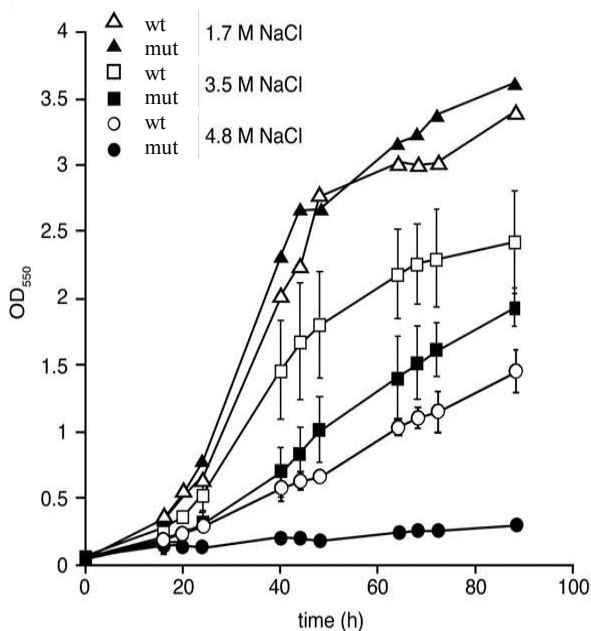


## Procesos asociados a membrana y pared celular 2018



1.- La envoltura celular de las arqueas está formada por la capa S. Esta consiste en una capa monomolecular compuesta de una glicoproteína.

Para conocer el efecto fisiológico de la capa S en la haloarquea *Haloferax volcanii*, se analizó el crecimiento de una cepa salvaje y una mutante que carece de la capa S bajo condiciones de estrés salino. Para ello se realizaron incubaciones medio con diferentes concentraciones de sal y se determinó el crecimiento a lo largo del tiempo (Fig 1).

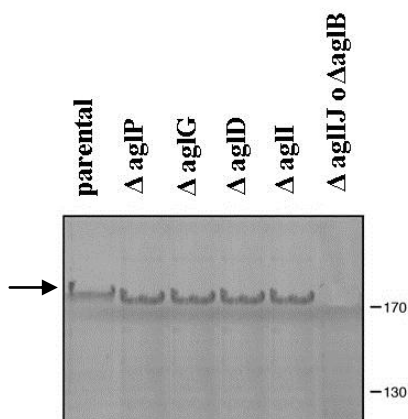


**Fig. 1: Crecimiento de *H. volcanii* bajo estrés salino.**

La cepa salvaje (wt) y la mutante sin capa S (mut) fueron crecidas en medio mínimo con diferentes concentraciones NaCl. A los diferentes tiempos se extrajo una muestra y se midió el crecimiento por cambios en la turbidez a 550nm

- Analice la figura indicando la posible función de la capa S
- Como explica el resultado obtenido para la mutante a 4.8M NaCl? Proponga un ensayo para demostrarlo

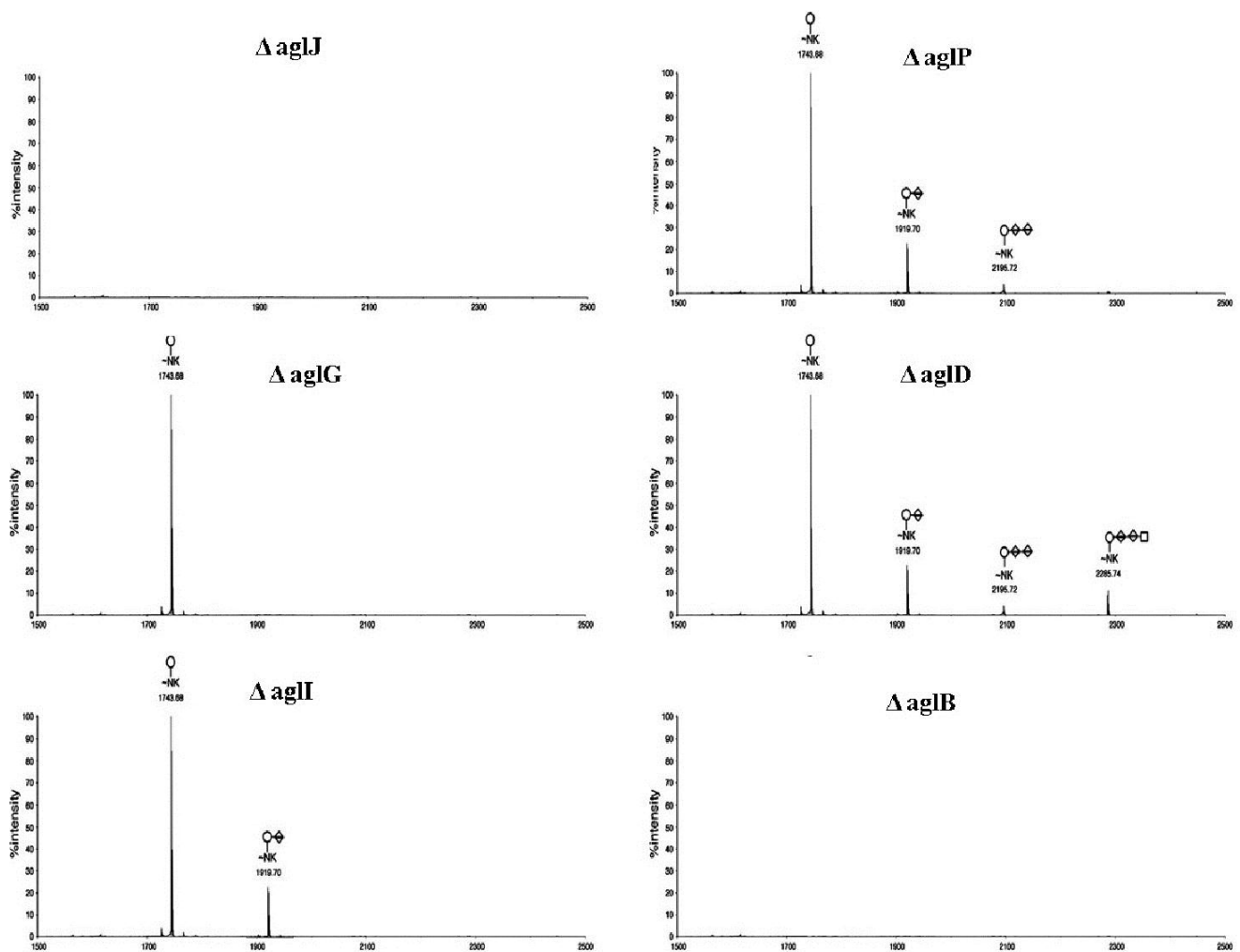
2.- En la haloarquea *Haloferax volcanii* la capa S está constituida por una proteína glicosilada con un pentasacárido. La porción peptídica es exportada a la cara externa de la membrana y luego es glicosilada. En eucariotas el ensamble de la porción glicosídica está asociado a la cara citoplasmática de la membrana mientras que la glicosilación está en la externa pero no se conoce la localización de estos procesos en arqueas. Por análisis de homólogos en el genoma de *H. volcanii*, se supone que la glicosilación es llevada a cabo por el cluster génico *agl*. Debido a que no se conoce el mecanismo, se decidió analizar la función de 6 genes presentes en el cluster (J, P, G, D, I y B). Para analizar si estos genes estaban asociados a este proceso, se generaron mutantes por eliminación de cada gen no siendo afectada la viabilidad de *H. volcanii*. Las proteínas de la capa S de las mutantes fueron analizadas por SDS-PAGE (Fig 1).



