



Facultad de Biología

Departamento de Microbiología

**La Familia de proteínas Hha-YmoA: estudios estructurales y papel regulador en
*Yersinia enterocolitica***

Programa de Doctorado: Microbiología Ambiental y Biotecnología (2001-2003).

Conformidad del director de tesis

Memoria presentada por J.
Ignacio Pons Ximénez para optar
al título de Doctor por la
Universidad de Barcelona

Dr. Antonio Juárez Giménez

J. Ignacio Pons Ximénez

Barcelona, 2006



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Facultad de Biología

Departamento de Microbiología

**La familia de proteínas Hha-YmoA: estudios estructurales y
papel regulador en *Yersinia enterocolitica***

J. Ignacio Pons Ximénez

Tesis Doctoral

Barcelona, 2006

Agradecimientos

Hace algún tiempo, cuando empecé a intuir que el final de la Tesis estaba cerca, pensé en hacer unos agradecimientos algo peculiares, contar una historia en la que apareciesen todas las personas que, de una u otra forma, habían contribuido a llevar a buen puerto este trabajo. Pero la verdad es que ahora estoy cansado, aborrecido de este teclado y esta pantalla que han sido mis compañeros en estos últimos meses, y para no alargar más mi agonía he decidido no alejarme de los cánones establecidos. Y ahora sí empiezan los agradecimientos:

- A los Doctores:

En primer lugar me gustaría agradecer al Doctor Antonio Juárez el haberme permitido realizar la Tesis Doctoral en su grupo de investigación, el hecho de haber tomado las riendas de ésta cuando, a falta de un año de finalizar mi beca, me quedé sin director y sin tema, y por preocuparse por mi futuro. A la Doctora Cristina Madrid, por su ayuda durante todo el periodo de Tesis tanto a nivel experimental como a otros niveles, por todas las “persecuciones” que he realizado por el pasillo del departamento en busca de datos desconocidos o extraviados, y por sus correcciones en este manuscrito. Al Doctor Francisco Muñoa, por su amistad, su apoyo y su inestimable ayuda para resolver dudas conceptuales de microbiología. A la Doctora Josefina Martínez, con quien me introduje en el mundo de la ciencia (inocente que era yo!), por cederme parte de su despacho y por recordarme a Juliette Binoche. Al Doctor Carlos Balsalobre que, aunque llegó algo tarde (siempre desde mi punto de vista egocéntrico), siempre ha estado dispuesto a perder un rato para intentar resolver las dudas que le he planteado. Al Doctor José María Nieto, con quien empecé la realizar la Tesis Doctoral. Y, sobretodo, quiero agradecerle a la Doctora Rosa Baños su inestimable ayuda en el laboratorio y su amistad, pero a ella la nombraré más adelante (en el apartado “mis niñas del laboratorio”).

Finalmente, también quiero citar al resto de los Doctores del departamento de Microbiología con los que siempre he tenido muy buena relación, a los secretarios (Manolo y sus chicas Macu, Bea y Fina, que son muy “cucas”), y a Rosario.

- A los compañeros de laboratorio:

A los que ya no están en el departamento; la Doctora Sonia Paytubi, a la que eché mucho de menos y que (espero) esté en mi tribunal de Tesis, a José Luis Parra,

a Eli, a Eva, a Sheila y a la chica alemana cuyo nombre ahora no recuerdo y a la que no le gustaban mis bromas.

A los nuevos; a Juanda, que me desplazó al puesto número 4 de los “machos α ” dentro del laboratorio, a Laura y a Llorenç, que me desplazó al 5º puesto.

