



UNIVERSITAT DE BARCELONA

U

B

Facultat de Biologia

Departament de Microbiologia

**Les famílies de proteïnes Hha/YmoA i H-NS: regulació global de
l'expressió gènica a *Escherichia coli* i paper en la conjugació plasmídica.**

Núria Forns Fradera

Tesi Doctoral

Barcelona, abril 2006

1. INTRODUCCIÓ

1.1 FACTORS AMBIENTALS I MODULADORS GLOBAIS DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA

Una de les característiques de la cèl·lula bacteriana és la capacitat d'adaptar-se ràpidament als freqüents canvis en les condicions ambientals de l'entorn en el que es desenvolupa. La capacitat d'adaptar-se a l'entorn per obtenir la major energia possible resulta tan essencial com l'estalvi d'aquesta. Per aquesta raó, en els procariotes la regulació de l'expressió gènica constitueix una eina fonamental per adaptar-se a un hàbitat canviant. Així doncs, els bacteris són capaços de detectar les variacions fisicoquímiques de l'exterior i ajustar la maquinària bioquímica en funció d'aquestes.

Els bacteris són capaços de detectar tant paràmetres químics, relacionats amb aspectes nutricionals del medi (presència o absència d'ions, fonts d'energia, acceptors finals d'electrons), com paràmetres físics (temperatura, pH, pressió hidrostàtica i pressió osmòtica).

Els estímuls ambientals són captats directa o indirectament per la cèl·lula mitjançant components solubles del citoplasma. Pot ser que l'estímul sigui capaç de penetrar a l'interior de la cèl·lula (per exemple, un substrat del metabolisme) o bé que es produeixi la detecció de l'efecte de l'estímul sobre components cel·lulars (per exemple, una elevada temperatura pot ser detectada a través del seu efecte en el plegament de determinades proteïnes). Alguns estímuls, entre els quals es troba el pH i l'osmolaritat, poden ser detectats a través de receptors específics de membrana que actuen com a sensors de la senyal a nivell de la superfície cel·lular (Ninfa *et al.*, 1996).

Els mecanismes de reconeixement d'aquests estímuls i la transmissió d'aquesta informació poden ser més o menys complexes depenent del sistema particular i de si la resposta que comporta és específica o global.

1.1.1 REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA A NIVELL TRANSCRIPCIONAL

La necessitat regular de l'expressió gènica en bacteris implica l'existència de mecanismes moleculars, tant o més complexos que els de la cèl·lula eucariota, que poden afectar a les diferents etapes del procés: inici, elongació o terminació de la transcripció, processament i estabilitat del RNA missatger, traducció, i finalment, a nivell post-traducciona mitjançant la modificació de la proteïna (Rojo, 1999). La major part dels mecanismes descrits en bacteris que regulen l'expressió gènica en funció dels factors ambientals exerceixen un control en el procés de transcripció, en particular en l'inici de la transcripció. La raó és senzilla: intervenint a nivell transcripcional, l'estalvi energètic és molt superior a quan s'actua a nivell de la degradació o inactivació d'una proteïna ja sintetitzada. L'inici de la transcripció pot ser activat o reprimat per mecanismes que impliquen modificacions en la RNA polimerasa, de proteïnes reguladores d'unió al DNA, o canvis en l'estat de superenrotllament del DNA.

1.1.1.1 Els factors sigma

L'holoenzim RNA polimerasa (RNAP) està format per dos components: el nucli enzimàtic i la subunitat corresponent. El nucli enzimàtic, format per les subunitats α i β , conté tota la maquinària catalítica necessària per la síntesi del RNA, però necessita la unió al factor σ per iniciar la transcripció. La subunitat β té tres funcions principals: assegurar el reconeixement d'una seqüència promotora específica, posicionar l'holoenzim en un promotor diana i facilitar l'obertura de la doble hèlix de DNA en l'inici de la transcripció.

A *Escherichia coli*, la majoria dels inicis de transcripció en cèl·lules en creixement exponencial són catalitzats per l'holoenzim RNAP (E⁻), que està format per un factor "housekeeping", el factor σ^{70} . Factors sigma alternatius controlen regulons específics que s'activen en determinades condicions d'estrès, de creixement o durant canvis morfològics. A més, els factors sigma interaccionen amb els factors de transcripció, tant si són activadors com si són repressors (Ebright i Busby, 1995; Hochschild i Dove, 1998; Dove *et al.*, 2003).

Tots els factors comparteixen característiques comunes, amb l'excepció de la família de factors ⁵⁴. Són proteïnes formades per fins a quatre dominis diferents units per connectors. Els dominis 2, 3 i 4 estan implicats en el reconeixement del promotor, però la funció del domini 1 és desconeguda. Fins i tot, en molts factors aquest domini no hi és (Gruber i Gross, 2003; Browning i Busby, 2004).

Escherichia coli conté un factor ⁵⁴ i sis factors de la família de ⁷⁰: ⁷⁰ (RpoD), ^S (RpoS), ³² (RpoH), ^F (FliA), ^E (RpoE), i FceI (Gruber i Gross, 2003). Cadascun d'ells dirigeix la transcripció de grups de gens específics. A *E. coli* ^S transcriu més de 100 gens implicats en la supervivència cel·lular, protecció contra diverses situacions d'estrès (estrès oxidatiu, radiació UV, xoc tèrmic, hiperosmolaritat, pH àcid) i expressió de la virulència (Ishihama, 2000). Els nivells de ^S estan cuidadosament controlats, augmentant significativament en l'inici de la fase estacionària de creixement, moment en què arriba al 30% del nivell del factor "housekeeping" ⁷⁰. Augmenta així la seva habilitat per competir pel nucli enzimàtic enfront els altres factors disponibles a la cèl·lula (Jishage *et al.*, 1996). Els estudis dels nivells de ^S han revelat un dels sistemes més complexes de la regulació en bacteris, ja que es produeix en diferents nivells: a nivell de la transcripció, de la traducció i de l'estabilitat proteica, de manera coordinada en resposta a diverses situacions d'estrès cel·lular (Jishage *et al.*, 1996). Encara que ⁷⁰ i ^S reconeixen bàsicament les mateixes seqüències promotores hi ha algunes característiques que determinen la selectivitat de ^S. A nivell de seqüència són: un lloc llunyà d'unió d'un element UP en direcció 5' del promotor, una citosina en posició -13 en la caixa -10, una zona rica en A+T en direcció 3' de la caixa -10, una caixa -35 degenerada, i un canvi en la posició geomètrica de les caixes -10 i -35. Finalment, l'acció sobre la regió promotora de determinats factors, com H-NS, Lrp o IHF, o la topologia del DNA en aquesta mateixa regió, juguen a vegades un paper decisiu en l'especificitat de ^S (Hengge-Aronis, 2002). Tot i que ^S és essencial en la transcripció de gens específics de fase estacionària i de situacions d'estrès, com s'ha mencionat anteriorment, alguns gens de resposta a l'estrès estan transcrits per l'holoenzim format per altres subunitats minoritàries. ⁵⁴ transcriu gens activats per una deficiència de nitrogen i altres gens de resposta a l'estrès. ³² transcriu gens que codifiquen per proteïnes del xoc tèrmic, i s'indueix quan s'acumula un nombre excessiu de proteïnes citoplasmàtiques que no es pleguen correctament. ^F activa els gens tardans implicats en l'ensamblatge del flagel. ^E s'indueix per proteïnes

desplegades de l'embolcall cel·lular i dirigeix l'expressió dels gens responsables de regenerar la integritat dels embolcalls. Finalment, FceI és el responsable de la transcripció de la maquinària necessària pel transport per translocació del citrat fèrric enfront una situació de limitació de ferro i presència de citrat fèrric a l'ambient. FceI forma part de la subfamília de factors sigma extracitoplasmàtics (EFC) o factors sigma del grup 4, que tenen una seqüència força divergent respecte els altres grups de la família ⁷⁰. S'anomenen factors sigma extracitoplasmàtics perquè inicialment molts dels factors descrits d'aquest grup es van relacionar amb aspectes dels embolcalls cel·lulars i del transport, i a més, es solen transcriure conjuntament amb un factor anti-sigma transmembrana. Tot i així, s'està demostrant que hi ha proteïnes pertanyents a aquest grup amb funcions més àmplies. Molts bacteris, sobretot aquells amb genomes complexos, contenen múltiples factors sigma EFC, que en molts casos superen el nombre d'altres factors sigma. Alguns exemples els trobem a *Bacillus subtilis* (7 factors sigma EFC), *Mycobacterium tuberculosis* (10), *Caulobacter crescentus* (13), *Pseudomonas aeruginosa* (aproximadament 19), i *Streptomyces coliecolor* (aproximadament 50) (Helmann, 2002).