**Fig 1: Efecto de las mutaciones sobre las proteínas de la capa S**  
 Iguales alícuotas de las células mutantes fueron separadas por 5% SDS-PAGE. Las proteínas fueron visualizadas por tinción con Schiff (tinción con PAS). Solo se muestra el área de las glicoproteínas de la capa S. La flecha señala la glicoproteína de la capa S de la cepa salvaje.

- Compare la movilidad de las glicoproteínas de las cepas mutantes con la parental, que indica este hecho?
- Como explicaría la mutantes *aglJ* y *AgIB*?
- Que experimento control realizaría para verificar que el cambio es producido por la eliminación de este gen? Tome como ejemplo la calle 2. Que resultado esperaría?

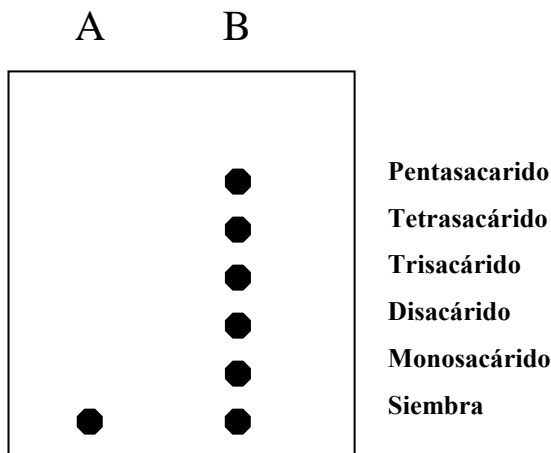
Para conocer la función de los genes del cluster *agl* y tratar de dilucidar la ruta de la glicosilación, se analizaron los glicopéptidos generados en cada mutante. Se realizaron cultivos de cada mutante. Al llegar a la fase estacionaria, las células fueron lavadas y tratadas con tripsina. De esta manera se digieren las proteínas de la capa S liberando péptidos de 14 aa conteniendo el sitio de glicosilación. Se separaron por una columna hidrofóbica y estos péptidos fueron analizados por espectrometría de masa y se determinó la composición del glicano asociado al péptido (Fig 2).



**Fig 2: Análisis por espectrometría de masa de los péptidos conteniendo el sitio de glicosilación**

Las diferentes mutantes fueron cosechadas en la fase estacionaria y tratadas con tripsina. Los péptidos de 14 aa liberados fueron analizados en un MALDI-TOF y determinadas las estructuras del glicopeptido por la relación carga/masa molecular. NK: ERGNLDABSESNK, o: glucosa,  $\diamond$  ácido hexurónico,  $\square$  manosa.

Debido a que no se puede distinguir con este método el efecto de la delección del gen *aglJ* o *aglB*, se analizaron los azúcares asociados a las membranas luego de la digestión trípica a través de una TLC (fig 3).



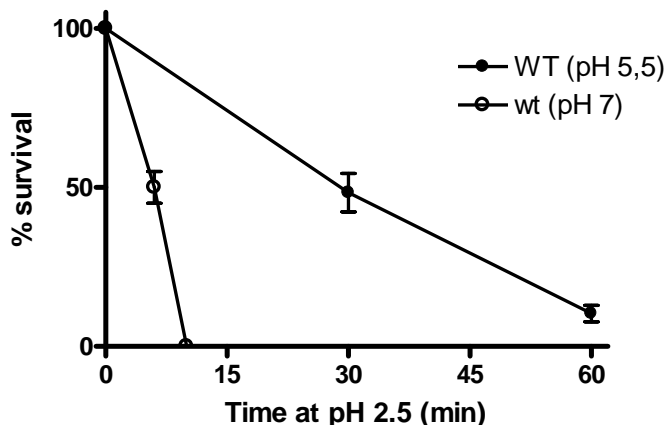
**Figura 3: TLC de los hidratos de carbono asociados a membrana en la mutantes *aglJ* y *aglB***

Se extrajeron los hidratos de carbono asociados a la membrana celular de ambas mutantes luego de haber sido tratadas con tripsina. Calle A *AglJ*, calle B *AglB*.

- d) que representa el material que se sembró en la TLC
- e) Puede indicar la composición de la porción glicosídica del glucopeptido?
- f) Cual podría ser la función del producto del gen *aglB*? Y *aglJ*?
- g) Realice un esquema indicando la acción del producto de cada gen analizado.

3.- *Shigella* es un patógeno intestinal Gram<sup>-</sup> que ingresa al organismo a través de agua o alimentos contaminados y debe sobrevivir al pH extremo del estómago para llegar a su nicho que es el colon. Se está estudiando el papel que juega el lipopolisacárido (LPS) en la fisiología y la capacidad de virulencia de este organismo. Se cuenta con una cepa salvaje y una cepa incapaz de sintetizar LPS por una mutación en el gen de la enzima antígeno O ligasa (gen *waal*, tiene fenotipo rugoso por carecer de cápsula). Se realizan los siguientes experimentos:

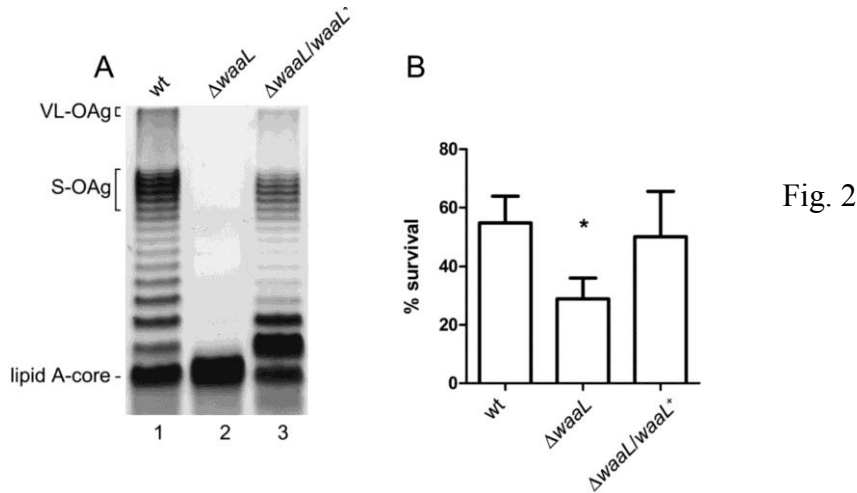
- a- Se inocula un modelo de ratón con una mezcla 1:1 de ambas cepas. Una vez establecida la infección, se recuperan microorganismos del colon y se plaquean para establecer el porcentaje de cada variante. El resultado arroja un 95% de colonias mucosas y sólo un 5 % de colonias rugosas.
- b- La cepa salvaje se crece a pH 7 o a pH 5.5, y un número equivalente de bacterias de ambos cultivos se expone por distintos tiempos a pH 2.5, al cabo de lo cual se los plaquea en medio a pH 7 para determinar el número de bacterias sobrevivientes. El resultado se muestra en la Fig.1



**Fig. 1. Supervivencia de las bacterias a pH ácido.**

10<sup>9</sup> UFC de cultivos crecidos a pH 7 o a pH 5.5 fueron centrifugadas y resuspendidas en medio a pH 2.5. A distintos tiempos después de la resuspensión las células fueron plaqueadas en medio a pH 7 y se contaron las UFC sobrevivientes. Los resultados se expresan como porcentajes.

