



Aïllament i caracterització de mutants de *Mycoplasma genitalium* deficients en motilitat

TESI DOCTORAL

Oscar Quijada Pich

Aïllament i caracterització de mutants de *Mycoplasma genitalium* deficients en motilitat

Tesi doctoral realitzada sota la direcció dels Doctors
Jaume Piñol Ribas i Enríque Querol Murillo

Institut de Biotecnologia i Biomedicina
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Universitat Autònoma de Barcelona

Oscar Quijada Pich
Gener 2008



INDEX

Abreviatures	1
I - Introducció general	3
Característiques generals dels micoplasmes	5
Manipulació genètica dels micoplasmes	7
Els micoplasmes com a microorganismes patògens	9
Factors de virulència dels micoplasmes	10
<i>Adhesines</i>	10
<i>Variabilitat antigènica</i>	12
<i>Resistència al complement i formació de biofilms</i>	13
<i>Invasió cel·lular i persistència intracel·lular</i>	14
<i>Producció de toxines</i>	15
<i>Motilitat</i>	17
El citoesquelet dels micoplasmes	17
L'organel·la terminal dels micoplasmes	20
La motilitat dels micoplasmes	25
Divisió cel·lular dels micoplasmes	30
II - Objectius	33
III - Resultats i discussió: capítol 1	37
Introducció	39
Resultats	41
Aïllament de mutants DM generats per la inserció del transposó MTn <i>TetM438</i> al genoma	41
Identificació del punt d'inserció del minitransposó al genoma dels mutants DM	41
Perfil proteic dels mutants mg200 ⁻ i mg386 ⁻	43
Caracterització dels mutants mg200 ⁻ i mg386 ⁻	45
<i>Morfologia de la colònia</i>	45
<i>Microcinematografia</i>	45
<i>Capacitat d'hemadsorció</i>	49

Complementació dels mutants mg200 ⁻ i mg386 ⁻	49
Discussió	51
IV - Resultats i discussió: capítol 2	59
Introducció	61
Resultats	62
Aïllament de mutants DM generats per la inserció del transposó MTn <i>TetM438</i> al genoma	62
Identificació del punt d'inserció del minitransposó al genoma dels mutants DM	63
Morfologia de les colònies dels mutants mg218 ⁻ i mg317 ⁻	64
Motilitat dels mutants mg218 ⁻ i mg317 ⁻	65
Construcció del plasmidi pΔmg218, assaig de transformació i anàlisi dels mutants	66
Perfil proteic dels mutants	67
Capacitat d'hemadsorció dels mutants	70
Morfologia cel·lular	71
Ultraestructura de l'organel·la terminal	72
Discussió	76
V - Resultats i discussió: capítol 3	85
Introducció	87
Resultats	88
Perfil proteic i capacitat d'hemadsorció del mutant mg192 ⁻	88
Morfologia de les colònies i motilitat de les cèl·lules del mutant mg192 ⁻	89
Morfologia i ultraestructura de les cèl·lules del mutant mg192 ⁻	90
Anàlisi del procés de migració i segregació de les OTs a la soca salvatge	92
Anàlisi del nombre d'OTs per cèl·lula	93
Discussió	95
VI - Discussió general	105

VII - Procediments experimentals	113
1. Llistat de soques bacterianes, vectors i encebadors utilitzats en aquest estudi	115
2. Composició i protocol de preparació dels medis de cultiu utilitzats en aquest estudi	118
3. Condicions de cultiu estàndard, condicions de conservació i mètode de recuperació de colònies aïllades de les soques bacterianes utilitzades en aquest estudi	121
4. Protocols de transformació bacterians utilitzats en aquest estudi	123
5. Construcció dels diferents plasmidis desenvolupats en aquest estudi	125
6. Tècniques per a la manipulació de seqüències d'ADN utilitzades en aquest estudi	127
7. Tècniques per a la manipulació de proteïnes utilitzades en aquest estudi	130
8. Identificació de proteïnes per espectrometria de masses	131
9. Expressió de la proteïna MG200 a <i>E. coli</i>	132
10. Obtenció d'anticossos monoclonals contra les proteïnes MG200 i MG218	133
11. Aïllament de mutants deficients en motilitat de <i>M. genitalium</i>	133
12. Complementació dels mutants deficients en motilitat mg200 ⁻ i mg386 ⁻	134
13. Estudis microcinematogràfics	134
14. Assaigs d'hemadsorció	135
15. Microscòpia electrònica de transmissió	136
16. Microscòpia electrònica de rastreig	136
 VIII - Conclusions	 137
 IX - Bibliografia	 142

ABREVIATURES

APR	<i>Acidic and proline residues rich</i>
ATCC	<i>American type cell culture</i>
BCIP	<i>5-Bromo-4-Chloro-3-Indolil Phosphate</i>
CARDS	<i>Community-acquired respiratory distress syndrome</i>
DA	Deficiències d'adhesió
DIG	<i>Dygoxigenin</i>
DM	Deficient en motilitat / deficiències de motilitat
EAGR	<i>Enriched in aromatic and glycine residues</i>
EE	Error estàndard
HMW	<i>High molecular weight</i>
Mb	Membrana
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
NBT	<i>Nitro Blue Tetrazolium</i>
NHBE	<i>Normal human traqueobronquial epithelial</i>
OT	Organel·la terminal
SD	Sense determinar
SMC	<i>Structural Maintenance of Chromosomes</i>
TE	Tris-EDTA
Vsa	<i>Variable surface antigen</i>

I - INTRODUCCIÓ

Característiques generals dels micoplasmes

La classe filogenètica *Mollicutes* comprèn un grup molt ampli de microorganismes distribuïts en nou gèneres: *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroleplasma* i *Phytoplasma*. Els *Mollicutes* són bacteris Gram-negatius derivats de microorganismes Gram-positius com ara els clostridis o els lactobacils. Amb més de cent espècies reconegudes, els micoplasmes (en referència als membres del gènere *Mycoplasma*) són els microorganismes més representatius de la classe *Mollicutes*. Una de les característiques més destacades dels micoplasmes és l'absència de paret cel·lular, fet que explica la seva elevada sensibilitat als detergents, als alcohols i a les variacions de la pressió osmòtica, a més de la seva resistència als antibiòtics que interfereixen en la síntesi de la paret cel·lular. La membrana plasmàtica d'aquests microorganismes és molt rica en colesterol i en lipoproteïnes. El micoplasmes presenten un codi genètic diferent de l'estàndard bacterià en el qual el codó UGA s'utilitza per a la incorporació de l'aminoàcid triptòfan en lloc de senyal d'aturada de la traducció de proteïnes. Aquest fet constitueix un inconvenient important per a l'expressió recombinant de proteïnes de micoplasma.

Per altra banda, els micoplasmes presenten genomes molt petits i amb un baix contingut en GC. Les cèl·lules de micoplasma s'han adaptat a un estil de vida parasitari, de manera que disposen d'una reduïda capacitat biosintètica i obtenen la majoria dels nutrients essencials per al seu creixement directament de la cèl·lula hoste. Per aquest motiu, els micoplasmes creixen molt lentament, són difícils de cultivar en medis lliures de cèl·lules i requereixen medis de cultiu molt rics per créixer. Els micoplasmes són contaminants habituals dels cultius cel·lulars i a causa de la seva mida reduïda (0,2-0,5 µm) són molt difícils de detectar mitjançant microscòpia. Quan les cèl·lules de

micoplasma es cultiven en medi sòlid desenvolupen colònies molt petites en forma d'ou ferrat (Figura I-1).

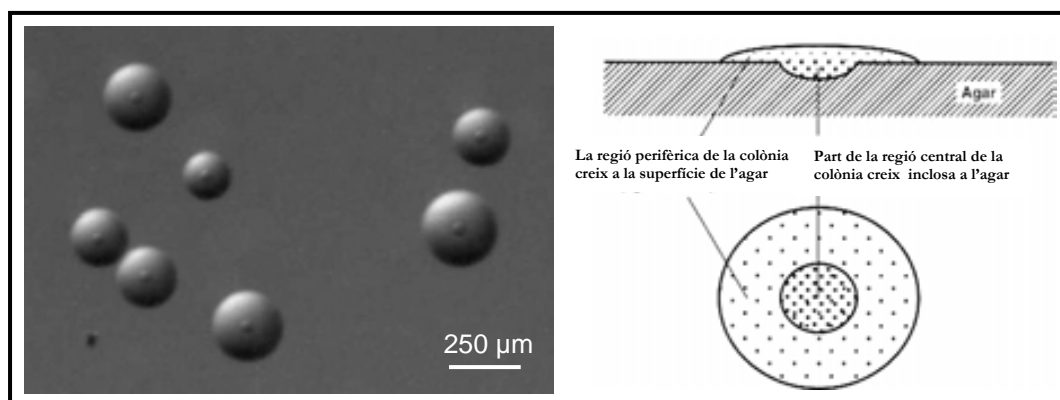


Figura I-1. Colònies de *Mycoplasma genitalium* desenvolupades en medi sòlid. L'endinsament de la regió central de la colònia a l'interior de l'agar dona lloc a colònies en forma d'ou ferrat.

Mycoplasma genitalium, objecte d'estudi d'aquest treball de tesi, és un dels organismes autoreplicatius amb el genoma més petit conegut (580 kb; Fraser *et al.*, 1995). Com la majoria de micoplasmes, *M. genitalium* requereix colesterol per al seu creixement i és anaerobi facultatiu. Les cèl·lules de *M. genitalium* no disposen de la majoria dels enzims relacionats amb el cicle de Krebs o la síntesi d'aminoàcids, nucleòtids i àcids grassos (Pollack *et al.*, 1997). En canvi, conserven els enzims necessaris per dur a terme la glicòlisi i generen energia per fosforilació a nivell de substrat. Diversos estudis indiquen que els micoplasmes disposen d'enzims multifuncionals que els permeten compensar la pèrdua de determinades capacitats biosintètiques. En aquest sentit, la promiscuïtat bioquímica de la lactat deshidrogenasa de *M. genitalium* sembla compensar l'absència de la malat deshidrogenasa (Cordwell *et al.*, 1997).

Actualment, el genoma de *M. genitalium* té anotats 525 gens que codifiquen per 482 proteïnes i s'apropa al que conceptualment es coneix com a genoma mínim, és a dir, el

complement genètic essencial per al manteniment de la vida. En aquest sentit, es considera que *M. genitalium* representa un model idoni per a l'estudi i la comprensió del funcionament d'un organisme viu (Roberts, 2004). Científics de renom com J. Craig Venter i Hamilton O. Smith s'han proposat obtenir el primer microorganisme sintètic a partir del genoma de *M. genitalium*. Recentment, aquests autors han aconseguit trasplantar amb èxit el genoma de *Mycoplasma mycoides* LC, virtualment lliure de proteïnes, en cèl·lules de *Mycoplasma capricolum* (Lartigue *et al.*, 2007). Estudis previs realitzats per aquest mateix grup han permès determinar que 382 dels 482 gens de *M. genitalium* que codifiquen per proteïnes, són essencials per al creixement d'aquest microorganisme en les condicions de cultiu del laboratori (Glass *et al.*, 2006). Sorprenentment, un 28% dels gens identificats com a essencials codifiquen per proteïnes amb una funció desconeguda. Aquest fet suggereix que una bona part dels mecanismes moleculars bàsics, necessaris per al manteniment de la vida, són encara desconeguts.

Manipulació genètica dels micoplasmes

Una de les principals causes del limitat coneixement de la biologia dels micoplasmes és la dificultat que comporta la seva manipulació genètica. En primer lloc, no existeix cap protocol estàndard de transformació. Així doncs, mentre que algunes espècies poden ser transformades utilitzant un electroporador, d'altres espècies requereixen l'ús de polietilenglicol. En segon lloc, la presència força generalitzada de nucleases de membrana (Minion *et al.*, 1993) i de sistemes de restricció actius (Dybvig *et al.*, 1998; Dybvig *et al.*, 2007), fan que la transformació dels micoplasmes requereixi concentracions molt elevades d'ADN, del voltant de les desenes de microgram. Paral·lelament, la quantitat d'eines disponibles per a la manipulació genètica dels

micoplasmes és molt limitada. En aquest sentit, només algunes espècies com ara *M. mycoides* disposen de plasmidis naturals (King *et al.*, 1992). Recentment, la identificació de les seqüències responsables de l'inici de la replicació del cromosoma dels micoplasmes ha permès dissenyar i construir alguns plasmidis artificials (Cordova *et al.*, 2002; Lartigue *et al.*, 2003; Janis *et al.*, 2005), tot i que aquests només són compatibles entre espècies de *Mycoplasma* filogenèticament properes. Així doncs, tradicionalment, els vehicles més utilitzats per a la manipulació genètica dels micoplasmes han estat els transposons. Entre els transposons més utilitzats trobem el Tn916, originari del bacteri *Enterococcus faecalis* i que confereix resistència a tetraciclina (Dybvig *et al.*, 1987), i el Tn4001, originari del bacteri *Staphylococcus aureus* i que confereix resistència a gentamicina (Mahairas *et al.*, 1989). Tant el Tn4001 com el Tn916 han estat objecte de nombroses modificacions per tal d'augmentar la seva versatilitat (Dybvig *et al.*, 2000; Pich *et al.*, 2006b). Malgrat això, hi ha moltes espècies de *Mycoplasma* que encara avui no han pogut ser transformades.

Cal destacar que els micoplasmes són particularment refractaris a la transformació per recombinació homòloga, molt probablement com a conseqüència de la pèrdua de la majoria dels enzims relacionats amb la reparació de l'ADN per recombinació. *M. genitalium* és una de les poques espècies que permet l'aplicació d'aquesta tècnica per a l'obtenció de mutants defectius per gens dispensables per al creixement (Dhandayuthapani *et al.*, 1999; Dhandayuthapani *et al.*, 2001; Burgos *et al.*, 2006). Malgrat que les eficiències de transformació obtingudes per recombinació homòloga són molt baixes (10^{-7} transformants per cèl·lula viable), aquest fet posa de manifest que les cèl·lules de *M. genitalium* disposen d'un sistema de recombinació actiu i d'una taxa de recombinació relativament elevada en comparació amb d'altres micoplasmes.

Els micoplasmes com a microorganismes patògens

Els micoplasmes són paràsits o comensals d'un gran nombre d'organismes vertebrats (Taula I-1) i són agents causants de malalties tant cròniques com agudes caracteritzades per una baixa mortalitat i una elevada morbiditat. Les malalties causades pels micoplasmes són de caràcter molt divers i inclouen patologies respiratòries, urinàries, oculars, etc.

Taula I-1. Hostes d'algunes espècies de *Mycoplasma*.

Hostes	<i>Mycoplasma</i>	Hostes	<i>Mycoplasma</i>
Humans	<i>M. genitalium</i>	Èquids	<i>M. equirhinis</i>
	<i>M. pneumoniae</i>		<i>M. equigenitalium</i>
	<i>M. penetrans</i>	Gats	<i>M. felis</i>
	<i>M. hominis</i>		<i>M. haemofelis</i>
	<i>M. fermentans</i>	Gossos	<i>M. canis</i>
	<i>M. salivarum</i>		<i>M. haemocanis</i>
	Remugants	<i>M. orale</i>	Simis
<i>M. capricolum</i>		<i>M. moatsii</i>	
<i>M. agalactiae</i>		Rosegadors	<i>M. pulmonis</i>
<i>M. ovis</i>			<i>M. arthritidis</i>
<i>M. bovis</i>		Rèptils	<i>M. agassizii</i>
<i>M. mycoides</i>	<i>M. testudinis</i>		
Porcs	<i>M. hyopneumoniae</i>		<i>M. crocodyli</i>
	<i>M. hyorhinis</i>		<i>M. alligatoris</i>
	<i>M. suis</i>		<i>M. insons</i>
Aus de corral	<i>M. gallisepticum</i>	Peixos	<i>M. mobile</i>
	<i>M. synoviae</i>	Pingüins	<i>M. sphenisci</i>

M. genitalium és un patògen humà de caràcter emergent (Baseman *et al.*, 1997). Des d'un punt de vista etiològic és clar que *M. genitalium* està implicat de manera significativa en el desenvolupament de malalties del tracte urogenital amb independència de *Chlamydia trachomatis* i *Neisseria gonorrhoea* (Deguchi *et al.*, 2002). Estudis recents indiquen que la transmissió sexual és la principal via de contagi de les malalties infeccioses originades per *M. genitalium* (Keane *et al.*, 2000). Entre les malalties genitourinàries causades per aquest microorganisme trobem la uretritis, la

cervicitis, l'endometritis, la salpingitis, la malaltia inflamatòria pelviana i certs tipus d'infertilitat. Paral·lelament, *M. genitalium* ha estat vinculat a diverses patologies extragenitourinàries com ara l'artritis, la pneumònia, la progressió de la SIDA, la síndrome de fatiga crònica, l'encefalitis i algunes malalties autoimmunes (Taylor-Robinson, 2002).

Factors de virulència dels micoplasmes

Els micoplasmes disposen d'un ampli ventall d'elements orientats a garantir la seva supervivència a l'interior de l'hoste. Aquests elements es coneixen com a factors o determinants de virulència. El grau de complexitat dels factors de virulència identificats als micoplasmes demostra que si bé aquests bacteris són relativament simples des d'un punt de vista metabòlic, són en canvi microorganismes patògens bastant sofisticats.

Adhesines. Un dels primers estadis del procés d'infecció dels micoplasmes és l'adhesió d'aquests microorganismes a les superfícies mucoses (Figura I-2). La gran diversitat d'epitelis que poden colonitzar les diferents espècies de *Mycoplasma*, requereix l'existència d'un ampli ventall de proteïnes d'adhesió a receptors de la cèl·lula hoste tant específics com inespecífics.



Figura I-2. Micoplasmes adherits a la superfície de cèl·lules eucariotes. Les fletxes indiquen cèl·lules de micoplasma individuals. Foto propietat de Daniel R. Brown.

Pel que fa als receptors inespecífics, els micoplasmes són capaços d'unir-se a nombrosos elements de la matriu extracel·lular. A *Mycoplasma gallisepticum*, una proteïna amb homologia amb les proteïnes OsmC que s'indueixen com a resposta a canvis osmòtics, presenta la capacitat d'unir-se a l'heparina (Jenkins *et al.*, 2007). A *Mycoplasma pneumoniae*, un complex format pel factor d'elongació Tu i la subunitat E1 β de la piruvat deshidrogenasa actua com a receptor de la fibronectina (Dallo *et al.*, 2002). A *M. genitalium*, l'enzim glicolític gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa s'uneix a la mucina, un dels components majoritaris de les superfícies mucoses (Alvarez *et al.*, 2003). La presència de tots aquests enzims a la membrana plasmàtica dels micoplasmes per realitzar tasques de citadherència, són exemples clars de la manera com aquests microorganismes han compensat la minimització dels seus genomes. Malauradament, els receptors específics de la cèl·lula hoste que són reconeguts per les adhesines dels micoplasmes i que confereixen l'especificitat de teixit, són encara poc coneguts.

El principal determinant de citadherència de *M. genitalium* és una proteïna de 140 kDa exposada a la superfície de la membrana (MG191, P140 o MgpB). Paral·lelament, una proteïna de 110 kDa (MG192, P110 o MgpC) col·labora significativament en el manteniment de la capacitat de citadherència d'aquest microorganisme. Les proteïnes P140 i P110 estan codificades pels gens *mg191* i *mg192* de l'operó MgPa, respectivament (Musatovova *et al.*, 2003). La proteïna P140 és homòloga a la proteïna P1 de *M. pneumoniae*, fet que justifica que aquestes dues proteïnes mostrin reactivitat serològica creuada (Dallo *et al.*, 1989). Estudis realitzats a *M. pneumoniae* indiquen que la regió de la proteïna P1 responsable de la unió als receptors de les cèl·lules epitelials es localitza entre els aminoàcids 1347-1396 (Drasbek *et al.*, 2007). Els residus d'àcid

siàlic presents a la superfície de la cèl·lula hoste són els principals candidats a actuar com a dianes de reconeixement d'aquestes adhesines (Baseman *et al.*, 1982a).

Variabilitat antigènica. Els micoplasmes disposen de sistemes bastant sofisticats per generar variabilitat antigènica i evadir així la resposta immunitària. Distribuïdes al llarg del genoma de *M. genitalium* trobem nou regions denominades illes MgPa que contenen seqüències repetides de l'operó MgPa (Fraser *et al.*, 1995). Les proteïnes P140 i P110, juntament amb la DnaK, són les proteïnes més immunogèniques d'aquest microorganisme (Svenstrup *et al.*, 2006). En conjunt, les regions amb seqüències repetides homòlogues als gens *mg191* i *mg192* representen un 4% del cromosoma de *M. genitalium* i tenen un contingut en GC superior al de la resta del genoma. Aparentment, les seqüències repetides presents a les illes MgPa no s'expressen tret que siguin transferides a l'operó MgPa per recombinació homòloga. En aquest sentit, diversos estudis indiquen que les illes MgPa representen una font de variabilitat antigènica per a les proteïnes P140 i P110 (Peterson *et al.*, 1995; Iverson-Cabral *et al.*, 2006). Recentment, l'aïllament de soques amb seqüències alternatives dels gens *mg191* i *mg192* ha permès demostrar que l'heterogeneïtat observada en aquests dos gens està associada a canvis en les seqüències repetides de les illes MgPa compatibles amb una recombinació recíproca (Ma *et al.*, 2007; Iverson-Cabral *et al.*, 2007). Aquest sistema d'intercanvi mutu fa de *M. genitalium* un microorganisme únic entre els bacteris patògens atès que, habitualment, els mecanismes per generar variabilitat antigènica es basen en la conversió gènica unidireccional.

De manera similar, el cromosoma de les cèl·lules de *Mycoplasma pulmonis* també està sotmès a contínues reorganitzacions que es produeixen amb una elevada freqüència

(Bhugra *et al.*, 1995). Algunes d'aquestes reorganitzacions serveixen per regular l'expressió dels gens del locus *vsa* ("variable surface antigen") que codifiquen per les lipoproteïnes V-1 (Shen *et al.*, 2000). Les lipoproteïnes V-1 o proteïnes *Vsa* representen veritables antigens de superfície i contenen dominis repetits en tàndem responsables de la interacció amb la cèl·lula hoste. Malgrat que les cèl·lules de *M. pulmonis* poden expressar diferents gens del locus *vsa* al llarg del seu cicle cel·lular, només un d'aquests gens és transcripcionalment actiu, mentre que els altres gens romanen silenciosos. El gen transcripcionalment actiu està associat a la regió 5' del locus *vsa* que conté la regió promotora i el lloc d'unió als ribosomes. Les reorganitzacions del cromosoma regulen l'expressió dels gens *vsa* permetent la reassociació d'aquesta regió 5' a gens del locus *vsa* que romanien silenciosos. Fins el moment, els rearranjaments identificats a *M. pulmonis* consisteixen en inversions específiques de lloc que es produeixen entre seqüències conservades de 34 pb presents a tots els gens del locus *vsa* (Bhugra *et al.*, 1995). En general, el guany o la pèrdua reversible de característiques fenotípiques concretes, com ara l'expressió de determinats antigens de superfície, es coneix com a variació de fase. És interessant destacar que les inversions del locus *vsa* tenen lloc de manera concertada amb inversions que regulen l'activitat dels sistemes de restricció-modificació de *M. pulmonis*, fet que suggereix un paper alternatiu d'aquests sistemes vinculat a la supervivència dels micoplasmes a l'interior de l'hoste (Gumulak-Smith *et al.*, 2001).

Resistència al complement i formació de biofilms. Estudis recents indiquen que el tropisme tissular de les cèl·lules de *M. pulmonis* no depèn del gen concret del locus *vsa* que s'expressa (Denison *et al.*, 2005). Aspectes importants de la biologia de *M. pulmonis* com la resistència al complement, la capacitat d'hemadsorció o la capacitat

per formar biofilms, tampoc no depenen de l'expressió d'un gen *vsa* determinat sinó de la longitud de les seqüències repetides presents al gen *vsa* transcripcionalment actiu (Simmons *et al.*, 2003; Simmons *et al.*, 2007). La longitud dels dominis repetits en tàndem dels gens *vsa* pot variar com a resultat de la recombinació post-replicativa. En general, les cèl·lules de *M. pulmonis* que expressen proteïnes Vsa amb regions repetides llargues són resistents al complement i no s'uneixen ni als eritròcits ni al poliestirè. En canvi, les cèl·lules de *M. pulmonis* que expressen proteïnes Vsa amb regions repetides curtes conserven la capacitat d'adhesió a superfícies i exhibeixen la facultat de formar biofilms. Els biofilms representen comunitats de bacteris inclosos en una matriu extracel·lular que en el cas de *M. pulmonis* conté lípids, ADN, sacàrids i les proteïnes Vsa. La capacitat per formar biofilms protegeix els microorganismes de l'acció de determinats agents antimicrobians i de la resposta immunitària de l'hoste. La facultat dels micoplasmes per desenvolupar estructures tan organitzades com els biofilms, constitueix un fet sorprenent si tenim en compte l'aparent senzillesa d'aquests microorganismes. Aquest fet posa de manifest l'existència als micoplasmes de sistemes de regulació diferencial encara desconeguts.

Invasió cel·lular i persistència intracel·lular. Els micoplasmes presenten la capacitat d'envair cèl·lules no fagocítiques i de sobreviure a l'entorn intracel·lular durant llargs períodes de temps (Baseman *et al.*, 1995; Dallo *et al.*, 2000). L'entorn intracel·lular representa un nínxol ecològic privilegiat que ofereix protecció contra les defenses de l'hoste i limita l'acció de la majoria d'agents antimicrobians. Estudis recents indiquen que *M. genitalium* té efectes citotòxics sobre cèl·lules humanes en cultiu a MOIs elevades (10 micoplasmes per cèl·lula), mentre que a MOIs més baixes estableix una infecció persistent que continua per setmanes o mesos fins i tot quan es tracten les

cèl·lules infectades amb gentamicina o ciprofloxacina (Blaylock *et al.*, 2004). Així doncs, la persistència intracel·lular dels micoplasmes possibilita l'establiment d'infeccions cròniques. El mecanisme d'internalització dels micoplasmes és desconegut, però aquest sembla respondre a un procés actiu que requereix la presència d'elements específics produïts pels propis micoplasmes. En aquest sentit, és possible aïllar mutants no invasius de *M. pneumoniae* que romanen adherits a la superfície de la cèl·lula durant dies (Baseman *et al.*, 1995). Desafortunadament, els gens responsables d'aquest fenotip no invasiu no han pogut ser identificats fins el moment. Atès que la invasió bacteriana de cèl·lules diana requereix l'ús de sistemes de transducció de senyal associats a receptors de la cèl·lula hoste i a elements del citoesquelet, és previsible que els mutants no invasius de *M. pneumoniae* siguin deficientes en l'activació d'aquests sistemes. En aquest sentit, estudis realitzats a *Mycoplasma penetrans* indiquen que l'adhesió d'aquest microorganisme a la superfície cel·lular desencadena un seguit de rearranjaments del citoesquelet de l'hoste. Aquests rearranjaments, propicien l'agregació d' α -actina, el reclutament de proteïnes fosforilades i l'acumulació de tubulina als llocs d'unió dels micoplasmes (Giron *et al.*, 1996). Paral·lelament, sembla clar que les cèl·lules internalitzades de *M. genitalium* estan associades a vesícules recobertes de clatrina (Mernaugh *et al.*, 1993), suggerint que el mecanisme d'invasió cel·lular dels micoplasmes podria ser similar al de *Chlamydia psittaci* o *C. trachomatis* (Hodinka *et al.*, 1986).

Producció de toxines. Atès que els micoplasmes no disposen d'enzims com la catalasa o la superòxid dismutasa, aquests no poden eliminar l'estrès oxidatiu resultant del seu metabolisme. En conseqüència, aquests microorganismes produeixen superòxids i peròxid d'hidrogen a uns nivells susceptibles d'induir citotoxicitat. En aquest sentit,

alguns estudis han vinculat l'estrès oxidatiu derivat de la producció H_2O_2 a l'activitat hemolítica que exhibeixen algunes espècies de micoplasma (Kannan *et al.*, 2000). En moltes espècies de *Mycoplasma*, l'activitat hemolítica sembla estar associada a la membrana plasmàtica (Minion *et al.*, 1994). Aquest fet suggereix que els micoplasmes han desenvolupat mecanismes que els permeten utilitzar l'estrès oxidatiu producte del seu metabolisme com a un veritable factor de virulència. A *M. mycoides* per exemple, la producció d' H_2O_2 derivada de l'activitat de l' α -glicerofosfat oxidasa (GlpO), un enzim de la membrana implicat en el metabolisme del glicerol, representa un dels principals factors de virulència d'aquest microorganisme (Vilei *et al.*, 2001; Pilo *et al.*, 2005). En aquest sentit, les cèl·lules de *M. mycoides* alliberen l' H_2O_2 produït per l'enzim GlpO directament a l'interior de la cèl·lula hoste, causant així la seva mort.

Tot i l'absència de catalasa i superòxid dismutasa, els micoplasmes disposen de mecanismes per pal·liar els efectes de l'estrès oxidatiu derivat tant de la pròpia producció de superòxids com de l'acció de la resposta immunitària innata de l'hoste. A *M. genitalium* per exemple, el gen *mg408* codifica per un enzim que catalitza la reducció dels residus de metionina oxidats de les proteïnes (MsrA). En conseqüència, la disrupció del gen *mg408* incrementa la sensibilitat del bacteri al peròxid d'hidrogen i disminueix la virulència de la soca defectiva (Dhandayuthapani *et al.*, 2001).

Per altra banda, estudis recents han permès identificar una toxina específica dels micoplasmes (Kannan *et al.*, 2006), responsable de la síndrome d'insuficiència respiratòria adquirida o CARDS ("community-acquired respiratory distress syndrome"). La toxina CARDS està codificada pel gen *mpn372* de *M. pneumoniae* i presenta activitat ADP-ribosiltransferasa. Igual que la subunitat S1 de la toxina pertussis

secretada per *Bordetella pertussis* (Locht *et al.*, 1995), la toxina CARDS podria utilitzar el NAD del citoplasma de la cèl·lula hoste per produir la ribosilació de l'ADP de la proteïna G, un fet que interferiria en la transmissió dels senyals des dels receptors de la superfície cel·lular. La proteïna MPN372 expressada de forma recombinant i subministrada en el medi de cultiu cel·lular, produeix una vacuolització extensiva i en darrer terme la mort de les cèl·lules exposades (Kannan *et al.*, 2006).

Motilitat. Com veurem més endavant, algunes espècies de *Mycoplasma* presenten la capacitat de desplaçar-se sobre superfícies sòlides. Estudis realitzats amb mutants immòbils de *M. pneumoniae* han demostrat que aquests presenten una capacitat molt reduïda per colonitzar cèl·lules NHBE en cultiu en comparació amb la soca salvatge (Jordan *et al.*, 2007). Les cèl·lules NHBE es caracteritzen per secretar mucines i per desenvolupar cilis funcionals (Gray *et al.*, 1996), creant una barrera que dificulta l'adhesió dels micoplasmes a la membrana plasmàtica de la cèl·lula. Molt probablement, la incapacitat dels mutants immòbils de *M. pneumoniae* per desplaçar-se limita l'accessibilitat dels receptors de membrana de les cèl·lules NHBE i redueix la capacitat de colonització d'aquests.

El citoesquelet dels micoplasmes

Les cèl·lules de micoplasma presenten un conjunt d'estructures citoplasmàtiques que constitueixen un citoesquelet similar al dels organismes eucariotes. En absència de paret cel·lular, la presència del citoesquelet dona forma a les cèl·lules i ofereix un punt de suport per a la maquinària responsable del moviment dels micoplasmes. L'arquitectura del citoesquelet ha estat extensivament estudiada a *M. pneumoniae* (Hegermann *et al.*, 2002), un patògen humà estretament relacionat amb *M. genitalium*. Basant-nos en

estudis ultraestructurals, podem dividir els diferents elements que conformen el citoesquelet de *M. pneumoniae* en tres grups (Figura I-3). En primer lloc, destaca la presència d'una estructura allargada i complexa que produeix l'extensió de la membrana citoplasmàtica en un dels pols de la cèl·lula. En conjunt, la prolongació de la membrana i els diferents elements estructurals que l'originen es denomina organel·la terminal. Com veurem més endavant, l'organel·la terminal constitueix un element funcional clau de la biologia dels micoplasmes. En segon lloc, trobem una estructura perifèrica que envolta el citoplasma i que està associada de manera directa a la superfície interna de la membrana plasmàtica. Aquesta capa constitueix un veritable punt d'ancoratge tant de proteïnes transmembrana com de la resta d'estructures citoplasmàtiques. Finalment, trobem un seguit de fibres que s'entrecreuen al citoplasma de la cèl·lula formant una malla.

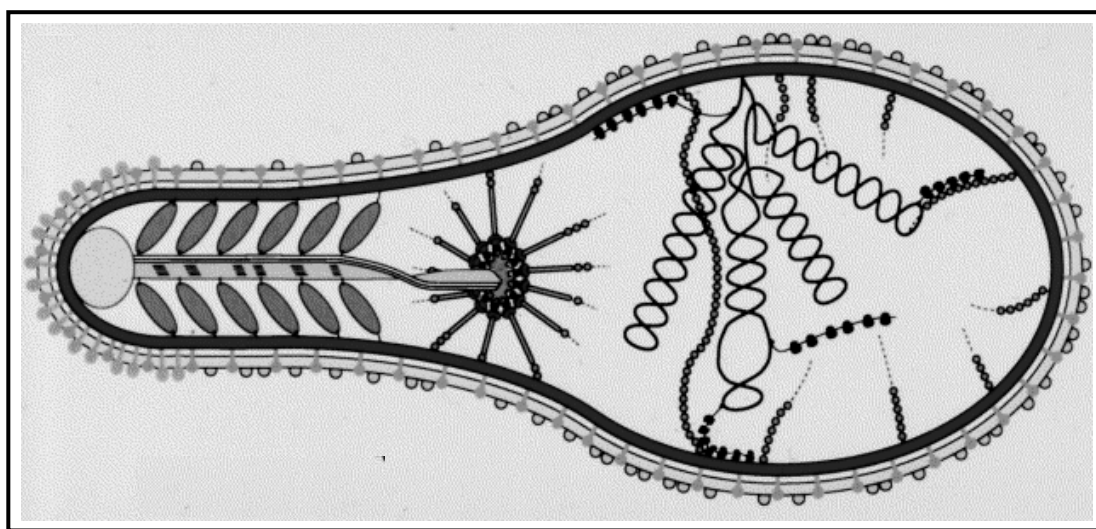


Figura I-3. Esquema d'una secció longitudinal d'una cèl·lula de *M. pneumoniae* (Mayer 2003).

Des de fa temps, se sap que el tractament de les cèl·lules de *M. pneumoniae* amb el detergent no iònic Tritó X-100 permet l'aïllament d'un complex proteic altament organitzat que roman a la fracció insoluble (Gobel *et al.*, 1981). L'anàlisi de la fracció

insoluble al Tritó X-100 ha permès identificar la major part de les proteïnes que conformen el citoesquelet de *M. pneumoniae* (Regula *et al.*, 2001). Les dues proteïnes més abundants del citoesquelet, la proteïna d'estrès tèrmic DnaK i el factor d'elongació Tu, presenten la capacitat de formar polímers (Beck *et al.*, 1978). En aquest sentit, la proteïna DnaK forma part d'una superfamília de proteïnes que presenten homologia estructural amb l'actina (Flaherty *et al.*, 1991; Itoh *et al.*, 1999). Per altra banda, el factor d'elongació Tu és un element bàsic per a la formació del citoesquelet de nombrosos organismes procariotes (Mayer 2003) i habitualment està present en una quantitat de còpies per cèl·lula 4 o 5 vegades superior a la necessària per interaccionar amb els ribosomes (Mayer *et al.*, 2002). Formant part de la fracció insoluble al Tritó X-100 també trobem nombroses lipoproteïnes, proteïnes relacionades amb el metabolisme energètic (gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa, lactat deshidrogenasa o subunitats α i β de la piruvat deshidrogenasa) i proteïnes relacionades amb la divisió cel·lular com l'FtsZ. És interessant destacar que la proteïna FtsZ presenta una estructura macromolecular similar a la de la tubulina, l'element estructural dels microtúbuls (Erickson *et al.*, 1996; Lowe *et al.*, 1998). Finalment, formen part del citoesquelet un grup de proteïnes estructurals, aparentment exclusives dels micoplasmes, la majoria de les quals estan associades al manteniment de la capacitat de citadherència (Taula I-2).

La majoria de les proteïnes estructurals de *M. pneumoniae* associades a la citadherència són riques en prolina i estan forforilades (Proft *et al.*, 1996; Su *et al.*, 2007). Per altra banda, moltes d'aquestes proteïnes estructurals presenten regions amb homologia de seqüència amb proteïnes estructurals de mamífers. La proteïna accessòria de citadherència HMW2 per exemple, presenta regions homòlogues a la miosina (Krause *et al.*, 1997), mentre que la proteïna P65 i les proteïnes accessòries de citadherència HMW1 i HMW3,

Taula I-2. Proteïnes estructurals de *M. pneumoniae* i *M. genitalium*.

Proteïna	<i>M. pneumoniae</i> ORF	ORFs/Proteïnes homòlogues de <i>M. genitalium</i>
HMW1 ¹	MPN447	MG312
HMW2	MPN310	MG218
HMW3	MPN452	MG317
P200	MPN567	MG386
P65	MPN309	MG217
P41	MPN311	MG218.1
P30	MPN453	MG318 (P32)
P1	MPN141	MG191 (P140)
B/C ²	MPN142	MG192 (P110)

¹ L'acrònim HMW fa referència a "high molecular weight" protein.

² El complex B/C, constituït per les proteïnes P90 i P40, s'origina com a conseqüència del processament de l'Orf6 a nivell post-traducciona (Sperker *et al.*, 1991; Layh-Schmitt *et al.*, 1992).

presenten seqüències repetides internes similars a l'espectrina, una proteïna de membrana present en organismes eucariotes (Krause 1996; Krause, 1998). Aquesta similitud molecular és especialment interessant perquè en processos infecciosos podria originar una resposta autoimmunitària de l'hoste. Cal destacar que la majoria dels gens que codifiquen per les proteïnes estructurals accessòries de citadherència de *M. pneumoniae* i *M. genitalium* es troben formant operons (Waldo *et al.*, 1999; Musatovova *et al.*, 2003).

L'organel·la terminal dels micoplasmes

Diverses espècies de *Mycoplasma* presenten una prolongació de la membrana en un dels pols de la cèl·lula. A *M. pneumoniae*, *M. genitalium* i *M. gallisepticum*, aquesta prolongació es denomina organel·la terminal i representa el màxim exponent del citoesquelet d'aquests microorganismes. L'organel·la terminal és una estructura

especialitzada en les funcions de motilitat i d'adhesió cel·lular. Recentment, la ultraestructura de l'organel·la terminal de *M. pneumoniae* ha estat analitzada en profunditat mitjançant criotomografia electrònica (Henderson *et al.*, 2006; Seybert *et al.*, 2006). Altres micoplasmes com ara *Mycoplasma mobile* també presenten prolongacions de la membrana anàlogues a l'organel·la terminal però, fins fa poc, la ultraestructura i la composició d'aquestes no ha començat a ser estudiada (Nakane *et al.*, 2007).