En molts casos, l'activitat d'un factor σ^E està controlada per un factor anti-sigma, que el manté allunyat de la subunitat catalítica de la RNAP (Hughes i Mathee, 1998). Per exemple, FlgM està unit a σ^F en la primera fase de formació del flagel, però es secreta fora de la cèl·lula després de la formació del cos basal del flagel, permetent la transcripció dels gens d'expressió tardana per σ^F . El producte del gen *rseA*, localitzat a continuació del gen *rpoE* en el mateix operó, regula negativament a σ^E , ja que l'extrem amino de RseA interacciona directament amb aquest factor sigma. Una de les característiques comunes dels EFC és que es transcriuen conjuntament amb un o més reguladors negatius, molts cops una proteïna transmembrana (Helmann, 2002). Un altre exemple de factor anti-sigma és Rsd (regulador de sigma D), específic de ⁷⁰. Rsd no està present en cèl·lules en creixement exponencial, però a l'entrar en fase estacionària es comença a sintetitzar arribant als seus màxims nivells en l'inici de la fase estacionària.

En resum, les cèl·lules bacterianes tenen un factor sigma "housekeeping" i un nombre variable de factors σ que tenen diferents propietats de reconeixement de seqüències promotores. La cèl·lula presenta un repertori de factors sigma que permeten alterar el seu patró d'expressió gènica en resposta a diferents estímuls.

1.1.1.2 Els factors de transcripció

Es considera que el genoma d'*E. coli* conté més de 300 gens que, en base a l'anàlisi de seqüència d'aminoàcids, codifiquen proteïnes són capaces de regular la transcripció per unió a regions promotores (Pérez-Rueda i Collado-Vides, 2000; Babu i Teichmann, 2003). La funció d'aquestes proteïnes, anomenades factors de transcripció, ha estat verificada experimentalment tan sols en la meitat dels casos. La majoria dels factors de transcripció, aproximadament tres quartes parts, són proteïnes formades estructuralment per dos dominis: un domini d'unió al DNA i un domini regulador (Babu i Teichmann, 2003). El domini d'unió al DNA predominant és el domini HTH ("helix-turn-helix"), present en 248 dels reguladors transcripcionals coneguts i predits (Pérez-Rueda i Collado-Vides, 2000). Els factors de transcripció es poden agrupar en base a l'anàlisi de la seva seqüència. D'aquesta manera s'han identificat una sèrie de famílies (taula 1.1.1.2) de les quals, les més ben caracteritzades són les famílies LacI, AraC, LysR, CRP i OmpR (Pérez-Rueda i Collado-Vides, 2000).

Taula 1.1.1.2 Famílies de proteïnes reguladores a *E. coli*.

Família	Factors coneguts	Factors predits
CRP	2	0
AsnC	2	1
IclR	2	6
Cold	8	1
TetR/AcrR	4	5
DeoR	7	7
EBP	9	5
GalR/LacI	12	2
OmpR	13	4
LuxR/UhpA	11	6
GntR	8	12
AraC/XylS	14	13
LysR	18	27
Altres	49	66

Els factors de transcripció relacionen l'expressió dels gens amb els senyals ambientals, i ells mateixos són regulats controlant la seva expressió o la seva activitat. S'han descrit diversos mecanismes pels quals es regulen els factors de transcripció. En primer lloc, l'afinitat d'unió d'aquests reguladors transcripcionals al DNA pot ser modulada mitjançant la seva unió a d'altres molècules, en concret a lligands de baix pes molecular, la concentració dels quals fluctua en resposta a senyals ambientals, com la disponibilitat d'un nutrient o una situació d'estrès. Tenint en compte que en el 44% dels factors de transcripció el domini regulador és un domini d'unió a molècules de baix pes molecular, es pot deduir que la meitat dels factors transcripcionals estan directament regulats per aquest mecanisme (Anantharaman *et al.*, 2001; Babu i Teichman, 2003). En segon lloc, l'activitat d'alguns factors transcripcionals està modulada per modificació covalent, com en el cas dels sistemes de transducció de senyal de dos components. Un 10% dels factors de transcripció té un domini tipus Che-Y (domini receptor de la fosforilació per part d'una histidina quinasa sensora) present en els reguladors de resposta, com per exemple NarL (implicat en la regulació dels gens de respiració de nitrat), que s'uneix al DNA diana només quan ha estat fosforilat pel seu corresponent sensor quinasa. Els sensors quinasa es localitzen normalment en la membrana citoplasmàtica i són regulats per senyals extracel·lulars. NarL està controlat per les quinases NarX i NarQ, que s'activen mitjançant la unió a ions nitrit o nitrat del medi (Chiang *et al.*, 1992; Cavicchioli *et al.*, 1995). En tercer lloc, per alguns factors transcripcionals és la seva concentració intracel·lular el que controla la seva activitat. En aquests casos la concentració està controlada per la seva expressió o per la seva proteòlisis. Per exemple, una resposta cel·lular a l'estrès oxidatiu està controlada mitjançant la concentració de la proteïna SoxS (Dempfle, 1996). La transcripció del gen que codifica SoxS està controlada per SoxR, que a la vegada està regulat directament mitjançant interaccions amb lligands oxidatius. Finalment, un altre mecanisme menys comú és el segrest del factor de transcripció mitjançant la unió a una proteïna reguladora, que fa que disminueixi la seva concentració. Com a exemple tenim la transcripció de MalT, activador transcripcional dels gens del reguló maltosa a *E. coli*. MalT està inhibit per Mlc, regulador global que és segrestat pel transportador PtsG (transportador de glucosa del sistema de la fosfotransferasa) quan no hi ha glucosa al medi (Böhm i Boss, 2004). També cal tenir en compte els canvis de la topologia local del DNA, on poden estar implicades

proteïnes associades al nucleoide, que poden variar l'accessibilitat o l'afinitat del factor de transcripció pel seu lloc d'unió al DNA.

Quan un factor de transcripció s'uneix a un promotor pot activar o reprimir l'inici de transcripció. De totes les proteïnes reguladores descrites o predites, un 34% són activadores, un 43% són repressores i un 22% són proteïnes duals, és a dir, poden actuar d'activadores o de repressores segons els seus promotors diana (Pérez-Rueda i Collado-Vides, 2000). Segons la localització del domini HTH es pot deduir la potencialitat d'un factor de transcripció com activador o repressor: en un 96% de les proteïnes repressores el domini es troba a l'extrem N-terminal, mentre que en el 78% de les proteïnes activadores es troba a l'extrem C-terminal. Una de les característiques dels factors de transcripció és que presenten una autoregulació negativa (Thieffry *et al.*, 1998). N'hi ha uns quants, però, que es regulen positivament, com PhoB, GutM, TdcA, CadC, RhaS i RhaR. Encara són menys els factors de transcripció descrits que exerceixen una regulació positiva i negativa sobre la seva expressió (Ada, CRP i NtrC) (Magasanik i Neidhart, 1987).

Alguns factors de transcripció poden ser considerats reguladors globals. Tradicionalment es descriuen com a reguladors globals aquells que causen un fenotip pleiotròpic i que són capaços de regular operons que codifiquen diferents funcions (Gottesman, 1984). Existeixen diferents criteris per determinar si un factor de transcripció és considerat un regulador global. Per a Babu i Teichmann (2003), és necessari que regulin més de 15 gens (ja sigui de forma directa o indirecta), mentre que per a Shen-Orr *et al.* (2002), han de regular 10 o més operons. Martínez-Antonio i Collado-Vides (2003) han definit una sèrie de característiques que han de presentar els factors de transcripció per a se considerats reguladors globals:

- Regulen un elevat nombre de gens. El 51% dels gens regulats a *E. coli* estan controlats únicament per set proteïnes reguladores que, per tant, controlen desenes o centenars de gens (CRP, FNR, IHF, FIS, ArcA, NarL i LrP). En canvi, la majoria de factors de transcripció només controlen un promotor individual o un nombre limitat de gens.

- Actuen conjuntament amb altres factors de transcripció. El 49% dels gens es troben regulats per múltiples factors, i sembla ser que intervenen junts reguladors globals amb reguladors específics.

- Poden regular altres factors transcripcionals i d'aquesta forma regular diferents gens de forma indirecta. Per exemple, CRP regula 23 factors de transcripció, incloent-se a si mateix.

- Un factor de transcripció global pot regular gens que són transcrits per diferents factors , i una determinada subunitat pot transcriure gens regulats per diferents factors de transcripció. D'aquesta forma, la cèl·lula té diverses alternatives per determinar quin gen o gens seran regulats o transcrits davant un determinat estímul.