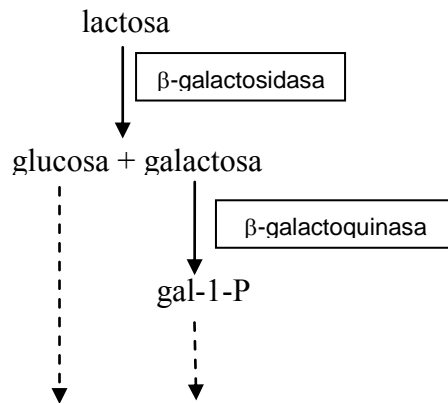
c- La cepa salvaje, la cepa mutante ( $\Delta$  waal) y una cepa mutante complementada con un plásmido de expresión que codifica el gen waal ( $\Delta$  waal/waal\*) son crecidas en un medio a pH 5.5. A una alícuota de cada cultivo se le extrae el LPS para su análisis en geles de poliacrilamida (Fig. 2A). Otra alícuota se expone por 15 minutos a pH 2.5, y se determina el porcentaje de bacterias sobrevivientes (Fig. 2B).



Preguntas:

- Puede decir si la presencia de polisacárido afecta la infectividad de este microorganismo? Y su resistencia a pHs extremadamente ácidos? Justifique.
- Qué puede decir de la resistencia de la cepa salvaje a pHs bajos? Cuál puede ser el efecto del pre-cultivo a pH 5.5? Proponga experimentos para determinarlo.

4.- *Escherichia coli* puede crecer utilizando lactosa como única fuente de carbono gracias a una permeasa específica. La lactosa intracelular sigue la siguiente vía:



Se está estudiando la capacidad de utilización de azúcares de *Streptococcus mutans* (uno de los principales causantes de las caries) y de otras bacterias Gram+ encontradas en la flora bucal.

Una de tales cepas presenta las siguientes características:

- carece de β-galactosidasa y β-galactoquinasa
- es capaz de crecer con lactosa o galactosa como única fuente de carbono.

Para determinar si el sistema de las fosfotransferasas estaba involucrado en el transporte de lactosa y galactosa se realizó un experimento para evaluar el crecimiento de la cepa con glucosa, lactosa o galactosa como única fuente de carbono. Se comparó la cepa salvaje con una serie de mutantes disponibles en el laboratorio.

	glucosa	lactosa	galactosa
salvaje	+	+	+
$\Delta E I^1$	-	-	-
$\Delta E IIa_{glucosa}^2$	-	+	+
$\Delta$ fosfo- $\beta$ -galactosidasa <sup>3</sup>	+	-	+
$\Delta$ fosfo-galactoquinasa <sup>4</sup>	+	+	-

<sup>1</sup> Enzima que fosforila a la proteína HPr del sistema de las fosfotransferasas.

<sup>2</sup> Enzima que fosforila a glucosa para su transporte por el sistema de las fosfotransferasas

<sup>3</sup> Enzima que cataliza la hidrólisis de lactosa-6P en glucosa + galactosa-6P

<sup>4</sup> Enzima que cataliza la fosforilación de galactosa-6P en el carbono 1. La galactosa 1,6-bifosfato puede proceder hacia la oxidación completa de manera análoga a la glucosa 1,6-bifosfato en la glucólisis.

a- Puede decir si el transporte de glucosa, galactosa y lactosa es absolutamente dependiente del sistema de fosfotransferasas en este organismo, o si existen vías alternativas de transporte?

b- Interprete cada uno de los renglones de la tabla. Explique por qué las mutantes en cuestión no pueden crecer con alguno/s de los azúcares y con otros sí.

5.- *Natranaerobius thermophilus* es un microorganismo anaerobio que requiere 3,5 M NaCl y una temperatura óptima de 53 °C para su crecimiento. Debido a que presentó tolerancia a las variaciones de pH, se decidió analizar su mecanismo de adaptación.

Primero se estudió el efecto del pH externo sobre el crecimiento (Fig 1A) y la homeostasis (Fig 1B) de este microorganismo.

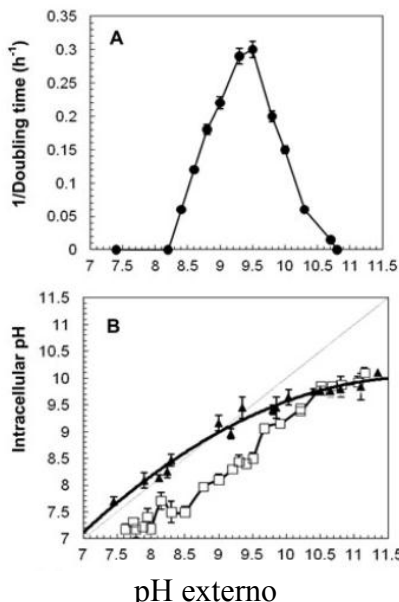


Fig 1 Efectos de las variaciones del pH externo sobre el crecimiento y homeostasis

A.- Se creció *N. thermophilus* en medio anaerobio ajustado a diferentes pH. Se realizaron curvas de crecimiento y se determinó el tiempo de duplicación en cada condición.

B.- Células de *N. thermophilus* fueron resuspendidas en buffer con sacarosa para obtener células energizadas (condiciones óptimas de ATP, solutos y carga de membrana,  $\square$ ) o en buffer sin sacarosa como control ( $\blacktriangle$ ). Estas suspensiones fueron incubadas a diferente pH en presencia de <sup>14</sup>C-metilamina y se calculó el pH interno por la distribución del radioisótopo.

### Preguntas

a- Integrando ambos gráficos, proponga la respuesta / mecanismo de adaptación.

Se detectaron 3 proteínas de membrana que podrían estar involucradas en el mecanismo propuesto (Nt-CPA1a, Nt-NhaC2 y Nt-NhaC3). Estas fueron clonadas en un vector para transformar una cepa de *E. coli* sensible a concentraciones mayores a 200 mM NaCl cuando se cultiva a pH > 7,5. Las cepas transformadas presentan crecimiento bacteriano a concentraciones mayores a 400 mM NaCl y pH 8 cuando se induce la expresión de estas proteínas. Por lo tanto, se realizaron diferentes ensayos para determinar la función de estas proteínas pero sólo el que se describe a continuación dio resultados positivos. Se generaron vesículas invertidas con células de

las diferentes transformantes en buffer a pH 13 conteniendo en su interior un colorante fluorescente sólo a este pH. Se incubaron en presencia de NADH para activar la cadena respiratoria hasta que se obtuvo la reducción de la fluorescencia interna (quenching) y se lavaron. Posteriormente, se incubaron en presencia de Na o K y se midió la re-aparición (dequenching) de la fluorescencia (Tabla 1). Se realizó el mismo experimento usando el buffer de resuspension de las vesículas a diferentes pHs (Tabla 2)

Transformant	% Dequenching observed upon addition of <sup>a</sup>	
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>
Nt-CPA1a	77 ± 2 (1.0) <sup>b</sup>	20 ± 2 (3.0)
Nt-NhaC2	43 ± 0.1 (4.4)	37 ± 0.3 (7.5)
Nt-NhaC3	< 2 (0)	26 ± 1 (30.2)
Control	< 2 (0)	2 ± 1 (0.5)

Tabla 1: Caracterización de la función de Nt-CPA1a, Nt-NhaC2 y Nt-NhaC3

Tabla 2: Efecto del pH

Transformant	% dequenching at pH <sup>a</sup>									
	7.8	8.0	8.3	8.5	8.8	9.0	9.3	9.5	9.8	10.0
Nt-CPA1a	0	0	0	43 ± 2	77 ± 2	44 ± 1	24 ± 1	11 ± 3	0	0
Nt-NhaC2	0	0	0	18 ± 1.4	19 ± 1.3	27 ± 0.2	41 ± 2.0	43 ± 0.1	15 ± 2.2	7 ± 0.2
Nt-NhaC3	0	0	12 ± 0.4	26 ± 1	18 ± 1	0	0	0	0	0
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

b- Por qué disminuye la fluorescencia en presencia de NADH?

c-Cuál es la función de las proteínas de *N. thermophilus*? Defina cada una y justifique

d- Se le ocurre algún experimento adicional?