A los de siempre; a Nuria Forns, hermanóloga en esto de la Tesis y con la que he compartido muchas cosas (hasta que, como todas, te abandonan en el momento que se echan novio, jejeje), a Sonia Rodríguez, gran compañera (“los High-tech” nos llamaban los envidiosos) siempre dispuesta a echar una mano y de la que heredé el “marrón” de *Yersinia*. A Jorge, el “pequeño” del grupo, por su ayuda a nivel informático y por sustituirme (sin yo habérselo pedido) en las labores de macho dominante (que nadie se moleste, no dejan de ser términos biológicos). A Sonia Aznar, por su ayuda y porque, aunque ella no quiera creerlo (y lo entiendo), nos parecemos un montón, y a esa chica vasca, sí.....como se llama... a sí! Aitziber!, que con su llegada y la aplicación de nuevos términos biológicos animó el ambiente del laboratorio. Y a Rosa Baños, por su risa, por su ayuda, por las confidencias, por todas esas cervezas y esa amistad que seguro que durará de por vida.

También me gustaría mencionar al resto de compañeros del departamento, a Santi, que va a ser papá, a Dani, aunque ahora vaya todo trajeado, a Oscar, Cristina y Iulia como representantes de todo el laboratorio 2, a Marc, a Kim, a Miriam y a Nuria, aunque le guste hacer agujeros para enterrar a sus amigos y a Lida. A Frank (tabaco plis), Mari, Luis, etc,... del grupo de virus, y al resto de los “currelas” del departamento de Microbiología.

- A los biólogos:

A Jaume Puigagut y Xesco, mis dos puntos de apoyo durante todos estos años, momentos mejores y peores hemos pasado, pero se que nuestra amistad durará toda la vida. A Rafa, que va por el segundo, a M^a Elena, que siempre me ha hecho sentir tan a gusto y bien, y al resto de compañeros de la carrera con los que mantengo más o menos el contacto.

A los de la cerveza de las seis: a Oriol (està clar!) por estar siempre allí, a Mark, Tana y Mercedes, y el resto de la gente que he ido conociendo en la terraza del bar. A Clara, Pere, Marcel, Xevi y Dani, y el resto de esa tribu.

A Senda, gran amiga todoterreno tanto de cafés como de cubatas, a Laura, Carmen, Josep, Hugo y Kurro. A Ana, que anda por Brasil y a María, con la que he compartido muchas cosas estos últimos meses.

- A los de fuera de Biología:

A María, Emilio y Carlos, y al resto de la tribu (gorrones o no de casa Eneko), que siempre hacen que me sienta tan bien y me suba la autoestima. A Sebastián y a Ernesto (mira que eres raro!). A todos los compañeros de piso que he tenido durante estos años, y en representación de Menorca, a los Siso's boys, a Gaspar y a Ruben. A Osoposo y la abominable mujer de la explanada, y todos los que habitan bajo mi cama y en mi armario. A la gente de un día. A la gente de una noche.

-A mi familia:

A mis tíos Cesar y Pili. A mi hermana Nuria y a Aure, que siempre cuidan de mí (plasta e inútil que puedo llegar a ser) y a los que llamo rápidamente ante el más mínimo problema. Gracias por todo vuestro apoyo y comprensión. A mi padre, por su apoyo y su carácter fácil de tratar, pero sobretodo quiero dedicar el esfuerzo de este trabajo a mi madre.

“...hay algo de magia en todo lo que hacemos,
y algo de pérdida para compensar...”