- Els factors de transcripció globals detecten un major nombre de senyals ambientals que els reguladors específics. La meitat dels factors transcripcionals, com s'ha comentat anteriorment, tenen un domini d'unió a petits metabòlits.

- La capacitat d'autoregulació és una característica present en tots els factors de transcripció, però és predominant en els factors de transcripció globals (Thieffry *et al.*, 1998).

- Els reguladors globals es transcriuen desacobllats dels gens que regulen, a diferència del que succeeix amb els factors específics. Aquesta característica és una conseqüència de la capacitat de regular molts gens.

- La majoria dels reguladors globals pertanyen a famílies que contenen un nombre de gens baix. Per exemple, CRP, IHF, FNR, Lrp i H-NS estan classificats en famílies amb 3 o menys membres.

Els reguladors globals es poden classificar en diferents nivells jeràrquics segons aquestes característiques que s'han definit i en funció del grau d'interconnexions transversals que puguin presentar. A més, a les xarxes reguladores també hi intervenen altres nivells de regulació com la metilació Dam (Oshima *et al.*, 2002) i el grau de superenrotllament en relació amb el nivell energètic de la cèl·lula. Tot aquest escenari suposa un complex model de regulació que permet a la cèl·lula establir el patró d'expressió més òptim.

1.1.1.3 El superenrotllament del DNA

El genoma bacterià es troba condensat en una estructura anomenada nucleoide. Aquesta estructura complexa és capaç de conciliar la necessitat d'empaquetar la gran

quantitat de DNA amb el requeriment de la cèl·lula de replicar-se i regular l'expressió gènica en resposta als canvis ràpids de les condicions nutricionals i ambientals.

A excepció del DNA plasmídic aïllat d'alguns arqueobacteris, en general les preparacions de DNA obtingudes a partir de cèl·lules procariotes presenten un dèficit en l'índex d'enllaç, que es manifesta com un superenrotllament negatiu (Drlica, 1992). Aquest nivell de superenrotllament negatiu està estrictament controlat per la influència combinada de diversos factors, que inclouen la transcripció, la replicació, les proteïnes d'unió al DNA i les activitats topoisomerases.

El nivell de superenrotllament mantingut per l'acció coordinada dels enzims DNA girasa i DNA topoisomerasa I és l'anomenat superenrotllament no restringit. L'acció de la DNA girasa provoca un increment dels superenrotllament negatiu mitjançant una reacció que requereix la hidròlisi d'ATP. L'acció de la topoisomerasa I, en canvi, provoca una relaxació del DNA independent de l'ATP.

L'acció de la DNA girasa no respon a la concentració d'ATP lliure, sinó a la relació $[ATP]/[ADP]$ intracel·lular indicativa de l'estat energètic de la cèl·lula. Molts estudis demostren que el nivell global de superenrotllament en una cèl·lula està controlat per la càrrega energètica. Una situació d'estrès altera tant la càrrega energètica com el nivell de superenrotllament del DNA. Per exemple, un xoc osmòtic fa augmentar aproximadament quatre cops la relació $[ATP]/[ADP]$ intracel·lular, i al mateix temps el nivell de superenrotllament global del cromosoma bacterià: si el valor típic del superenrotllament durant el creixement balancejat és de -0,05, en aquest cas augmenta a -0,09 (Higgins *et al.*, 1988). Durant les transicions del creixement en un ambient aerobi a un creixement anaerobi, la relació $[ATP]/[ADP]$ disminueix, i el nivell de superenrotllament global cau momentàniament de -0,05 a -0,038 (Cortassa i Aon, 1993). En una escala més àmplia, mutacions en les topoisomerases canvien el superenrotllament de tal manera que afecten els nivells d'expressió d'un nombre molt elevat de proteïnes. De 88 proteïnes analitzades en un gel de dues dimensions, el 39% mostraren canvis en el nivell d'expressió (Steck *et al.*, 1993).

S'ha proposat que a nivell global, el grau de superenrotllament del DNA seria el factor més important que afectaria la regulació de l'expressió gènica (Schaechter, 2001; Hatfield i Benham, 2002). Com que el nivell de superenrotllament està influït per l'estat energètic cel·lular, aquest pot canviar ràpidament en resposta a un ampli ventall de condicions ambientals i nutricionals. Aquesta és una alteració global que

afecta al cromosoma bacterià per complet i per tant, als nivells d'expressió de tots els promotors sensibles al superenrotllament. En el cas dels operons del reguló *ilv* a *E. coli*, que contenen dos gens que codifiquen pels enzims de la biosíntesis d'aminoàcids de cadenes ramificades (L-soleucina, L-valina i L-leucina), s'ha demostrat que els seus nivells d'expressió basal estan ajustats al nivell de superenrotllament del DNA (Hatfeild i Benham, 2002), molt per sobre del nivell específic de regulació de l'operó. Així els seus nivells d'expressió basal són baixos quan el superenrotllament també ho és, i alts quan augmenta el superenrotllament.

Com s'ha mencionat anteriorment, el nivell de superenrotllament del cromosoma bacterià està controlat, a part de l'acció de les topoisomerases, per les proteïnes d'unió al DNA. Entre elles cal destacar les proteïnes d'unió al nucleòide, responsables aproximadament de compensar la meitat del superenrotllament global del cromosoma bacterià, el denominat superenrotllament restringit. Es caracteritzen per ser un grup de proteïnes de baix pes molecular, riques en aminoàcids carregats, que a diferència de les histones eucariotes formen unions inestables amb el DNA. Aquestes proteïnes poden afectar profundament l'estructura local i global del cromosoma, encara que no es coneix el paper fonamental de cada proteïna en la condensació del genoma bacterià. A més de la funció d'organització del nucleòide, aquestes proteïnes influeixen en la regulació de l'expressió gènica, així com en altres processos en els que està implicat el DNA, com la replicació, recombinació, reparació o transposició.

A *E. coli* s'han descrit 12 proteïnes associades al nucleòide o NAPs (Nucleoid Associated Proteins) (revisat a Ali Azam i Ishihama, 1999). Algunes de les més estudiades són HU (Heat-Unstable Nucleoid Protein), IHF (Integration Host Factor), H-NS (Histone-like Nucleoid-Structuring protein), StpA (Supresor of *td*-mutant phenotype A), FIS (Factor for Invesion Stimulation) i Dps (DNA-binding protein from starved cells). En general es pot considerar que cap d'aquestes proteïnes és essencial per a la viabilitat del bacteri, tot i que certes combinacions de mutants poden ser molt perjudicials per la cèl·lula i en alguns casos resulten letals (McLeod i Johnson, 2001).

Totes les NAPs s'uneixen al DNA de forma inespecífica, encara que algunes mostren preferència per una seqüència o estructura del DNA en particular. Per exemple, H-NS s'uneix preferentment al DNA corbat (Dame *et al.*, 2001; Rimsky *et al.*, 2001).

La concentració d'aquestes proteïnes al citoplasma varia depenent de les condicions de creixement cel·lular i de la fase de creixement. FIS, HU, IHF, StpA i H-NS, per exemple, són més abundants en fase exponencial. Durant la fase estacionària les proteïnes majoritàries són Dps, IHF i HU (Ali Azam *et al.*, 1999). Aquest canvi en la composició del “pool” de les proteïnes associades al nucleòide seria el responsable dels canvis globals en la estructura i activitat del nucleòide segons la fase de creixement.

Les NAPs actuen directa o indirectament, i en molts casos en combinació, per controlar l'expressió d'una gran varietat de gens que són fonamentals per la viabilitat de la cèl·lula, com els implicats en la síntesi proteica i el metabolisme. També intervenen en la regulació de gens implicats en la resposta a estímuls ambientals, com per exemple, els que responen a canvis en la osmolaritat o a la temperatura, i també afecten a gens implicats en la virulència (McLeod i Johnson, 2001).