6.- La aqualisina I es una serín proteasa alcalina de tipo subtilisina secretada por *Thermus aquaticus* YT-1, una bacteria Gram<sup>-</sup> hipertermófila.

Se produce como un precursor de 51 kDa con cuatro dominios:

- péptido señal (14 aminoácidos)
- prosecuencia N-terminal (113 aminoácidos)
- dominio maduro (281 aminoácidos)
- prosecuencia C-terminal (105 aminoácidos)

El precursor es procesado en ese orden.

La prosecuencia N-terminal tiene como funciones mantener la estabilidad del precursor y actúa en el correcto plegamiento de la región de proteasa, también inhibe la actividad proteolítica de la aqualisina I. El rol de la prosecuencia C-terminal todavía no se conoce. Con el objeto de establecer cuál es su función se realizaron los siguientes experimentos:

Se contaba con el gen completo de la aqualisina, el cual se utilizó para realizar las siguientes construcciones:

(A) Mutants as to the C-terminal pro-sequence

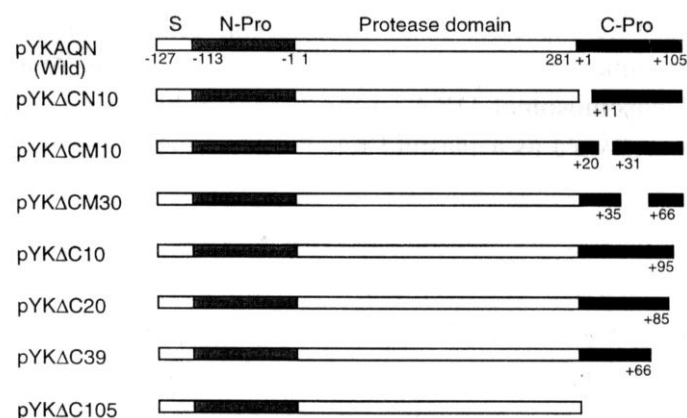


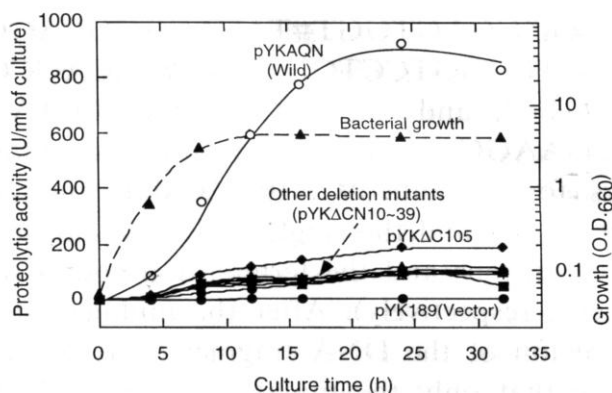
Fig. 1: Mutantes en la prosecuencia C-terminal de la aqualisina I.

pYKΔCN10 a pYKΔC105 son plásmidos para el precursor de la aqualisina con deleciones en la pro-secuencia C-terminal según se indica.

S: péptido señal; N-Pro: pro-secuencia amino terminal;

C-Pro: pro-secuencia carboxilo terminal.

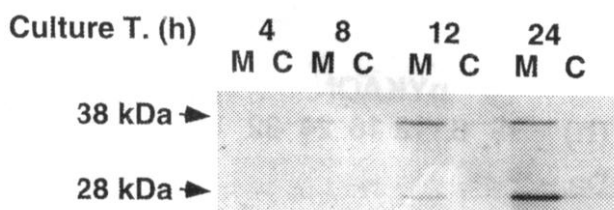
Estas construcciones se clonaron en un plásmido de expresión (pYK189) y luego se transformaron células de *Thermus thermophilus* (bacteria no productora de aqualisina). Se realizaron cultivos de las transformantes y se les determinó crecimiento (DO<sub>660</sub>) y la actividad proteolítica en los medios de cultivo libres de células, observándose lo siguiente:



**Fig. 2: Crecimiento bacteriano y secreción extracelular de Aqualisina I**

Células de *T. thermophilus* conteniendo las construcciones fueron cultivadas en medio TM a 60°C y se recolectaron alícuotas en los tiempos indicados. La actividad proteolítica en los medios libres de células fue ensayada utilizando un sustrato sintético. La actividad está expresada como unidades (U) por ml del medio de cultivo. Todas las transformantes mostraron el mismo crecimiento.

Dado que se contaba con un anticuerpo contra la aqualisina I, se decidió realizar un Western Blot para detectar la presencia de la proteasa madura (28 kDa) y su precursor de 38 kDa (sin el péptido señal ni la prosequencia N-t) en el medio de cultivo y en las células. En primer lugar se analizó en *T. aquaticus* (cepa originalmente productora de la proteasa) obteniéndose lo siguiente:

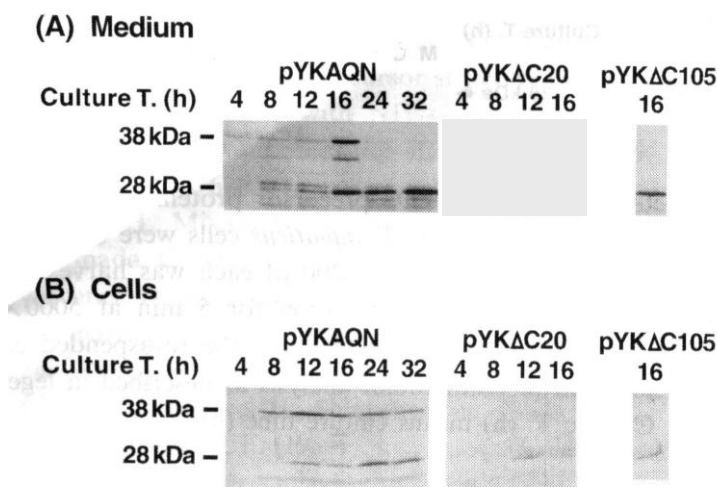


**Fig. 3: Detección de la proteína precursora de 38 kDa en el medio de cultivo de *T. aquaticus* YT-1.**

Células de *T. aquaticus* fueron cultivadas en medio TM a 60°C y se recolectaron alícuotas en los tiempos indicados. Posteriormente, fueron centrifugados a 5000 g por 5 min. 10 µl del sobrenadante del cultivo (medio, M) y 10 µl de células resuspendidas en 200 µl de buffer (C), fueron sometidos a análisis por inmunoblotting.

Se utilizó un anticuerpo generado contra aqualisina I purificada.

Luego se realizó el mismo ensayo pero utilizando *T. thermophilus* transformada con pYKAQN, pYKΔC20 o pYKΔC105:



**Fig 4. Detección de aqualisina I y sus precursores por inmunoblotting.**

Células de *T. thermophilus* conteniendo los plásmidos fueron cultivadas en medio TM a 60°C y se recolectaron alícuotas en los tiempos indicados. Las muestras (medio, A y células, B) fueron analizadas por inmunoblotting (ver fig. 3)

Preguntas:

a- En base a los resultados de la Fig. 3, qué puede decir acerca de la secreción y procesamiento de la aqualisina en *Thermus aquaticus*?