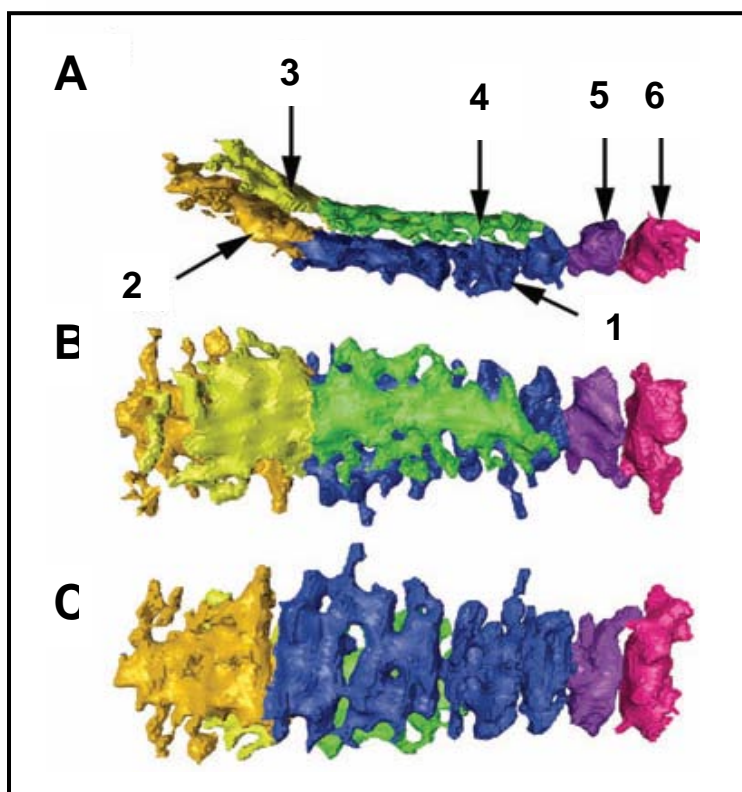


Figura I-4. Reconstrucció de l'eix electrodens de l'organel·la terminal de *M. pneumoniae* obtinguda a partir de diferents imatges de criotomografia electrònica. Sis components estructurals diferents han estat acolorits per facilitar la interpretació de les diferents vistes que es presenten. A, vista lateral; B, vista superior i C, vista inferior (Henderson *et al.*, 2006).

La major part de l'organel·la terminal de *M. pneumoniae* està formada per un eix central electrodens que constitueix la columna vertebral d'aquesta estructura (Figura I-4). L'eix electrodens està format per dues varetes paral·leles independents i està envoltat per una regió electrolúcida que el separa de la membrana citoplasmàtica. Les imatges de

criotomografia electrònica obtingudes han permès demostrar que la vareta inferior (Figura I-4, components 1 i 2) és més llarga i gruixuda que la vareta superior (Figura I-4, components 3 i 4). Tot i que les dues varetes estan clarament separades, s'observen diferents punts de contacte entre elles. Els components 2 i 3 d'ambdues varetes estan lleugerament inclinats respecte els components 1 i 4, generant una curvatura a la regió més proximal de l'eix electrodens. Per altra banda, la regió més distal de l'eix electrodens presenta un engruiximent que es coneix com a botó terminal. El botó terminal consta de dos nòduls independents (components 5 i 6) però íntimament relacionats. El nòdul més proximal (component 5) està en contacte amb el component 1 de la vareta inferior mentre que el nòdul més distal està connectat a la membrana citoplasmàtica per mitjà d'un conjunt de proteïnes globulars discretes (Henderson *et al.*, 2006). La regió més proximal de l'eix electrodens sembla separada de la resta de la cèl·lula per un material lleugerament electrodens amb forma de roda (Figura I-3).

La complexa arquitectura del citoesquelet present a l'organel·la terminal planteja l'ambició repte d'assignar cadascun dels components ultraestructurals identificats a proteïnes específiques. Malauradament, la mida reduïda de les cèl·lules de micoplasma constitueix un obstacle important a l'hora de determinar amb precisió la localització cel·lular d'una proteïna concreta. Per aquest motiu, els estudis realitzats fins el moment en aquesta direcció només han permès determinar si una proteïna es localitza a l'organel·la terminal o no, o si aquesta es localitza a la regió distal, central o proximal de l'organel·la terminal (Figura I-5). Les dues tècniques més utilitzades per analitzar la localització cel·lular de les proteïnes de micoplasma són la visualització de proteïnes marcades amb fluorescència mitjançant microscòpia de contrast de fase i immunomicroscòpia electrònica ("immunogold").

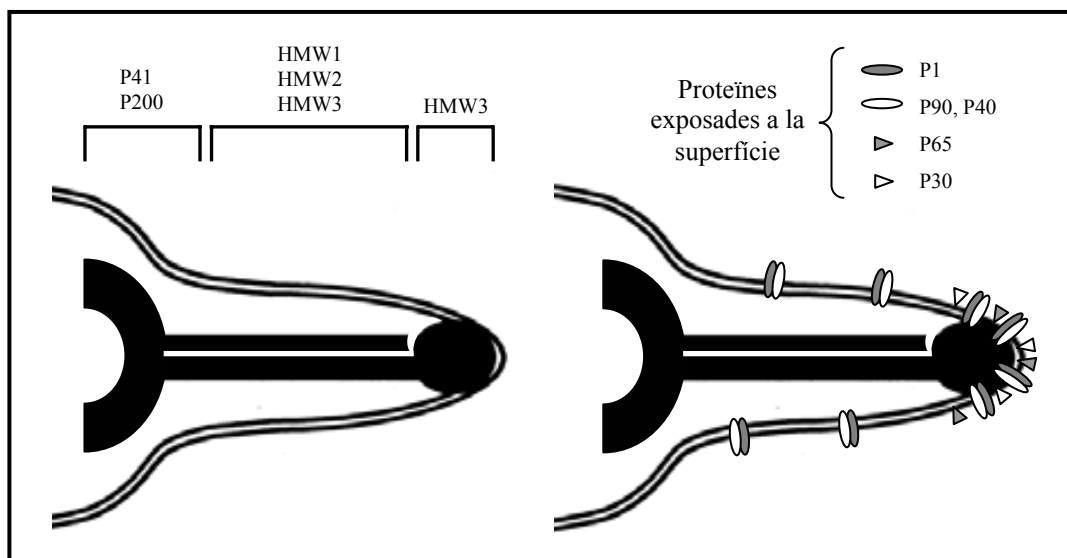


Figura I-5. Diagrames esquemàtics mostrant la localització majoritària de determinades proteïnes a l'organel·la terminal de *M. pneumoniae* (veure Krause *et al.*, 2004 per més informació).

Segons estudis realitzats a *M. pneumoniae*, les proteïnes P41 i P200 es localitzen a la base de l'organel·la terminal (Kenri *et al.*, 2004; Jordan *et al.*, 2007). Tot i això, no s'ha pogut determinar si aquestes dues proteïnes formen part de la regió més proximal del propi eix electrodens o de l'estructura circular que el separa de la cèl·lula. Un estudi recent ha demostrat que les organel·les terminals dels mutants defectius per a la proteïna P41 sovint se separen del cos de la cèl·lula i es continuen desplaçant amb independència d'aquest al voltant d'uns 30 minuts. Per una banda, aquests resultats indiquen que la proteïna P41 és responsable de l'ancoratge de l'eix electrodens a la cèl·lula (Hasselbring *et al.*, 2007). Per altra banda, el fenotip dels mutants defectius per la proteïna P41 demostra que l'organel·la terminal és responsable de la motilitat de les cèl·lules de *M. pneumoniae*. Les proteïnes HMW1 i HMW2 en canvi, es localitzen a la regió central de l'organel·la terminal i són les principals responsables de la formació de l'eix electrodens (Seto *et al.*, 2003; Kenri *et al.*, 2004). La proteïna HMW3 es concentra a la regió més distal de l'organel·la terminal, tot i que una part de la població d'aquesta proteïna també

es localitza a la regió central d'aquesta estructura (Stevens *et al.*, 1992; Seto *et al.*, 2003). Els mutants de *M. pneumoniae* per les proteïnes HMW1 i HMW2 perden completament la capacitat de citadherència (Hahn *et al.*, 1998; Krause *et al.*, 1997) mentre que els mutants HMW3 presenten una capacitat de citadherència intermèdia (Willby *et al.*, 2002). Aquests resultats posen de manifest la importància de l'organel·la terminal per a l'adhesió de les cèl·lules de micoplasma a la cèl·lula hoste.

Altres proteïnes de *M. pneumoniae* en general implicades en el manteniment de la capacitat de citadherència, també presenten una distribució polar a la cèl·lula (Figura I-5). En aquest sentit, les proteïnes P30 i P65 es localitzen a la regió més distal de l'organel·la terminal, mentre que les proteïnes P1, P90 i P40 es troben distribuïdes al llarg de tota aquesta estructura (Seto *et al.*, 2003). Els assaigs de proteòlisi limitada duts a terme en diferents estudis indiquen que aquestes proteïnes presenten regions exposades a la superfície de la membrana citoplasmàtica (Krause *et al.*, 2004). La localització a l'organel·la terminal de totes aquestes proteïnes de superfície és essencial per al manteniment de la capacitat de citadherència de les cèl·lules de *M. pneumoniae* (Baseman *et al.*, 1982b; Hahn *et al.*, 1998). Cal tenir present però, que moltes espècies de *Mycoplasma* no disposen d'organel·la terminal ni de cap estructura polar diferenciada (Dybvig *et al.*, 1996), fet que no impedeix que aquests microorganismes s'adhereixin a la superfície de les cèl·lules diana de l'hoste (Spencer *et al.*, 2002). En canvi, totes les espècies mòbils de *Mycoplasma* identificades fins el moment disposen d'organel·la terminal o d'una prolongació de la membrana anàloga a aquesta estructura. Aquestes observacions indiquen que la funció principal de l'organel·la terminal sembla estretament relacionada amb la motilitat de les cèl·lules de micoplasma.

Els estudis realitzats a *M. pneumoniae* indiquen que el procés de formació de l'organel·la terminal és extremadament complex i jeràrquic (Krause *et al.*, 2004). Les dades obtingudes suggereixen que les diferents proteïnes estructurals s'incorporen a l'organel·la terminal de manera seqüencial. La comprensió del procés de desenvolupament d'aquesta estructura passa per determinar l'ordre en el qual s'incorpora cada proteïna a nivell individual. Amb freqüència, s'observa que les mutacions en gens que codifiquen per alguna de les proteïnes de l'organel·la terminal, afecten a l'estabilitat d'altres proteïnes d'aquesta estructura. Molt probablement, això es conseqüència que l'assemblatge incorrecte d'una estructura concreta de l'organel·la terminal dificulta o impedeix l'assemblatge de tots els elements que hi estan vinculats de manera directa. Aquesta circumstància condueix a la degradació prematura de les proteïnes que no han pogut incorporar-se al citoesquelet, un fet molt habitual entre les proteïnes que formen part d'estructures d'ordre superior.

La motilitat dels micoplasmes

Diverses espècies de *Mycoplasma* presenten la capacitat de desplaçar-se sobre superfícies sòlides per mitjà d'un mecanisme poc conegut (Taula I-3). En aquest sentit,

Taula I-3. Velocitat de desplaçament d'algunes espècies mòbils de *Mycoplasma*.

Espècie de <i>Mycoplasma</i>	Velocitat de desplaçament ($\mu\text{m s}^{-1}$)
<i>M. mobile</i>	1,5 - 4,6 (a)
<i>M. pulmonis</i>	0,4 - 0,7 (a)
<i>M. pneumoniae</i>	0,336 (b)
<i>M. genitalium</i>	0,152 - 0,163 (c)
<i>M. gallisepticum</i> R _L	0,131 (b)
<i>M. penetrans</i> GTU-54-6AT	0,595 (d)
<i>M. penetrans</i> HF-2	0,050 (d)
<i>M. testudinis</i>	2,971 (d)

(a) Rosengarten *et al.*, 1987; (b) Hatchel *et al.*, 2006; (c) Aquest estudi; (d) Balish MF, 16è congrés IOM.

els micoplasmes no presenten ni flagels ni *pili*, les dues estructures bacterianes responsables de la motilitat de la majoria de microorganismes mòbils. Alternativament, els micoplasmes disposen d'estructures polars diferenciades on es concentra la maquinària responsable del moviment (Hasselbring *et al.*, 2007; Miyata *et al.*, 2002). Totes les espècies mòbils de *Mycoplasma* identificades fins el moment es desplacen en la mateixa direcció i sentit de la prolongació de la membrana.

El fet que les cèl·lules de micoplasma hagin d'adherir-se a una superfície sòlida per desplaçar-se, suggereix que les maquinàries d'adhesió i de motilitat podrien estar relacionades. Aquesta situació explicaria perquè la majoria de proteïnes implicades en el manteniment de la capacitat de la citadherència com la P1 o el complex B/C, es localitzen de manera pràcticament exclusiva a l'organel·la terminal, l'estructura responsable del moviment. En aquest sentit, la major part dels gens de micoplasma implicats inequívocament en el mecanisme de motilitat contribueixen paral·lelament al manteniment de la capacitat d'adhesió de les cèl·lules. Aquest és el cas de les proteïnes P1, P30, HMW1 i complex B/C de *M. pneumoniae* o de les proteïnes Gli521, Gli349 i Gli123 de *M. mobile* (Seto *et al.*, 2005a; Hasselbring *et al.*, 2005; Hasselbring *et al.*, 2006b; Seto *et al.*, 2005b; Uenoyama *et al.*, 2004; Uenoyama *et al.*, 2005b).

Les cèl·lules de *M. mobile* presenten una velocitat de desplaçament relativament elevada en comparació amb la resta de micoplasmes mòbils. Aquest fet ha despertat un enorme interès pel mecanisme de motilitat d'aquest microorganisme. La capacitat de desplaçament de les cèl·lules de *M. mobile* sembla estar relacionada amb la presència d'unes estructures allargades d'uns 50 nm de longitud que uneixen la membrana cel·lular del micoplasma amb la superfície d'adhesió (Miyata *et al.*, 2004). Aquestes

petites protrusions, denominades espines, es localitzen principalment a la regió més proximal de la prolongació de la membrana i a la part del cos cel·lular més proper a aquesta prolongació (Figura I-6).

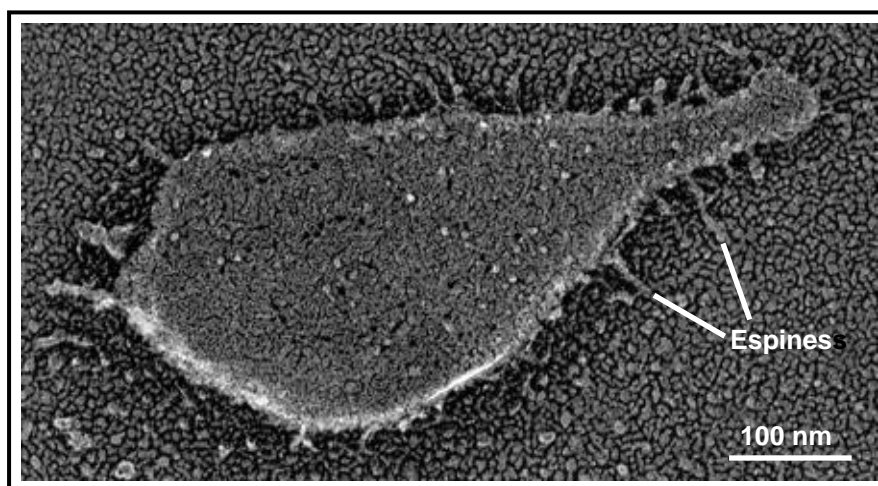


Figura I-6. Cèl·lula individual de *M. mobile* en la qual s'observa la presència d'unes estructures allargades denominades espines que es localitzen a la regió més proximal de la prolongació de la membrana i a la part del cos cel·lular més proper a aquesta estructura (Miyata *et al.*, 2004).

Els estudis que s'han dut a terme suggereixen que cada espina correspon a una molècula individual de la proteïna Gli349 (Adan-Kubo *et al.*, 2006). Les imatges de microscòpia electrònica de molècules de Gli349 aïllades mostren que aquesta proteïna presenta dues regions flexibles que li permeten adoptar diferents conformacions estructurals (Figura I-7). En base a les diferents conformacions de la proteïna Gli349 observades, s'ha elaborat un model segons el qual les cèl·lules de *M. mobile* serien propulsades per molècules individuals de Gli349 que actuarien com si fossin veritables cames. Segons aquest model, el moviment de les cèl·lules de *M. mobile* constaria de 4 etapes diferents: adhesió de la proteïna Gli349 a la superfície sòlida, canvi de conformació de la proteïna Gli349 que generaria el cop de força responsable del moviment, alliberament de la proteïna Gli349 de la superfície d'adhesió i recuperació de la conformació original. Un

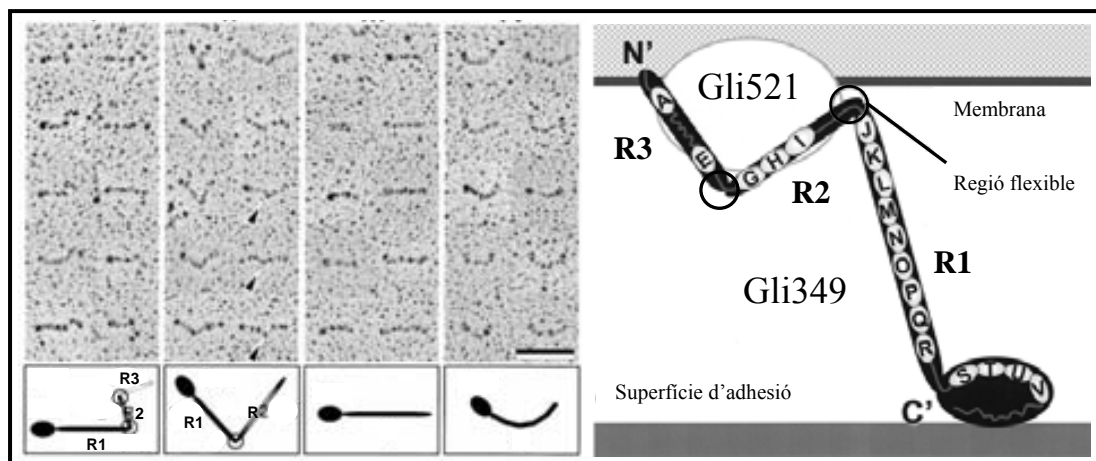


Figura I-7. Morfologia de la proteïna Gli349 de *M. mobile* (Adan-Kubo *et al.*, 2006). (A) Imatges de microscòpia electrònica de transmissió de molècules aïllades de la proteïna Gli349 i representació esquemàtica de les diferents formes observades. La barra correspon a una longitud de 100 nm. (B) Representació d'una molècula de Gli349 ancorada a la membrana d'una cèl·lula de micoplasma per l'extrem N-terminal i adherida en una superfície sòlida per l'extrem C-terminal. Paral·lelament, es mostra una molècula de la proteïna Gli521 en contacte amb l'extrem N-terminal de la proteïna Gli349. S'indica també la presència a la seqüència d'aminoàcids de la proteïna Gli349 de 18 repeticions diferents del motiu YXXXXXGF (lletres a l'interior de la proteïna). Les molècules de Gli349 presenten tres regions rígides (R1, R2, R3) separades entre elles per dues regions flexibles (indicades amb cercles).

treball recent, suggereix que la motilitat de les cèl·lules de *M. mobile in vivo* podria tenir lloc com a conseqüència de l'adhesió/alliberament de la proteïna Gli349 a residus d'àcid siàlic de la superfície de la cèl·lula (Nagai *et al.*, 2006). Paral·lelament, altres estudis indiquen que els canvis de conformació de la proteïna Gli349 podrien estar induïts per la proteïna Gli521 (Seto *et al.*, 2005a) i que el procés de motilitat consumeix energia en forma d'ATP (Jaffe *et al.*, 2004a; Uenoyama *et al.*, 2005a). Cal destacar que les proteïnes de motilitat de *M. mobile* Gli521, Gli349 i Gli123, es troben agrupades formant un operó (Seto *et al.*, 2005b).

Per altra banda, les cèl·lules de *M. pneumoniae* i *M. genitalium* no presenten espines ni disposen dels gens homòlegs als que codifiquen per les proteïnes Gli349, Gli521 i Gli123

(Himmelreich *et al.*, 1997; Fraser *et al.*, 1995). Aquesta situació obre les portes a la possibilitat que aquests dos micoplasmes es desplacin mitjançant un mecanisme de motilitat diferent al de *M. mobile* (Jaffe *et al.*, 2004b). En aquest sentit, les imatges de criotomografia electrònica mostren que els components 1 i 4 de les dues varetes de l'eix electrodens de *M. pneumoniae* (Figura I-4) estan segmentats transversalment (Henderson *et al.*, 2006), un fet que podria permetre la contracció/distensió de l'organel·la terminal d'aquests microorganismes (Figura I-8).

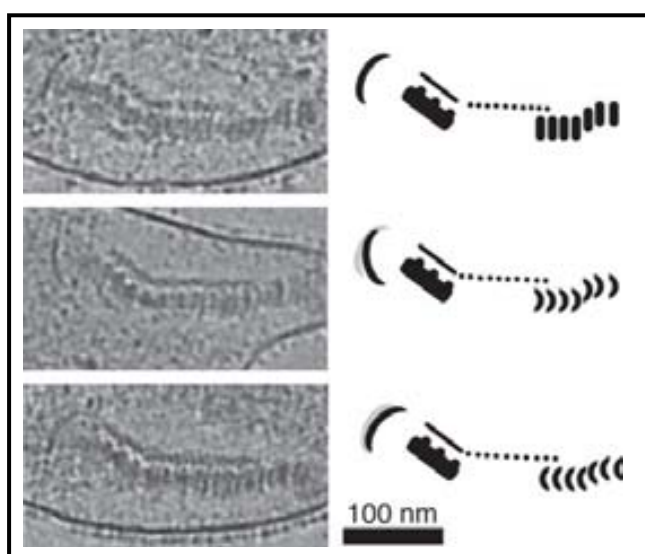


Figura I-8. Imatges de criotomografia electrònica de l'organel·la terminal de *M. pneumoniae*, posant de manifest l'existència d'estries a l'eix electrodens amb capacitat per adoptar diferents conformacions (Henderson *et al.*, 2006).

Segons això, l'organel·la terminal podria donar lloc a un tipus de desplaçament amb algunes característiques similars al moviment dels cucs. Tot i que encara queda un llarg camí per recórrer abans de poder determinar si el desplaçament de les cèl·lules de *M. pneumoniae* i *M. genitalium* s'origina realment com a conseqüència de la contracció/distensió de l'organel·la terminal, la proposta de models de motilitat com aquest és necessària per tal de dissenyar experiments que permetin avaluar la seva viabilitat.

Divisió cel·lular dels micoplasmes

Les imatges de microscòpia electrònica indiquen que les cèl·lules de micoplasma es divideixen per fissió binària (Freundt 1969). La divisió cel·lular dels micoplasmes que disposen d'organel·la terminal (OT) va precedida per la duplicació d'aquesta estructura (Bredt 1968). L'organel·la terminal nova es desenvolupa al costat de l'organel·la terminal preexistent i posteriorment migra fins al pol oposat de la cèl·lula (Figura I-9A). El fet que l'organel·la terminal nova es desenvolupi al costat de l'organel·la terminal preexistent suggereix que alguna proteïna de l'organel·la terminal actua com a marcador espacial del punt de formació de l'organel·la terminal nova. En aquest sentit, la proteïna P41 de *M. pneumoniae* sembla implicada en el control de la localització de les organel·les terminals noves (Hasselbring *et al.*, 2007).

Estudis recents realitzats a *M. pneumoniae* indiquen que l'organel·la terminal es desenvolupa *de novo* (Hasselbring *et al.*, 2006a). Paral·lelament, aquests mateixos autors han demostrat que la motilitat de les cèl·lules de *M. pneumoniae* està coordinada amb el procés de duplicació de l'organel·la terminal (Hasselbring *et al.*, 2006a). En aquest sentit, les cèl·lules de *M. pneumoniae* s'aturen coincidint amb l'inici de la formació d'una organel·la terminal nova. Aquest fet suggereix que l'organel·la terminal preexistent perd la capacitat de desplaçar-se mentre es duplica. Paral·lelament, la migració de l'organel·la terminal nova fins al pol oposat de la cèl·lula coincideix amb la restauració de la capacitat de desplaçament de l'organel·la terminal preexistent, suggerint que el propi mecanisme de motilitat és responsable de la migració de les organel·les terminals acabades de formar. La migració de l'organel·la terminal nova té lloc perquè aquesta adquireix la capacitat d'adhesió a superfícies poc després de formar-se, és a dir, al costat de l'organel·la terminal preexistent. En canvi, sembla que les

organel·les terminals noves no són mòbils per si mateixes fins que no arriben al pol oposat de la cèl·lula.

Tradicionalment, es pensava que els micoplasmes només formaven una sola organel·la terminal abans de l'inici de la citocinesi (Figura I-9A; Seto *et al.*, 2001). Sorprenentment però, un treball recent ha demostrat que nombroses cèl·lules de la soca salvatge de *M. pneumoniae* presenten més d'una organel·la terminal, indicant que les cèl·lules d'aquest microorganisme poden iniciar diversos cicles de duplicació de l'organel·la abans que es produeixi la citocinesi (Figura I-9B; Hasselbring *et al.*, 2006a).

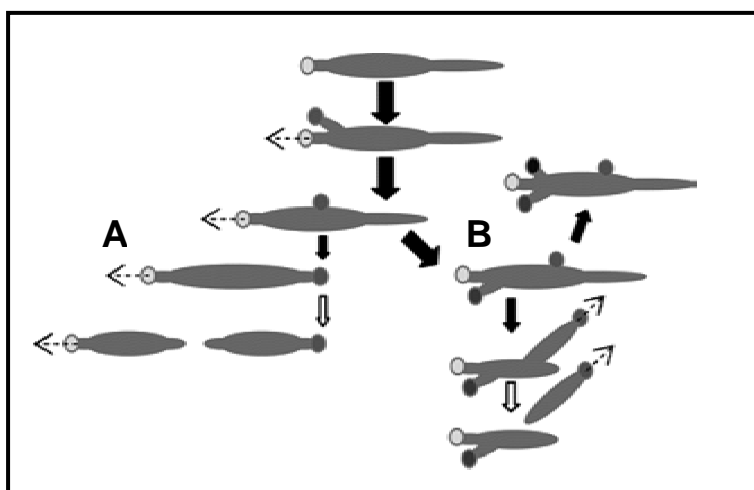


Figura I-9. Models de duplicació de l'organel·la terminal durant el cicle cel·lular de *M. pneumoniae*. (A) Model segons el qual l'organel·la terminal es duplica una sola vegada abans de la citocinesi (Seto *et al.*, 2001). (B) Model actualitzat segons el qual l'organel·la terminal es duplica diverses vegades abans de la citocinesi (Hasselbring *et al.*, 2006a).

De la mateixa manera, altres estudis indiquen que la replicació de l'ADN podria estar coordinada amb la duplicació/migració de l'organel·la terminal. Aquesta hipòtesi es basa en experiments que han permès correlacionar el contingut d'ADN de les cèl·lules de *M. pneumoniae* amb el nombre i la localització de les organel·les terminals

d'aquestes cèl·lules (Seto *et al.*, 2001). Els resultats obtinguts indiquen que el contingut d'ADN de les cèl·lules amb dues organel·les terminals és superior al de les cèl·lules amb una sola organel·la terminal. De la mateixa manera, el contingut màxim d'ADN a les cèl·lules amb dues organel·les terminals s'observa just abans de l'inici de la citocinesi, és a dir, un cop ha finalitzat el procés de migració de l'organel·la terminal nova.

En conjunt, sembla doncs que els micoplasmes disposen d'elements reguladors que permeten coordinar la motilitat, la duplicació de l'organel·la terminal i la replicació de l'ADN. L'existència d'aquests sistemes de regulació ens indica que la complexitat d'aquests microorganismes pot ser superior a la que podria esperar-se prenent com a referència la mida reduïda dels seus genomes. La identificació de les proteïnes que constitueixen els sistemes de regulació representa una de les línies de recerca més prometedores dins el camp de la micoplasmologia.

II - OBJECTIUS

Els objectius que s'han plantejat per aquest treball de tesi són:

1. Estudiar i descriure les característiques del moviment de les cèl·lules de *M. genitalium*.
2. Desenvolupar un mètode que permeti aïllar mutants de *M. genitalium* deficients en motilitat.
3. Aïllar i caracteritzar mutants de *M. genitalium* deficients en motilitat que no presentin deficiències d'adhesió.
4. Aïllar i caracteritzar mutants de *M. genitalium* deficients en motilitat i amb deficiències d'adhesió.
5. Estudiar i descriure les característiques de l'organel·la terminal de *M. genitalium*.
6. Determinar la possible relació dels gens de motilitat identificats amb l'organització de l'organel·la terminal.
7. Determinar o proposar l'origen de les deficiències de motilitat en cadascun dels mutants aïllats.

III - RESULTATS I DISCUSSIÓ

Capítol 1

Identificació de gens de *M. genitalium* implicats en motilitat però no en adhesió cel·lular.

INTRODUCCIÓ

L'any 1995, "The Institute of Genome Research" (Maryland, USA) va fer pública la seqüència del genoma de *M. genitalium* (Fraser *et al.*, 1995). Més de deu anys després d'aquesta fita, encara existeixen més de 100 gens d'aquest microorganisme amb una funció desconeguda. En aquest sentit, la identificació dels gens implicats en els mecanismes de virulència de *M. genitalium*, entre els quals trobem els gens responsables de la motilitat, constitueix una línia de recerca de gran interès.

El cultiu de bacteris mòbils inclosos en medis d'agar tou o medis semisòlids permet demostrar la capacitat de desplaçament de les seves cèl·lules i constitueix una tècnica d'ús habitual per a la identificació i l'aïllament de mutants deficients en motilitat (DM). La presència de l'agar al voltant de les cèl·lules possibilita el moviment d'aquestes però alhora restringeix la seva capacitat de desplaçament. Estudis previs han demostrat que les cèl·lules de *M. mobile* incloses en agar tou desenvolupen colònies disperses i amb un gran nombre de microcolònies satèl·lit (Miyata *et al.*, 2000). Aquesta morfologia de colònia reflecteix la capacitat de les cèl·lules de *M. mobile* per desplaçar-se. El cultiu de cèl·lules de *M. mobile* incloses en agar tou ha fet possible l'aïllament de mutants DM que desenvolupen colònies compactes i sense satèl·lits (Miyata *et al.*, 2000).

Malauradament, aquest sistema de cultiu no permet identificar mutants DM de *M. genitalium*, molt probablement com a conseqüència de la baixa taxa de motilitat de les seves cèl·lules. Tot i això, no podem descartar que aquesta limitació sigui conseqüència del mecanisme particular de motilitat que presenten les cèl·lules de *M. genitalium*. Alternativament, hem observat que el contacte de les cèl·lules d'aquest microorganisme amb una superfície sòlida durant el desenvolupament de la colònia afavoreix el seu

moviment i en conseqüència les colònies resultants presenten nombrosos satèl·lits (Figura III-1A). Així doncs, l'addició d'agar tou sobre cèl·lules prèviament adherides a la superfície plàstica d'una placa de cultiu permet demostrar la motilitat de la soca salvatge de *M. genitalium* i proporciona una eina per a la identificació i l'aïllament de mutants DM.

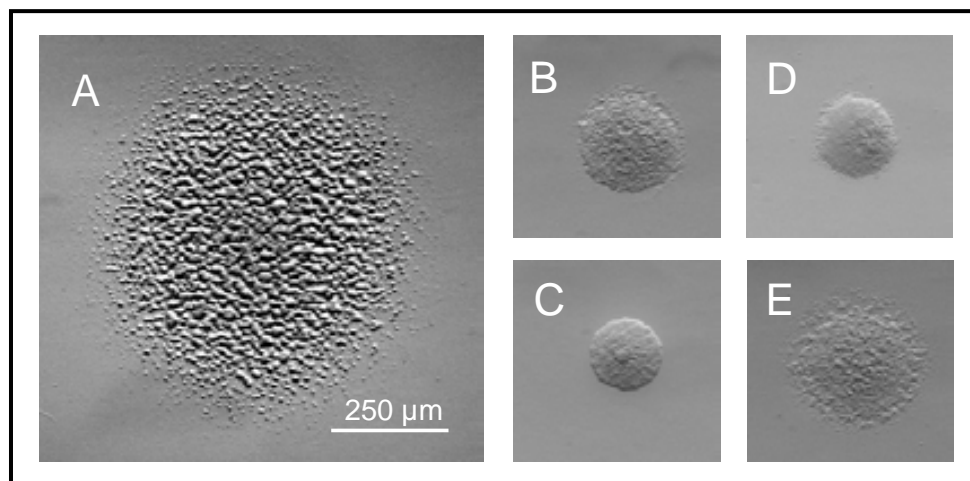


Figura III-1. Morfologia de les colònies desenvolupades per cèl·lules de la soca salvatge de *M. genitalium* i de diferents mutants DM en medi SP-4 semisòlid. (A) Soca salvatge, (B) clon 12, (C) clon 5, (D) clon 15 i (E) clon 1. Totes les imatges es mostren als mateixos augments.

L'aplicació del sistema de cultiu desenvolupat en aquest treball, ens ha permès identificar i aïllar amb èxit diferents mutants DM de *M. genitalium*. Cal recordar que amb anterioritat a la realització d'aquest estudi, tots els gens de motilitat identificats als micoplasmes també estaven vinculats al manteniment de la capacitat d'adhesió (Hasselbring *et al.*, 2005; Hasselbring *et al.*, 2006b; Seto *et al.*, 2005a; Seto *et al.*, 2005b; Uenoyama *et al.*, 2004; Uenoyama *et al.*, 2005b). Atès que la nostra tècnica de cultiu requereix l'adhesió prèvia de les cèl·lules de micoplasma a una superfície sòlida, els mutants DM aïllats en aquest estudi demostren l'existència de gens implicats en la motilitat dels micoplasmes que no formen part de la maquinària de citadherència.

RESULTATS

Aïllament de mutants DM generats per la inserció del transposó MTnTetM438 al genoma

Mitjançant un assaig de mutagènesi per transposó, es va generar una bateria de mutants a l'atzar de *M. genitalium*. Es va utilitzar l'MTnTetM438, un minitransposó derivat del Tn4001 que confereix resistència a tetraciclina i dóna lloc a insercions estables al genoma de *M. genitalium* (Pich *et al.*, 2006b). Les cèl·lules transformants resultants van ser seleccionades en presència de tetraciclina i cultivades en medi semisòlid tal i com s'ha descrit al paràgraf anterior. L'agar tou utilitzat s'obté afegint agarosa de baix punt de fusió al 0,5% al medi SP-4. La majoria de les colònies obtingudes presentaven nombrosos microsatèl·lits (Figura III-1A). Ara bé, entre les 12000 colònies analitzades, se'n van poder identificar i recuperar de l'agar vint-i-cinc amb una morfologia compacta i sense microcolònies satèl·lit (Figura III-1B-E), dues característiques pròpies dels mutants amb un fenotip DM. La fragilitat dels medis semisòlids i la dificultat que comporta recuperar colònies desenvolupades sota l'agar tou dificulta l'aïllament de soques pures. Per aquest motiu, les vint-i-cinc soques recuperades van ser propagades en medi líquid, filtrades per porus de 0,22 µm i recultivades en medi semisòlid. Aquest pas va permetre confirmar la puresa de divuit de les soques obtingudes. La resta de soques presentaven alguna colònia dispersa i amb satèl·lits un cop recultivades i, en conseqüència, van ser descartades.

Identificació del punt d'inserció del minitransposó al genoma dels mutants DM

El punt d'inserció de l'MTnTetM438 al genoma dels divuit mutants DM seleccionats es va identificar per mitjà de la seqüenciació de la regió del cromosoma que flanqueja al minitransposó en aquests mutants. Per dur a terme la reacció de seqüenciació es van

Taula III-1. Punt d'inserció de l'MTn*TetM438* al genoma dels divuit mutants DM aïllats.

Mutant DM	Punt d'inserció	Gen interromput
clon 1	485097 -	<i>mg386</i>
clon 2	238166 +	<i>mg200</i>
clon 3	486787 +	<i>mg386</i>
clon 4	486455 +	<i>mg386</i>
clon 5	487458 +	<i>mg386</i>
clon 7	486623 +	<i>mg386</i>
clon 9	486784 -	<i>mg386</i>
clon 10	485775 -	<i>mg386</i>
clon 12	237771 +	<i>mg200</i>
clon 13	486789 +	<i>mg386</i>
clon 14	485771 +	<i>mg386</i>
clon 15	486716 -	<i>mg386</i>
clon 16	486081 -	<i>mg386</i>
clon 17	484239 -	<i>mg386</i>
clon 22	485307 -	<i>mg386</i>
clon 23	488029 +	<i>mg386</i>
clon 24	486492 +	<i>mg386</i>
clon 25	486323 +	<i>mg386</i>

El símbol (+) o (-) indica l'orientació al genoma de l'MTn*TetM438* respecte al gen interromput.

utilitzar els encebadors *Tc upstream* i *Tc downstream* (descrits a la secció VII corresponent als Procediments Experimentals) presents al minitransposó. Setze insercions de l'MTn*TetM438* van produir-se a la regió codificant del gen *mg386*, mentre que les dues insercions restants van tenir lloc dins la regió codificant del gen *mg200* (Taula III-1; Figura III-2).

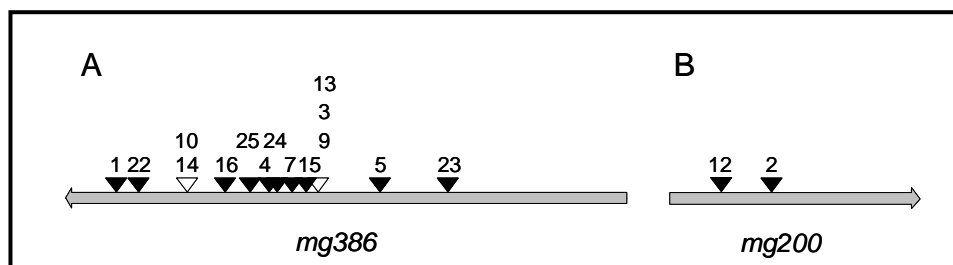


Figura III-2. Representació esquemàtica de la localització del minitransposó MTn*TetM438* a la regió codificant dels gens (A) *mg386*, bases 484702-489552 del genoma de *M. genitalium*, i (B) *mg200*, bases 237346-239151 del genoma de *M. genitalium*. Els triangles buits denoten la inserció de més d'un minitransposó en aquella regió.

Els diferents mutants obtinguts presentaven les dues orientacions possibles del minitransposó al genoma i una distribució aleatòria d'aquest. Tot i així, es va observar una regió d'inserció preferent entre les bases 486784 - 486789 del genoma.

Perfil proteic dels mutants mg200⁻ i mg386⁻

Mitjançant SDS-PAGE es va comparar el perfil proteic de les diferents soques DM amb el de la soca salvatge. Es va observar l'absència d'una banda a l'alçada de 87 kDa (Figura III-3A) als mutants que presentaven la inserció del minitransposó a la regió codificant del gen *mg200* (mutants mg200⁻). Aquesta banda es va retallar del gel de poliacrilamida al carril corresponent a la soca salvatge, es va digerir amb tripsina i es va analitzar per espectrometria de masses. Basant-nos en l'empremta peptídica obtinguda i utilitzant el programa MASCOT, la banda retallada es va identificar com la proteïna MG200. La massa molecular aparent de l'MG200 observada als gels d'SDS-PAGE era superior a la massa molecular teòrica esperada per aquesta proteïna (68,5 kDa). Mitjançant transferència de tipus Western utilitzant anticossos monoclonals obtinguts contra l'MG200, es va confirmar l'absència d'aquesta proteïna als mutants mg200⁻ (Figura III-3B).

Pel que fa al perfil proteic dels mutants que presentaven la inserció del transposó a la regió codificant del gen *mg386* (mutants mg386⁻), es va observar la desaparició de la banda amb la mobilitat electroforètica més reduïda de *M. genitalium* (Figura III-3C). Aquesta banda es va identificar com la proteïna MG386 pel mateix mètode descrit anteriorment. Paral·lelament, es va observar l'aparició d'una banda nova i amb una mobilitat electroforètica reduïda a cadascun dels mutants mg386⁻. La massa molecular aparent de les bandes noves es correlacionava amb la migració electroforètica esperada

pels diferents fragments truncats de la proteïna MG386 als diferents mutants $mg386^-$ (Figura III-3C). L'espectrometria de masses va confirmar que aquestes bandes corresponien a fragments truncats d'MG386. Igual que en el cas de l'MG200, la massa molecular aparent de la proteïna MG386 i dels seus fragments truncats també era superior a la seva massa molecular esperada. La migració electroforètica de proteïnes per sobre de la seva massa molecular teòrica és freqüent en proteïnes de micoplasma riques en residus de prolina (Dirksen *et al.*, 1996; Ogle *et al.*, 1992; Proft *et al.*, 1995; Proft *et al.*, 1996). En aquest sentit, la presència de regions riques en prolina a les proteïnes MG200 i MG386 justifica la seva migració electroforètica anòmala i evidencia la presència de característiques comunes en la seva seqüència d'aminoàcids. A part de les diferències ja esmentades, no es va observar cap altra alteració del perfil proteic dels mutants $mg386^-$ o $mg200^-$ respecte al de la soca salvatge.