Entre les NAPs més ben caracteritzades trobem HU, FIS, IHF i H-NS. Algunes de les seves característiques són:

- HU: la proteïna HU és molt abundant (15.000-30.000 dímers per cèl·lula en fase exponencial). És un heterodímer format per dues subunitats intercanviables, HU- i HU- , de 9,2 i 9,5 kDa respectivament, molt similars entre elles (70%) a *E. coli*, *S. enterica* serovar Typhimurium, *E. chrysanthemi* i *S. flexneri*. En altres espècies es tracta d'un homodímer (Oberto i Rouvière-Yaniv, 1996). *E. coli* pot variar la composició de la proteïna HU (2, o 2) al llarg de la fase de creixement. Aquests canvis en la seva composició semblen tenir conseqüències en l'habilitat per organitzar la cromatina bacteriana i influir en l'expressió gènica (revisat a Dorman *et al.*, 1999). Tot i que hi ha moltes evidències de la unió d'HU a regions promotores, no hi ha detalls moleculars, excepte en el cas de la repressió depenent de GalR del promotor de *gal P2* a *E. coli*. En aquest cas, HU i el superenrotllament del DNA col·laboren per ajudar a la unió d'un tetràmer de GalR per formar un bucle de repressió en el promotor (Kar i Adhya, 2001). S'ha proposat que els papers estructurals de les proteïnes H-NS i HU són oposats, i com a conseqüència també ho seran en la regulació de l'expressió gènica (Dame i Goosen, 2002).

- FIS: és una proteïna bàsica formada per dues subunitats iguals codificades pel gen *fis*, altament conservada en els bacteris entèrics. Es tracta de la proteïna associada al nucleòide més abundant en cèl·lules d'*E. coli* en fase de creixement exponencial (20.000-40.000 còpies per cèl·lula). FIS regula l'expressió d'un nombre molt elevat de gens, tant per control directe a nivell de l'inici de transcripció, com per efecte indirecte (Finkel i Johnson, 1992; Xu i Johnson, 1995; González-Gil *et al.*, 1996; Schneider *et al.*, 1999). Actualment s'està considerant a FIS com un regulador important de gens de virulència de patògens bacterians: promou la transcripció dels gens d'invasió de *Shigella flexneri* (Falconi *et al.*, 2001), i contribueix a la regulació dels gens de virulència de *S. enterica* serovar Typhimurium (Wilson *et al.*, 2001) i de soques d'*E. coli* enteropatògenes (Goldberg *et al.*, 2001).
- IHF: està implicada en la integració i en la escissió de la proteïna integrasa tant *in vivo* com *in vitro*. És una proteïna bàsica, formada per heterodímers de les subunitats IHF i IHF', codificades pels gens *himA* i *himD*, abundant en l'inici de la fase estacionària. IHF afecta directa o indirectament la transcripció d'uns 100 gens d'una àmplia gamma de funcions (Freundlinch *et al.*, 1992; Goosen i Van de Putte, 1995; revisat a McLeod i Johnson, 2001). Entre aquests trobem gens relacionats amb la virulència bacteriana a *Shigella flexneri* (Porter i Dorman, 1997) i *S. enterica* serovar Typhimurium (Marshall *et al.*, 1999).

1.2 LA FAMÍLIA DE PROTEÏNES H-NS

1.2.1 LA PROTEÏNA H-NS

1.2.1.1 Característiques generals

La proteïna H-NS (Histone-like Nucleoid Structuring protein) va ser descrita per primera vegada com el major component del nucleòide bacterià (Varshavsky *et*

al., 1977). El gen que codifica per a la proteïna H-NS, denominat *hns*, es troba localitzat en el minut 27,8 del cromosoma d'*E. coli* i és de còpia única, encara que presenta un gen paràleg, el gen *stpA*.

Mutacions en el gen *hns* (que també ha rebut el nom de H1, *osmZ*, *virR*, *drdX*, *bglY*, *pilG*), han estat descrites en diferents espècies de bacteris Gram-negatius al llarg del temps (no s'ha descrit en bacteris Gram-positius). Aquestes mutacions van ser descrites a causa de l'alteració que produeixen en diferents gens que estan regulats per temperatura o osmolaritat. La proteïna H-NS està implicada en la virulència de soques d'*E. coli* uropatogèniques (Göransson *et al.*, 1990; Madrid *et al.*, 2002a) i enterotoxigèniques (Trachman i Maas, 1998), a *S. flexneri* (Maurelli i Sansonetti, 1988), a *S. enterica* serovar Typhimurium (Higgins *et al.*, 1988) i a *Vibrio cholerae* (Nye *et al.*, 2000; Tendeng *et al.*, 2000). Tanmateix en altres espècies bacterianes no ha estat possible obtenir soques mutants per al gen *hns*, com per exemple *Proteus mirabilis* (Coker *et al.*, 2000), *Bordetella bronchiseptica* (Goyard i Bertin, 1997), *Y. pseudotuberculosis* (Heroven *et al.*, 2004), o *Y. enterocolitica*.

La proteïna H-NS d'*E. coli* (juntament amb la proteïna H-NS de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium) ha estat la més ben caracteritzada. Com s'ha explicat anteriorment, H-NS és coneguda des de fa més de 30 anys com una proteïna associada al nucleòide, i al llarg del temps s'ha estudiat el seu paper com a proteïna estructural implicada en la regulació global de l'expressió gènica (revisat a Dorman, 2004).

H-NS és una proteïna petita, de baix pes molecular (aproximadament 15,6 kDa i 137 aminoàcids) i molt abundant (20.000 còpies aproximadament per cèl·lula). A diferència de la major part de proteïnes associades al nucleòide i de les histones eucariotes, la proteïna H-NS presenta un caràcter global neutre, malgrat la presència d'algunes zones amb aminoàcids carregats (Rimsky, 2004). De tota manera s'han detectat tres isoformes de la proteïna amb diferents punts isoelèctrics 5'1, 6'5 i 7'5, sent les dues últimes les més predominants, tot i que la quantitat relativa de les diferents isoformes presents a la cèl·lula depèn de la fase de creixement (Spassky *et al.*, 1984). Una de les modificacions post-traduccionals descrites per H-NS és una conjugació amb cPHB, i s'ha suggerit un paper d'aquesta molècula en la unió i/o organització del DNA (Reusch *et al.*, 2002).

Els nivells de la proteïna H-NS dins de la cèl·lula són molt importants per a la seva funció. L'expressió d'H-NS es manté relativament constant al llarg de la fase de

creixement, però s'ha comprovat que experimenta un lleuger increment en la fase estacionària primerenca (Dersh *et al.*, 1993; Falconi *et al.*, 1996; Ueguchi *et al.*, 1993). En relació amb la temperatura, H-NS s'expressa d'igual forma a 37 °C i a 26 °C, però afecta a l'expressió dels gens que controla de diferent forma (Göransson *et al.*, 1990)

Les mutacions en el gen *hns* són altament pleiotròpiques ja que intervenen en diferents processos cel·lulars: inhibeixen la recombinació i afecten a l'estabilitat del genoma, entre d'altres. A més, H-NS és un regulador global de la transcripció ja que controla l'expressió d'aproximadament del 5% dels gens a *E. coli* (Hommals *et al.*, 2001). El gen *hns* es transcriu independentment dels gens que el flanquegen i és capaç d'autoregular la seva pròpia expressió inhibint-la a nivell de transcripció (Hulton *et al.*, 1990; Dersch *et al.*, 1993; Ueguchi *et al.*, 1993; Falconi *et al.*, 1993). Les proteïnes associades al nucleòide FIS i Csp poden activar l'expressió del gen *hns*, ja que competeixen pels mateixos llocs d'unió (Falconi *et al.*, 1996). A més, H-NS i la seva proteïna paràloga StpA són capaces d'activar la transcripció de FIS (Johansson *et al.*, 2000).

La proteïna H-NS s'uneix als àcids nucleics, tant DNA com RNA (Friedrich *et al.*, 1988). Tot i que no presenta una seqüència d'unió específica, s'uneix preferencialment a regions de DNA de doble cadena corbat i ric en seqüències A+T, ja siguin lineals o superenrotllades (Bracco *et al.*, 1989, Yamada *et al.*, 1990; Owen-Hughes *et al.*, 1992) i fins i tot pot provocar la curvatura de la regió a la qual s'uneix (Spurio *et al.*, 1997). És a dir, reconeix estructures locals més que seqüències específiques. Existeix un gran nombre de promotors en els gens d'*E. coli* que presenten aquestes regions corbades (Bracco *et al.*, 1989), però a més en alguns casos, com el del gen *proU*, aquestes regions es troben després del promotor i es denominen DRE (Downstream Regulatory Element) (Owen-Hughes *et al.*, 1992).

1.2.1.2 Dominis estructurals de la proteïna H-NS

La proteïna H-NS presenta dos dominis estructurals independents que es corresponen amb els seus dos dominis funcionals. D'una banda presenta un domini N-terminal en el que recau la seva capacitat d'oligomeritzar, i per altra banda un domini C-terminal responsable de l'habilitat d'aquesta proteïna per a unir-se al DNA. Els dos

dominis es troben units a través d'una petita regió molt flexible que permet a ambdós dominis actuar de manera independent (Shindo *et al.*, 1995; Dorman *et al.*, 1999; Smyth *et al.*, 2000; Esposito *et al.*, 2002; Bloch *et al.*, 2003). En la figura 1.2.1.2 es mostra l'esquema de la proteïna H-NS.