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| <u>1.- INTRODUCCIÓN</u> | 1 |
| | |
| <u>1.1.- REGULACIÓN AMBIENTAL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEÍNAS ASOCIADAS AL NUCLEOIDE</u> | 3 |
| 1.1.1.- REGULACIÓN AMBIENTAL DE LA EXPRESIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA | 3 |
| 1.1.1.1.- Hierro..... | 4 |
| 1.1.1.2.- pH..... | 5 |
| 1.1.1.3.- Oxígeno..... | 6 |
| 1.1.1.4.- Temperatura..... | 7 |
| 1.1.1.5.- Osmolaridad..... | 8 |
| 1.1.2.- PROTEÍNAS ASOCIADAS AL NUCLEOIDE | 9 |
| | |
| <u>1.2.- LA FAMILIA DE PROTEÍNAS H-NS</u> | 16 |
| 1.2.1.- LA PROTEÍNA H-NS | 16 |
| 1.2.1.1.- Características generales de la proteína H-NS..... | 16 |
| 1.2.1.2.- Estructura de la proteína H-NS..... | 19 |
| <i>1.2.1.2.1.- Dominio N-Terminal</i> | 19 |
| <i>1.2.1.2.2.- Dominio C-Terminal</i> | 23 |
| 1.2.1.3.- Modulación de la expresión génica por la proteína H-NS... | 24 |
| 1.2.2.- LA PROTEÍNA StpA | 28 |
| | |
| <u>1.3.- LA FAMILIA DE PROTEÍNAS HHA / YMOA</u> | 31 |
| 1.3.1.- LA PROTEÍNA HHA | 31 |
| 1.3.1.1.- Características generales..... | 31 |
| 1.3.1.2.- Regulación de la expresión de la α -hemolisina por la proteína Hha..... | 33 |
| 1.3.1.3.- Interacción de la proteína Hha con la proteína H-NS para modular la expresión génica..... | 36 |
| 1.3.1.4.- Otras proteínas de la familia Hha / YmoA..... | 38 |
| | |
| <u>1.4.- <i>Yersinia enterocolitica</i></u> | 41 |

| | |
|--|----|
| 1.4.1.- CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>Y. enterocolitica</i> | 41 |
| 1.4.2.- FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>Y. enterocolitica</i> | 44 |
| 1.4.3.- TERMORREGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA EN <i>Y. enterocolitica</i> | 49 |
| 1.4.3.1.- La proteína YmoA participa en la termorregulación de la expresión de factores de virulencia en <i>Y. enterocolitica</i> | 50 |
| 1.4.3.2.- Superenrollamiento del ADN y regulación de la expresión de factores de virulencia en <i>Y. enterocolitica</i> | 51 |
| 1.4.3.3.- Estudios recientes sobre la regulación de la expresión génica en <i>Y. enterocolitica</i> por la proteína YmoA..... | 51 |
| | |
| <u>1.5.- OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO</u> | 53 |
| | |
| 2.- MATERIALES Y MÉTODOS | 55 |
| | |
| <u>2.1.- CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS</u> | 57 |
| | |
| <u>2.2.- MEDIOS DE CULTIVO Y ANTIBIÓTICOS</u> | 60 |
| 2.2.1.- MEDIOS DE CULTIVO..... | 60 |
| 2.2.2.- ANTIBIÓTICOS..... | 63 |
| | |
| <u>2.3.- MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS</u> | 64 |
| 2.3.1.- ESTERILIZACIÓN..... | 64 |
| 2.3.2.- MANTENIMIENTO DE MICROORGANISMOS..... | 65 |
| 2.3.3.- INOCULACIÓN Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS.... | 65 |
| | |
| <u>2.4.- MÉTODOS DE TRANSFERENCIA GENÉTICA</u> | 66 |
| 2.4.1.- TRANSFORMACIÓN BACTERIANA..... | 66 |
| 2.4.1.1.- Transformación de células competentes obtenidas por tratamiento con CaCl ₂ | 66 |
| 2.4.1.2.- Transformación por electroporación..... | 67 |
| 2.4.1.2.1.- <u>Electroporación de <i>Escherichia coli</i></u> | 67 |
| 2.4.1.2.2.- <u>Electroporación de <i>Yersinia enterocolitica</i></u> | 68 |