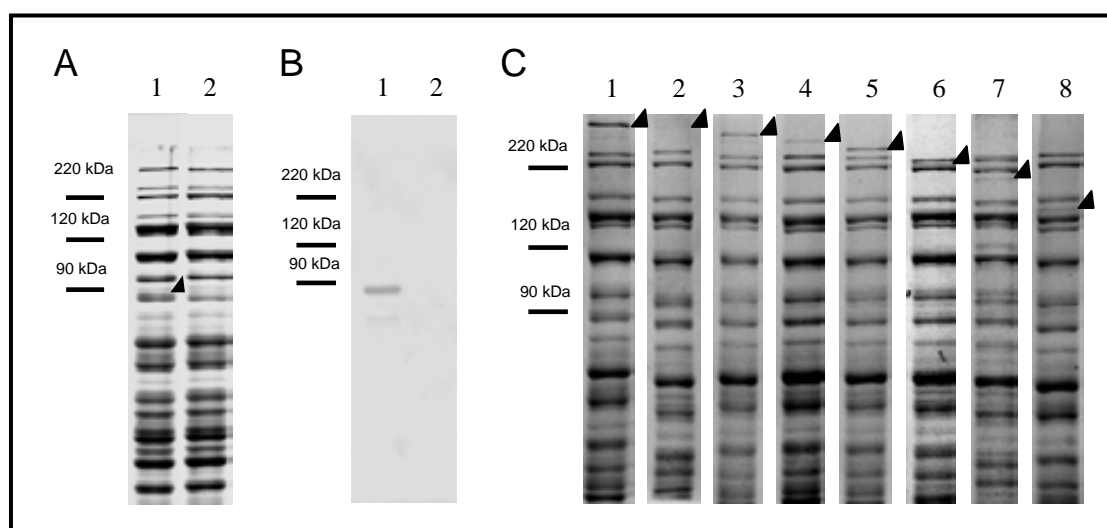


Figura III-3. Identificació de les proteïnes MG200 i MG386. (A) Perfil proteic per SDS-PAGE de la soca salvatge (carril 1) i del clon 12 dels mutants $mg200^-$ (carril 2). (B) Transferència de tipus Western d'un extracte de proteïna total de la soca salvatge (carril 1) i del clon 12 dels mutants $mg200^-$ (carril 2) utilitzant anticossos monoclonals contra la proteïna MG200. (C) Perfil proteic per SDS-PAGEs de la soca salvatge (carril 1) i dels clons 1 (carril 2), 22 (carril 3), 10 (carril 4), 16 (carril 5), 24 (carril 6), 13 (carril 7) i 5 (carril 8) dels mutants $mg386^-$. Les fletxes indiquen les bandes corresponents a les proteïnes MG200 i MG386 o els seus fragments truncats.

Caracterització dels mutants mg200⁻ i mg386⁻

Morfologia de la colònia. Les colònies dels diferents mutants DM crescuts en medi SP-4 semisòlid eren més petites que les de la soca salvatge. Les colònies derivades dels mutants mg200⁻ presentaven una superfície d'aspecte rugós i granulat (Figura III-1B). En canvi, les colònies derivades dels mutants mg386⁻ eren brillants i molt compactes (Figura III-1C-E). Les colònies derivades dels clons 1 i 22 dels mutants mg386⁻ presentaven alguna microcolònia satèl·lit (Figura III-1E), indicant que les cèl·lules d'aquests mutants conservaven una certa capacitat de desplaçament. S'ha de tenir present que no totes les interrupcions d'un gen per la inserció d'un transposó tenen com a resultat la inactivació completa de la funció del gen interromput. A partir de dades experimentals obtingudes en diferents estudis, s'han establert uns criteris teòrics que permeten estimar la probabilitat que un gen sigui inactivat o no com a conseqüència de la inserció d'un transposó (Hutchison *et al.*, 1999; Glass *et al.*, 2006). Segons aquests criteris, la inserció del transposó a l'extrem 3' de la regió codificant del gen *mg386* als clons 1 i 22 és compatible amb el manteniment d'una certa activitat d'aquest gen. Molt probablement, aquest fet és conseqüència que el producte polipeptídic esperat pel gen *mg386* en aquests dos mutants, conserva més del 80% de la seqüència de la proteïna MG386 original. Malgrat això, la morfologia de les colònies indica que la capacitat de desplaçament de les cèl·lules d'aquests dos mutants és molt reduïda. Els estudis cinematogràfics realitzats posteriorment confirmen que totes les soques aïllades en aquest treball, incloent els clons 1 i 22 dels mutants mg386⁻, presenten un fenotip DM.

Microcinematografia. La motilitat de les soques DM i de la soca salvatge es va estudiar en profunditat mitjançant microcinematografia. Tal i com s'havia observat amb anterioritat en altres micoplasmes (Radestock *et al.*, 1977), la majoria de les cèl·lules de

la soca salvatge de *M. genitalium* presenten un moviment circular. Es va observar també que la motilitat de la població en conjunt és superior quan les mostres presenten una elevada concentració de cèl·lules, suggerint l'existència d'algun factor estimulants del moviment secretat per les pròpies cèl·lules de *M. genitalium*. A diferència d'altres micoplasmes, els breus períodes de repòs durant els quals les cèl·lules romanen immòbils són molt poc freqüents a *M. genitalium*. En part, això pot ser conseqüència de la menor viscositat del medi de cultiu utilitzat en el nostre estudi per analitzar les característiques del moviment de les cèl·lules. L'estudi de la motilitat en d'altres espècies de micoplasma requereix l'addició de gelatina al 3% al medi de cultiu per tal d'evitar que les cèl·lules es desenganxin durant l'anàlisi. La presència de gelatina al medi de cultiu però, modifica paràmetres importants del moviment dels micoplasmes (Radestock *et al.*, 1977). Per una banda, una major viscositat del medi augmenta la durada dels períodes de repòs, un fet que pot alterar l'estimació del nombre de cèl·lules immòbils en períodes d'observació curts. Per altra banda, un medi viscos reduïx notablement la velocitat de les cèl·lules. Per aquest motiu, sembla que les cèl·lules de *M. genitalium* ofereixen un model idoni per a l'estudi de les característiques del moviment dels micoplasmes.

A efectes quantitatives, el 94,6% de les cèl·lules de la soca salvatge eren mòbils durant el període d'anàlisi. El 74,1% de les cèl·lules mòbils descrivien un moviment circular, mentre que el 25,9% restant es movia sense cap orientació definida (Figura III-4D). D'ara en endavant, ens referirem al moviment sense cap orientació definida com a moviment erràtic. La mitjana de les velocitats de les cèl·lules mòbils de la soca salvatge era de $0,163 \pm 0,007 \mu\text{m s}^{-1}$. En canvi, tan sols el 4,8% de les cèl·lules del clon 12 dels mutants mg200⁻ es van moure durant el període d'observació (Figura III-4A), amb una

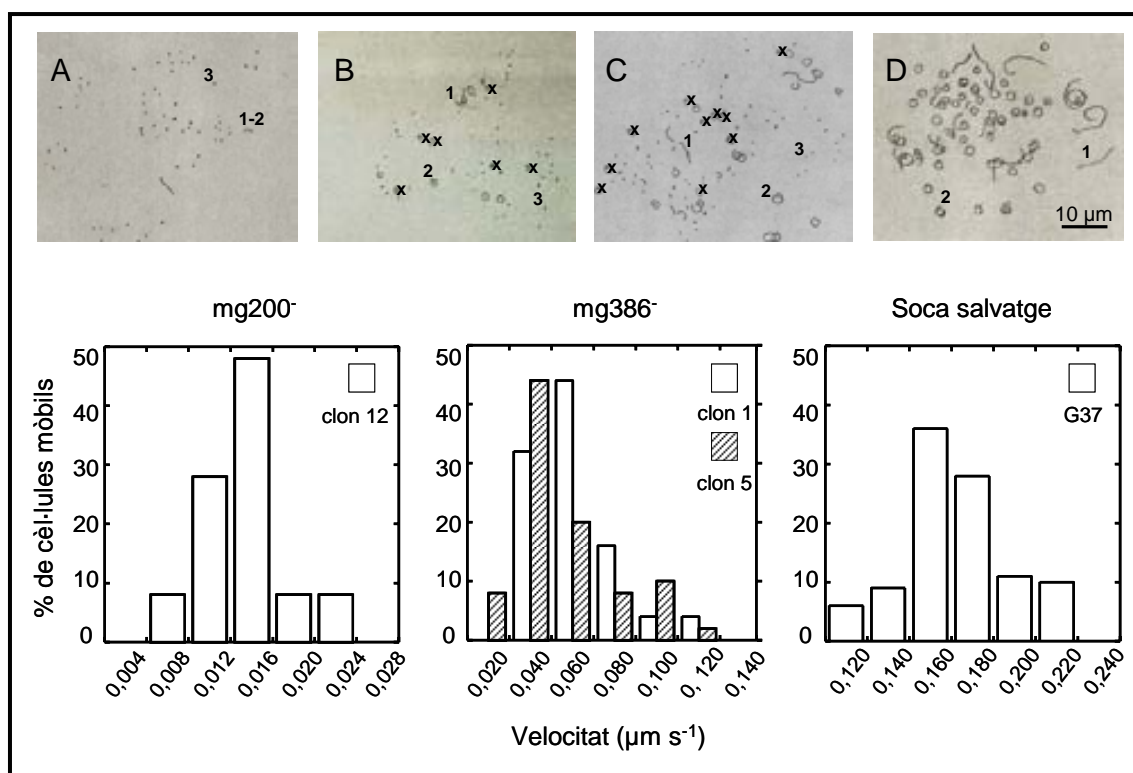


Figura III-4. Estudis cinematogràfics de la soca salvatge i dels mutants DM. A la part superior de la figura es mostren les representacions esquemàtiques de les trajectòries descrites per cèl·lules del clon 12 dels mutants mg200⁻ (A), dels clons 5 (B) i 1 (C) dels mutants mg386⁻ i de la soca salvatge (D), durant 2 min. Les trajectòries s'obtenen marcant la posició de cada cèl·lula durant 61 fotogrames consecutius, equivalents a 2 min d'observació. 1, cèl·lules amb moviment erràtic; 2, cèl·lules amb moviment circular; 3, cèl·lules immòbils; X, cèl·lules amb moviment similar al Brownià. A la part inferior es mostren les distribucions de les velocitats dels mateixos mutants DM.

mitjana de les velocitats de $0,013 \pm 0,001 \mu\text{m s}^{-1}$. De la mateixa manera, només el 20,7% de les cèl·lules del clon 5 dels mutants mg386⁻ es van moure durant el període d'anàlisi. El 32,8% de les cèl·lules mòbils d'aquest mutant descriu moviments circulars o erràtics similars als descrits per la soca salvatge (Figura III-4B) mentre que el 67,2% restant exhibia un moviment circular molt ràpid. Les característiques d'aquest darrer moviment ens van fer pensar que es tractava d'un moviment de tipus Brownià, característic de totes les partícules en suspensió en fluids i que no requereix per tant de l'existència d'un sistema específic de motilitat. Per aquesta raó, els micoplasmes que

presentaven aquest tipus de moviment no van ser considerats per determinar la mitjana de les velocitats de les cèl·lules d'aquest mutant ($0,048 \pm 0,004 \mu\text{m s}^{-1}$). La proporció de cèl·lules mòbils al clon 1 dels mutants mg386^- era superior a la del clon 5 dels mutants mg386^- (47,3%). El 43,8% de les cèl·lules mòbils d'aquest mutant exhibien moviments circulars o erràtics (Figura III-4C) amb una mitjana de les velocitats de $0,047 \pm 0,004 \mu\text{m s}^{-1}$. El 46,2% restant de cèl·lules mòbils descrivien un moviment similar al Brownià. Cal destacar que tant els mutants mg200^- com els mutants mg386^- presentaven un grau elevat d'agregació i que moltes de les cèl·lules estaven interconnectades per mitjà de filaments.

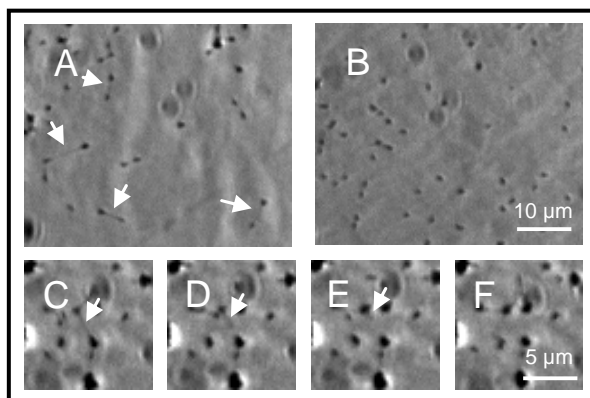


Figura III-5. Imatge obtinguda al microscopi de contrast de fase de cèl·lules individuals del clon 5 dels mutants mg386^- (A) i de la soca salvatge (B). Les fletxes indiquen els filaments intercel·lulars observats en tots els mutants DM aïllats. Els panells C-D corresponen a fotogrames seqüencials separats per un interval de temps de 34 s i mostren la retracció d'un filament intercel·lular.

Els filaments observats eren particularment abundants als mutants mg386^- (Figura III-5A) i eren extraordinàriament rars a la soca salvatge (Figura III-5B). Ocasionalment, es va observar la retracció d'aquests filaments en un temps inferior als 2 minuts (Figura III-5C-F). La presència d'aquests filaments sembla ser determinant per a la generació del particular moviment Brownià que presenten algunes cèl·lules dels mutants mg386^- . Especulativament, podria ser que les cèl·lules d'aquests mutants es mantinguessin

unides a la superfície de la placa de cultiu per mitjà dels filaments prèviament esmentats i giressin vigorosament al voltant del punt d'ancoratge. Eventualment, es va observar que algunes cèl·lules que descrivien aquest moviment esdevenien immòbils, un fet que podria coincidir amb el contacte directe i l'adhesió d'aquestes cèl·lules a la superfície de la placa de cultiu.

Capacitat d'hemadsorció. Atès que les soques DM aïllades en aquest estudi conserven la capacitat d'adherir-se a superfícies sòlides, és d'esperar que també mantinguin la seva capacitat de citadherència. La capacitat dels micoplasmes d'unir-se als eritròcits (hemadsorció) proporciona un mitjà fàcil per avaluar la capacitat d'adhesió de les soques de micoplasma. Una anàlisi qualitativa de la capacitat d'hemadsorció va demostrar que els mutants DM aïllats presentaven una capacitat de citadherència comparable a la de la soca salvatge (Figura III-6). El mutant no adherent de classe I (Mernaugh *et al.*, 1993) va ser utilitzat com a control negatiu de l'experiment.

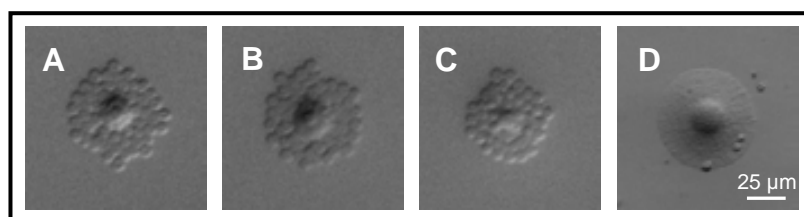


Figura III-6. Anàlisi qualitativa de la capacitat d'hemadsorció dels mutants DM. (A) mutant *mg200*⁻ clon 12, (B) mutant *mg386*⁻ clon 5, (C) soca salvatge i (D) mutant de classe I (control negatiu).

Complementació dels mutants *mg200*⁻ i *mg386*⁻

Amb l'objectiu de confirmar que el fenotip DM dels mutants aïllats era conseqüència directa de la inserció del transposó als gens *mg200* o *mg386*, els al·lels salvatges d'aquests dos gens es van amplificar per PCR i es van reintroduir als mutants DM amb l'ajut d'un minitransposó. En aquest cas es va utilitzar el minitransposó MTn*Gm*, també

derivat del Tn4001 però que confereix resistència a gentamicina a les soques transformants (Pich *et al.*, 2006b). La reintroducció del gen *mg200* salvatge va restaurar la formació de satèl·lits en medi semisòlid i la motilitat al clon 12 dels mutants *mg200*⁻. De la mateixa manera, la reintroducció del gen *mg386* salvatge va restaurar la formació de satèl·lits en medi semisòlid i la motilitat als clons 1 i 5 dels mutants *mg386*⁻. En canvi, les DM persistien després de la reintroducció de l'MTn*Gm* sense els dos gens anteriors, descartant que fos la remobilització de l'MTn*TetM438* preexistent al genoma dels mutants DM la causa de la restauració de la motilitat. Posteriorment, la presència de la banda de 87 kDa corresponent a la proteïna MG200 als mutants *mg200*⁻ complementats es va confirmar per transferència de tipus Western (Figura III-7A). Igualment, la banda corresponent a la proteïna MG386 sencera es va identificar per SDS-PAGE als mutants *mg386*⁻ complementats (Figura III-7B). Aquests resultats confirmen que els gens *mg200* i *mg386* són responsables de les DM dels mutants aïllats.

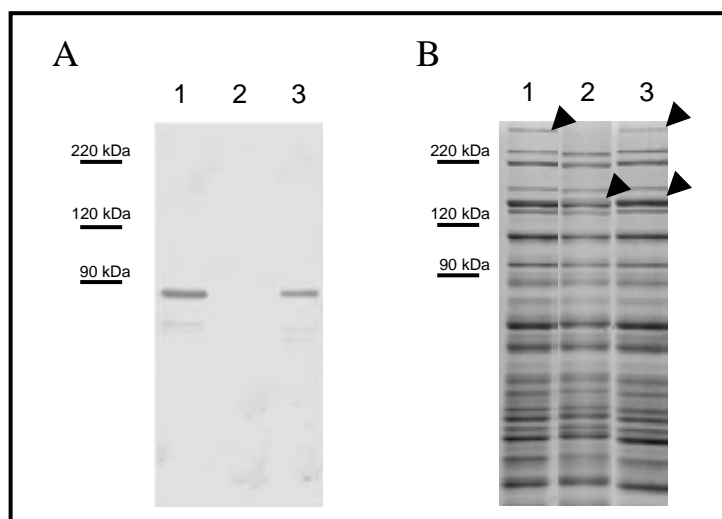


Figura III-7. Identificació de les proteïnes MG200 i MG386 als mutants *mg200*⁻ i *mg386*⁻ complementats amb els al·lels salvatges dels gens *mg200* i *mg386* respectivament. (A) Transferència de tipus Western utilitzant anticossos monoclonals contra la proteïna MG200: soca salvatge (carril 1) i mutant *mg200*⁻ clon 12 sense complementar (carril 2) i complementat (carril 3). (B) SDS-PAGE al 8% de soca salvatge (carril 1) i del mutant *mg386*⁻ clon 5 sense complementar (carril 2) i complementat (carril 3). Les fletxes indiquen les bandes corresponents a la proteïna MG386 o els seus fragments truncats.

DISCUSSIÓ

Els micoplasmes presenten la capacitat de desplaçar-se per mitjà d'un mecanisme poc conegut. En aquest sentit, els micoplasmes mòbils no presenten ni flagels ni *pili*, les dues estructures responsables de la motilitat de la majoria de microorganismes. Estudis comparatius del genoma de diferents micoplasmes amb la d'altres bacteris mòbils confirmen l'absència dels gens que conformen les maquinàries de motilitat d'altres microorganismes més coneguts (Chambaud *et al.*, 2001; Dandekar *et al.*, 2000; Fraser *et al.*, 1995; Jaffe *et al.*, 2004b; Papazisi *et al.*, 2003). Per aquest motiu, en aquest estudi ens vam proposar identificar la maquinària de motilitat de *M. genitalium*, un patogen humà emergent i fins ara el microorganisme autoreplicatiu amb el genoma més petit conegut. Estudis com aquest contribueixen a millorar el coneixement actual de la biologia dels micoplasmes així com dels seus mecanismes de supervivència *in vivo*.

En aquest estudi s'ha demostrat que l'adhesió dels micoplasmes a la superfície de les plaques de cultiu cel·lular afavoreix la motilitat de les cèl·lules en medis d'agar tou. En aquest sentit, la morfologia de les colònies desenvolupades per cèl·lules de *M. genitalium* cultivades en plaques de cultiu cel·lular i cobertes amb medi SP-4 semisòlid reflecteix la seva capacitat de desplaçar-se. Aquest sistema de cultiu ens ha permès identificar i caracteritzar divuit mutants DM de *M. genitalium*, basant-nos en l'absència de microcolònies satèl·lit. Per altra banda, l'aïllament de mutants DM de micoplasma que conserven la seva capacitat d'adhesió a superfícies ens ha permès demostrar l'existència d'un conjunt de proteïnes de motilitat independent de les adhesines o de les proteïnes accessòries d'adhesió. Els diferents mutants DM aïllats presenten insercions del minitransposó MTnTetM438 a les regions codificants dels gens *mg386* o *mg200*. Sorprenen que en cap dels assajos de transposició globals duts a terme a *M. genitalium* per

tal d'identificar els gens prescindibles per al creixement en les condicions de cultiu del laboratori (Hutchison *et al.*, 1999; Glass *et al.*, 2006), no es trobés cap transposó inserit en aquests dos gens. En conseqüència, els gens *mg200* i *mg386* eren considerats fins ara essencials per al creixement de *M. genitalium*. L'aïllament de mutants amb insercions de transposons en aquests dos gens ens fa pensar que la llista de gens dispensables per al creixement de *M. genitalium* en les condicions de cultiu del laboratori podria ser més llarga que l'obtinguda mitjançant els experiments de mutagènesi global per transposó.

L'observació directa de cèl·lules individuals dels diferents mutants DM aïllats va confirmar la seva limitada capacitat de desplaçament. A més, l'observació de diferències entre els mutants *mg200*⁻ i els mutants *mg386*⁻ a diferents nivells (forma i textura de la colònia, percentatge de cèl·lules immòbils, etc.) suggereix que les proteïnes MG200 i MG386 duen a terme una funció diferent en la motilitat de *M. genitalium*. La proteïna MG200 presenta un domini J al seu extrem N-terminal. Aquest domini, present a la família de proteïnes DnaJ, sembla estar implicat en la modulació de l'activitat ATPasa de la xaperona Hsp 70 o DnaK (Hennessy *et al.*, 2000; Walsh *et al.*, 2004). Dues altres proteïnes de *M. genitalium*, l'MG019 i l'MG002, presenten dominis J al seu extrem N-terminal i igual que l'MG200, presenten una certa homologia amb les proteïnes DnaJ al seu extrem C-terminal. Tot i això, només el gen *mg200* presenta una regulació positiva a nivell transcripcional com a resposta a un xoc tèrmic (Musatovova *et al.*, 2006). Crida l'atenció que la majoria de proteïnes DnaJ presenten una longitud d'uns 300 o 400 aminoàcids, una característica compartida per l'MG019 i l'MG002. La proteïna MG200 en canvi, presenta una regió central addicional que allarga el polipèptid fins als 601 aminoàcids. Cal dir que la participació de les xaperones en el mecanisme de motilitat ja havia estat descrita amb anterioritat en d'altres microorganismes. A

Escherichia coli per exemple, les xaperones DnaK, DnaJ i GrpE són necessàries per a la síntesi del flagel (Shi *et al.* 1992). En el cas del bacteri no flagel·lat *Myxococcus xanthus*, una proteïna homòloga a la DnaK és necessària per dur a terme un dels dos tipus de moviment que exhibeixen les cèl·lules d'aquest microorganisme. En el cas de *M. xanthus* el gen que codifica per la xaperona vinculada a la motilitat no està regulat per xoc tèrmic (Yang *et al.*, 1998). Caldrà realitzar estudis complementaris per determinar si la implicació de la proteïna MG200 en el mecanisme de motilitat de *M. genitalium* té relació o no amb la seva participació en el plegament d'altres proteïnes de micoplasma.

Per altra banda, la proteïna MG386 és homòloga a la proteïna P200 de *M. pneumoniae*. La proteïna P200 forma part de la fracció insoluble al tractament amb Triton X-100, de la qual formen part la majoria de les proteïnes del citoesquelet dels micoplasmes (Proft *et al.*, 1996; Regula *et al.*, 2001). Estudis previs indiquen que la proteïna P200 es localitza a la base de l'òrganel·la terminal de *M. pneumoniae* (Jordan *et al.*, 2007). Malgrat això, les soques de *M. pneumoniae* amb mutacions a la proteïna P200 no presenten cap alteració a ultraestructural de l'òrganel·la terminal (Jordan *et al.*, 2007). De la mateixa manera, estudis de microscòpia electrònica de transmissió dels mutants *mg386*⁻ i *mg200*⁻ realitzats al nostre laboratori indiquen l'absència d'anomalies estructurals a l'òrganel·la terminal d'aquestes soques. Basant-nos en dades derivades de l'anàlisi comparativa de gels d'electroforesi bidimensionals, alguns autors han suggerit que els nivells de la proteïna MG386 de *M. genitalium* augmenten de manera significativa quan el cultiu arriba a la fase estacionària de creixement (Wasinger *et al.*, 2000). Aquest augment dels nivells d'MG386 podria representar una resposta de la cèl·lula a la depleció de nutrients, dirigit a augmentar la motilitat de la soca salvatge per tal de buscar unes condicions ambientals més favorables pel creixement. Estudis

addicionals orientats a determinar l'existència d'una correlació entre els nivells d'MG386 i el grau de motilitat de les cèl·lules de *M. genitalium* permetrien demostrar la viabilitat d'aquesta hipòtesi.

Mitjançant una anàlisi comparativa de l'homologia en la seqüència d'aminoàcids s'ha identificat la presència de proteïnes homòlogues a l'MG200 i l'MG386 a *M. pneumoniae* (proteïnes MPN119 i MPN567, respectivament) i a *M. gallisepticum* (proteïnes MGA1228 i MGA0205, respectivament). En canvi, *M. pulmonis* disposa de proteïnes homòlogues a les tres proteïnes responsables de la motilitat de *M. mobile* (Gli349, Gli521 i Gli123). El fet que *M. pneumoniae*, *M. gallisepticum* i *M. genitalium* pertanyin a una branca filogenètica diferent a *M. mobile* i *M. pulmonis* (Maniloff, 2002) suggereix que el mecanisme de motilitat ha evolucionat dues vegades de manera independent als micoplasmes (Jaffe *et al.*, 2004b). Com a característica general, les cèl·lules de les tres espècies de *Mycoplasma* amb proteïnes homòlogues a l'MG200 i l'MG386 exhibeixen una velocitat de desplaçament baixa, mentre que les cèl·lules de les dues espècies amb proteïnes homòlogues a Gli349, Gli521 i Gli123 presenten una velocitat de desplaçament elevada.

MG200	169	WEALVGDTRYGYFDETGDWSWK-GYFDEQKVV	200
MG386	165	WYIFVGDGRKYGFWKNH-TWVWL-GYFDQLQRWN	195
MG386	223	WRPLVGNPNYGFVQNN-TWIWK-GFFDKKLNWI	253
MG386	859	WELLIGNSNYGHYEPSGEVWVA-GYFDDNQIWT	890
MG386	903	YTDLIGDEIYGRYRNKGEWIWY-GYYDETGEWV	934
MG386	954	WEQLIGNEDYGYIEDN-EWKWYDGEFDSEGNWL	985
MG312	94	YLKYVGNPDYGSYDENGWVWS-GYFENDQ-WI	124
Consens		W--LVGN--YG-Y---GEW-W--GYFD----W-	

Figura III-8. Alineament de les seqüències d'aminoàcids corresponents a les caixes EAGRs de les proteïnes MG200, MG386 i MG312 de *M. genitalium* mitjançant el programa CLUSTAL W 1.8. La seqüència consens s'ha obtingut identificant els aminoàcids que es conserven en quatre o més de les seqüències alineades.

Les proteïnes MG200 i MG386 presenten dominis rics en prolina i en residus àcids (dominis APR), i caixes riques en glicina i en residus aromàtics (caixes EAGR; Balish *et al.*, 2001). Les caixes EAGR (Figura III-8) són exclusives de les proteïnes MG200, MG386 i MG312 de *M. genitalium*, i les seves proteïnes homòlogues a *M. pneumoniae* i *M. gallisepticum* (Figura III-9). La presència d'una caixa EAGR a la proteïna MG312, una proteïna accessòria de citadherència homòloga a la proteïna HMW1 de *M. pneumoniae*, suggereix la implicació d'aquesta proteïna en el mecanisme de motilitat de *M. genitalium*. La participació de l'MG312 en la motilitat i la contribució de les caixes EAGR en aquest procés ha estat demostrada recentment al nostre laboratori (Burgos *et al.*, 2007).

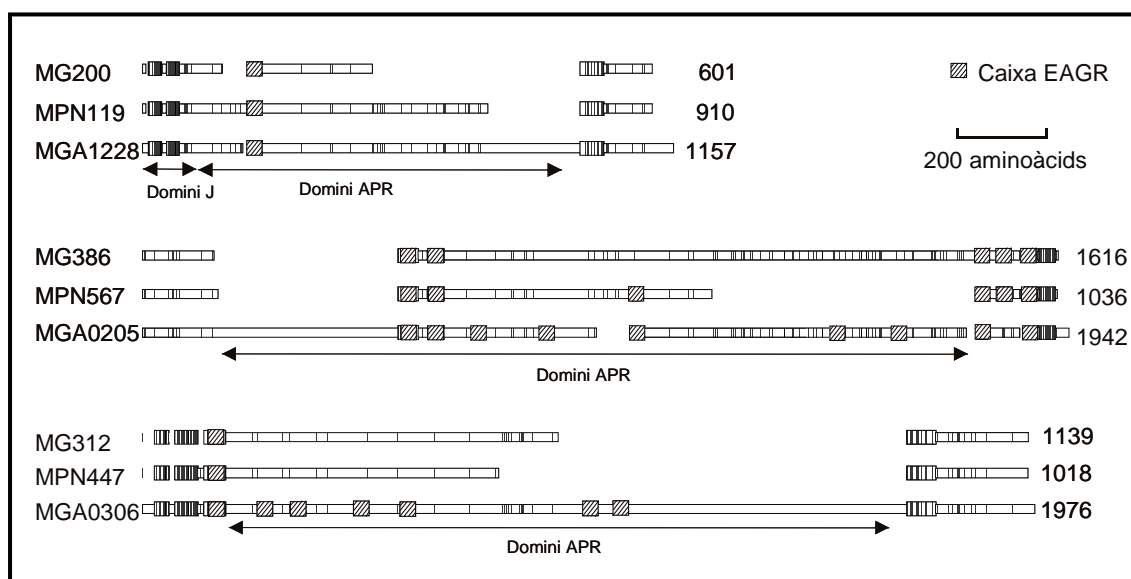


Figura III-9. Representació esquemàtica dels alineaments de seqüència de les proteïnes MG200, MG386 i MG312 de *M. genitalium* amb les seves proteïnes homòlogues de *M. pneumoniae* i *M. gallisepticum*. L'alineament s'ha obtingut utilitzant el programa MACAW (Schuler *et al.*, 1991) i posteriorment s'ha modificat manualment per introduir les caixes EAGR. Les línies verticals corresponen a aminoàcids conservats (matriu Blosum-62).

Diverses proteïnes del citoesquelet dels micoplasmes (HMW1, HMW3, P65, P200) presenten dominis APR. Nombroses proteïnes d'organismes eucariotes presenten

dominis rics en prolina que semblen estar implicats en les interaccions proteïna-proteïna (Kay *et al.*, 2000). Cal destacar el paper particular que presenten algunes proteïnes amb dominis rics en prolina en la regulació de la polimerització d'actina a les protrusions locals de la membrana, un paper íntimament relacionat amb la motilitat cel·lular (Holt *et al.*, 2001). La relació existent entre les proteïnes amb dominis rics en prolina i la motilitat cel·lular és interessant, si tenim en compte que alguns estudis de microscòpia suggereixen l'existència de petites protrusions de la membrana al voltant de l'organel·la terminal de *M. pneumoniae* (Baseman *et al.*, 1982b; Shimizu *et al.*, 2002). A més, la motilitat dels micoplasmes es pot inhibir afegint citocalasina B (Maniloff *et al.*, 1979), una droga que impedeix la polimerització dels monòmers d'actina. L'existència d'una proteïna amb característiques similars a l'actina ha estat descrita amb anterioritat a *M. pneumoniae* (Gobel *et al.*, 1981; Mayer, 2003; Rosenbusch *et al.*, 1976), tot i que no ha pogut ser identificada. Aquesta proteïna podria ser la DnaK, un proteïna de la superfamília de les actines amb capacitat per formar polímers i que constitueix una de les proteïnes més abundants dels citoesquelet de *M. pneumoniae* (Flaherty *et al.*, 1991; Regula *et al.*, 2001). L'homologia de l'MG200 amb les xaperones DnaJ, les quals funcionen de manera coordinada amb les xaperones DnaK, obre un camp d'estudi força atractiu pel que fa a la possible participació de microfilaments i la pròpia proteïna DnaK en la motilitat dels micoplasmes. La possibilitat que el moviment dels micoplasmes presenti característiques similars al moviment de les cèl·lules eucariotes, fa encara més interessant l'estudi de la maquinària de motilitat d'aquests microorganismes tant des d'un punt de vista genètic com bioquímic.

Finalment, cal comentar que amb posterioritat a la publicació d'aquest treball (Pich *et al.*, 2006a) ha aparegut publicat un estudi en el qual es descriu la identificació de gens

de *M. pneumoniae* vinculats a la motilitat d'aquest microorganisme (Hasselbring *et al.*, 2006b). L'aïllament de quaranta-set mutants DM de *M. pneumoniae* ha permès identificar trenta-dos gens implicats en motilitat, entre els quals trobem un gran nombre de transportadors de membrana i de proteïnes implicades en metabolisme. Hem de tenir present que la participació de tots aquests gens en la motilitat de *M. pneumoniae* és només provisional, atès que no s'han dut a terme els corresponents assaigs de complementació. Sorprenentment però, els dos gens de *M. pneumoniae* homòlegs a l'*mg200* i l'*mg386* no formen part de la llista de gens de motilitat identificats. Tot i això, els autors fan referència a l'existència d'experiments addicionals realitzats al seu laboratori que demostren que aquests dos gens efectivament formen part de la maquinària de motilitat de *M. pneumoniae*. L'any 2007, aquests autors han confirmat la implicació de la proteïna P200 de *M. pneumoniae* (MPN567) en la motilitat d'aquest microorganisme així com el paper de la motilitat en el procés de colonització de l'epitel·li bronquial diferenciat (Jordan *et al.*, 2007).

IV - RESULTATS I DISCUSSIÓ

Capítol 2

Mutacions en dos gens implicats en la formació de l'organel·la terminal afecten a la motilitat i a l'adhesió de *M. genitalium*.

INTRODUCCIÓ

M. genitalium i *M. pneumoniae* són dos patògens humans estretament relacionats que disposen d'organel·la terminal, una estructura molt complexa que es desenvolupa per mitjà d'un procés altament jeràrquic i poc conegut. Les dues espècies de *Mycoplasma* comparteixen una organització gènica similar i presenten adhesines i proteïnes accessòries de citadherència homòlogues (Dallo *et al.*, 1989; Reddy *et al.*, 1995). Al llarg de gairebé vint anys, l'aïllament i la caracterització de mutants de *M. pneumoniae* en gens relacionats amb l'adhesió ha permès identificar bona part dels components de l'organel·la terminal d'aquest micoplasma (Krause *et al.*, 2004). La proteïna HMW2 per exemple, sembla ser un dels elements majoritaris de l'eix central electrodens que constitueix la columna vertebral de l'organel·la terminal (Balish *et al.*, 2003b). Els polímers d'HMW3 en canvi, envolten l'eix electrodens i el botó terminal seguint un patró lineal, contribuint a l'estabilització d'aquestes dues estructures (Krause *et al.*, 1996). Malauradament, el paper de les diferents proteïnes de *M. genitalium* en la formació i l'organització de l'organel·la terminal ha estat molt menys estudiat. Recentment però, el nostre laboratori ha demostrat que la presència de les proteïnes P140 i P110 és necessària per al desenvolupament de l'organel·la terminal de *M. genitalium* (Burgos *et al.*, 2006). Aquest fet posa de manifest l'existència de diferències entre les dues espècies de *Mycoplasma*, atès que l'absència de les adhesines de *M. pneumoniae* homòlogues a la P140 i la P110 no sembla impedir la formació de d'aquesta estructura (Seto *et al.*, 2003). Dos factors independents han dificultat l'estudi de l'organel·la terminal i el de la maquinària de citadherència en general a *M. genitalium*. Per una banda, els experiments realitzats per aïllar mutants no adherents de *M. genitalium* generats per la inserció d'un transposó al genoma, no han permès recuperar cap mutant en el qual el gen responsable del fenotip codifiqui per alguna de

les proteïnes accessòries de citadherència (Reddy *et al.*, 1996). Per altra banda, l'elevada freqüència d'aparició espontània dels mutants no adherents denominats de classe I i de classe II (Mernaugh *et al.*, 1993) dificulta el procés d'aïllament de mutants hemadsorció negatius i compromet la caracterització dels mutants aïllats. Atès que l'organel·la terminal té un paper central en la motilitat dels micoplasmes, l'aïllament de mutants per als diferents components que conformen aquesta estructura podria ajudar a comprendre el mecanisme de motilitat subjacent. En aquest estudi es descriu l'aïllament i la caracterització de mutants de *M. genitalium* en dos gens implicats en la formació de l'organel·la terminal. Els canvis morfològics i ultraestructurals observats a l'organel·la terminal dels diferents mutants aïllats, justifiquen les deficiències en motilitat i en adhesió presents en aquestes soques.

RESULTATS

Aïllament de mutants DM generats per la inserció del transposó MTnTetM438 al genoma

Igual que en l'anterior estudi, es va obtenir una bateria de mutants de *M. genitalium* electroporant cèl·lules de la soca salvatge en presència del minitransposó MTnTetM438 (Pich *et al.*, 2006b). Les cèl·lules electroporades es van deixar adsorbir a la superfície plàstica de diferents plaques de cultiu cel·lular i es van cobrir amb medi SP-4 complementat amb agarosa de baix punt de fusió al 0,5%. En aquest cas però, els rentats amb PBS es van ometre per tal de retenir els mutants amb alguna deficiència d'adhesió (DA). Es van identificar i recuperar de l'agar quaranta colònies amb una morfologia compacta, un fet compatible amb la presència de DM. Atès que els mutants sense DA també es poden aïllar mitjançant aquest protocol, en primer lloc es van identificar per SDS-PAGE o transferència de tipus Western els mutants amb transposons inserits als

gens *mg200* i *mg386*, extensivament analitzats en l'anterior estudi. Del total de quaranta mutants aïllats, vint-i-dos no expressaven les proteïnes MG386 o MG200 i en conseqüència van ser descartats. Experiments posteriors van mostrar que sis dels divuit mutants restants no eren soques pures i en conseqüència també van ser descartats.

Identificació del punt d'inserció del minitransposó al genoma dels mutants DM

El punt d'inserció de l'MTn*TetM438* al genoma dels dotze mutants DM restants es va determinar per mitjà de la seqüenciació de la regió del cromosoma que flanqueja al minitransposó (Taula IV-1, Figura IV-1). Set dels mutants aïllats presentaven l'MTn*TetM438* inserit a la regió codificant del gen *mg218* (mutants *mg218*⁻). Quatre dels mutants aïllats presentaven el minitransposó inserit a la regió codificant del gen *mg317* (mutants *mg317*⁻). Finalment, un mutant presentava el minitransposó inserit a la regió codificant del gen *mg192* (mutant *mg192*⁻). Les reaccions de seqüenciació van permetre determinar que la seqüència CTTTTT, corresponent a les bases 228969 a 228984 del genoma, s'havia duplicat en aquest darrer mutant i apareixia als dos extrems del punt d'inserció de l'MTn*TetM438*. El mutant *mg192*⁻ presenta unes característiques

Taula IV-1. Punt d'inserció de l'MTn*TetM438* al genoma dels dotze mutants DM aïllats.