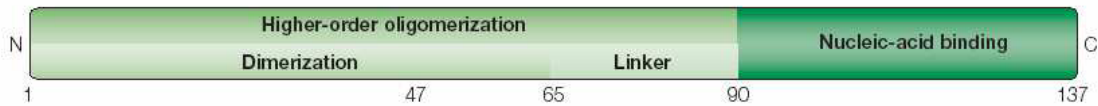


Figura 1.2.1.2 Representació esquemàtica dels dominis funcionals de la proteïna H-NS. Es mostra el domini N-terminal d'oligomerització, dividit en el domini de dimerització (aminoàcids del 1 al 64) i la regió flexible (aminoàcids del 59 al 89), i finalment el domini C-terminal d'unió al DNA (extret de Dorman, 2004).

1.2.1.2.1 Domini N-terminal: domini d'oligomerització

El domini d'oligomerització de la proteïna H-NS es troba en l'extrem N-terminal i s'estén fins al residu aminoacídic 64 (Smyth *et al.*, 2000).

La proteïna H-NS en general i el domini d'oligomerització en particular, es troben altament conservats entre els diferents membres de la família de proteïnes H-NS que existeixen en les diferents espècies bacterianes. Aquest fet facilita les interaccions heteromèriques entre les diferents proteïnes (Dorman *et al.*, 1999; Rimsky, 2004).

Per a poder realitzar les seves funcions biològiques, la proteïna H-NS requereix de la formació d'estructures d'elevat ordre d'oligomerització (Spurio *et al.*, 1997; Esposito *et al.*, 2002). Els primers 64 aminoàcids de la proteïna constitueixen el domini d'oligomerització, encara que recents estudis de ressonància magnètica nuclear (RMN) mostren que el mínim domini de dimerització el constitueixen únicament els primers 46 aminoàcids (Bloch *et al.*, 2003). Altres estudis han demostrat que per a la formació d'unitats d'oligomerització majors al dímer, a més del propi domini d'oligomerització, és necessària (almenys en part) la presència de la regió connectora (aminoàcids del 65 al 89), ja que proteïnes truncades d'H-NS₁₋₆₄ no són capaces de formar oligòmers majors (Smyth *et al.*, 2000).

L'estructura “coiled-coil” ha estat identificada com element d'oligomerització en molts factors de transcripció (Lupas, 1996) i podria funcionar com a sensor de la temperatura. La proteïna H-NS també posseeix aquesta estructura. A més aquesta regió rica en hèlixs α és similar a proteïnes eucariotes amb estructura “coiled-coil” com la miosina o la distrofina (Atlung i Ingmer, 1997).

El domini d'oligomerització d'aquesta proteïna presenta en la seva estructura 3 hèlixs : H1 (2-7), H2 (11-18) i H3 (22-46). Tot i que l'estructura secundària del domini N-terminal és clara, s'han descrit dues estructures terciàries diferents per a la proteïna H-NS, una per la proteïna H-NS d'*E. coli* (Bloch *et al.*, 2003) i l'altre per la de *Salmonella Typhimurium* (Esposito *et al.*, 2002). Les dues descripcions estan d'acord amb l'estructura en “coiled-coil” de les hèlixs H3. Tot i així, per *E. coli* s'ha descrit que les hèlix H3 estan en disposició antiparal·lela, on cada hèlix H2 establiria la hèlix H3 de l'altre monòmer, i per últim les hèlixs H1 s'aparellarien de forma perpendicular (Figura 1.2.1.2.1a). El dímer que es formaria a *E. coli* seria com una associació de dues estructures en forma d'U invertides, on les dues hèlixs H3 formarien un angle obtús. Els residus hidrofòbics quedarien a l'interior del dímer i l'estabilitzarien. En l'estructura definida per H-NS de *Salmonella Typhimurium*, en canvi, les hèlix H3 es disposarien paral·lelament adoptant una conformació “coiled-coil” on les hèlixs H1 i H2 es plegarien per darrera de cada hèlix H3 del mateix protòmer (Figura 1.2.1.2.1b).

En el seu estudi, Ono *et al.* (2005), proposen que les dues estructures diferents de dimerització d'H-NS que han estat definides per Esposito *et al.* (2002) i per Bloch *et al.* (2003) es deuen a l'estat de la proteïna a temperatures diferents. L'estructura secundària seria bàsicament la mateixa a temperatures diferents, però no la disposició dels dímers i oligòmers. A 25°C s'adoptaria la conformació descrita per Esposito *et al.* (2002) per H-NS de *Salmonella Typhimurium* i a 37°C la conformació seria la descrita per Bloch *et al.* (2003) per H-NS d'*E. coli*. La conformació d'H-NS a elevades temperatures faria augmentar l'aparició de formes dimèriques, a més, faria que els dominis C-terminal dels dos protòmers s'allunyessin l'un de l'altre (Figura 1.2.1.2.2c). Les dues estructures proposades serien capaces d'unir-se al DNA. El fet que a elevades temperatures predominessin els dímers, faria que fos més fàcil desfer la unió DNA-proteïna i d'aquesta manera el DNA seria més accessible a la RNA polimerasa.

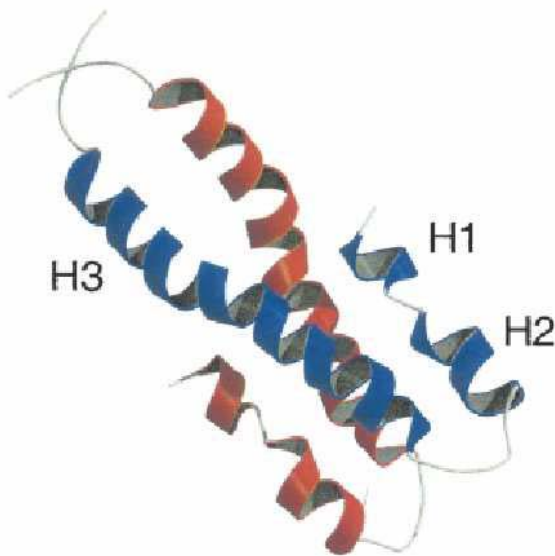


Figura 1.2.1.2.1a Domini d'oligomerització d'H-NS segons Esposito *et al.* (2002). Estructura tridimensional del dímer d'H-NS₁₋₅₇ on els dos protòmers es mostren en blau i vermell, respectivament.

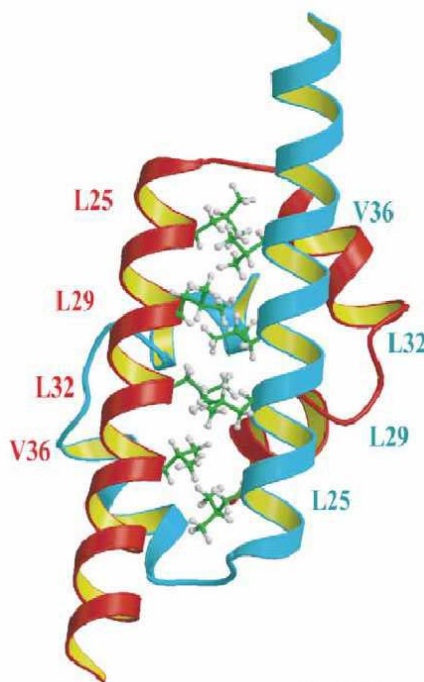


Figura 1.2.1.2.1b Estructura del domini d'oligomerització d'H-NS (N-terminal) segons Bloch *et al.* (2003). Es mostren els dos protòmers en blau i vermell respectivament i es detallen els aminoàcids implicats en la interacció.

Per a l'oligomerització en primer lloc es formaria la unitat estructural (el dímer) que és dependent de la concentració, la temperatura i els tipus de cations del medi (Smyth *et al.*, 2000). A continuació es formen els oligòmers, en els quals el nombre d'unitats és proporcional a la concentració, facilitant d'aquesta manera la compactació del DNA. L'estat d'oligomerització que presenta H-NS en la cèl·lula és incert i existeix controvèrsia, encara que sembla que es trobaria formant predominantment

dímers o estructures oligomèriques sempre de nombres parells (Ueguchi *et al.*, 1996; Smyth *et al.*, 2000).