- b-** Según se observa en la Fig.3, en la productora nativa *T. aquaticus* la proteasa sólo se observa en el medio de cultivo, mientras que en *T. thermophilus* se detectan ambas formas de la proteasa asociadas a célula (Fig. 4B). Cuando extractos celulares de *T. thermophilus* fueron fraccionados en membrana y citosol, las dos formas de la proteasa se detectaron asociadas a membrana. Puede proponer una explicación para este hecho?
- c-** La mutante pYKΔC105 no mostró actividad proteolítica en el medio, sin embargo, los anticuerpos anti aqualisina detectaron una banda de 28 kDa. ¿Cómo explica este hecho?
- d-** Debido a que no se vieron bandas para la mutante pYKΔC20, se intentó detectar los productos del gen marcando las proteínas con <sup>35</sup>S-Met, seguido por inmunoprecipitación. Sin embargo, no se detectaron productos. ¿Cómo interpreta estos resultados?
- e-** ¿Qué puede decir en conclusión acerca del rol de la prosequencia C-terminal de la aqualisina?

**7.-** Los péptidos señal se requieren para la entrada de una preproteína en la vía secretoria. Sin embargo, la manera en que funcionan en conjunto con otros componentes del transporte no se conoce en detalle. En *E. coli*, la proteína Sec A es un componente clave de la maquinaria de translocación que se encuentra tanto en el citoplasma como en los sitios de translocación en las membranas. Un punto fundamental para comprender el rol de Sec A durante la translocación es conocer hasta qué punto esta proteína es capaz de discriminar diferentes propiedades del péptido señal. Con la finalidad de establecer los requerimientos necesarios para la interacción del péptido señal con Sec A, se realizaron varios experimentos usando secuencias señal con distinto grado de hidrofobicidad y carga en el extremo N-terminal. En la tabla 1 se muestran propiedades de los péptidos señal usados como modelo

**Tabla I. Características de distintos péptidos señal.**

Péptido	Hidrofobicidad	Carga N-terminal	
Wt	1	+2	Los distintos péptidos se denominan según el número de residuos leucina (L, hidrofóbico) y lisina (K, básico) que contienen.
1K7L	1	+1	
3K7L	1	+3	
1K4L	0,74	+1	
3K4L	0,72	+3	
1K2L	0,6	+1	
3K2L	0,5	+3	

**Experimento 1.** En primer lugar se llevó a cabo un ensayo de competencia. El péptido salvaje (wt por *wild type*) se marcó con tritio (<sup>3</sup>H) y un compuesto *crosslinker* fotoactivable (APDP). Cuando este péptido se incubaba con SecA y se activa el *crosslinking* por iluminación con luz UV, se forma una unión covalente entre SecA y el péptido marcado, que se puede detectar por electroforesis seguida de autorradiografía. En el ensayo de competencia, se probó la capacidad de distintos péptidos señal de desplazar (competir) al péptido marcado, incluyendo en la reacción un exceso de diez veces del péptido a testear frío, antes de la activación del *crosslinking* por luz. Los resultados se muestran en la Tabla II.

**Tabla II. Competición relativa de péptidos en solución acuosa**

Competidor	Marca unida a SecA
-	100
wt	28
3K7L	10
3K2L	91
+ membrana, sin competidor	97
+ membrana + wt	22



**Experimento 2.** Se investigó el efecto de los péptidos sintéticos sobre la actividad ATPasa de SecA en presencia o ausencia de membrana de *E. coli* (Tabla III).

**Tabla III. Efecto de péptidos sintéticos sobre la actividad ATPasa de Sec A.**

Péptido	Actividad ATPasa relativa (%)		Funcionalidad <i>in vivo</i> * (cap. translocar a la fosfatasa alcalina)
	+membrana	-membrana	
wt	100	3	+
1K7L	94	0	+
3K7L	90	2	+
1K4L	71	0	+/-
3K4L	69	0	+/-
1K2L	0	1	-
3K2L	0	1	-

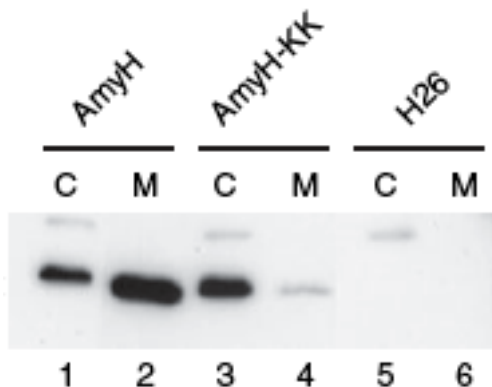
\* Para determinar la funcionalidad *in vivo* se fusionó cada uno de los péptidos al N-terminal de la fosfatasa alcalina, y se determinó la capacidad de esta enzima de ser translocada a través de la medición de actividad de fosfatasa alcalina en el medio extracelular.

**Preguntas:**

- a- Qué se puede concluir sobre la especificidad de unión de los péptidos a Sec A? Cómo afecta esta unión la presencia de membrana? Es necesaria la presencia de ATP en este paso? Justifique.
- b- Qué conclusiones se pueden sacar respecto de las propiedades de los péptidos señal en cuanto a grado de hidrofobicidad, funcionalidad *in vivo* y estimulación de la actividad ATPasa?
- c- Armar un modelo que incluya toda la información disponible.

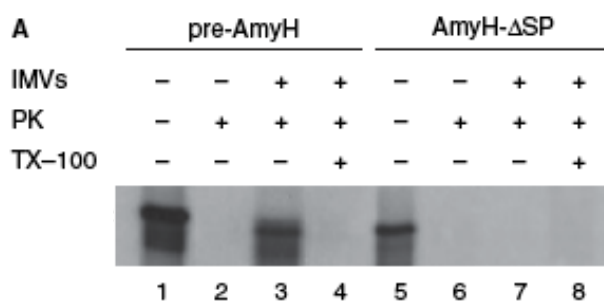
**8.-** Una arquea halófila llamada *Haloarcula hispanica* habita en ambientes cuya concentración de NaCl es de 2.5M. Para tolerar ese estrés osmótico, esta arquea mantiene intracelularmente una concentración similar de KCl. *H. hispanica* produce una amilasa extracelular y se está estudiando el mecanismo de secreción. Se realizan los siguientes experimentos:

- Cuando se clonó el gen de la amilasa (AmyH) se observó que tenía un péptido señal típico de las proteínas que se secretan por el sistema de las argininas gemelas. Para analizar si la amilasa era secretada por este sistema, se reemplazaron en el gen las dos argininas esenciales por dos residuos de lisina (AmyH-KK). Una cepa de arquea defectiva en amilasa extracelular (H26) fue transformada con los plásmidos AmyH o AmyH-KK o no transformada, y se realizó un Western blot con muestras de células y de medio de cultivo



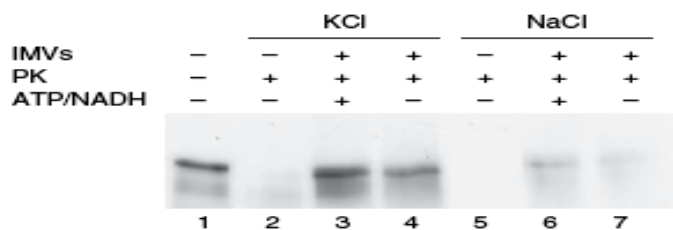
a- interprete el resultado del Western

- Se midió la secreción de amilasa al medio de cultivo en presencia de diferentes compuestos. Mientras que la presencia del protonóforo CCCP no afectó el nivel de amilasa obtenido en el medio con respecto al control sin agregados, la presencia del ionóforo específico de sodio monensina causó una severa disminución en la secreción.
- Se diseñó luego un ensayo de “secreción” *in vitro*: se preparó por un lado AmyH, conteniendo el péptido señal salvaje (pre-AmyH) o sin péptido señal (AmyH  $\Delta$ SP), por traducción *in vitro* con aminoácidos radiactivos, y posterior plegado en presencia de 2.5M KCl. Por otro lado, se prepararon vesículas de membrana de *H. hispanica* con orientación invertida, preparadas en presencia de 2.5 M NaCl (IMV por **inverted membrane vesicles**). Posteriormente se incubaron las proteínas sintetizadas *in vitro* en presencia o no de vesículas, proteinasa K (PK) o el detergente tritón X-100 (TX-100). Luego de la incubación los productos resultantes se sometieron a electroforesis de poliacrilamida y se autorradiografiaron