Mutant DM	Punt d'inserció	Gen interromput	Proteïna truncada (aa) / proteïna sencera (aa)	Massa molecular esperada
clon 1	396783 -	<i>mg317</i>	213 / 599	24,4 kDa
clon 3	261568 +	<i>mg218</i>	797 / 1805	95,0 kDa
clon 4	259188 -	<i>mg218</i>	3 / 1805	-
clon 5	396582 -	<i>mg317</i>	280 / 599	31,8 kDa
clon 6	261575 +	<i>mg218</i>	799 / 1805	95,3 kDa
clon 7	228984 -	<i>mg192</i>	1026 / 1053	111,7 kDa
clon 9	396712 +	<i>mg317</i>	237 / 599	26,9 kDa
clon 11	261142 +	<i>mg218</i>	655 / 1805	78,5 kDa
clon 12	260913 +	<i>mg218</i>	577 / 1805	69,0 kDa
clon 13	261124 +	<i>mg218</i>	648 / 1805	77,7 kDa
clon 15	396348 -	<i>mg317</i>	358 / 599	40,7 kDa
clon 16	259895 +	<i>mg218</i>	239 / 1805	28,5 kDa

El símbol (+) o (-) indica l'orientació al genoma de l'MTn*TetM438* respecte al gen interromput.

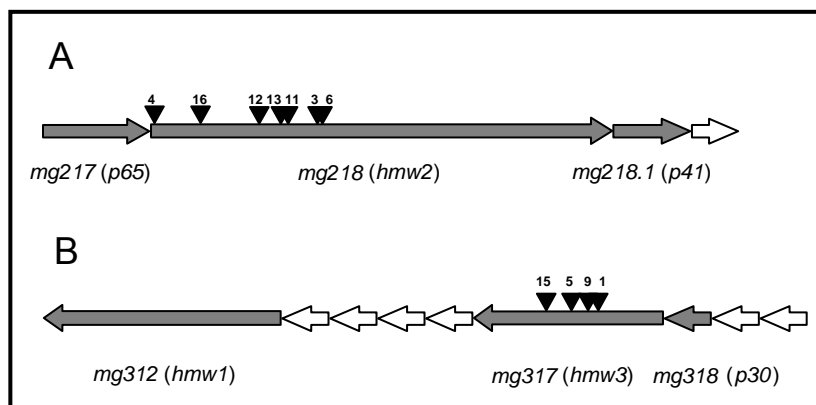


Figura IV-1. Representació esquemàtica de la localització de l'MTnTetM438 a la regió codificant del gens *mg218* de l'operó p65 (A; Musatovova *et al.*, 2003) i del gen *mg317* de l'operó hmw (B; Waldo *et al.*, 1999). En color gris es mostren els gens de rellevància dins de cada operó. Entre parèntesi s'indiquen els gens homòlegs a *M. pneumoniae*. El gen *mg218.1* també ha estat anotat com a *mg491*.

fenotípiques molt diferents a la de la resta de mutants DM aïllats en aquest estudi i serà analitzat de manera independent al capítol 3 d'aquest treball de tesi.

Morfologia de les colònies dels mutants *mg218*⁻ i *mg317*⁻

Les cèl·lules dels clons 4 i 16 dels mutants *mg218*⁻ cultivades en medi SP-4 semisòlid formaven colònies compactes i brillants que generalment apareixien fragmentades (Figura IV-2A). Les cèl·lules d'aquests dos mutants DM exhibien una capacitat d'adhesió als flascons de cultiu cel·lular molt baixa. En canvi, les cèl·lules de tots els clons *mg317*⁻ i *mg218*⁻ restants formaven colònies amb superfícies rugoses i d'aspecte granulat al centre (Figura IV-2B). Les colònies d'aquestes últims clons presentaven alguna microcolònia satèl·lit, indicant que les cèl·lules d'aquests mutants conservaven un cert grau de motilitat. Les cèl·lules d'aquests nou mutants DM s'adherien força bé als flascons de cultiu cel·lular. Així doncs, les dues morfologies de colònia observades entre els onze mutants DM objecte d'estudi semblen reflectir l'efecte de la inserció del transposó sobre la capacitat d'adhesió a superfícies. Per aquest motiu, els diferents clons

dels mutants $mg218^-$ es van separar en dos grups: mutants $mg218^-$ amb una DA severa (clons 4 i 16) i mutants $mg218^-$ amb una DA moderada (clons 3, 6, 11, 12 i 13). Tots els clons dels mutants $mg317^-$ aïllats en aquest estudi presentaven una DA moderada.

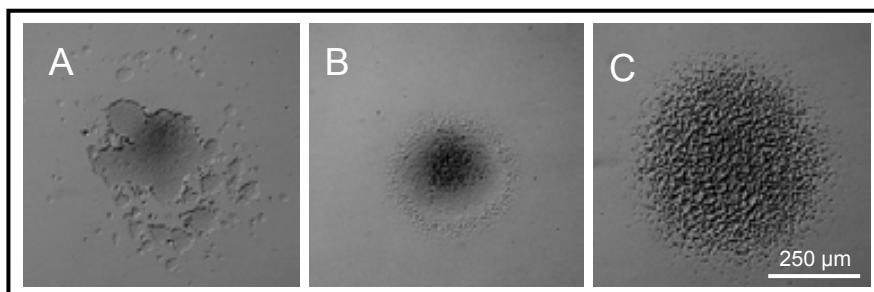


Figura IV-2. Morfologia de les colònies desenvolupades en medi semisòlid per cèl·lules del clon 4 dels mutants $mg218^-$ amb una DA severa (A), del clon 11 dels mutants $mg218^-$ amb una DA moderada (B) i de la soca salvatge (C).

Motilitat dels mutants $mg218^-$ i $mg317^-$

La motilitat de la soca salvatge i dels mutants $mg218^-$ i $mg317^-$ es va analitzar quantitativament per microcinematografia (Taula IV-2). Un 93,8% de les cèl·lules de la soca salvatge es van moure durant el període d'observació, amb una mitjana de les velocitats de $0,152 \mu\text{m s}^{-1}$. Aquests valors són similars als descrits al capítol anterior. En canvi, les cèl·lules dels mutants $mg317^-$ i $mg218^-$ amb una DA moderada presentaven una mitjana de les velocitats entre 4 i 5 vegades inferior a la de la soca salvatge. Un 48,3% de la població dels mutants $mg317^-$ es van moure durant l'anàlisi mentre que el percentatge de cèl·lules mòbils dels mutants $mg218^-$ amb una DA moderada era del 43,9%. Cal destacar que les cèl·lules dels mutants $mg317^-$ i $mg218^-$ amb una DA moderada rarament es desenganxaven de la superfície de cultiu durant l'anàlisi. En canvi, cap de les cèl·lules dels mutants $mg218^-$ amb una DA severa es va moure durant el període d'observació, malgrat que moltes cèl·lules d'aquests mutants es desenganxaven de la superfície de cultiu. Aquests resultats indiquen que la inserció de l'MTn*TetM438* a la regió codificant dels gens *mg218* o *mg317* dóna lloc tant a

deficiències de motilitat com a deficiències d'adhesió. Paral·lelament, es va detectar la presència a tots els mutants DM de nombrosos filaments similars als descrits amb anterioritat pels mutants mg386⁻ (Pich *et al.*, 2006a). Aquests filaments es trobaven connectant cèl·lules independents però també apareixien en cèl·lules aïllades (veure Figura IV-5 d'aquest mateix capítol). Més endavant discutirem el possible origen d'aquests filaments als mutants DM.

Taula IV-2. Sumari dels fenotips dels mutants analitzats en aquest estudi.

Soca	Mitjana de velocitats ($\mu\text{m s}^{-1}$) \pm EE	Rang de mitjanes de velocitats ^a	Cèl·lules mòbils (%)	Capacitat d'hemadsorció ^b
Salvatge	0,152 \pm 0,007	–	93,8	100
mg218 ⁻ amb DA moderada	0,034 \pm 0,004	0,033 - 0,037	43,9	46,5
mg317 ⁻	0,032 \pm 0,004	0,031 - 0,034	48,3	62,4
mg218 ⁻ amb DA severa / Δ mg218	0	–	0	19,3
Δ mg191	SD	–	SD	10,8

^a Valor màxim i mínim de les mitjanes de les velocitats obtingudes entre els diferents clons del mateix mutant; ^b % respecte a la soca salvatge; SD, Sense determinar; EE, Error estàndard

Construcció del plasmidi p Δ mg218, assaig de transformació i anàlisi dels mutants

Amb l'objectiu de determinar de manera clara l'efecte de la pèrdua de la proteïna MG218 a *M. genitalium*, ens vam proposar obtenir mutants defectius per deleció del gen *mg218*. Amb aquest objectiu, es va dissenyar i construir el plasmidi suïcida p Δ mg218 (Figura IV-3) que incorpora el marcador de selecció *tetM438* a la regió flanquejant del gen *mg218* al genoma (Pich *et al.*, 2006b). Com a resultat d'una doble recombinació entre el plasmidi p Δ mg218 i el genoma de *M. genitalium*, les bases 43 a 5376 del gen *mg218* (98,5% de la regió codificant) són substituïdes pel marcador *tetM438*. L'eficiència de transformació de l'experiment va ser de 4×10^{-7} , un valor comparable a l'obtingut anteriorment durant la construcció dels mutants Δ mg191 i Δ mg192 (Burgos

et al., 2006). La presència de la deleció esperada a les diferents soques resistents a tetraciclina aïllades es va analitzar per transferència de tipus Southern. L'ADN genòmic de la soca salvatge i de vuit soques resistents a tetraciclina va ser digerit amb *Acc65I*, separat per electroforesi, transferit a una membrana de niló i hibridat amb una sonda de 0,8 kb producte de la digestió del plasmidi p Δ mg218 amb *Bam*HI-*Apa*I. Durant el revelat, es va observar l'aparició d'una banda de 2,2 kb als vuit mutants analitzats (Figura IV-3). La presència d'aquesta banda única de 2,2 kb, clarament diferent a la banda de 10,9 kb detectada a la soca salvatge, només és compatible amb la deleció esperada del gen *mg218* en aquests mutants, denominats a partir d'ara mutants Δ mg218.

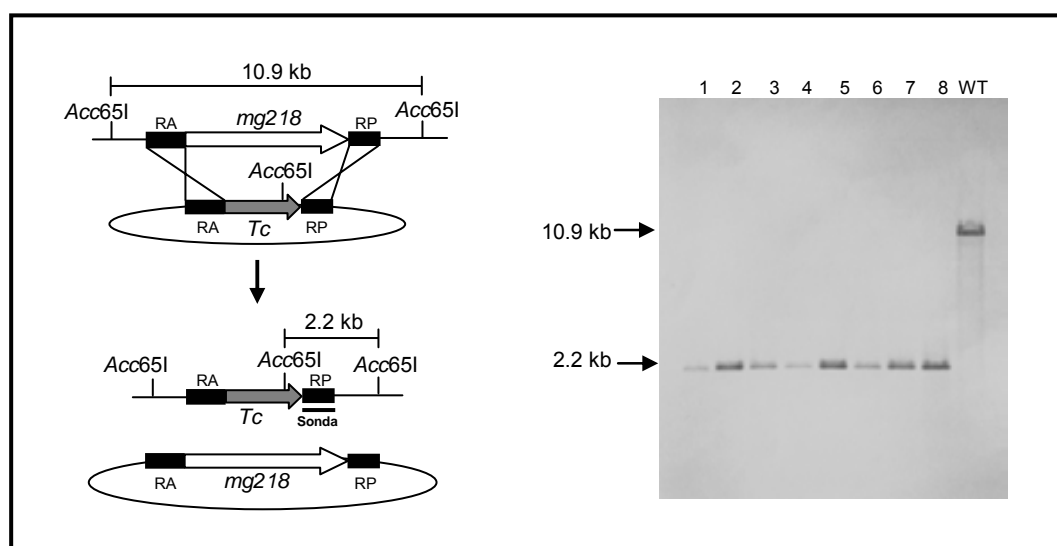


Figura IV-3. Representació esquemàtica dels processos de recombinació entre el plasmidi p Δ mg218 i el genoma de *M. genitalium* que permeten obtenir els mutants Δ mg218, i anàlisi dels mutants Δ mg218 per transferència de tipus Southern. RA, regió anterior; RP, regió posterior.

Perfil proteic dels mutants

El perfil proteic dels diferents mutants DM obtinguts en aquest estudi va ser analitzat per SDS-PAGE (Figura IV-4A) i transferència de tipus Western, utilitzant anticossos contra la proteïna MG218 de *M. genitalium* (Figura IV-4B), HMW3 de *M. pneumoniae* (Figura IV-4C) o HMW1 i P41 de *M. pneumoniae* (Figura IV-4D). Com calia esperar,

tots els mutants $mg218^-$ i $\Delta mg218$ no presentaven la banda de 220 kDa (Figura IV-4A i B) prèviament identificada com la proteïna MG218 (Dhandayuthapani *et al.*, 1999).

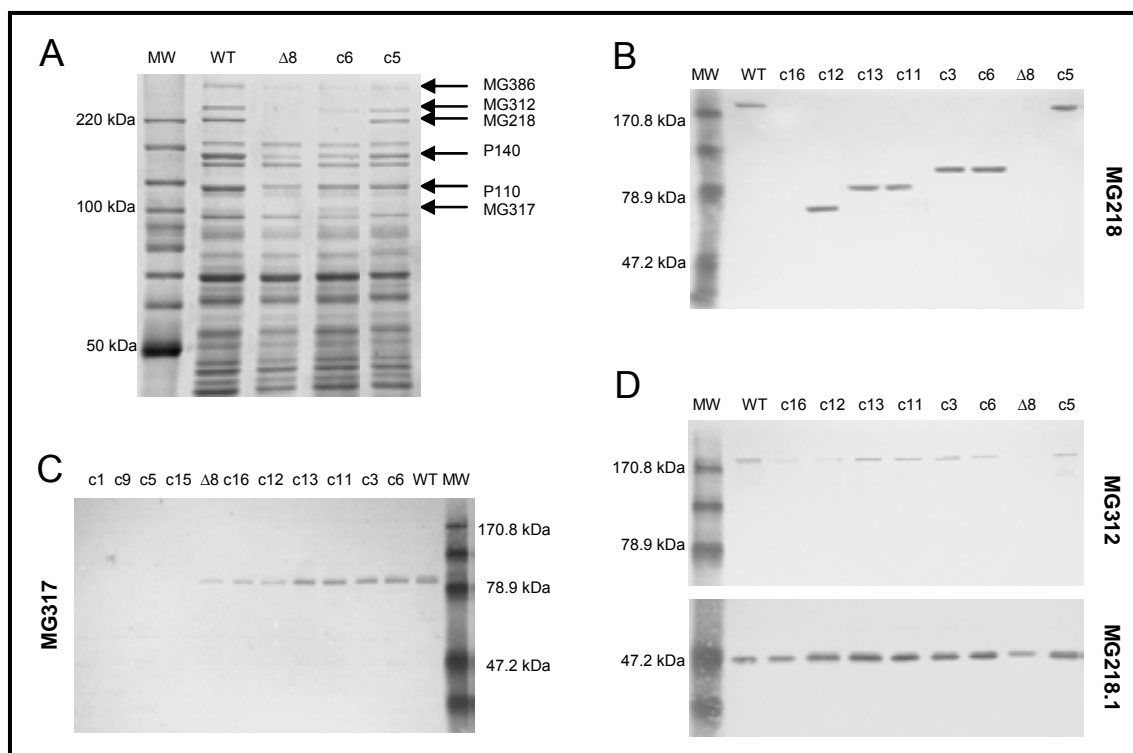


Figura IV-4. Perfil proteic de la soca salvatge i dels diferents mutants obtinguts en aquest estudi. SDS-PAGE al 8% (A) i transferències de tipus Western utilitzant anticossos monoclonals contra la proteïna MG218 de *M. genitalium* (B), anticossos policlonals contra la proteïna HMW3 de *M. pneumoniae* (C) o anticossos policlonals contra les proteïnes HMW1 i P41 de *M. pneumoniae* (D).

Tot i això, l'anticòs monoclonal obtingut contra la proteïna MG218 va demostrar la presència de fragments truncats N-terminals de la proteïna MG218 als mutants $mg218^-$ amb una DA moderada (Figura IV-4B). A més, la banda prèviament identificada com la proteïna MG312 (Svenstrup *et al.*, 2006), homòloga a la proteïna HMW1 de *M. pneumoniae*, no va poder ser detectada ni als mutants $\Delta mg218$ ni al clon 4 dels mutants $mg218^-$ amb una DA severa (Figura IV-4A i D). De la mateixa manera, tant els mutants $\Delta mg218$ com el clon 4 dels mutants $mg218^-$ amb una DA severa presentaven nivells molt reduïts de la proteïna MG317, homòloga a la proteïna HMW3 de *M.*

pneumoniae (Figura IV-4C). Els clons 16 i 12 dels mutants *mg218*⁻ també exhibien nivells d'MG312 i d'MG317 clarament inferiors als de la soca salvatge (Figura IV-4C i D). Aquests resultats suggereixen que les proteïnes MG312 i MG317 són estables quan la proteïna MG218 truncada conserva la regió compresa entre els aminoàcids 577-648 (Taula IV-1). Com calia esperar, els mutants *mg317*⁻ no presentaven la banda corresponent a la proteïna MG317 (Figura IV-4A i C), tot i que en aquest cas no es va detectar la presència de fragments truncats d'aquesta proteïna. La banda corresponent a la proteïna MG317 als gels d'SDS-PAGE es va identificar mitjançant espectrometria de masses pel mateix procediment utilitzat anteriorment (Pich *et al.*, 2006a). Cal destacar que tots els mutants obtinguts en aquest estudi presenten nivells reduïts de les proteïnes MG386, P140 i P110. L'estabilitat de la proteïna MG386 sembla estar lligada a l'expressió de P140 i P110 a nivells propers als de la soca salvatge (Burgos *et al.*, 2006), suggerint l'existència d'algun tipus d'interacció entre aquestes tres proteïnes.

Paral·lelament, es va investigar la presència d'efectes polars a nivell traduccional derivats de la inserció de l'MTn*TetM438* al genoma dels mutants DM. Atès que la terminació de la transcripció als micoplasmes sembla ser independent del factor rho, la presència d'efectes polars a nivell transcripcional està, en principi, descartada. A dos parells de bases de l'extrem 3' del gen *mg218* a l'operó p65 trobem el gen *mg218.1* (Figura IV-1A). La proteïna MG218.1, homòloga a la proteïna P41 de *M. pneumoniae*, va ser detectada tant als mutants *mg218*⁻ com als mutants Δ *mg218* mitjançant transferència de tipus Western (Figura IV-4D). Aquest fet descarta la presència d'efectes polars a nivell traduccional als gens de l'operó p65 en aquests mutants. De la mateixa manera, a quaranta parells de bases de l'extrem 3' del gen *mg317* a l'operó hmw trobem el gen *mg316* (Figura IV-1B). Aquest gen codifica per una proteïna amb

homologia a les proteïnes ComEC/Rec2. Tot i que la funció de la proteïna MG316 a *M. genitalium* és desconeguda, les proteïnes ComEC/Rec2 són necessàries per a la internalització d'ADN en d'altres bacteris (Draskovic *et al.*, 2005). Estudis previs realitzats al nostre laboratori (Lluch-Senar *et al.*, 2007) indiquen que la longitud de la regió intergènica que separa els gens *mg316* i *mg317* és massa gran com per permetre l'acoblament de la traducció de la proteïna MG316 al de la proteïna MG317. Per aquest motiu, no s'espera que la inserció del transposó MTn*TetM438* al gen *mg317* tingui conseqüències sobre la traducció del gen *mg316* als mutants *mg317*.

Capacitat d'hemadsorció dels mutants

La capacitat d'hemadsorció dels diferents mutants aïllats en aquest estudi va ser analitzada de manera quantitativa. Paral·lelament, també es va avaluar quantitativament la capacitat d'hemadsorció de la soca salvatge i dels mutants no adherents Δ *mg191* (Burgos *et al.*, 2006). Els mutants *mg317*⁻ i els mutants *mg218*⁻ amb una DA moderada mostraven una capacitat d'hemadsorció al voltant d'un 50% respecte a la de la soca salvatge (Taula IV-2). Com ja hem comentat anteriorment, les cèl·lules d'aquests mutants creixen principalment adherides a la superfície dels flascons de cultiu cel·lular. En canvi, la capacitat d'hemadsorció dels mutants Δ *mg218* i *mg218*⁻ amb una DA severa no arribava al 20% respecte a la de la soca salvatge i en conseqüència les cèl·lules d'aquests mutants creixen majoritàriament en suspensió.

Cal destacar que totes les dades derivades de la caracterització dels mutants *mg218*⁻ amb una DA severa obtingudes en aquest estudi són comparables a les dels mutants Δ *mg218*. Així doncs, per tal de simplificar la presentació i la discussió dels resultats, a partir d'aquest moment només es mostraran les dades referents als mutants Δ *mg218*.

Morfologia cel·lular

Com es pot observar a la Figura IV-5A, les cèl·lules de la soca salvatge de *M. genitalium* visualitzades per microscòpia electrònica de rastreig tenen forma de pera, com a conseqüència de la presència de l'organel·la terminal en un dels pols de la cèl·lula.

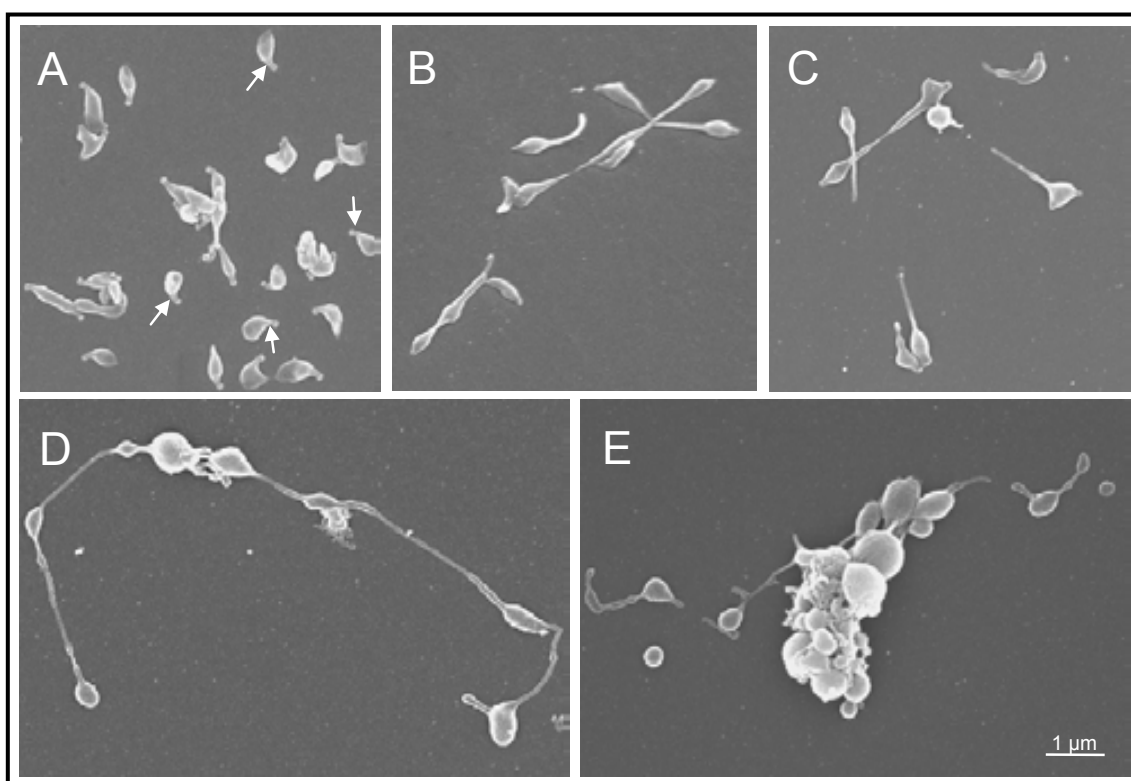


Figura IV-5. Imatges de microscòpia electrònica de rastreig de la soca salvatge (A), el clon 6 dels mutants $mg218^-$ amb una DA moderada (B), el clon 5 dels mutants $mg317^-$ (C) i el clon 8 dels mutants $\Delta mg218$ (D i E). Les fletxes assenyalen el coll que separa el cos cel·lular del botó terminal a la soca salvatge.

En general, la morfologia de les cèl·lules dels mutants $mg218^-$ amb una DA moderada (Figura IV-5B) i la dels mutants $mg317^-$ (Figura IV-5C) era similar a la de la soca salvatge. Tot i això, les organel·les terminals d'aquests mutants eren més curtes i més gruixudes, i el coll estret que separa el cos cel·lular del botó terminal a la soca salvatge (fletxes, Figura IV-5A) semblava absent. A més, les cèl·lules d'aquests mutants presentaven llargues cues al pol oposat al de l'organel·la terminal. Molt probablement,

aquestes cues corresponen als filaments observats anteriorment en aquests mutants durant els estudis microcinematogràfics.

La major part de la població dels mutants Δ mg218 es trobava formant grans agregats (Figura IV-5D i E). Entre les cèl·lules individuals hi havia cèl·lules completament rodones, similars a les observades prèviament als mutants Δ mg191 i Δ mg192 (Burgos *et al.*, 2006), i cèl·lules més allargades. Cridava l'atenció la presència de cossos cel·lulars entre dues i tres vegades més grans que els de la soca salvatge. La presència d'aquests cossos cel·lulars grans suggereix l'existència de deficiències greus en el mecanisme de divisió cel·lular als mutants Δ mg218.

Ultraestructura de l'organel·la terminal

L'organel·la terminal de les cèl·lules de la soca salvatge i dels mutants DM va ser analitzada amb detall mitjançant microscòpia electrònica de transmissió. En primer lloc, en aquest estudi hem pogut observar que l'estructura general de l'organel·la terminal de *M. genitalium* (Figura IV-6A) és comparable a la descrita recentment a *M. pneumoniae* (Figura IV-6B) per criotomografia electrònica (Henderson *et al.*, 2006).

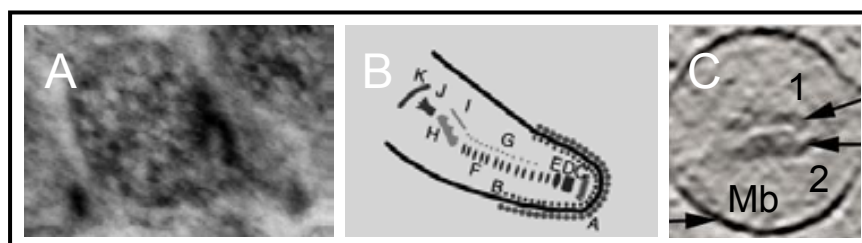


Figura IV-6. Estructura general de l'organel·la terminal de *M. genitalium*. (A) organel·la terminal de *M. genitalium* visualitzada per microscòpia electrònica de transmissió. (B) Representació esquemàtica de l'organel·la terminal de *M. pneumoniae* on s'indica la presència de diferents components macromoleculars (Henderson *et al.*, 2006). (C) Secció transversal de l'eix electroquímico de *M. pneumoniae* mostrant la presència de dues varetes independents (Henderson *et al.*, 2006).

Les organel·les terminals de la soca salvatge presentaven un eix electrodens d'uns 214 ± 7 nm de longitud amb una curvatura característica a l'extrem més proximal (Figura IV-7A). Algunes vistes suggerien l'origen de dues varetes independents a la base de l'organel·la terminal (indicades amb els números 1 i 2 a la Figura IV-7B) que s'unien més amunt per formar un únic eix electrodens. L'existència de dues varetes independents (Figura IV-6C) ja havia estat descrita prèviament durant l'anàlisi de l'organel·la terminal de *M. pneumoniae* (Henderson *et al.*, 2006). A més, s'intuïa la presència d'un material lleugerament electrodens que separava el citoplasma de la part proximal de l'eix electrodens (fletxes, Figura IV-7). Per altra banda, l'engruïment present a la regió distal de l'eix electrodens, conegut com a botó terminal, era clarament visible. Cal destacar que alguns talls transversals propers al botó terminal van posar de manifest la presència d'unes partícules globulars discretes altament electrodenses (asterisc, Figura IV-7C). Aquestes partícules podrien correspondre a unes proteïnes globulars recentment identificades a *M. pneumoniae* (Henderson *et al.*, 2006) que es localitzen entre la superfície intracel·lular de la membrana plasmàtica i el botó terminal (component C, Figura IV-6B).

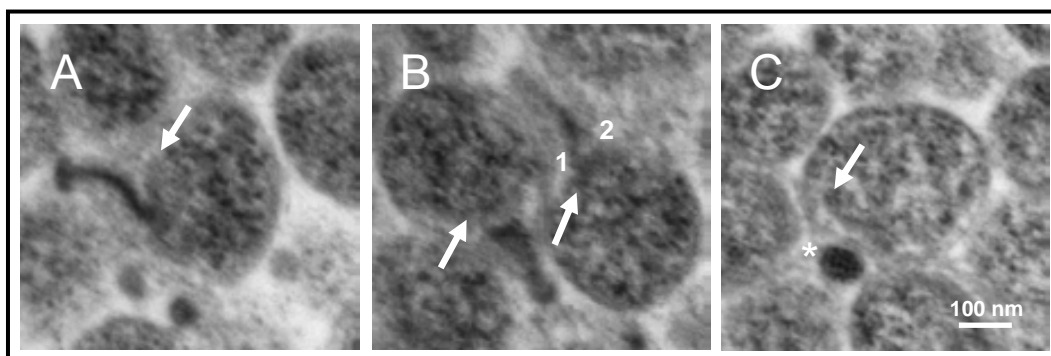


Figura IV-7. Imatges de microscòpia electrònica de transmissió de la soca salvatge. Les fletxes assenyalen la presència d'un material lleugerament electrodens que separa el citoplasma de la part proximal de l'eix electrodens. L'origen de dues varetes diferents a la base de l'organel·la terminal s'indica amb els números 1 i 2. L'asterisc posa de manifest la presència de partícules globulars electrodenses discretes en alguns talls transversals del botó terminal.

Les cèl·lules dels mutants $mg218^-$ amb una DA moderada presentaven organel·les terminals més curtes (138 ± 10 nm) que les de la soca salvatge (Figura IV-8). Tant el botó terminal com les partícules globulars discretes altament electrodenses eren presents a les preparacions d'aquests mutants.

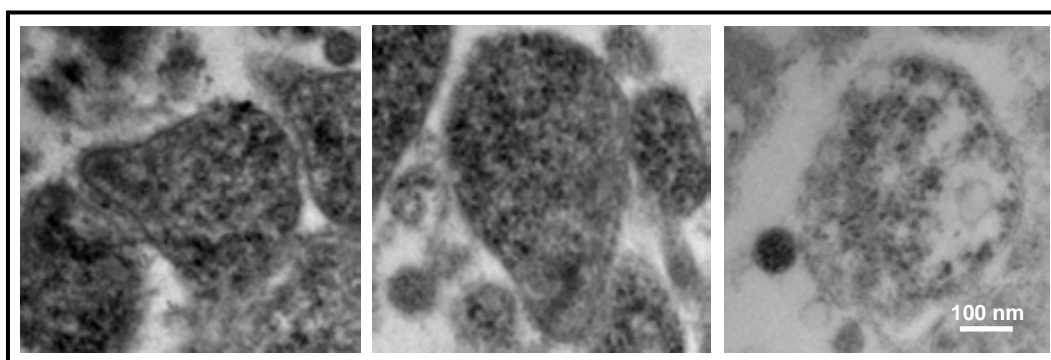


Figura IV-8. Imatges de microscòpia electrònica de transmissió del clon 6 dels mutants $mg218^-$ amb una DA moderada.

En canvi, les partícules globulars electrodenses no van poder ser identificades a les preparacions dels mutants $mg317^-$ i el botó terminal era absent o en tot cas, molt menys aparent que a la soca salvatge (Figura IV-9). Sovint, la regió distal de l'eix electrodens apareixia separada de la membrana plasmàtica (fletxa, Figura IV-9). Sorprenentment, es va observar que algunes cèl·lules dels mutants $mg317^-$ presentaven una estructura electrodensa inclosa al citoplasma i no associada a cap prolongació de la membrana. Creiem que aquestes estructures podrien correspondre a veritables eixos electrodensos lliures al citoplasma. En aquest sentit, les cèl·lules que presentaven una estructura electrodensa lliure al citoplasma mai no presentaven un eix electrodens estàndard. De la mateixa manera, no es va observar cap estructura electrodensa lliure al citoplasma en aquelles cèl·lules que presentaven un eix electrodens estàndard. Aquest fet suggereix que la regió distal de l'eix electrodens no està estretament unida a la superfície interna de la membrana plasmàtica als mutants $mg317^-$.

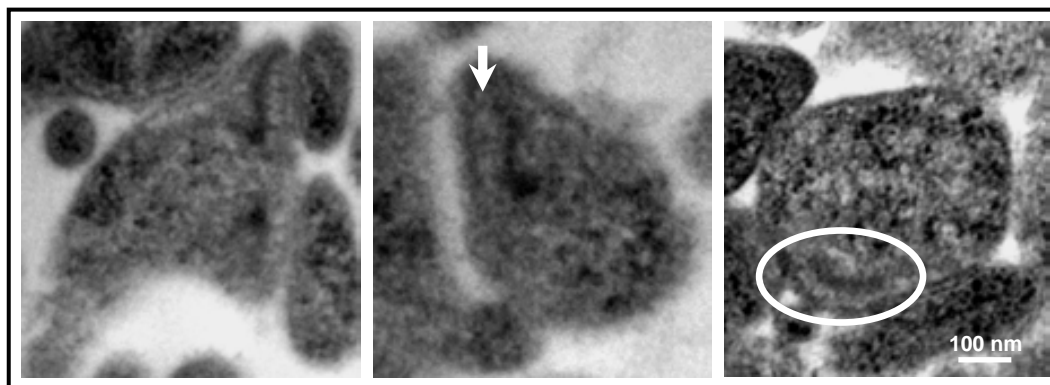


Figura IV-9. Imatges de microscòpia electrònica de transmissió del clon 5 dels mutants $mg317^-$ en les quals s'indica la presència d'eixos electrodensos lliures al citoplasma.

Les preparacions dels mutants $\Delta mg218$ es caracteritzaven per l'absència d'eixos electrodensos (Figura IV-10). Igual que a les imatges obtingudes per microscòpia electrònica de rastreig, es va observar que els cossos cel·lulars de les cèl·lules d'aquests mutants eren més grans que els de les cèl·lules de la soca salvatge. Les cues o filaments presents a les preparacions de tots els mutants analitzats, apareixien com unes prolongacions llargues de la membrana en les quals s'alternaven regions clares i fosques.

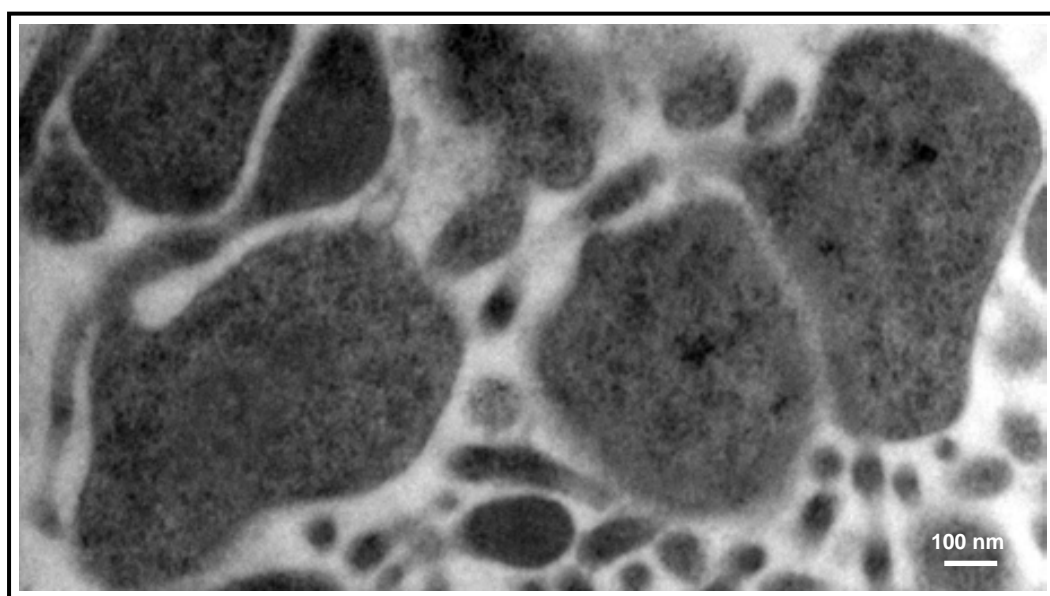


Figura IV-10. Imatges de microscòpia electrònica de transmissió del clon 8 dels mutants $\Delta mg218$.

DISCUSSIÓ

En aquest estudi es descriu l'aïllament i la caracterització de mutants de *M. genitalium* amb transposons inserits als gens *mg218* i *mg317*. Els estudis cinematogràfics han demostrat que tant la velocitat de desplaçament com el percentatge de cèl·lules mòbils dels mutants *mg218*⁻ i *mg317*⁻ són clarament inferiors als de la soca salvatge. A més, els mutants *mg218*⁻ i *mg317*⁻ obtinguts exhibeixen DA, en general de caràcter lleu, i presenten nivells reduïts de les proteïnes P140, P110 i MG386. La caracterització del mutant *mg192*⁻ presentada al capítol 3 demostrarà que els nivells reduïts de les proteïnes P140 i P110 no alteren la velocitat de desplaçament de les cèl·lules. Contràriament al que s'havia observat als mutants *mg200*⁻ i *mg386*⁻, les imatges de microscòpia electrònica han permès identificar la presència d'organel·les terminals anòmales als mutants *mg218*⁻ i *mg317*⁻. En aquest sentit, les DM observades en aquests mutants semblen conseqüència de la participació de les proteïnes MG218 i MG317 en la formació de l'organel·la terminal. Els resultats obtinguts indiquen que la longitud dels eixos electrodensos i la presència de botons terminals fortament units a la membrana plasmàtica són dues característiques importants per al moviment de les cèl·lules de *M. genitalium*. Cal destacar que els mutants DM de *M. mobile* també presenten una longitud anòmala de la prolongació de la membrana anàloga a l'organel·la terminal (Miyata *et al.*, 2000). A diferència però dels mutants *mg218*⁻ de *M. genitalium*, les DM a *M. mobile* semblen associades a un allargament d'aquesta prolongació de la membrana (Figura IV-11). La diferent morfologia cel·lular observada entre els mutants DM de *M. genitalium* i els de *M. mobile* reforça la teoria que aquests dos microorganismes presenten mecanismes de motilitat diferents (Jaffe *et al.*, 2004b; Henderson *et al.*, 2006), controlats per proteïnes amb característiques diferents.

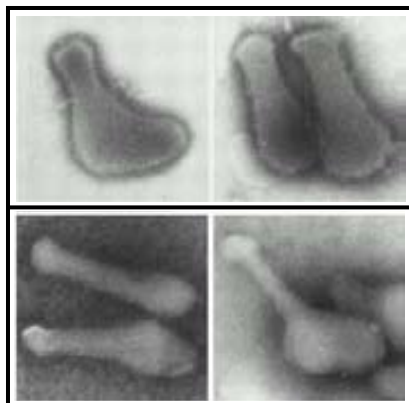


Figura IV-11. Imatges de microscòpia electrònica de transmissió de cèl·lules de *M. mobile* en tinció negativa (Miyata *et al.*, 2000). Fila superior, soca salvatge. Fila inferior, mutant m12.