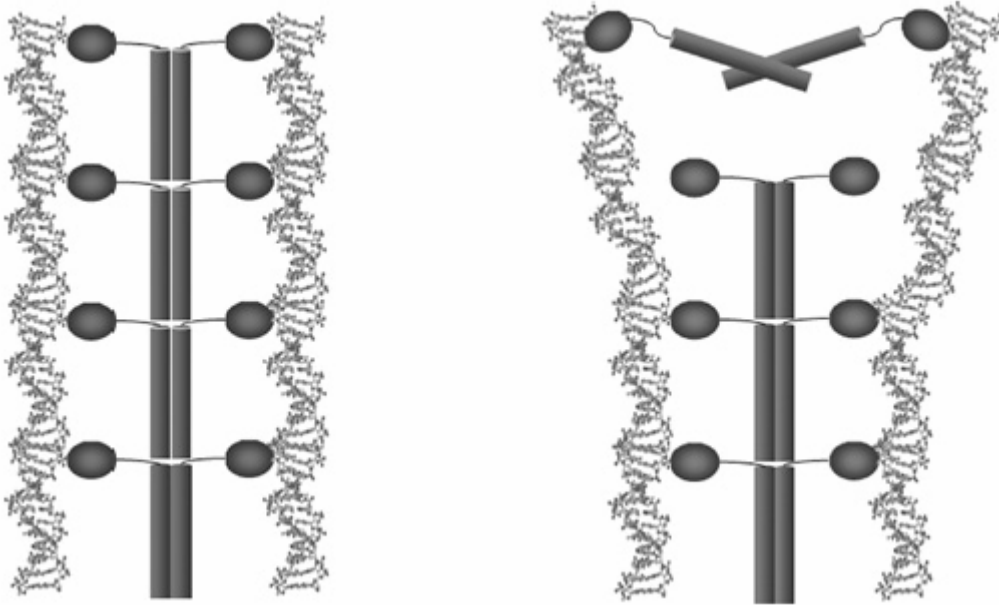


Figura 1.2.1.2.1c Representació del mecanisme proposat de la resposta d'H-NS a l'increment de temperatura de 25°C a 37°C. A la dreta, H-NS a 25°C és capaç d'unir-se a les dues cadenes de DNA de manera cooperativa formant oligòmers, on hi intervé tant la regió d'oligomerització com la regió flexible. A la dreta, és mostra el canvi conformacional sofert per primer dímer d'H-NS al incrementar la temperatura a 37°C. El dímer ja no és capaç de formar oligòmers de major nombre, i per tant interacciona amb el DNA de forma no cooperativa. Això afecta a la topologia del DNA i a més el fa més accessible a la RNA polimerasa (extret de Ono *et al.*, 2005).

Tot i que el domini N-terminal es defineix com el domini d'oligomerització, s'ha descrit que els primers 20 aminoàcids del domini N-terminal són els responsables de la repressió/silenciament genètic (mutacions en aquests aminoàcids eviten la formació de oligòmers d'elevat ordre). A més aquesta zona participaria també juntament amb el domini C-terminal en el reconeixement de les regions corbades i per tant de la unió al DNA (Dorman, 2004). Treballs de Bloch *et al.*, (2003) estan d'acord amb aquesta hipòtesi.

1.2.1.2.2 Domini C-terminal: domini d'unió al DNA

El domini d'unió al DNA d'H-NS es troba situat en l'extrem C-terminal de la proteïna i inclouria de l'aminoàcid 90 al 137 (Shindo *et al.*, 1995).

La proteïna H-NS no té una regió consens d'unió al DNA, però no obstant això s'uneix preferencialment a regions del DNA corbades riques en seqüències A+T (Yamada *et al.*, 1990; Owen-Hughes *et al.*, 1992; Ueguchi *et al.*, 1993). A més els promotors regulats per H-NS sempre presenten més d'un lloc d'unió per a la proteïna, per exemple en la regió reguladora el gen *virF* de *Shigella* (Falconi *et al.*, 1998), o en el cas del promotor del gen *proU* d' *E. coli* (Owen-Hughes *et al.*, 1992). També en el cas de l'operó *hly* s'han descrit dos llocs d'unió d'H-NS a la regió reguladora (Madrid *et al.*, 2002b). La situació espacial d'aquests diferents llocs d'unió és molt important perquè H-NS actuï sobre la conformació del DNA.

L'estructura del domini C-terminal de la proteïna H-NS va ser identificada per primera vegada per Shindo *et al.* (1995) (Figura 1.2.1.2.2.). Es creu que les regions que estarien directament implicades en la unió amb el DNA serien les que formen el "loop" 2 i que es troben entre unes estructures secundàries rígides (hèlix α i làmina). A l'observar aquesta estructura tridimensional es pot observar una protuberància (que comprèn de l'aminoàcid 108 al 116) precisament en la regió de "loop" 2 que donaria suport a la idea que aquesta regió és la implicada en el reconeixement del DNA (Ueguchi *et al.*, 1996). A més el motiu TWTGXGRXP (on X pot ser qualsevol aminoàcid) present en aquesta regió es troba altament conservat en la família de proteïnes H-NS (Dorman *et al.*, 1999). En la revisió de Dorman (2004) s'indica que l'aminoàcid 109 (Triptòfan) estaria íntimament relacionat amb la interacció amb el DNA i l'aminoàcid 116 (Prolina) amb el reconeixement de regions corbades o no corbades i produir curvatures en el DNA (fortament dependent de l'estat d'oligomerització). També s'ha observat que després de l'associació amb el DNA es poden induir estructures secundàries en "el loop" 1 (Shindo *et al.*, 1995).

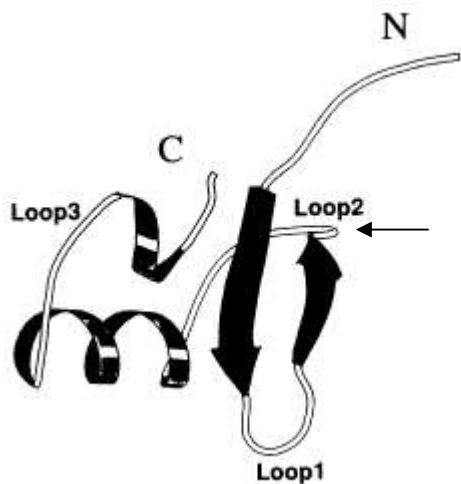


Figura 1.2.1.2.2 Estructura tridimensional del domini C-terminal de la proteïna H-NS (aminoàcids 90-137) on es mostren les làmines i les hèlix. Es mostren les “loops” de l’estructura i la fletxa marca els residus T108-P116 del “loop” 2. (Extret de Shindo *et al.*, 1995).

La presència de la regió connectora flexible permet que el domini C-terminal existeixi com un domini independent i pugui rotar lliurement (Smyth *et al.*, 2000). A més, encara que el domini no presenta cap funció en l’oligomerització de la proteïna, la unió sola de la proteïna al DNA no és suficient per a produir el silenciament o repressió transcripcional, sinó que també són importants els primers 20 aminoàcids del domini N-terminal, com ja s’ha indicat (revisió Dorman, 2004). El fet que el domini C-terminal tingui poca afinitat pel DNA (Shindo *et al.*, 1995) suggereix que és important la cooperació de la proteïna i per tant la formació d’oligomers per a millorar l’afinitat. Per altra banda la interacció amb el DNA es veu afavorida per l’estructura “coiled-coil” del domini d’oligomerització que exposa càrregues negatives que tenen tendència a oposar-se al DNA (Esposito *et al.*, 2002). En alguns models d’interacció es formaria un filament tipus bastó on els llocs d’unió al DNA quedarien exposats per a facilitar la seva unió al DNA. D’aquesta manera H-NS podria unir dos dúplex d’ADN i actuar com una cremallera formant una estructura corbada en el DNA (Figura 1.2.1.2.2) (Dame *et al.*, 2002).

1.2.1.3 Modulació de l’expressió gènica per H-NS

La proteïna H-NS és considerada un modulador global de l’expressió gènica en resposta a canvis ambientals que afecta a la transcripció, ja sigui de forma directa o indirecta, d’un 5% dels gens d’*E. coli* (Hommais *et al.*, 2001).

Diversos autors han proposat dos mecanismes moleculars a través dels quals es podria produir la regulació de la transcripció per part de la proteïna H-NS. Aquests dos mecanismes es coneixen com a silenciament transcripcional (Göransson *et al.*, 1990) i repressió via topologia del DNA (Hulton *et al.*, 1990; Tupper, *et al.*, 1994). Els dos models no són necessàriament excloents.