| | |
|--|----|
| 2.4.2.- CONJUGACIÓN EN MEDIO SÓLIDO..... | 69 |
| <u>2.5.- TÉCNICAS EXPERIMENTALES CON ADN</u> | 69 |
| 2.5.1.- AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO..... | 69 |
| 2.5.1.1.- Aislamiento de ADN plasmídico por el método de la lisis alcalina..... | 69 |
| 2.5.1.1.1.- <i>Desproteización del ADN por precipitación con cloruro de litio</i> | 70 |
| 2.5.1.1.2.- <i>Desproteización del ADN por extracción con fenol</i> | 71 |
| 2.5.1.1.3.- <i>Tratamiento de la suspensión de ADN con ARNasa A</i> | 72 |
| 2.5.1.2.- Aislamiento de ADN plasmídico mediante “kits” comerciales..... | 72 |
| 2.5.2.- UTILIZACIÓN DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN, LIGACIÓN Y MODIFICACIÓN DEL ADN..... | 72 |
| 2.5.3.- TÉCNICAS BASADAS EN LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)..... | 73 |
| 2.5.3.1.- Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa..... | 73 |
| 2.5.3.2.- Mutagénesis mediante reacción en cadena de la polimerasa | 74 |
| 2.5.3.3.- Secuenciación..... | 75 |
| 2.5.4.- OBTENCIÓN DE SECUENCIAS REGULADORAS POR HIBRIDACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS..... | 77 |
| 2.5.5.- ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA..... | 77 |
| 2.5.5.1.- Electroforesis en geles de agarosa..... | 77 |
| 2.5.5.2.- Marcadores de tamaño molecular..... | 78 |
| 2.5.5.3.- Tinción con bromuro de etidio..... | 78 |
| 2.5.6.- AISLAMIENTO DE FRAGMENTOS DE ADN DE GELES DE AGAROSA MEDIANTE ELECTROELUCIÓN..... | 79 |
| 2.5.7.- CUANTIFICACIÓN DEL ADN..... | 79 |
| <u>2.6.- TÉCNICAS EXPERIMENTALES CON ARN</u> | 80 |
| 2.6.1.- EXTRACCIÓN DE ARN CELULAR TOTAL..... | 80 |
| 2.6.2.- CUANTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DEL ARN..... | 80 |

| | |
|--|----|
| 2.6.3.- ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA Y TINCIÓN CON BROMURO DE ETIDIO | 80 |
| 2.6.4.- ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL ARN POR RT-PCR | 81 |
| 2.6.4.1.- Digestión con ADNasa I | 81 |
| 2.6.4.2.- RT-PCR | 82 |
| | |
| <u>2.7.- TÉCNICAS EXPERIMENTALES CON PROTEÍNAS</u> | 83 |
| 2.7.1.- OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS | 83 |
| 2.7.1.1.- Obtención de extractos proteicos mediante disrupción celular por ultrasonidos | 83 |
| 2.7.1.2.- Obtención de extractos proteicos mediante disrupción celular por presión | 84 |
| 2.7.1.3.- Obtención de extractos proteicos para geles 2D-PAGE | 84 |
| 2.7.2.- VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA POR EL MÉTODO DE BRADFORD | 86 |
| 2.7.3.- TÉCNICAS DE ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS | 86 |
| 2.7.3.1. Geles de poliacrilamida | 86 |
| <u>2.7.3.1.1.- Geles de poliacrilamida en Tris-Glicina-SDS</u> | 87 |
| <u>2.7.3.1.2.- Geles de poliacrilamida en Tris-Tricina-SDS</u> | 88 |
| 2.7.3.2.- Electroforesis bidimensional (2D-PAGE) | 90 |
| <u>2.7.3.2.1.- Primera dimensión</u> | 90 |
| <u>2.7.3.2.2.- Segunda dimensión</u> | 91 |
| 2.7.3.3.- Marcadores de peso molecular | 93 |
| 2.7.3.4.- Tinción de geles de proteínas | 93 |
| <u>2.7.3.4.1.- Tinción de proteínas con Azul de Coomassie®</u> | 93 |
| <u>2.7.3.4.2.- Tinción de proteínas con nitrato de plata (2D-PAGE)</u> | 94 |
| 2.7.4.- IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR MALDI-TOF / Q-TOF | 94 |
| 2.7.5.- SOBREEXPRESIÓN DE PROTEÍNAS | 95 |
| 2.7.5.1.- Inducción de la expresión de proteínas | 95 |
| 2.7.5.2.- Obtención de extractos celulares | 96 |
| 2.7.5.3.- Solubilización de cuerpos de inclusión | 96 |
| 2.7.5.4.- Purificación mediante Ni²⁺-NTA agarosa | 97 |

