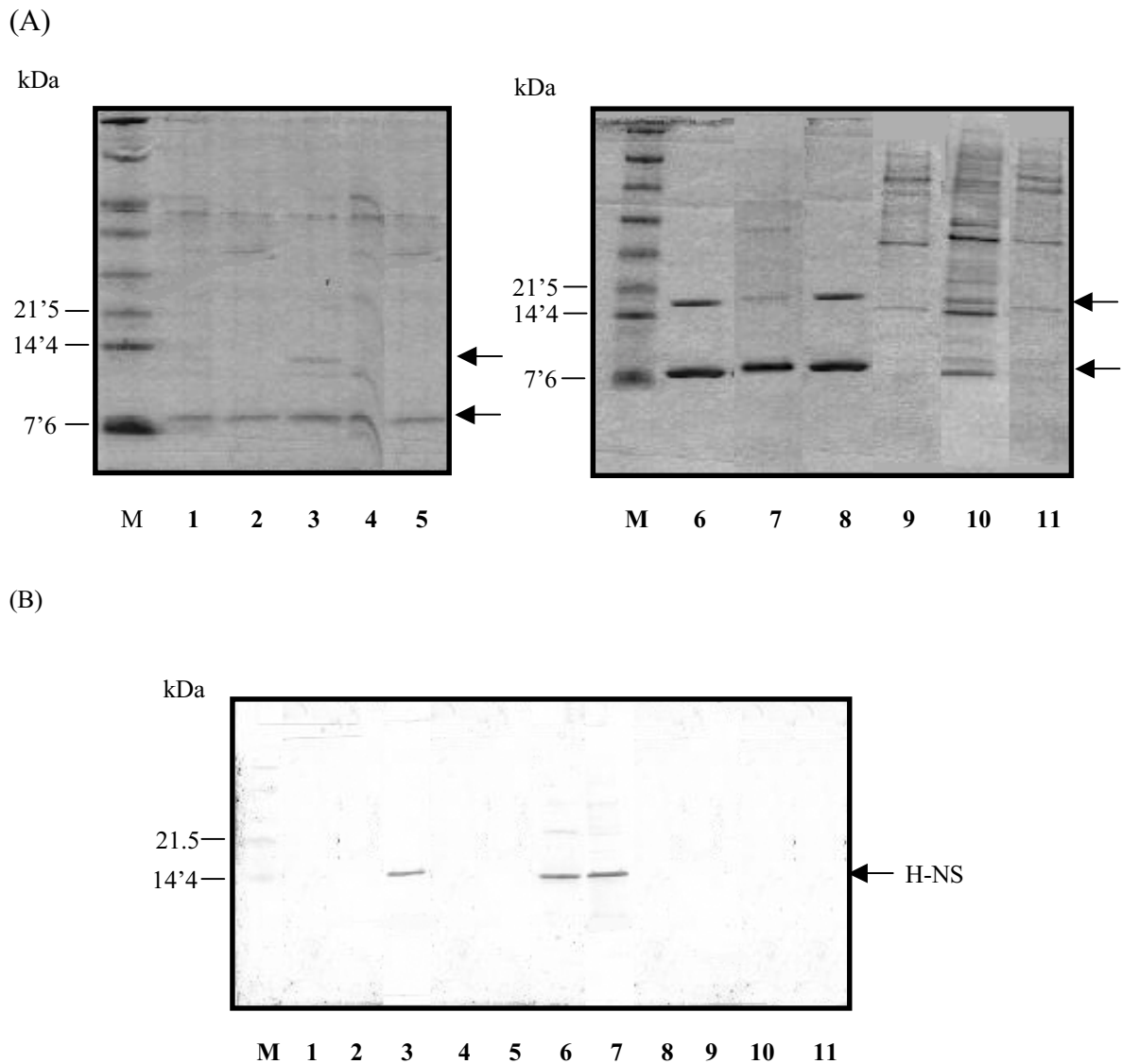


Figura 3.1.7. Interacción de las diferentes proteínas mutantes de Hha con la proteína H-NS de *E. coli*

- (A) Análisis electroforético en un gel SDS-Tricina-PAGE teñido con Azul de Coomassie. M, Marcador de bajo peso molecular (Pre-stained, SDS Standard, Broad Range, Bio-Rad). Carril 1, HisHha11. Carril 2, HisHha29. Carril 3, HisHha42. Carril 4, HisHha18. Carril 5, HisHha39. Carril 6, HisYmoA. Carril 7, HisHha. Carril 8, Hha-C-His. Carril 9, HisHhaT1. Carril 10, HisHhaT2. Carril 11, HisHhaT3. Las flechas a la altura de la banda del marcador de 14'4 kDa, indican la proteína H-NS y las flechas a la altura de la banda del marcador de 7'6 kDa señala las proteínas alteradas de Hha.
- (B) Inmunodetección con anticuerpos específicos para la proteína H-NS de las fracciones del panel A. M, Marcador de bajo peso molecular (Pre-stained, SDS Standard, Broad Range, Bio-Rad).

Todos estos datos indicarían que prácticamente la totalidad de la secuencia de la proteína Hha está implicada en la unión a H-NS y, en especial, el extremo C-terminal, ya que la simple adición de la cola de histidinas en ese extremo afecta a su capacidad para unir H-NS. Sin embargo, HisYmoA, que comparada con Hha carece de los primeros cinco aminoácidos en el extremo N-terminal, si que es capaz de retener dicha proteína. En la figura 3.1.8. se muestra la secuencia aminoacídica de todas estas proteínas y se indica si son capaces de retener o no a la proteína H-NS.

		Unión H-NS
HisHha11	MHHHHHMSEKPLTKTDYLMRLRRCQTIDTLERVIKKNKYELSDNELAVFYSAADHRLAELTMNKLYDKIPSSVWKFIR-----	-
HisHhaT1	MHHHHHMSEKPLTKTDYLMRLRRCQTIDTLERVIKKNKYELSDNELAVF-----	-
HisHha39	MHHHHHMSEKPLTKTDYLMRLRRCQTIDTLERVIKKNKYELSDNELAVFYSAADHRLAELTMNKLYDKIPSSVWKFIR-----	-
HisHha29	MHHHHHMSEKPLTKTDYLMRLRRCQTIDTLERVIKKNKYELSDNELAVFYSAADHRLAELTMNKLYDKIPSSVWKFIR-----	-
HisHhaT2	MHHHHHMSEKPLTKTDYLMRLRRCQTIDTLERVIKKNKYELSDNELAVFYSAADHRLAELTMN-----	-
HisHha18	MHHHHHMSEKPLTKTDYLMRLRRCQTIDTLERVIKKNKYELSDNELAVFYSAADHRLAELTMNKLYDKIPSSVWKFIR-----	-
Hha-C-His	-----MSEKPLTKTDYLMRLRRCQTIDTLERVIKKNKYELSDNELAVFYSAADHRLAELTMNKLYDKIPSSVWKFIRHHHHHH	-
HisHha42	MHHHHHMSEKPLTKTDYLMRLRRCQTIDTLERVIKKNKYELSDNELAVFYSAADHRLAELTMNKLYDKIPSSVWKFIR-----	+
HisHha	MHHHHHMSEKPLTKTDYLMRLRRCQTIDTLERVIKKNKYELSDNELAVFYSAADHRLAELTMNKLYDKIPSSVWKFIR-----	+
HisYmoA	-----MHHHHHMSEKPLTKTDYLMRLRRCQTIDTLERVIKKNKYELSDNELAVFYSAADHRLAELTMNKLYDKIPPTVWQHVK-----	+
HisHhaT3	-----MHHHHHMSEKPLTKTDYLMRLRRCQTIDTLERVIKKNKYELSDNELAVFYSAADHRLAELTMNKLYDKIPSSVWKFIR-----	-

Figura 3.1.8. Mutaciones puntuales de *hha* y secuencias de las proteínas truncadas. También se muestran las colas de histidinas de las diferentes construcciones. Finalmente, se indica la capacidad de cada una de las proteínas para retener H-NS.

En paralelo a estos trabajos, J. M^a Nieto realizó un análisis comparativo entre la familia de proteínas Hha/YmoA y el dominio de oligomerización de proteínas de la familia H-NS, que se corresponde con los primeros 65 aminoácidos aproximadamente (Smyth *et al.*, 2000). En la figura 3.1.9. se observa que diferentes dominios aparecen conservados a lo largo de la secuencia en ambas familias.

Si bien al comparar el nivel de similitud de las secuencias de aminoácidos entre las diferentes proteínas el mismo no sería muy elevado, la existencia de dominios conservados sugiere que proteínas de la familia Hha puedan ser funcionalmente equivalentes al dominio N-terminal de proteínas de la familia H-NS.

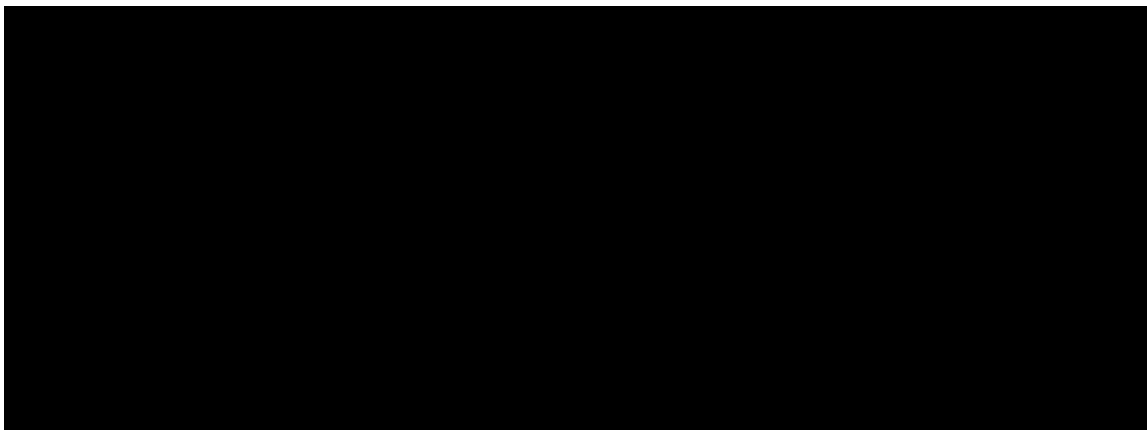


Figura 3.1.9. Comparación de algunos miembros de la familia Hha/YmoA de proteínas y el dominio de oligomerización (primeros 70 aminoácidos en cada caso) de algunos miembros de la familia de proteínas H-NS. Los números de acceso de las proteínas son los siguientes. Hha_Eco (*E. coli*, P23870); Hha_Sty (*S. enterica* serotipo Typhimurium), AF242359; YmoA_Yen (*Y. enterocolitica*, P27720); Hha_pO157 (plásmido pO157), Q9ZGV7; Hmo_pWR (plásmido pWR501), Q9AFJ8; RmoA_R100 (plásmido R100), O32581; YdfA_R721 (plásmido R721), 9971679; Hha_R27 (plásmido R27), Q9L5G3; Ydgt_Eco (*E. coli*), P76179; Orf5_R446b (plásmido R446b), 312264.NHNS_Eco (*E. coli*; P08936); NHNS_Sfl (*Shigella flexneri*; P09120); NHNS_Sma (*Serratia marcescens*; P18955); NHNS_Yen (*Y. enterocolitica*; Q99QH3); NHNS_Ype (*Y. pestis* obtenida del servidor www.genome.wisc.edu); NHNS_Pvu (*Proteus vulgaris*; P18818); NHNS_Hin (*Haemophilus influenzae*; P43841); NOrf4_R446b (plásmido R446b; 312263) (Figura obtenida por J. M^a Nieto).

3.1.4.- OBTENCIÓN DE MUTACIONES SUPRESORAS INTERGÉNICAS

En el apartado anterior se ha visto como prácticamente todas las mutaciones que se producen en la proteína Hha y que causan un fenotipo superhemolítico, afectan a su capacidad para unirse a la proteína H-NS. Para ver qué aminoácidos de la proteína H-NS están implicados en la unión con Hha, se intentaron obtener mutantes supresores intergénicos del fenotipo superhemolítico, en los cuales la mutación se hubiese producido en H-NS. Estos mutantes se intentaron obtener a partir de uno de los mutantes puntuales en Hha, concretamente del mutante 5K H29 obtenido en el apartado 3.1.1.

En primer lugar se realizó la mutagénesis química con DES (apartado 2.5.1.) del mutante puntual en Hha H29 portador del plásmido pANN202-312. Se analizaron aproximadamente 20.000 colonias resultantes de la mutagénesis química y se seleccionaron aquellas que, en placas de agar-sangre, presentaban un halo de hemólisis

reducido, es decir, se seleccionaban aquellas colonias que hubiesen compensado el fenotipo superhemolítico. De esta forma se obtuvieron 29 clones no hemolíticos

Igual que en el caso de la obtención de mutantes en *hha*, no todos estos clones seleccionados eran necesariamente mutantes en el gen *hns*. Para identificar estos posibles mutantes, se realizó una transducción con el bacteriófago P1*vir* (apartado 2.4.3.) obtenido sobre la cepa BSN26. Esta cepa presenta la resistencia a tetraciclina muy próxima al gen *hns*, lo que permite realizar la transducción con el bacteriófago P1*vir* y seleccionar aquellos transductantes que presenten una frecuencia elevada de cotransducción de la resistencia a tetraciclina y la reversión hacia un fenotipo superhemolítico, como el de la cepa 5K H29 pANN202-312 (sobre la que se hizo la mutagénesis). Se obtuvieron 10 clones que presentaban esta asociación y que se denominaron 5K R2, R6, R9, R10, R11, R16, R20, R21, R27 y R29.

Como comprobación adicional, se realizó la amplificación del gen *hns* en estas cepas a través de los oligonucleótidos OSMZI y OSMZII (Apéndice I). Estos oligonucleótidos se encuentran flanqueando la secuencia de *hns* a 5' y 3' respectivamente. La temperatura de hibridación fue de 50 °C y el tiempo de 1 minuto.

Las bandas amplificadas por PCR del gen *hns* (de 489 pb), fueron purificadas y utilizadas como molde para poder realizar la reacción de secuenciación y comprobar que realmente los clones seleccionados eran mutantes en el gen *hns*. Los oligonucleótidos utilizados fueron nuevamente OSMZI y OSMZII.

El resultado de la secuenciación fue que ninguno de los clones seleccionados presentaban una mutación en el gen *hns*, es decir, la complementación en el fenotipo superhemolítico observada en estos clones, se habría producido a través de alguna mutación en una localización diferente.

3.2.- OBTENCIÓN DE UNA PROTEÍNA HÍBRIDA ENTRE HHA Y H-NS

La interacción previamente caracterizada entre las proteínas Hha y H-NS, juntamente con los resultados que se refieren en el apartado anterior, especialmente por lo que hace referencia a la figura 3.1.9., hicieron plantear la hipótesis de que la proteína Hha podría ser considerada como un homólogo del dominio de oligomerización de H-NS. Por ello, para aportar evidencias experimentales que refuercen ésta hipótesis, se planteó la construcción en *E. coli* de una proteína híbrida entre la proteína Hha y el dominio de unión al ADN de H-NS y determinar si esta proteína híbrida es capaz de complementar alguno de los fenotipos típicos de un mutante *hns*.

Se abordó el problema de una forma dirigida en primer lugar y de una forma aleatoria después.

3.2.1.- OBTENCIÓN DE UNA PROTEÍNA HÍBRIDA A TRAVÉS DE LA TÉCNICA DE LA “MEGAPRIMER” PCR.

3.2.1.1.- Construcción de la proteína híbrida (de forma dirigida)

La primera aproximación para intentar construir una proteína híbrida entre la proteína Hha y el dominio de unión al ADN de H-NS fue la utilización de la técnica de la “Megaprimer” PCR (Sarkar y Sommer, 1990; apartado 2.6.4.1. de material y métodos).

Esta técnica permite obtener una proteína híbrida de una forma dirigida. Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados a partir de: a) la secuencia del gen *hha* homóloga al dominio de oligomerización de *hns* y b) de la secuencia del dominio de unión al ADN del gen *hns*. Los oligonucleótidos que han de definir la zona de unión entre ambas proteínas, presentan fragmentos de ambos genes en su secuencia.

En la figura 3.2.1. se muestra el esquema de la técnica aplicada a nuestro caso concreto.

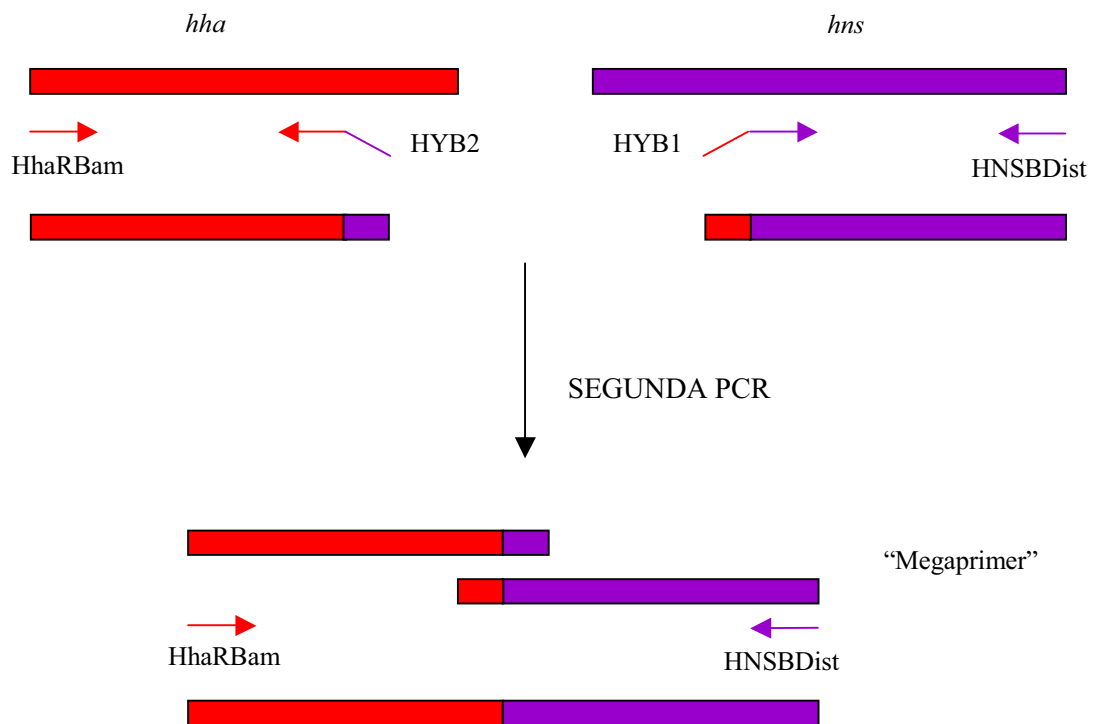


Figura 3.2.1. Esquema de la construcción de la proteína híbrida entre el gen *hha* y el dominio de unión al ADN del gen *hns*. Las secuencias de los oligonucleótidos HYB2 y HYB1 son homólogas y permiten la hibridación entre los fragmentos obtenidos en la primera PCR para que formen el "megaprimer" necesario para la segunda PCR.

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen *hha* completo (215 pb) fueron HhaRBam y HYB2 (Apéndice I). Para el dominio de unión al ADN de *hns* (las últimas 197 pb del gen), los oligonucleótidos HNSBDist y HYB1 (Apéndice I) fueron los empleados. La temperatura de hibridación utilizada fue de 48 °C. La figura 3.2.2. muestra la situación de dichos oligonucleótidos.

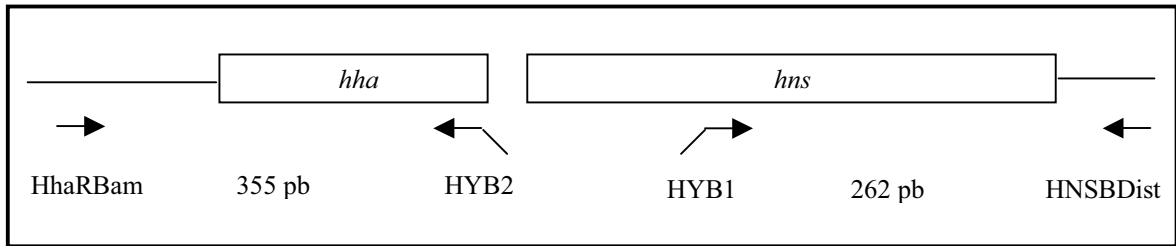


Figura 3.2.2. Situación de los oligonucleótidos utilizados para realizar la técnica de la “megaprimer”. También se indica la longitud de los fragmentos amplificados.

En la siguiente figura se muestra la homología entre los oligonucleótidos HYB2 y HYB1 y, por tanto, entre los dos fragmentos amplificados en la primera PCR. Esta homología permitirá la hibridación entre los dos fragmentos que servirá de molde para la segunda PCR.

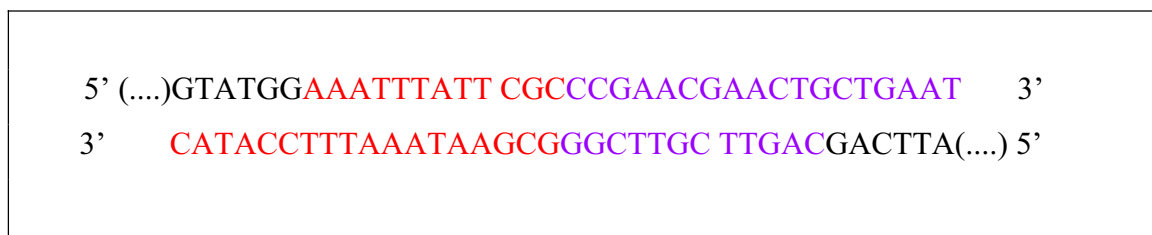


Figura 3.2.3. Zona de hibridación entre los fragmentos obtenidos en la primera PCR de la técnica del “Megaprimer” para la obtención de la proteína híbrida. En la línea superior se muestra la parte correspondiente al fragmento amplificado con HYB1. En la línea inferior se muestra la parte correspondiente al fragmento amplificado con HYB2. En rojo se indica la secuencia de los oligonucleótidos que pertenece al gen *hha* y en lila la secuencia de los oligonucleótidos que pertenece al gen *hns*. En gris se señala la secuencia de los fragmentos amplificados que no pertenece a los oligonucleótidos.

Los fragmentos obtenidos fueron utilizados como “megaprimer” para la segunda PCR. Después de 15 ciclos a 64 °C para permitir la hibridación de los dos fragmentos, se añadieron los oligonucleótidos HhaRBam y HNSBDist y se utilizó una temperatura de hibridación de 54 °C y un tiempo de 1 minuto. La longitud total del fragmento obtenido fue de 617 pb.

El fragmento de PCR fue purificado y cortado con el enzima de restricción *Bam*HI (las dianas fueron creadas con los oligonucleótidos HhaRBam y HNSBDist). A

continuación, el fragmento fue clonado dentro del plásmido pBR322 cortado con el mismo enzima de restricción y transformado a la cepa 5K de *E. coli*. Se seleccionaron aquellos transformantes que fueran resistentes a ampicilina y sensibles a tetraciclina. La diana *Bam*HI se encuentra dentro de la resistencia a tetraciclina y si el plásmido incorpora el inserto la resistencia se pierde. Finalmente, se comprobó mediante una restricción *Bam*HI que realmente se había incorporado el inserto y el plásmido obtenido se denominó pBR-Hib.

La proteína híbrida construida, presenta por una parte el gen *hha* completo, es decir, los 72 aminoácidos (215 pb) y, por otra, los últimos 65 aminoácidos, del 72 al 137 (las últimas 197 pb), del gen *hns*. La secuencia de la proteína híbrida resultante se muestra en la figura 3.2.4.

3.2.1.2.- Expresión de la proteína híbrida en mutantes *hns* y *hha* de *E. coli*

Una vez obtenida la proteína híbrida mediante la técnica de la “megaprimer” PCR, se procedió a analizar si esta proteína era capaz de complementar alguno de los fenotipos de un mutante *hns*, *hha* y *hns-hha* de *E. coli*.

En primer lugar el plásmido pBR-Hib fue transformado a las cepas BSN26 (*hns*⁺, *hha*⁺), BSN27 (*hns*⁻, *hha*⁺), BSN26H (*hns*⁺, *hha*⁻) y BSN27H (*hns*⁻, *hha*⁻) para analizar el fenotipo β -glucósido. También se transformó el plásmido a las mismas cepas portadoras del plásmido pANN202-312 que nos permiten analizar el fenotipo hemolítico.

En el caso del fenotipo β -glucósido, se realizaron estrías de los transformantes en placas indicadoras. Cuando se analizó el color de estas estrías en las placas de β -glucósido, se pudo ver que en todas las cepas mutantes (BSN27, BSN26H y BSN27H) se mantenía el color amarillento típico de estas cepas, es decir, no se produjo una complementación del fenotipo.

En el caso del análisis del fenotipo hemolítico se realizaron estrías de los transformantes en placas de agar-sangre. Las cepas mutantes que fueron transformadas con el plásmido pBR322 sin inserto, ya eran capaces de complementar los halos de hemólisis típicos de estas cepas sin la presencia de la proteína híbrida, de esta forma, no se pudo analizar la capacidad de esta proteína para complementar el fenotipo hemolítico.

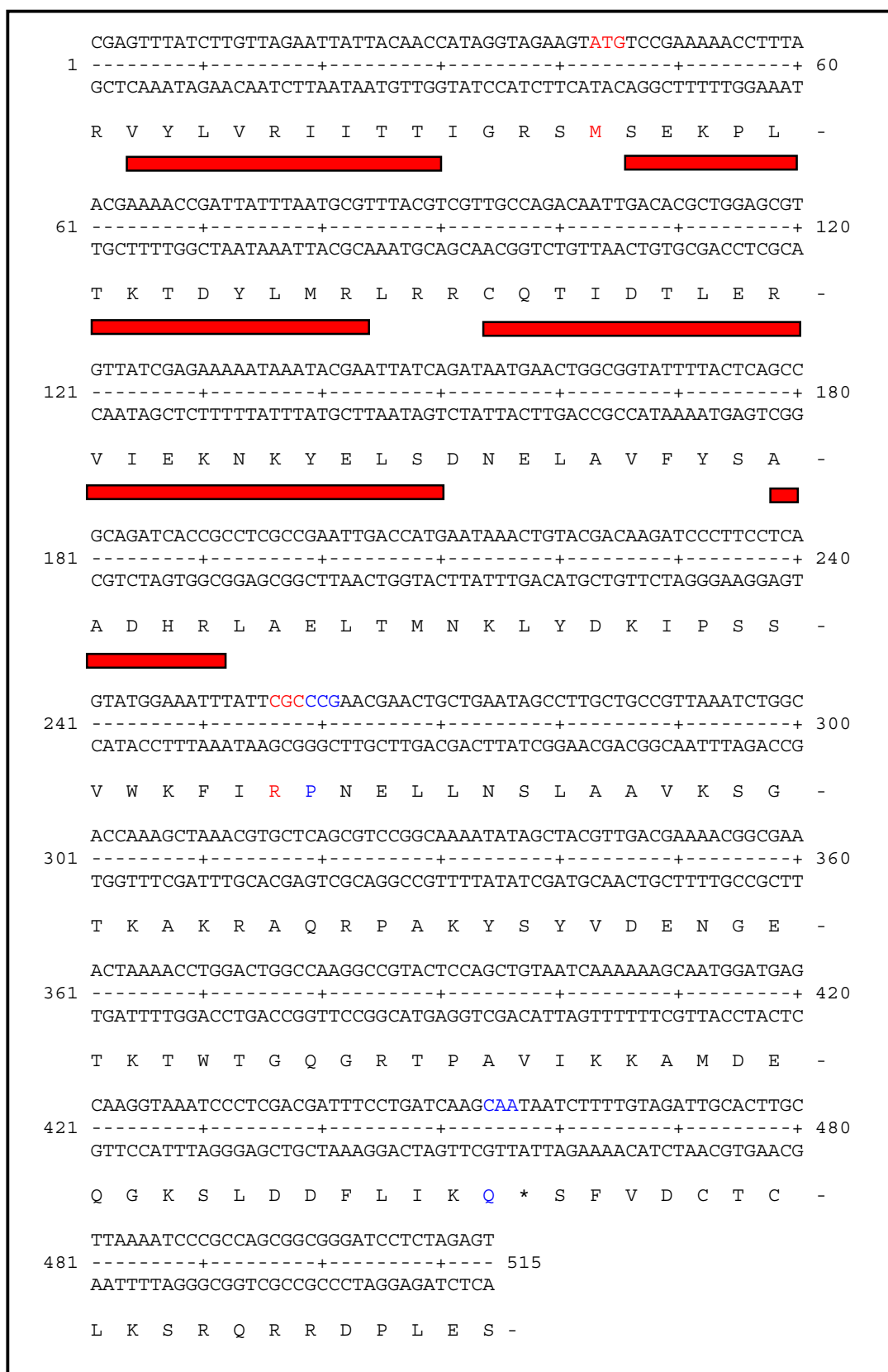


Figura 3.2.4. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos de la proteína híbrida obtenida a través de la técnica de la “megaprimer” PCR. En color rojo se señala el inicio y fin de la parte que corresponde a *hha* y en azul el inicio y fin de la parte que corresponde a *hms*. Los rectángulos rojos muestran las 4 hélices α presentes en la proteína Hha. El fragmento de la proteína H-NS se corresponde con su dominio de unión al ADN.

En el estudio de la proteína híbrida podía existir un problema con la expresión de la misma, es decir, que la complementación de los fenotipos mutantes no tuviera lugar porque no se expresara de forma suficiente. Para evitar este problema, se decidió clonar la proteína híbrida en un plásmido con expresión inducible a través de IPTG, el plásmido ptac85 (Marsh, 1986).

A partir del fragmento obtenido por el protocolo de la “megaprimer” PCR (617 pb) se amplificó la proteína híbrida a través de los oligonucleótidos HhaBamMet y HNSSalDist (Apéndice I). El primero permite clonar justo al inicio de Hha con una diana BamHI mientras que el segundo crea una diana SalI justo al final de H-NS. La temperatura de hibridación utilizada fue de 52 °C.

El fragmento de PCR obtenido, de 459 pb, fue cortado con los enzimas de restricción BamHI y SalI y clonado dentro del plásmido ptac85 cortado con los mismos enzimas. La ligación fue transformada a la cepa 5K de *E. coli*. Para analizar cuál de los clones obtenidos contenía el plásmido con el inserto, se realizaron varios aislamientos de ADN plasmídico y a continuación un análisis de restricción con los enzimas EcoRI y SalI. La diana EcoRI se encuentra fuera del “polilinker” del plásmido y esta restricción conjunta con SalI genera una banda de aproximadamente 850 pb en aquellos clones que presentaran el inserto. De esta forma se obtuvo un plásmido con la proteína híbrida que se denominó ptac-Hib.