Ambdós models tenen una característica en comuna: la proteïna H-NS s'uneix a unes determinades regions o llocs específics que es corresponen amb zones corbades del ADN, riques en A+T, i normalment relacionades amb els promotors dels gens. Existeix més d'un lloc d'unió per a H-NS en els diferents promotors tant abans com després d'aquests. A continuació es produeix un recobriment al llarg de la seqüència del DNA a través de la nucleació i polimerització de molècules d'H-NS (Williams i Rimsky, 1997). Aquest recobriment és el responsable del control de l'activitat del promotor.

En canvi, els dos models difereixen en com el complex H-NS/ADN pot afectar a l'activitat de la RNA polimerasa.

En el cas del model denominat silenciament transcripcional H-NS actua directament com a repressor transcripcional a causa de la seva habilitat per a polimeritzar linealment sobre el DNA i impedir la correcta unió de la polimerasa, ja sigui per captura o per oclusió del lloc d'unió (Williams i Rimsky, 1997). Aquesta repressió de la transcripció per part d'H-NS no es produeix de forma indefinida, sinó que determinades senyals ambientals (com la temperatura o l'osmolaritat) o diferents factors de transcripció (com la proteïna Fis) poden contribuir a la disrupció dels complexos repressors (Dorman i Deighan, 2003). La figura 1.2.1.3 mostra un esquema del possible model de silenciament transcripcional. Aquest model és el proposat per a la regulació del gen *virF* de *S. flexneri* (Falconi *et al.*, 1998) o per a l'operó hemolític d'*E. coli* (Madrid *et al.*, 2002a).

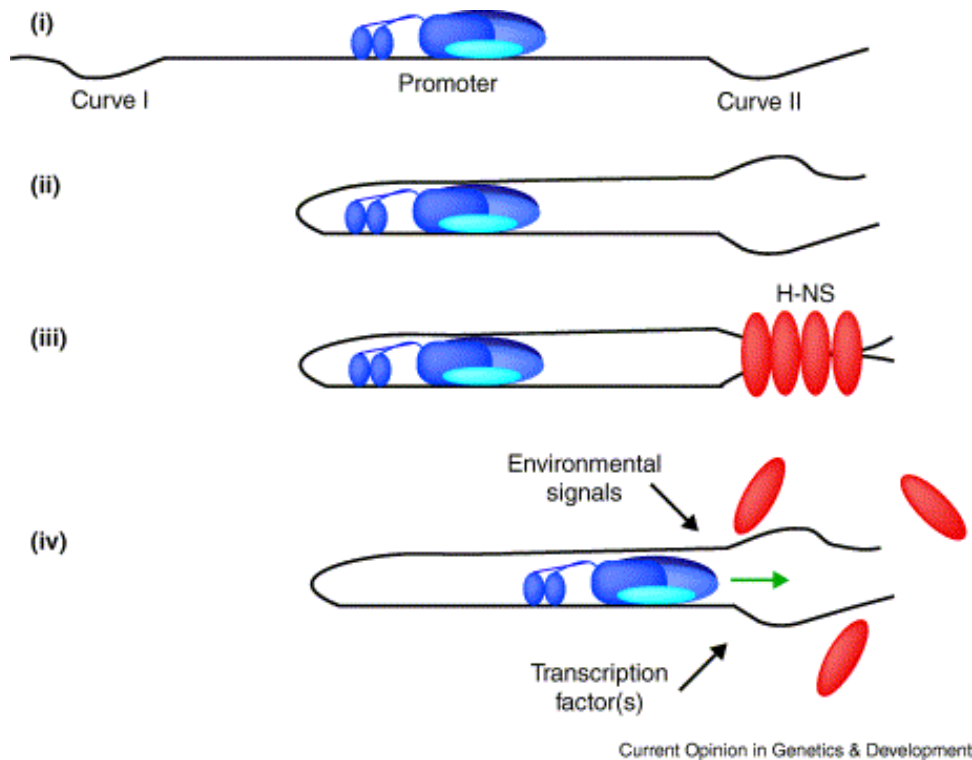


Figura 1.2.1.3 Repressió de la transcripció per H-NS. i) la seqüència d'unió de la RNA polimerasa està flanquejada per regions de curvatures intrínseques; ii) el DNA embolcalla la RNA polimerasa, proporcionant proximitat a les regions corbades; iii) H-NS s'uneix a les regions corbades donant com a resultat un complex nucleoproteic que atrapa la RNA polimerasa a l'estadi inicial de la transcripció, reprimint el promotor; vi) la formació del complex de repressió es desfà degut a senyals ambientals (com elevada temperatura) o per l'acció de factors de transcripció activadors (extret de Dorman i Deighan, 2003).

El model de repressió via topologia del DNA deriva de l'observació que H-NS pot actuar directament sobre la topologia del ADN, produint canvis conformationals a nivell local. Les curvatures causades impedeixen la unió correcta al promotor d'altres proteïnes, factors de transcripció i sobretot de la RNA polimerasa (Hulton *et al.*, 1990). Està descrit que molts promotors són sensibles al superenrotllament del DNA i que un augment de la flexibilitat pot promoure l'activitat d'un promotor (Tupper *et al.*, 1994). En aquest cas, la formació del complex nucleoproteic H-NS/ADN podria provocar una disminució de la flexibilitat d'aquest, i aquesta rigidesa del promotor impediria que es portés a terme la transcripció del gen. A més aquests complexos també eviten la formació d'un complex actiu entre la RNA polimerasa i la

seqüència del DNA (Spassky *et al.*, 1984; Rimsky *et al.*, 2001; Schröder i Wagner, 2002).

H-NS per tant afecta a la condensació del DNA tant *in vivo* com *in vitro* (Spassky *et al.*, 1984; Tupper *et al.*, 1994) i en aquest procés és important el fenomen d'oligomerització cooperativa al llarg del DNA. Per altra banda també influeix el fet que H-NS pot unir-se a zones específiques o inespecífiques, formant diferents complexos amb el DNA. Finalment, la manera com H-NS afecta a l'expressió d'un gen depèn de la sensibilitat que presenti cada promotor determinat al superenrotllament.

H-NS pot actuar com un sensor de canvis ambientals com la temperatura, l'osmolaritat o la anaerobiosi regulant així l'expressió de diferents gens. A més aquests factors ambientals també afecten al superenrotllament del DNA *in vivo*.

De tots els gens que es troben directa o indirectament afectats per la proteïna H-NS un 35 % formen part de l'embolcall cel·lular o estan regulats en funció dels canvis ambientals (osmolaritat, temperatura, pH o disponibilitat d'oxigen). Un 20 % està implicat en la fase o la taxa de creixement i codifiquen per a proteïnes implicades en l'aparell transcripcional o traduccional. Per altra banda un 34 % dels gens afectats per la proteïna H-NS són de funció desconeguda, indicant que encara resten molts aspectes de la regulació per part d'aquesta proteïna que no es coneixen (Hommais *et al.*, 2001). Recentment, Ono *et al.*, (2005) han determinat els gens expressats diferencialment en resposta a la temperatura a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, i han observat que la termoregulació del 77% d'aquests gens és dependent de la proteïna H-NS.

En molts bacteris patògens, quan augmenta la temperatura per contacte amb el mamífer hoste, es produeix una resposta que implica l'expressió de factors de virulència. Una propietat d'H-NS és la seva habilitat per a regular gens en resposta a diferents temperatures. Aquest és el cas dels gens de l'operó hemolític o del promotor *virF*. És bastant comú que les funcions de virulència bacteriana estiguin regulades per factors ambientals per tal de ser expressades en el moment adequat.

Els nivells d'H-NS es mantenen constants, no varien dependent de factors ambientals (Hulton *et al.*, 1990). Per això és possible que els canvis ambientals produeixin modificacions en la proteïna que influeixin en la seva interacció amb el DNA o altres components de la cromatina. Els canvis en la topologia produïts serien els responsables dels canvis en l'expressió gènica. Un fet similar es pot observar en

les histones eucariotes, les quals es modifiquen mitjançant fosforilacions reversibles i acetilacions que afecten a la seva unió amb el DNA (Norton *et al.*, 1989; Hill *et al.*, 1990). S'ha proposat que canvis en la temperatura o l'osmolaritat eviten la polimerització d'H-NS al llarg del DNA (Dorman i Deighan, 2003).