Les imatges de microscòpia electrònica han posat de manifest que l'absència d'MG218 als mutants Δ mg218 dona lloc a la pèrdua dels eixos electrodensos. Aquesta observació sumada a la pèrdua d'estabilitat d'altres proteïnes del citoesquelet com l'MG312 o l'MG317 corrobora el paper central de la proteïna MG218 en la formació de l'organel·la terminal de *M. genitalium*. Estudis previs havien suggerit un model en el qual la longitud de l'eix electrodens de l'organel·la terminal de *M. pneumoniae* podria correspondre's amb la longitud de la proteïna HMW2 modelada com una hèlix α completament estirada (Balish *et al.*, 2003b). Els nostres resultats donen suport a aquest model. En aquest sentit, l'expressió de fragments truncats de la proteïna MG218 als mutants mg218' amb una DA moderada dona lloc a la formació d'eixos electrodensos més curts que els de la soca salvatge. Les imatges de microscòpia electrònica també mostren que l'expressió de la proteïna MG317 és necessària per a la formació dels botons terminals a l'organel·la terminal de *M. genitalium*. Atès que moltes cèl·lules dels mutants mg317' presenten eixos electrodensos lliures al citoplasma, sembla que el botó terminal constitueix un punt d'ancoratge important de l'eix electrodens a la superfície interna de la membrana plasmàtica. En aquest sentit, la proteïna MG317 podria estar implicada en l'adhesió de l'eix electrodens als dominis intracel·lulars de les adhesines P140/P110 que recobreixen l'organel·la terminal. La localització majoritària de la

proteïna MG317 a l'extrem distal de l'eix electrodens concorda amb estudis previs d'immunolocalització de l'HMW3 a *M. pneumoniae* (Stevens *et al.*, 1992). Sorprenentment, però, l'absència als mutants $mg317^-$ dels eixos electrodensos en forma de V descrits en un mutant de *M. pneumoniae* amb un transposó inserit al gen que codifica per la proteïna HMW3 (Jordan *et al.*, 2007; Willby *et al.*, 2002).

La baixa capacitat de citadherència dels mutants $\Delta mg218$ com a conseqüència de la pèrdua de la proteïna MG218 indica que els fragments truncats N-terminal de MG218 presents als mutants $mg218^-$ amb una DA moderada són encara relativament funcionals. De la mateixa manera, els nostres resultats demostren que la interrupció de la proteïna MG218 entre els aminoàcids 577 (clon 12) i 799 (clon 6) dona lloc a fragments truncats de MG218 estables. Aquest fet té rellevància si tenim en compte que estudis previs realitzats a *M. pneumoniae* indiquen que la interrupció de l'HMW2 abans de l'aminoàcid 1040 no dona lloc a fragments truncats d'HMW2 estables (Balish *et al.*, 2003a). La capacitat de citadherència intermèdia que mostren els mutants $mg218^-$ amb una DA moderada indica que al contrari del que succeeix amb la proteïna HMW2 de *M. pneumoniae* (Balish *et al.*, 2003b), la regió C-terminal de la proteïna MG218 és dispensable per a l'adhesió. A més, el fet de no recuperar mutants amb insercions per transposó a la regió distal del gen *mg218* després de seleccionar les soques amb DM, suggereix que el C-terminal de l'MG218 no té un paper determinant en la motilitat de *M. genitalium*. Així doncs, mentre que la meitat C-terminal de l'HMW2 de *M. pneumoniae* sembla ser essencial per a la funció d'aquesta proteïna, aquest paper sembla recaure sobre la meitat N-terminal de la proteïna MG218 de *M. genitalium*.

El diferent comportament entre l'MG218 de *M. genitalium* i l'HMW2 de *M. pneumoniae* és realment sorprenent si tenim en compte que ambdues proteïnes presenten un 56% d'identitat en la seqüència d'aminoàcids conservada al llarg de tota la proteïna. Existeix la possibilitat però que l'estabilitat dels fragments truncats d'aquestes proteïnes vingui determinat per la seva capacitat per formar hèlix sobreentrellades o "coiled-coils". Tant l'MG218 com l'HMW2 presenten cremalleres de leucina, uns motius estructurals que constitueixen dominis de dimerització de proteïnes. Les cremalleres de leucina generen forces d'adhesió entre hèlix- α paral·leles que permeten la formació de "coiled-coils" (Figura IV-12). La presència de nombroses cremalleres de

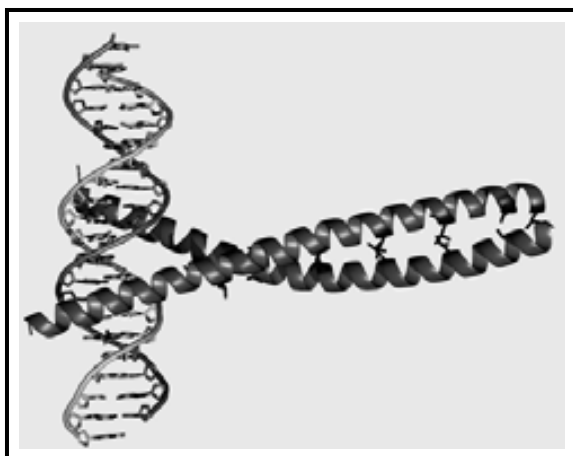


Figura IV-12. Dues hèlix- α paral·leles formant un "coiled-coil" i interaccionant amb ADN.

leucina al llarg de la seqüència polipeptídica tant de l'MG218 com de l'HMW2 reforça la capacitat d'aquestes proteïnes per formar estructures macromoleculares com ara els eixos electrodensos. En els darrers anys però, s'han trobat evidències experimentals de l'existència de seqüències curtes d'aminoàcids que constitueixen regions d'hèlix- α monomèriques determinants per a la formació dels "coiled-coils" (Steinmetz *et al.*, 2007). Malgrat que no han estat identificades, la presència de regions determinants per a la formació dels "coiled-coils" a les proteïnes MG218 i HMW2 podria condicionar l'estabilitat dels seus fragments truncats. En aquest sentit, la presència d'una regió

determinant per a la formació del “coiled-coil” a la meitat N-terminal de l'MG218 permetria que els fragments truncats N-terminal d'aquesta proteïna s'assemblassin per formar estructures macromoleculares. Les estructures macromoleculars resultants podrien així associar-se al citoesquelet, fet que estabilitzaria els fragments truncats N-terminal d'aquesta proteïna. Aquesta situació té sentit si tenim en compte que moltes proteïnes estructurals de micoplasma es degraden prematurament si no poden incorporar-se al citoesquelet subjacent a l'organel·la terminal (Krause *et al.*, 2004). Molt probablement, això explica també la inestabilitat de les proteïnes MG317 i MG312 en absència de la proteïna MG218. A l'HMW2 de *M. pneumoniae* en canvi, la localització de la regió determinant per a la formació del “coiled-coil” podria estar desplaçada cap a la meitat C-terminal, implicant l'estabilitat dels fragments truncats N-terminal d'aquesta proteïna interromputs abans de l'aminoàcid 1040. Tot i això, la funcionalitat de la proteïna HMW2 sembla dependre d'altres factors addicionals, atès que els mutants de *M. pneumoniae* amb transposons inserits al gen *hmw2* perden completament la capacitat de citadherència amb independència de si expressen o no fragments truncats estables (Hedreyda *et al.*, 1995).

La pèrdua de la proteïna MG312 i en menor mesura de la proteïna MG317 als mutants Δ mg218, molt probablement té lloc a nivell post-transcripcional. Aquest fet ha pogut ser demostrat experimentalment en el cas de les proteïnes HMW1 i HMW3 als mutants *hmw2* de *M. pneumoniae* (Popham *et al.*, 1997). La majoria de mutants mg218⁻ amb una DA moderada però, presenten nivells d'MG312 i MG317 similars als de la soca salvatge, fet que ens ha permès identificar un determinant important de l'estabilització d'aquestes dues proteïnes entre els aminoàcids 577-648 de l'MG218 (Figura IV-13). Molt probablement, aquest determinant de l'estabilització de les proteïnes MG312 i

MG317 representa la regió d'interacció entre la proteïna MG218 i les proteïnes MG312 i MG317, que permet la incorporació d'aquestes dues proteïnes estructurals al citoesquelet. Estudis similars realitzats a *M. pneumoniae* (Balish *et al.*, 2003a) indiquen en canvi, que la regió de l'HMW2 implicada en l'estabilització de la proteïna HMW1 sembla estar localitzada entre els aminoàcids 1040-1578 de l'HMW2 (Figura IV-13). Aquests resultats, confirmen la importància funcional de l'extrem N-terminal de la proteïna MG218.

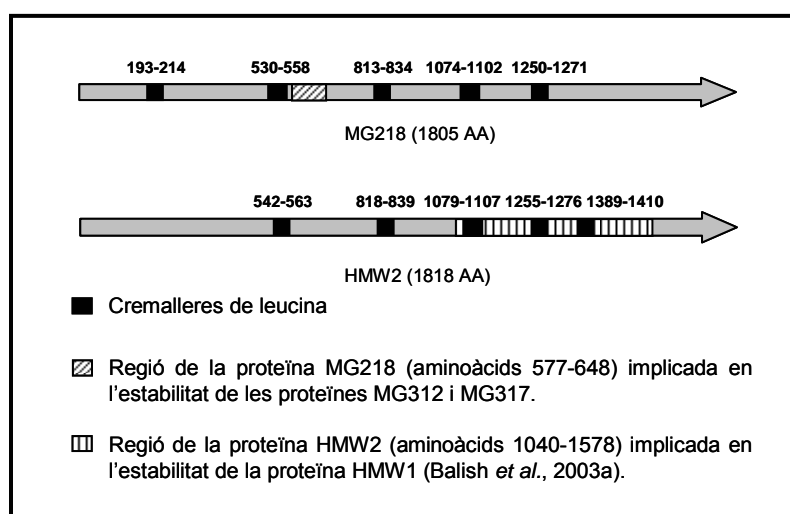


Figura IV-13. Representació esquemàtica mostrant les regions de les proteïnes MG218 i HMW2 implicades en l'estabilitat de les proteïnes MG312/HMW1 i MG317/HMW3. També es mostra la distribució de les cremalleres de leucina a les proteïnes MG218 i HMW2. Les cremalleres de leucina van ser identificades per la base de dades del PROSITE (Hulo *et al.*, 2006).

És important destacar que la capacitat de citadherència intermèdia dels mutants *mg218*⁻ i *mg317*⁻ justifica el fet que no s'hagin pogut aïllar mutants amb transposons inserits als gens *mg317* i *mg218* en els diversos experiments adreçats a aïllar mutants no adherents de *M. genitalium* (Reddy *et al.*, 1996). De la mateixa manera, els experiments dirigits a aïllar mutants no adherents de *M. gallisepticum* només han permès recuperar mutants amb transposons inserits als gens *gapA* i *crmA*. Els gens *gapA* i *crmA* són homòlegs als gens *mg191* i *mg192* de *M. genitalium* els quals codifiquen per les proteïnes P140 i

P110, respectivament (Mudahi-Orenstein *et al.*, 2003). *M. gallisepticum* també presenta proteïnes amb homologia de seqüència amb les proteïnes MG218 i MG317 de *M. genitalium* (Papazisi *et al.*, 2003), un fet lògic si tenim en compte que les cèl·lules de *M. gallisepticum* disposen d'organel·la terminal. Creiem que el mètode de selecció i aïllament de mutants descrit en aquest estudi pot permetre l'aïllament de mutants de *M. gallisepticum* en altres gens relacionats amb adhesió cel·lular i motilitat per tal d'aprofundir en el mecanisme de virulència d'aquest microorganisme.

Més enllà de la interdependència mútua de les proteïnes P140 i P110, prèviament demostrada als mutants Δ mg191 i Δ mg192 (Burgos *et al.*, 2006), els nostres resultats mostren que els nivells de P140 i P110 a *M. genitalium* semblen estar regulats de manera coordinada. Probablement, els nivells reduïts de P140 i P110 contribueixen a explicar la reducció de la capacitat d'adhesió observada als mutants mg218⁻ i mg317⁻. Malgrat això, l'absència de la proteïna MG218 sembla afectar de manera directa a la capacitat d'adhesió de les cèl·lules de *M. genitalium*, atès que la capacitat de citadherència dels mutants Δ mg218 i dels mutants mg218⁻ amb una DA moderada és diferent tot i presentar nivells similars de P140 i P110. En aquest sentit, estudis realitzats a *M. pneumoniae* suggereixen que la proteïna HMW2 contribueix a la correcta localització de les proteïnes P1 i P90/P40, homòlogues a les proteïnes P140 i P110 de *M. genitalium*, a l'organel·la terminal (Seto *et al.*, 2003). Amb anterioritat, un estudi en el qual el gen *mg218* de *M. genitalium* va ser interromput mitjançant recombinació homòloga (Dhandayuthapani *et al.*, 1999), va permetre aïllar uns mutants (denominats mutants JB1) que presentaven uns nivells molt reduïts de P140 i P110, i que exhibien un fenotip completament no adherent. Creiem que el fet que les proteïnes P140 i P110 siguin molt menys estables als mutants JB1 que als mutants Δ mg218 aïllats al nostre

estudi, podria ser conseqüència de mutacions espontànies addicionals als gens *mg191* i/o *mg192* als mutants JB1. Com ja hem comentat anteriorment, les mutacions espontànies als gens *mg191* i *mg192* són molt freqüents i donen lloc a mutants no adherents denominats genèricament de classe I o de classe II (Mernaugh *et al.*, 1993; Burgos *et al.*, 2006).

La presència als mutants *mg218⁻* i *mg317⁻* de filaments similars als descrits als mutants *mg386⁻* i *mg200⁻* confirma que l'aparició d'aquests filaments està relacionada amb la presència de DM. En aquest sentit, les cèl·lules de la soca salvatge incubades durant una hora a temperatura ambient, temps durant el qual esdevenen immòbils, també presenten aquests filaments (dada no presentada). Les imatges de microscòpia electrònica de rastreig mostren que la majoria de les cèl·lules dels mutants *mg218⁻* i *mg317⁻* unides per filaments estan orientades en sentits oposats, una configuració que és característica de les cèl·lules de micoplasma en divisió (Seto *et al.*, 2001). En conjunt, aquestes observacions suggereixen que la presència d'un fenotip DM dificulta el procés de citocinesi. La motilitat sembla a més determinant per a la dispersió de les cèl·lules de *M. genitalium*. En aquest sentit, la formació d'agregats en cultius líquids dels mutants DM podria respondre més a una dificultat de les cèl·lules per dispersar-se que a una tendència d'aquestes a agregar. De manera similar, els cultius líquids de soques no adherents de *M. genitalium*, que en conseqüència perden la capacitat de moure's, creixen formant grans agregats cel·lulars en suspensió (Burgos *et al.*, 2006). L'existència de deficiències en el procés de citocinesi sembla especialment evident als mutants Δ *mg218*. Aquest fet és de particular interès si tenim en compte que els cossos cel·lulars grans presents en aquests mutants no han pogut ser observats als mutants *mg200⁻*, malgrat que la capacitat de moviment d'aquests últims és molt menor. Així

doncs, no podem descartar que la presència dels cossos cel·lulars grans als mutants Δ mg218 estigui posant de manifest un paper addicional de la proteïna MG218 a *M. genitalium*. Especulativament, podria ser que la proteïna MG218 contribuís a la correcta segregació dels cromosomes. En aquest sentit, una anàlisi computacional (Marchler-Bauer *et al.*, 2004) posa de manifest la presència de dos dominis SMC (“Structural Maintenance of Chromosomes”, COG1196) a la proteïna MG218. Les proteïnes amb dominis SMC es caracteritzen per formar llargs “coiled-coils” i són els components clau dels complexos proteics que controlen la dinàmica dels cromosomes. El fet que en alguns casos les regions en “coiled-coil” de les proteïnes amb dominis SMC intervinguin de manera directa en la unió a l’ADN (Figura IV-12; Akhmedov *et al.*, 1999) obre les portes a una possible interacció de la proteïna MG218 amb el cromosoma de *M. genitalium*. La participació de components de l’organel·la terminal en la dinàmica dels cromosomes, podria permetre l’acoblament entre la segregació del cromosoma i la segregació de l’organel·la terminal.

V - RESULTATS I DISCUSSIÓ

Capítol 3

La proteïna P110 de *M. genitalium* està implicada en la regulació temporal de la duplicació de l'organel·la terminal.

INTRODUCCIÓ

Com hem comentat anteriorment a la introducció general, la divisió cel·lular dels micoplasmes que disposen d'organel·la terminal (OT) va precedida per la duplicació d'aquesta estructura (Bredt 1968). A més, un estudi recent ha demostrat que la motilitat de les cèl·lules de *M. pneumoniae* està coordinada amb el procés de duplicació de l'organel·la terminal (Hasselbring *et al.*, 2006a). En aquest sentit, les cèl·lules de *M. pneumoniae* s'aturen coincidint amb l'inici de la formació d'una organel·la terminal nova, suggerint que l'organel·la terminal preexistent perd la capacitat per desplaçar-se mentre es duplica. Paral·lelament, l'organel·la terminal nova migra fins al pol oposat de la cèl·lula coincidint amb la restauració de la capacitat de desplaçament de l'organel·la terminal preexistent, suggerint que el propi mecanisme de motilitat és responsable de la migració de les organel·les terminals acabades de formar. La migració de l'organel·la terminal nova té lloc perquè aquesta adquireix la capacitat d'adhesió poc després de formar-se, és a dir, al costat de l'organel·la terminal preexistent. En canvi, sembla que les organel·les terminals noves no són mòbils per si mateixes fins que no arriben al pol oposat de la cèl·lula.

Al capítol anterior hem descrit l'aïllament d'un mutant DM que presenta una inserció del minitransposó MTn*TetM438* al gen *mg192*. El gen *mg192* de *M. genitalium* codifica per la proteïna P110 i juntament amb els gens *mg190* i *mg191* forma part de l'operó MgPa (Musatovova *et al.*, 2003). La proteïna P110 és necessària per a la formació de l'organel·la terminal i intervé en el manteniment de la capacitat de citadherència (Burgos *et al.*, 2006). Estudis recents indiquen que la pèrdua del complex B/C de *M. pneumoniae*, homòleg a la proteïna P110, dóna lloc a cèl·lules no adherents i immòbils (Hasselbring *et al.*, 2006b). La inserció de l'MTn*TetM438* al mutant *mg192*⁻ interromp

la traducció de la proteïna P110 a l'aminoàcid 1026, impedit la traducció dels darrers vint-i-set aminoàcids. Els experiments realitzats en aquest estudi indiquen que les DM observades al mutant *mg192⁻* i la resta de característiques fenotípiques d'aquest mutant, no s'originen com a conseqüència de deficiències en la maquinària de motilitat sinó que són el resultat d'una pèrdua del control temporal de la formació de les OTs noves.

RESULTATS

Perfil proteic i capacitat d'hemadsorció del mutant *mg192⁻*

El perfil proteic del mutant *mg192⁻* va ser analitzat per SDS-PAGE i per transferència de tipus Western (Figura V-1). Es va observar que la banda corresponent a la proteïna P110 al mutant *mg192⁻* presentava una migració electroforètica més elevada que la banda corresponent a la mateixa proteïna a la soca salvatge. Aquest fet és compatible amb la interrupció de la traducció a l'aminoàcid 1026 de la proteïna P110 al mutant *mg192⁻*. Paral·lelament, es va observar que els nivells de les proteïnes P110 i P140 eren inferiors als de la soca salvatge. Aquest fet confirma l'estreta relació existent entre les proteïnes P110 i P140, i suggereix que la regió C-terminal de la proteïna P110 és important per a l'estabilitat d'aquestes proteïnes.

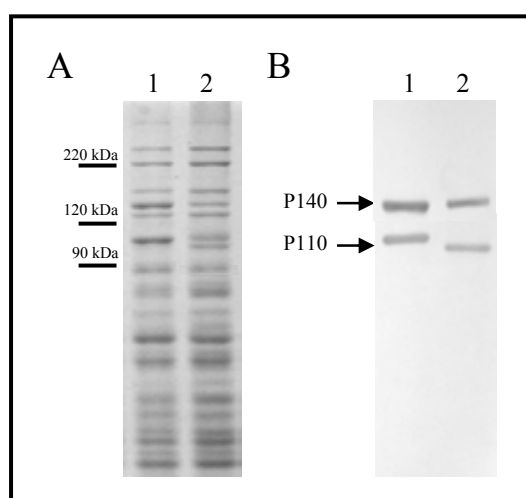


Figura V-1. Anàlisi comparativa del perfil proteic de la soca salvatge (carril 1) i del mutant *mg192⁻* (carril 2). (A) SDS-PAGE al 8% i (B) transferència de tipus Western utilitzant anticossos monoclonals contra la proteïna P140 i anticossos policlonals contra la proteïna P110.

Els nivells reduïts de P110 i P140 justifiquen la presència de DA al mutant $mg192^-$. En aquest sentit, part de la població del mutant $mg192^-$ creix en suspensió quan les cèl·lules es cultiven en medi líquid. La capacitat de citadherència del mutant $mg192^-$ es va analitzar de manera qualitativa mitjançant un assaig d'hemadsorció sobre colònies desenvolupades en medi sòlid. Es va observar que les colònies del mutant $mg192^-$ presentaven una capacitat de citadherència parcial o intermèdia comparada amb la de la soca salvatge (Figura V-2B).

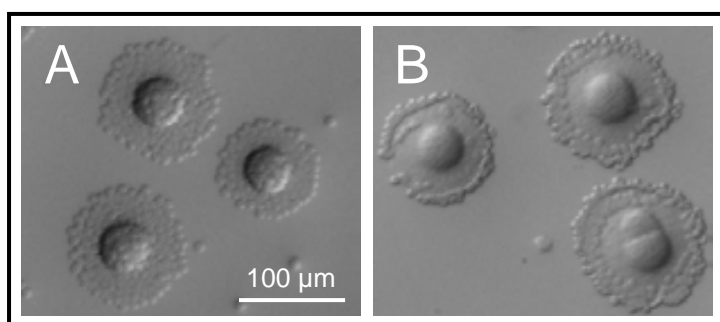


Figura V-2. Anàlisi qualitativa de la capacitat d'hemadsorció de la soca salvatge (A) i del mutant $mg192^-$ (B).

Morfologia de les colònies i motilitat de les cèl·lules del mutant $mg192^-$

La morfologia de les colònies del mutant $mg192^-$ desenvolupades en medi semisòlid era similar a la de les colònies dels mutants $mg317^-$ i $mg218^-$ amb una DA moderada (Figura V-3B). La presència d'algunes microcolònies satèl·lit indicava que les cèl·lules d'aquest mutant conservaven un cert grau de motilitat. També es va observar la presència de colònies secundàries al voltant de la colònia principal (fletxes, Figura V-3B).

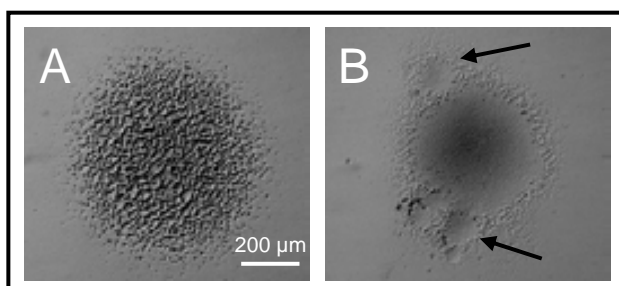


Figura V-3. Morfologia de les colònies desenvolupades en medi semisòlid per cèl·lules de la soca salvatge (A) i del mutant $mg192^-$ (B). Les fletxes indiquen la presència de colònies secundàries al voltant de la colònia principal.

Mitjançant microcinematografia es va determinar que només el 45,6% de les cèl·lules del mutant $mg192^-$ eren mòbils durant el període d'anàlisi, confirmant l'existència de DM en aquest mutant (Figura V-4). Sorprenentment però, la mitjana de les velocitats de les cèl·lules del mutant $mg192^-$ era molt similar a la de la soca salvatge ($0,142 \pm 0,006 \mu\text{m s}^{-1}$). Aquest fet suggereix que les cèl·lules del mutant $mg192^-$ no presenten cap anomalia mecànica en el sistema de motilitat. Així doncs, les DM observades en aquest mutant es limiten a la presència d'una elevada freqüència de cèl·lules immòbils que en conseqüència originen la morfologia compacta de les colònies en medi semisòlid. Els resultats obtinguts indiquen que la disminució dels nivells de P140 i P110 té conseqüències significatives sobre la velocitat de desplaçament de les cèl·lules. Finalment, tot i la capacitat de citadherència intermèdia del mutant $mg192^-$, cal dir que les cèl·lules d'aquest mutant rarament es desenganxaven durant el període d'anàlisi.

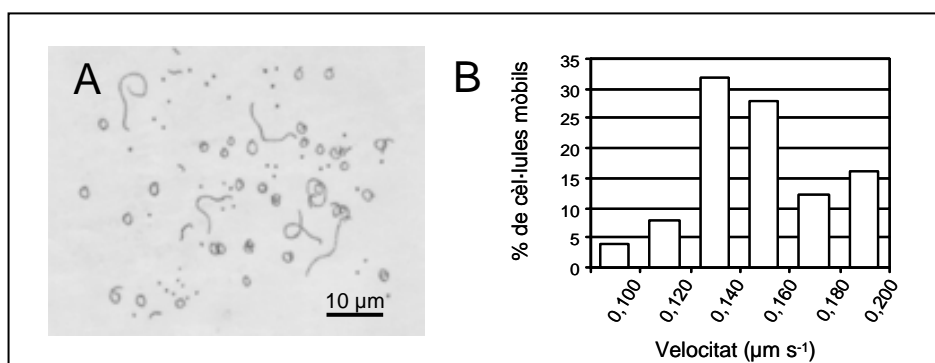


Figura V-4. Estudis cinematogràfics del mutant $mg192^-$. (A) Representació esquemàtica de les trajectòries descrites per les cèl·lules del mutant $mg192^-$ durant 2 min i (B) distribucions de les velocitats de les cèl·lules d'aquest mutant.

Morfologia i ultraestructura de les cèl·lules del mutant $mg192^-$

Les cèl·lules del mutant $mg192^-$ van ser analitzades mitjançant microscòpia electrònica de transmissió (Figura V-5). En general, els eixos electrodensos observats a les preparacions del mutant $mg192^-$ presentaven les mateixes característiques

morfològiques que els de la soca salvatge: botó terminal a l'extrem distal, curvatura a l'extrem proximal, etc.

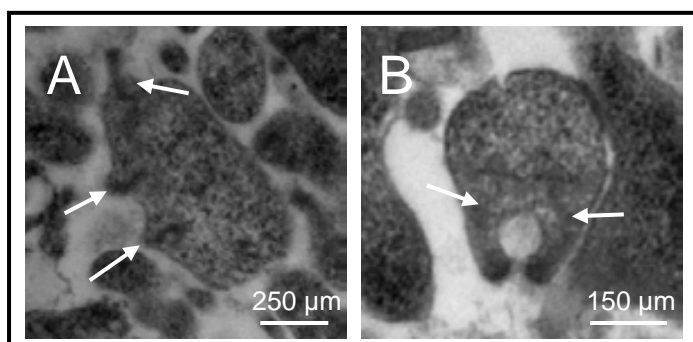


Figura V-5. Imatges de microscòpia electrònica de transmissió del mutant mg192. Les fletxes posen de manifest la presència de més d'un eix electrodensos per cèl·lula.

Sorprenentment però, les imatges obtingudes van posar de manifest la presència de cèl·lules amb més d'un eix electrodensos (fletxes, Figura V-5). Cal tenir present que l'anàlisi de talls semifins mitjançant microscòpia electrònica de transmissió no permet obtenir dades quantitatives ni del nombre d'eixos electrodensos que presenta una cèl·lula, ni de la quantitat de cèl·lules amb més d'un eix electrodensos presents a la preparació. Com a sistema d'estudi alternatiu, les cèl·lules van ser analitzades mitjançant microscòpia electrònica de rastreig (Figura V-6).

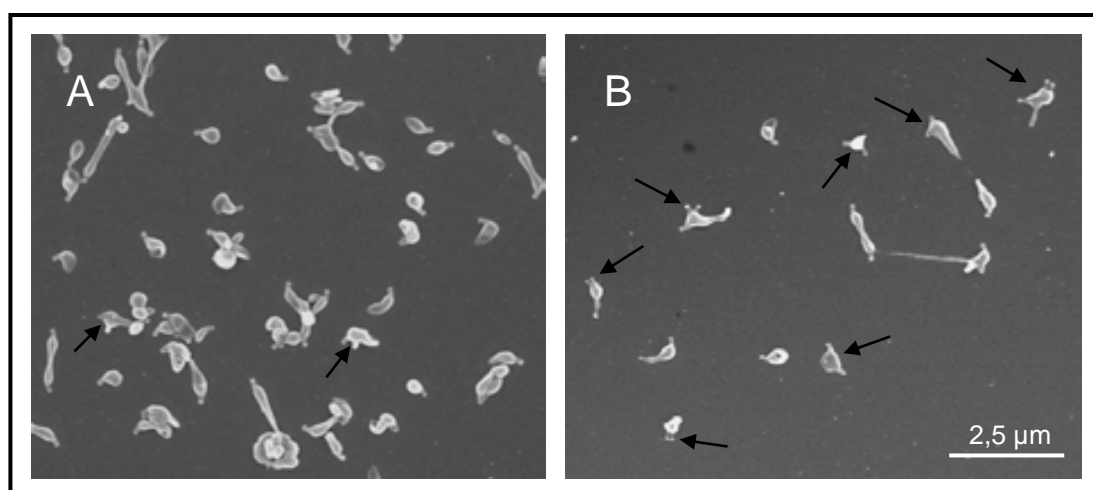


Figura V-6. Imatges de microscòpia electrònica de rastreig de cèl·lules de la soca salvatge (A) i del mutant mg192 (B). Les fletxes indiquen la presència de cèl·lules amb més d'una OT.

En general, la morfologia de les cèl·lules del mutant mg192⁻ era similar a la de les cèl·lules de la soca salvatge. Les característiques distintives dels mutants DM (presència de filaments, tendència a la formació d'agregats, etc.) eren presents al mutant mg192⁻, tot i que en menor mesura. Es va observar però, la presència de nombroses cèl·lules amb més d'una OT (Figura V-6B), un fet molt poc freqüent entre les cèl·lules de la soca salvatge (Figura V-6A). Aquest resultat és consistent amb la presència de múltiples eixos electrodensos al mutant mg192⁻, tal i com s'havia observat anteriorment a les imatges de microscòpia electrònica de transmissió.

Anàlisi del procés de migració i segregació de l'OT a la soca salvatge

Un dels primers estadis del procés de divisió cel·lular dels micoplasmes és la duplicació de l'OT (Bredt 1968). Aquest fet justifica la presència de cèl·lules amb dues OTs a la soca salvatge de *M. genitalium*. Les OTs noves es desenvolupen al costat de les OTs preexistents i posteriorment migren fins al pol oposat de la cèl·lula. Un cop que s'ha completat el procés de migració de l'OT nova, la cèl·lula mare es duplica i s'inicia el procés de citocinesi. Així doncs, la posició relativa de l'OT nova respecte l'OT preexistent varia durant el procés de divisió cel·lular (Figura V-7A).

A partir de les imatges de microscòpia electrònica de rastreig, es va determinar que un 2,8% de les cèl·lules de la soca salvatge presentaven una OT polar i una altra lateral (Figura V-7B). Aquesta disposició de les OTs indica que l'OT lateral està en procés de migració. El reduït percentatge de cèl·lules de la soca salvatge amb aquesta disposició de les OTs indica que el procés de migració de les OTs noves d'un pol de la cèl·lula a l'altre és molt ràpid. De la mateixa manera, el reduït percentatge de cèl·lules amb dues OTs al mateix pol (0,4%) indica que el procés de migració de l'OT nova s'inicia

inmediatament després de la seva formació. Paral·lelament, el reduït percentatge de cèl·lules amb una OT a cada pol (0,4%) suggereix que el procés de citocinesi comença poc després de l'arribada de l'OT nova al pol oposat de la cèl·lula. En canvi, la presència d'un percentatge relativament elevat de cèl·lules en procés de citocinesi (8%) indica que aquest procés és relativament lent comparat amb el de migració de les OTs noves.

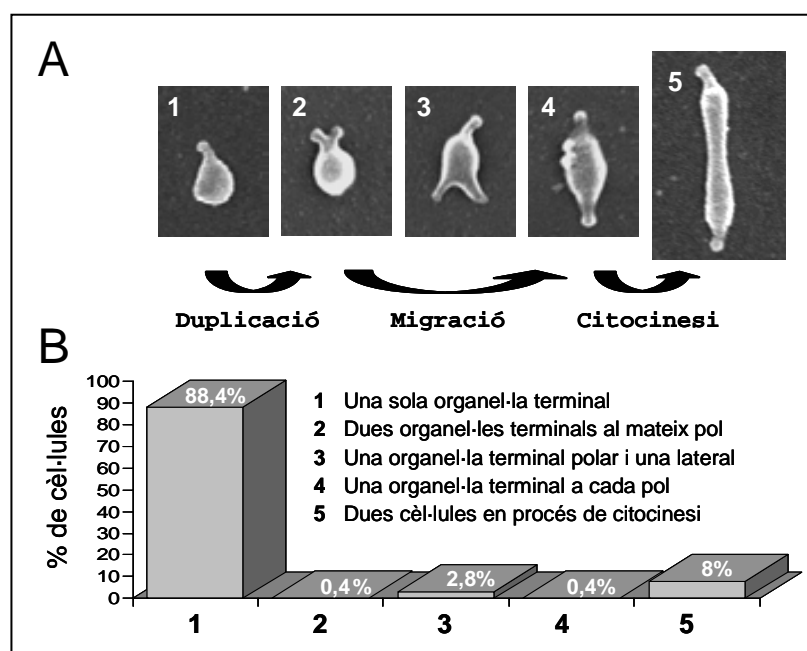


Figura V-7. Anàlisi de la localització de les OTs a les cèl·lules de la soca salvatge de *M. genitalium* durant el procés de divisió cel·lular. (A) Imatges de microscòpia electrònica de rastreig representatives de cèl·lules amb una diferent disposició de les OTs i (B) distribució dels percentatges de cèl·lules amb que presenten una diferent disposició de les OTs.

Anàlisi del nombre d'OTs per cèl·lula

Amb independència de la localització de les OTs a la cèl·lula, les imatges de microscòpia electrònica mostren que només el 3,6% de les cèl·lules de la soca salvatge presenten dues OTs (Figura V-8). A l'hora de calcular aquest percentatge, s'ha considerat que les cèl·lules en procés de citocinesi constitueixen dues cèl·lules filles independents. L'absència de cèl·lules amb tres OTs a la soca salvatge de *M. genitalium*

suggereix l'existència d'algun mecanisme que impedeix que es formi una OT nova abans que es completi la segregació cel·lular.

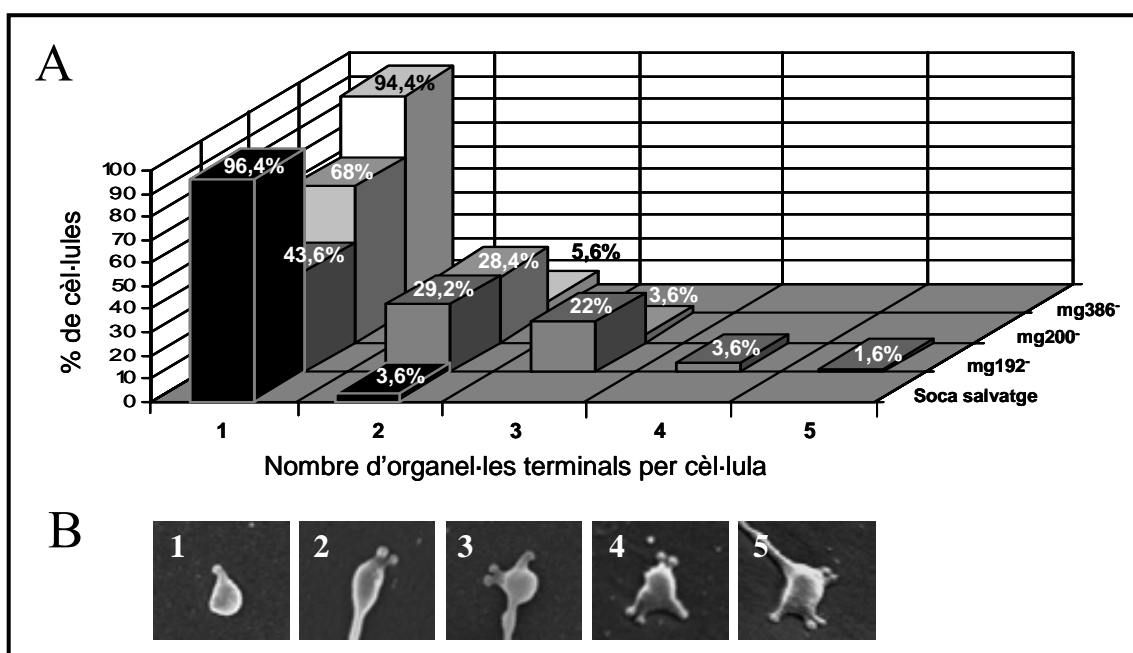


Figura V-8. Anàlisi del nombre d'OTs observat a les cèl·lules de la soca salvatge i dels mutants mg192⁻, mg200⁻ (clon 12) i mg386⁻ (clon 1). (A) Distribució del percentatge de cèl·lules amb una, dues, tres, quatre o cinc OTs. (B) Imatges de microscòpia electrònica de rastreig representatives de cèl·lules del mutant mg192⁻ amb un diferent nombre d'OTs.

Atès que treballs anteriors havien demostrat que els mutants immòbils de *M. pneumoniae* presentaven un nombre d'OTs per cèl·lula superior al de la soca salvatge (Hasselbring *et al.*, 2006a), en aquest estudi també hem analitzat el percentatge de cèl·lules amb més d'una OT als mutants mg200⁻ i mg386⁻. Es va determinar que un 5,6% de les cèl·lules del clon 1 dels mutants mg386⁻ exhibien dues OTs mentre que el 94,4% restant presentaven una sola OT. El percentatge de cèl·lules amb dues OTs al clon 12 dels mutants mg200⁻ s'elevava fins a un 28,4%, tot i que la majoria de les cèl·lules d'aquest mutant continuaven mostrant una sola OT (68%). Malgrat que no es van observar cèl·lules amb quatre o més OTs al mutants DM analitzats, un 3,6% de cèl·lules del clon 12 dels mutants mg200⁻ presentaven tres OTs. El reduït percentatge de

cèl·lules amb tres OTs en un mutant amb una motilitat tan reduïda, confirma l'existència d'un mecanisme de control temporal de la formació d'OT noves.

Pel que fa al mutant *mg192*⁻, es va observar que un 29,2% de les cèl·lules presentaven dues OTs i que fins a un 27,2% de les cèl·lules presentaven tres o més OTs (Figura V-8). En aquest cas però, hem de tenir present que la velocitat de desplaçament de les cèl·lules del mutant *mg192*⁻ és similar a la de la soca salvatge i que per tant, la presència de múltiples OTs no és conseqüència d'un augment de la durada del procés de migració d'aquestes estructures.

DISCUSSIÓ

En aquest estudi es descriu la caracterització d'un mutant de *M. genitalium* amb un transposó inserit al gen *mg192*. L'observació directa de les cèl·lules d'aquest mutant ha posat de manifest la presència d'un percentatge molt elevat de cèl·lules immòbils. Tot i això, les dades obtingudes indiquen que la velocitat de desplaçament de les cèl·lules mòbils d'aquest mutant és comparable a la de la soca salvatge. Per altra banda, el mutant *mg192*⁻ presenta un percentatge extraordinàriament elevat de cèl·lules amb més d'una OT i algunes cèl·lules d'aquest mutant presenten quatre o cinc OTs. Aquest fet que no s'havia pogut observar anteriorment a cap altra soca de *M. genitalium*.