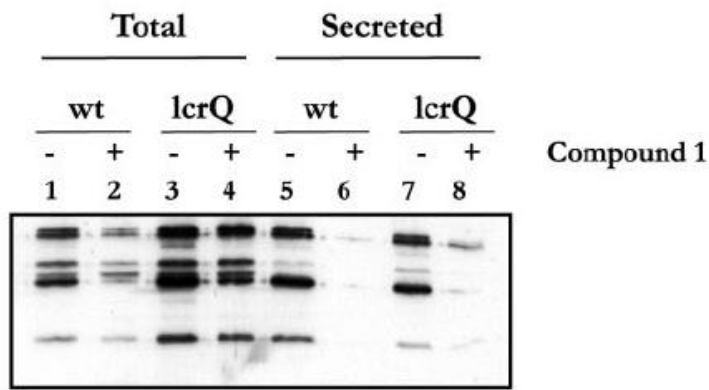
**b-** interprete el resultado de este experimento.

- Finalmente, se realizó el mismo ensayo de secreción *in vitro* con pre-AmyH que había sido previamente dializada con KCl 2.5 M (como en el experimento anterior) o con NaCl 2.5M. La proteína se pliega y es activa en presencia de cualquiera de las dos sales. El experimento se realizó en presencia o ausencia de ATP y NADH.



**c-** teniendo en cuenta todos los resultados, qué puede decir del mecanismo de secreción de AmyH? Requiere energía? Si la respuesta es positiva, podría decir de dónde proviene esa energía? Justifique sus respuestas.

**9.-** *Yersinia* es una bacteria patógena de eucariotas. En el proceso de infección, cuando se adhiere al huésped, ej macrófagos, detecta bajos niveles de calcio, induce así el sistema de secreción tipo III, y a través de éste inyecta proteínas denominadas *Yop* (proteínas externas de *Yersinia*) que inhiben la inmunidad innata. Antes que la bacteria haga contacto, la expresión de *Yop* está suprimida por *LcrQ*. En el momento de contacto, *LcrQ* es secretada al medio generando una alta producción de *Yop* la cual es secretada a través del sistema de secreción tipo III de *Yersinia* sp (Ysc TTS) y translocada en la célula hospedadora. Debido a la importancia de estas proteínas en la infección, se estudió el efecto de un compuesto sobre la expresión y/o secreción de *Yop*. Se utilizaron dos cepas de *Y. pseudotuberculosis*: *wild type* y en una mutante nula en *lcrQ* que produce *Yop* constitutivamente. La producción de *Yop* es estimulada por la ausencia de calcio aún en ausencia de hospedador.



**Fig 1: Efecto del compuesto 1 sobre Yop.**

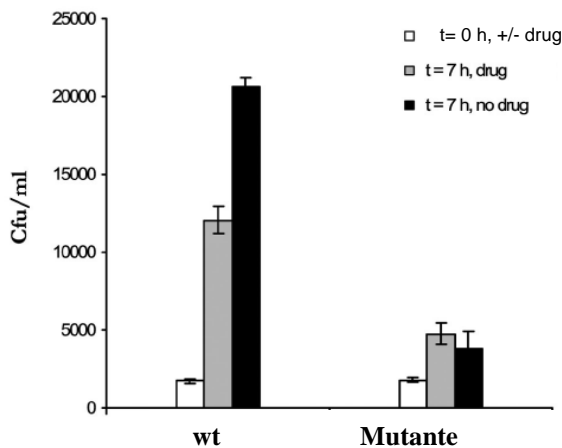
Se realizaron cultivos de ambas cepas en condiciones de inducción de *Yop* (sin calcio) y se separaron por centrifugación la células y el medio. El medio fue concentrado y las muestras se sembraron en un gel SDS. Se realizó un Western blot utilizando un anticuerpo anti *Yop* totales.

Calles 1 a 4 extracto total de células, 5 a 8 medio de cultivo.

wt: wild type; lcrQ: mutante nula

Posteriormente, se decidió estudiar el efecto de este compuesto sobre la virulencia *in vivo*. Para ello, se infectaron cultivos de células humanas (HeLa) con la cepa wild type de *Y.*

*pseudotuberculosis* o una mutante defectiva en el sistema de transporte III ( $\Delta yopB$ ) en presencia de DMSO o el compuesto 1.



**Fig. 2: Efecto del compuesto 1 sobre la virulencia *in vivo*.**

Las células de HeLa fueron infectadas con *Y. pseudotuberculosis* wt (pIB102) o una mutante defectiva en TTS (pIB604). Se utilizó el compuesto (barra gris) o DMSO como control (barra negra). Las bacterias fueron tratadas con el compuesto 1 por 30 min, y luego se infectaron las células HeLa. Posteriormente, se lavaron e incubaron por 7 h. Las células fueron lisadas con buffer y se determinó el número de bacterias viables por conteo de colonias en agar (CFU/ml).

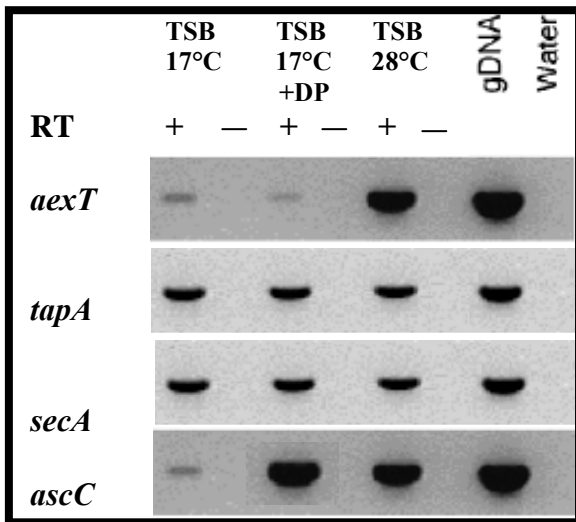
**Preguntas (JUSTIFIQUE en todos los casos)**

- a- Interprete los resultados de la figura 1 e indique el efecto del compuesto sobre las dos cepas de *Y. pseudotuberculosis*. Cómo podría explicar las diferencias en el efecto del compuesto 1 sobre la cantidad de proteínas Yop totales entre las dos cepas utilizadas?
- b- Explique el efecto del compuesto 1 sobre la virulencia.

**10.-** En el laboratorio se decidió estudiar la virulencia de *Aeromonas salmonicida*. Este microorganismo se convierte en patógeno al entrar en contacto con su hospedador, aumentando su virulencia en el interior del mismo. Se conoce que posee dos toxinas diferentes y que las mismas son secretadas al medio. En su genoma existen los genes para los sistemas de transporte SecA-dependientes y tipo III (TTS).

Primeramente, para estudiar los cambios en la virulencia, se analizó la expresión de diferentes genes relacionados con la patogenicidad de *A. salmonicida* en condiciones similares al contacto con el hospedador: aumento de la temperatura, y disminución en la concentración de hierro. Los genes analizados son: *aexT* y *tapA* toxinas secretadas al medio, *ascC* componente del TT, y *secA* componente del sistema SecA-dependiente. Se obtuvieron los mRNA totales de cultivos en las diferentes condiciones y las muestras fueron analizadas por RT-PCR. Brevemente, RT-PCR consiste en un primer paso de obtención de cDNA a partir de los mensajeros con oligómeros al azar y posteriores amplificaciones por PCR utilizando cebadores específicos para cada gen.