Al igual que con el caso del plásmido pBR-Hib, para analizar la capacidad de la proteína híbrida de complementar los fenotipos de un mutante *hns* o *hha*, el plásmido ptac-Hib fue transformado a las cepas BSN26, BSN27, BSN26H y BSN27H y también a las mismas cepas portadoras del plásmido pANN202-312. Para tener un control, también se transformó el plásmido ptac85 a las mismas cepas.

Cuando se analizó el fenotipo hemolítico en las cepas portadoras de los plásmidos ptac-Hib y pANN202-312 no se observó una reducción de los halos de hemólisis en las diferentes cepas mutantes (BSN27, BSN26H y BSN27H) cuando se realizaban estrías en placas de agar-sangre suplementadas con 5 µM del inductor IPTG, es decir, no se producía una complementación de fenotipo hemolítico.

En el caso del fenotipo β-glucósido, las estrías en placas indicadoras suplementadas con 5 µM de IPTG no permitieron detectar con claridad si se estaba produciendo una complementación del fenotipo. Por esta razón, para poder realizar un ensayo más exacto en medio líquido, a las diferentes cepas portadoras del plásmido ptac-Hib se les introdujo el

plásmido pDFY436. Este plásmido es portador de una fusión entre el promotor del operón *bgl* y el gen de la β -galactosidasa y permite analizar la expresión del operón *bgl* a través de la medida de la actividad β -galactosidasa (apartado 2.8.6.3.). Igual que en todos los casos anteriores, tampoco pudo detectarse la complementación del fenotipo β -glucósido, ya que las actividades del ensayo en líquido de las cepas mutantes portadoras del plásmido ptac85 era igual a las cepas mutantes portadoras del plásmido ptac-Hib (resultados no referidos).

3.2.2.- OBTENCIÓN DE UNA PROTEÍNA HÍBRIDA Hha-HNS A TRAVÉS DE LA RECOMBINACIÓN DE PROTEÍNAS INDEPENDIENTE DE SECUENCIA (SIPR)

Debido a que la proteína híbrida entre Hha/H-NS obtenida de forma dirigida no fue capaz de complementar los fenotipos típicos de un mutante *hns*, se decidió obtener diferentes proteínas híbridas de una forma aleatoria, es decir, que tuvieran fragmentos del gen *hha* y *hns* de diferentes tamaños y obtenidos al azar.

3.2.2.1.- Construcción del plásmido pUCHhaHnsHyb

El primer paso fue la construcción de un plásmido que tuviera en primer lugar el gen *hha*, a continuación el gen *hns*, encontrándose ambos genes completos y clonados bajo el promotor del gen *hns*. Se consideró que la presencia de la región reguladora nativa del gen *hns* podía resultar importante para obtener éxito en el experimento (Figura 3.2.5; Pág. 116).

Se decidió utilizar como vector para hacer el clonaje el plásmido pUC19. Como esta construcción requería la realización de un clonaje en tres pasos, en primer lugar se clonó el gen *hha*, a continuación el gen *hns* y finalmente el promotor del gen *hns*.

De esta forma se realizó como primer paso la amplificación del gen *hha* a través de los oligonucleótidos HhaNde y HhaBam (Apéndice I). HhaNde permite clonar el gen *hha* desde su primer nucleótido, mientras que HhaBam se encuentra justo al final del gen. Se utilizó como molde el plásmido pETHha y una temperatura de hibridación de 55 °C.

A continuación, el fragmento del gen *hha* obtenido a través de PCR, de 237 pb, fue cortado con los enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* y clonado dentro del plásmido pUC19 cortado con los mismos enzimas de restricción. Del plásmido pUC19 se seleccionó

la banda de aproximadamente 2'3 kb (apartado 2.6.8.). La ligación fue transformada a la cepa 5K de *E. coli*. Para comprobar si el plásmido había incorporado el inserto, se aislaron los plásmidos y se cortaron con los enzimas *NdeI* y *BamHI* que liberan el inserto. El plásmido obtenido se denominó pUCHha. A continuación, el plásmido pUCHha fue cortado con el enzima de restricción *BamHI*. La diana *BamHI* se encuentra justo al final del gen *hha* y fue el lugar donde se clonó el fragmento del gen *hns* completo. El gen *hns* fue amplificado a partir de la cepa 5K de *E. coli* con los oligonucleótidos HNSBProx y HNSBDist (Apéndice I) que se encuentran flanqueando la secuencia del gen. La temperatura de hibridación utilizada fue de 50 °C y el tiempo de hibridación de 1 minuto. Finalmente el fragmento obtenido de la amplificación, de 508 pb, fue cortado con el enzima *BamHI* para permitir su clonaje dentro del plásmido. La ligación fue transformada nuevamente en la cepa 5K.

Para comprobar cuál de los plásmidos aislados había incorporado el inserto y además si la orientación del mismo era correcta, los plásmidos se cortaron con el enzima de restricción *PvuII*. Esta diana de restricción se encuentra a 208 pb de la diana *BamHI* en el plásmido pUC19 y también se encuentra en el inserto 117 pb antes del final del gen *hns*, por tanto, el inserto en orientación correcta presentaba una banda de 325 pb con la restricción *PvuII* (y de 599 pb si el inserto se encontrase en la orientación opuesta). De esta forma se seleccionó un clon con el inserto en orientación correcta que recibió el nombre de pUCHhaHns.

Finalmente para clonar el promotor del gen *hns* en el plásmido pUCHhaHns se amplificó un fragmento anterior al gen *hns* con los oligonucleótidos pHNSNProx y pHNSDist (Apéndice I) y como molde la cepa 5K de *E. coli*. El fragmento amplificado incluye el promotor del gen *hns* (Figura 3.2.5.). La temperatura de hibridación que se utilizó fue de 52 °C. El fragmento de PCR, de 270 pb, fue cortado con el enzima de restricción *NdeI* y clonado dentro del plásmido pUCHhaHns cortado con el mismo enzima de restricción. De esta forma, el promotor del gen *hns* queda clonado justo delante del gen *hha*. Los plásmidos aislados de las colonias resultantes de la ligación fueron cortados con los enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRI* para comprobar si contenían inserto y en que orientación. Se utilizaron estas dianas de restricción porque se encuentran ambas en el interior del inserto y con ellas se libera, por una parte el fragmento del gen *hns* (508 pb) y por otra un fragmento que contiene el gen *hha* y parte del promotor *hns*. En el caso de que el inserto se encuentre orientado de manera correcta, la banda liberada es de 337 pb,

mientras que si aparece en la orientación opuesta, la banda liberada es de 407 pb. El clon resultado del clonaje completo se denominó pUCHhaHnsHyb.

En la figura 3.2.5. se muestra un esquema de toda la construcción.

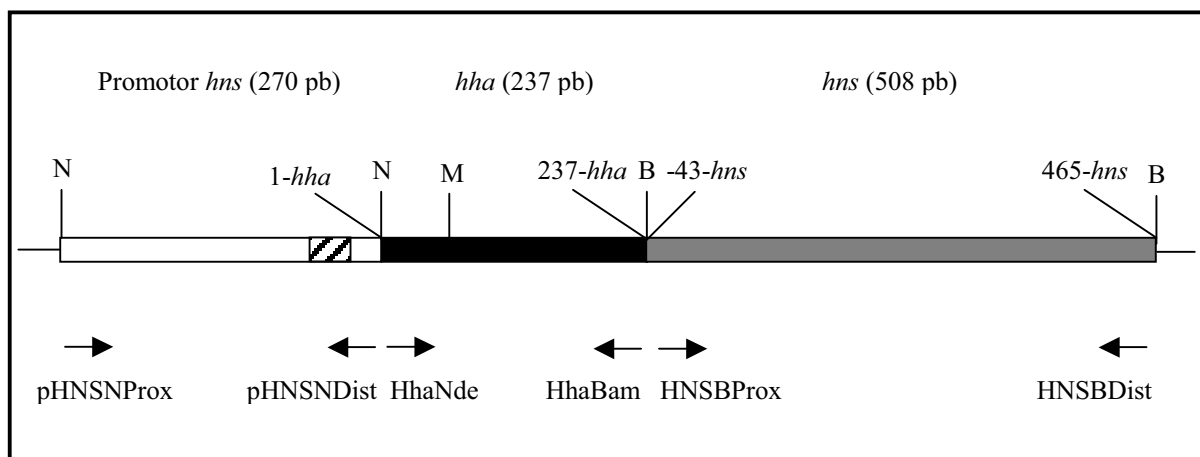


Figura 3.2.5. Disposición de los genes *hha* y *hns* en el plásmido pUCHhaHnsHyb. En color blanco se muestra la región que contiene el promotor de *hns*. Marcado con rayas diagonales se muestra el posible promotor según los programas informáticos. Con una caja negra se muestra la región del gen *hha* completo y con una caja gris la región del gen *hns* completo. También se señalan los diferentes oligonucleótidos utilizados para obtener la construcción y las dianas de restricción con las que se realizó el clonaje. N, *Nde*I. B, *Bam*HI. M, *Mfe*I.

Una vez obtenido el plásmido pUCHhaHnsHyb, se decidió comprobar si esta construcción era capaz de complementar el fenotipo de un mutante *hns* en placas de β -glucósido. Para ello se transformó el plásmido a la cepa BSN27 (*hns*⁻) y se observó que era capaz de complementar el fenotipo (color azul) a diferencia de lo que pasaba con el control, el plásmido pUC19 (color amarillento).

3.2.2.2.- Recombinación de las proteínas Hha y H-NS independiente de secuencia (SIPR)

Para la construcción de la proteína híbrida entre las proteínas Hha y H-NS, se decidió seguir la técnica de recombinación de proteínas independiente de secuencia (SIPR) (Sieber *et al.*, 2001).

Respecto a la técnica descrita se introdujo una pequeña modificación que hiciera más fácil la detección de las proteínas híbridas obtenidas. En lugar de aplicar la técnica sobre un plásmido abierto que contuviera ambos genes, se decidió utilizarla sobre dos fragmentos de PCR amplificados, uno correspondiente al gen *hha* y otro correspondiente al gen *hns*.

Para la amplificación del gen *hha* se utilizaron los oligonucleótidos RPISHha y HhaBam (Apéndice I), mientras que para la amplificación del gen *hns* se utilizaron los oligonucleótidos RPISHNS y HNSBProx (Apéndice I). La temperatura de hibridación utilizada fue de 52 y 50 °C respectivamente. El fragmento amplificado del gen *hha* tenía un tamaño de 417 pb y el del gen *hns* de 993 pb. En la figura 3.2.6. se muestra un esquema sobre la amplificación de estos dos genes.

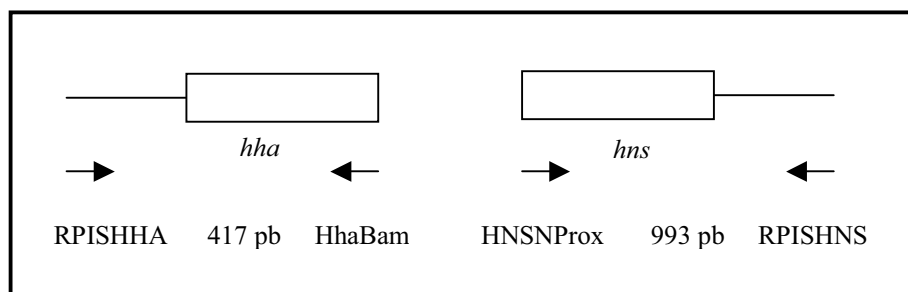


Figura 3.2.6. Esquema de la amplificación de los genes *hha* y *hns* para la técnica de recombinación de proteínas independiente de secuencia (SIPR). Se muestran los oligonucleótidos utilizados, su situación y el tamaño de los fragmentos amplificados.

En el experimento de degradación para la creación de la proteína híbrida no interesa que se produzca una degradación ni del inicio del gen *hha* ni del final del gen *hns*. Por esta razón los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de estos genes dejan en esos extremos una zona más amplia. El oligonucleótido RPISHha se encuentra 190 pb antes del inicio de *hha* y el oligonucleótido RPISHNS se encuentra 545 pb después del final de *hns*.

Una vez obtenidos los fragmentos de PCR, se procedió a realizar la técnica de la recombinación de proteínas independiente de secuencias (SIPR) propiamente dicha.

En primer lugar los fragmentos de los genes *hha* y *hns* fueron degradados a través del tratamiento con la nucleasa Bal31 (apartado 2.6.6.). Las muestras recogidas fueron purificadas y tratadas con la polimerasa Klenow para rellenar los extremos. A continuación fueron tratadas con la polinucleótidoquinasa y finalmente los fragmentos obtenidos fueron ligados entre ellos. En el producto de ligación obtenido, los fragmentos podían haberse unido de muchas formas diferentes. Para seleccionar aquellos fragmentos de la ligación que tenían un orden (primero el gen *hha* y después el gen *hns*) y una orientación correcta (no ligados en orientaciones opuestas), se realizó una PCR con los oligonucleótidos HhaBamMet y HNSBDist (Apéndice I.). Estos oligonucleótidos se encuentran situados por una parte justo al inicio del gen *hha* y por otra al final del gen *hns*, permitiendo de esta forma amplificar aquellos productos de ligación que fueran correctos. Además ambos oligonucleótidos crean en los extremos las dianas de restricción adecuadas para su posterior clonaje.

El siguiente paso fue seleccionar a partir de la amplificación por PCR aquellos fragmentos producto de la ligación que tuvieran un tamaño de entre 400-650 pb. Se escogieron estos tamaños porque se correspondían con el tamaño del gen *hns* y la proteína híbrida que se quería conseguir habría de tener un tamaño similar. Una vez se habían seleccionado aquellos fragmentos que tenían una longitud adecuada, se procedió al clonaje de los mismos en el plásmido pUCHhaHNSHyb para que quedaran bajo el control del promotor del gen *hns*. Los fragmentos fueron cortados con los enzimas de restricción *MfeI* (60 pb al inicio del gen *hha*) y *BamHI* (al final de *hns*) y se ligaron con la banda del plásmido pUCHhaHNSHyb cortada con los mismos enzimas de restricción (de esta forma se elimina del plásmido pUCHhaHNSHyb la zona interior de *hha* y de *hns* que originalmente estaba presente y que ya no era necesaria). Como resultado final se obtenían los fragmentos de las diferentes proteínas híbridas clonados bajo el promotor nativo de la proteína H-NS.

En la figura 3.2.7. se muestra un esquema de todo este proceso, desde la amplificación, ligación y selección de los fragmentos de los genes *hha* y *hns* hasta el clonaje en el plásmido pUCHhaHNSHyb. También se indican las diferentes dianas de restricción necesarias para realizar el proceso.

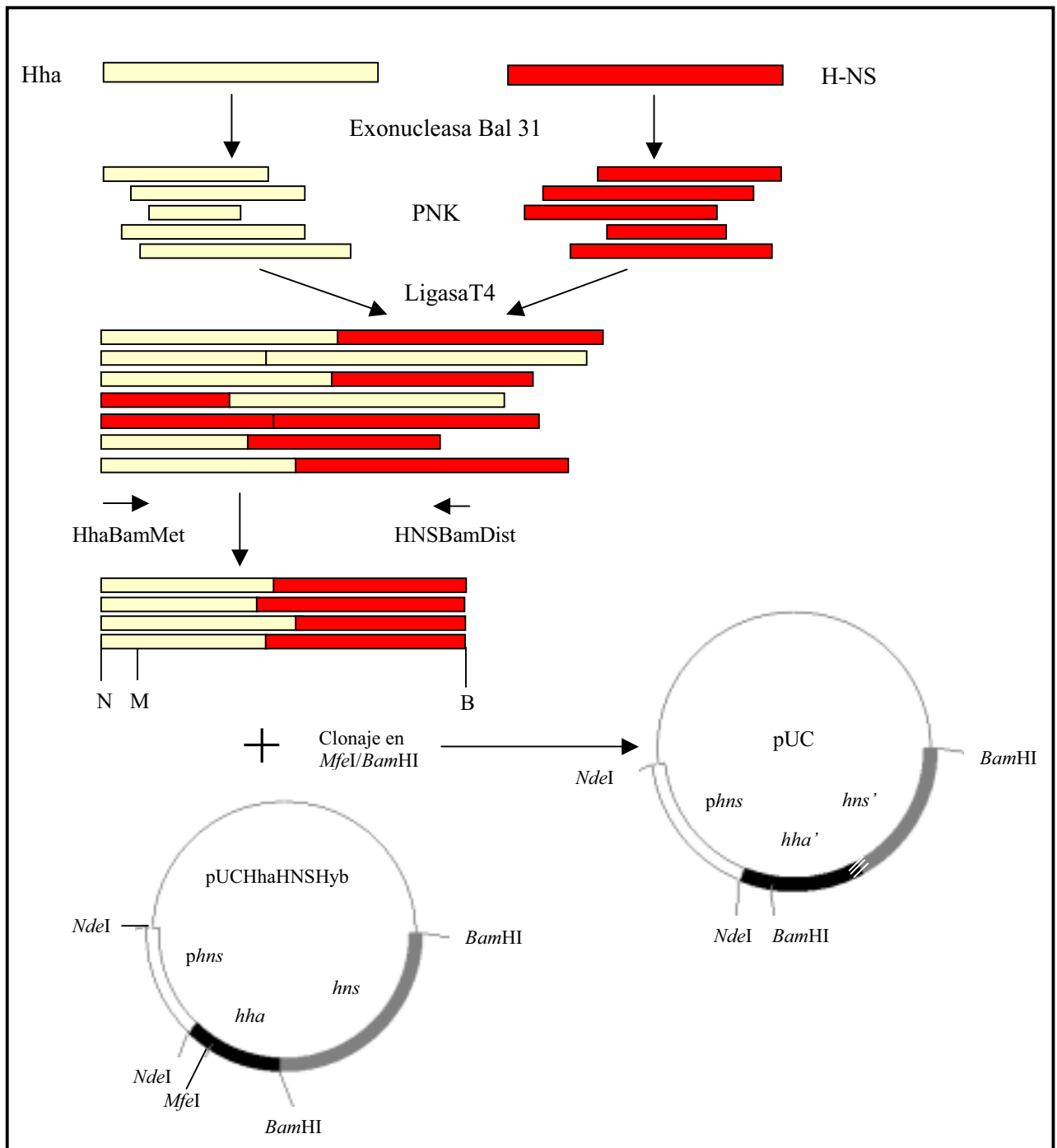


Figura 3.2.7. Esquema sobre la construcción de la proteína híbrida a través de la recombinación independiente de secuencia (SIPR). PNK, polinucleótidoquinasa. N, *NdeI*. B, *BamHI*. M, *MfeI*. *hha'* y *hns'* no son genes completos y las pequeñas líneas blancas indican la fusión de ambos genes.

El producto de la ligación fue transformado a la cepa 5K y finalmente, de los diferentes clones obtenidos se procedió a analizar cuáles de ellos contenían los fragmentos de *hha* y *hns* en pauta.

En primer lugar se procedió a analizar el tamaño de los insertos que contenían los diferentes plásmidos aislados (se aislaron aproximadamente 75 plásmidos de todos los transformantes obtenidos). Para ello se realizó una restricción *MfeI/BamHI* de los diferentes plásmidos y se seleccionaron 52 clones que tenían un tamaño adecuado (350-700 pb) para ser secuenciados.

3.2.2.3.- Secuenciación de los fragmentos de ADN potencialmente codificadores de proteínas híbridas

Los 52 clones seleccionados fueron secuenciados a través del oligonucleótido PUC19LL (Apéndice I). En la figura 3.2.8. se muestra la localización de dicho oligonucleótido.

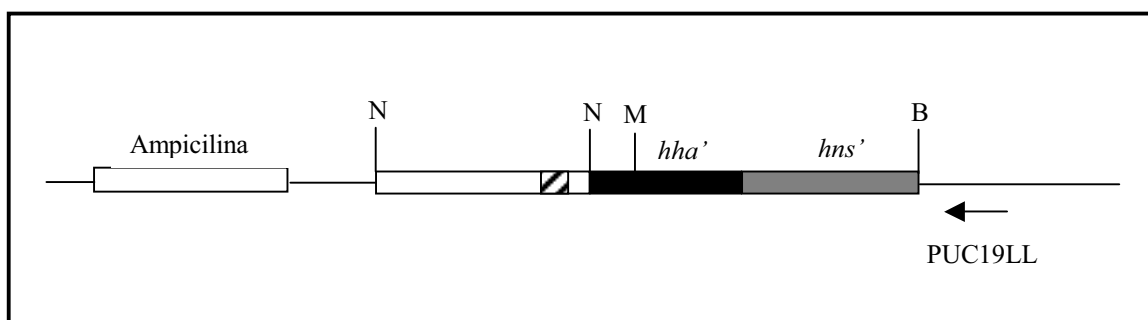
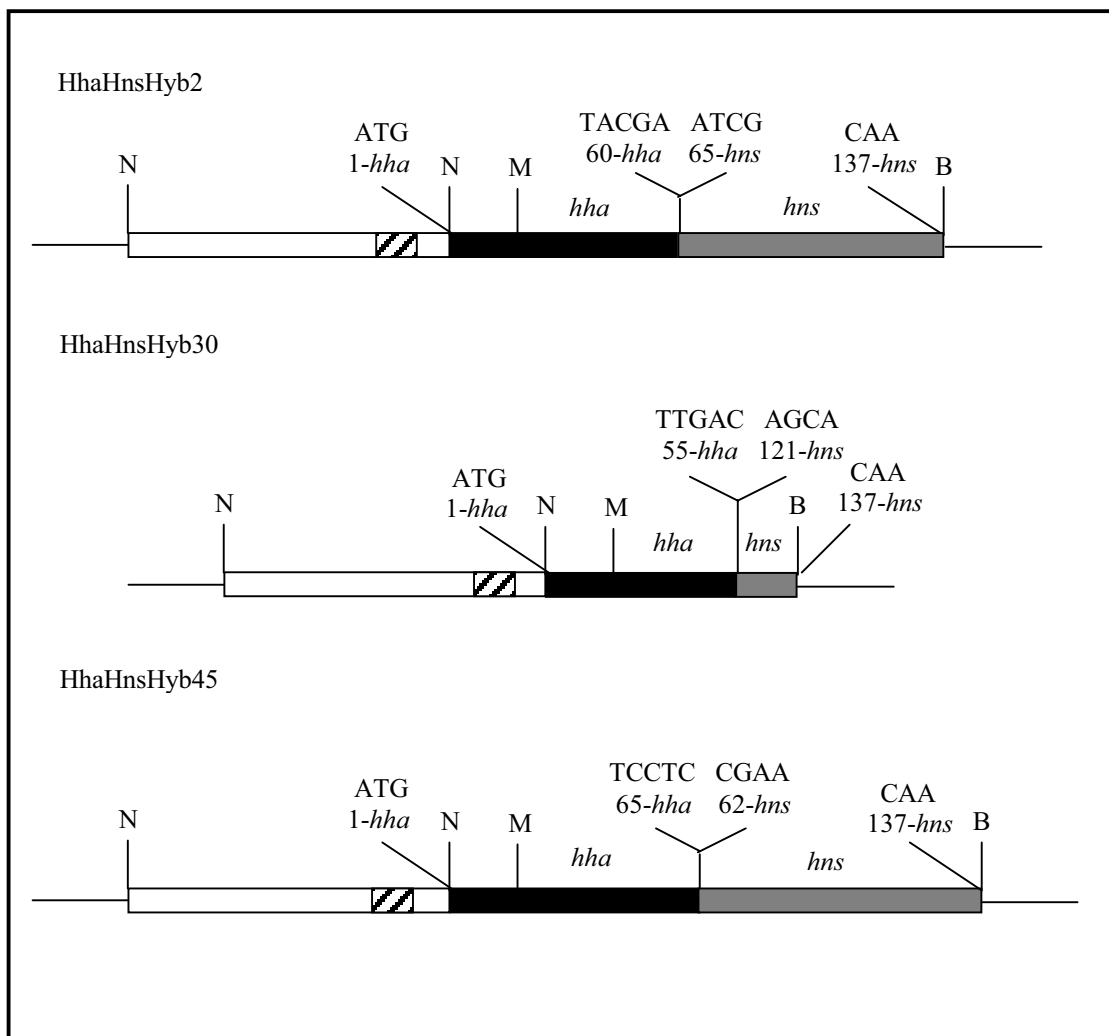


Figura 3.2.8. Situación del oligonucleótido pUC19LL en el plásmido portador de las posibles proteínas híbridas entre Hha y H-NS. En blanco se muestra la región que contiene el promotor de *hns* determinado a través de programas informáticos (cuadro rayado). En negro el fragmento del gen *hha* y en gris el fragmento del gen *hns*. N, *NdeI*. M, *MfeI*. B, *BamHI*.

De entre los 52 clones secuenciados, únicamente tres de ellos se encontraban en pauta de lectura. Esto representaba una frecuencia muy inferior a la de 1/3 que se esperaba

de una ligación al azar. Los tres plásmidos obtenidos fueron denominados pUCHhaHnsHyb2, pUCHhaHnsHyb30 y pUCHhaHnsHyb45 y las proteínas fueron denominadas HhaHnsHyb2, HhaHnsHyb30 y HhaHnsHyb45 respectivamente. En la figura 3.2.9. se muestra A) un esquema de estas tres proteínas híbridas y B) qué hélices α se encuentran presentes en cada una de las proteínas.

(A)



B)

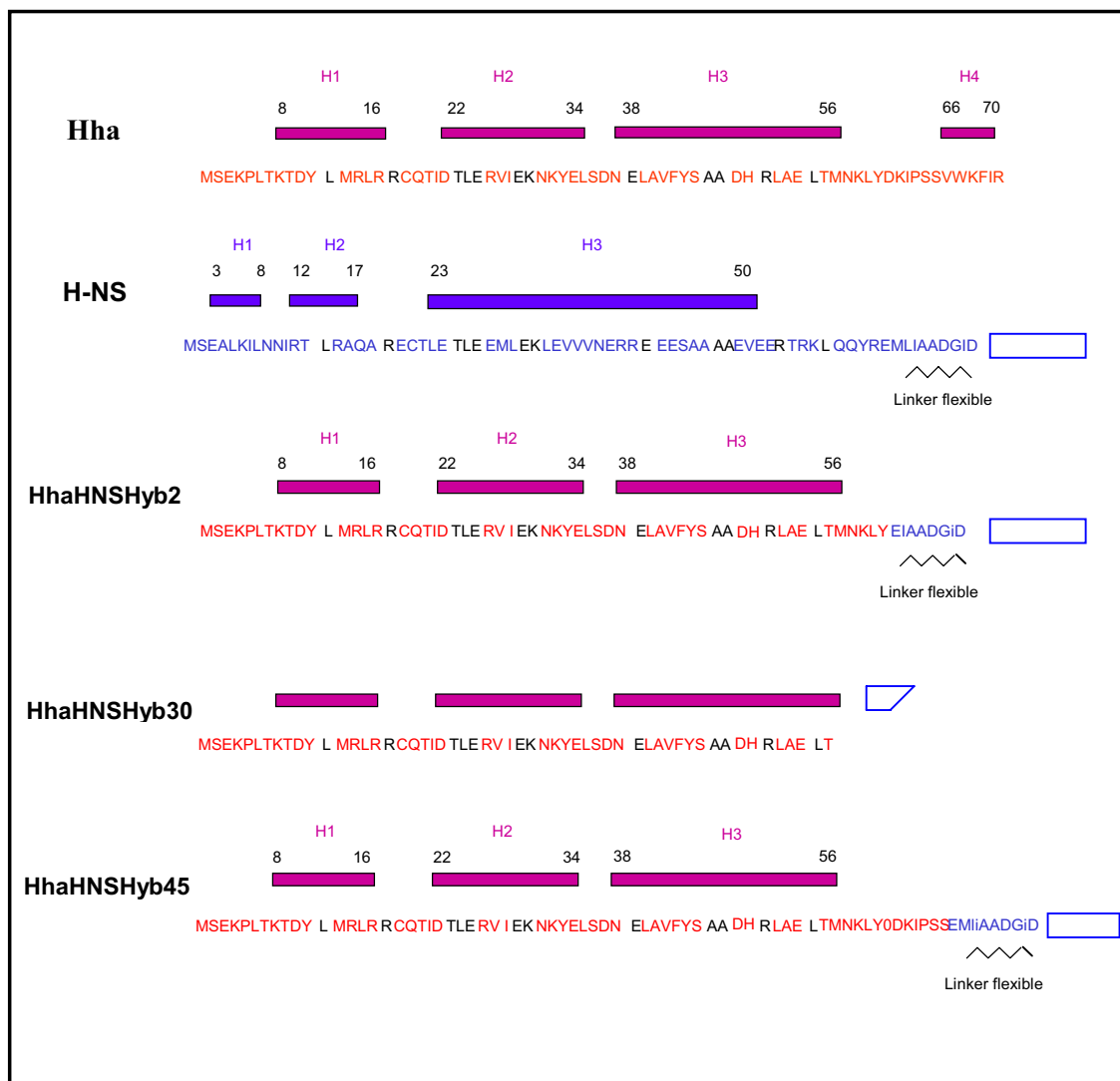


Figura 3.2.9. Proteínas híbridas

- (A) Esquema de las tres proteínas híbridas en el que se muestra en blanco la región que contiene el promotor de *hms* (cuadro rayado), en negro la parte correspondiente al gen *hha* y en gris la parte correspondiente al gen *hms*. También se indican el primer y último aminoácido de Hha y H-NS presentes en estas proteínas y su respectiva secuencia de nucleótidos. Finalmente se señalan las dianas de restricción. N, *NdeI*. M, *MfeI*. B, *BamHI*.
- (B) Esquema de la secuencia de aminoácidos de las tres proteínas híbridas y de las proteínas Hha y H-NS. En rojo se muestra la secuencia de Hha y en azul la de H-NS. En negro se indican los aminoácidos conservados entre la secuencia de Hha y el dominio de oligomerización de H-NS (Figura 3.1.9.). También se muestra la posición de la región conectora flexible de H-NS y con cajas el dominio de unión al ADN de H-NS. En el caso de la proteína HisHhaHyb30 el dominio no es completo, solo 16 aminoácidos, por eso se dibuja una caja incompleta. En la figura además se incluyen las diferentes hélices α presentes en cada una de las proteínas.

Como se puede observar, la proteína HhaHnsHyb2 presenta las tres primeras hélices α de la proteína Hha sustituyendo a las tres que tiene la proteína H-NS. A continuación aparece ya la región conectora flexible (zona de unión entre los dos dominios de H-NS) y el dominio de unión al ADN de H-NS. Además, esta proteína híbrida tiene un tamaño muy similar al de la proteína H-NS.

La proteína HhaHnsHyb45 es bastante parecida a HhaHnsHyb2 pero un poco mayor. Contiene todos los aminoácidos de Hha que se encuentran entre la tercera y cuarta hélice α de dicha proteína y a continuación la región conectora y el dominio de unión al ADN de H-NS.