Igualment, en aquest estudi s'ha avaluat l'impacte de les DM sobre el percentatge de cèl·lules amb més d'una OT als mutants *mg386*⁻ i *mg200*⁻. Les dades obtingues mostren que el percentatge de cèl·lules amb més d'una OT al mutant *mg386*⁻ és lleugerament superior al de la soca salvatge, mentre que aquest percentatge augmenta de manera considerable al mutant *mg200*⁻. Aquests resultats indiquen que una menor velocitat de

desplaçament de les cèl·lules allarga la durada del procés de migració d'una OT d'un pol de la cèl·lula a un altre. En conseqüència, el percentatge de cèl·lules amb dues OTs als mutants $mg386^-$ i $mg200^-$ augmenta (Figura V-9). Paral·lelament, s'ha observat que un percentatge reduït de cèl·lules del mutant $mg200^-$ presenten tres OTs, indicant que de

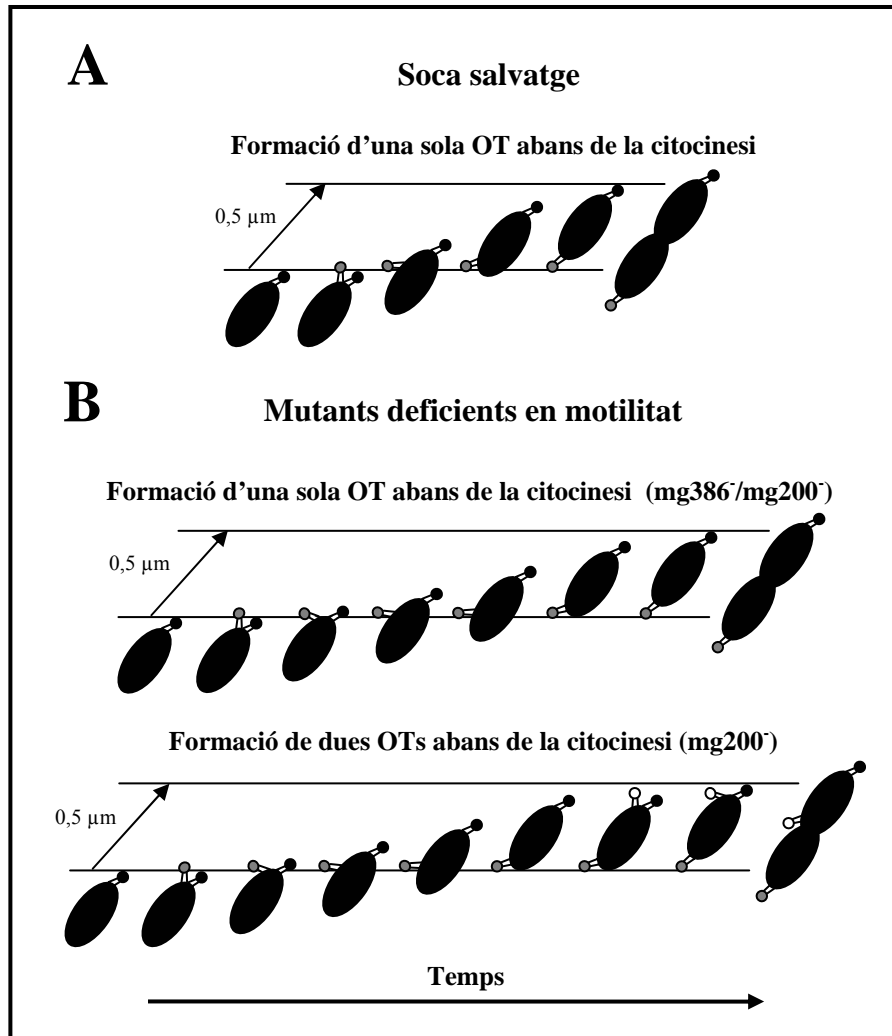


Figura V-9. Esquema il·lustratiu del procés de duplicació i migració de l'OT a *M. genitalium*. (A) Soca salvatge i (B) mutants $mg386^-$ i $mg200^-$.

manera excepcional, algunes cèl·lules d'aquest mutant inicien la formació d'una OT nova abans que s'hagi completat el procés de segregació cel·lular anterior (Figura V-9B). Sens dubte, aquest fet està afavorit per la llarga durada del procés de migració de les OTs noves en aquest mutant. Per altra banda, l'elevat percentatge de cèl·lules amb

una sola OT als mutants mg386⁻ i mg200⁻ indica que les cèl·lules d'aquests mutants que romanen immòbils durant el període d'observació dels estudis microcinematogràfics, es mouen en algun moment del cicle cel·lular. En cas contrari, les OTs no podrien separar-se i s'acumularien en aquestes cèl·lules a mesura que s'anessin formant, de manera similar al que succeeix al mutant III-4 de *M. pneumoniae* (Hasselbring *et al.*, 2006a). Molt probablement, les deficiències en la maquinària de motilitat existents als mutants mg386⁻ i mg200⁻, responsables de la menor velocitat de desplaçament de les cèl·lules, són també l'origen d'aquests llargs períodes de repòs.

En canvi, atès que les cèl·lules del mutant mg192⁻ poden desplaçar-se a una velocitat comparable a la de les cèl·lules de la soca salvatge, l'elevat percentatge de cèl·lules immòbils observat en aquest mutant sembla conseqüència d'algun factor independent a la pròpia maquinària de motilitat. En aquest punt, és interessant destacar que el percentatge de cèl·lules amb més d'una OT al mutant mg192⁻ (56,4%) és similar al percentatge de cèl·lules immòbils (54,4%). Un estudi recent ha demostrat que les cèl·lules de *M. pneumoniae* s'aturen durant el procés de duplicació de l'OT mentre que la migració de l'OT nova coincideix amb la restauració de la motilitat de l'OT preexistent (Hasselbring *et al.*, 2006a). Paral·lelament, els resultats obtinguts per aquests mateixos autors indiquen que les cèl·lules amb OTs en procés de migració semblen immòbils durant l'anàlisi microcinematogràfic (Hasselbring *et al.*, 2006a). Aquest fet és lògic si tenim en compte que l'OT nova roman adherida i immòbil durant el procés de migració. Segons això, un augment important del percentatge de cèl·lules amb OTs en procés de formació/migració, hauria d'anar acompanyat d'un augment significatiu del percentatge de cèl·lules immòbils. Aquesta situació, permetria explicar l'elevat percentatge de cèl·lules amb múltiples OTs i immòbils al mutant mg192⁻.

Així doncs, el fenotip del mutant $mg192^-$ sembla conseqüència de la pèrdua del control temporal de la formació d'OTs noves. En aquest sentit, les cèl·lules del mutant $mg192^-$ sovint inicien la formació d'OTs noves mentre altres OTs de la mateixa cèl·lula estan encara en procés de migració (Figura V-10A). Com a resultat, moltes cèl·lules del mutant $mg192^-$ presenten més d'una OT individual en procés de migració (Figura V-11A). Atès que en teoria, la velocitat de migració de les OTs noves d'aquest mutant hauria de ser similar a la de la soca salvatge, sembla que el temps que transcorre entre dos cicles consecutius de duplicació de l'OT al mutant $mg192^-$ és extraordinàriament curt.

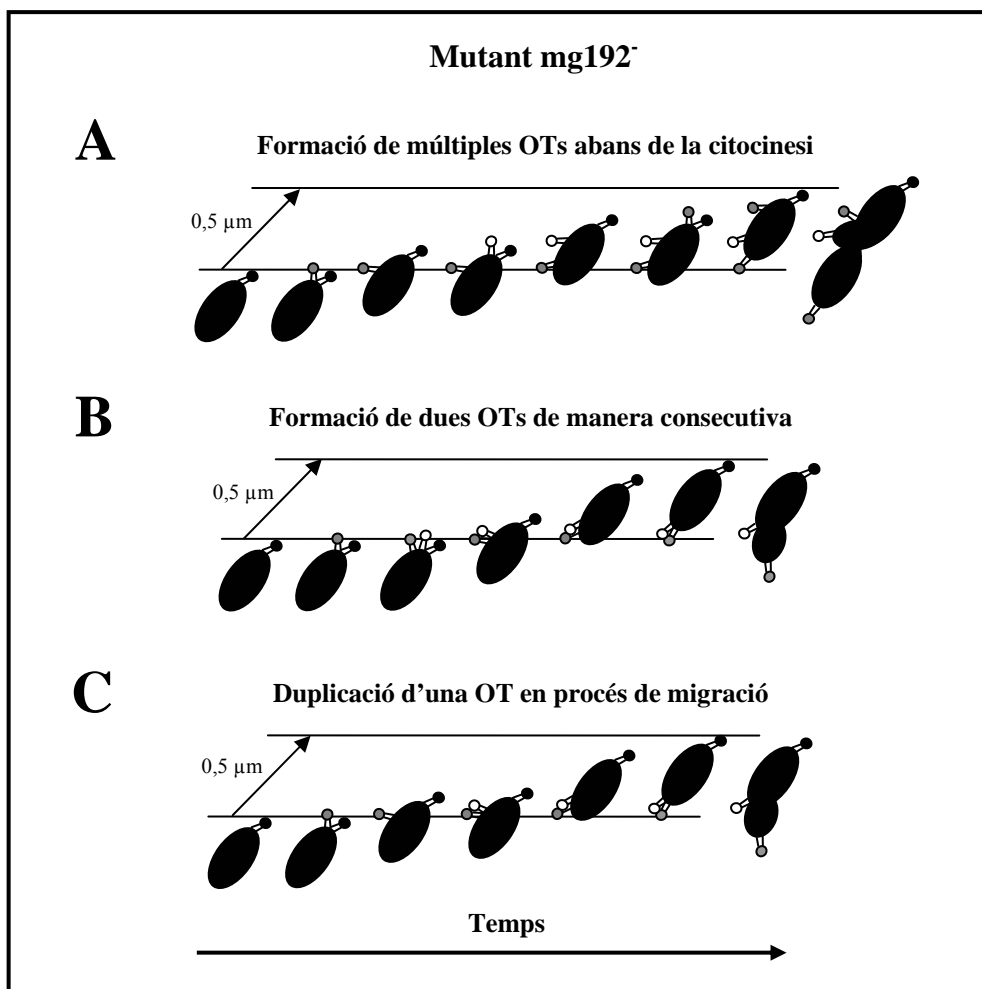


Figura V-10. Esquema il·lustratiu del procés de duplicació i migració de l'OT al mutant $mg192^-$ com a conseqüència de la desregulació temporal de la formació d'OTs noves. (A) Formació de múltiples OTs abans de la citocinesi. (B) Formació de dues OTs de manera consecutiva. (C) Duplicació d'una OT en procés de migració. El fenotip del mutant $mg192^-$ sembla producte de la combinació d'aquests factors.

Creiem que la presència de més d'una OT per cèl·lula al mutant $mg192^-$ no impedeix que les OTs noves segreguin de manera individual donant lloc a cèl·lules filles amb una sola OT (Figura V-10A). Aquesta situació explicaria perquè el percentatge de cèl·lules amb una sola OT al mutant $mg192^-$ es manté elevat (43,6%) després de tants cicles de duplicació cel·lular. Així doncs, considerem que el més probable és que es desenvolupi una cèl·lula filla independent per cada OT nova que arriba al pol oposat de la cèl·lula mare. En aquest sentit, tot indica que les cèl·lules filles que s'originen a la soca salvatge de *M. pneumoniae* només presenten una sola OT, tot i que les cèl·lules d'aquest microorganisme amb freqüència dupliquen l'OT diverses vegades abans de la citocinesi (Hasselbring *et al.*, 2006a). Per altra banda, la presència de llargs filaments en moltes cèl·lules del mutant $mg192^-$ suggereix que l'existència de més d'una OT en una mateixa cèl·lula dificulta considerablement el procés de citocinesi.

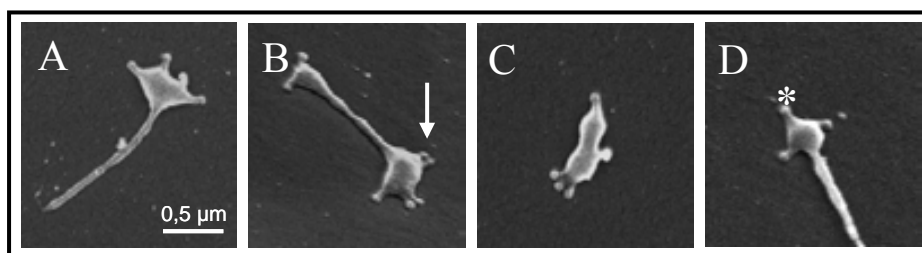


Figura V-11. Imatges de microscòpia electrònica de rastreig del mutant $mg192^-$. (A) Cèl·lula amb quatre OTs. (B) Dues cèl·lules en procés de citocinesi en les quals una de les cèl·lules presenta dues OTs que semblen migrar de manera conjunta. (C) Dues cèl·lules en procés de citocinesi en les quals una de les cèl·lules presenta tres OTs juntes i una OT a punt de finalitzar el procés de migració. (D) Cèl·lula amb tres OTs en la qual dues OTs aïllades semblen migrar per costats oposats de la que aparentment és l'OT preexistent, indicada amb un asterisc.

Les imatges de microscòpia electrònica de rastreig del mutant $mg192^-$ també mostren la presència de cèl·lules en les quals dues OTs semblen migrar de manera conjunta (fletxa, Figura V-11B). Una possible explicació d'aquest fet és que les dues OTs que migren aparellades s'hagin desenvolupat de manera ràpida i consecutiva al mateix costat d'una

OT preexistent (Figura V-10B). La presència de cèl·lules amb tres OTs juntes al mutant $mg192^-$ recolza aquesta teoria (Figura V-11C). Alternativament, podria ser que algunes OTs noves del mutant $mg192^-$ es dupliquessin mentre estan en procés de migració (Figura V-10C). Per altra banda, no podem descartar que la presència de tres OT juntes en algunes cèl·lules del mutant $mg192^-$ sigui conseqüència de la formació simultània d'una OT nova a cada costat de l'OT preexistent. Actualment, desconeixem si una OT nova es pot desenvolupar indistintament a qualssevol dels dos costats de l'OT preexistent. Si no fos així, existiria una asimetria bilateral en l'eix longitudinal de l'OT que determinaria la localització de l'OT nova durant el procés de duplicació. Analitzant amb deteniment les imatges de microscòpia electrònica de rastreig del mutant $mg192^-$, observem la presència de cèl·lules en les quals dues OTs aïllades semblen migrar per costats oposats de la que aparentment és l'OT preexistent (asterisc, Figura V-11D). Aquesta situació suggereix que les cèl·lules de *M. genitalium* o si més no les del mutant $mg192^-$, poden desenvolupar OTs noves als dos costats de l'OT preexistent. Per tal de confirmar aquesta dada, seria necessari realitzar estudis amb marcadors fluorescents que permetin fer un seguiment del procés d'aparició de les OTs noves. Malauradament, aquesta tècnica encara no està disponible a *M. genitalium*.

Malgrat que l'estructura tridimensional de la proteïna P110 és desconeguda, el programa TMHMM 2.0 (Krogh *et al.*, 2001) ens permet identificar la presència de dues regions transmembrana a la proteïna P110 (Figura V-12), corresponents als aminoàcids 13-30 i 939-961. La proximitat a l'extrem N-terminal de la primera regió transmembrana suggereix que aquesta regió rica en aminoàcids hidrofòbics probablement correspon a un pèptid senyal, responsable de la localització de la proteïna P110 a la membrana. La publicació prèvia d'un estudi en el qual es demostra l'activitat

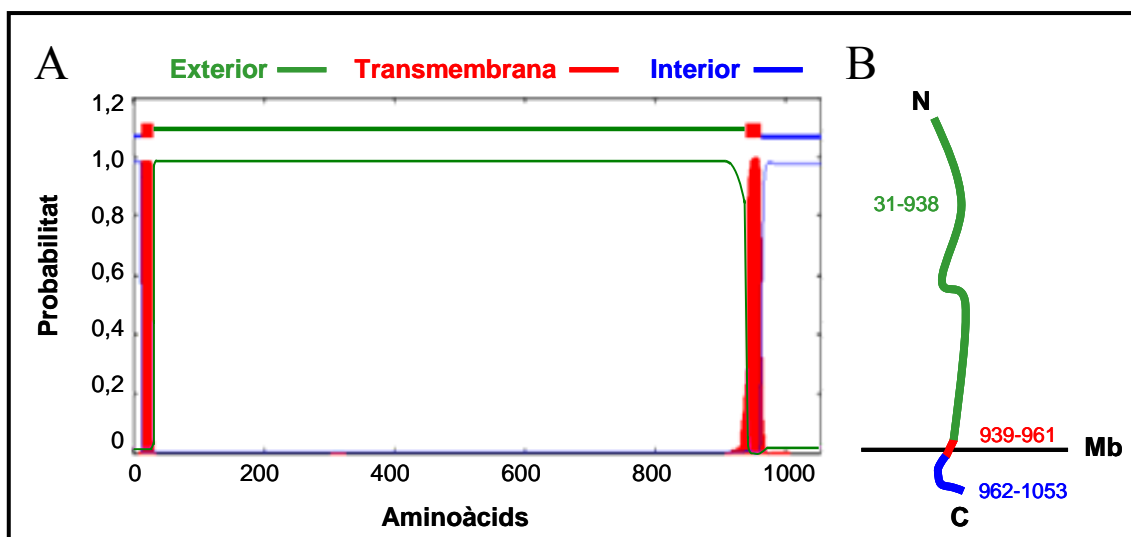


Figura V-12. Topologia de la proteïna P110 de *M. genitalium* a la membrana plasmàtica. (A) Predicció de la localització i l'orientació de les regions transmembrana a la proteïna P110 mitjançant el programa TMHMM 2.0 (Krogh *et al.*, 2001). (B) Representació esquemàtica de la disposició de la proteïna P110 a la membrana (Mb) basada en la predicció del programa TMHMM 2.0 en la qual s'indiquen els aminoàcids que delimiten cada regió.

d'una peptidasa del senyal de tipus I a *M. pneumoniae* i el processament de l'extrem N-terminal del complex B/C entre els aminoàcids 25-26, recolza aquesta hipòtesi (Catrein *et al.*, 2005). El processament del pèptid senyal un cop a la membrana, explicaria perquè la migració electroforètica de la proteïna P110 observada als gels d' SDS-PAGE és lleugerament superior a la que li correspondria tenint en compte la seva massa molecular teòrica (114,45 kDa). Paral·lelament, el programa TMHMM 2.0 indica que la regió de la proteïna P110 compresa entre els aminoàcids 31-938 presenta una probabilitat molt elevada de localitzar-se a l'exterior de la membrana, un fet consistent amb la participació d'aquesta proteïna en el manteniment de la capacitat d'adhesió. La presència d'una segona regió transmembrana a la proteïna P110, possibilita que la regió compresa entre els aminoàcids 962-1053 d'aquesta proteïna es localitzi a l'interior de la cèl·lula. La localització intracel·lular de l'extrem C-terminal de la proteïna P110 concorda amb el paper regulador d'aquesta regió identificat en aquest estudi.

Basant-nos en l'absència d'OTs als mutants $\Delta mg192$ i $\Delta mg191$, i en l'estreta relació existent entre les proteïnes P110 i P140 (Burgos *et al.*, 2006), pensem que la formació d'una OT nova podria iniciar-se amb l'acumulació (formació d'un focus) d'aquestes dues proteïnes en un punt proper a l'OT preexistent. El nou focus de P110/P140 resultant, independent del de l'OT preexistent, induiria aleshores el desenvolupament d'una OT nova en aquest punt de la cèl·lula. En certa manera, el nou focus de P110/P140 actuaria d'encebador del procés de formació de l'OT. Així doncs, qualsevol mecanisme que permetés controlar la formació dels nous focus de P110/P140, permetria regular la duplicació de l'OT a nivell temporal. En aquest sentit, la regió C-terminal de la proteïna P110 podria actuar com un interruptor de tipus ON/OFF que permetria controlar quan es pot formar un focus nou de P110/P140 i quan no. Atès que la pèrdua d'aquest interruptor al mutant $mg192^-$ augmenta la freqüència de formació d'OTs noves, sembla que el paper de l'extrem C-terminal de la proteïna P110 a la soca salvatge de *M. genitalium* consisteix en impedir o retardar la formació dels nous focus de P110/P140 fins que es presentin les condicions apropiades per a la duplicació de l'OT. El control de la formació dels focus nous de P110/P140 podria aconseguir-se per diferents vies: interferint en la interacció de les proteïnes P110/P140, restringint el trànsit d'aquestes proteïnes fins a la membrana, etc. És interessant destacar que bona part de la regió de la proteïna P110 que sembla necessària per controlar la duplicació de l'OT a *M. genitalium* (aminoàcids 1026-1053), no és present al complex B/C de *M. pneumoniae* (Figura V-13). Aquesta situació, podria explicar perquè les cèl·lules de la soca salvatge de *M. pneumoniae* presenten característiques tan similars a les de les cèl·lules del mutant $mg192^-$: formació de més d'una OT abans de la citocinesi, alt percentatge de cèl·lules immòbils, presència de filaments al pol oposat de l'OT, etc.

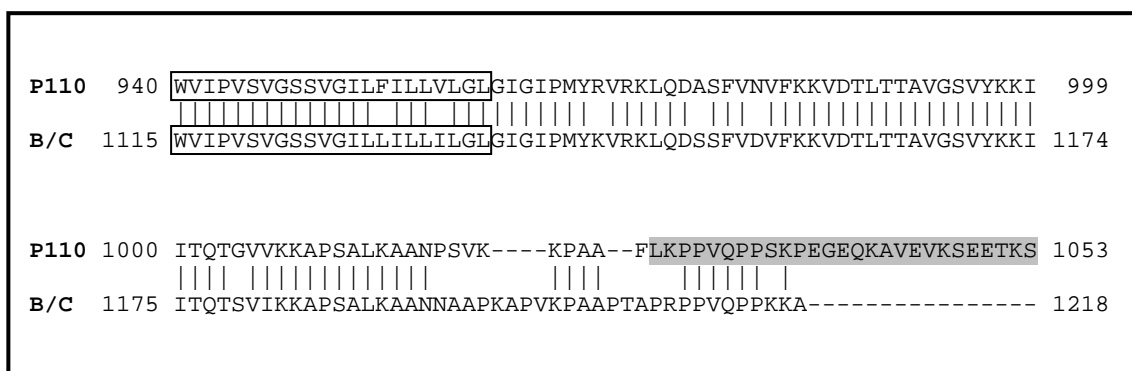


Figura V-13. Alineament de les seqüències d'aminoàcids corresponents als extrems C-terminal de la proteïna P110 de *M. genitalium* i del complex B/C de *M. pneumoniae*. La regió de la proteïna P110 que sembla necessària per regular la duplicació de l'OT a *M. genitalium* (aminoàcids 1026-1053), es mostra subratllada en color gris. Les regions de les proteïnes P110 i B/C encapsulades (aminoàcids 939-961 i 1115-1136, respectivament) corresponen a possibles regions transmembrana identificades mitjançant el programa TMHMM 2.0 (Krogh *et al.*, 2001).

Els resultats obtinguts en aquest treball demostren que existeix un mecanisme que permet regular la duplicació de l'OT a nivell temporal a *M. genitalium* i que aquest mecanisme de control és inexistent al mutant *mg192⁻*. El fenotip observat al mutant *mg192⁻* posa de manifest que la proteïna P110 constitueix un element clau per al desenvolupament i la regulació de l'OT de *M. genitalium*. Actualment, s'estan realitzant els assaigs de complementació del mutant *mg192⁻*, necessaris per demostrar de forma inequívoca que el fenotip observat és conseqüència de la inserció del transposó al gen *mg192* i no de mutacions espontànies addicionals en d'altres punts del genoma.

VI - DISCUSSIÓ GENERAL

En aquest treball, hem estudiat la motilitat de les cèl·lules de *M. genitalium* i hem desenvolupat mètodes que han fet possible l'aïllament de trenta mutants deficients en motilitat d'aquest microorganisme. La caracterització dels mutants aïllats, ens ha permès identificar cinc gens que redueixen la capacitat de desplaçament de les cèl·lules. Les mutacions als gens *mg200* i *mg386* redueixen dràsticament la motilitat de *M. genitalium* sense que això vagi acompanyat d'una disminució de la capacitat d'adhesió de les cèl·lules. Aquest resultat demostra l'existència a *M. genitalium* d'una maquinària de motilitat independent de la maquinària d'adhesió i suggereix que les proteïnes MG200 i MG386 tenen un paper important en el moviment de les cèl·lules d'aquest microorganisme. Tot i que encara es desconeix el paper concret de les proteïnes MG200 i MG386 en el mecanisme de motilitat, és previsible que les dues proteïnes es localitzin a l'organel·la terminal de *M. genitalium* i que actuïn de manera coordinada amb altres proteïnes d'aquesta estructura. En canvi, la reducció de la motilitat observada com a conseqüència de mutacions als gens *mg218* i *mg317*, està associada a canvis ultraestructurals importants de l'organel·la terminal i a una disminució de la capacitat d'adhesió de les cèl·lules. L'estreta relació existent entre la capacitat d'adhesió i la capacitat de desplaçament dels micoplasmes, ens impedeix vincular de manera directa les proteïnes MG218 i MG317 a la maquinària de motilitat de *M. genitalium*. Tot i això, els resultats obtinguts mostren clarament que les proteïnes MG218 i MG317 són dos components estructurals bàsics de l'organel·la terminal de *M. genitalium*. La proteïna MG218 és un dels components majoritaris de l'eix electrodens, mentre que la proteïna MG317 està implicada en la formació/estabilitat del botó terminal i en l'ancoratge de l'organel·la terminal a la membrana plasmàtica. Finalment, els resultats obtinguts en aquest treball de tesi indiquen que la proteïna P110 (MG192) forma part d'un sistema de control temporal de la duplicació de l'organel·la terminal de *M. genitalium*, que

impedeix que es formin dues organel·les terminals abans de la citocinesi. La presència de múltiples organel·les terminals en una mateixa cèl·lula dóna lloc a un percentatge molt elevat de cèl·lules immòbils a la població del mutant mg192⁻ aïllat en aquest estudi. Així doncs, les deficiències de motilitat observades en aquest mutant no són conseqüència de deficiències en el mecanisme de desplaçament de les cèl·lules. Tot i que es desconeixen completament els mecanismes de regulació de micoplasma, aquest mutant posa de manifest l'existència d'aquests mecanismes a l'hora de controlar i coordinar les diferents funcions que duen a terme aquestes microorganismes. Aquests sistemes de regulació garanteixen que tots aquests processos es desenvolupin de manera correcta i de manera eficient.

Un del fets que pot resultar més sorprenent d'aquest treball és que no s'hagi pogut aïllar cap mutant de *M. genitalium* que doni lloc a cèl·lules completament immòbils però adherents. Aquesta situació pot estar indicant que les proteïnes de *M. genitalium* que en última instància són responsables directes del moviment de les cèl·lules són alhora imprescindibles per a l'adhesió d'aquest microorganisme. La necessitat que les cèl·lules de micoplasma s'adhereixin a superfícies sòlides per desplaçar-se, dificulta l'anàlisi del moviment de les soques no adherents de *M. genitalium*. Aquesta situació impedeix vincular de manera directa els gens mutats presents a les soques no adherents a la maquinària de motilitat dels micoplasmes. El fet que només s'hagin pogut identificar dos gens de *M. genitalium* implicats en motilitat però no en adhesió, suggereix que moltes de les proteïnes implicades en l'adhesió a superfícies d'aquest microorganisme també formen part de la maquinària de motilitat.

Per altra banda, l'origen evolutiu dels micoplasmes està estretament vinculat a una dràstica reducció dels seus genomes que ha donat lloc a uns microorganismes extraordinàriament adaptats a un estil de vida parasitari. En aquest sentit, és lògic pensar que totes les funcions que desenvolupen els micoplasmes contribueixen significativament a la seva supervivència *in vivo*. Amb només 525 gens, *M. genitalium* és un dels microorganismes amb el genoma més petit que es coneix. Tot i això, les cèl·lules d'aquest microorganisme presenten algunes característiques, com ara la capacitat de desplaçar-se, pròpies d'organismes molt més complexos. Atès que els sistemes de motilitat cel·lular comporten una important despesa energètica, tot fa pensar que la capacitat de desplaçament de les cèl·lules de *M. genitalium* ha de tenir un paper important per a l'establiment d'una infecció.

La motilitat constitueix un determinant de virulència bastant estès entre els microorganismes patògens. La capacitat de desplaçament confereix diversos avantatges com ara la possibilitat d'accedir als llocs de colonització preferents o d'afavorir la disseminació del microorganisme a dins de l'hoste. Tot i això, aquestes tasques estan estretament vinculades a la capacitat de les cèl·lules mòbils per orientar la direcció del seu moviment. Per posar un exemple, la colonització de la membrana mucosa de l'estómac pel patògen humà *Helicobacter pylori* requereix que les cèl·lules d'aquest microorganisme siguin mòbils i sensibles als gradients d'urea (Yoshiyama *et al.*, 2000). Les ureases d'*H. pylori*, presents tant a la superfície citoplasmàtica com al citoplasma d'aquest microorganisme, estan implicades en la neutralització dels àcids de l'estómac però també en l'orientació del moviment de les cèl·lules. En aquest sentit, el gradient d'urea existent a la superfície interna de l'estómac orienta les cèl·lules mòbils d'*H. pylori* cap a l'epiteli gàstric mentre aquestes travessen la superfície mucosa de l'estómac.

Paral·lelament, la hidròlisi d'urea per la ureasa citoplasmàtica contribueix a la generació d'energia pel moviment del flagel.

Però, poden les cèl·lules de micoplasma controlar la direcció del seu moviment? Durant la realització d'aquest estudi hem pogut observar que les cèl·lules de *M. genitalium* presenten un comportament cooperatiu pel que fa al moviment. En aquest sentit, sembla que la presència d'una concentració elevada de cèl·lules estimula la motilitat de la població en general, suggerint que les cèl·lules de *M. genitalium* secreten algun factor capaç d'estimular el moviment. Aquesta situació demostra que la motilitat de les cèl·lules de *M. genitalium* és sensible a determinats factors de l'entorn. Paral·lelament, tot i que la majoria de cèl·lules de *M. genitalium* es mouen en cercles en les condicions en les quals s'ha dut a terme l'anàlisi de la motilitat, algunes cèl·lules exhibeixen un moviment erràtic caracteritzat per la presència de períodes de desplaçament rectilinis. Aquesta observació suggereix que les cèl·lules de *M. genitalium* poden variar la trajectòria del seu desplaçament i que per tant, ha d'existir algun mecanisme implicat en el control de la direcció de les cèl·lules.

Diversos estudis indiquen que algunes espècies de micoplasma presenten quimiotaxi, és a dir, la capacitat de desplaçar-se amb una orientació definida com a resposta a estímuls de tipus químic (Trachtenberg, 1998). A *M. mobile* per exemple, alguns sucres i aminoàcids tenen un efecte atractiu de les cèl·lules (Piper *et al.*, 1987). De la mateixa manera, sembla que les cèl·lules de *M. mobile* s'orienten i es desplacen en sentit contrari al corrent quan aquestes són sotmeses a un flux constant (Rosengarten *et al.*, 1988). Aquesta característica es coneix com a reotaxi positiva. Sembla clar doncs, que algunes espècies de micoplasma poden controlar la direcció del seu moviment com a resposta a

estímuls externs. Tot i això, els genomes dels micoplasmes no disposen dels gens homòlegs als gens *che*, responsables de les respostes quimiotàctiques en la majoria de microorganismes mòbils. Per aquest motiu, els gens implicats en el control de la direcció del moviment de les cèl·lules de micoplasma són ara per ara desconeguts.

Recentment, un estudi realitzat a *M. pneumoniae* ha permès relacionar l'activitat motora de les cèl·lules d'aquest microorganisme amb la capacitat de colonització de cèl·lules diferenciades (Jordan *et al.*, 2007). En aquest sentit, sembla que la motilitat de les cèl·lules de *M. pneumoniae* és important per travessar les mucoses que recobreixen les cèl·lules de l'hoste. Podria donar-se el cas que alguns components presents a les superfícies mucoses poguessin estimular el moviment de les cèl·lules o funcionar com a atractants d'aquestes cèl·lules. Com hem comentat a la introducció, una fracció de la població de l'enzim glicolític gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa de *M. genitalium* es localitza a la membrana plasmàtica i actua com a receptor de la mucina, un dels components majoritaris de les superfícies mucoses (Alvarez *et al.*, 2003). Paral·lelament, la mucina secretada per les cèl·lules epitelials podria atraure o estimular el moviment de les cèl·lules de micoplasma. El paper de la mucina com a factor quimiotàctic atractant del moviment de microorganismes mòbils, ja ha estat proposat anteriorment per altres autors (Turner *et al.*, 1997).

Així doncs, l'estudi dels factors que modifiquen els paràmetres del moviment dels micoplasmes i la identificació dels gens implicats en aquest procés, poden ajudar a entendre de forma decisiva el paper de la motilitat com a determinant de virulència i a comprendre les interaccions existents entre aquests microorganismes i les cèl·lules de l'hoste.

VII - PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS

1. Llistat de soques bacterianes, vectors i encebadors utilitzats en aquest estudi

1.1 Soques d'*E. coli*

XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺), <i>supE44, relA1, lac, [F', proAB, lacI^qZΔM15::Tn10(tet^r)]</i>
	Utilitzada per dur a terme el clonatge de plasmidis.
BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT, hsdS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>dcm, gal, λ</i> (DE3)
	Utilitzada per dur a terme l'expressió recombinant de proteïnes de <i>M. genitalium</i> .

1.2 Soques de *M. genitalium*

G37	Aïllat natural de <i>M. genitalium</i> a partir d'un cas clínic d'uretritis. Soca salvatge. Origen: ATCC 33530.
mg200⁻	G37 amb un transposó inserit al gen <i>mg200</i> . Origen: aquest estudi.
mg386⁻	G37 amb un transposó inserit al gen <i>mg386</i> . Origen: aquest estudi.
mg218⁻	G37 amb un transposó inserit al gen <i>mg218</i> . Origen: aquest estudi.
mg317⁻	G37 amb un transposó inserit al gen <i>mg317</i> . Origen: aquest estudi.
mg192⁻	G37 amb un transposó inserit al gen <i>mg192</i> . Origen: aquest estudi.
Δmg218	G37 en el qual el gen <i>mg218</i> ha estat deletat per recombinació homòloga. Origen: aquest estudi.
Δmg191	G37 en el qual el gen <i>mg191</i> ha estat deletat per recombinació homòloga. Origen: Burgos <i>et al.</i> , 2006.
Δmg192	G37 en el qual el gen <i>mg192</i> ha estat deletat per recombinació homòloga. Origen: Burgos <i>et al.</i> , 2006.

cI G37 no adherent que no expressa la proteïna P110 i que presenta nivells molt reduïts de la proteïna P140, la qual apareix com un doblet a les transferències de tipus Western.
Origen: Mernaugh *et al.*, 1993.

1.3 Vectors

pBSK Plasmidi utilitzat com a vector de clonatge de fragments de restricció d'ADN.
Origen: Stratagene

pBE Plasmidi utilitzat com a vector de clonatge de fragments d'ADN amplificats per PCR. És un plasmidi derivat del pBSK en qual el lloc de clonatge múltiple ha estat substituït per un fragment portador de la diana *EcoRV*.
Origen: Pich *et al.*, 2006b.

pET19b Plasmidi utilitzat per dur a terme l'expressió de proteïnes recombinants a *E. coli*. Afegeix una cua d'histidines a l'extrem N-terminal de la proteïna.
Origen: Novagen

pMTnTetM438 Plasmidi portador del minitransposó MTnTetM438. Aquest minitransposó derivat del Tn4001 confereix resistència a tetraciclina a les soques de *M. genitalium*.
Origen: Pich *et al.*, 2006b.

pMTnGm Plasmidi portador del minitransposó MTnTetGm. Aquest minitransposó derivat del Tn4001 confereix resistència a gentamicina a les soques de *M. genitalium*.
Origen: Pich *et al.*, 2006b.

pMTnmg200 Plasmidi utilitzat per dur a terme la complementació dels mutants mg200.
Origen: aquest estudi.

pMTnmg386 Plasmidi utilitzat per dur a terme la complementació dels mutants mg386.
Origen: aquest estudi.

pΔmg218 Plasmidi utilitzat per dur a terme la deleció del gen *mg218* al genoma de *M. genitalium*.
Origen: aquest estudi.

pETmg200 Plasmidi utilitzat per dur a terme l'expressió de la proteïna MG200 de *M. genitalium* a *E. coli*.
Origen: aquest estudi.

1.4 Encebadors

Tc upstream	5'-GGTAGTTTTCTGCATCAACATG
Tc downstream	5'-CGTCGTCCAAATAGTCGGATAG
	Utilitzats per dur a terme les reaccions de seqüenciació de les regions situades als costats 5' i 3' de les insercions de l'MTn <i>TetM438</i> als mutants aïllats.
mg200c-5'	5'-<u>CTCGAG</u>TAGTATTTAGAATTAATAAAGTATGGCTGAACAGAAACGTGATTATTATG
mg200c-3'	5'-<u>CCCGGG</u>CTAACTAATGGGTTCTTGGGAGAGG
	Utilitzats per amplificar un fragment d'1,8 kb corresponent a l'ORF del gen <i>mg200</i> . L'encebador de l'extrem 5' porta una regió de 22 nucleòtids que permet l'expressió de gens a <i>M. genitalium</i> (Pich <i>et al.</i> , 2006b).
mg386c-5'	5'-<u>GGGCC</u>TAGTATTTAGAATTAATAAAGTATGCCAAAAACAACAAGAATAAAAAAC
mg386c-3'	5'-<u>CCCGGG</u>CTATTTTTATCATTACTGCCAAAAAC
	Utilitzats per amplificar un fragment de 4,8 kb corresponent a l'ORF del gen <i>mg386</i> . L'encebador de l'extrem 5' porta una regió de 22 nucleòtids que permet l'expressió de gens a <i>M. genitalium</i> .
BEmg218-5'	5'-<u>CTGCAG</u>CCAGGATTTGATCCTAACCAAC
BEmg218-3'	5'-<u>GAATTC</u>CATAAATGGTTGCAGCGAAGG
	Utilitzats per amplificar un fragment d'1 kb corresponent a la regió flanquejant al gen <i>mg218</i> per l'extrem 5'.
BDmg218-5'	5'-<u>GGATCC</u>AACATTAATAAAGGTTGATTGGCC
BDmg218-3'	5'-<u>GGGCC</u>TAACAATTAACGGTGGTTCTTC
	Utilitzats per amplificar un fragment de 0,8 kb corresponent a la regió flanquejant al gen <i>mg218</i> per l'extrem 3'.
MG200Exp1	5'-GGAATTC<u>CATATG</u>GCTGAACAGAAACGTGATTATTATG
MG200Exp3	5'-GAATGA<u>ACTGG</u>TTCGTTCCAAACCCATTGGCCCTGTTTCATCAAAGTAACC
	Utilitzats per amplificar un fragment de 0,6 kb corresponent a l'extrem 5' de l'ORF del gen <i>mg200</i> . A l'encebador de l'extrem 3' s'ha introduït una mutació puntual que permet substituir un codó TGA (Trp189) per un codó TGG.
MG200Exp2	5'-CAGGGGATTGGAGTTGGAAGGGTTACTTTGATGAACAGGGCAAATGGGTT
MG200Exp4	5'-<u>CTCGAG</u>ACTAATGGGTTCTTGGGAGAGG
	Utilitzats per amplificar un fragment d'1,2 kb corresponent a l'extrem 3' de l'ORF del gen <i>mg200</i> . A l'encebador de l'extrem 5' s'ha introduït una mutació puntual que permet substituir el codó TGA (Trp201) per un codó TGG.

Les regions dels encebadors subratllades corresponen a dianes de restricció introduïdes per facilitar el clonatge dels fragments de PCR resultants:

CTCGAG *Xho*I; CCCGGG *Sma*I; GGGCCC *Apa*I; CTGCAG *Pst*I; GAATTC *Eco*RI; GGATCC *Bam*HI; CATATG *Nde*I

2. Composició i protocol de preparació dels medis de cultiu utilitzats en aquest estudi

2.1 Cultiu de les soques d'*E. coli*.

Medis líquids

- LB, composició per 1 L:

- Bactotripton (ADSAmicro)	10 g
- Extracte de llevat (ADSAmicro)	5 g
- NaCl	10 g
- H ₂ O destil·lada	fins a 1 L

1) Autoclavar 20 min a 120°C

- 2YT, composició per 1 L:

- Bactotripton (ADSAmicro)	16 g
- Extracte de llevat (ADSAmicro)	10 g
- NaCl	5 g
- H ₂ O destil·lada	fins a 1 L

1) Autoclavar 20 min a 120°C

Medi sòlid

Per preparar medi LB sòlid s'afegeix al medi Bacteriological agar (ADSAmicro) a una concentració final de l'1,5%. Un cop autoclavat, el medi es posa en un bany a 56°C durant 1 h i es dispensa en plaques de Petri de 90 mm de diàmetre en volums d'entre 15 i 20 ml. Les plaques es conserven a 4°C durant un temps inferior a un mes.