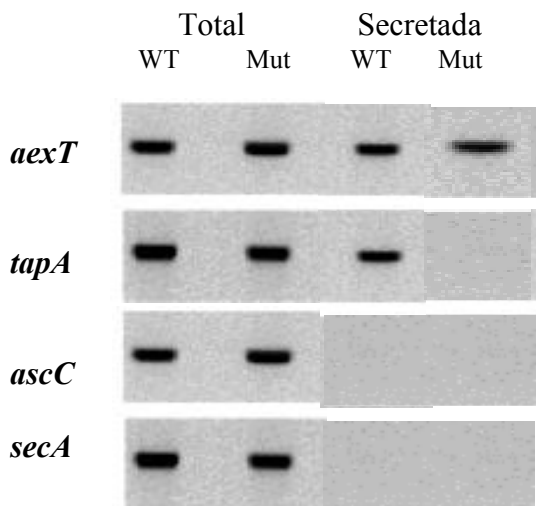
Siempre se hace un control en el que se incuba el RNA sin transcriptasa reversa (RT) para descartar contaminantes con DNA genómico en la preparación de mRNA.



**Fig 1:** Análisis RT-PCR de los genes *aexT*, *ascC* y *tapA* de *A. salmonicida*.

Las muestras de mRNA totales fueron obtenidas de bacterias incubadas en medio TSB a 17 y 28°C, y en presencia de un secuestrante de hierro (DP) a 17°C. Se realizó el tratamiento con la RT y posteriormente se realizaron reacciones de PCR utilizando cebadores específicos para cada uno de los genes en estudio.

A continuación, se analizó la correlación de las toxinas con los sistemas de transporte presentes en *A. salmonicida*. Para ello se contaba con una mutante en la proteína *ascH*, bloqueando el paso de las proteínas a través de TTS (Fig 2).



**Fig 2:** Análisis de las proteínas patogénicas de *A. salmonicida* por Western blotting.

Se realizaron cultivos de *A. salmonicida* wt y mutante en medio TSB a 28°C. Se cosecharon las células y se extrajeron las proteínas totales. El medio libre de células fue concentrado 10 veces. Las muestras fueron sembradas en un gel SDS-PAGE 12% y se realizó un Western blot. Para el revelado se utilizaron anticuerpos específicos para cada proteína.

### Preguntas

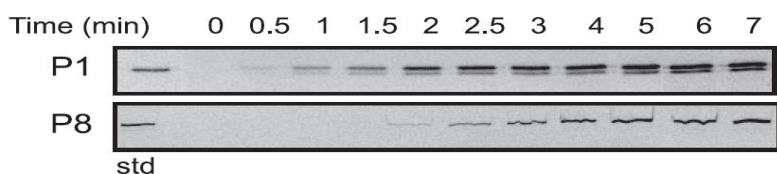
- Describe e interprete los resultados de la figura 1 incluyendo los controles
- Describe e interprete los resultados de la figura 2
- Dibuje los resultados esperados en un Western blot similar a la fig 2 pero realizado con cultivos de *A. salmonicida* incubados a 17°C con y sin hierro.
- Realice un esquema indicando los cambios que se producen al pasar este microorganismo a 28°C o en medio en ausencia de hierro.

### Problemas anexos guía Transporte (problemas de parcial de años anteriores)

1. Se quiere estudiar los parámetros que afectan la velocidad de transporte de las proteínas por el sistema Sec. Para ello se realizó el siguiente ensayo: Vesículas de membrana de orientación invertida conteniendo los componentes del sistema de transporte (SecYEG) se incubaron con la proteína SecA y dos sustratos del sistema Sec, con su péptido señal, por separado: la proteína OMP (P1, 347 aminoácidos) o una derivada de mayor PM (P8, 1397 aminoácidos), ambas conteniendo un marcador fluorescente en su C<sub>t</sub>. La reacción se inició con el agregado de 1mM

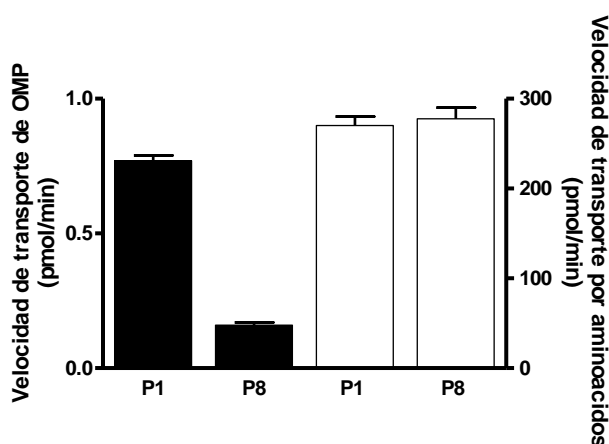
ATP, y a distintos tiempos desde el agregado se tomaron muestras, se trataron con proteinasa K y se analizaron por electroforesis en gel. Primeramente se analizó la cinética del transporte de ambas proteínas (Fig 1).

**Fig 1: Cinética del transporte de OPM (P1) y derivada (P8).**



Las reacciones fueron realizadas como se describió anteriormente. Muestras fraccionadas por SDS-PAGE fueron reveladas por un detector de fluorescencia. En la primera calle se sembraron ambas proteínas sin incubar con vesículas ni proteinasa K

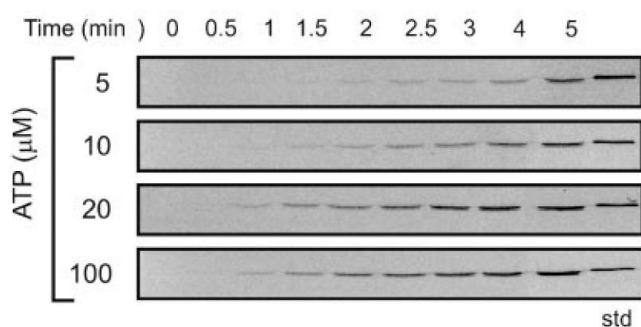
A continuación, se analizó la velocidad de transporte a través de la membrana (Fig 2)



**Fig 2: Velocidad de transporte de la proteína OPM y su derivada.**

Se cuantificó la proteína translocada y se expresó la velocidad en pmoles de proteína/min (barras negras) o en pmoles de aminoácidos/min (barras blancas)

Por último, se estudió la cinética de transporte a diferentes concentraciones de ATP (Fig 3).



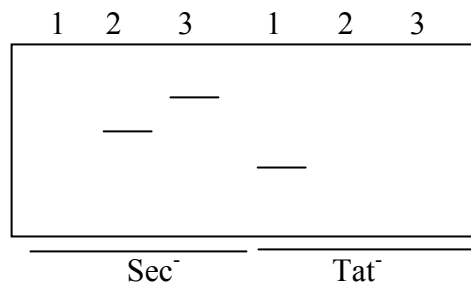
**Fig 3: Efecto del ATP en el transporte de OPM.**

Se realizaron los ensayos utilizando P1 y la reacción se inició con diferentes concentraciones de ATP. Las muestras tomadas se analizaron como se describió anteriormente. En la última calle se sembraron ambas proteínas sin incubar con vesículas ni proteinasa K.