Finalmente la proteína HhaHnsHyb30 es la más corta de las tres proteínas híbridas. Le falta un aminoácido para tener completas las 3 primeras hélices α de la proteína Hha y a continuación únicamente aparecen los últimos 16 aminoácidos del dominio de unión al ADN de H-NS. Tiene una longitud muy similar a la proteína Hha y no a la proteína H-NS como se buscaba.

A fin de evitar procesos indeseados de recombinación, los tres plásmidos fueron conservados en una cepa como la HB101 (*recA*⁻).

3.2.2.4- Clonaje del gen de la proteína híbrida en el plásmido pLG388-30

Tal y como se refiere en el apartado 3.2.2.3., las diferentes proteínas híbridas construidas fueron clonadas en el plásmido pUC19. Adicionalmente, se decidió también clonar la proteína HhaHnsHyb2 en el plásmido pLG388-30. A diferencia del plásmido pUC19, éste es un plásmido de bajo número de copias. De las tres proteínas híbridas se escogió esta proteína debido a que, como se referirá en apartados posteriores, fue la que presentó un mayor grado de complementación del fenotipo de un mutante *hns*.

La proteína híbrida HhaHnsHyb2 fue amplificada con los oligonucleótidos HibBProx y HNSBam2 que flanquean su secuencia (Figura 3.2.10.). Estos dos oligonucleótidos introducen una diana *Bam*HI en sus extremos (Apéndice I) que permiten el posterior clonaje en el plásmido pLG388-30. La temperatura de hibridación utilizada fue de 50 °C.

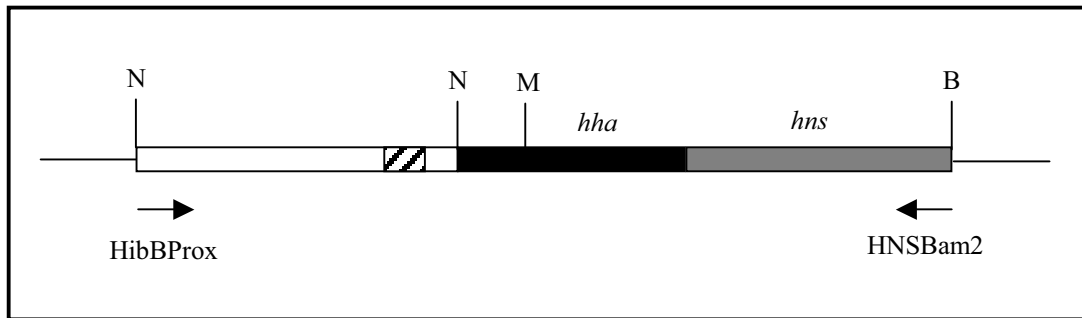


Figura 3.2.10. Situación de los oligonucleótidos HibBProx y HNSBam2 utilizados para amplificar el gen de la proteína HhaHnsHyb2 y clonarlo en el plásmido pLG388-30. Se muestra la estructura de HhaHnsHyb2 igual que en figuras anteriores. En blanco la región que contiene el promotor de *hns* (cuadrado rayado), en negro la parte correspondiente al gen *hha* y en gris la parte correspondiente al gen *hns*. N, *NdeI*. M, *MfeI*. B, *BamHI*.

El producto de PCR fue cortado con el enzima de restricción *BamHI* y clonado dentro del plásmido pLG388-30 cortado con el mismo enzima. La ligación fue transformada en la cepa 5K y se comprobó la presencia del inserto a través de la misma restricción. El plásmido obtenido fue denominado pLGHhaHnsHyb2.

3.2.3.- ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS PROTEÍNAS HÍBRIDAS

Una vez obtenidas las diferentes construcciones, se analizó la capacidad de las tres proteínas híbridas obtenidas mediante la técnica de recombinación independiente de secuencia (SIPR), es decir de las proteínas HhaHnsHyb2, HhaHnsHyb30 y HhaHnsHyb45, para complementar alguno de los fenotipos típicos de un mutante *hns* como, por ejemplo, el fenotipo hemolítico, el fenotipo β -glucósido y el crecimiento en un medio mínimo con serina.

3.2.3.1.- Complementación del fenotipo β -glucósido

Para el análisis del fenotipo β -glucósido los plásmidos pUCHhaHnsHyb2, pUHhaHnsHib30 y pUCHhaHnsHib45 fueron transformados a la cepa BSN27 (*hns*⁻) de *E. coli*. También se utilizaron como referencia la cepa salvaje (BSN26), la cepa mutante sin complementar portadora del plásmido pUC19 (BSN27 pUC19) y también la cepa mutante

portadora del plásmido pUCHhaHnsHyb obtenido en el apartado 3.2.2.1. (BSN27 pUCHhaHnsHyb que contiene los genes *hha* y *hns* consecutivos y se comporta como una cepa salvaje *hns*). A continuación, se hicieron estrías de todas las cepas obtenidas en placas de β -glucósido para analizar el fenotipo.

En la figura 3.2.11. se muestra el crecimiento de las diferentes cepas. El color azul aparece en el crecimiento de la cepa BSN26, de la cepa BSN27 complementada con la construcción pUCHhaHnsHyb y de la cepa BSN27 complementada con el plásmido pUCHhaHnsHyb2. En cambio, las cepas BSN27 (pUC19), BSN27 (pUCHhaHnsHyb30) y BSN27 (pUCHhaHnsHyb45) muestran color amarillo. Estos datos sugieren que la construcción pUCHhaHnsHyb2 complementa, al menos parcialmente, el fenotipo β -glucósido de un mutante *hns*.

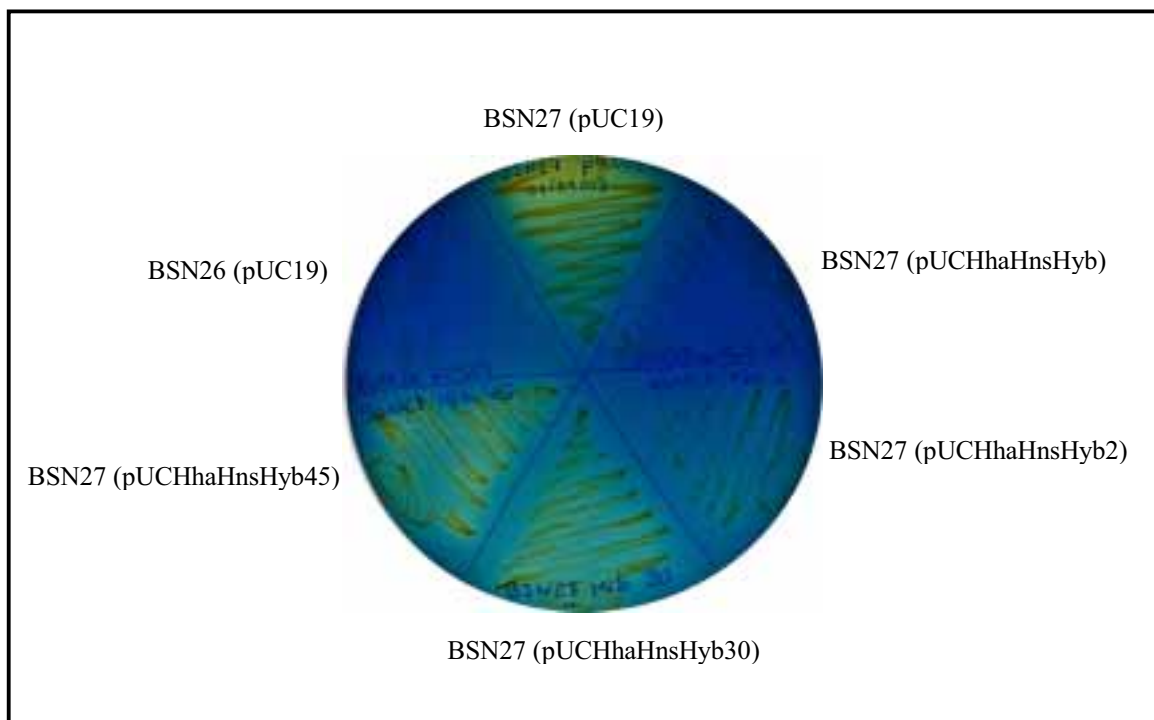


Figura 3.2.11. Complementación del fenotipo β -glucósido de las cepas BSN26 (pUC19), BSN27 (pUC19), BSN27 (pUCHhaHnsHyb), BSN27 (pUCHhaHnsHyb2), BSN27 (pUCHhaHnsHyb30) y BSN27 (pUCHhaHnsHyb45).

Para cuantificar la complementación del fenotipo *bgl* se decidió realizar un ensayo en líquido. Para ello, tanto a las cepas control (BSN26 y BSN27 (pUC19)) como a las portadoras de las proteínas híbridas (BSN27 (pUCHhaHnsHyb2), BSN27 (pUCHhaHnsHyt30) y BSN27 (pUCHhaHnsHyb45)), se les introdujo el plásmido pDFY436 por transformación. Este plásmido es portador de una fusión génica entre el promotor del operón β -glucósido y la β -galactosidasa. La actividad β -galactosidasa se determinó tal y como se explica en el apartado 2.8.6.3. utilizando muestras obtenidas a DO_{600} de 0'4 y 0'8. Los valores obtenidos se normalizaron pasándolos a porcentaje para poder comparar mejor los resultados obtenidos en los diferentes experimentos realizados.

En la figura 3.2.12. se muestra la gráfica con los resultados de la actividad β -galactosidasa. Como se puede ver los valores de la cepa salvaje son prácticamente nulos mientras que los de la cepa mutante son los más elevados (100 %). En el caso de las proteínas híbridas, se observa que la complementación de la proteína HhaHnsHyb2 es prácticamente del 60 % cuando se analiza a DO_{600} 0'4 y un poco menos, alrededor del 35 %, a 0'8. Las proteínas híbridas HhaHnsHyb30 y HhaHnsHyb45, complementan muy moderadamente el fenotipo, con valores de aproximadamente el 30 % y 20 % respectivamente.

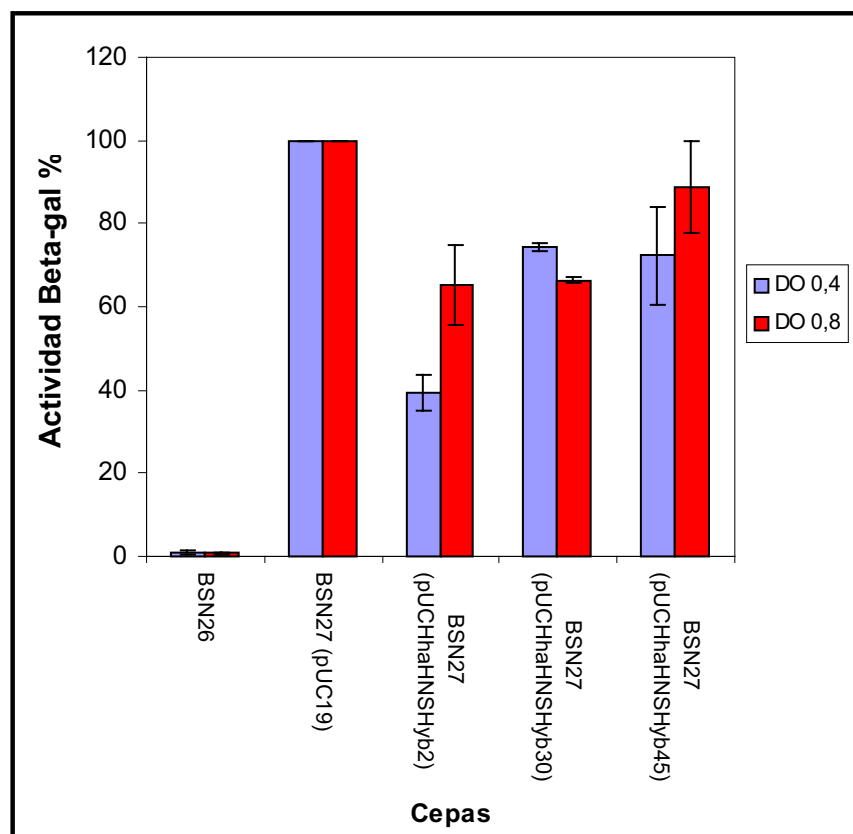


Figura 3.2.12. Actividad β -galactosidasa de las cepas BSN26, BSN27 (pUC19), BSN27 (pUCHhaHnsHyb2), BSN27 (pUCHhaHnsHyb30) y BSN27 (pUCHhaHnsHyb45), todas portadoras del plásmido pDFY436 (*bglG::LacZ*). La actividad de la cepa BSN27 (pUC19), que se considera del 100%, fue de 1.500 unidades.

Además, en el caso de la proteína HhaHnsHyb2, debido a que era la que presentaba un mayor grado de complementación, se decidió analizar la complementación cuando se encontraba clonada en un plásmido de bajo número de copias, utilizando por ello el plásmido pLGHhaHnsHyb2 (obtenido en el apartado 3.2.2.4.). El plásmido fue transformado a la cepa BSN27 y posteriormente se introdujo también el plásmido pDFY436 para analizar la actividad β -galactosidasa. En este caso la complementación del fenotipo *bgl* por parte de la proteína HhaHnsHyb2 no se produce (Figura 3.2.13.), sugiriendo que el bajo número de copias del plásmido hace que no sea suficiente la cantidad de proteína híbrida presente para compensar las funciones de la proteína H-NS.

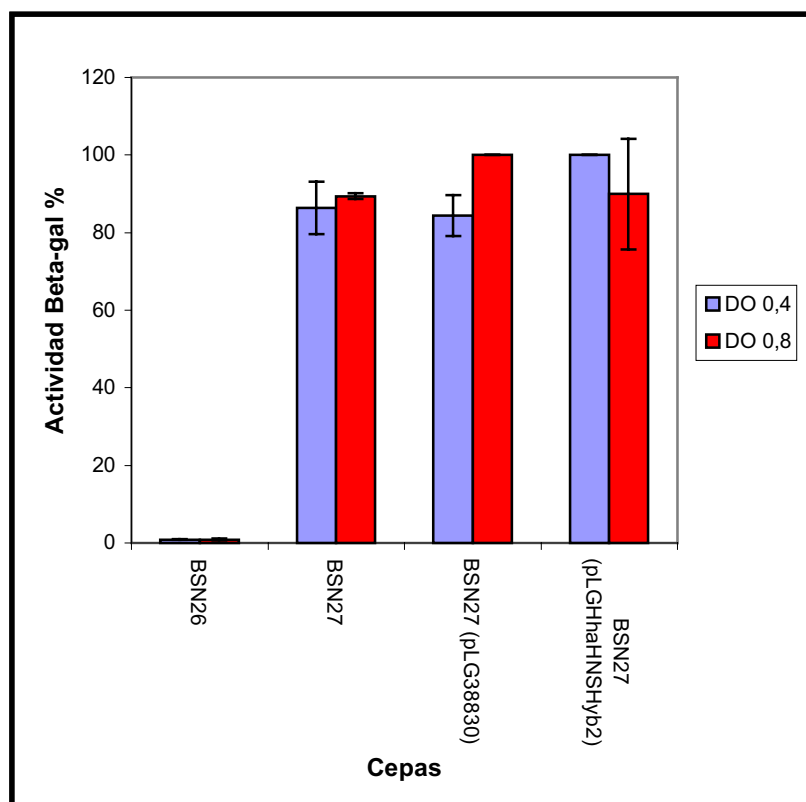


Figura 3.2.13. Actividad β -galactosidasa de las cepas BSN26, BSN27, BSN27 (pLG388-30) y BSN27 (pLGHhaHnsHyb2), todas portadoras del plásmido pDFY436 (*bgIG::LacZ*). La actividad de la cepa BSN27 (pLG388-30), que se consideró como 100 %, fue de 1.000 unidades.

3.2.3.2.- Complementación del fenotipo hemolítico

Además de la complementación del fenotipo β -glucósido referida en el apartado anterior, también se realizó el análisis de la complementación del fenotipo hemolítico por parte de las diferentes proteínas híbridas obtenidas.

Para realizar este análisis se transformaron los plásmidos pUCHhaHnsHyb2, pUCHhaHnsHyb30 y pUCHhaHnsHyb45 a la cepa mutante de *E. coli* BSN27 portadora del plásmido pHly152. Este plásmido contiene el operón hemolítico y nos permite analizar la expresión de la toxina α -hemolisina a través del cálculo de la actividad hemolítica de la fracción externa o del halo de hemólisis que presentan las cepas cuando son analizadas en placas de agar-sangre.

En primer lugar se realizó una estría de todas estas cepas, incluyendo los controles, en placas de agar-sangre. En la Figura 3.2.14. se pueden ver, por una parte, alguna de las colonias de la cepa mutante (BSN27) con unos halos de hemólisis grandes y por la otra, algunas colonias de la cepa mutante portadora del plásmido pUCHhaHnsHyb2 con unos halos de hemólisis pequeños, donde se mostraba más claramente la complementación del fenotipo hemolítico.

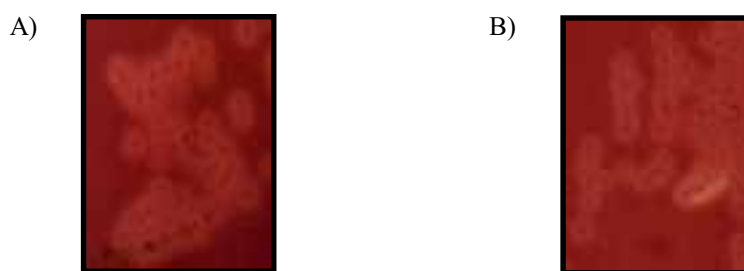


Figura 3.2.14. Fenotipo en placas de agar-sangre de las cepas A) BSN27, B) BSN27 (pUCHhaHnsHyb2).

El segundo paso consistió en valorar la expresión de la toxina α -hemolisina a través de la actividad hemolítica en la fracción externa (apartado 2.8.6.1.). Al igual que en el apartado anterior, se realizó una normalización de los datos pasándolos a porcentaje. Las actividades hemolíticas se determinaron en cultivos de una DO_{600} de 0'4.

En el fenotipo hemolítico la complementación que producen las proteínas híbridas es mucho mayor que en el caso del fenotipo β -glucósido (Figura 3.2.15.) La proteína HhaHnsHyb2 presenta un grado de complementación prácticamente completo (90 %), mientras que en el caso de la proteína HhaHnsHyb30 la complementación es de aproximadamente el 50 %. La proteína HhaHnsHyb45 no complementa. Es decir, nuevamente la proteína HhaHnsHyb2 es la que presenta un mayor grado de complementación del fenotipo de un mutante *hns*.

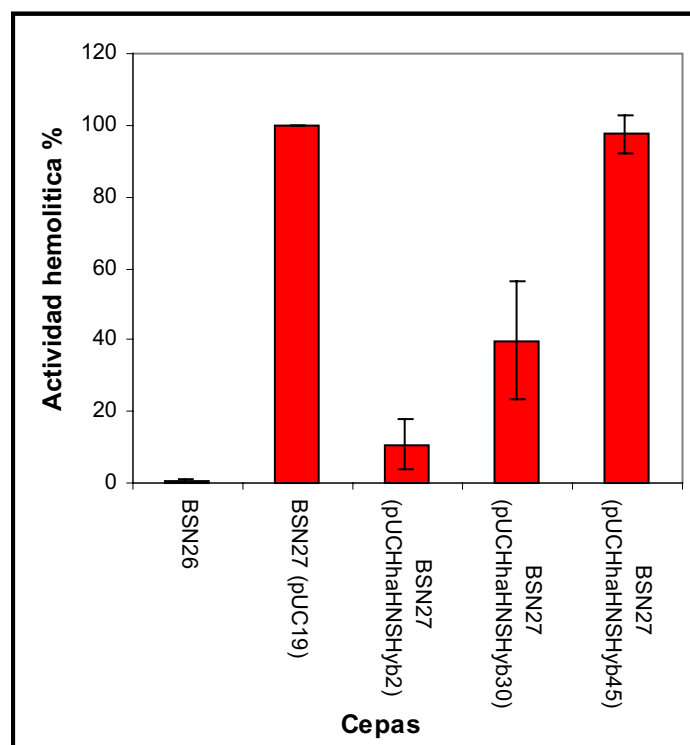


Figura 3.2.15. Actividad hemolítica de las cepas BSN26, BSN27 (pUC19), BSN27 (pUCHhaHnsHyb2), BSN27 (pUCHhaHnsHyb30), BSN27 (pUCHhaHnsHyb45), todas ellas portadoras del plásmido hemolítico pHly152. La actividad de la cepa BSN27 (pUC19), considerada como 100 %, fue de 1.200 unidades.

A continuación se procedió, al igual que en el apartado anterior, a realizar el análisis de la producción de α -hemolisina de la cepa portadora de la proteína HhaHnsHyb2, cuando se encuentra clonada en un vector de bajo número de copias, en este caso el pLGHhaHnsHyb2. El plásmido fue transformado a la cepa BSN27 (pHly152) y se comparó su actividad hemolítica con la de las diferentes cepas controles.

Como se puede observar en la figura 3.2.16. la cepa portadora de la proteína híbrida HhaHnsHyb2 complementa el fenotipo hemolítico en un 65 %. Este porcentaje es bastante elevado, pero no tanto como cuando la proteína se encontraba clonada en el plásmido pUC19, sugiriendo nuevamente que el número de copias es importante para el grado de complementación.

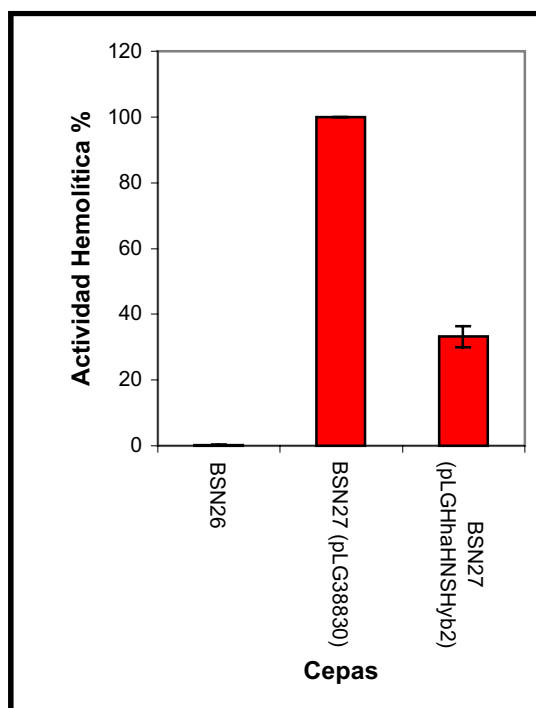


Figura 3.2.16. Actividad hemolítica de la fracción externa de las cepas, BSN26, BSN27 (pLG388-30) y BSN27 (pLGHhaHnsHyb2), todas ellas portadoras del plásmido hemolítico pHly152. La actividad de la cepa BSN27 (pLG388-30), considerada como 100 %, fue de 3.000 unidades.

3.2.3.3.- Complementación del fenotipo de un mutante *hns* en medio mínimo con serina

Los mutantes para el gen *hns* presentan un crecimiento deficiente en un medio mínimo en el que se encuentre presente la serina (Lejeune *et al.*, 1989). Por este motivo se decidió comprobar si las cepas mutantes complementadas con la proteína HhaHnsHyb2 eran capaces de compensar esta deficiencia.

El medio mínimo utilizado fue el M63 (Miller, 1992) suplementado con serina (40 $\mu\text{g/ml}$) y también con triptófano (40 $\mu\text{g/ml}$), ya que las diferentes cepas analizadas, BSN26 (hns^+), BSN27 (hns^-), BSN27 (pUCHhaHnsHyb2) y BSN27 (pLGHhaHnsHyb2) son auxotróficas para este aminoácido.

Como se puede ver en la figura 3.2.17. la cepa mutante presenta una tasa de crecimiento significativamente más baja que la de la cepa salvaje. Las cepas complementadas con la proteína HhaHnsHyb2 presentan un comportamiento muy diferente en función del plásmido en el que se encuentra codificada.

La cepa complementada con el plásmido pLGHhaHnsHyb2 prácticamente no crece, presentando un comportamiento todavía más deficiente que el de la propia cepa mutante para el gen *hns*, mientras que la cepa complementada con el plásmido pUCHhaHnsHyb2, sin llegar a los niveles de la cepa salvaje, presenta una fase de crecimiento bastante más elevada que la de la cepa mutante.

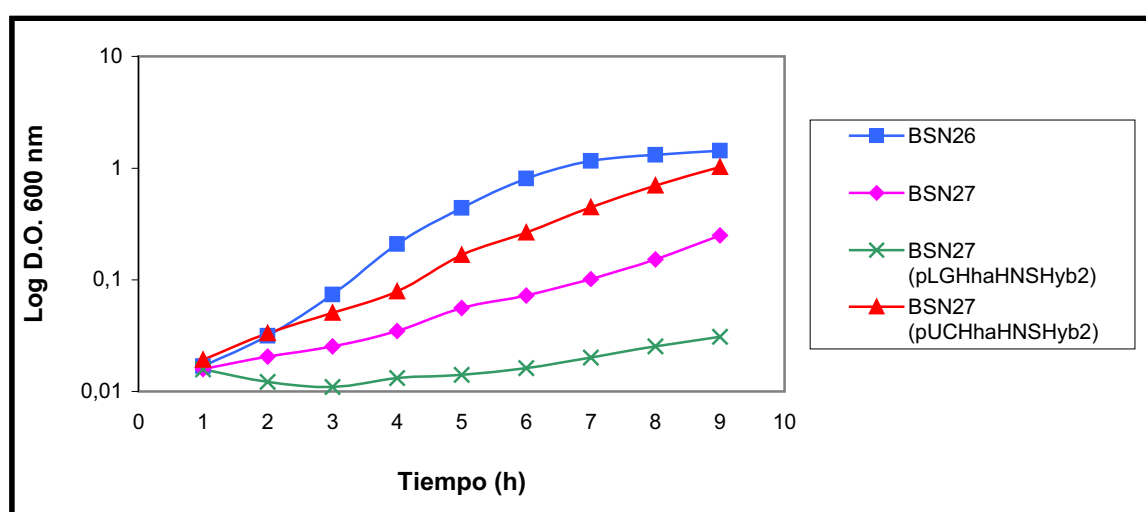


Figura 3.2.17. Curva de crecimiento de las cepas BSN26, BSN27, BSN27 (pUCHhaHnsHyb2) y BSN27 (pLGHhaHnsHyb2) en medio mínimo (M63) suplementado con serina y triptófano (ambos a una concentración de 40 µg/ml).

3.2.3.4.- Unión de la proteína híbrida al ADN

La proteína H-NS de *E. coli* es un regulador transcripcional y, por tanto, para realizar su función se une al ADN, preferentemente en regiones curvadas. Trabajos anteriores habían mostrado la especificidad de la proteína H-NS por regiones reguladoras del operón hemolítico (*hly*) (Nieto *et al.*, 2000).

En este apartado se realizaron experimentos para comprobar la capacidad de la proteína híbrida para unirse al ADN y si esta unión era específica.

3.2.3.4.1.- Sobreexpresión de la proteína híbrida

Para poder realizar el análisis de la unión de la proteína híbrida al ADN a través de los ensayos de retardo en gel fue necesario en primer lugar obtener una cantidad suficiente de proteína híbrida purificada.

El primer paso para la sobreexpresión de la proteína híbrida fue su clonaje en un vector de expresión, incorporando además una cola de histidinas en su extremo N-terminal que permitiese su posterior purificación. Para ello, el gen de la proteína HhaHnsHyb2 fue amplificado a través de los oligonucleótidos HisHha y HNSBam2 (Apéndice I). Estos oligonucleótidos añaden directamente una cola de 6 histidinas justo antes del inicio de transcripción de HhaHnsHyb2 y también las dianas *NdeI* y *BamHI* necesarias para su posterior clonaje. El molde utilizado para obtener la amplificación fue el plásmido pUCHhaHnsHyb2 y la temperatura de hibridación utilizada en la PCR fue de 50 °C.

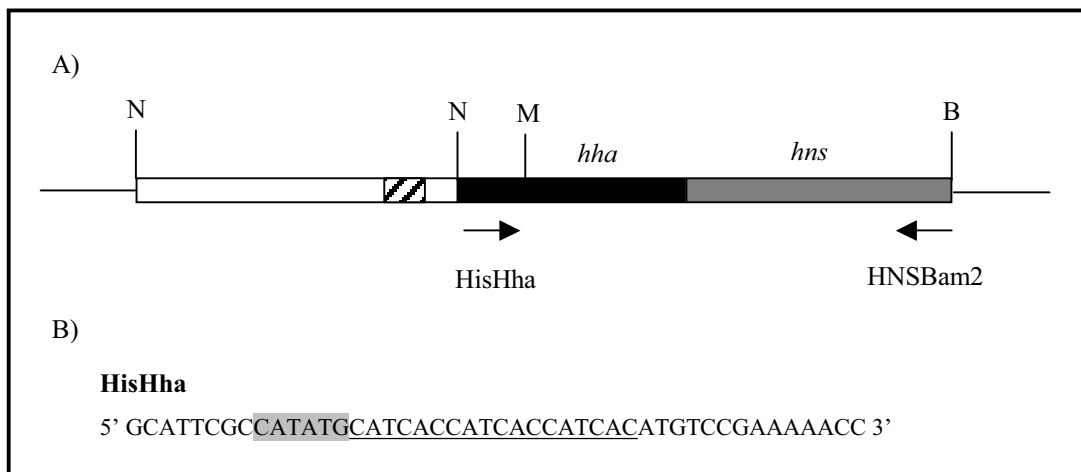


Figura 3.2.18. Oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen de la proteína HhaHnsHyb2.

- A) Situación de los oligonucleótidos HisHha y HNSBam2 sobre la secuencia de HhaHnsHyb2. En blanco la región que contiene el promotor de *hns* (cuadrado rayado), en negro la parte correspondiente al gen *hha* y en gris la parte correspondiente al gen *hns*. N, *NdeI*. M, *MfeI*. B, *BamHI*.
- B) Secuencia del oligonucleótido HisHha. En gris se señala la diana de restricción *NdeI*. Subrayados se encuentran los 2 codones (CAT y CAC) que codifican para las 6 histidinas. A continuación comienza la secuencia de HhaHnsHyb2.

A continuación el fragmento de PCR obtenido, de 445 pb, fue cortado con los enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* y clonado en el plásmido pET15b cortado con los mismos enzimas de restricción. El producto de ligación fue transformado a la cepa HB101 de *E. coli*. El plásmido que contenía el inserto adecuado se denominó pETHisHhaHnsHyb2.

El siguiente paso para la sobreexpresión de la proteína híbrida fue la transformación del plásmido pETHisHhaHnsHyb2 en la cepa BL21 DE3 Δhns . Se utilizó esta cepa porque proporciona un fondo genético sin la presencia de la proteína H-NS y evitar de esta forma que pudiese enmascarar la producción de la proteína híbrida. Los transformantes fueron recogidos en 1L de LB y se indujo la sobreexpresión de HisHhaHnsHyb2 con IPTG (apartado 2.8.1.1.). A continuación, se procedió a la purificación de la proteína híbrida a través del sistema de Ni^{2+} -NTA-agarosa (2.8.1.2. y 2.8.1.3.) y finalmente se analizaron los extractos en geles de SDS-Tricina-PAGE (2.8.3.1.2.).