Suplements

- Ampicil·lina (Roche).

Utilitzada per seleccionar soques transformants portadores del gen de resistència a ampicil·lina *bla*. L'ampicil·lina es prepara a una concentració de 100 mg ml^{-1} en H_2O MilliQ. La solució s'esterilitza per filtració (porus de $0,22 \mu\text{m}$ Millipore) i es conserva a -20°C en alíquotes d'1 ml. La concentració de treball és de $100 \mu\text{g ml}^{-1}$.

- Tetraciclina (Fluka).

Utilitzada durant l'elaboració de competents pel mètode del CaCl_2 . La tetraciclina es prepara a una concentració de 5 mg ml^{-1} en etanol absolut. Donat que aquest antibiòtic és fotosensible, s'ha d'evitar l'exposició a la llum. La solució es conserva a -20°C en alíquotes d'1 ml. La concentració de treball és de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$.

- IPTG (Fluka).

Utilitzat per induir l'expressió de gens situats sota control del promotor del gen *lacZ*. L'IPTG es prepara a una concentració de 0,5 M en H_2O MilliQ estèril i es conserva a -20°C en alíquotes d'1 ml. La concentració de treball és de 0,1 mM.

- X-Gal (Fluka)

Utilitzat per a la detecció de plasmidis recombinats. És un substrat de l'enzim β -galactosidasa que al ser hidrolitzat produeix un cromòfor de color blau. L'X-Gal es prepara a una concentració de 50 mg ml^{-1} en dimetilformamida i es conserva a -20°C en alíquotes d'1 ml. La concentració de treball és de $0,05 \text{ mg ml}^{-1}$.

2.2 Cultiu de les soques de *M. genitalium*.

Medi líquid

SP-4, composició per 500 ml:

- Preparació de la base

- PPLO (Difco)	1,75 g
- Triptona (Difco)	5,00 g
- Bactopeptona (Difco)	2,65 g
- Glucosa (Sigma)	2,50 g
- H_2O destil·lada	fins a 312 ml

1) Ajustar el pH a 7,8 amb NaOH 1 M

2) Autoclavar 15 min a 120°C

3) Deixar refredar i afegir els complements

• Preparació dels complements

- Yestolate 2% (Difco) Autoclavat	50,0 ml
- Roig de fenol 0,1% (pH 7,0) Autoclavat	7,0 ml
- Extracte de llevat fresc 25%	17,5 ml
- CMRL 10x (Invitrogen)	25,0 ml
- Sèrum boví fetal (Invitrogen)	85,0 ml
- Glutamina 29,2 mg ml ⁻¹	1,71 ml

1) El pH final del medi ha d'estar entre 7,6 - 7,8

Per preparar l'extracte de llevat, es dilueixen 250 g de llevat fresc en 1 L d'aigüa destil·lada i s'autoclava a 115°C durant 10 min. La suspensió es refreda en gel picat i se centrifuga a 380 x g durant 10 min a 4°C. Posteriorment, es recupera el sobrenedant i aquest s'autoclava de nou a 115°C durant 10 min. Finalment, l'extracte de llevat es conserva a -20°C en al·iquotes de 20 ml. Per altra banda, el sèrum boví fetal s'ha d'escalfar a 56°C durant 30 min per inactivar el sistema del complement.

Medi sòlid

Per preparar medi SP-4 sòlid s'afegeix a la base Agar noble (Difco) a una concentració final del 0,8%. La base s'autoclava i es posa en un bany a 56°C durant 1 h. Posteriorment, s'hi afegeixen els complements prèviament escalfats a 56°C i es dispensa en plaques de Petri de 50 mm de diàmetre en volums d'entre 5 i 6 ml. Les plaques es conserven a 4°C durant un temps inferior a una setmana.

Medi semisòlid

Per preparar medi SP-4 semisòlid s'afegeix a la base Agarosa de baix punt de fusió SeaPlaque GTG (BioWhittaker) a una concentració final del 0,5%. La base s'autoclava i es posa en un bany a 42°C. Posteriorment, s'afegeixen els complements prèviament escalfats a 42°C i es dispensa en plaques de cultiu cel·lular de 50 mm de diàmetre en volums d'entre 5 i 6 ml. Donat que el medi semisòlid s'ha utilitzat per cultivar cèl·lules de *M. genitalium* prèviament adherides a la superfície de plaques de cultiu cel·lular (Corning), aquest medi s'ha preparat el mateix dia que ha de ser utilitzat.

Suplements

- Ampicil·lina (Roche).

Utilitzada per prevenir la contaminació dels cultius de *M. genitalium* amb altres soques bacterianes. L'ampicil·lina es prepara a una concentració de 200 mg ml⁻¹ en H₂O MilliQ. La solució s'esterilitza per filtració (filtres amb porus de 0,22 µm de Millipore) i es conserva a -20°C en alíquotes d'1 ml. La concentració de treball és de 100 µg ml⁻¹.

- Gentamicina 10 mg ml⁻¹ (Invitrogen).

Utilitzada per seleccionar soques transformants de *M. genitalium* portadores del gen de resistència a gentamicina, tobramicina i kanamicina *aac(6')-aph(2'')* del Tn4001 (Lyon *et al.*, 1984). La concentració de treball és de 120 µg ml⁻¹. La solució mare es conserva a 4°C.

- Tetraciclina (Fluka).

Utilitzada per seleccionar soques transformants de *M. genitalium* portadores del gen de resistència a tetraciclina *tetM438* (Pich *et al.*, 2006b). El marcador *tetM438* deriva del gen de resistència a tetraciclina *tetM* del Tn916 (Franke *et al.*, 1981). La concentració de treball és de 2 µg ml⁻¹ i es conserva a -20°C.

3. Condicions de cultiu estàndard, condicions de conservació i mètode de recuperació de colònies aïllades de les soques bacterianes utilitzades en aquest estudi

3.1 Cultiu de les soques d'*E. coli*

Cultius en medi líquid

Els cultius d'*E. coli* en medi líquid es duen a terme en tubs estèrils i s'inoculen en una cabina de flux laminar (Telsar, model AV-100). Com a inòcul s'utilitza una colònia aïllada provinent d'una placa de cultiu en medi sòlid o 2-10 µl d'un glicerinat de treball. Per inocular cultius de gran volum es duen a terme precultius crescuts fins a una $A_{600} \sim 1$. Posteriorment, els cultius s'incuben a 37°C i 250 rpm durant tota la nit en un incubador d'aire amb agitació orbital (Braun, model Centromat H).

Volums de cultiu i aplicació:

3 ml: Obtenció d'ADN plasmídic a petita escala.

10 ml: Obtenció d'ADN plasmídic a mitjana escala.

500 ml: Producció de proteïnes recombinants.

Cultius en medi sòlid

Els cultius d'*E. coli* en medi sòlid es duen a terme en plaques d'LB i s'inoculen en una cabina de flux laminar (Telsar, model AV-100). Com a inòcul s'utilitzen entre 100 i 200 µl d'una suspensió cel·lular que s'estén per tota la superfície de cultiu mitjançant una nansa de Digralsky. Posteriorment, les plaques s'incuben invertides a 37°C durant tota la nit en una estufa de cultiu (Mettler). Les colònies aïllades es recuperen amb l'ajut d'un escuradent estèril.

Preparació de glicerinat de treball

Els glicerinat de treball de les soques d'*E. coli* es preparen a partir de 500 µl d'un cultiu líquid en medi LB o 2YT al qual s'hi afegeix glicerol estèril al 15%. Els glicerinat de treball es conserven a -80°C.

3.2 Cultiu de les soques de *M. genitalium*

Cultius en medi líquid

Els cultius de *M. genitalium* en medi líquid s'han dut a terme en flascons o en plaques de cultiu cel·lular (TPP) i s'inoculen en una cabina de flux laminar (Telsar, model BIO-II-A). Com a inòcul s'ha utilitzat una colònia aïllada provinent d'una placa de cultiu en medi sòlid o 20-100 µl d'un *stock* de treball. Posteriorment, els cultius s'incuben a 37°C en una atmosfera de CO₂ al 5% (Estufes de cultiu Jouan, models EG 110 IR i 160-150). Les soques adherents de *M. genitalium* es desenganxen de la superfície de cultiu cel·lular mitjançant un rascador (Becton Dickinson). Les soques no adherents es recuperen del flascó de cultiu amb una pipeta i se centrifuguen a 12000 rpm durant 15 min a 4°C.

Volums de cultiu i aplicació:

- 200 µl: Propagació de colònies aïllades recuperades d'una placa de cultiu amb medi SP-4 semisòlid.
Es duen a terme en plaques de cultiu cel·lular de 96 pous.
- 5 ml: Preparació d'*stocks* de treball, extracció de proteïna total o propagació de colònies aïllades provinents d'una placa de cultiu amb medi SP-4 sòlid.

Es duen a terme en flascons de cultiu de 25 cm² i triguen entre 3-12 dies en créixer depenent de si l'inòcul és realitza a partir d'un *stock* de treball o a partir d'una colònia aïllada recuperada d'una placa amb medi SP-4 sòlid.

20 ml: Extracció d'ADN genòmic.

Es duen a terme en flascons de cultiu de 75 cm² i triguen entre 3-4 dies en créixer.

50 ml: Transformació de cèl·lules per electroporació.

Es duen a terme en flascons de cultiu de 150 cm² i triguen 5-8 dies en créixer.

Cultius en medi sòlid

Els cultius de *M. genitalium* en medi sòlid es duen a terme en plaques d'SP-4 i s'inoculen en una cabina de flux laminar (Telsar, model BIO-II-A). Com a inòcul s'utilitzen entre 10 i 200 µl d'una suspensió cel·lular que es deixa adsorbir a la superfície de cultiu durant uns 15 min. Posteriorment, les plaques s'incuben invertides a 37°C en una atmosfera de CO₂ al 5%. Les colònies triguen entre 7 i 12 dies en aparèixer. Les colònies es visualitzen mitjançant una lupa estereoscòpica (Wild Heerbrugg Leitz Plan) i es recuperen mitjançant una punta de pipeta de 200 µl estèril prèviament retallada per obtenir un diàmetre d'uns 2-3 mm.

Preparació d'*stocks* de treball

Els *stocks* de treball de les soques de *M. genitalium* es preparen a partir d'un cultiu líquid de 5 ml en medi SP-4. Un cop que el cultiu ha crescut, es retira el medi SP-4 envellit i les cèl·lules es recuperen en 5 ml de medi SP-4 fresc. Els *stocks* de treball es conserven a -80°C en alíquotes de 100 µl. Per preservar les soques de *Mycoplasma* no és necessari afegir glicerol.

4. Protocols de transformació bacterians utilitzats en aquest estudi

4.1 Transformació de soques d'*E. coli*

Tant l'obtenció de cèl·lules competents d'*E. coli* per tractament amb CaCl₂ com la transformació d'aquestes cèl·lules mitjançant un shock tèrmic, s'ha dut a terme segons els protocols descrits al "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Sambrook *et al.*, 2001).

4.2 Transformació de soques de *M. genitalium*

El protocol d'electroporació que s'ha utilitzat en aquest treball està basat en el protocol descrit per Hedreyda *et al.*, 1993 per a la transformació de *M. pneumoniae*. Aquest protocol va ser adaptat amb èxit per Reddy *et al.*, 1996 per a la transformació de *M. genitalium* i ha estat lleugerament modificat al nostre laboratori.

Breument:

- 1) Iniciem un cultiu de *M. genitalium* de 20 ml a partir d'un *stock* de treball.
- 2) Al tercer dia de cultiu, retirem 15 ml del medi SP-4 envellit.
- 3) Recollim les cèl·lules del flascó amb l'ajut d'un rascador, obtenint 5 ml d'una suspensió cel·lular.
- 4) Fem passar les cèl·lules per filtres de baixa retenció de proteïnes amb porus de 0,45 µm (Millipore).
- 5) La suspensió cel·lular filtrada es dispensa en un flascó de cultiu de 150 cm² i s'hi afegeixen 45 ml de medi SP-4 fresc.
- 6) Al dia següent, retirem el medi SP-4 envellit del flascó de cultiu.
- 7) Rentem les cèl·lules tres vegades amb el tampó d'electroporació (8mM HEPES; 272 mM sucrosa, pH 7,4).
- 8) Recollim les cèl·lules amb l'ajut d'un rascador en un volum d'1,5 ml de tampó d'electroporació (títol aproximat 10⁹ cfus ml⁻¹).
- 9) Dipositem 100 µl de la suspensió cel·lular anterior en una cubeta d'electroporació de 2 mm de separació entre elèctrodes (BTX).
- 10) Afegim entre 10 i 30 µg d'ADN plasmídic en el mínim volum possible (concentració ~1 µg µl⁻¹).
- 11) Mantenim la cubeta amb la barreja en gel picat durant 15 min.
- 12) Introduïm la cubeta a l'electroporador (BTX[®] Electroporation System, model Electro Cell Manipulator[®] 600) i accionem el disparador del corrent (2,5 kV de voltatge; 129 Ω de resistència).
- 13) Un cop electroporades les cèl·lules s'incuben durant 15 min en gel picat encara a la mateixa cubeta d'electroporació.
- 14) Afegim 900 µl de medi SP-4 i transferim el contingut en un tub eppendorf.
- 15) Incubem la suspensió cel·lular a 37°C durant 2 h per tal que s'expressi el gen de resistència a l'antibiòtic.
- 16) Finalment, dispensem la suspensió cel·lular en plaques de medi SP-4 sòlid en volums de 200 µl.

5. Construcció dels diferents plasmidis desenvolupats en aquest estudi

pMTnmg200

Per obtenir el plasmidi pMTnmg200, es va amplificar per PCR la regió corresponent a l'ORF del gen *mg200* a partir d'ADN de la soca salvatge de *M. genitalium* mitjançant els encebadors mg200c-5' i mg200c-3'. L'encebador mg200c-5' incorpora una regió de 22 nucleòtids capaç de promoure la transcripció de gens a *M. genitalium* (Pich *et al.*, 2006b). El fragment de PCR d'1,8 kb resultant es va clonar en un plasmidi pBE que havia estat prèviament digerit amb l'enzim *EcoRV* (Pich *et al.*, 2006b). Un cop clonat, el fragment de PCR es va alliberar del vector de clonatge utilitzant les dianes de restricció *XhoI* i *SmaI* que incorporen els encebadors. Finalment, el fragment de restricció d'1,8 kb es va clonar en un plasmidi pMTnGm que havia estat prèviament digerit amb els enzims *XhoI* i *SmaI*.

Nota: La regió de 22 nucleòtids que permet l'expressió de gens a *M. genitalium* correspon a la regió promotora del gen *mg438* d'aquest mateix microorganisme. El gen *mg438* està anotat com la subunitat S d'un sistema de restricció-modificació de tipus I. Tot i això, la funció del gen *mg438* a *M. genitalium* és encara desconeguda i està sent investigada al nostre laboratori. L'estructura tridimensional de la proteïna MG438 ha estat resolta recentment en col·laboració amb el grup del Dr. Ignasi Fita (Calisto *et al.*, 2005).

pMTnmg386

Per obtenir el plasmidi pMTnmg386, la regió corresponent a l'ORF del gen *mg386* a la soca salvatge de *M. genitalium* es va amplificar per PCR mitjançant els encebadors mg386c-5' i mg386c-3'. L'encebador mg386c-5' també incorpora la regió promotora del gen *mg438* de *M. genitalium*. El fragment de PCR de 4,8 kb resultant es va clonar en un plasmidi pBE que havia estat prèviament digerit amb l'enzim *EcoRV*. Un cop clonat, el fragment de PCR es va alliberar del vector de clonatge utilitzant les dianes de restricció *ApaI* i *SmaI* que incorporen els encebadors. Finalment, el fragment de restricció de 4,8 kb es va clonar en un plasmidi pMTnGm que havia estat prèviament digerit amb els enzims *ApaI* i *SmaI*.

pΔmg218

Per obtenir el plasmidi pΔmg218, es van amplificar per PCR les regions flanquejants 5' i 3' del gen *mg218* a partir d'ADN de la soca salvatge de *M. genitalium*. En primer lloc, mitjançant els encebadors BEmg218-5' i BEmg218-5', es va amplificar un fragment d'1 kb corresponent a la regió contigua al gen

mg218 en direcció 5'. Aquest fragment es va clonar en un plasmidi pBE prèviament digerit amb l'enzim *EcoRV*. Un cop clonat, el fragment de PCR es va alliberar del vector de clonatge utilitzant les dianes de restricció *PstI* i *EcoRI* que incorporen els encebadors. En segon lloc, mitjançant els encebadors BDmg218-5' i BDmg218-5' es va amplificar un fragment de 0,8 kb corresponent a la regió contigua al gen *mg218* en direcció 3'. A l'igual que en el cas anterior, aquest fragment es va clonar en un plasmidi pBE prèviament digerit amb l'enzim *EcoRV* i posteriorment es va alliberar utilitzant les dianes de restricció *BamHI* i *ApaI* que incorporen els encebadors. Separadament, es va digerir el plasmidi MTn*TetM438* amb els enzims *EcoRI* i *BamHI* per tal d'obtenir un fragment de restricció de 2 kb corresponent al marcador de resistència a tetraciclina *tetM438*. Finalment, els tres fragments de restricció obtinguts (1 kb, 0,8 kb i 2 kb) es van clonar de manera conjunta en un plasmidi pBSK que havia estat prèviament digerit amb els enzims *PstI* i *ApaI*.

pETmg200

En primer lloc, es va amplificar per PCR un fragment de 0,6 kb corresponent a l'extrem 5' de l'ORF del gen *mg200*. Durant l'amplificació d'aquest fragment de 0,6 kb amb els encebadors MG200Exp1 i MG200Exp3, el codó TGA que codifica pel Trp189 de la proteïna MG200 va ser substituït pel codó TGG mitjançant mutagènesi dirigida. En segon lloc, es va amplificar per PCR un fragment d'1,2 kb corresponent a l'extrem 3' de l'ORF del gen *mg200*. A l'igual que en el cas anterior, durant l'amplificació d'aquest fragment d'1,2 kb amb els encebadors MG200Exp2 i MG200Exp4, el codó TGA que codifica pel Trp201 de la proteïna MG200 va ser substituït per codó TGG. Aquestes dues mutacions puntuals introduïdes permeten eliminar els dos codons TGA presents a la proteïna MG200 que serien reconeguts com a senyal d'aturada de la traducció a la soca d'*E.coli* utilitzada. Finalment, utilitzant com a motlle els dos fragments de PCR anteriors i els encebadors MG200Exp1 i MG200Exp4, es va amplificar per PCR un fragment d'1,8 kb corresponent a l'ORF sencer del gen *mg200*. El fragment de PCR resultant es va clonar en un plasmidi pBE prèviament digerit amb l'enzim *EcoRV* i posteriorment es va alliberar utilitzant les dianes de restricció *NdeI* i *XhoI* que incorporen els encebadors. Finalment, per obtenir el plasmidi pETmg200, el fragment de restricció resultant es va clonar en un plasmidi pET19b que havia estat prèviament digerit amb els enzims *NdeI* i *XhoI*. Per tal de confirmar la presència de les dues mutacions puntuals introduïdes durant el procés de clonatge i l'absència de mutacions espontànies

addicionals, es va dur a terme la seqüenciació de l'ORF del gen *mg200* després del seu clonatge al plasmidi pBE.

6. Tècniques per a la manipulació de seqüències d'ADN utilitzades en aquest estudi

6.1 Extracció d'ADN plasmídic

Les extraccions d'ADN plasmídic a petita escala o Minipreps s'han dut a terme mitjançant el Kit comercial "Fast Plasmid Miniprep Kit" (Eppendorf), seguint les indicacions del fabricant.

Les extraccions d'ADN plasmídic a mitjana escala o Midipreps s'han dut a terme manualment en base al protocol descrit al "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Sambrook *et al.*, 2001). Per tal de millorar la qualitat de l'extracció però, l'ADN plasmídic no es va precipitar amb etanol absolut si no que es va purificar mitjançant les columnetes del Kit comercial "e.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kit" (Omega).

6.2 Extracció d'ADN genòmic

Per obtenir ADN genòmic de les soques de *M. genitalium* s'ha seguit el següent protocol:

- 1) Iniciem un cultiu de 20 ml de la soca objecte d'estudi.
- 2) Rentem les cèl·lules tres vegades amb PBS.
- 3) Recuperem les cèl·lules del flascó de cultiu en 1 ml de solució I (0,1 M Tris-HCl pH 8,0; 0,5 M NaCl; 10 mM EDTA).
- 4) Afegim 50 µl d'SDS al 20% , agitem suaument i esperem 10 min.
- 5) Afegim proteïnasa K a una concentració final de 50 µg ml⁻¹.
- 6) Incubem la mostra en un bany a 55°C durant 1 h .
- 7) Duem a terme tres tractaments amb fenol-cloroform sense vortexar.
- 8) Després de cada tractament, centrifuguem la mostra a 13000 rpm durant 10 min i recuperem la fase superior pipetejant amb una punta de 100-200 µl retallada.
- 9) Al final del tercer tractament, precipitem l'ADN amb 2,5 volums d'etanol absolut.
- 10) Centrifuguem la mostra a 13000 rpm durant 10 min i retirem el sobrenedant.
- 11) Rentem el *pellet* dues vegades amb 1 ml d'etanol al 70% i centrifuguem la mostra a 13000 rpm durant 10 min després de cada rentat.
- 12) Assequem el *pellet* durant 15 min en una campana de buit.

13) Finalment, afegim 200 µl de TE amb RNasa.

6.3 Quantificació d'ADN

La quantificació de les mostres d'ADN per electroporar s'ha dut a terme mitjançant mètodes espectrofotomètrics utilitzant un aparell Cary 400 Bio i seguint el protocol descrit al “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” (Sambrook *et al.*, 2001). Les mostres d'ADN utilitzades durant els processos de clonatge i altres mostres d'ADN que no eren completament pures es van quantificar mitjançant electroforesi en gel d'agarosa.

6.4 Seqüenciació d'ADN

Les reaccions de seqüenciació van ser dutes a terme mitjançant el Kit comercial “Big Dye 3.0 Terminator Kit” (Applied Biosystems), seguint les indicacions del fabricant. Posteriorment, les mostres van ser analitzades utilitzant un aparell “ABI 3100 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems). Tot el procés va ser dut a terme pel Servei de Seqüenciació d'ADN de la Facultat de Veterinària de la UAB.

6.5 Digestió de seqüències d'ADN

Les digestions de seqüències d'ADN amb enzims de restricció (Roche) s'han dut a terme seguint les indicacions del fabricant per cada enzim.

6.6 Lligació de fragments d'ADN

Les lligacions de fragments d'ADN s'han dut a terme amb la lligasa del bacteriòfag T4 (Roche), seguint les indicacions del fabricant.

6.7 Electroforesi de fragments d'ADN en gels d'agarosa

L'electroforesi de fragments d'ADN en gels d'agarosa (SeaKem[®]), s'ha dut a terme amb material de la casa comercial BioRad (cubetes, pintes, fonts d'alimentació, etc). Les solucions necessàries per dur a terme l'electroforesi (tampó TAE 50x i tampó de mostres d'ADN 10x) s'han preparat segons el protocol descrit al “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” (Sambrook *et al.*, 2001). Per tal d'estimar la mida dels fragments d'ADN al gel d'electroforesi s'ha utilitzat el marcador de pes molecular comercial “1 kb

Plus DNA Ladder” (Invitrogen). Per quantificar mostres d’ADN es va utilitzar el marcador de pes molecular comercial “ λ DNA-*Bst*EII Digest” (NEB). Els gels d’electroforesi resultants s’han visualitzat en un equip de fotografia (BioRad, model Gel Doc 100) amb el software Molecular Analyst 1,5 o en un transil·luminador (Ultra-Violet Products TC-365-A).

6.8 Purificació de fragments d’ADN dels gels d’agarosa

La purificació de fragments d’ADN dels gels d’agarosa s’ha dut a terme mitjançant el kit comercial “e.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kit” (Omega). En general, les purificacions s’han realitzat seguint les indicacions del fabricant. Tot i això, durant la purificació de seqüències d’ADN de *M. genitalium* s’ha omès el pas consistent en escalfar el retall d’agarosa a 55-65°C. Aquest pas disminueix l’eficiència del procés de purificació de seqüències d’ADN riques en AT, com és el cas del genoma de *M. genitalium*.

6.9 Amplificació de fragments d’ADN per PCR

L’amplificació de fragments d’ADN s’ha dut a terme per PCR (Minicycler-MJ research), utilitzant la polimerasa Deep Vent (NEB) amb activitat correctora de proves.

6.10 Marcatge no radioactiu de fragments d’ADN

Els fragments d’ADN es van marcar mitjançant mètodes no radioactius utilitzant l’anàleg de nucleòtids dioxigenina-11-dUTP (Roche). Per dur a terme la reacció de marcatge s’ha utilitzat el kit comercial “DIG DNA Labelling & Detection Nonradioactive Kit” (Roche), seguint les indicacions del fabricant.

6.11 Transferència de tipus Southern

La transferència de tipus Southern és una tècnica d’ús habitual per analitzar la presència d’una seqüència d’ADN determinada en un gel d’agarosa. En aquest treball, l’ADN ha estat transferit per capil·laritat a membranes de niló en condicions alcalines. La transferència i la preparació de les solucions de desnaturalització i neutralització s’han dut a terme segons els protocols descrits al “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” (Sambrook *et al.*, 2001). La incubació de la membrana amb la sonda s’ha realitzat en un forn d’hibridació (Amersham Pharmacia Biotech) a 42°C durant tota la nit. La detecció i la preparació de les solucions d’hibridació i de rentat s’han dut a terme segons el protocol descrit al DIG labelling

manual (Roche). Per a la detecció, s'han utilitzat els compostos cromogènics NTB i BCIP (BioRad), prèvia incubació de la membra amb un anticòs anti-DIG conjugat a fosfatasa alcalina (Roche).

7. Tècniques per a la manipulació de proteïnes utilitzades en aquest estudi

7.1 Extracció de mostres de proteïna total

L'obtenció dels extractes de proteïna total dels bacteris objecte d'estudi es va dur a terme tractant les cèl·lules en PBS amb la solució de lisi corresponent al tampó de mostres de proteïna per PAGE. El tampó de mostres de proteïna per PAGE es va preparar segons les indicacions del "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Sambrook *et al.*, 2001).

7.2 Gels de poliacrilamida (PAGE)

La separació de mostres de proteïna es va dur a terme per SDS-PAGE seguint procediments estàndards. Per visualitzar les proteïnes, aquestes van ser tenyides amb "Coomassie brilliant blue" (Sigma). A cada PAGE es va incloure una mostra de marcador de massa molecular comercial "BenchMark Protein Ladder" (Invitrogen) o "BenchMark Pre-stained Protein Ladder" (Invitrogen).

7.3 Transferència de tipus Western

La transferència de tipus Western és una tècnica d'ús habitual per analitzar la presència d'una proteïna determinada en un PAGE. La transferència i la preparació de les solucions necessàries (transferència, rentats, etc) s'ha dut a terme segons els protocols descrits al "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Sambrook *et al.*, 2001). Per dur a terme la detecció, s'han utilitzat els compostos cromogènics NTB i BCIP (BioRad), prèvia incubació de la membra amb un anticòs secundari conjugat a fosfatasa alcalina (BioRad), seguint les indicacions del fabricant.

Els anticossos primaris que s'han utilitzat en aquest estudi són:

Anti-MG200: Anticòs monoclonal contra la proteïna MG200 obtingut en aquest estudi.

Dilució de treball 1:10000

Anti-MG218: Anticòs monoclonal contra la proteïna MG218 obtingut en aquest estudi.

Dilució de treball 1:500

- Anti-HMW1: Anticòs policlonal contra la proteïna HMW1 de *M. pneumoniae* (Stevens *et al.*, 1991) subministrat pel Dr. Duncan Krause (UGA).
Dilució de treball 1:7000
- Anti-HMW3: Anticòs policlonal contra la proteïna HMW3 de *M. pneumoniae* (Stevens *et al.*, 1992) subministrat pel Dr. Duncan Krause (UGA).
Dilució de treball 1:5000
- Anti-P41: Anticòs policlonal contra la proteïna P41 de *M. pneumoniae* (Krause *et al.*, 1997) subministrat pel Dr. Duncan Krause (UGA).
Dilució de treball 1:500
- Anti-P140: Anticòs monoclonal contra la proteïna P140 (Morrison-Plummer *et al.*, 1987) subministrat pel Dr. Joel Baseman (UTHSCSA).
Dilució de treball 1:1000
- Anti-P110: Anticòs policlonal contra la proteïna P110 (Dhandayuthapani *et al.*, 1999) subministrat pel Dr. Joel Baseman (UTHSCSA).
Dilució de treball 1:1000

8. Identificació de proteïnes per espectrometria de masses

Les bandes d'interès es van retallar dels PAGEs corresponents tenyits amb Coomassie. A continuació, els retalls van ser destenyir i es van digerir amb tripsina utilitzant el Kit comercial "In-Gel Digest_{ZP} Kit" (Millipore) i seguint les indicacions del fabricant. Posteriorment, es va barrejar un microlitre de cada mostra amb el mateix volum d'una solució d'àcid α -cian-4-hidroxi-trans-cinnàmic (0,3 mg ml⁻¹ en etanol:acetona 6:3). Les mostres resultants es van aplicar sobre una placa de MALDI AnchorChip de 600 μ m (Bruker) i es van deixar assecat a temperatura ambient. L'espectre de masses es va obtenir utilitzant un aparell de MALDI-TOF Ultraflex (Bruker). L'anàlisi de l'empremta peptídica es va dur a terme utilitzant el programa MASCOT (Matrix Science). Només es van acceptar les identificacions positives amb un puntuació superior a 68. Per a les identificacions positives amb una puntuació superior a 68 el valor de P és inferior a 0,05, on P és la probabilitat que la identificació tingui lloc per atzar (Perkins *et al.*, 1999).

Mitjançant el procediment descrit anteriorment, es van identificar les bandes dels gels d'SDS-PAGE corresponents a les següents proteïnes:

MG200: La identificació del MASCOT tenia una puntuació de 190 i els pèptids identificats cobrien una regió corresponent al 43% de la seqüència de la proteïna.

MG386: La identificació del MASCOT tenia puntuació de 229 i els pèptids identificats cobrien una regió corresponent al 28% de la seqüència de la proteïna.

MG317: La identificació del MASCOT tenia una puntuació de 136 i els pèptids identificats cobrien una regió corresponent al 39% de la seqüència de la proteïna.

9. Expressió de la proteïna MG200 a *E. coli*

Per dur a terme l'expressió de la proteïna MG200, es van obtenir colònies individuals de cèl·lules de BL21(DE3) portadores del plasmidi pETmg200. Posteriorment, es va iniciar un cultiu de 10 ml a 37°C a partir d'una colònia aïllada controlant que l' A_{600} no fos superior a 1 unitat. A continuació, 5 ml del cultiu anterior van ser utilitzats per inocular un cultiu de 500 ml que va ser incubat a 37°C. Quan l' A_{600} va arribar a 0,55 unitats, es va posar el cultiu en gel picat durant 15 min i es va dur a terme la inducció afegint IPTG (concentració final 0,1 mM). Un cop induït, el cultiu va ser incubat a 16°C durant tota la nit; aquestes condicions de cultiu permeten augmentar la quantitat de proteïna MG200 present a la fracció soluble quan es lisen les cèl·lules són. Al matí següent, les cèl·lules es van centrifugar a 5000 x g durant 15 min a 4°C i van afegir 5 ml de tampó d'unió (5 mM imidazol; 500 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 7,9) fins aconseguir una suspensió cel·lular homogènia. Després d'afegir l'inhibidor de proteases PMSF (1 mM concentració final) i DNasa I (20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ concentració final), les cèl·lules van ser lisades per sonicació (3x2 min a 32 W). La mostra va ser centrifugada a 39000 x g durant 25 min a 4°C i el sobrenedant va ser passat per un filtre de baixa retenció de proteïnes amb porus de 0,22 μm (Millipore). La proteïna recombinat es va purificar mitjançant una columna d'afinitat de níquel, utilitzant un cromatògraf Äkta prime (Amersham Pharmacia Biotech) i seguint el protocol descrit al manual del pET (Novagen). Al final del procés, una mostra de la fracció recuperada de la columna d'afinitat corresponent al pic d'elució, va ser analitzada per SDS-PAGE. Es va observar una banda majoritària de 87 kDa corresponent a la proteïna MG200 sencera i algunes bandes addicionals corresponents a fragments de degradació.

10. Obtenció d'anticossos monoclonals contra les proteïnes MG200 i MG218

Els anticossos monoclonals contra la proteïna MG200 es van obtenir immunitzant un ratolí BALB/c amb 4 punxades intraperitoneals amb 50 µg de proteïna MG200 purificada. Prèviament, la proteïna MG200 resuperada de la columna d'afinitat va ser dialitzada per tal de substituir el tampó d'elució (1 M imidazol; 0,5 M NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 7,9) pel tampó fosfat PBS. Per altra banda, els anticossos monoclonals contra la proteïna MG218 es van obtenir immunitzant un ratolí BALB/c amb 4 punxades intraperitoneals d'una mostra de proteïna resultant del tractament de cèl·lules de *M. genitalium* (~10⁹) amb 3 ml d'una solució de Tritó X-100 al 0,1% en PBS estèril, seguint també el procediment estàndard. Prèviament, una alíquota de la mostra de proteïna obtinguda després del tractament amb Tritó X-100 va ser plaquejada en medi SP-4 sòlid per descartar la presència de cèl·lules viables. En ambdós casos, la fusió dels esplenòcits, l'anàlisi dels híbridomes i la producció dels anticossos monoclonals es va dur a terme segons el protocol descrit a "Antibodies: a Laboratory Manual" (Harlow *et al.*, 1998).

11. Aïllament de mutants deficients en motilitat de *M. genitalium*

Els mutants deficients en motilitat de *M. genitalium* es van generar mitjançant el minitransposó MTnTetM438 al genoma. Per fer això, les cèl·lules van ser electroporades en presència del plasmidi pMTnTetM438, incubades durant 2 h a 37°C i recuperades en 37,5 ml de medi SP-4 líquid. Posteriorment, les cèl·lules es van dispensar en 50 plaques de cultiu cel·lular en volums de 750 µl (~250 cfus) i es van deixar adsorbir durant 2 h. Passat aquest temps, es va retirar el medi SP-4 amb les cèl·lules no absorbides i es va afegir medi SP-4 amb agarosa de baix punt de fusió al 0,5% suplementat amb tetraciclina. Les plaques es van incubar a 37°C en una atmosfera de CO₂ al 5% en posició **no** invertida. Després de dotze dies d'incubació, les colònies amb una morfologia compacte es van recuperar del medi semisòlid mitjançant un escuradent i es van propagar en 200 µl de medi SP-4 líquid suplementat amb tetraciclina en plaques de cultiu cel·lular de 96 pous. Un cop crescudes al pou, les cèl·lules es van transferir en un flascó de cultiu de 25 cm² amb 5 ml de medi SP-4 líquid suplementat amb tetraciclina. Per tal de forçar l'aïllament de soques sense deficiències d'adhesió, les cèl·lules es renten repetides vegades amb PBS a la placa de cultiu cel·lular abans d'afegir el medi SP-4 semisòlid.

12. Complementació dels mutants deficients en motilitat *mg200⁻* i *mg386⁻*

Les cèl·lules dels clons 1 i 5 dels mutants *mg386⁻* van ser electroporades en presència del plasmidi *pMTnmg386Gm*, mentre que les cèl·lules del clon 12 dels mutants *mg200⁻* van ser electroporades en presència del plasmidi *pMTnmg200Gm*. Les cèl·lules d'aquests mateixos mutants també van ser electroporades en presència del plasmidi *pMTnGm* per tal de determinar la taxa de reversió del fenotip deficient en motilitat com a conseqüència de la remobilització del transposó original present al genoma d'aquest mutants. Aquest fet pot tenir lloc com a resultat de l'expressió transitòria de la transposasa present al plasmidi *pMTnGm* o els seus plasmidis derivats *pMTnmg386Gm* i *pMTnmg200Gm*. Després de dues hores d'incubació a 37°C, les cèl·lules electroporades es van passar per filtres de baixa retenció de proteïnes amb porus de 0,45 µm (Millipore) per minimitzar la presència d'agregats cel·lulars. Posteriorment, diferents dilucions de la suspensió cel·lular resultant van ser cultivades en medi SP-4 semisòlid suplementat amb gentamicina, seguint el protocol descrit anteriorment. Pràcticament totes les colònies resistents a gentamicina observades presentaven una morfologia dispersa. Amb l'ajut d'un escuradents, es van recuperar algunes colònies que posteriorment van ser propagades i analitzades seguint el protocol descrit anteriorment.

13. Estudis microcinematogràfics

Per dur a terme els estudis microcinematogràfics, es van iniciar diversos cultius amb diferents dilucions de les soques objecte d'estudi en plaques de cultiu cel·lular. Després de 16 h d'incubació, es va retirar el medi, es van afegir unes gotes de medi fresc sobre les cèl·lules adherides i es va col·locar un cubreobjectes. El moviment de les cèl·lules es va analitzar a 37°C en un microscopi Axioplan (Zeiss) i les imatges van ser capturades a intervals de 2 s durant 2-5 min amb una càmera digital Hamamatsu ORCA-ER CCD controlada pel programa Aquacosmos.

Obtenció de les dades de motilitat

Per determinar el percentatge de cèl·lules mòbils, es va analitzar la capacitat de desplaçament de 300-700 cèl·lules aïllades de cada soca objecte d'estudi. La velocitat de desplaçament de les cèl·lules es va calcular mesurant la distància recorreguda durant 2 min per 25 cèl·lules aïllades, escollides a l'atzar entre 8 microcinematografies diferents. Per obtenir dades comparables entre diferents soques, només es van considerar les preparacions que contenien un nombre similar de cèl·lules. S'ha de tenir present que el

terme “mitjana de les velocitats” utilitzat en aquest estudi fa referència al valor obtingut després de promitjar les velocitats de 25 cèl·lules independents. No s’ha de confondre aquest terme amb el que habitualment es coneix com a “velocitat mitjana”, que fa referència a un valor promig de les diferents velocitats que exhibeix una partícula mòbil durant un període de temps determinat.

14. Assaigs d’hemadsorció

14.1 Qualitativa

Per dur a terme l’assaig d’hemadsorció qualitativa, es van passar per un filtre de baixa retenció de proteïnes amb porus de 0,45 µm (Millipore) diferents dilucions de les cèl·lules objecte d’estudi i es van cultivar en plaques de medi sòlid d’SP-4. Quan les colònies eren visibles (8-10 dies), es van afegir 2 ml d’una suspensió cel·lular d’eritròcits humans diluïts en PBS estèril 1:50 i es van incubar durant 1 h a 37°C sense agitació. Passat aquest temps, es van dur a terme tres rentats amb PBS per eliminar els eritròcits que no estaven adherits a les colònies i aquestes van ser observades en una lupa estereoscòpica (LeicaMZFLIII). Les imatges es van prendre mitjançant una càmera digital LeicaDC500 connectada a la lupa.