| | |
|--|-----|
| <u>2.7.5.4.1.- Purificación de proteína solubilizada a partir de cuerpos de inclusión</u> | 97 |
| <u>2.7.5.4.2.- Purificación por columna de afinidad</u> | 98 |
| <u>2.7.5.4.3.- Purificación por sistema discontinuo</u> | 98 |
| 2.7.5.5.- Disociación de unión entre proteínas | 99 |
| 2.7.6.- INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS TRANSFERIDAS A MEMBRANA (WESTERN BLOTTING) | 99 |
| 2.7.6.1.- Electrotransferencia de proteínas a membrana | 99 |
| 2.7.6.2.- Inmunodetección y revelado colorimétrico mediante fosfatasa alcalina | 100 |
| 2.7.7.- OBTENCIÓN DE SUERO INMUNE ANTI H-NS | 102 |
| 2.7.7.1.- Obtención de proteína H-NS | 102 |
| 2.7.7.2.- Inmunización del conejo | 103 |
| 2.7.7.3.- Obtención del suero inmune | 103 |
| 2.7.8.- VALORACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA | 104 |
| 2.7.8.1.- Determinación de la actividad β-galactosidasa | 104 |
| | |
| <u>3.- RESULTADOS</u> | 107 |
| | |
| <u>3.1.- ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE LA PROTEÍNA Hha</u> | 109 |
| 3.1.1.- ANTECEDENTES | 109 |
| 3.1.2.- PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA Hha | 109 |
| 3.1.2.1.- Sobreproducción basada en el sistema de expresión pET3b | 110 |
| 3.1.2.2.- Sobreexpresión del tándem proteico Hha / H-NS | 112 |
| <u>3.1.2.2.1.- Construcción del vector para la expresión en tándem de las proteínas Hha y H-NS</u> | 113 |
| <u>3.1.2.2.2.- Selección de una cepa hospedadora para el vector de expresión en tándem de las proteínas Hha y H-NS</u> | 114 |
| <u>3.1.2.2.3.- Incremento de la solubilidad de HisHha como resultado de la expresión en tándem</u> | 115 |
| 3.1.2.3.- Utilización del vector de expresión pET15b | 120 |
| <u>3.1.2.3.1.- Construcción del vector pET15bHisHha</u> | 122 |
| <u>3.1.2.3.2.- Construcción del vector pET15bHNSHis-64</u> | 124 |