En la figura 3.2.19. se puede observar la sobreexpresión de la proteína HisHhaHnsHyb2, que se produce en gran cantidad y que además reacciona con los anticuerpos anti-H-NS. Las bandas superiores corresponden a formas oligoméricas y las inferiores a formas truncadas de la proteína híbrida.

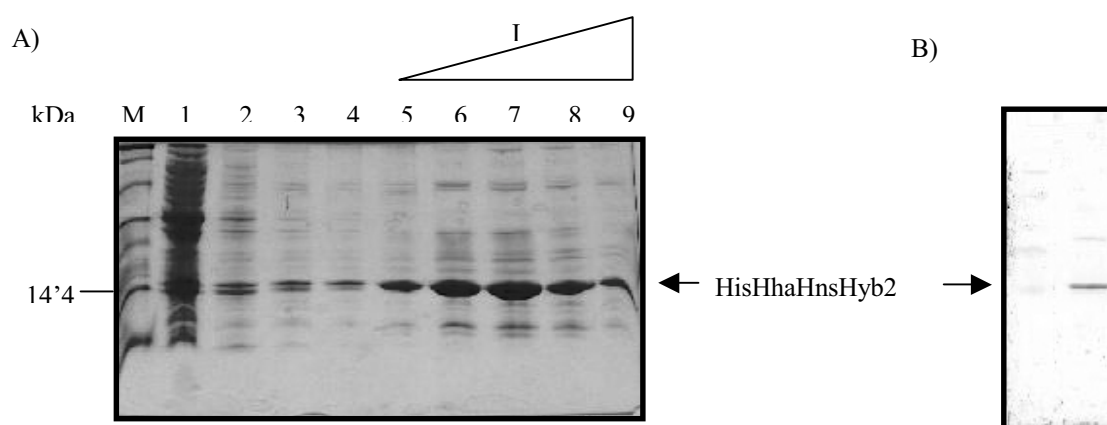


Figura 3.2.19. Purificación de HisHhaHnsHyb2.

- A) Análisis electroforético en gel SDS-Tricina-PAGE y tinción en azul de Coomassie de las fracciones obtenidas de la proteína HisHhaHnsHyb2 purificada. M, Marcador de bajo peso molecular (Pre-stained, SDS Standard, Broad Range, Bio-Rad). Carril 1-4, lavados con tampón A. Carril 5, lavado con 50 mM de imidazol. Carril 6, lavado con 100 mM de imidazol. Carriles 7-9, lavados con 250 mM de imidazol.
- B) Inmunodetección con anticuerpos específicos para H-NS de la fracción 5 del panel A. M, Marcador de peso molecular preteñido (Pre-stained, SDS Standard, Broad Range, Bio-RAD).

3.2.3.4.2.- Retardo en geles de agarosa

Una vez obtenida la proteína HisHhaHnsHyb2 purificada se procedió al análisis de su capacidad para interactuar con el ADN, utilizando para ello ensayos de retardo en geles de agarosa. El método se basa en el hecho de que cuando se produce la unión de la proteína al ADN, la migración del complejo es más lenta que la del ADN solo.

Se utilizó para los ensayos la fracción de 250 mM Imidazol (1) obtenida en el apartado anterior (que se encuentra en el carril 7 de la figura 3.2.19.). Esta fracción presentaba una gran cantidad de ADN y ARN acompañante, por lo que fue tratada con DNasa y RNasa previamente a los ensayos de retardo.

También se realizó una cuantificación de la cantidad de proteína presente en esta fracción después de los tratamientos, siendo la concentración de 0'8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

El fragmento de ADN específico que se utilizó para realizar los ensayos, se denominó R0. Este fragmento fue obtenido de la región reguladora (región 5') del operón hemolítico (*hly*) que es productor de la toxina α -hemolisina (apartado 1.3.1.2.) situada dentro del plásmido pHly152. La proteína H-NS es capaz de unirse a él de forma específica (Nieto *et al.*, 2000). Los oligonucleótidos HlyR0 y HlyBam (Apéndice I) fueron los utilizados para obtener dicho fragmento que presenta una longitud aproximada de 2'8 kb (Figura 3.2.20.).

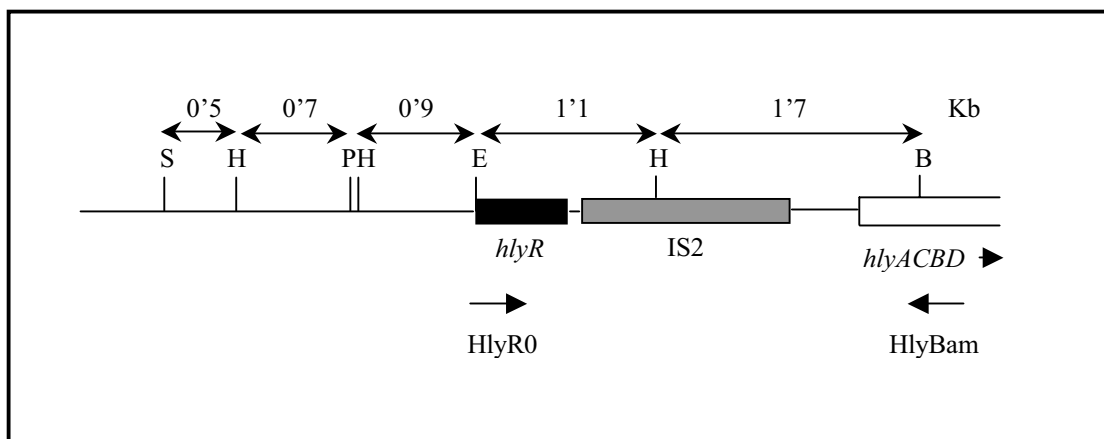
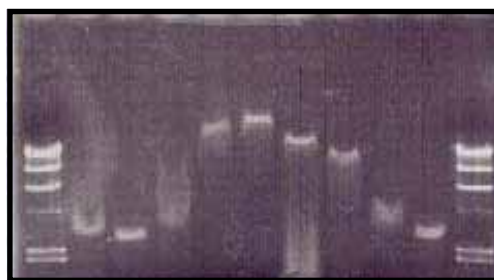


Figura 3.2.20. Esquema del operón hemolítico y su región reguladora. La caja negra es la secuencia reguladora de 650 pb *hlyR*. La caja gris corresponde a la secuencia de inserción entre la región reguladora y el operón hemolítico. La caja blanca muestra el inicio del operón hemolítico *hlyACBD*. Se indican las dianas de restricción S, *SalI*, H, *HindIII*, P, *PstI*, E, *EcoRI*, B, *BamHI* y la distancia en pb entre ellas. Finalmente se muestra la localización de los oligonucleótidos HlyR0 y HlyBam utilizados para la amplificación del fragmento R0.

Además también se utilizaron en el ensayo la proteína H-NS (a una concentración de 0'65 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y la proteína Hha (concentración de 3'37 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) como controles para comparar con la proteína híbrida, ya que H-NS se une específicamente a este fragmento y Hha se une inespecíficamente y a muy elevadas concentraciones de proteína.

En la figura 3.2.21. se puede ver como la proteína híbrida es capaz de unirse al fragmento R0. La unión de la proteína HisHhaHnsHyb2 a este fragmento no es tan efectiva como en el caso de la proteína H-NS, ya que a una misma concentración el retardo es menor. Además, la concentración de proteína híbrida necesaria es muy inferior a la correspondiente de Hha. Como control para ver la migración del fragmento R0 se colocó dicho fragmento sin ninguna proteína.



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 M

Figura 3.2.21. Ensayo de retardo en gel (agarosa 0'8 %) con el fragmento de ADN R0. M, marcador de peso molecular Fago λ / *HindIII*. Carril 1, 47'18 μg de la proteína Hha. Carril 2 y 9, fragmento R0 solo como control. Carril 3, 0'32 μg de H-NS. Carril 4, 0'65 μg de H-NS. Carril 5, 1'95 μg de H-NS. Carril 6, 11'2 μg de HisHhaHnsHyb2. Carril 7, 4'8 μg de HisHhaHnsHyb2. Carril 8, 0'8 μg de HisHhaHnsHyb2.

En trabajos anteriores del grupo de investigación (Nieto *et al.*, 2000), se ha puesto de manifiesto que la interacción conjunta de las proteínas Hha y H-NS con el ADN supone la formación de unos complejos con un retardo ligeramente superior al que se obtiene cuando se utilizan las dos proteínas por separado. Por esta razón, una vez comprobada la capacidad de la proteína híbrida para unirse al fragmento de ADN R0, se decidió comprobar el comportamiento de esta proteína cuando actúa de manera conjunta con la

proteína Hha y ver si en esta situación, la proteína HisHhaHnsHyb2 se comporta de una manera similar a como lo hace H-NS.

En la figura 3.2.22. se muestra el resultado de estos experimentos, en los que nuevamente se utilizó el fragmento de ADN R0 obtenido de la región reguladora del operón hemolítico. Se puede observar por una parte el retardo provocado por la proteína H-NS y por la interacción entre H-NS y Hha y, por otra parte, el retardo provocado por la proteína HisHhaHnsHyb2 y por la interacción entre HisHhaHnsHyb2 y Hha.

En concreto, en el retardo donde se encuentran interaccionando conjuntamente las proteínas HisHhaHnsHyb2 y Hha, se puede ver como el fragmento R0 muestra cierto escalonamiento, diferentes grados de retardo, comienza como la proteína HisHhaHnsHyb2 sola y va retardando cada vez más. Estos resultados indican que la formación del complejo HisHhaHnsHyb2/Hha/ADN es más difícil de conseguir que en el caso de H-NS/Hha/ADN y por eso no se obtiene una banda bien definida y además el retardo es menor, pero que aún así el complejo entre los tres elementos se forma y el retardo que se observa es mayor que el producido por cada una de las dos proteínas por separado.

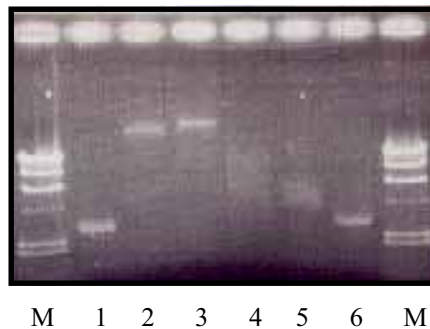


Figura 3.2.22. Ensayo de retardo en gel (agarosa 0'8 %) con el fragmento de ADN R0 y la interacción conjunta de H-NS/Hha y HisHhaHnsHyb2/Hha. M, marcador de peso molecular Fago λ / *HindIII*. Carril 1 y 6, control con el fragmento R0 solo. Carril 2, 0'65 μ g de H-NS. Carril 3, 0'65 μ g de H-NS y 47'18 μ g de Hha. Carril 4, 0'8 μ g de HisHhaHnsHyb2 y 47'18 μ g de Hha. Carril 5, 0'8 μ g de HisHhaHnsHyb2.

Ha sido referido anteriormente que la interacción de la proteína H-NS con la región reguladora del operón hemolítico es específica para determinadas regiones (Nieto *et al.*, 2000) y que no se une de la misma forma a otras. En este punto se quiso comprobar si la interacción de la proteína híbrida por estas regiones también era específica. Para ello se realizó un ensayo de retardo competitivo en el que se coloca por una parte el fragmento específico R0 y por otra parte el fragmento inespecífico denominado Pst. El fragmento Pst, es un fragmento de 1'1 kb, obtenido a través de los oligonucleótidos HlyS y HlyP (Apéndice I, Figura 3.2.23.) también sobre la región reguladora a 5' del operón hemolítico.

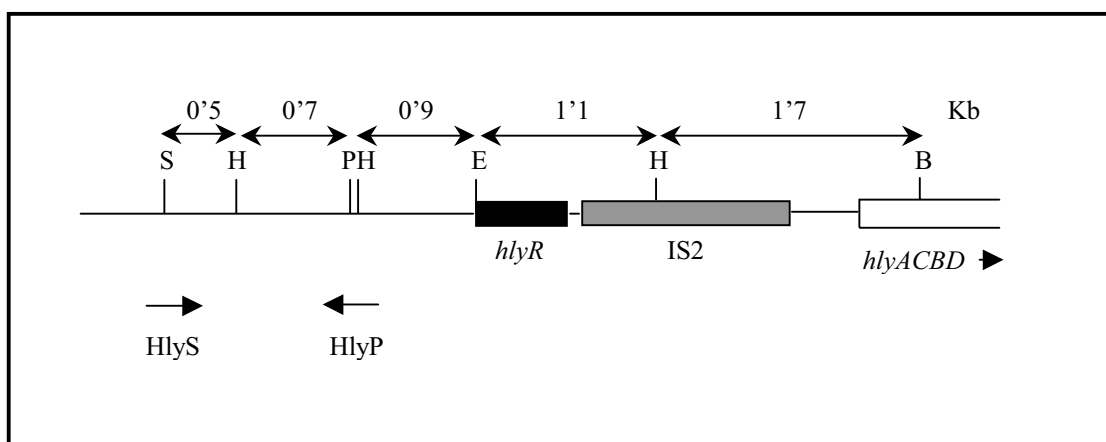


Figura 3.2.23. Esquema del operón hemolítico y su región reguladora. La caja negra es la secuencia reguladora de 650 pb *hlyR*. La caja gris corresponde a la secuencia de inserción entre la región reguladora y el operón hemolítico. La caja blanca muestra el inicio del operón hemolítico *hlyACBD*. Se indican las dianas de restricción S, *SalI*, H, *HindIII*, P, *PstI*, E, *EcoRI*, B, *BamHI* y la distancia en pb entre ellas. Finalmente se muestra la localización de los oligonucleótidos HlyP y HlyS utilizados para la amplificación del fragmento Pst.

El ensayo competitivo consiste en colocar dentro de la misma mezcla, los dos fragmentos de ADN, en este caso tanto el fragmento específico como el inespecífico y ver si se produce el retardo de solo uno de los fragmentos.

En la figura 3.2.24. se puede ver como la proteína H-NS retarda de forma específica el fragmento R0 y no retarda el fragmento Pst. En el caso de la proteína HisHhaHnsHyb2, aunque el retardo del fragmento R0 es menor que con la proteína H-NS a una misma concentración (igual que en los retardos anteriores), también se produce de una forma específica, ya que el fragmento Pst no se ve retardado.

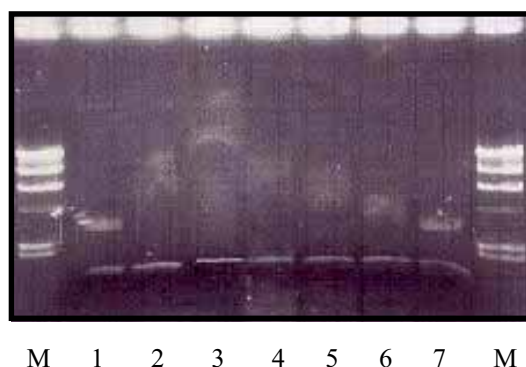


Figura 3.2.24. Ensayo de retardo en gel de competición (agarosa 0'8 %) con los fragmentos de ADN R0 y Pst. M, marcador de peso molecular Fago λ / *HindIII*. Carril 1 y 7, control negativo con los fragmentos R0 y Pst sin proteína. Carril 2, 0'32 μ g de H-NS. Carril 3, 0'65 μ g de H-NS. Carril 4, 4'8 μ g de HisHhaHnsHyb2. Carril 5, 2'4 μ g de HisHhaHnsHyb2. Carril 6, 0'8 μ g de HisHhaHnsHyb2.

3.2.3.5.- Efecto de la proteína HhaHnsHyb2 sobre la expresión del gen *stpA*

Estudios anteriores (Zhang *et al.*, 1996; Sondén y Uhlin, 1996; Free y Dorman, 1997) han descrito que la expresión del gen *stpA* está incrementada a nivel transcripcional en mutantes en el gen *hns*, ya que el gen *stpA* esta regulado negativamente por la proteína H-NS.

Debido a que los resultados obtenidos en el apartado 3.2.3.3. y 3.2.3.4. indican que la proteína HhaHnsHyb2 en ciertas condiciones puede complementar, al menos parcialmente, los fenotipos de un mutante *hns*, se decidió comprobar si esta proteína también es capaz de reducir los niveles de expresión del gen *stpA* al mismo nivel que los de la cepa salvaje. Por esta razón se realizó un ensayo de RT-PCR para analizar las cantidades relativas de ARNm correspondiente al gen *stpA* y se utilizaron las cepas BSN26, BSN27, BSN28, BSN27 (pUC19) y BSN27 (pUCHhaHnsHyb2).

En primer lugar se procedió al aislamiento del ARN total de las diferentes cepas utilizando cultivos en fase exponencial de crecimiento (DO 0'5) (apartado 2.8.1.1.). Además de mirar la expresión del gen *stpA*, también se realizó un control interno con el gen del 16S.

Para la retrotranscripción o transcripción inversa del ARNm a ADN se utilizó el oligonucleótido STPA-RT y 16S1 respectivamente (Apéndice I). Ambos nucleótidos se utilizaron después en el posterior paso de PCR como oligonucleótidos 3' - 5'. Los otros oligonucleótidos utilizados en el paso de PCR, situados en posición 5' - 3' fueron STPA-PCR y 16S3 respectivamente (Apéndice I). Las parejas de oligonucleótidos se añadieron simultáneamente al inicio de la RT-PCR.

Para la elección de los oligonucleótidos del gen *stpA* se tuvo en cuenta dos aspectos, que incluyeran la zona codificante del gen desde el nucleótido +1 hasta el +252 y que estuvieran situados en zonas de unas 20 pares de bases que presentasen poca homología con el parálogo de *stpA*, es decir, con *hns*, ya que sino podría dar lugar a falsos resultados (Figura 3.2.25.).

<i>hns</i>	ATGAGCGAAGCACTTAAAATTCTGAACAACATCCGTA	60
<i>stpA</i>	ATGTCCGTAATGTTACAAAGTTTAAATAACATTCGCACCCCTCCGTGCGATGGCTCGCGAA	60
<i>hns</i>	TGTACACTTGAAACGCTGGAAGAAATGCTGGAAAAATTAGAAGTTGTTGTTAACGAACGT	120
<i>stpA</i>	TTCTCCATTGACGTTCTTGAAGAAATGCTCGAAAAATTCAGGGTTGTCACTAAAGAAAAGA	120
<i>hns</i>	CGCGAAGAAGAAAGCGCGGCTGCTGC - TGAAGTTGAAGAGCGCACTCGTAAATGCAGCA	179
<i>stpA</i>	CGTGAAGAAGAA - GAACAGCAGCAGCGTGAACGGCAGAGCGC - CAGGAAAAAATTAGCA	178
<i>hns</i>	A - TATCGCGAAATGCTGATCGCTGACGGTATTGACCCGAACGAGCTGCTGAATAGCCTTG	238
<i>stpA</i>	CCTGGCTGGAGCTGATGAAAGCTGACGGAATTAACCCGGAAGAGTTATGGGTAATAGCT	238
<i>hns</i>	CCGCCGTTAAATCTGGCACCAAGCTAAACGTGCTCAGCGTCCGGCAAATATAGCTACG	298
<i>stpA</i>	CTGCTGCTGCACCAACGCGCTGGTAAAAAACGCCAGCCGCTCCGGCGAAATATAAATCA	298
<i>hns</i>	TTGACGAAAACGGCGAAACTAAAACCTGGACTGGCCAGGGCCGTA	358
<i>stpA</i>	CCGATGTTAACGGTGAACATAAACCTGGACCGGTACAGGGCCGTACACCGAAGCCAATTG	358
<i>hns</i>	AAAAAGCAATGGATGAGCAAGTAAATCCCTCGACGATTTCTGATCAAGCAATAA	414
<i>stpA</i>	CTCAGGCGCTGGCAGA --- AGGTAAATCTCTCGACGATTTCTGATCTAA -----	405

Figura 3.2.25. Oligonucleótidos utilizados para el ensayo de RT-PCR. En la figura se muestra la secuencia de aminoácidos de los genes *hns* y *stpA*. En gris se señala la situación de los oligonucleótidos STPA-RT y STPA-PCR en el gen *stpA* y su comparación con *hns*.

Antes de realizar la PCR propiamente dicha se realizaron unos ensayos para obtener una concentración de ARN en la que los niveles de *stpA* no estuviesen saturados y permitiesen observar diferencias entre las cepas (con la cepa BSN26). Este proceso fue utilizado tanto para el gen *stpA* como para el ARN 16S y se determinaron las concentraciones en 50 y 0'5 ng respectivamente. El ciclo de PCR utilizado se encuentra descrito en el apartado 2.7.3. de material y métodos.

A continuación, se procedió al ensayo de RT-PCR. Además, se comprobó que los diferentes ARN aislados no estuvieran contaminados con ADN. Para ello se realizó una PCR después de inactivar la transcriptasa inversa y se observó que no hubiera amplificación.

En la figura 3.2.26. (B) se puede ver cómo las diferentes muestras están libres de ADN. El ARN 16S presenta intensidades similares entre las diferentes cepas, control de que se están utilizando concentraciones iguales de ARN.

Cuando se analiza la expresión del gen *stpA* se puede observar como las cepas BSN27 y BSN27 (pUC19) presentan una mayor expresión que la cepa salvaje (BSN26). El mutante *stpA* (BSN28) no presenta expresión de *stpA* (control negativo) y la cepa BSN27 (pUCHhaHnsHyb2) presenta unos niveles de expresión similares a la cepa mutante (BSN27), es decir, mayores que los de la cepa salvaje. Ello sugiere que la proteína HhaHnsHyb2 no afecta a los niveles de expresión del gen *stpA*, al menos no como lo hace la proteína H-NS.

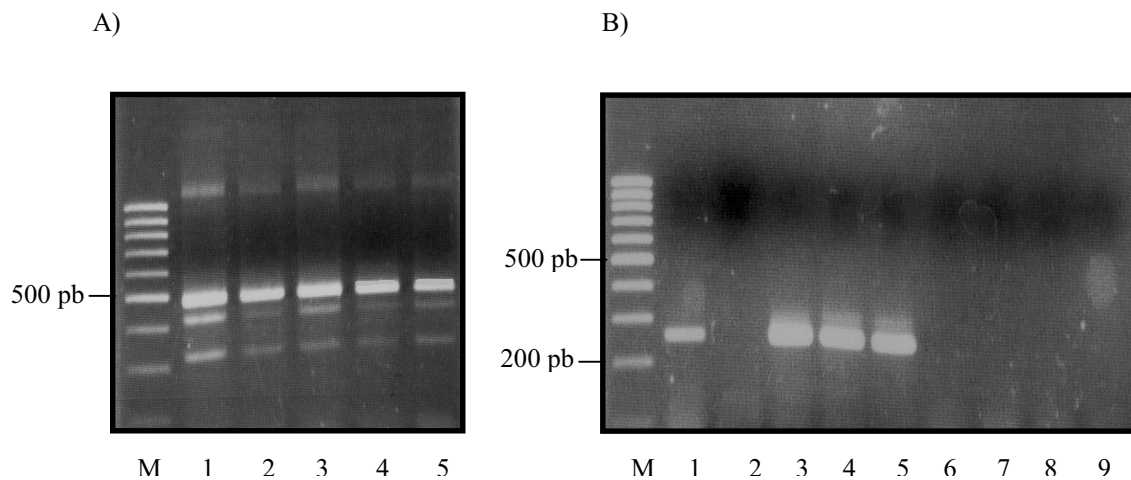


Figura 3.2.26. RT-PCR del gen *stpA* de las cepas BSN26, BSN28, BSN27, BSN27 (pUC19) y BSN27 (pUCHhaHnsHyb2).

- A) RT-PCR del gen 16S, control de cantidad de ARN. M, marcador de peso molecular 100 pb. Carril 1, BSN26. Carril 2, BSN28. Carril 3, BSN27. Carril 4, BSN27 (pUC19). Carril 5, BSN27 (pUCHhaHnsHyb2).
- B) RT-PCR del gen *stpA*. M, marcador de peso molecular 100 pb. Carril 1, BSN26. Carril 2, BSN28. Carril 3, BSN27. Carril 4, BSN27 (pUC19). Carril 5, BSN27 (pUCHhaHnsHyb2). Carriles 6-9, controles de ausencia de ADN de las cepas BSN26, BSN27, BSN27 (pUC19) y BSN27 (pUCHhaHnsHyb2).

3.3.- IDENTIFICACIÓN DEL GEN H-NS DE *Yersinia enterocolitica*

Como ya se ha explicado en apartados anteriores (introducción 3.1.), se conoce la capacidad que tiene la proteína H-NS de *E. coli* para unirse a otras proteínas y de esta manera realizar algunas de sus funciones (Caramel y Schnetz, 1998). Una de las proteínas que se unen a H-NS y forma complejos con ella, es la proteína Hha, juntas participan en la regulación del operón hemolítico y, por tanto, en la producción de la toxina α -hemolisina (Nieto *et al.*, 2000).

Como continuación a este trabajo se decidió comprobar si esta interacción entre Hha y H-NS era una particularidad de *E. coli* o por el contrario podía ser extensible a otras bacterias del grupo entérico, en concreto a *Y. enterocolitica*. En esta especie bacteriana se había encontrado un miembro de la familia de Hha, denominada YmoA. Esta proteína fue caracterizada como represor del regulón de virulencia *yop* en este microorganismo (Cornelis *et al.*, 1991). En cambio no era conocida hasta ese momento la existencia del correspondiente miembro de la familia H-NS en *Y. enterocolitica*.

3.3.1.- UNIÓN DE HisYmoA A H-NS DE *E. coli*

El primer paso para comprobar si la interacción entre Hha y H-NS de *E. coli* es extensible a otros miembros de las respectivas familias, en este caso para YmoA y H-NS en *Y. enterocolitica*, fue comprobar si la proteína YmoA era capaz de interactuar con H-NS de *E. coli*.

En primer lugar se procedió al clonaje del gen *ymoA*. Para ello, el gen *ymoA* fue amplificado por PCR utilizando como molde el ADN de la cepa Y754 de *Y. enterocolitica* (material y métodos 2.6.4.) y como oligonucleótidos las secuencias YEYN y YEYB (Apéndice I). Además, estos oligonucleótidos introducían respectivamente una diana *NdeI* y una diana *BamHI* en los extremos 5' y 3' (Figura 3.3.1.). La temperatura de hibridación utilizada en la amplificación fue de 58 °C y el tiempo de hibridación de 1 minuto.

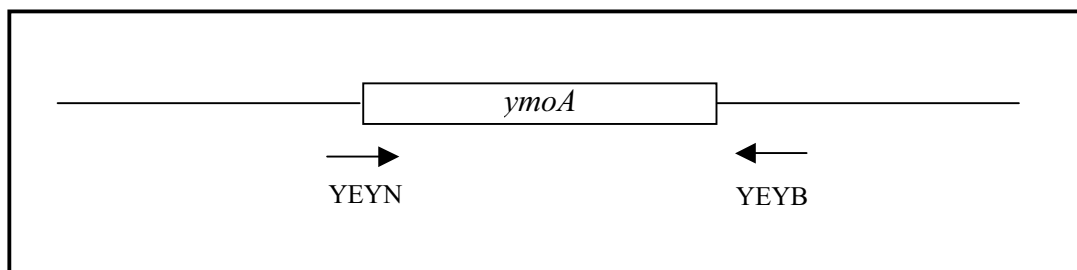


Figura 3.3.1. Situación de los oligonucleótidos YEYN y YEYB utilizados en la amplificación del gen *ymoA*.

El fragmento de 215 pb obtenido a través de la amplificación fue digerido con los enzimas de restricción correspondientes. Posteriormente dicho fragmento fue ligado dentro del plásmido pET3b previamente digerido con los mismos enzimas de restricción. De esta forma se obtuvo el plásmido pETYmoA.

A continuación se procedió a la introducción de una cola de 6 histidinas anterior al triplete de inicio de traducción, de manera que permite obtener una proteína con una cola de histidinas en el extremo N-terminal. Esta cola de histidinas se añadió a través de la unión de dos oligonucleótidos complementarios HISC y HISC-R (Figura 3.1.3.), tal como se había realizado en el apartado 3.1.3. para los mutantes de la proteína Hha. Los dos oligonucleótidos se unen de forma que dejan en ambos extremos una diana *NdeI* y permiten de este modo que sean clonados entre la secuencia del plásmido (pET3b) y el gen (*ymoA*) a través de un lugar *NdeI*.

Se formó un oligonucleótido de doble cadena a partir de una mezcla equimolar en agua bidestilada de HISC y HISC-R a 70 °C y se dejó enfriar. A continuación se realizó la ligación de este oligonucleótido de doble cadena junto con el plásmido pETYmoA linealizado previamente por la diana *NdeI*. El plásmido obtenido se denominó pETHisYmoA.

La mezcla se transformó en la cepa 5K y se comprobaron los clones positivos a través de la amplificación con los oligonucleótidos HISC del inserto y pETBam (Apéndice I) que pertenece al propio vector. La temperatura de hibridación para la amplificación fue de 50 °C.

Una vez obtenida la construcción se procedió a la sobreexpresión de la proteína de fusión HisYmoA (apartado 2.8.1.1.) y al análisis de las proteínas que pudieran copurificar con ella (apartados 2.8.1.2 y 2.8.1.3.).

Para la sobreexpresión de la proteína HisYmoA, el plásmido pETHisYmoA fue introducido en la cepa BL21 (DE3) pLysE de *E. coli*. Los transformantes fueron recogidos e inoculados en 1L de LB y la síntesis de HisYmoA inducida con IPTG. Posteriormente la proteína HisYmoA fue purificada a través del sistema de Ni²⁺-NTA-agarosa y finalmente se analizaron los extractos en geles de SDS-Tricina-PAGE (2.8.3.1.2.).

Los resultados obtenidos (Figura 3.3.2.(A)) pusieron de manifiesto que, junto a la proteína HisYmoA, copurificaba una segunda proteína de un tamaño aproximado de 15 kDa que podría corresponderse con la proteína H-NS de *E. coli*. Para comprobar que realmente se trataba de dicha proteína se realizó posteriormente una inmunodetección (apartado 2.8.4.) con el anticuerpo primario anti-H-NS (Figura. 3.3.2. (B)).