14.2 Quantitativa

Per dur a terme l’assaig d’hemadsorció quantitativa, alíquotes de 25 µl de les diferents soques objecte d’estudi es van barrejar amb 475 µl d’eritròcits humans diluïts en PBS estèril (1:50). La barreja es va incubar a 37°C durant 2 h, mantenint una agitació suau. Els eritròcits i els micoplasmes adherits es van centrifugar a 300 x g durant 2 min. Posteriorment, es van cultivar en medi SP-4 sòlid diferents dilucions del sobrenedant per tal d’estimar la concentració de micoplasmes que no s’havien adherit als eritròcits. Paral·lelament, abans de la incubació dels micoplasmes amb els eritròcits, també es van cultivar en medi SP-4 sòlid diferents dilucions de les mateixes alíquotes de 25 µl utilitzades en aquest assaig, per tal d’estimar la concentració inicial de micoplasmes. El valor d’hemadsorció que es presenta en aquest estudi deriva de les dades obtingudes en dos experiments independents. En cada experiment, es van combinar les dades de dos clons diferents del mateix tipus de mutant.

15. Microscòpia electrònica de transmissió

Per dur a terme l'anàlisi dels mutants per microscòpia electrònica de transmissió, es van realitzar cultius de 20 ml de les soques d'interès en flascons de cultiu cel·lular de 75 cm², es van recuperar les cèl·lules i es van centrifugar a 12000 rpm durant 15 min. Posteriorment, les cèl·lules es van rentar amb PBS i es van fixar amb una solució de glutaraldehyd al 2.5% (v/v) i paraformaldehyd 2% (v/v) en PBS (pH 7,4) durant 2 h. A continuació, les cèl·lules es van rentar amb PBS i es van incubar en una solució amb OsO₄ a l'1% (p/v) i K₃Fe(CN)₆ al 0,8% (p/v). Un cop rentades, les cèl·lules es van deshidratar en etanol i es van infiltrar en Spurr, que es va deixar polimeritzar a 60°C durant 48 h. Els talls semifins de la reina amb les cèl·lules es van muntar en reixetes de coure, es van contrastar amb acetat d'uranil i citrat de plom, i es van observar en un microscopi electrònic de transmissió Hitachi H-7000 a 75KV.

Mesura de la longitud dels eixos electrodensos

La longitud dels eixos electrodensos es va calcular utilitzant el programa de processament d'imatges "Scion Image" analitzant un total de 17-25 cèl·lules de diferents micrografies.

16. Microscòpia electrònica de rastreig

Per dur a terme l'anàlisi dels mutants per microscòpia electrònica de transmissió, es van realitzar cultius de 2 ml de les soques d'interès en cambres de cultiu cel·lular de permanox (Nunc). A les 16 h, es va retirar el medi de cultiu, es van rentar les cèl·lules amb PBS i es van fixar amb una solució de glutaraldehyd a l'1% en PBS durant 1 h. Posteriorment, les cèl·lules es van rentar amb PBS i es van deshidratar submergint-les de manera seqüencial en etanol al 25, 50, 75 i 100% durant un període de 10 min per cada solució. Immediatament, les mostres es van assecar mitjançant un punt crític (K850 Critical point drier) i es van metal·litzar amb or. Finalment, les preparacions es van observar en un microscopi electrònic de rastreig Hitachi S-570.

Obtenció de les dades del nombre d'organel·les terminals per cèl·lula

Per determinar el percentatge de cèl·lules amb un determinat nombre o distribució de les organel·les terminals, es van analitzar 250 cèl·lules individuals de cada soca objecte d'estudi.

VIII - CONCLUSIONS

1. La morfologia de les colònies desenvolupades per cèl·lules de *M. genitalium* prèviament adherides a la superfície d'una placa de cultiu cel·lular i recobertes amb medi SP-4 semisòlid, permet demostrar la capacitat de desplaçament d'aquestes cèl·lules. Aquest sistema de cultiu permet la identificació i l'aïllament de mutants de *M. genitalium* deficients en motilitat.
2. La interrupció dels gens *mg200* i *mg386* de *M. genitalium* amb el transposó MTn*TetM438* dona lloc a deficiències de motilitat que no semblen associades ni a deficiències d'adhesió, ni a canvis en la ultraestructura de l'organel·la teminal. Les proteïnes MG200 i MG386 formen part de la maquinària de motilitat d'aquest microorganisme.
3. Les seqüències d'aminoàcids de les proteïnes MG200 i MG386 presenten característiques comunes com ara la presència de dominis APR i de caixes EAGR. Els dominis EAGR són exclusius de les proteïnes de motilitat de *M. genitalium* i de les respectives proteïnes homòlogues de *M. pneumoniae* i *M. gallisepticum*.
4. La interrupció dels gens *mg218* i *mg317* de *M. genitalium* amb el transposó MTn*TetM438* dona lloc a deficiències de motilitat i d'adhesió, associades a canvis en la ultraestructura de l'organel·la teminal. Les proteïnes MG218 i MG317 estan implicades en l'organització de l'organel·la terminal d'aquest microorganisme.
5. La proteïna MG218 és essencial per al desenvolupament de l'organel·la terminal i a més és un dels components majoritaris de l'eix electrodens de *M. genitalium*. La proteïna MG218 determina la longitud de l'eix electrodens de *M. genitalium*.

6. La proteïna MG317 no sembla essencial per al desenvolupament de l'eix electrodens, però sí és necessària per a la formació del botó terminal de *M. genitalium*. El botó terminal constitueix un punt d'ancoratge important de l'eix electrodens a la membrana plasmàtica.

7. Les cèl·lules de la soca salvatge de *M. genitalium* disposen d'un mecanisme de control que impedeix que l'organel·la terminal es dupliqui dues vegades abans de la citocinesi. La proteïna P110 forma part d'aquest sistema de control temporal de la formació d'organel·les terminals noves.

8. El procés de migració de les organel·les terminal noves s'allarga a les soques de *M. genitalium* amb deficiències de motilitat. Aquest fet indica que la motilitat està implicada en la segregació de les organel·les terminals en aquest microorganisme.

IX - BIBLIOGRAFIA

- Adan-Kubo, J., A. Uenoyama, T. Arata & M. Miyata, (2006) Morphology of isolated Gli349, a leg protein responsible for *Mycoplasma mobile* gliding via glass binding, revealed by rotary shadowing electron microscopy. *J Bacteriol* **188**: 2821-2828.
- Akhmedov, A. T., B. Gross & R. Jessberger, (1999) Mammalian SMC3 C-terminal and coiled-coil protein domains specifically bind palindromic DNA, do not block DNA ends, and prevent DNA bending. *J Biol Chem* **274**: 38216-38224.
- Alvarez, R. A., M. W. Blaylock & J. B. Baseman, (2003) Surface localized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Mycoplasma genitalium* binds mucin. *Mol Microbiol* **48**: 1417-1425.
- Balish, M. F., T. W. Hahn, P. L. Popham & D. C. Krause, (2001) Stability of *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence-accessory protein HMW1 correlates with its association with the triton shell. *J Bacteriol* **183**: 3680-3688.
- Balish, M. F., S. M. Ross, M. Fisseha & D. C. Krause, (2003a) Deletion analysis identifies key functional domains of the cytoadherence-associated protein HMW2 of *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol* **50**: 1507-1516.
- Balish, M. F., R. T. Santurri, A. M. Ricci, K. K. Lee & D. C. Krause, (2003b) Localization of *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence-associated protein HMW2 by fusion with green fluorescent protein: implications for attachment organelle structure. *Mol Microbiol* **47**: 49-60.
- Baseman, J. B., M. Banai & I. Kahane, (1982a) Sialic acid residues mediate *Mycoplasma pneumoniae* attachment to human and sheep erythrocytes. *Infect Immun* **38**: 389-391.
- Baseman, J. B., R. M. Cole, D. C. Krause & D. K. Leith, (1982b) Molecular basis for cytoadsorption of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* **151**: 1514-1522.
- Baseman, J. B., M. Lange, N. L. Criscimagna, J. A. Giron & C. A. Thomas, (1995) Interplay between mycoplasmas and host target cells. *Microb Pathog* **19**: 105-116.
- Baseman, J. B. & J. G. Tully, (1997) Mycoplasmas: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. *Emerg Infect Dis* **3**: 21-32.
- Beck, B. D., P. G. Arcott & A. Jacobson, (1978) Novel properties of bacterial elongation factor Tu. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 1250-1254.
- Bhugra, B., L. L. Voelker, N. Zou, H. Yu & K. Dybvig, (1995) Mechanism of antigenic variation in *Mycoplasma pulmonis*: interwoven, site-specific DNA inversions. *Mol Microbiol* **18**: 703-714.
- Blaylock, M. W., O. Musatovova, J. G. Baseman & J. B. Baseman, (2004) Determination of infectious load of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples of human vaginal cells. *J Clin Microbiol* **42**: 746-752.
- Bredt, W., (1968) Motility and multiplication of *Mycoplasma pneumoniae*. A phase contrast study. *Pathol Microbiol (Basel)* **32**: 321-326.
- Burgos, R., O. Q. Pich, M. Ferrer-Navarro, J. B. Baseman, E. Querol & J. Pinol, (2006) *Mycoplasma genitalium* P140 and P110 cytoadhesins are reciprocally stabilized and required for cell adhesion and terminal-organelle development. *J Bacteriol* **188**: 8627-8637.
- Burgos, R., O. Q. Pich, E. Querol & J. Pinol, (2007) Functional analysis of the *Mycoplasma genitalium* MG312 protein reveals a specific requirement of the MG312 N-terminal domain for gliding motility. *J Bacteriol* **189**: 7014-7023.
- Calisto, B. M., O. Q. Pich, J. Pinol, I. Fita, E. Querol & X. Carpena, (2005) Crystal structure of a putative type I restriction-modification S subunit from *Mycoplasma genitalium*. *J Mol Biol* **351**: 749-762.

- Catrein, I., R. Herrmann, A. Bosserhoff & T. Ruppert, (2005) Experimental proof for a signal peptidase I like activity in *Mycoplasma pneumoniae*, but absence of a gene encoding a conserved bacterial type I SPase. *FEBS J* **272**: 2892-2900.
- Cordova, C. M., C. Lartigue, P. Sirand-Pugnet, J. Renaudin, R. A. Cunha & A. Blanchard, (2002) Identification of the origin of replication of the *Mycoplasma pulmonis* chromosome and its use in oriC replicative plasmids. *J Bacteriol* **184**: 5426-5435.
- Cordwell, S. J., D. J. Basseal, J. D. Pollack & I. Humphery-Smith, (1997) Malate/lactate dehydrogenase in mollicutes: evidence for a multienzyme protein. *Gene* **195**: 113-120.
- Chambaud, I., R. Heilig, S. Ferris, V. Barbe, D. Samson, F. Galisson, I. Moszer, K. Dybvig, H. Wroblewski, A. Viari, E. P. Rocha & A. Blanchard, (2001) The complete genome sequence of the murine respiratory pathogen *Mycoplasma pulmonis*. *Nucleic Acids Res* **29**: 2145-2153.
- Dallo, S. F. & J. B. Baseman, (2000) Intracellular DNA replication and long-term survival of pathogenic mycoplasmas. *Microb Pathog* **29**: 301-309.
- Dallo, S. F., J. R. Horton, C. J. Su & J. B. Baseman, (1989) Homologous regions shared by adhesin genes of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *Microb Pathog* **6**: 69-73.
- Dallo, S. F., T. R. Kannan, M. W. Blaylock & J. B. Baseman, (2002) Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol* **46**: 1041-1051.
- Dandekar, T., M. Huynen, J. T. Regula, B. Ueberle, C. U. Zimmermann, M. A. Andrade, T. Doerks, L. Sanchez-Pulido, B. Snel, M. Suyama, Y. P. Yuan, R. Herrmann & P. Bork, (2000) Re-annotating the *Mycoplasma pneumoniae* genome sequence: adding value, function and reading frames. *Nucleic Acids Res* **28**: 3278-3288.
- Deguchi, T. & S. Maeda, (2002) *Mycoplasma genitalium*: another important pathogen of nongonococcal urethritis. *J Urol* **167**: 1210-1217.
- Denison, A. M., B. Clapper & K. Dybvig, (2005) Avoidance of the host immune system through phase variation in *Mycoplasma pulmonis*. *Infect Immun* **73**: 2033-2039.
- Dhandayuthapani, S., M. W. Blaylock, C. M. Bebear, W. G. Rasmussen & J. B. Baseman, (2001) Peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a virulence determinant in *Mycoplasma genitalium*. *J Bacteriol* **183**: 5645-5650.
- Dhandayuthapani, S., W. G. Rasmussen & J. B. Baseman, (1999) Disruption of gene mg218 of *Mycoplasma genitalium* through homologous recombination leads to an adherence-deficient phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 5227-5232.
- Dirksen, L. B., T. Proft, H. Hilbert, H. Plagens, R. Herrmann & D. C. Krause, (1996) Sequence analysis and characterization of the hmw gene cluster of *Mycoplasma pneumoniae*. *Gene* **171**: 19-25.
- Drasbek, M., G. Christiansen, K. R. Drasbek, A. Holm & S. Birkelund, (2007) Interaction between the P1 protein of *Mycoplasma pneumoniae* and receptors on HEp-2 cells. *Microbiology* **153**: 3791-3799.
- Draskovic, I. & D. Dubnau, (2005) Biogenesis of a putative channel protein, ComEC, required for DNA uptake: membrane topology, oligomerization and formation of disulphide bonds. *Mol Microbiol* **55**: 881-896.
- Dybvig, K., Z. Cao, C. T. French & H. Yu, (2007) Evidence for type III restriction and modification systems in *Mycoplasma pulmonis*. *J Bacteriol* **189**: 2197-2202.
- Dybvig, K. & G. H. Cassell, (1987) Transposition of gram-positive transposon Tn916 in *Acholeplasma laidlawii* and *Mycoplasma pulmonis*. *Science* **235**: 1392-1394.

- Dybvig, K., C. T. French & L. L. Voelker, (2000) Construction and use of derivatives of transposon Tn4001 that function in *Mycoplasma pulmonis* and *Mycoplasma arthritidis*. *J Bacteriol* **182**: 4343-4347.
- Dybvig, K., R. Sitaraman & C. T. French, (1998) A family of phase-variable restriction enzymes with differing specificities generated by high-frequency gene rearrangements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13923-13928.
- Dybvig, K. & L. L. Voelker, (1996) Molecular biology of mycoplasmas. *Annu Rev Microbiol* **50**: 25-57.
- Erickson, H. P., D. W. Taylor, K. A. Taylor & D. Bramhill, (1996) Bacterial cell division protein FtsZ assembles into protofilament sheets and minirings, structural homologs of tubulin polymers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 519-523.
- Flaherty, K. M., D. B. McKay, W. Kabsch & K. C. Holmes, (1991) Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 5041-5045.
- Franke, A. E. & D. B. Clewell, (1981) Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of "conjugal" transfer in the absence of a conjugative plasmid. *J Bacteriol* **145**: 494-502.
- Fraser, C. M., J. D. Gocayne, O. White, M. D. Adams, R. A. Clayton, R. D. Fleischmann, C. J. Bult, A. R. Kerlavage, G. Sutton, J. M. Kelley, R. D. Fritchman, J. F. Weidman, K. V. Small, M. Sandusky, J. Fuhrmann, D. Nguyen, T. R. Utterback, D. M. Saudek, C. A. Phillips, J. M. Merrick, J. F. Tomb, B. A. Dougherty, K. F. Bott, P. C. Hu, T. S. Lucier, S. N. Peterson, H. O. Smith, C. A. Hutchison, 3rd & J. C. Venter, (1995) The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**: 397-403.
- Freundt, E. A., (1969) Cellular morphology and mode of replication of the mycoplasmas. In: *The Mycoplasmatales and the L-phase of bacteria*. L. Hayflick (ed). New York: Appleton-Century-Crofts.
- Giron, J. A., M. Lange & J. B. Baseman, (1996) Adherence, fibronectin binding, and induction of cytoskeleton reorganization in cultured human cells by *Mycoplasma penetrans*. *Infect Immun* **64**: 197-208.
- Glass, J. I., N. Assad-Garcia, N. Alperovich, S. Yooseph, M. R. Lewis, M. Maruf, C. A. Hutchison, 3rd, H. O. Smith & J. C. Venter, (2006) Essential genes of a minimal bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 425-430.
- Gobel, U., V. Speth & W. Brecht, (1981) Filamentous structures in adherent *Mycoplasma pneumoniae* cells treated with nonionic detergents. *J Cell Biol* **91**: 537-543.
- Gray, T. E., K. Guzman, C. W. Davis, L. H. Abdullah & P. Nettlesheim, (1996) Mucociliary differentiation of serially passaged normal human tracheobronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **14**: 104-112.
- Gumulak-Smith, J., A. Teachman, A. H. Tu, J. W. Simecka, J. R. Lindsey & K. Dybvig, (2001) Variations in the surface proteins and restriction enzyme systems of *Mycoplasma pulmonis* in the respiratory tract of infected rats. *Mol Microbiol* **40**: 1037-1044.
- Hahn, T. W., M. J. Willby & D. C. Krause, (1998) HMW1 is required for cytoadhesin P1 trafficking to the attachment organelle in *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* **180**: 1270-1276.
- Harlow, E. & D. Lane, (1998) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York.
- Hasselbring, B. M., J. L. Jordan & D. C. Krause, (2005) Mutant analysis reveals a specific requirement for protein P30 in *Mycoplasma pneumoniae* gliding motility. *J Bacteriol* **187**: 6281-6289.

- Hasselbring, B. M., J. L. Jordan, R. W. Krause & D. C. Krause, (2006a) Terminal organelle development in the cell wall-less bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 16478-16483.
- Hasselbring, B. M. & D. C. Krause, (2007) Cytoskeletal protein P41 is required to anchor the terminal organelle of the wall-less prokaryote *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol* **63**: 44-53.
- Hasselbring, B. M., C. A. Page, E. S. Sheppard & D. C. Krause, (2006b) Transposon mutagenesis identifies genes associated with *Mycoplasma pneumoniae* gliding motility. *J Bacteriol* **188**: 6335-6345.
- Hatchel, J. M., R. S. Balish, M. L. Duley & M. F. Balish, (2006) Ultrastructure and gliding motility of *Mycoplasma amphoriforme*, a possible human respiratory pathogen. *Microbiology* **152**: 2181-2189.
- Hedreyda, C. T. & D. C. Krause, (1995) Identification of a possible cytoadherence regulatory locus in *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Immun* **63**: 3479-3483.
- Hegermann, J., R. Herrmann & F. Mayer, (2002) Cytoskeletal elements in the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Naturwissenschaften* **89**: 453-458.
- Henderson, G. P. & G. J. Jensen, (2006) Three-dimensional structure of *Mycoplasma pneumoniae*'s attachment organelle and a model for its role in gliding motility. *Mol Microbiol* **60**: 376-385.
- Hennessy, F., M. E. Cheetham, H. W. Dirr & G. L. Blatch, (2000) Analysis of the levels of conservation of the J domain among the various types of DnaJ-like proteins. *Cell Stress Chaperones* **5**: 347-358.
- Himmelreich, R., H. Plagens, H. Hilbert, B. Reiner & R. Herrmann, (1997) Comparative analysis of the genomes of the bacteria *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *Nucleic Acids Res* **25**: 701-712.
- Hodinka, R. L. & P. B. Wyrick, (1986) Ultrastructural study of mode of entry of *Chlamydia psittaci* into L-929 cells. *Infect Immun* **54**: 855-863.
- Holt, M. R. & A. Koffer, (2001) Cell motility: proline-rich proteins promote protrusions. *Trends Cell Biol* **11**: 38-46.
- Hulo, N., A. Bairoch, V. Bulliard, L. Cerutti, E. De Castro, P. S. Langendijk-Genevaux, M. Pagni & C. J. Sigrist, (2006) The PROSITE database. *Nucleic Acids Res* **34**: D227-230.
- Hutchison, C. A., S. N. Peterson, S. R. Gill, R. T. Cline, O. White, C. M. Fraser, H. O. Smith & J. C. Venter, (1999) Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome. *Science* **286**: 2165-2169.
- Itoh, T., H. Matsuda & H. Mori, (1999) Phylogenetic analysis of the third hsp70 homolog in *Escherichia coli*; a novel member of the Hsc66 subfamily and its possible co-chaperone. *DNA Res* **6**: 299-305.
- Iverson-Cabral, S. L., S. G. Astete, C. R. Cohen, E. P. Rocha & P. A. Totten, (2006) Intrastrain heterogeneity of the *mgpB* gene in *Mycoplasma genitalium* is extensive in vitro and in vivo and suggests that variation is generated via recombination with repetitive chromosomal sequences. *Infect Immun* **74**: 3715-3726.
- Iverson-Cabral, S. L., S. G. Astete, C. R. Cohen & P. A. Totten, (2007) *mgpB* and *mgpC* sequence diversity in *Mycoplasma genitalium* is generated by segmental reciprocal recombination with repetitive chromosomal sequences. *Mol Microbiol* **66**: 55-73.
- Jaffe, J. D., M. Miyata & H. C. Berg, (2004a) Energetics of gliding motility in *Mycoplasma mobile*. *J Bacteriol* **186**: 4254-4261.

- Jaffe, J. D., N. Stange-Thomann, C. Smith, D. DeCaprio, S. Fisher, J. Butler, S. Calvo, T. Elkins, M. G. FitzGerald, N. Hafez, C. D. Kodira, J. Major, S. Wang, J. Wilkinson, R. Nicol, C. Nusbaum, B. Birren, H. C. Berg & G. M. Church, (2004b) The complete genome and proteome of *Mycoplasma mobile*. *Genome Res* **14**: 1447-1461.
- Janis, C., C. Lartigue, J. Frey, H. Wroblewski, F. Thiaucourt, A. Blanchard & P. Sirand-Pugnet, (2005) Versatile use of oriC plasmids for functional genomics of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 2888-2893.
- Jenkins, C., S. J. Geary, M. Gladd & S. P. Djordjevic, (2007) The *Mycoplasma gallisepticum* OsmC-like protein MG1142 resides on the cell surface and binds heparin. *Microbiology* **153**: 1455-1463.
- Jordan, J. L., H. Y. Chang, M. F. Balish, L. S. Holt, S. R. Bose, B. M. Hasselbring, R. H. Waldo, 3rd, T. M. Krunkosky & D. C. Krause, (2007) Protein P200 is dispensable for *Mycoplasma pneumoniae* hemadsorption but not gliding motility or colonization of differentiated bronchial epithelium. *Infect Immun* **75**: 518-522.
- Kannan, T. R. & J. B. Baseman, (2000) Hemolytic and hemoxidative activities in *Mycoplasma penetrans*. *Infect Immun* **68**: 6419-6422.
- Kannan, T. R. & J. B. Baseman, (2006) ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin of *Mycoplasma pneumoniae* represents unique virulence determinant among bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 6724-6729.
- Kay, B. K., M. P. Williamson & M. Sudol, (2000) The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J* **14**: 231-241.
- Keane, F. E., B. J. Thomas, C. B. Gilroy, A. Renton & D. Taylor-Robinson, (2000) The association of *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium* with non-gonococcal urethritis: observations on heterosexual men and their female partners. *Int J STD AIDS* **11**: 435-439.
- Kenri, T., S. Seto, A. Horino, Y. Sasaki, T. Sasaki & M. Miyata, (2004) Use of fluorescent-protein tagging to determine the subcellular localization of *mycoplasma pneumoniae* proteins encoded by the cytoadherence regulatory locus. *J Bacteriol* **186**: 6944-6955.
- King, K. W. & K. Dybvig, (1992) Nucleotide sequence of *Mycoplasma mycoides* subspecies *Mycoides* plasmid pKMK1. *Plasmid* **28**: 86-91.
- Krause, D. C., (1996) *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence: unravelling the tie that binds. *Mol Microbiol* **20**: 247-253.
- Krause, D. C., (1998) *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence: organization and assembly of the attachment organelle. *Trends Microbiol* **6**: 15-18.
- Krause, D. C. & M. F. Balish, (2004) Cellular engineering in a minimal microbe: structure and assembly of the terminal organelle of *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol* **51**: 917-924.
- Krause, D. C., T. Proft, C. T. Hedreyda, H. Hilbert, H. Plagens & R. Herrmann, (1997) Transposon mutagenesis reinforces the correlation between *Mycoplasma pneumoniae* cytoskeletal protein HMW2 and cytoadherence. *J Bacteriol* **179**: 2668-2677.
- Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne & E. L. Sonnhammer, (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* **305**: 567-580.
- Lartigue, C., A. Blanchard, J. Renaudin, F. Thiaucourt & P. Sirand-Pugnet, (2003) Host specificity of mollicutes oriC plasmids: functional analysis of replication origin. *Nucleic Acids Res* **31**: 6610-6618.

- Lartigue, C., J. I. Glass, N. Alperovich, R. Pieper, P. P. Parmar, C. A. Hutchison, 3rd, H. O. Smith & J. C. Venter, (2007) Genome transplantation in bacteria: changing one species to another. *Science* **317**: 632-638.
- Layh-Schmitt, G. & R. Herrmann, (1992) Localization and biochemical characterization of the ORF6 gene product of the *Mycoplasma pneumoniae* P1 operon. *Infect Immun* **60**: 2906-2913.
- Locht, C. & R. Antoine, (1995) A proposed mechanism of ADP-ribosylation catalyzed by the pertussis toxin S1 subunit. *Biochimie* **77**: 333-340.
- Lowe, J., (1998) Crystal structure determination of FtsZ from *Methanococcus jannaschii*. *J Struct Biol* **124**: 235-243.
- Lyon, B. R., J. W. May & R. A. Skurray, (1984) Tn4001: a gentamicin and kanamycin resistance transposon in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet* **193**: 554-556.
- Lluch-Senar, M., M. Vallmitjana, E. Querol & J. Pinol, (2007) A new promoterless reporter vector reveals antisense transcription in *Mycoplasma genitalium*. *Microbiology* **153**: 2743-2752.
- Ma, L., J. S. Jensen, L. Myers, J. Burnett, M. Welch, Q. Jia & D. H. Martin, (2007) *Mycoplasma genitalium*: an efficient strategy to generate genetic variation from a minimal genome. *Mol Microbiol* **66**: 220-236.
- Mahairas, G. G. & F. C. Minion, (1989) Random insertion of the gentamicin resistance transposon Tn4001 in *Mycoplasma pulmonis*. *Plasmid* **21**: 43-47.
- Maniloff, J., (2002) Phylogeny and evolution. In: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas S. Razin & R. Herrmann (eds). New York: Kluwer Academic/Plenum.
- Maniloff, J. & U. Chaudhuri, (1979) Gliding mycoplasmas are inhibited by cytochalasin B and contain a polymerizable protein fraction. *J Supramol Struct* **12**: 299-304.
- Marchler-Bauer, A. & S. H. Bryant, (2004) CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res* **32**: W327-331.
- Mayer, F., (2003) Cytoskeletons in prokaryotes. *Cell Biol Int* **27**: 429-438.
- Mayer, U. & G. Jurgens, (2002) Microtubule cytoskeleton: a track record. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 494-501.
- Mernaugh, G. R., S. F. Dallo, S. C. Holt & J. B. Baseman, (1993) Properties of adhering and nonadhering populations of *Mycoplasma genitalium*. *Clin Infect Dis* **17 Suppl 1**: S69-78.
- Minion, F. C. & K. Jarvill-Taylor, (1994) Membrane-associated hemolysin activities in mycoplasmas. *FEMS Microbiol Lett* **116**: 101-106.
- Minion, F. C., K. J. Jarvill-Taylor, D. E. Billings & E. Tigges, (1993) Membrane-associated nuclease activities in mycoplasmas. *J Bacteriol* **175**: 7842-7847.
- Miyata, M. & J. D. Petersen, (2004) Spike structure at the interface between gliding *Mycoplasma mobile* cells and glass surfaces visualized by rapid-freeze-and-fracture electron microscopy. *J Bacteriol* **186**: 4382-4386.
- Miyata, M. & A. Uenoyama, (2002) Movement on the cell surface of the gliding bacterium, *Mycoplasma mobile*, is limited to its head-like structure. *FEMS Microbiol Lett* **215**: 285-289.
- Miyata, M., H. Yamamoto, T. Shimizu, A. Uenoyama, C. Citti & R. Rosengarten, (2000) Gliding mutants of *Mycoplasma mobile*: relationships between motility and cell morphology, cell adhesion and microcolony formation. *Microbiology* **146 (Pt 6)**: 1311-1320.

- Morrison-Plummer, J., D. H. Jones, K. Daly, J. G. Tully, D. Taylor-Robinson & J. B. Baseman, (1987) Molecular characterization of *Mycoplasma genitalium* species-specific and cross-reactive determinants: identification of an immunodominant protein of *M. genitalium*. *Isr J Med Sci* **23**: 453-457.
- Mudahi-Orenstein, S., S. Levisohn, S. J. Geary & D. Yogeve, (2003) Cytadherence-deficient mutants of *Mycoplasma gallisepticum* generated by transposon mutagenesis. *Infect Immun* **71**: 3812-3820.
- Musatovova, O., S. Dhandayuthapani & J. B. Baseman, (2003) Transcriptional starts for cytodherence-related operons of *Mycoplasma genitalium*. *FEMS Microbiol Lett* **229**: 73-81.
- Musatovova, O., S. Dhandayuthapani & J. B. Baseman, (2006) Transcriptional heat shock response in the smallest known self-replicating cell, *Mycoplasma genitalium*. *J Bacteriol* **188**: 2845-2855.
- Nagai, R. & M. Miyata, (2006) Gliding motility of *Mycoplasma mobile* can occur by repeated binding to N-acetylneuraminyllactose (sialyllactose) fixed on solid surfaces. *J Bacteriol* **188**: 6469-6475.
- Nakane, D. & M. Miyata, (2007) Cytoskeletal "jellyfish" structure of *Mycoplasma mobile*. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Ogle, K. F., K. K. Lee & D. C. Krause, (1992) Nucleotide sequence analysis reveals novel features of the phase-variable cytodherence accessory protein HMW3 of *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Immun* **60**: 1633-1641.
- Papazisi, L., T. S. Gorton, G. Kutish, P. F. Markham, G. F. Browning, D. K. Nguyen, S. Swartzell, A. Madan, G. Mahairas & S. J. Geary, (2003) The complete genome sequence of the avian pathogen *Mycoplasma gallisepticum* strain R(low). *Microbiology* **149**: 2307-2316.
- Perkins, D. N., D. J. Pappin, D. M. Creasy & J. S. Cottrell, (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**: 3551-3567.
- Peterson, S. N., C. C. Bailey, J. S. Jensen, M. B. Borre, E. S. King, K. F. Bott & C. A. Hutchison, 3rd, (1995) Characterization of repetitive DNA in the *Mycoplasma genitalium* genome: possible role in the generation of antigenic variation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 11829-11833.
- Pich, O. Q., R. Burgos, M. Ferrer-Navarro, E. Querol & J. Pinol, (2006a) *Mycoplasma genitalium* mg200 and mg386 genes are involved in gliding motility but not in cytodherence. *Mol Microbiol* **60**: 1509-1519.
- Pich, O. Q., R. Burgos, R. Planell, E. Querol & J. Pinol, (2006b) Comparative analysis of antibiotic resistance gene markers in *Mycoplasma genitalium*: application to studies of the minimal gene complement. *Microbiology* **152**: 519-527.
- Pilo, P., E. M. Vilei, E. Peterhans, L. Bonvin-Klotz, M. H. Stoffel, D. Dobbelaere & J. Frey, (2005) A metabolic enzyme as a primary virulence factor of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony. *J Bacteriol* **187**: 6824-6831.
- Piper, B., R. Rosengarten & H. Kirchhoff, (1987) The influence of various substances on the gliding motility of *Mycoplasma mobile* 163K. *J Gen Microbiol* **133**: 3193-3198.
- Pollack, J. D., M. V. Williams & R. N. McElhaney, (1997) The comparative metabolism of the mollicutes (*Mycoplasmas*): the utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function in the smallest free-living cells. *Crit Rev Microbiol* **23**: 269-354.
- Popham, P. L., T. W. Hahn, K. A. Krebs & D. C. Krause, (1997) Loss of HMW1 and HMW3 in noncytadhering mutants of *Mycoplasma pneumoniae* occurs post-translationally. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 13979-13984.

- Proft, T., H. Hilbert, G. Layh-Schmitt & R. Herrmann, (1995) The proline-rich P65 protein of *Mycoplasma pneumoniae* is a component of the Triton X-100-insoluble fraction and exhibits size polymorphism in the strains M129 and FH. *J Bacteriol* **177**: 3370-3378.
- Proft, T., H. Hilbert, H. Plagens & R. Herrmann, (1996) The P200 protein of *Mycoplasma pneumoniae* shows common features with the cytoadherence-associated proteins HMW1 and HMW3. *Gene* **171**: 79-82.
- Radestock, U. & W. Bredt, (1977) Motility of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* **129**: 1495-1501.
- Reddy, S. P., W. G. Rasmussen & J. B. Baseman, (1995) Molecular cloning and characterization of an adherence-related operon of *Mycoplasma genitalium*. *J Bacteriol* **177**: 5943-5951.
- Reddy, S. P., W. G. Rasmussen & J. B. Baseman, (1996) Isolation and characterization of transposon Tn4001-generated, cytoadherence-deficient transformants of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **15**: 199-211.
- Regula, J. T., G. Boguth, A. Gorg, J. Hegermann, F. Mayer, R. Frank & R. Herrmann, (2001) Defining the mycoplasma 'cytoskeleton': the protein composition of the Triton X-100 insoluble fraction of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae* determined by 2-D gel electrophoresis and mass spectrometry. *Microbiology* **147**: 1045-1057.
- Roberts, R. J., (2004) Identifying protein function--a call for community action. *PLoS Biol* **2**: E42.
- Rosenbusch, J. P., G. R. Jacobson & J. C. Jaton, (1976) Does a bacterial elongation factor share a common evolutionary ancestor with actin? *J Supramol Struct* **5**: 391-396.
- Rosengarten, R. & H. Kirchhoff, (1987) Gliding motility of *Mycoplasma* sp. nov. strain 163K. *J Bacteriol* **169**: 1891-1898.
- Rosengarten, R., A. Klein-Struckmeier & H. Kirchhoff, (1988) Rheotactic behavior of a gliding mycoplasma. *J Bacteriol* **170**: 989-990.
- Sambrook, J. & D. Russell, (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press New York.
- Schuler, G. D., (2001) Sequence alignment and database searching. *Methods Biochem Anal* **43**: 187-214.
- Seto, S., T. Kenri, T. Tomiyama & M. Miyata, (2005a) Involvement of P1 adhesin in gliding motility of *Mycoplasma pneumoniae* as revealed by the inhibitory effects of antibody under optimized gliding conditions. *J Bacteriol* **187**: 1875-1877.
- Seto, S., G. Layh-Schmitt, T. Kenri & M. Miyata, (2001) Visualization of the attachment organelle and cytoadherence proteins of *Mycoplasma pneumoniae* by immunofluorescence microscopy. *J Bacteriol* **183**: 1621-1630.
- Seto, S. & M. Miyata, (2003) Attachment organelle formation represented by localization of cytoadherence proteins and formation of the electron-dense core in wild-type and mutant strains of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* **185**: 1082-1091.
- Seto, S., A. Uenoyama & M. Miyata, (2005b) Identification of a 521-kilodalton protein (Gli521) involved in force generation or force transmission for *Mycoplasma mobile* gliding. *J Bacteriol* **187**: 3502-3510.
- Seybert, A., R. Herrmann & A. S. Frangakis, (2006) Structural analysis of *Mycoplasma pneumoniae* by cryo-electron tomography. *J Struct Biol* **156**: 342-354.
- Shen, X., J. Gumulak, H. Yu, C. T. French, N. Zou & K. Dybvig, (2000) Gene rearrangements in the *vsa* locus of *Mycoplasma pulmonis*. *J Bacteriol* **182**: 2900-2908.

- Shi, W., Y. Zhou, J. Wild, J. Adler & C. A. Gross, (1992) DnaK, DnaJ, and GrpE are required for flagellum synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**: 6256-6263.
- Shimizu, T. & M. Miyata, (2002) Electron microscopic studies of three gliding Mycoplasmas, *Mycoplasma mobile*, *M. pneumoniae*, and *M. gallisepticum*, by using the freeze-substitution technique. *Curr Microbiol* **44**: 431-434.
- Simmons, W. L., J. R. Bolland, J. M. Daubenspeck & K. Dybvig, (2007) A stochastic mechanism for biofilm formation by *Mycoplasma pulmonis*. *J Bacteriol* **189**: 1905-1913.
- Simmons, W. L. & K. Dybvig, (2003) The Vsa proteins modulate susceptibility of *Mycoplasma pulmonis* to complement killing, hemadsorption, and adherence to polystyrene. *Infect Immun* **71**: 5733-5738.
- Spencer, D. L., K. T. Kurth, S. A. Menon, T. VanDyk & F. C. Minion, (2002) Cloning and analysis of the gene for a major surface antigen of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis* **46**: 816-825.
- Sperker, B., P. Hu & R. Herrmann, (1991) Identification of gene products of the P1 operon of *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol* **5**: 299-306.
- Steinmetz, M. O., I. Jelesarov, W. M. Matousek, S. Honnappa, W. Jahnke, J. H. Missimer, S. Frank, A. T. Alexandrescu & R. A. Kammerer, (2007) Molecular basis of coiled-coil formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 7062-7067.
- Stevens, M. K. & D. C. Krause, (1991) Localization of the *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence-accessory proteins HMW1 and HMW4 in the cytoskeletonlike Triton shell. *J Bacteriol* **173**: 1041-1050.
- Stevens, M. K. & D. C. Krause, (1992) *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence phase-variable protein HMW3 is a component of the attachment organelle. *J Bacteriol* **174**: 4265-4274.
- Su, H. C., C. A. Hutchison, 3rd & M. C. Giddings, (2007) Mapping phosphoproteins in *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. *BMC Microbiol* **7**: 63.
- Svenstrup, H. F., J. S. Jensen, K. Gevaert, S. Birkelund & G. Christiansen, (2006) Identification and characterization of immunogenic proteins of *mycoplasma genitalium*. *Clin Vaccine Immunol* **13**: 913-922.
- Taylor-Robinson, D., (2002) *Mycoplasma genitalium* -- an up-date. *Int J STD AIDS* **13**: 145-151.
- Trachtenberg, S., (1998) Mollicutes-wall-less bacteria with internal cytoskeletons. *J Struct Biol* **124**: 244-256.
- Turner, G. A., R. P. H. Logan, R. Chinnery, A. Cockayne, C. J. Hawkey & S. P. Borriello, (1997) Trefoil peptides are unique chemotaxins for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **112**:A1107.
- Uenoyama, A., A. Kusumoto & M. Miyata, (2004) Identification of a 349-kilodalton protein (Gli349) responsible for cytoadherence and glass binding during gliding of *Mycoplasma mobile*. *J Bacteriol* **186**: 1537-1545.
- Uenoyama, A. & M. Miyata, (2005a) Gliding ghosts of *Mycoplasma mobile*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 12754-12758.
- Uenoyama, A. & M. Miyata, (2005b) Identification of a 123-kilodalton protein (Gli123) involved in machinery for gliding motility of *Mycoplasma mobile*. *J Bacteriol* **187**: 5578-5584.
- Vilei, E. M. & J. Frey, (2001) Genetic and biochemical characterization of glycerol uptake in *mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: its impact on H₂O₂ production and virulence. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**: 85-92.

- Waldo, R. H., 3rd, P. L. Popham, C. E. Romero-Arroyo, E. A. Mothershed, K. K. Lee & D. C. Krause, (1999) Transcriptional analysis of the hmw gene cluster of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* **181**: 4978-4985.
- Walsh, P., D. Bursac, Y. C. Law, D. Cyr & T. Lithgow, (2004) The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO Rep* **5**: 567-571.
- Wasinger, V. C., J. D. Pollack & I. Humphery-Smith, (2000) The proteome of *Mycoplasma genitalium*. Chaps-soluble component. *Eur J Biochem* **267**: 1571-1582.
- Willby, M. J. & D. C. Krause, (2002) Characterization of a *Mycoplasma pneumoniae* hmw3 mutant: implications for attachment organelle assembly. *J Bacteriol* **184**: 3061-3068.
- Yang, Z., Y. Geng & W. Shi, (1998) A DnaK homolog in *Myxococcus xanthus* is involved in social motility and fruiting body formation. *J Bacteriol* **180**: 218-224.
- Yoshiyama, H. & T. Nakazawa, (2000) Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus. *Microbes Infect* **2**: 55-60.