- a- Describa e interprete la fig 1. Por qué no se ve fluorescencia a los 0.5 min?
- b- Qué resultado esperarías si omitiera SecA del medio de incubación?
- c- Indique el efecto del tamaño de OPM en la velocidad de transporte. Justifique. Podría decir cuál de los siguientes dos procesos es más limitante en cuanto a la energía que requiere? Por qué?
  - A- la unión de la proteína a translocón Sec.
  - B- el proceso de translocación en sí a través de la membrana.
- d- Indique el efecto de las concentraciones de ATP en la velocidad de transporte. Para su respuesta utilice los datos de las Fig. 1 y 3. Justifique

2.- Un microorganismo secreta una enzima llamada hemolisina. Si se plaquean las bacterias en placas agar-sangre, la producción de hemolisina extracelular se detecta como un halo blanquecino alrededor de la colonia. Por otra parte, se conoce que este microorganismo secreta una amilasa por el sistema Sec, y una fosfolipasa por el sistema Tat.

Se desea saber el sistema de secreción que media la exportación de la hemolisina. Se cuenta con cepas que contienen uno de los genes necesarios para los sistemas de secreción Sec (cepa SEC<sup>-</sup>) o el de argininas gemelas (cepa TAT<sup>-</sup>), interrumpidos por un cassette que otorga resistencia a kanamicina. Se preparan vesículas invertidas de ambas cepas y se incuban por 2 hs con amilasa S<sup>35</sup> (calles 1) o fosfolipasa S<sup>35</sup> (calles 2) o hemolisina S<sup>35</sup> (calles 3). Luego de la incubación se tratan con tripsina y centrifugan. El pellet se siembra en un gel SDS y se analizan a través de una autoradigrafía. Se obtiene el siguiente resultado:



Por otro lado, se preparó un lisado de P1 sobre la cepa SEC<sup>-</sup>, y con ese lisado, libre de células, se infectó la cepa productora de hemolisina y se agregó citrato para evitar nuevas infecciones. Las células resultantes se plaquearon en medio con kanamicina.

El mismo experimento fue repetido usando un lisado de P1 sobre la cepa TAT<sup>-</sup>.

Las bacterias resistentes a kanamicina obtenidas de cada uno de los experimentos fueron caracterizadas del siguiente modo:

- A- Se sembraron en placas de agar sangre y se incubaron toda la noche.
- B- Se crecieron en medio de cultivo, Se cosecharon las células por centrifugación, y las fracciones correspondientes a pellet y sobrenadante se sembraron en geles de poliacrilamida. Posteriormente se realizaron ensayos de Western blot utilizando los siguientes anticuerpos: anti-hemolisina, anti-amilasa, y anti-fosfolipasa.

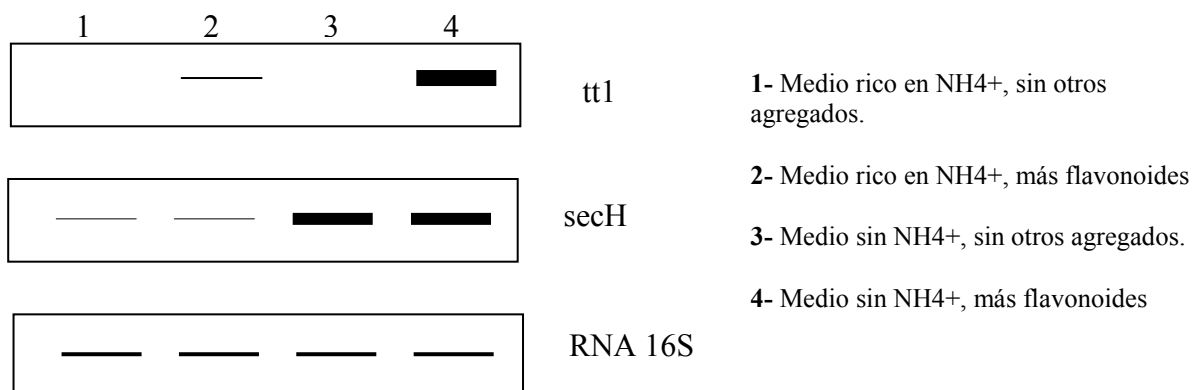
Preguntas:

- a- Indique el sistema de transporte para hemolisina.
- b- Indique los resultados que obtendría de la caracterización (puntos A y B) de las dos cepas.

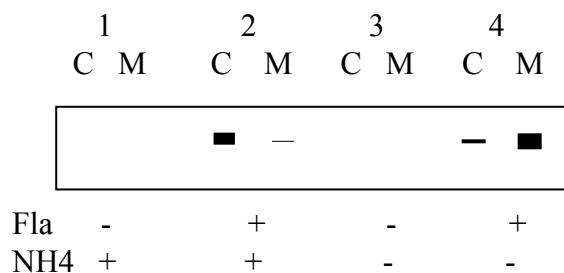
3.- Se está estudiando la interacción de *Rhizobium loti* con la planta en la cual es capaz de establecer nódulos para fijación de nitrógeno. Esta interacción es beneficiosa para la planta porque le permite obtener nitrógeno utilizable, y para el microorganismo ya que recibe fotosintatos para alimentarse. El microorganismo detecta la cercanía de la planta a través de compuestos presentes en el exudado de las raíces como los flavonoides, y se establece la interacción física, lo que involucra la penetración del microorganismo al tejido vegetal y la posterior formación de un nódulo.

**Exp 1.** Se analiza la expresión del gen *tt1* (que codifica para un componente esencial del sistema de secreción tipo III) y del gen *secH* ( que codifica para una proteína que tiene alguna función en

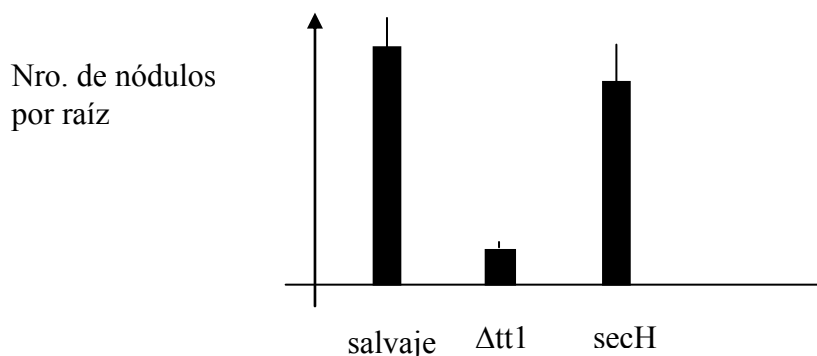
la secreción de ciertas proteínas mediada por el sistema sec) en respuesta a distintas condiciones mediante un ensayo de RT-PCR: aislamiento de RNA, transcripción reversa, amplificación por PCR con primers específicos para el gen *tt1*, para el gen *secH* y para el gen de RNA 16S



**Exp. 2.** Se analiza la producción y secreción de pectinasa (necesaria para la primera penetración del microorganismo en la planta) por medio de un Western blot utilizando muestras correspondientes al medio extracelular (M) o a las células (C) crecidas en las mismas condiciones que en el experimento 1 y un anticuerpo antipectinasa.



**Exp. 3.** Se dispone además de dos cepas de *R. loti*, que presentan deleciones en los genes *tt1* o *secH*. Se mide la capacidad de nodulación de ambas cepas en comparación con la cepa salvaje.



- Interprete las Fig.1 y 2. Por qué mecanismo cree que se secreta la pectinasa? Justifique.
- Para estudiar si su sospecha es cierta Ud. decide hacer experimentos iguales a los mostrados en las Fig. 1 y 2 con las mutantes de deleción. Dibuje el resultado que esperaría obtener, de acuerdo a su hipótesis.
- Cómo podría explicar las diferencias en la capacidad de nodulación de las cepas?