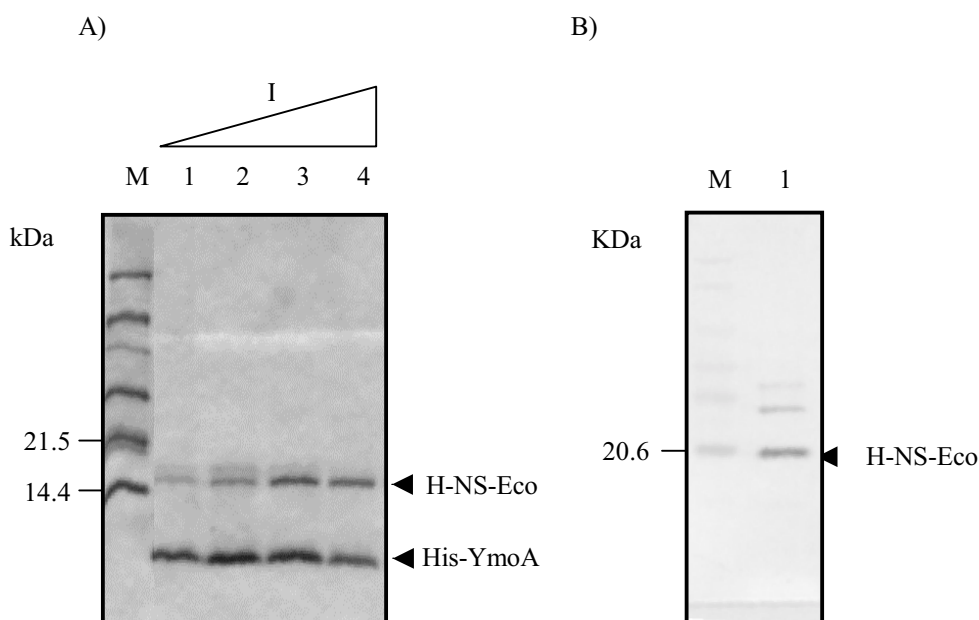


Figura 3.3.2. Interacción de HisYmoA con H-NS de *E. coli*.

- A) Gel SDS-Tricina-PAGE teñido con azul de Coomassie, mostrando las fracciones eluidas con concentraciones crecientes de imidazol (50, 100, 200 y 200 mM) extraídas de la resina Ni²⁺-NTA-agarosa y obtenidas del extracto celular del cultivo de *E. coli* BL21 DE3 (pLysE, pETHisYmoA). M, Marcador de bajo peso molecular (Pre-stained, SDS Standard, Broad Range, Bio-Rad).
- B) Inmunodetección con anticuerpos específicos para H-NS de la fracción 4 del panel A. M, Marcador de peso molecular preteñido (Pre-stained, SDS Standard, Broad Range, Bio-RAD).

3.3.2.- UNIÓN DE HisYmoA A H-NS DE *Y. enterocolitica*

El hecho de constatar que la proteína que copurificaba con HisYmoA era H-NS de *E. coli*, hizo pensar en la posible existencia de un miembro de la familia de H-NS en *Y. enterocolitica*. Además esta proteína podría tener características similares a H-NS de *E. coli* y, por tanto, interaccionar también con Hha e YmoA.

Se decidió comprobar si en el contenido citoplasmático de *Y. enterocolitica* existe una proteína capaz de interaccionar con Hha o YmoA. Por ello el siguiente paso consistió en separar la proteína HisYmoa de *Y. enterocolitica* del complejo HisYmoA/H-NS de *E. coli*. Con este objetivo cuando se obtuvo el extracto de la proteína (2.8.1.1.) no se resuspendió en tampón A, sino en 20 ml de una solución de tampón A que no contenía Imidazol y que presentaba una concentración de KCl de 1'5 M. Este tampón no permite la unión de HisYmoA a H-NS, es decir, no se produce la formación del complejo, pero no interfiere en la unión de HisYmoA con la resina. De este extracto de 20 ml se utilizó la mitad como control, para comprobar que realmente se había obtenido la proteína HisYmoA purificada.

Se pasaron los 10 ml de extracto a través del sistema de Ni²⁺-NTA-agarosa y finalmente se analizaron las fracciones en geles de SDS-Tricina-PAGE (2.8.3.1.2.).

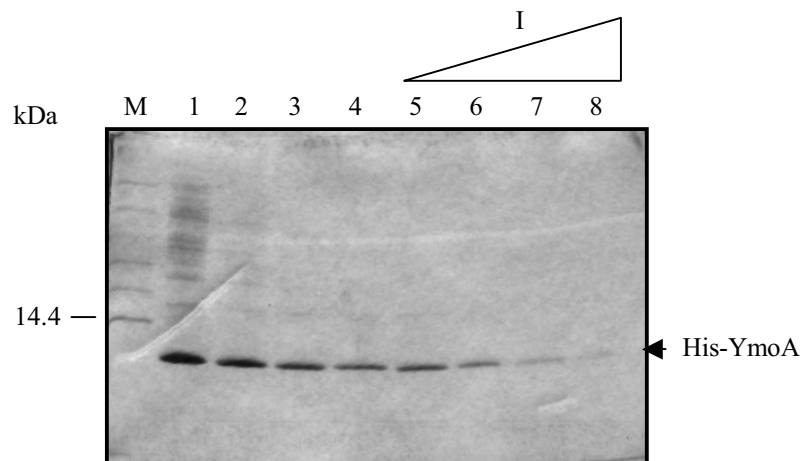


Figura 3.3.3. Análisis electroforético en gel SDS-Tricina-PAGE y tinción con azul de Coomassie de las fracciones utilizadas para obtener la proteína HisYmoa purificada. M, Marcador de bajo peso molecular (Pre-stained, SDS Standard, Broad Range, Bio-Rad). Carril 1-3, lavados con tampón A. Carril 4, lavado con 50 mM de imidazol. Carril 5, lavado con 100 mM de imidazol. Carriles 6-8, lavados con 200 mM de imidazol.

En la figura 3.3.3. se puede observar la proteína HisYmoA ya libre de la presencia de H-NS de *E. coli*.

A continuación se utilizó la otra mitad del extracto (que también contenía HisYmoA purificada) para intentar obtener H-NS de *Y. enterocolitica*. Se mezclaron los 10 ml de extracto de la proteína HisYmoA con 20 ml de un extracto soluble obtenido sobre un cultivo de 1L a DO_{600} 1'0 de la cepa Y754 de *Y. enterocolitica* y con 1 ml de Ni^{2+} -NTA-agarosa. La mezcla se incubó a 4 °C durante 2 horas para permitir la unión de HisYmoA a la resina y H-NS de *Y. enterocolitica* si la hubiera. Posteriormente se eluyeron y analizaron las proteínas unidas a la resina de la forma habitual. Junto a HisYmoA aparecía otra proteína de un peso molecular aproximado de 35 kDa que no se correspondía con el tamaño esperado para la proteína H-NS y además no reaccionaba con los anticuerpos específicos para H-NS de *E. coli*.

Esta proteína parecía tener afinidad por sí misma a la resina y para comprobarlo se obtuvo un nuevo extracto crudo de la cepa Y754 y se mezcló con 500 μ l de resina. La mezcla se incubó durante 2 horas a 4 °C. Cuando se purificaron las proteínas unidas a esta resina, utilizando los lavados habituales con concentraciones crecientes de imidazol, se vio que continuaba apareciendo esta proteína (aun en ausencia de HisYmoA), lo cual indica que no presenta una unión específica a HisYmoA, sino que presenta afinidad por la resina de Ni^{2+} -NTA-agarosa (Figura 3.3.4).

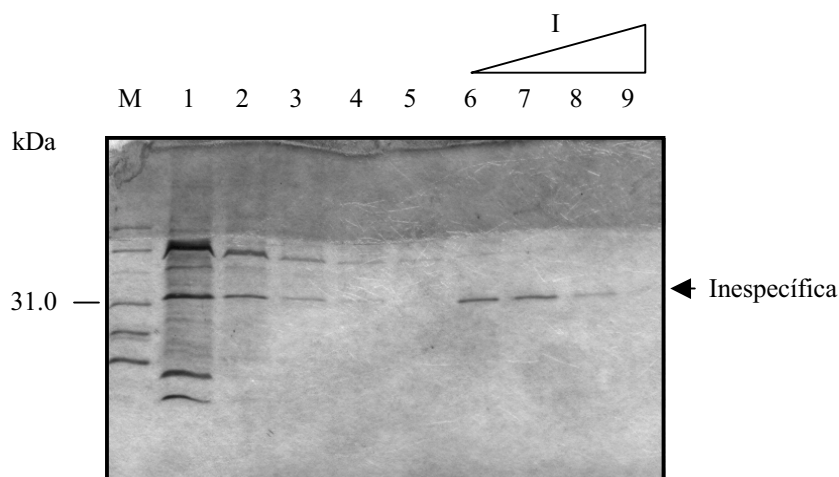


Figura 3.3.4. Análisis electroforético en SDS-Tricina-PAGE de las proteínas de la cepa Y754 unidas a una resina de Ni^{2+} -NTA-agarosa. M, Marcador de bajo peso molecular (Pre-stained, SDS Standard, Broad Range, Bio-Rad). Carriles 1-5, lavados con tampón A. Carriles 6-9, lavados con 200 mM de imidazol.

A continuación, para evitar la interferencia que podría causar esta proteína por su unión inespecífica a la resina, se procedió a eliminar la máxima cantidad posible de ella y de esta forma permitir la máxima unión a la resina de HisYmoA y de las proteínas que pudieran copurificar con ella.

Se realizó la mezcla de un extracto soluble obtenido sobre 1L de cultivo a DO_{600} 1'0 de la cepa Y754 con 1 ml de resina Ni^{2+} -NTA, pero esta mezcla no fue utilizada directamente para hacer el experimento, sino que primero fue centrifugada para eliminar junto con la resina toda la proteína unida inespecíficamente. Finalmente se utilizó el sobrenadante obtenido para hacer el experimento de unión con HisYmoA juntamente con un nuevo volumen de resina.

Una vez obtenidas las fracciones, el siguiente paso fue analizar las proteínas acompañantes de HisYmoA en geles de SDS-Tricina-PAGE (2.8.3.1.2.). En estos geles se podía observar que continuaba apareciendo la proteína de unión inespecífica y también HisYmoA, pero además aparecía una tercera proteína de unos 15 kDa, que copurificaba específicamente con HisYmoA y que reaccionaba con los anticuerpos específicos de H-NS de *E. coli*. (Figura 3.3.5.).

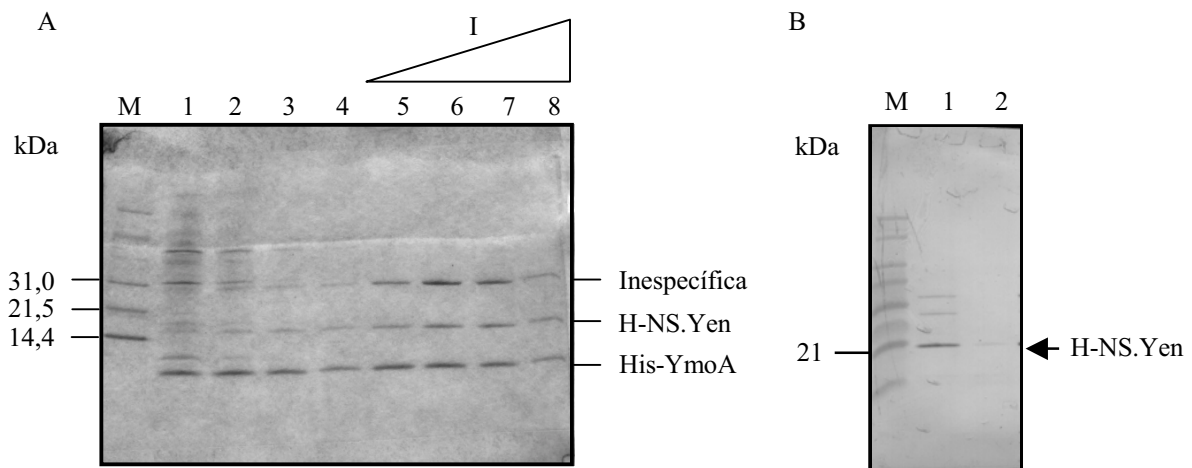


Figura 3.3.5. Interacción de HisYmoA con H-NS de *Y. enterocolitica*

- (A) M, marcador de bajo peso molecular (Pre-stained, SDS Standard, Broad Range, Bio-Rad). Carriles 1-4, lavados con tampón A. Carril 5, lavado con 50 mM de imidazol. Carril 6, lavado con 100 mM de imidazol. Carriles 7-8, lavados con 200 mM de imidazol.
- (B) Inmunodetección de las fracciones 5 y 1 respectivamente del panel anterior, con anticuerpos específicos anti-H-NS de *E. coli*. M, marcador de peso molecular (Pre-stained, SDS Standard, Broad Range, Bio-Rad).

Estos resultados indican que esta proteína de 15 kDa se corresponde con la proteína H-NS de *Y. enterocolitica* y, para confirmarlo, se procedió a la secuenciación del extremo amino terminal de la proteína (apartado 2.8.5.), obteniendo el resultado que se muestra en la figura 3.3.6.

SEALKILNNIRTLRAQAREXTLETLE

Figura 3.3.6. Secuencia de aminoácidos obtenida a través de la degradación de Edman de la proteína de *Y. enterocolitica* que copurifica con HisYmoA.

Esta secuencia de aminoácidos obtenida mediante la degradación de Edman, coincidía exactamente con la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína H-NS de *E. coli*. Sólo existe una excepción, el residuo situado en la posición 20 en *E. coli* es una cisteína, pero esta diferencia puede deberse a que los residuos de cisteína no suelen encontrarse en la secuenciación N-terminal de Edman.

3.3.3.- CLONAJE DEL GEN *hns* DE *Y. enterocolitica*

Una vez visto que la proteína identificada en *Y. enterocolitica* reaccionaba con los anticuerpos de H-NS de *E. coli* y que además la secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal era idéntica a esa misma proteína, se decidió clonar el posible gen *hns* de *Y. enterocolitica* para determinar su secuencia de nucleótidos.

La estrategia utilizada para clonar *hns* de *Y. enterocolitica* se basó en la posibilidad de que ambas proteínas tengan funciones intercambiables ya que, como se vio anteriormente, ambas proteínas tienen características similares. Por una parte H-NS de *E. coli* y H-NS de *Y. enterocolitica* tienen el extremo N-terminal idéntico y, por otra parte, HisYmoA tiene la capacidad de unir H-NS de *E. coli*. Por ello se decidió abordar el clonaje a través de la complementación de un mutante *hns* de *E. coli*, concretamente del fenotipo *bgl* de la cepa BSN27 de *E. coli* (*hns*).

El primer paso para conseguir el clonaje del gen *hns* de *Y. enterocolitica* consistió en la construcción de una genoteca con ADN de la cepa de *Y. enterocolitica* Y754 en el

vector plasmídico pUC19 y transformar la genoteca en la cepa mutante BSN27. Para la construcción de la genoteca, se realizó el aislamiento de ADN cromosómico de la cepa Y754 de *Y. enterocolitica*. A continuación el ADN cromosómico se sometió a una digestión parcial con el enzima de restricción *Sau3A* y se aislaron los fragmentos comprendidos entre 2 y 6 kilobases (kb). Se escogieron fragmentos de este tamaño ya que debido al peso de la proteína y al tamaño del gen *hms* en *E. coli*, el gen que se intentaba clonar no debería tener más de 1 kb. Los fragmentos aislados de geles de agarosa (apartado 2.6.8.) se ligaron al vector pUC19. Este plásmido se digirió previamente con *Bam*HI para permitir la ligación, ya que los enzimas *Sau3A* y *Bam*HI crean extremos compatibles.

El conjunto de plásmidos (ligación) fue transformado en la cepa BSN27 de *E. coli*. Se analizaron aproximadamente 4.000 transformantes. Todas las colonias fueron individualmente picadas con palillos estériles y sembradas en estrías en placas indicadoras de β -glucósido. Entre todas ellas se seleccionaron dos clones que eran capaces de complementar el fenotipo *bgl*, es decir, aparecía la estría de color azul, mientras que el resto de estrías mantenían el color amarillento característico de la cepa mutante BSN27 (Figura 3.3.7).



Figura 3.3.7. Análisis de complementación del fenotipo *Bgl*⁻ de la cepa BSN27 de *E. coli* a través de la genoteca obtenida sobre la cepa Y754 de *Y. enterocolitica*.

El siguiente paso consistió en comprobar si el inserto de los dos clones seleccionados contenía el gen *hns* de *Y. enterocolitica*. Para ello se realizó en primer lugar el aislamiento del ADN plasmídico, recibiendo los plásmidos obtenidos la denominación de pYH-NS1 y pYH-NS3.

Para analizar el tamaño del inserto de estos plásmidos, se realizó una restricción con los enzimas *EcoRI* y *PstI*. Se utilizaron estas enzimas porque se encuentran flanqueando el inserto introducido en pUC19 y por tanto la diana *BamHI* donde se clonaron los fragmentos. El análisis de las restricciones indicó que el plásmido pYH-NS1 contenía un inserto de 3'2 kb, mientras que el plásmido pYH-NS3 contenía un inserto de 500 pb, pareciendo este último demasiado pequeño para contener la secuencia que se buscaba (se confirmó posteriormente por secuenciación). A continuación se analizó mediante inmunodetección (apartado 2.8.4.) si en el extracto crudo de la cepa BSN27 portadora del plásmido pYH-NS1 existía alguna proteína que reaccionase con anticuerpos primarios anti-H-NS. Como se muestra en la figura 3.3.8., aparece una proteína de aproximadamente 15 kDa tanto en el carril de la cepa salvaje (BSN26) como en el carril de la BSN27 portadora del plásmido pYH-NS1, mientras que no aparece en el carril de la cepa BSN27 portadora del vector pUC19. Teniendo en cuenta que el análisis se realizó en la cepa BSN27, cepa *hns*, esta banda ha de corresponder a una proteína codificada por el inserto del plásmido pYH-NS1.

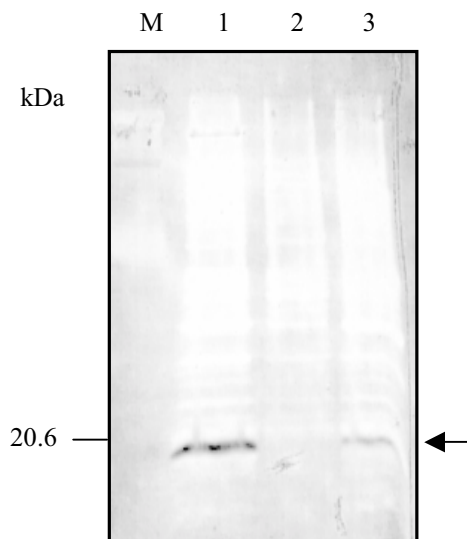


Figura 3.3.8. Inmunodetección de H-NS de diferentes extractos de cepas *E. coli*. M, marcador de bajo peso molecular (Pre-stained, SDS Standard, Broad Range, Bio-Rad). Carril 1, extracto de la cepa BSN27 (pYH-NS1). Carril 2, extracto de la cepa BSN27 (pUC19). Carril 3, extracto de la cepa BSN26.

Finalmente se procedió a la secuenciación del inserto de los dos plásmidos capaces de complementar el fenotipo Bgl^r. Se comenzó utilizando los oligonucleótidos PUCR y PUC19LL que se encuentran flanqueando el inserto clonado en el plásmido pUC19. En el caso de pYH-NS3 no se obtuvo ninguna pauta de lectura abierta, ni tampoco homología. En el caso del plásmido pYH-NS1, debido a que el tamaño del inserto era grande (3'2 kb), se tuvieron que ir diseñando nuevos oligonucleótidos sobre las secuencias obtenidas para llegar a obtener la secuencia completa del fragmento. De esta forma se crearon los oligonucleótidos L2, L3, L4, L5, R1 y R2 de los cuales se puede ver su orientación en la Figura 3.3.9. La secuencia de todos los oligonucleótidos se encuentra en el Apéndice I.

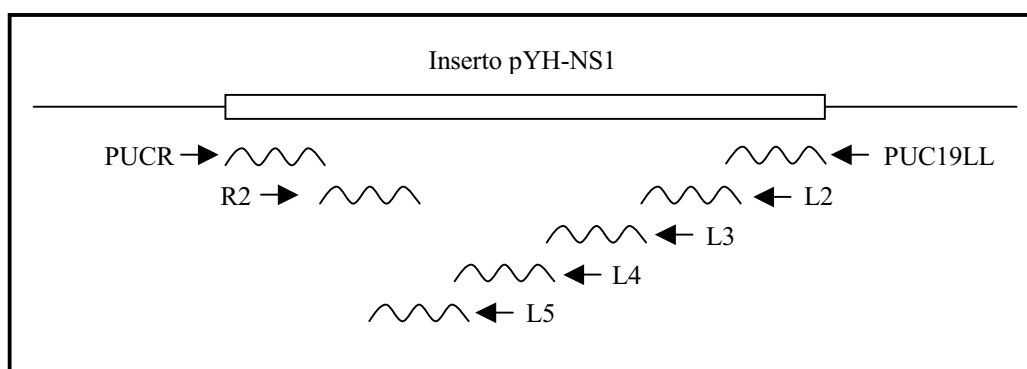


Figura 3.3.9. Situación de los oligonucleótidos para amplificar el inserto del plásmido pYH-NS1.

Después de analizar las secuencias localmente y en las diferentes bases de datos (apartado 2.6.5.), se pudo comprobar que las secuencias obtenidas con los oligonucleótidos L5 y R2 se solapan y que por tanto todo el inserto se encuentra secuenciado. También se vio que el fragmento contiene una pauta de lectura que presenta una elevada homología con las secuencias de genes conocidos de la familia H-NS. Cuando esta secuencia de nucleótidos era traducida a aminoácidos, fue comparada con la secuencia obtenida en el apartado anterior (Figura 3.3.6.) a través de la secuenciación N-terminal de Edman y ver como coincidía de manera exacta. En la figura 3.3.10. se muestra la comparación entre la proteína H-NS de *E. coli* y H-NS de *Y. enterocolitica*.

Eco	1	MSEALKILNNIRTLRAQARECTLETLEEMLEKLEVVNERREEESAAAAEVEERTRKLOQYREMLIADGI	70
Yen	1	MSEALKILNNIRTLRAQARECTLETLEEMLEKLEVVNERREEDSQAQAEIEERTRKLOQYREMLIADGI	70
Eco	71	DPNELLNSLAAVKSG-TKAKRAQRPAKYSYVDENGETKTWTGQGRTPAVIKKAMDEQKSLDDFLIKQ	137
Yen	71	DPNELLNAMAVTKAAATKSKRAARPAKYKYIDENGETKTWTGQGRTPAVIKKAIIEQKSLDDFLI-	136

Figura 3.3.10. Comparación de las secuencias de aminoácidos de la proteína H-NS de *E. coli* (fila superior) y de la proteína H-NS de *Y. enterocolitica* (fila inferior). En negro se resaltan los aminoácidos iguales, en gris los similares y en blanco aquellos aminoácidos que son diferentes.

Una vez obtenida la secuencia de nucleótidos del gen *hns* de *Y. enterocolitica* (Figura 3.3.11), se procedió a introducirla en las bases de datos para que pudiera ser consultada, de forma que se puede encontrar en el GenBank a través del siguiente número de acceso: AJ302081.

1	natataaag	aaacttataa	cttagtgaga	gaatcatggt	cacgagtagg	ctcattagcg
61	agtaaaacga	agattgacgt	taaaaacagc	tcagataata	acaagagaca	tgcgtttatt
121	agtaggaagc	agcaattttt	ctctaataaa	atacgtaaat	tcgagtatgc	taatcaaatt
181	ggctattgca	gaaattaaaa	tagcactcta	ttattatcca	gacgcccccc	cnccaattat
241	aatttgagac	caggacaatg	agcgaagcgt	taaagattct	taacaacatc	cgtactctgc
301	gtgcacaagc	acgtgaatgc	actcttgaaa	cattagaaga	aatgctcgag	aaacttgaag
361	tggtcgtaa	cgaacgccgc	gaagaagatt	cccaggcaca	agcagaaatt	gaagaacgca
421	cacgtaaatt	acagcaatac	cgtgaaatgc	tgattgcaga	tggtattgac	ccaaatgaac
481	tgttgatgc	tatggcagtt	actaaagccg	ctgctactaa	atcaaaacgt	gctgcacgcc
541	ctgctaaata	taagtacatt	gatgaaaatg	gcgaaactaa	aacctggacc	ggccaaggcc
601	gtactccagc	agtgatcaag	aaagccattg	aagagcaagg	taaatcactg	gatgatttcc
661	tgctgtaatc	gtgatagtta	attagctatt	gtgataaaaa	taccttcccta	ttatatgggg
721	ggtatttttt	ttgctctctt	cttaagagtt	aaaattcgac	gcatcccagt	gaagtncttt
781	cccccaanc	ago				

Figura 3.3.11. Secuencia de H-NS de *Yersinia enterocolitica*. En gris se encuentran señalados respectivamente los tripletes de inicio y final del gen.

Coincidiendo con la obtención de estos resultados, otros autores han identificado el mismo gen (Bertin *et al.*, 2001), aunque su trabajo se ha limitado a la obtención de la secuencia de nucleótidos.

3.3.4.- COMPLEMENTACIÓN DE LOS FENOTIPOS β -GLUCÓSIDO Y HEMOLÍTICO DE UN MUTANTE *hns* DE *E. coli* POR EL GEN *hns* DE *Y. enterocolitica*

En el apartado anterior (3.3.3.) se demuestra que el gen *hns* de *Y. enterocolitica* es capaz de complementar el fenotipo Bgl⁻ en un mutante *hns* de *E. coli* (BSN27). De hecho, la capacidad de complementar el fenotipo Bgl⁻ permitió identificar el gen y de esta forma poder conocer el miembro de la familia H-NS en *Y. enterocolitica*. A continuación se decidió comprobar si el gen *hns* de *Y. enterocolitica* era también capaz de complementar el fenotipo hemolítico propio de los mutantes *hns* de *E. coli* portadores del operón *hly*, realizando un análisis de producción de hemolisina.

Para el análisis de la actividad hemolítica se transformó el plásmido pYH-NS1 en la cepa BSN27 portadora del plásmido pHly152 (que contiene el operón hemolítico) y se comparó con las cepas BSN26 (pHly152) y BSN27 (pHly152) (pUC19). Se siguió el protocolo descrito en el apartado 2.8.6.1. y los resultados se muestran en la figura 3.3.12.

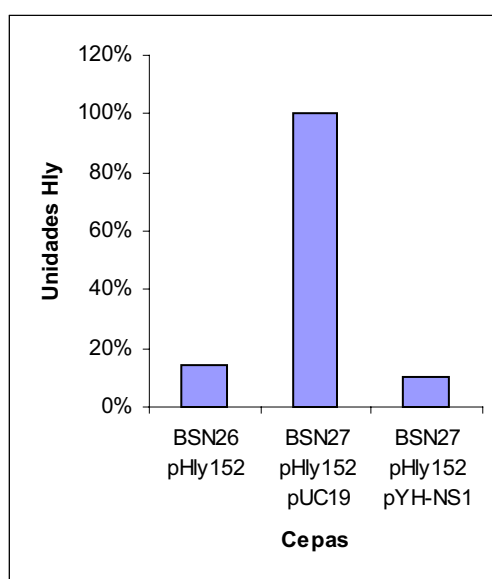


Figura 3.3.12. Efecto del gen *hns* de *Y. enterocolitica* en la producción de α -hemolisina de un mutante *hns* de *E. coli*.

Estos resultados muestran que el plásmido conteniendo el gen *hns* de *Y. enterocolitica* es capaz de complementar el fenotipo hemolítico. Se observa que los niveles de producción de hemolisina se reducen hasta los mismos niveles de la cepa salvaje (BSN26). Cuando se analizaba el crecimiento de estas mismas cepas en placas de agar-sangre se obtenía el mismo resultado, es decir, la cepa portadora del plásmido pYH-NS1 reducía los halos de hemólisis al nivel de la cepa salvaje, mientras que la cepa mutante (BSN27) presentaba unos halos de hemólisis mucho mayores.

3.4.- MUTAGÉNESIS EN EL GEN *hns* DE *Y. enterocolitica*

Una vez identificado el gen *hns* de *Y. enterocolitica*, se planteó como siguiente objetivo la obtención de mutantes en dicho gen a fin de evaluar el papel de la proteína H-NS como modulador de la expresión génica en *Y. enterocolitica*. Anteriormente ya habían sido descritos mutantes para el gen *hns* en otras especies de la familia *Enterobacteriaceae*. Por ejemplo, en *E. coli* la primera mutación de este gen fue descrita en *drdX* (otra forma de denominar al gen *hns*) por Göransson *et al.*, 1990 y también se ha encontrado en especies de *Salmonella* (mutación *osmZ* descrita por Higgins *et al.*, 1988) y en especies de *Shigella* (mutación *virR*, Maurelli y Sansonetti, 1988). Sin embargo no se han podido obtener mutantes *hns* en otras especies bacterianas como *Proteus mirabilis* (Coker *et al.*, 2000), *Bordetella bronchiseptica* (Goyard y Bertin, 1997) o *Y. pseudotuberculosis* (Heroven *et al.*, 2004).

3.4.1.- MUTAGÉNESIS A TRAVÉS DEL PLÁSMIDO pKO3

El primer intento para mutagenizar el gen *hns* de *Y. enterocolitica* se basó en la utilización del vector pKO3 (Link *et al.*, 1997). Se trataba de clonar una copia mutada del gen *hns* de *Y. enterocolitica* dentro de este plásmido que contiene un replicón termosensible y, por tanto, cuando se coloca a una temperatura restrictiva (en este caso 43 °C), no puede mantenerse por sí solo, sino que necesita integrarse en el cromosoma a través de una recombinación homóloga. A continuación, se seleccionó la escisión del plásmido aislando supervivientes en medio con sacarosa, lo que implica la sustitución de la copia salvaje por la mutante.

La construcción de una copia mutada del gen *hns* de *Y. enterocolitica* se realizó a partir del clon de la genoteca que complementaba el fenotipo β -glucósido (obtenido en el apartado 3.3.3.). El plásmido pYH-NS1 se cortó con el enzima de restricción *Bbr*PI. Esta diana de restricción es diana única en este plásmido y se encuentra 57 pb después del inicio del gen. En este lugar se clonó el gen de resistencia a la estreptomycinina (Sm) provocando la rotura de la pauta de lectura del gen *hns*.

El gen de resistencia a estreptomycinina (*aadA1*) fue obtenido a través de la amplificación por PCR a partir del plásmido R100 (Yoshioka *et al.*, 1987). Se utilizaron los oligonucleótidos SmR100F y SmR100R (Apéndice I). Dichos oligonucleótidos flanqueaban el gen de la estreptomycinina y originaban un fragmento de 1'1 kb con una diana *Bbr*PI en los extremos, que permitía el clonaje dentro de pYH-NS1, obteniendo el plásmido pYH-NS-Sm. La temperatura de hibridación utilizada fue de 56 °C y el tiempo de extensión de 1 minuto.