| | |
|---|------------|
| 3.1.3.- CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES EN LA CISTEÍNA EN POSICIÓN 18..... | 126 |
| 3.1.3.1.- Mutagénesis del aminoácido cisteína en posición 18..... | 127 |
| 3.1.3.2.- Efecto de las mutaciones en la cisteína 18 de Hha sobre el crecimiento de <i>E. coli</i>..... | 128 |
| 3.1.3.3.- Complementación de la mutación <i>hha</i> por las proteínas HhaC18I, HhaC18S y HhaC18A..... | 131 |
| 3.1.3.4.- Efecto de las mutaciones en la cisteína 18 de Hha sobre la capacidad de unión con H-NS..... | 133 |
| | |
| <u>3.2.- PAPEL REGULADOR DE LAS PROTEÍNAS H-NS E YmoA EN <i>Y. enterocolitica</i>.....</u> | 136 |
| | |
| 3.2.1.- ANTECEDENTES..... | 136 |
| 3.2.2.- EFECTO DE LA PRESENCIA DEL PLÁSMIDO pBRStpA SOBRE LA FISIOLOGÍA DE <i>Y. enterocolitica</i> | 138 |
| 3.2.2.1.- Efecto de la presencia del plásmido pBRStpA sobre el crecimiento de <i>Y. enterocolitica</i> W22703 en medio LB a 30° C..... | 138 |
| 3.2.2.2.- Efecto de la presencia del plásmido pBRStpA sobre el crecimiento de <i>Y. enterocolitica</i> W22703 en distintas condiciones de cultivo | 139 |
| <u>3.2.2.2.1.- Crecimiento en medio rico a diferentes temperaturas.....</u> | 139 |
| <u>3.2.2.2.2.- Crecimiento en medio rico en condiciones anaeróbicas....</u> | 140 |
| <u>3.2.2.2.3.- Crecimiento en medio mínimo con glucosa.....</u> | 141 |
| <u>3.2.2.2.4.- Metabolismo de la glucosa por la cepa W22703.....</u> | 142 |
| 3.2.3.- EFECTO DE LA PRESENCIA DEL PLÁSMIDO pBRStpA SOBRE EL CRECIMIENTO DE OTRAS ENTEROBACTERIAS..... | 143 |
| 3.2.4.- EFECTO DE LA PRESENCIA DEL PLÁSMIDO pBRStpA SOBRE EL PATRÓN DE EXPRESIÓN PROTEICA EN LAS CEPAS W22703 Y W22703H DE <i>Y. enterocolitica</i>..... | 144 |
| 3.2.4.1.- Análisis del patrón de expresión proteico por SDS-PAGE... | 144 |
| 3.2.4.2.- Electroforesis bidimensional..... | 145 |
| 3.2.4.3.- Relación de proteínas identificadas que muestran un nivel de expresión diferente en las cepas portadoras del plásmido pBRStpA con | |

| | |
|---|-----|
| respecto a la cepa salvaje W22703..... | 150 |
| 3.2.5.- ANÁLISIS POR RT-PCR DE LA EXPRESIÓN DE GENES CUYOS PRODUCTOS GÉNICOS MUESTRAN UN NIVEL DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN PRESENCIA DEL PLÁSMIDO pBRStpA..... | 154 |
| 3.2.6.- SELECCIÓN DE MUTANTES <i>hns</i> EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO..... | 156 |
| 3.2.7.- ANÁLISIS DEL MECANISMO POR EL QUE EL PLÁSMIDO pBRStpA ALTERA LA FISIOLOGÍA DE <i>Y. enterocolitica</i>... | 159 |
| 3.2.7.1.- Niveles de expresión de la proteína H-NS a 25° C y 37° C... | 159 |
| 3.2.7.2.- Niveles de expresión de la proteína YmoA a 25° C y 37° C... | 160 |
| 3.2.7.3.- Expresión de los genes <i>ymoA</i> y <i>hns</i> en presencia del plásmido pBRStpA..... | 160 |
| 3.2.7.4.- Efecto de un incremento de la concentración intracelular de la proteína H-NS en la cepa W22703..... | 163 |
| <u>4.- DISCUSIÓN.....</u> | 167 |
| <u>4.1.- ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE LA PROTEÍNA Hha.....</u> | 169 |
| 4.1.1.- ESTRATEGIAS DE PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS Hha Y H-NS..... | 169 |
| 4.1.2.- CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA Hha: MUTAGÉNESIS EN LA CISTEÍNA EN POSICIÓN 18..... | 170 |
| <u>4.2.- PAPEL DE LAS PROTEÍNA H-NS E YmoA EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN <i>Y. enterocolitica</i>.....</u> | 173 |
| <u>5.- CONCLUSIONES.....</u> | 179 |
| <u>6.- BIBLIOGRAFÍA.....</u> | 183 |
| <u>7.- ANEXO.....</u> | 215 |