El siguiente paso consistió en clonar el gen *hns* mutagenizado de *Y. enterocolitica* en el vector pKO3. El plásmido pYH-NS-Sm fue cortado con los enzimas de restricción *Sma*I y *Sal*I. Estos enzimas liberan una banda de aproximadamente 3'9 kb que contiene el gen *hns* mutagenizado por la presencia del casete de resistencia a estreptomycinina y además flanqueado secuencias adicionales de ADN de *Y. enterocolitica*. Este material que acompaña al gen es necesario para conseguir posteriormente la recombinación homóloga en el cromosoma. A continuación la banda de interés fue clonada dentro del vector pKO3 cortado con los mismos enzimas de restricción (*Sma*I y *Sal*I) y la construcción obtenida se denominó pKO3*hns*-Sm (Figura 3.4.1.). Antes de continuar se comprobó si el plásmido obtenido era correcto mediante diferentes restricciones simples y dobles (*Sma*I, *Sal*I, *Bbr*PI, *Sma*I-*Sal*I y *Bbr*PI-*Sal*I), que dieron el resultado esperado.

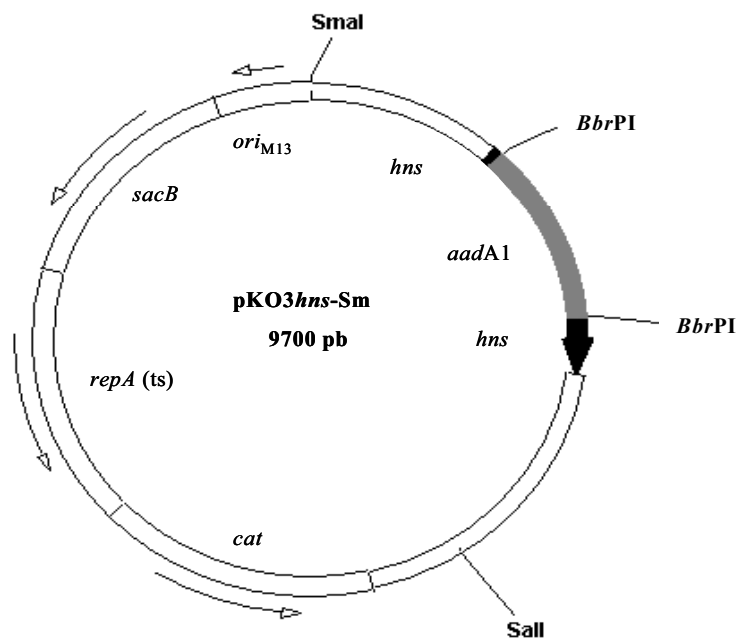


Figura 3.4.1. Estructura del plásmido pKO3*hns*-Sm. Las flechas exteriores muestran la orientación y genes presentes. La flecha negra representa el gen *hns* y el rectángulo gris que lo interrumpe representa el gen resistencia a estreptomicina.

El plásmido pKO3*hns*-Sm fue introducido por electroporación (apartado 2.4.1.2.2.) dentro de la cepa de *Y. enterocolitica* IP383 (portadora del plásmido de virulencia pYV) y de la cepa IP383 p⁻ (cepa isogénica que no presenta el plásmido de virulencia).

El protocolo de mutagénesis a seguir se describe en el apartado de material y métodos 2.5.2. En este experimento, después de la electroporación, cuando se incubaban las placas durante aproximadamente 48 horas, aparecían unas 100 colonias en la dilución 10⁻⁶ resistentes a estreptomicina, es decir, que habían incorporado el plásmido. En cambio, después de subcultivar a 43 °C (temperatura restrictiva para el plásmido que provoca su integración en el cromosoma) y plaquear en sacarosa (para provocar la escisión del mismo), se obtenían únicamente 5-6 colonias. Esto representa una frecuencia muy baja (alrededor de 10⁻⁷) según lo descrito en la bibliografía (Link *et al.*, 1997). Esta frecuencia se correspondería a la de un gen esencial, muy diferente de la frecuencia de 10⁻²-10⁻⁴ que se obtendría al realizar un experimento equivalente en un gen no esencial.

En la figura 3.4.3. se muestra un esquema sobre el proceso esperado para el reemplazamiento alélico en el caso del gen *hns* de *Y. enterocolitica*. Un primer paso (3.4.3. (A)) en el que se produce la integración del plásmido suicida en el cromosoma por recombinación homóloga y un segundo paso (3.4.3. (B)) de escisión y obtención de la mutación, también por recombinación homóloga.

A continuación se analizaron las pocas colonias aparecidas para comprobar qué copia del gen *hns* se encontraba presente en el cromosoma. Para ello se diseñaron un par de oligonucleótidos que se encontraban flanqueando el gen *hns*, a través de los cuales obteníamos una banda de 486 pb en el caso de la copia salvaje del gen y de 1.601 pb en el caso de la copia mutante. Estos oligonucleótidos se denominaron HNSYEF y HNSYER (Apéndice I; Figura 3.4.2.). La temperatura de hibridación utilizada fue de 54 °C y el tiempo de extensión de 30 segundos.

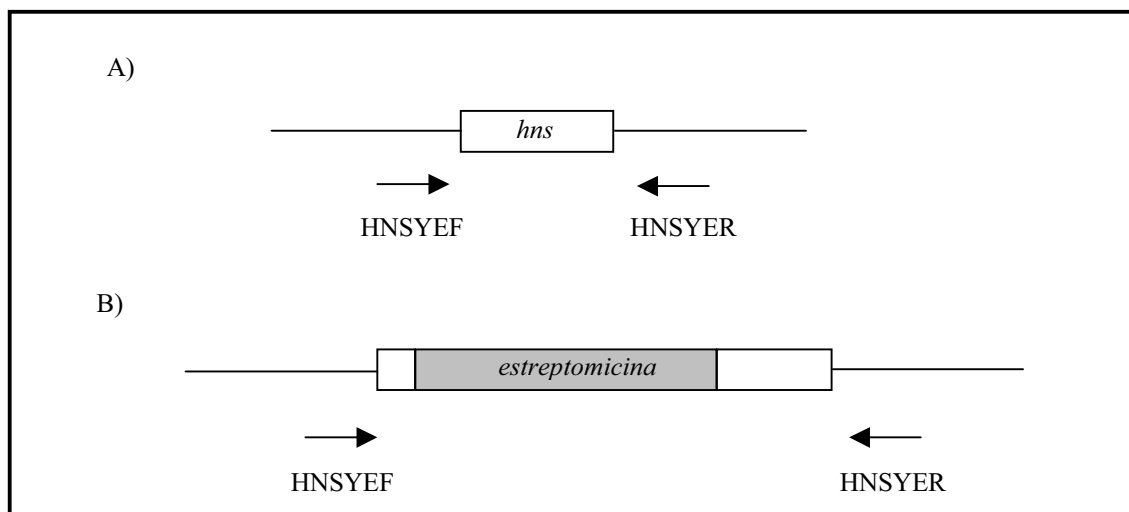
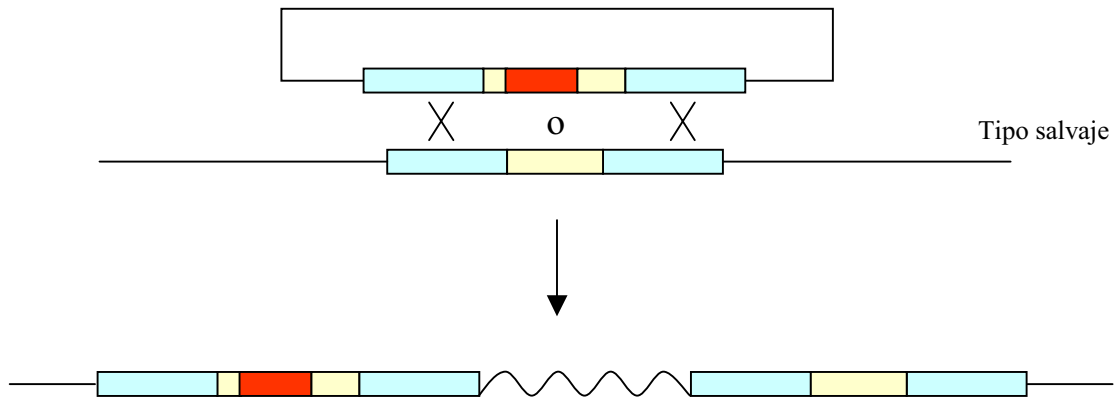


Figura 3.4.2. Situación de los oligonucleótidos HNSYEF y HNSYER utilizados para comprobar la presencia del gen *hns* de *Y. enterocolitica*. En blanco se muestra el gen *hns* y en gris el gen de estreptomicina con que lo mutageniza.

- A) Copia salvaje del gen *hns*.
- B) Copia mutante del gen *hns*.

A) Integración por recombinación homóloga



B) Escisión del plásmido y obtención de la mutación

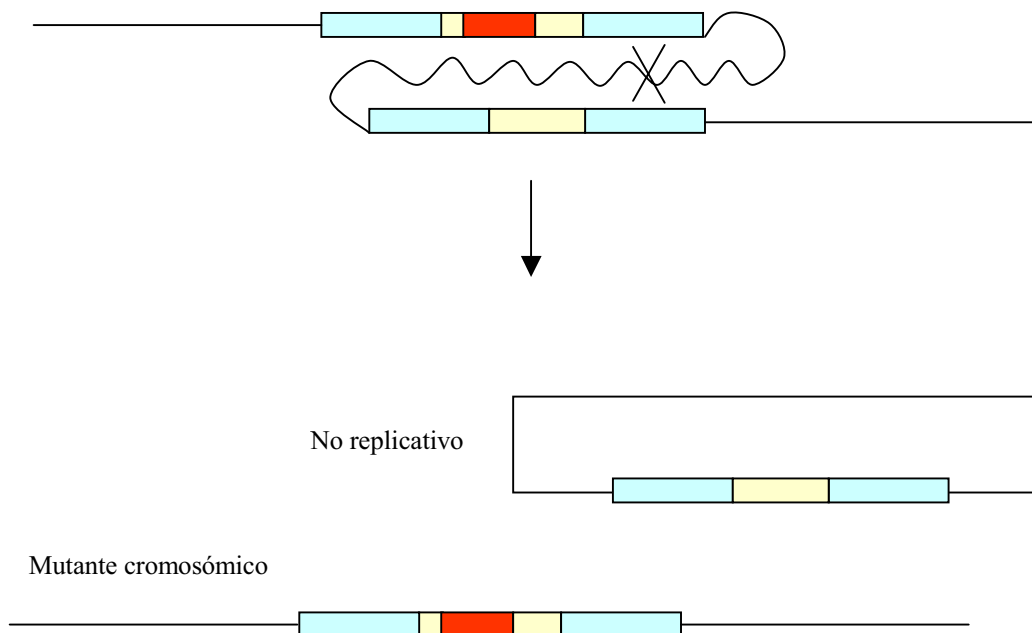


Figura 3.4.3. Reemplazamiento alélico en dos pasos (A y B).

En color amarillo se encuentra representado el gen *hns* de *Y. enterocolitica*. En color rojo, mutagenizando a *hns*, se representa la resistencia a estreptomicina. En color azul, se marca el ADN de *Y. enterocolitica* que flanquea a *hns* y que es necesario para la recombinación homóloga. Las líneas curvas representan el plásmido suicida cuando se encuentra integrado en el cromosoma.

Todas las colonias analizadas, tal y como se puede observar en la figura 3.4.4., presentaban tanto la copia salvaje como la mutante del gen *hns*, lo que indica que mantenían el plásmido. Por tanto, este método no permitió la obtención de un mutante en el gen *hns* de *Y. enterocolitica*.

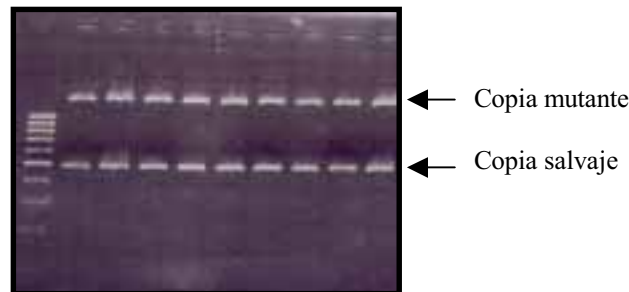


Figura 3.4.4.- Análisis de los fragmentos de PCR obtenidos en la amplificación del gen *hns* de *Y. enterocolitica*. El primer carril corresponde al marcador de 100 pb. El resto de carriles presentan las diferentes colonias analizadas, la banda superior corresponde a la copia mutante del gen *hns* mientras que la inferior corresponde a la copia salvaje del mismo.

3.4.2.- MUTAGÉNESIS A TRAVÉS DEL PLÁSMIDO pUTHns-Sm

3.4.2.1.- Construcción del plásmido pUTHns-Sm

En el apartado anterior, con la utilización del vector pKO3, no se pudo obtener una cepa mutante para el gen *hns* en *Y. enterocolitica*. Por esta razón se decidió realizar un segundo intento de mutagénesis, construyendo un plásmido que tuviera una serie de características más apropiadas para ser aplicado en *Y. enterocolitica*.

Las diferentes cepas de *Y. enterocolitica* son difíciles de electroporar, sobretodo cuando se trata de plásmidos de gran tamaño, por ello, la opción utilizada fue la construcción de un plásmido que fuese conjugativo y suicida.

Se partió de vectores derivados de pGP704 (Miller y Mekalanos, 1988). Estos plásmidos son conjugativos y también suicidas si la cepa en la que se encuentran no presenta la proteína λ pir. En este caso concreto, utilizamos la parte *ori*_{R6K}, *mob*_{RP4} del vector pUTmini-Tn5Km1 (Herrero *et al.*, 1990). En la figura 3.4.5. se muestra el esquema de dicho vector.

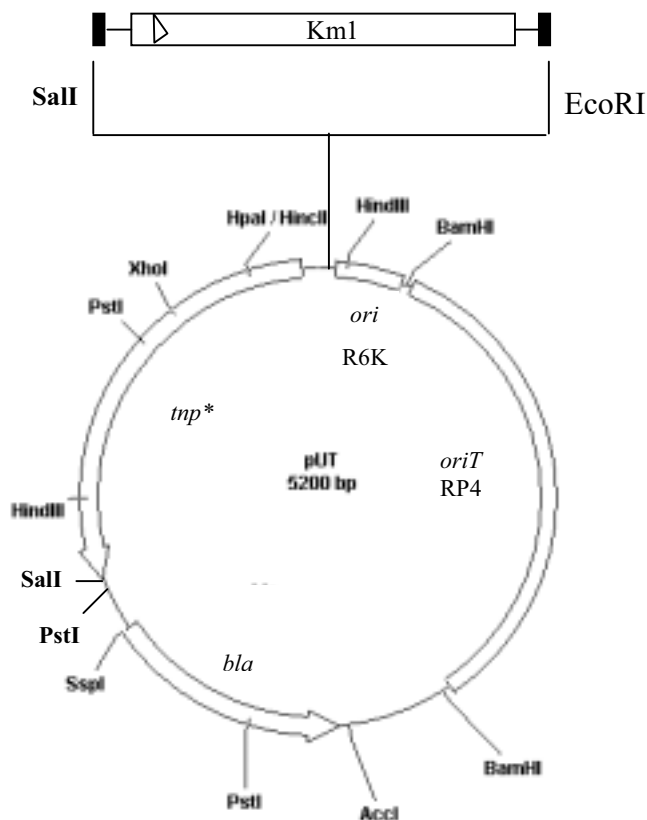


Figura 3.4.5. Esquema del vector pUTmini-Tn5Km1. Se muestra el origen de replicación (*ori_{R6K}*), la región movilizadora (*ori_{TRP4}*), la resistencia a ampicilina (*bla*) y la transposasa truncada (*tnp**). Además se indica la situación del mini-Tn5Km1 y las diferentes dianas de restricción del vector.

Debido a la necesidad de la proteína π para el mantenimiento de los plásmidos derivados del pUT, todas las manipulaciones necesarias en la construcción del plásmido (transformaciones, etc.), fueron realizadas en la cepa SY327 λ pir de *E. coli* (Miller y Mekalanos, 1988).

En primer lugar se cortó el vector pUTmini-Tn5Km1 con los enzimas de restricción *EcoRI* y *SalI*. En esta restricción, tal y como se puede ver en la figura 3.4.5., se obtienen tres bandas. De las tres 3 bandas obtenidas se aisló (apartado 2.6.8.) aquella que tenía un tamaño aproximado de 3'2 kb y que se corresponde con la región que contiene la región movilizadora del vector.

Por otra parte, a partir del plásmido pYH-NS-Sm (obtenido en el apartado anterior) se realizó la restricción *EcoRI* – *SalI*. De esta forma se obtienen 2 fragmentos. Después de

realizar la electroelución del gel de agarosa (apartado 2.6.8.), aquél que tiene un tamaño aproximado de 4'2 kb y que incluye el gen *hns* de *Y. enterocolitica* mutagenizado con el casete de estreptomicina fue seleccionado. A continuación se realizó la ligación entre este fragmento y la parte movilizadora del vector pUTmini-Tn5Km1 obteniendo el plásmido que denominamos pUT*hns*-Sm1 (Figura 3.4.6.).

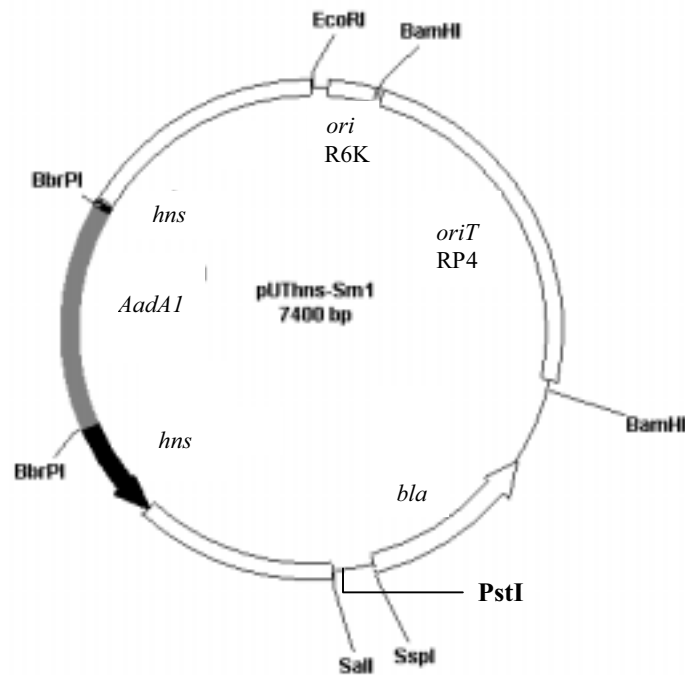


Figura 3.4.6. Esquema del plásmido pUT*hns*-Sm1. Plásmido obtenido a través de la región movilizable del vector pUTmini-Tn5Km1 y del gen *hns* (en negro) mutagenizado con el casete de estreptomicina (en gris) obtenido del plásmido pYH-NS-Sm. También se muestran las dianas de restricción más relevantes.

Para que este plásmido pudiera ser utilizado, se realizaron un par de modificaciones: por una parte se introdujo la resistencia a cloranfenicol, que nos ayudaba a seleccionar el plásmido y, por otra parte, se introdujo el gen *sacB* (de la levansucrasa de *Bacillus subtilis*), que es letal en presencia de sacarosa y permite la contraselección del plásmido.

La resistencia a cloranfenicol se obtuvo por amplificación mediante PCR. Para ello se utilizó como molde el vector pACYC184 (Chang y Cohen, 1978) y los oligonucleótidos CmSalF y CmSalR (Apéndice I). Estos oligonucleótidos se encuentran flanqueando el gen del cloranfenicol y permiten amplificar una banda de 900 pb con una diana *SalI* en cada

extremo. Se utilizó una temperatura de hibridación de 56 °C y 30 segundos de extensión. La banda obtenida fue cortada con el enzima de restricción *SalI* y clonada dentro del plásmido pUT*hns*-Sm1, previamente cortado con el mismo enzima de restricción.

El gen *sacB* fue obtenido a partir del plásmido pSUP104-*sac* (Simon *et al.*, 1991). Se realizó una restricción *PstI* del plásmido y se extrajo por electroelución en geles de agarosa (apartado 2.6.8.) la banda pequeña, de aproximadamente 2'6 kb, que contiene el gen *sacB*. El gen *sacB* presenta una diana *SalI*, por lo que se realizó primero el clonaje del gen que codifica para la resistencia a cloranfenicol, para que esta diana no interfiriera. A continuación se ligó esta banda con el plásmido pUT*hns*-Sm1 cortado previamente con *PstI*. La selección de los plásmidos correctos se realizó a través de la sensibilidad que presentan las cepas portadoras del gen *sacB* a la sacarosa. El plásmido obtenido se denominó pUT*hns*-Sm. Finalmente se realizaron diferentes restricciones con los enzimas utilizados durante la construcción del plásmido, para comprobar que fuera correcto. La estructura final se muestra en la Figura 3.4.7.

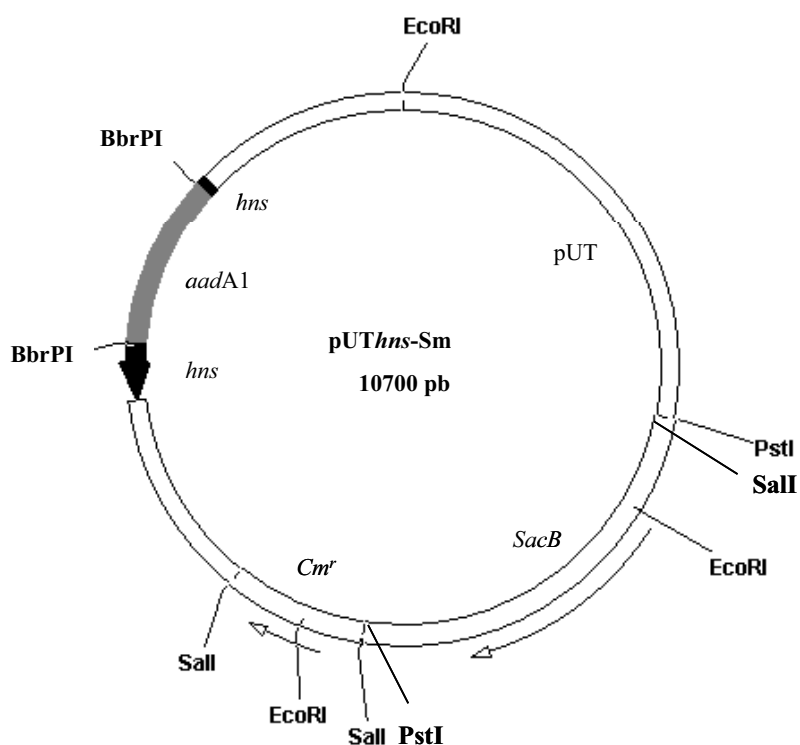


Figura 3.4.7. Estructura del plásmido pUT*hns*-Sm. Las flechas exteriores muestran la orientación y genes presentes. La flecha negra representa el gen *hns* y el rectángulo gris que lo interrumpe representa el gen de resistencia a estreptomicina

3.4.2.2.- Mutagénesis con el plásmido pUTHns-Sm

Una vez construido el plásmido pUTHns-Sm, para realizar la mutagénesis del gen *hns*, fue introducido por transformación dentro de la cepa S17-1 λ pir. Esta cepa era necesaria para la movilización del plásmido y fue utilizada como dadora de la conjugación (apartado 2.4.3.1.). De esta forma se pudo introducir el pUTHns-Sm dentro de la cepa W22703 de *Y. enterocolitica*.

Después de realizar la conjugación, se obtuvieron bastantes colonias resistentes a estreptomicina, es decir, colonias en las que se había producido la integración del plásmido en el cromosoma de la cepa a través de una recombinación homóloga. La frecuencia de inserción era aproximadamente de 10^{-2} .

A continuación se intentó realizar la segunda recombinación homóloga (igual que en el apartado anterior, figura 3.4.3.) que deje la copia mutante en el cromosoma y se pierda la copia salvaje. Para ello se provocó la escisión del plásmido a través del crecimiento en medio líquido (LB) sin cloranfenicol y posterior selección en medio TSA con sacarosa. Se seleccionaron aquellas colonias que mantuvieran la resistencia a estreptomicina y por tanto tuvieran la copia mutante y que además fueran resistentes a sacarosa, es decir, que hubieran perdido el plásmido. La frecuencia esperada en este tipo de experimentos debía ser alrededor de 10^{-2} - 10^{-4} . En contra de lo esperado, la frecuencia que se obtuvo era de 10^{-7} . Estos datos apoyan la idea de que la inactivación funcional del gen *hns* es letal en *Y. enterocolitica*.

Cuando se analizaban estas colonias, el 90% seguían siendo resistentes a cloranfenicol, es decir, mantenían el plásmido y habrían obtenido la resistencia a sacarosa a través de algún tipo de mutación espontánea en el gen *sacB*. Esta situación ya se ha descrito anteriormente en el caso de genes esenciales (Brown *et al.*, 1995). Además cuando se realizaba el análisis por PCR de estas colonias con los oligonucleótidos HNSYEF y HNSYER (Figura 3.4.3.), igual que en el experimento con el plásmido pKO3*hns*-Sm, todas mantenían ambas copias del gen *hns*.

Para posteriores experimentos de complementación (apartado 3.4.4.), se reservó la cepa W22703 con el plásmido pUTHns-Sm integrado, también denominada W22703-18.

3.4.3.- INSERCIÓN EN UN PUNTO

Otra aproximación, bastante diferente a las anteriores, para ver si se podía obtener la cepa mutante en el gen *hns* de *Y. enterocolitica*, fue intentar el experimento de inserción en un punto. En esta técnica no se trata de eliminar totalmente el gen a mutagenizar, sino de obtener un gen y, quizás también, una proteína truncada.

La inserción en un punto se basa en la utilización de un vector suicida que sea portador de un fragmento (no completo) del gen a mutagenizar. Este fragmento realiza una recombinación homóloga con la copia cromosómica de la cepa, de tal forma que el gen queda interrumpido por el plásmido. Con este procedimiento se puede obtener la mutación en un solo paso, ya que no se ha de introducir primero el plásmido y después provocar la escisión del mismo (Figura 3.4.8.).

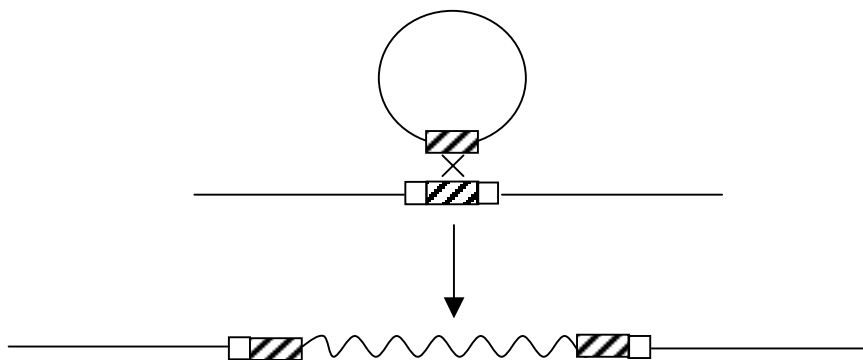


Figura 3.4.8. Esquema explicativo sobre la técnica de inserción en un punto

En este caso utilizamos el vector suicida pDMS197 (Edwards *et al.*, 1998) que permite su selección a través de la resistencia a tetraciclina y su movilización a *Y. enterocolitica* mediante conjugación con la cepa S17-1 λ pir (igual que en el apartado anterior). El vector fue cortado con el enzima de restricción *EcoRI* y se seleccionó la banda de 4 kb. En esta banda no se encuentra el gen *sacB* del que era portador el plásmido, ya que en esta técnica no es necesario provocar la escisión del mismo.

Por otra parte amplificamos un fragmento de aproximadamente 230 pb del gen *hns* de *Y. enterocolitica*, utilizando como molde el plásmido pYH-NS1 y los oligonucleótidos YERIN y YEROUT (Apéndice I; Figura 3.4.9.) que incorporan en los extremos la diana *EcoRI*. La temperatura de hibridación utilizada fue de 54 °C y el tiempo de extensión de 30 segundos.

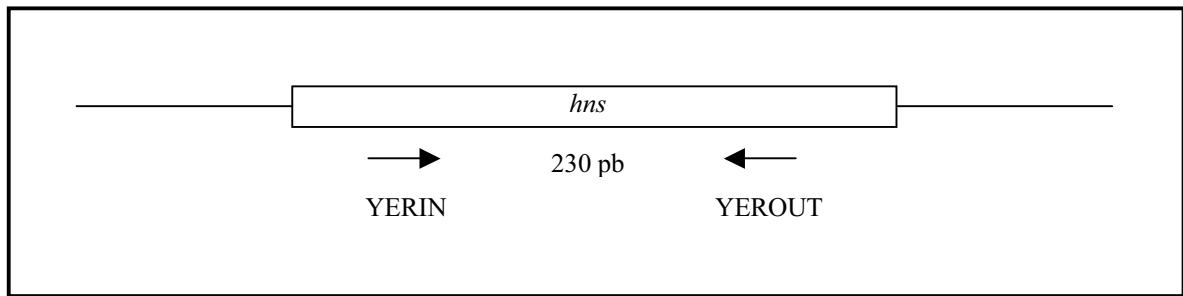


Figura 3.4.9.- Situación de los oligonucleótidos YERIN y YEROUT utilizados para amplificar un fragmento interior de 230 pb del gen *hns* de *Y. enterocolitica*.

El fragmento de PCR obtenido fue clonado dentro del fragmento seleccionado del plásmido pDMS197 y este proceso fue realizado en la cepa SY327 λ pir. Los plásmidos obtenidos fueron analizados para ver si habían incorporado el fragmento. Para ello se utilizó el enzima de restricción *Hind*III, que nos da un tamaño de banda mayor que con el enzima *Eco*RI con el que se hizo el clonaje y, por tanto, más fácil de detectar la banda en un gel de agarosa.

Una vez obtenido el plásmido fue transformado a la cepa S17-1 λ pir para su posterior conjugación a la cepa W22703 de *Y. enterocolitica*.

Las conjugantes deberían presentar la resistencia del plásmido, es decir, la tetraciclina, pero al realizar este experimento no se obtuvieron colonias que cumplieran este requisito y que por tanto fueran mutantes en el gen *hns*. Estos datos apoyan nuevamente la idea de que la mutación de *hns* en *Y. enterocolitica* es letal.

3.4.4.- OBTENCIÓN DE CEPAS MUTANTES EN EL GEN *hns* DE *Y. enterocolitica* POR COMPLEMENTACIÓN EN *trans*.

Una vez obtenidas numerosas evidencias sobre la letalidad de la mutación *hns* en *Y. enterocolitica*, se decidió comprobar si era posible obtener dicha mutación previa complementación en *trans* con una copia del gen *hns*.

3.4.4.1.- Obtención de la mutación *hns* previa complementación con el plásmido salvaje R27

3.4.4.1.1.- Complementación con R27 y R27*hns::Km*

El plásmido R27 de *S. enterica* serovar *typhimurium* es el prototipo de los plásmidos del grupo de incompatibilidad HI1 (IncHI1), responsables de fenotipos de resistencia múltiple a antibióticos. R27 es además un plásmido conjugativo de gran tamaño (180 kb) que puede transmitirse entre diferentes miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y otras bacterias Gram-negativas (Maher y Taylor, 1993).

Este plásmido ha sido secuenciado totalmente (Sherburne *et al.*, 2000) y presenta una particularidad (juntamente con su capacidad conjugativa) por la cual fue utilizado en primer lugar para intentar conseguir el mutante *hns* por complementación en *trans*: R27, dentro de las 210 ORFs hipotéticas identificadas, contiene una ORF denominada Orf164 que es homóloga a HNS, es decir, el plásmido presenta una copia del gen *hns*. En la figura 3.4.10. se muestra una comparación entre la secuencia de aminoácidos de la proteína H-NS de *E. coli* y la proteína de la Orf164 de R27.

HNS	1	MSEALKILNNIRTLRAQARECTLEETLEEMLEKLEVVVNERREEESAAAAEVEERTRKLQYREMLIADGI	70
R27	1	MSEALKSLNNIRTLRAQGRELPLEILEELLEKLSVVVEERRQEESKKAELKARLEKIESLRQLMLEDGI	70
HNS	71	DPNELLSLAAVKSGTKAKRAQRPAYKSYVDENGETKTWTGQGRTPAVIKKAMDEQCKSLDDFLIKQ	137
R27	71	DPBELLSSFSKSGAPKKVREPRPAKYKYTDVNGETKTWTGQGRTPKALAEQL-EAGKKLDDFLI-	134

Figura 3.4.10. Comparación de las secuencias aminoácidas de H-NS de *E. coli* (fila superior) y de la proteína de la Orf164 de R27 (fila inferior). En color negro se resaltan aquellos aminoácidos idénticos, en color gris los similares y en blanco aquellos aminoácidos que son diferentes.

La hipótesis de trabajo contempla la posibilidad de que con la presencia de una nueva copia del gen (aunque no sea propia de la cepa), se pueda obtener la escisión del plásmido integrado llevándose consigo la copia salvaje del gen y dejando la mutante en el cromosoma. El primer paso consistió en conjugar (apartado 2.4.3.2.) el plásmido R27 a la cepa W22703-18 obtenida en el apartado 3.4.2.2. y que presenta integrada en su cromosoma tanto la copia salvaje como la mutante del gen *hns*. Se utilizó como dadora la

cepa *E. coli* (R27) (Sherburne *et al.*, 2000) y la selección de los conjugantes se realizó en placas de McConkey a través de la resistencia a tetraciclina que presenta el plásmido.

A continuación se seleccionó la escisión del plásmido integrado haciendo crecer la cepa W22703-18 *hns* (R27) en un medio líquido (LB) sin cloranfenicol y luego plaqueando en TSA con sacarosa. A diferencia de lo que sucedió cuando se realizó el experimento sin la presencia del plásmido R27, ahora aparecían colonias con una frecuencia mayor (10^{-4}) y además con una asociación entre la resistencia a sacarosa y la sensibilidad a cloranfenicol de entre el 70-90 %. Finalmente se comprobaron estas colonias aparecidas mediante PCR, a través de los oligonucleótidos HNSYER y HNSYEF. Contrariamente a lo sucedido en los experimentos anteriores, en este caso se obtuvieron colonias que presentaban únicamente la copia mutante del gen *hns* (figura 3.4.11.) y, por tanto, se había obtenido una cepa de *Y. enterocolitica* mutante para el gen *hns*.

Paralelamente, también se conjugó a la cepa W22703-18 el plásmido (R27*hns*::Km). Este plásmido corresponde al plásmido R27 en el cual la Orf164 (H-NS) se encuentra mutagenizada a través del transposón mini-Tn5Km1. De esta forma se intenta demostrar que la obtención de la mutación era debida a la presencia de la Orf164 y no a cualquiera de las otras proteínas presentes en el plásmido R27.

Cuando se intentó seleccionar la escisión del plásmido integrado, nuevamente se obtuvo una frecuencia en la aparición de colonias muy baja (10^{-7}) y que mantenían la resistencia a cloranfenicol del plásmido pUT*hns*-Sm. Al realizar la comprobación mediante PCR, estas colonias mantenían ambas copias del gen *hns* (Figura 3.4.11.).

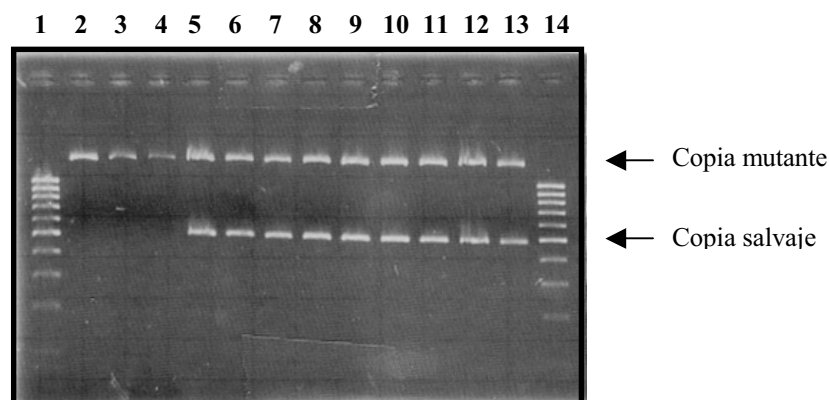


Figura 3.4.11. Análisis de los productos resultantes de la amplificación por PCR del gen *hns* de *Y. enterocolitica*. 1 y 14) Marcador de peso molecular 100 bp-ladder, 2-4) 3 colonias de W22703-18 (R27), 5-13) 9 colonias de W22703-18 (R27*hns*::Km).

En la Tabla (3.4.1.), se muestra un resumen de: 1) la frecuencia combinada de conjugación o electroporación y recombinación de los diferentes plásmidos utilizados para intentar obtener el mutante *hns* en *Y. enterocolitica*, 2) la frecuencia de escisión del plásmido, es decir, de aparición de resistentes a sacarosa, 3) en el caso del vector pUT*hns*-Sm, se muestra la asociación existente entre las colonias resistentes a sacarosa y sensibles a cloranfenicol y 4) la capacidad para obtener la mutación en el gen *hns* de *Y. enterocolitica* a través de la complementación con los diferentes plásmidos.

Tabla 3.4.1.- Tabla resumen de las frecuencias de conjugación, recombinación y escisión con los diferentes plásmidos utilizados para la obtención del mutante *hns* en *Y. enterocolitica*.

	Frecuencia combinada de conjugación y recombinación	Frecuencia de escisión	Asociación Sacarosa ^r -Cloranfenicol ^s (Cm ^s /Sac ^r x 100)	Obtención de la mutación <i>hns</i>
pKO3 <i>hns</i> -Sm	10 ⁻²	10 ⁻⁷	n.a.	-
pUT <i>hns</i> -Sm	10 ⁻²	10 ⁻⁷	10%	-
pUT <i>hns</i> -Sm R27	10 ⁻²	10 ⁻⁴	70-90%	+
pUT <i>hns</i> -Sm R27 <i>hns</i> ::Km	10 ⁻²	10 ⁻⁷	10%	-

n.a. no aplicable.

3.4.4.1.2.- Detección de H-NS de R27 en un mutante *hns* *Y. enterocolitica*

Para comprobar que realmente se había obtenido un mutante *hns* en *Y. enterocolitica*, se obtuvieron extractos de la cepa W22703-18 *hns* (R27) y se analizó la presencia de la proteína H-NS de R27 y no de *Y. enterocolitica*.

En primer lugar se transformó el plásmido pETHisHha en la cepa BL21 (DE3) Δ *hns*::Km- A continuación se recogieron los transformantes que se inocularon en 1L de LB y finalmente se realizó la sobreexpresión, obtención de extractos y purificación de HisHha tal y como se explica en el apartado 2.8.1. de Material y Métodos. La utilización de esta cepa mutante *hns* permite purificar la proteína HisHha libre de H-NS.

Por otra parte también se obtuvo un extracto crudo de la cepa W22703-18 *hns* (R27) (apartado 2.8.1.2.) que se mezcló con la proteína HisHha purificada y con nueva resina (Ni²⁺-NTA agarosa), para posteriormente eluir y analizar qué proteínas copurifican

con HisHha (apartado 2.8.1.3.). Finalmente los extractos se analizaron en geles de SDS-Tricina-PAGE (2.8.3.1.2.).

En la figura 3.4.12. se puede observar que aparece la proteína HisHha y varios agregados (dímero, etc.), pero no aparece un monómero de H-NS. Esto indica la obtención de un verdadero mutante ya que no se detecta la proteína H-NS de *Y. enterocolitica*, aunque tampoco se pudo comprobar la presencia de H-NS de R27.

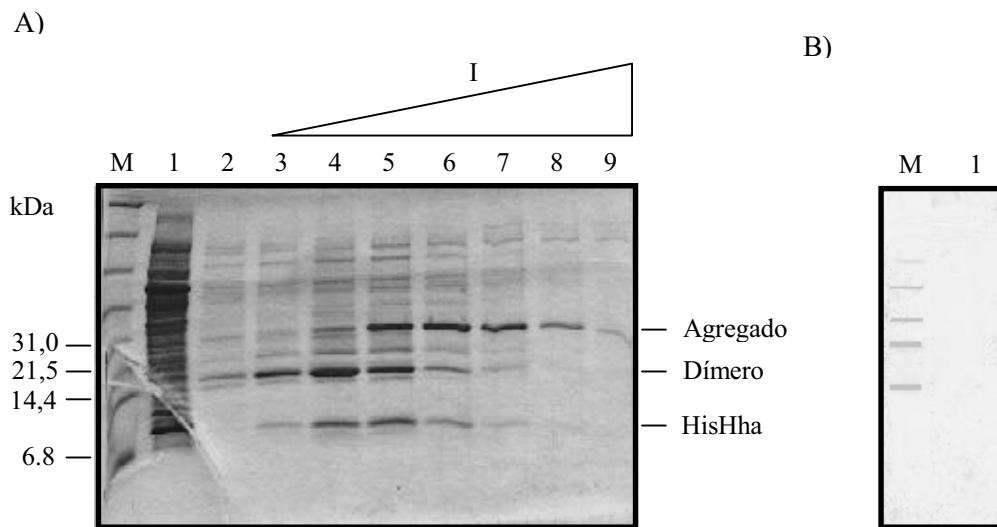


Figura 3.4.12. Análisis de la interacción de HisHha con la Orf164 de R27.

- A) Análisis electroforético en geles SDS-Tricina-PAGE de la interacción de HisHha con un extracto de W22703-18 *hns*⁻ (R27). M, Marcador de bajo peso molecular (Pre-stained, SDS Standard, Broad Range, Bio-Rad). Carriles 1-2, lavados con tampón A. Carril 3, lavado con 50 mM imidazol. Carril 4, lavado con 100 mM imidazol. Carril 5, lavado con 150 mM imidazol. Carriles 6-9, lavados con 200 mM de imidazol.
- B) Inmunodetección del carril 6 del panel anterior con anticuerpos específicos anti-H-NS de *E. coli*. M, Marcador de bajo peso molecular (Pre-stained, SDS Standard, Broad Range, Bio.Rad).

Al no detectar la proteína H-NS de R27, se planteó la posibilidad de que esta proteína no fuera capaz de unirse a Hha y que por esa razón no se detectaba. Para comprobarlo, se introdujeron los plásmidos pETHisHha y R27 conjuntamente a la cepa BL21 (DE3) Δhns . Igual que en los casos anteriores, se realizó la sobreexpresión, obtención de extractos y purificación de las proteínas mediante Ni^{2+} -NTA agarosa

(apartado 2.8.1.). Al analizar las proteínas purificadas en geles de SDS-Tricina-PAGE (2.8.3.1.2.), como se observa en la figura 3.4.13., juntamente con HisHha si aparece una banda atribuible a la Orf164 de R27.

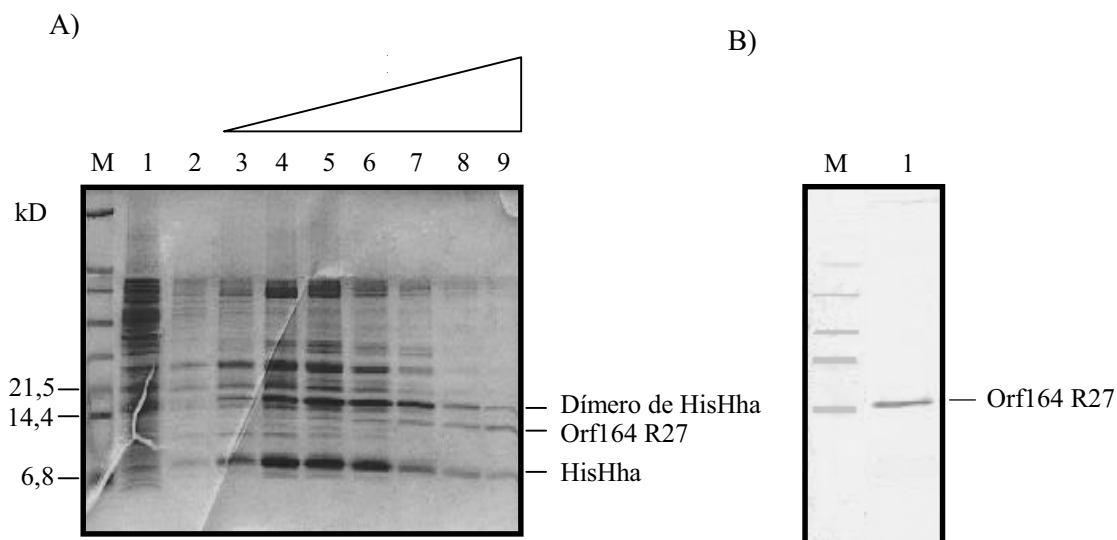


Figura 3.4.13. Interacción de HisHha con la Orf164 de R27 dentro de la cepa BL21 (DE3) $\Delta hms::Km$.

- A) Análisis electroforético en geles SDS-Tricina-PAGE de BL21 (DE3) $\Delta hms::Km$ pETHisHha R27. M, Marcador de bajo peso molecular (Pre-stained, SDS Standard, Broad Range, Bio-Rad). Carriles 1-2, lavados con tampón A. Carril 3, lavado con 50 mM imidazol. Carril 4, lavado con 100 mM imidazol. Carril 5, lavado con 150 mM imidazol. Carriles 6-9, lavados con 200 mM de imidazol.
- B) Inmunodetección del carril 8 del panel anterior con anticuerpos específicos anti-H-NS de *E. coli*. M, Marcador de bajo peso molecular (Pre-stained, SDS Standard, Broad Range, Bio-Rad).

3.4.4.2.- Utilización de diferentes plásmidos de expresión o replicación controlada para la complementación en *trans* de la mutación *hms* de *Y. enterocolitica*.

Una vez que se había obtenido una cepa de *Y. enterocolitica* mutante para el gen *hms* y debido a la esencialidad del gen en esta especie, se intentó la obtención de un mutante letal condicional, es decir, un mutante en el que se pudiera controlar la expresión de la copia de *hms* introducida en *trans*. En este apartado se presentan algunos plásmidos que fueron utilizados para intentar conseguir este objetivo, pero que por diferentes motivos, no dieron el resultado esperado.

pMAK705

El plásmido pMAK705 (Hamilton *et al.*, 1989), presenta dos características que permitieron su utilización: la resistencia a cloranfenicol (Cm20) y un replicón termosensible. Este replicón termosensible hace que el pMAK705 sea un plásmido que replica con normalidad a una temperatura de 30 °C, pero que no puede hacerlo cuando se coloca a una temperatura restrictiva de 42 °C. Debido a esta característica, clonar el gen *hns* en este plásmido, permitiría controlar su expresión cambiando la temperatura de crecimiento de la cepa.

Se decidió utilizar el gen *hns* de *Aeromonas hydrophila* A3. Se disponía de este gen en el laboratorio que fue obtenido por Jose Ignacio Pons de la misma forma que *hns* en *Y. enterocolitica*, es decir, a través de la construcción de una genoteca que complementa el fenotipo *hns* de *E. coli* (apartado 3.3.3.).

En primer lugar se cortaron los plásmidos pMAK705 y pUCHNSAER (pUC19 que contiene el gen *hns* de *A. hydrophila*) con los enzimas de restricción *Bam*HI y *Sal*I. En el caso de pUCHNSAER se recortó la banda de 1.953 pb (apartado 2.6.8.). Los fragmentos fueron ligados y transformados en la cepa 5K. A continuación se seleccionó un plásmido correcto, pMAK-HNSAER y se electroporó a la cepa W22703-18 (obtenida en el apartado 3.4.2.2.).

Del resultado de la electroporación aparecieron pocas colonias, muy pequeñas y que no crecían bien. Además, de estas cepas no fue posible aislar el plásmido. De estos datos se deduce que el plásmido no era capaz de introducirse o replicarse correctamente en *Y. enterocolitica*.

pKD46

El plásmido pKD46 (Datsenko y Wanner, 2000) presenta resistencia a Ap (Ap50) y un promotor arabinosa que permitiría controlar la expresión del gen *hns*.

El primer paso consistió en amplificar el gen *hns* de *E. coli* a través de los oligonucleótidos ETF y ETR (Apéndice I) y utilizando como molde el plásmido pETH-NS. Estos oligonucleótidos se encuentran flanqueando el gen *hns* de *E. coli* e incorporan la diana *Eco*RI en su secuencia. La temperatura de hibridación utilizada fue de 56 °C, el tiempo de hibridación de 1 minuto y el tiempo de extensión de 30 segundos. El fragmento obtenido, de 580 pb, fue después cortado con el enzima de restricción *Eco*RI para clonarlo en el pKD46 cortado con el mismo enzima de restricción. En este caso no se pudo obtener el clonaje.

pLAC22

El plásmido pLAC22 (Warren *et al.*, 2000) es un plásmido resistente a ampicilina y tetraciclina (Ap50, Tc12'5) y que presenta un promotor *tac* dependiente de la inducción con IPTG. La presencia o no de IPTG permitiría controlar la expresión del gen *hns*.

Se intentó realizar el experimento de complementación de una manera diferente, cambiando el promotor del gen *hns* dentro de la propia cepa W22703 de *Y. enterocolitica*.

El proceso consiste en utilizar un fragmento interno del gen *hns*, clonarlo bajo un promotor inducible por IPTG y que se produzca una recombinación homóloga entre este fragmento y la copia cromosómica del gen. De esta forma el fragmento interno del gen *hns* queda bajo el control del promotor del gen y la copia salvaje del gen queda bajo el control del promotor inducible por IPTG. La figura 3.4.14. muestra el resultado que se espera.

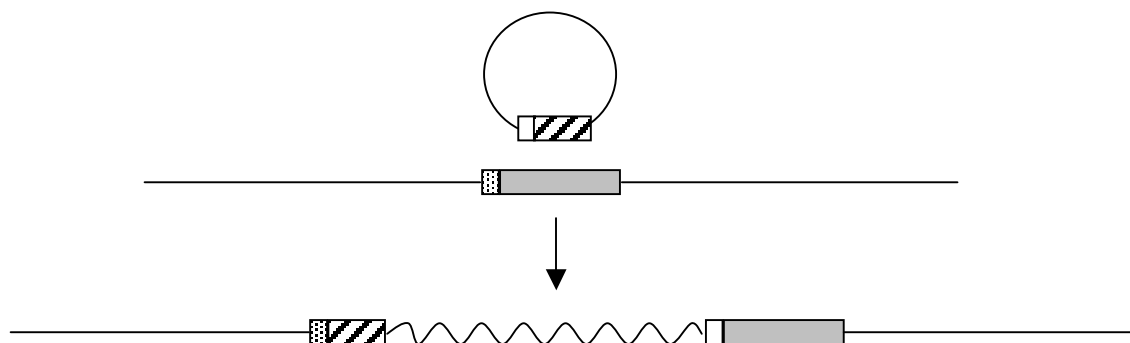


Figura 3.4.14. Esquema para el cambio de promotor. El rectángulo blanco representa el promotor inducible por IPTG, el rectángulo con bandas diagonales representa el fragmento interno del gen *hns*, el rectángulo punteado representa el promotor de *hns* y el rectángulo gris representa la copia cromosómica del gen *hns*.

Se amplificó el fragmento de 174 pb del gen *hns*, utilizando como molde la cepa Y754 de *Y. enterocolitica* y como oligonucleótidos, HNSYE1F y HNSYE2R (Apéndice I; Figura 3.4.15.), que generan una diana *Bgl*III en los extremos. Se utilizó una temperatura de hibridación de 50 °C y un tiempo de extensión de 30 segundos.

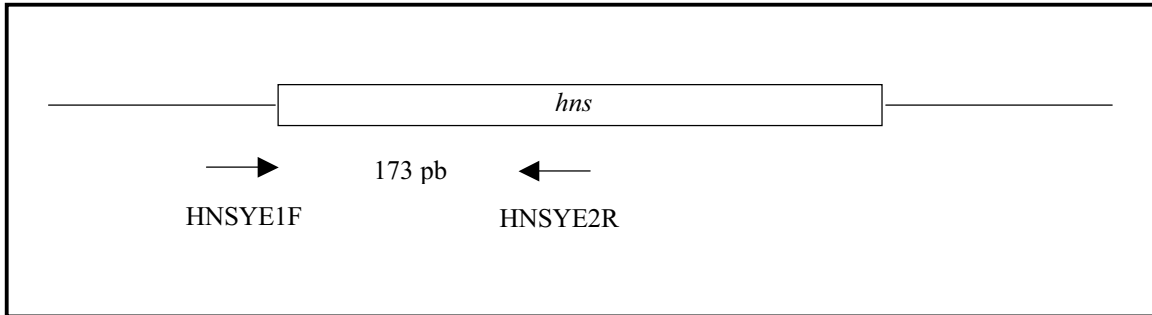


Figura 3.4.15. Situación de los oligonucleótidos HNSYE1F y HNSYE2R utilizados para amplificar el fragmento interno del gen *hns* de *Y. enterocolitica*.

Tanto el producto de PCR como el plásmido pLAC22 fueron cortados con el enzima de restricción *Bg*/III y posteriormente ligados y transformados en la cepa 5K. Una vez seleccionado el plásmido correcto que se denominó pLAC22-HNSYER (a través de una restricción *Hpa*I se puede ver si hay inserto y su orientación), se decidió transportar el fragmento del gen *hns* junto al promotor inducible por IPTG a un plásmido conjugativo (pFS100, resistente a Km 50) para facilitar su incorporación a la cepa W22703 de *Y. enterocolitica*. Para poder realizar este paso, se utilizaron los oligonucleótidos TETINV y PLAC22 (Apéndice I; Figura 3.4.16.) que flanquean el fragmento deseado y uno de ellos incorpora la diana de restricción *Eco*RI. La temperatura de hibridación utilizada fue de 56 °C y el tiempo de extensión de 2 minutos.

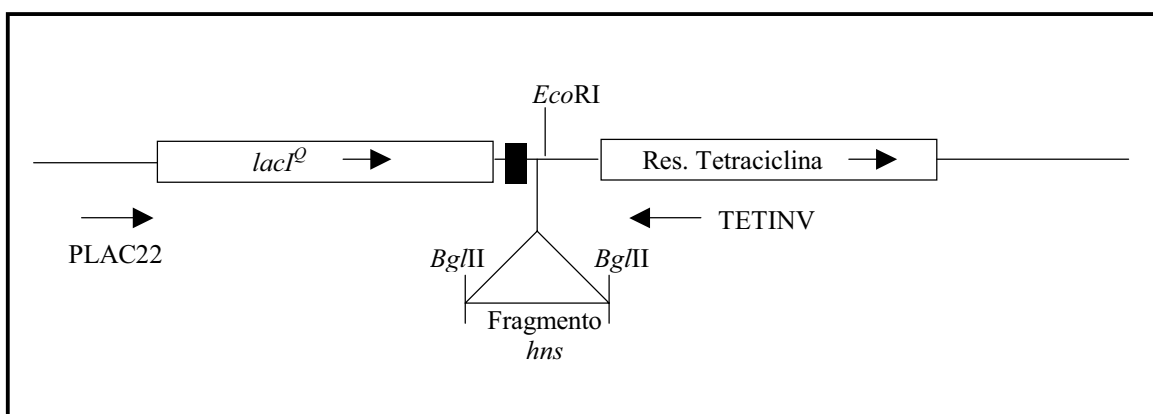


Figura 3.4.16. Situación de los oligonucleótidos PLAC22 y TETINV utilizados para extraer el promotor y el fragmento del gen *hns* del plásmido pLAC22-HNSYER. La caja negra muestra al promotor *lac*PO. Se indica la situación del inserto y de la diana *Eco*RI utilizada para el posterior clonaje juntamente con la presente en el oligonucleótido PLAC22.

El fragmento amplificado de aproximadamente 1'5 kb y el plásmido pFS100 fueron cortados con el enzima de restricción *EcoRI*, ligados y transformados en la cepa S17-1 λ pir dadora de la conjugación a W22703. Los conjugantes fueron plaqueados en diferentes concentraciones de IPTG (10 μ M, 100 μ M y 1 mM) y también con glucosa 0'2 %, sorbitol 1M y/o betaina 2'5 mM (reducen la formación del complejo CAP/AMPc), pero se obtuvieron muy pocas colonias y cuando fueron analizadas no presentaban la integración del plásmido. Además, en el análisis por PCR de las colonias resultantes del experimento a través de los oligonucleótidos R2 y YEROUT (Figura 3.3.9. y 3.4.9. respectivamente), aparecía exclusivamente la forma salvaje de la región *hns*. Estos datos sugieren que no se produce la inserción que hubiera llevado al cambio de promotor.

Este mismo proceso se intentó utilizando el plásmido ptac85 (Marsh, 1986) en lugar de pLAC22 pero clonando el fragmento en *BamHI* y también transportando el fragmento al plásmido conjugativo pFS100, pero esta construcción tampoco dio los resultados esperados.

Los vectores pKil194T (Gabant *et al.*, 1998), pJBSD1 (Karunakaran, *et al.*, 1999) y (Skerra, 1994) tampoco dieron un resultado positivo.

RNAI (pACYC184)

La secuencia RNAI, como RNA regulador antisentido, podría modular el número de copias de un plásmido con un origen de replicación p15A cuando se encuentra clonado bajo un promotor *ptac* en el cual se encontrara una copia complementadora de *hns*. Para comprobarlo, se clonó la banda RNAI obtenida a través de los oligonucleótidos RNAIBgl y RNAIBgl(2) (Apéndice I). Dichos oligonucleótidos se sitúan sobre el origen de replicación del plásmido pACYC184 y amplifican un fragmento de 166 pb que va desde la posición 1239 a 1395. La temperatura de hibridación utilizada fue de 54 °C y el tiempo de extensión de 1 minuto. La banda amplificada fue cortada con el enzima *BglII* y clonada dentro del ptac85 cortado con *BamHI*.

Se obtuvieron varios clones que incorporaban uno, dos o tres insertos de RNAI. Todos ellos fueron transformados en la 5K (pACYC184) para ver si tras la adición de IPTG se producía una inhibición de la replicación del pACYC184, pero el efecto era bastante reducido, por lo que no se siguió adelante con esta estrategia.

3.4.4.3.- Obtención de la mutación *hns* a través del plásmido pJOB101

El plásmido pJOB101 (Johansson *et al.*, 2001) presenta básicamente dos características que permitieron su utilización: por una parte presenta clonado bajo un promotor *tac* inducible por IPTG una copia del gen *hns* de *E. coli*, concretamente en las dianas *EcoRI/BamHI* y por otra parte es un plásmido conjugativo (*ori*_{TRP4}) que puede ser movilizado cuando se utiliza como dadora una cepa como la S17-1 (Simon *et al.*, 1983) que contiene el plásmido IncP (RP4) insertado en su cromosoma y que le otorga las funciones de movilización. Sin embargo, la resistencia a ampicilina (Ap 50) que presenta no puede ser utilizada para su selección en *Y. enterocolitica*. Por esta razón, en primer lugar se procedió a cambiar la resistencia del plásmido pJOB101.

Las múltiples dianas de restricción que presentan tanto el plásmido como el gen de resistencia a kanamicina (pFS100) no permiten el cambio de resistencia a través de la recombinación de fragmentos de ADN obtenidos “in vitro”. Por ello, el proceso utilizado fue la incorporación de la resistencia a kanamicina mediante inserción de mini-Tn5Km1.

En primer lugar se realizó la conjugación (apartado 2.4.3.1.) de la cepa S17-1 λ pir (pUTmini-Tn5Km1) a la cepa BSN27 (pJOB101) y se seleccionaron los conjugantes resistentes a kanamicina y tetraciclina, es decir, aquellas colonias de la cepa BSN27 que hubieran incorporado el plásmido pUTmini-Tn5Km1. A continuación se aislaron los plásmidos de estos conjugantes y se transformaron a la cepa 5K seleccionando resistentes a kanamicina. De esta forma se obtenían aquellos plásmidos derivados de pJOB101 que hubieran incorporado la resistencia. Finalmente, para asegurar que la inserción no se producía en alguna de las funciones necesarias del pJOB101, se buscaron aquellos plásmidos que tuvieran la inserción de kanamicina dentro del gen de resistencia a ampicilina. Para ello se repicaron con palillos estériles las colonias de 5K (pJOB101-km) en placas con kanamicina y kanamicina más ampicilina. Finalmente, se seleccionaron aquellas que fueran kanamicina resistentes y ampicilina sensibles. De las mismas se aisló el ADN plasmídico y se realizaron restricciones con los enzimas *EcoRI*, *PstI* y *EcoRI/PstI* comparándolos con el plásmido pJOB101 para comprobar que la construcción fuese correcta.

Una vez obtenido, el plásmido pJOB101-km fue transformado a la cepa S17-1 λ pir para poder conjugarlo a la cepa de *Y. enterocolitica* W22703-18 portadora de la copia mutante y salvaje del gen *hns*. Se obtuvieron bastantes conjugantes y se comprobó que realmente habían incorporado el plásmido pJOB101-km través de su aislamiento.

Finalmente se procedió a realizar el experimento para obtener el mutante en el gen *hns* (igual que en el apartado 3.4.2.2.).

En primer lugar se inoculó la W22703-18 (pJOB101-km) en medio LB sin cloranfenicol a 30 °C para permitir la escisión del plásmido (segundo paso de la doble recombinación homóloga necesaria para el reemplazamiento alélico) y luego se plaqueó en medio TSA (más los antibióticos Nal Sm Km) suplementado con 5 % sacarosa y también con diferentes concentraciones del inductor IPTG (1 μ M, 10 μ M y 100 μ M). Las placas fueron incubadas a 30-37 °C y en ambas temperaturas únicamente aparecieron colonias a la concentración de 1 μ M de IPTG. Se analizó por PCR con los oligonucleótidos HNSYER y HNSYEF (Figura 3.4.3.) qué copia del gen *hns* se encontraba en estas colonias, presentando todas ellas la copia mutante. Sorprendentemente, estas cepas eran capaces de crecer en un medio que no tuviera IPTG de igual forma que lo hacían en presencia de 1 μ M del inductor, indicando que la expresión basal del gen *hns* dentro del plásmido pJOB101 era suficiente para compensar la letalidad de la mutación.

Para intentar reducir esta expresión basal se realizó el crecimiento de la cepa W22703-18 *hns* (pJOB101) en presencia de 1 % de glucosa (reduce la formación del complejo CAP/AMPC) y también del producto 2-nitrophenyl- β -D-fucoside 1 mM (ONPF, Jayaraman *et al.*, 1966), descrito como antiinductor de la expresión del promotor *lac* a través de su unión al represor LacI cuando se une a las secuencias *lacO*. En la figura 3.4.17. se muestran las curvas de crecimiento de estas cepas y se puede ver que las diferencias de crecimiento son bastante pequeñas en las diferentes condiciones ensayadas.

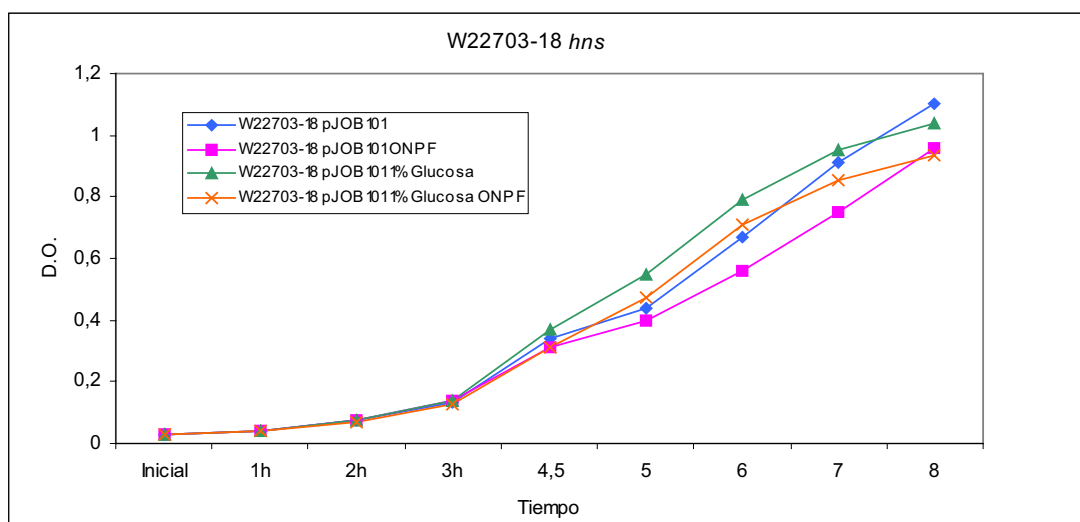


Figura 3.4.17. Curva de crecimiento de la cepa W22703-18 *hns* en diferentes condiciones (presencia de glucosa y/o ONPF).

3.4.4.4.- Obtención del plásmido pJOB_{LacO4}

A fin de intentar reducir la expresión basal del gen *hns*, se planteó la construcción de un plásmido derivado del pJOB101. Para conseguir esta reducción en la expresión basal, se intentó introducir secuencias *lacO* (lugar de unión del represor) tras la región promotora, justo antes del gen *hns*. También se intentó situar la resistencia a un antibiótico, tetraciclina.

Por una parte se obtuvo la resistencia a tetraciclina a través de la restricción con el enzima *EcoRI* del plásmido pUTmini-Tn5Tc, extrayendo la banda de 2'1 kb del gel de agarosa (apartado 2.6.8.).

Por otra parte se obtuvo la región operadora *lacO* a través de los oligonucleótidos LacO1 y LacO2, que además dejan en los extremos la secuencia adecuada para poder ligarse después entre ellos o a fragmentos provenientes de una restricción *EcoRI* (Figura 3.4.18.).

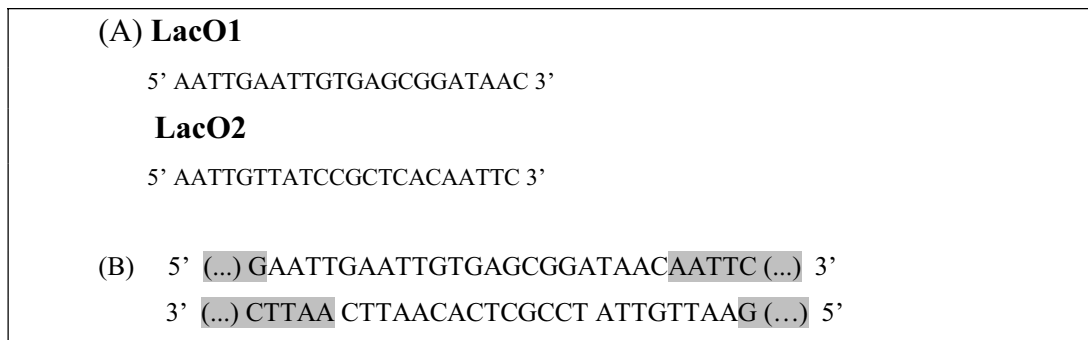


Figura 3.4.18. (A) Secuencia de los oligonucleótidos LacO1 y LacO2.

(B) Secuencia operadora *lacO*. En gris se muestran los fragmentos digeridos *EcoRI* con los que se liga esta secuencia operadora y en blanco los oligonucleótidos, LacO1 en la parte superior y LacO2 en la inferior.

La formación de este oligonucleótido de doble cadena formado a partir de LacO1 y LacO2 se obtuvo tras la incubación de una mezcla de 5 µg de cada uno de ellos en 100 µl de H₂O bidestilada a 80 °C. A continuación la mezcla se dejó enfriar lentamente y fue tratada con PNK (polinucleotidoquinasa). Este enzima introduce los fosfatos necesarios en el extremo 5' para que varios de estos oligonucleótidos de doble secuencia se puedan ligar entre sí.

Una vez obtenida la secuencia operadora *lacO* y la resistencia a tetraciclina, se realizaron dos ligaciones diferentes, una que incluía estos dos elementos y el plásmido pJOB101 tratado con el enzima de restricción *EcoRI* y otra en la que no se incluía la resistencia a tetraciclina. Ambas ligaciones fueron transformadas a la cepa 5K.

Primero se analizaron las colonias obtenidas de la ligación con los tres elementos (pJOB101, *lacO* y Tc). Antes de introducir estos plásmidos en *Y. enterocolitica*, se decidió comprobar como se comportaban estos plásmidos en un mutante *hns* de *E. coli*, por lo que fueron transformados a la cepa BSN27 (cepa mutante *hns*) y se analizó el color de las cepas resultantes a diferentes concentraciones de IPTG (0, 10 μ M, 100 μ M, 1 mM y 10 mM) en placas de β -glucósido. Cuando se analizaron las diferentes estrías, todas ellas mostraban color amarillo, es decir, no se encontró una concentración de IPTG que fuera capaz de complementar el fenotipo *hns*. Por este motivo no se continuó utilizando estos plásmidos.

En el caso de la ligación con pJOB101 y la secuencia *lacO*, se obtuvieron muchas colonias. Debido a que cada una podía presentar diferente número de secuencias operadoras, se aislaron conjuntamente todos los plásmidos de estas cepas y fueron transformados a la cepa BSN27. A continuación, se analizó en placas de β -glucósido el fenotipo de estas cepas a diferentes concentraciones de IPTG, para comprobar cual era el plásmido más adecuado. Como se puede observar en la figura 3.4.19. se obtuvo una cepa (estría número 4) que era de color amarillo cuando crecía sin IPTG (no complementaba el fenotipo) y que era de color azul con 10 μ M de IPTG (complementaba el fenotipo). Esto era diferente del control, pJOB101 (estría número 1), que ya era de color azul sin la presencia de IPTG y que no crecía cuando se colocaba a 10 μ M de IPTG.

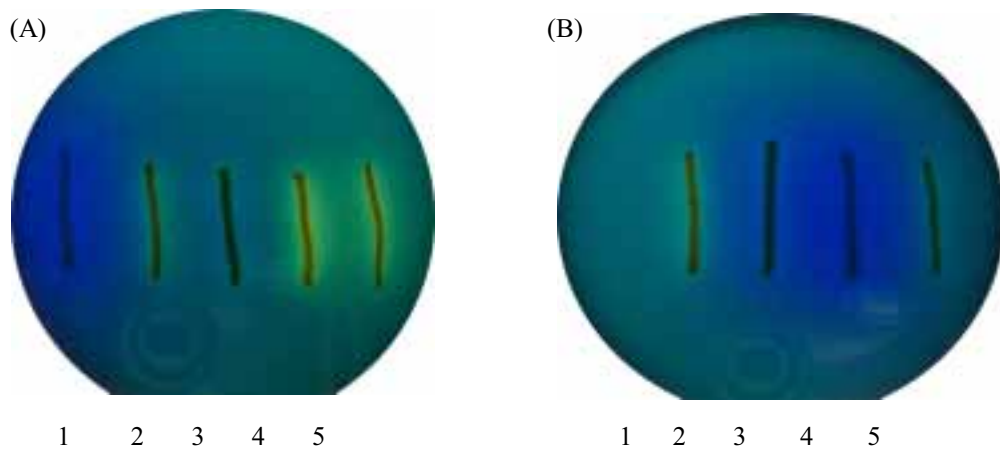
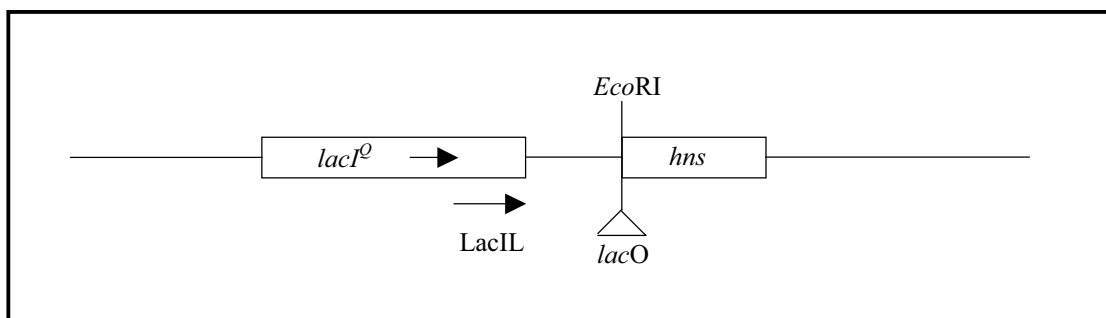


Figura 3.4.19. Placas de β -glucósido con (A) 0 IPTG y (B) 10 μ M IPTG. La estría 1 corresponde a células portadoras del plásmido pJOB101 y las estrías 2-5 corresponden a cepas portadoras de derivados de pJOB101 que incorporan secuencias *lacO*

Se aisló el plásmido correspondiente a la estría número 4 y se denominó pJOBLacO4. El siguiente paso consistió en cambiarle la resistencia de ampicilina a kanamicina tal como se había hecho en el apartado anterior con el plásmido pJOB101, para de esta forma poder introducirlo a la cepa W22703-18 de *Y. enterocolitica*.

Por otra parte también se analizó la región promotora del pJOBLacO4 para ver que secuencias se había incorporado. Para la secuenciación se utilizó el oligonucleótido LacIL (Apéndice I; Figura 3.4.20.A.). En la figura 3.4.20.B se puede ver el promotor *tac* y su secuencia *lacO*, a continuación las secuencias *lacO* incorporadas, que fueron 7, las dos de los extremos invertidos y las 5 centrales son directas y finalmente el inicio de *hns*.

A)



(B)

```

1 attgcaagct gatccgggct tatcgactgc acggtgcacc aatgcttctg gcgtcaggca
61 gccatcggaa gctgtggtat ggctgtgcag gtcgtaaadc actgcataat tcgtgtcgct
121 caaggcgcac tcccgttctg gataatgttt tttgcgccga catcataacg gttctggcaa
181 atattctgaa atgagctggt gacaattaat catcggctcg tataatgtgt ggaattgtga
241 gcgaataaca atttcacaca ggaaacagaa ttttatccgc tcacaattca attgaattgt
301 gagcggataa caattgaatt gtgagcggat aacaattgaa ttgtgagcgg ataacaattg
361 aattgtgagc ggataacaat tgaattgtga gcggataaca attggtatcc gctcacaatt
421 aattccctca acaaccacc ccaatataag tttgagatta ctacaatgag cgaagcactt
481 aaaattctga acaacatccg tactcttctg gcgcaggnaa gagaatgtac acttgaaacg
541 ctggaagaaa tgctggaaaa attagaagtt gttg

```

- Figura 3.4.20.** (A) Situación del oligonucleótido LacIL utilizado para secuenciar la región promotora del plásmido pJOBLaO4. Se muestra la diana *EcoRI* donde se han incorporado las secuencias *lacO*.
- (B) Secuencia promotora de pJOBLaO4. En azul se resalta el promotor *tac*, las flechas rojas indican el inicio de cada secuencia *lacO* incorporada y en verde se resalta el inicio del gen *hms*.

3.4.4.5.- Obtención del plásmido pBR-stpA

Tal y como se ha referido en el apartado de introducción (1.2.2.) el gen *stpA* de *E. coli*, se identificó en 1992 por Zhang y Belfort y posteriormente se descubrió su capacidad para complementar el fenotipo de un mutante *hms* (Shi y Bennett, 1994). La proteína StpA presenta un 67 % de similitud con la proteína H-NS y está considerada como paróloga de esta. En la figura 3.4.21 se muestra la comparación entre la secuencia de aminoácidos de las proteínas H-NS y StpA de *E. coli*.

HNS	1	MSEALKILNNIRTLRAQARECTLETLEEMLEKLEVVVNERREEESAAAAEVEERTKLLQQYREMLIADGI	70
StpA	1	MSVMLQSLNNIRTLRAMAREFSIDVLEEMLEKFRVVTKERREEEEQQQRELAERQEKISTWLELMKADGI	70
HNS	71	DPNELLNSLAIVKSGTKAKRAQRPAKYSYVDENGETKTWTGQGRTPAVIKKAMDEQKSLDDFLIKQ	137
StpA	71	NPPELLGNSSAAPRAGKKRQPRPAKYKFTDVNGETKTWTGQGRTPKPIAQAALAE--GKSLDDFLI--	134

Figura 3.4.21. Comparación entre las secuencias de aminoácidos de las proteínas H-NS y StpA de *E. coli*. En negro se resaltan los aminoácidos iguales, en gris los similares. En blanco se marcan aquellos aminoácidos diferentes.

El genoma de *Y. enterocolitica* se conoce por completo, pero en su secuencia no se ha encontrado un gen homólogo a *stpA*. Debido a la capacidad de StpA para complementar alguna de las funciones de H-NS en *E. coli*, se planteó la posibilidad de que el gen *stpA* pudiera permitir la obtención del mutante *hns* en *Y. enterocolitica* y, de ser así, poder analizar en *Y. enterocolitica* un mutante de *hns* equivalente a los que se han obtenido en *E. coli*.

Se amplificó el fragmento del gen *stpA* (con su propio promotor) a través de los oligonucleótidos StpAPF y StpAPR (Apéndice I; Figura 3.4.22.) que incluyen la diana *PstI* en sus extremos, utilizando como molde la cepa 5K de *E. coli*. La temperatura de hibridación utilizada fue de 53 °C y el tiempo de extensión de 1 minuto.

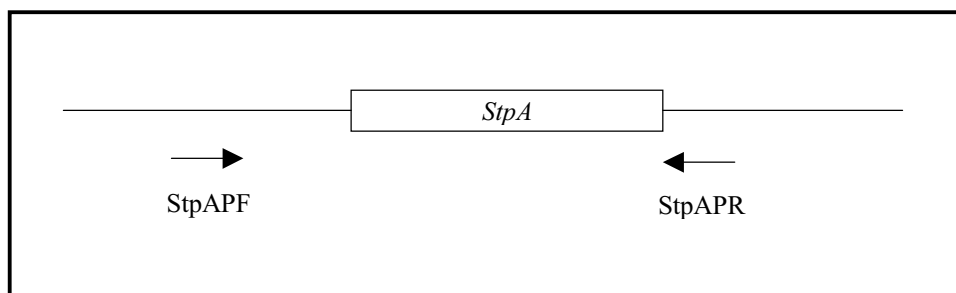


Figura 3.4.22. Situación de los oligonucleótidos StpAPF y StpAPR utilizados para amplificar el gen *stpA*.

El fragmento obtenido a partir del producto de la amplificación por PCR y el plásmido pBR322 (Bolívar *et al.*, 1977), fueron cortados con el enzima de restricción *PstI* y posteriormente ligados y transformados en la cepa 5K. Una vez comprobados los transformantes, se seleccionó un clon correcto y el plásmido se denominó pBR-StpA.

3.4.5.- CRECIMIENTO DE LA CEPA W22703-18 DE *Y. enterocolitica* EN PRESENCIA DE LOS PLÁSMIDOS pJOBLaO4 Y Pbr-StpA

3.4.5.1.- Crecimiento en presencia del plásmido pJOBLaO4

El plásmido pJOBLaO4-km (apartado 3.4.4.4.) fue transformado en la cepa S17-1, que se utilizó como dadora para conjugarlo a la cepa W22703-18 de *Y. enterocolitica*. Los conjugantes fueron cultivados en medio LB sin cloranfenicol a 30 °C para permitir la escisión del plásmido integrado (pUT hns -Sm). A continuación se plaquearon en medio TSA suplementado con 5 % sacarosa y suplementado con 0, 2 μ M, 5 μ M y 10 μ M de IPTG, respectivamente.

En este experimento aparecieron colonias únicamente con una concentración de IPTG de 2 μ M y todas ellas al ser analizadas por PCR (al igual que en los casos anteriores con los oligonucleótidos HNSYEF y HNSYER, apartado 3.4.4), presentaban la copia mutante del gen *hns*. Las cepas obtenidas continuaban creciendo en ausencia de IPTG, pero en este caso había una diferencia de crecimiento, sobretodo cuando se utilizaba el producto ONPF y una temperatura de 37 °C (Figura 3.4.23.). De esta forma, aunque no se había obtenido un mutante letal condicional para el gen *hns*, si que se podía obtener una diferencia de crecimiento importante para continuar analizándolo.

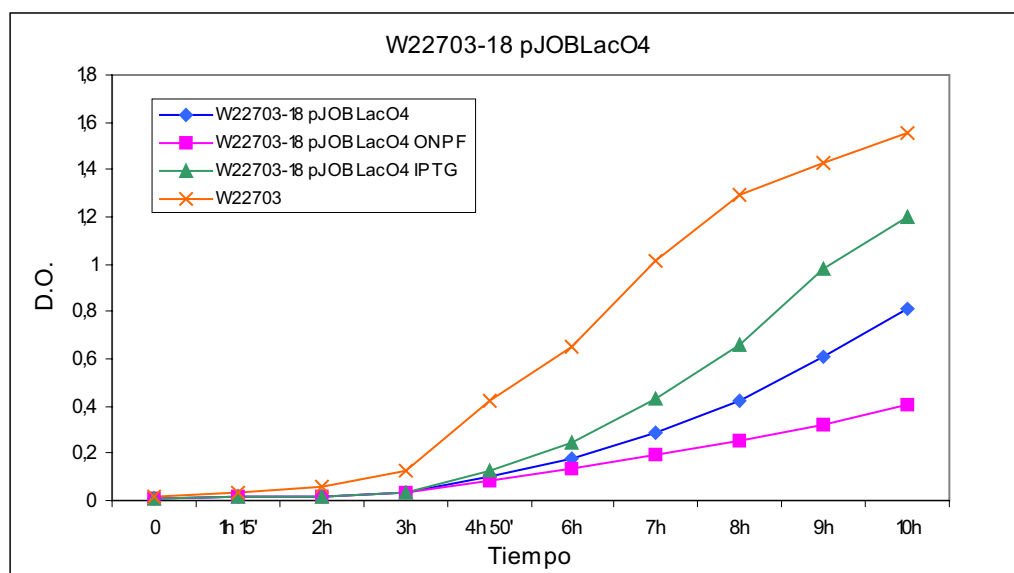


Figura 3.4.23.- Curva de crecimiento de las cepas W22703 y W22703-18 *hms* (pJOBLaO4) en diferentes condiciones.

3.4.5.2.- Obtención y crecimiento del mutante *hns* complementado con el plásmido pBR-StpA

El plásmido pBR-StpA (apartado 3.4.4.5.) fue electroporado (2.4.1.2.2.) a la cepa W22703-18. Uno de los transformantes, igual que en los casos anteriores, fue cultivado en medio LB sin cloranfenicol para provocar la escisión del plásmido integrado y a continuación fue plaqueado en medio TSA suplementado con 5 % sacarosa. Se obtuvieron aproximadamente 30 colonias muy pequeñas, todas ellas Sm^r y Cm^s y al ser analizadas por PCR (oligonucleótidos HNSYER y HNSYEF, apartado 3.4.4.) presentaban únicamente la copia mutante del gen *hns*.

Se puede ver (figura 3.4.24.) que el crecimiento de la cepa mutante W22703-18 *hns* (pBR-StpA) es muy lento comparado con la cepa salvaje (W22703), lo que indica que aunque el gen *stpA* permite obtener la mutación *hns* en *Y. enterocolitica*, no es suficiente para complementar todas las funciones de H-NS. También se puede comprobar que la cepa salvaje complementada con el plásmido pBR-StpA, aunque no tan lento, tampoco tiene un buen crecimiento, es decir, la presencia de StpA y H-NS juntas no beneficia a la cepa sino que la perjudica.

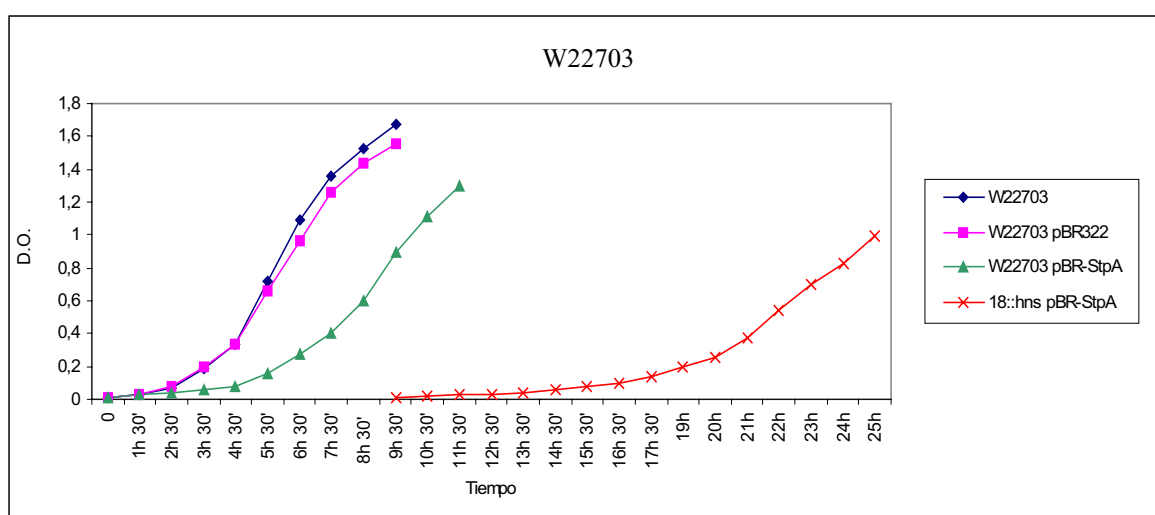


Figura 3.4.24. Crecimiento de la cepa W22703-18 *hns* (pBR-StpA) en comparación con las cepas W22703, W22703 (pBR322) y W22703 (pBR-StpA).

3.4.6.- EFECTO DE LA MUTACIÓN *hns* EN *E. coli* SOBRE EL GEN *virF* DE *Y. enterocolitica*

En el plásmido pYV (70 kb) se encuentran codificadas la mayor parte de las proteínas implicadas en la patogenicidad de *Y. enterocolitica* en humanos y también de otras especies relacionadas como *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis*.

Entre las proteínas codificadas por el plásmido pYV encontramos la adhesina YadA y las proteínas Yop (14) que facilitan la infección (Cornelis *et al.*, 1987). Las proteínas Yop están codificadas por una región de 20 kb, región dependiente de Ca^{2+} , en la que se encuentra el activador transcripcional *virF* (Cornelis *et al.*, 1989).

Debido a que mutantes del gen *ymoA* de *Y. enterocolitica* (homóloga a la proteína Hha de *E. coli*) estimulan fuertemente la expresión de *virF* (Cornelis *et al.*, 1991), se planteó la posibilidad de que mutantes en el gen *hns* también afectarían a la expresión de este activador transcripcional.

En primer lugar, ante la dificultad de obtener el mutante *hns* en *Y. enterocolitica*, se realizó un primer experimento en *E. coli*. Para ello, se transformó el plásmido pGCS757 (Cornelis *et al.*, 1989) portador de una fusión entre *virF* y el gen de la cloranfenicol acetil transferasa (*cat*), a las cepas BSN26 (hns^+) y BSN27 (hns^-). A continuación se valoró la actividad CAT (cloranfenicol acetil transferasa) en estas cepas a dos temperaturas diferentes y también a diferentes densidades ópticas. Se puede observar en la figura 3.4.25. que las actividades en *E. coli* son muy bajas y parecidas en ambas temperaturas, aunque parece indicar que existe una actividad 3-4 veces mayor en la cepa mutante *hns*.

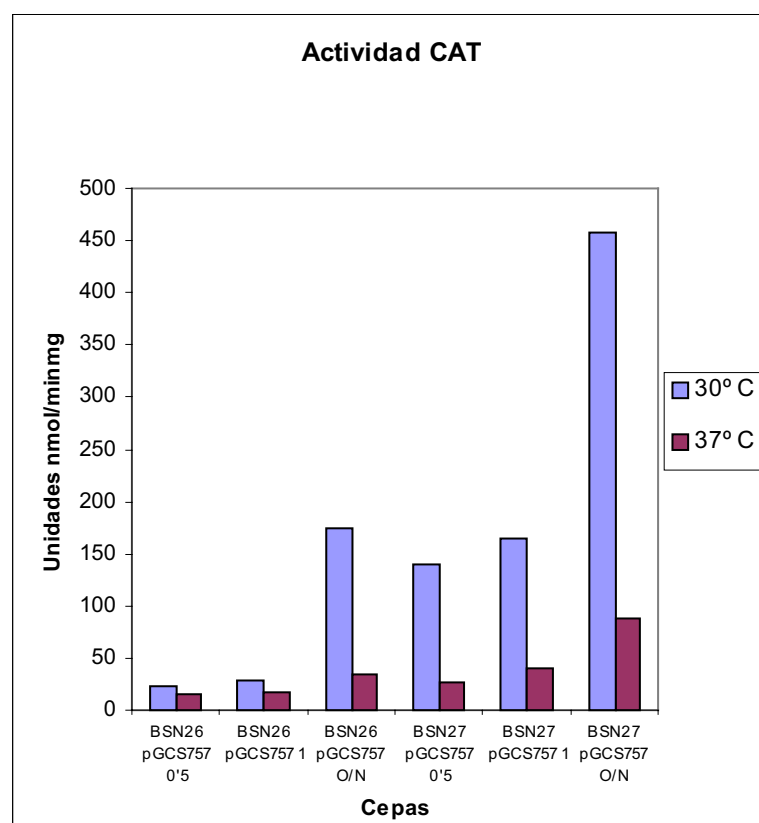


Figura 3.4.25. Gráfica de la actividad cloranfenicol acetil transferasa a 30 y 37 °C de las cepas BSN26 (pGCS757) y BSN27 (pGCS757) a diferentes densidades ópticas.

3.4.7.- EFECTO DE LA MUTACIÓN *hns* EN *Y. enterocolitica* SOBRE EL GEN *virF*

Una vez se había conseguido obtener una cepa mutante para el gen *hns* de *Y. enterocolitica*, se decidió comprobar en esta cepa si la mutación en el gen *hns* afectaba a la expresión del activador transcripcional *virF*.

El primer paso consistió en transformar el plásmido pGCS757 (plásmido que contiene la fusión transcripcional entre *cat-virF*) a la cepa W22703-18 *hns* (pJOBLaO4) y de esta forma poder analizar la expresión del gen *virF* en esta cepa y a diferentes condiciones (IPTG, ONPF, temperatura, etc.). Igual que en el apartado anterior, las actividades que se obtuvieron fueron muy bajas, incluso a 37 °C y se observaron muy pocas diferencias, aunque parecía que la actividad era menor cuando la cepa crecía en presencia de IPTG (Figura 3.4.26.).

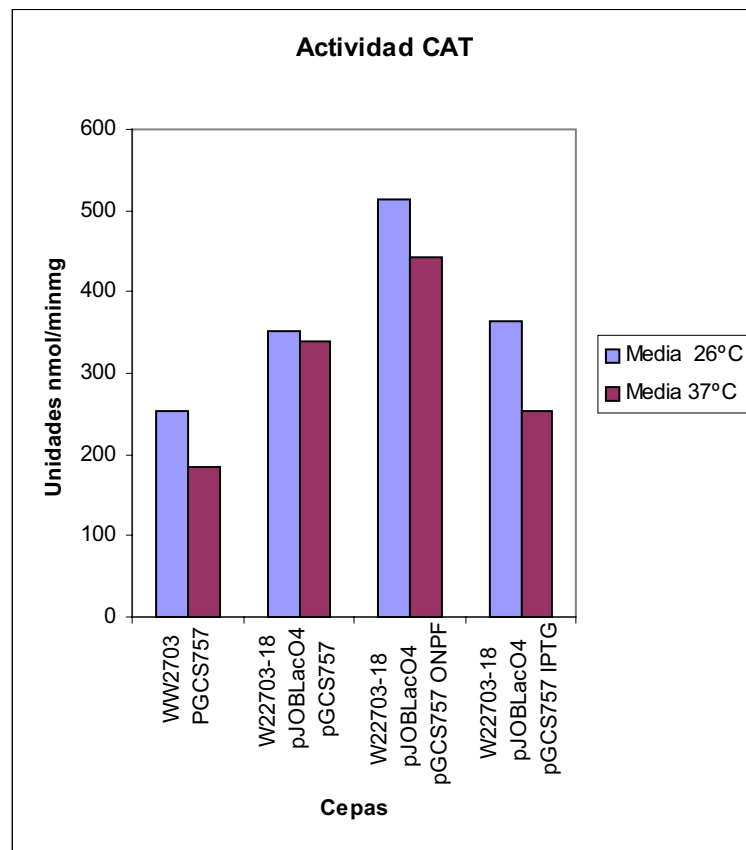


Figura 3.4.26. Gráfica de la actividad cloranfénicol acetil transferasa a 26 y 37 °C de las cepas W22703 (pGCS757) y W22703-18 *hms* (pJOBLaO4) sin IPTG, con 2 μ M de IPTG y con 1mM de ONPF.