En general, la proteïna H-NS es considera un regulador negatiu de la transcripció, o sigui, un repressor o silenciador. Mutacions en el gen *hns* causen la desrepressió de nombrosos gens (Atlung i Ingmer, 1997). Encara que no hi ha evidències clares que la proteïna H-NS actuï de forma directa com activador transcripcional (a diferència del que passa amb altres proteïnes associades al nucleoide, com Fis), sí que existeixen diferents exemples d'activació. S'ha mostrat que H-NS influeix positivament sobre la mobilitat bacteriana encara que aquest fet no és necessàriament un reflex d'un paper directe d'aquesta proteïna com activador transcripcional. D'una banda, H-NS és repressor del gen *hdfR* que codifica per a una proteïna tipus LysR que regula negativament el promotor de l'operó flagel·lar *flhDC*, és a dir, en absència d'H-NS augmenta el producte d'*hdfR* i per tant es redueix l'expressió de l'operó flagel·lar. A més, el promotor de *flhDC* també està subjecte a una repressió directa per part d'H-NS. Per altra banda sembla que H-NS és capaç d'interaccionar directament amb la proteïna motor flagel·lar, FliG, incrementant la seva funció (Dorman, 2004).

A part de la regulació de l'expressió gènica, H-NS també participa en altres processos cel·lulars com ho demostra el fet que els mutants *hns* presenten fenotips pleiotròpics. Aquests mutants presenten processos de recombinació il·legítims, presenten freqüències de transposició alterades i delecions cromosòmiques (Lejeune i Danchin, 1990; Falconi *et al.*, 1991). També participa en els processos de replicació i cicle cel·lular. Finalment la proteïna H-NS també actua a nivell post-transcripcional, jugant un paper important en l'estabilitat del mRNA o l'eficiència de traducció (Yamashino *et al.*, 1995; Deighan *et al.*, 2000).

1.2.2 LA PROTEÏNA STPA: PARÀLOGA DE H-NS

La proteïna StpA (Suppressor of *td-* mutant Phenotype A) va ser identificada per Zhang i Belfort (1992), com a supressora multicòpia del fenotip Td⁻ dels fags T4 defectius en el processament d'introns. Posteriorment, StpA va ser també identificada

per la seva habilitat, quan es troba sobreexpressada, de complementar alguns fenotips d'un mutant *hns* (Shi i Bennett, 1994). Un exemple és la seva capacitat de reprimir l'expressió del gen *adi* en aquest mutants (Shi i Bennett, 1994).

StpA presenta un 58 % d'identitat i un 67 % de similitud a nivell de seqüència proteica amb H-NS. La identitat és major en l'extrem C-terminal (73 % fins al residu 91) que en l'extrem N-terminal (51 % fins al residu 90) (Cusick i Belfort, 1998). Les dues proteïnes presenten una organització estructural similar i es consideren paràlogues.

El gen *stpA* es localitza en el minut 60,24 del mapa genètic d'*E. coli* (Berlyn *et al.*, 1996) i codifica per a una proteïna de 134 aminoàcids i 15'3 kDa (Zhang *et al.*, 1995). La proteïna StpA és bastant més bàsica que la proteïna H-NS, ja que el seu pI teòric és de 9,08 mentre que el d'H-NS és de 5,25.

Donada l'elevada similitud entre ambdues proteïnes, no és d'estranyar que presentin molts paral·lelismes funcionals encara que també presenten algunes característiques diferents. Ambdues proteïnes es troben localitzades per tot el nucleoide (Ali Azam *et al.*, 1999), actuen com repressors transcripcionals, són capaços de compactar el DNA, unir-se a regions corbades d'aquest i inhibir la transcripció (Zhang *et al.*, 1996).

Ambdues proteïnes tenen activitat xaperona del RNA *in vitro*, de fet la proteïna StpA va ser descrita inicialment com a xaperona de RNA, ja que facilita la seva correcta conformació (Zhang *et al.*, 1995). Aquesta activitat resideix en l'extrem C-terminal de la proteïna (Cusick i Belfort, 1998) i és unes 10 vegades més eficient que la proteïna H-NS (Zhang *et al.*, 1996).

Una altra diferència entre les dues proteïnes es troba en els seus patrons d'expressió. Mentre que l'expressió de StpA és dependent de la fase de creixement, els nivells d'H-NS es mantenen més o menys constants. Els nivells de StpA es mantenen baixos a l'inici de la fase exponencial en medi ric però augmenten un 50 % en fases posteriors (Free i Dorman, 1997).

La transcripció del gen *stpA* està molt condicionada pels canvis en els factors ambientals. El promotor d'aquest gen és molt sensible als canvis que es produeixen en la topologia del DNA pels factors ambientals. StpA es troba fortament induïda en condicions d'estrès osmòtic, augment de temperatura (Free i Dorman, 1997) i creixement en medi mínim. En aquest últim cas, aquesta inducció és dependent de la

proteïna Lrp (Leucine-responsive Regulatory Protein) ja que la presència de leucina en el medi inhibeix la seva expressió (Sondén i Uhlin, 1996).

StpA i H-NS regulen la seva pròpia expressió i al mateix temps regulen l'expressió de l'altra, és a dir, mantenen una regulació creuada i simultània que permet mantenir la concentració adequada de cada proteïna (Zhang *et al.*, 1996). En mutants *hns*, l'expressió de *stpA* es troba molt augmentada. En alguns casos, com en l'operó *bgl*, pot compensar les funcions d'H-NS (Free *et al.*, 1998). De totes maneres, els nivells de StpA en el mutant *hns*, mai arriben als nivells d'H-NS d'una soca salvatge (Sonnenfield *et al.*, 2001).

Els nivells de StpA també es troben regulats a través de la seva degradació per la proteasa Lon. La proteasa Lon té la capacitat de degradar a la proteïna StpA quan aquesta no es troba unida a H-NS (Johansson i Uhlin, 1999). La protecció per part d'H-NS es produeix per interacció directa entre ambdues proteïnes (Johansson *et al.*, 2001), el que indica que StpA es troba de forma predominant formant heterodímers amb H-NS.

La proteïna StpA pot actuar directa o indirectament en l'expressió de diversos gens reprimint-los o fins i tot activant gens que també estan regulats per H-NS, encara que la seva capacitat per a competir amb la RNA polimerasa és menor que en el cas d'H-NS (Rimsky *et al.*, 2001). No es coneixen exemples clars de gens regulats únicament per StpA i a més no tots els gens regulats per H-NS ho són també per StpA (Zhang *et al.*, 1996). Alguns dels operons regulats conjuntament són *pap*, *hns*, *proU*, *bgl* i *malT* (Sondén i Uhlin, 1996; Johansson *et al.*, 1998).

Encara que StpA pot unir-se amb més especificitat al DNA (de 4 a 6 vegades), H-NS té un paper dominant, potser a causa dels seus nivells d'expressió més que a la seva activitat intrínseca (Zhang *et al.*, 1996; Sonnenfield *et al.*, 2001).

1.2.3 H-NS INTERACCIÓ AMB ALTRES PROTEÏNES

H-NS presenta una gran versatilitat en la seva funció reguladora, és capaç de controlar una gran varietat de gens. Per a això és important la seva capacitat d'unir-se al DNA de diferents formes però també la interacció amb una gran varietat de proteïnes reguladores.

Entre les proteïnes que interaccionen amb H-NS es troben les seves proteïnes paràlogues StpA (Williams *et al.*, 1996) i Sfh (Deighan *et al.*, 2003). Ambdues poden formar heterodímers amb H-NS i/o compensar parcialment les funcions d'H-NS en un mutant *hns* (Shi i Bennett, 1994; Deighan *et al.*, 2003). S'ha descrit que la interacció entre StpA i H-NS es produeix a través de l'extrem N-terminal d'ambdues proteïnes (Williams *et al.*, 1996). Altres autors han proposat uns dominis d'interacció diferents que inclourien la part C-terminal de la proteïna i que plantejarien l'existència de diferències entre la homodimerització d'H-NS i la heterodimerització entre H-NS i StpA. Aquest fet podria alterar l'habilitat de les dues proteïnes per a unir-se el DNA (Johansson *et al.*, 2001).

H-NS també interacciona amb el regulador post-transcripcional Hfq (proteïna d'unió al RNA) i juntament amb DrsA participarien en la regulació de *rpoS* (Muffler *et al.*, 1996).

La interacció forta entre la proteïna H-NS i el producte gènic 5.5 del fag T7 suprimeix l'activitat inhibidora d'H-NS en la transcripció tant *in vivo* com *in vitro* (Liu i Richardson, 1993).

A part de les interaccions amb paper en la regulació a nivell transcripcional, H-NS també interacciona directament amb la proteïna motora flagel·lar FliG i aquesta interacció és important per a l'activitat funcional d'aquesta proteïna motora (revisat Dorman, 2004).

H-NS també és capaç d'interaccionar amb la proteïna Hha, formant un complex nucleoproteic que intervé en la termoregulació de l'operó *hly* d'*E. coli* (Nieto *et al.*, 2000), així com amb el seu paràleg, la proteïna YdgT (Paytubi *et al.*, 2004).

1.3 LA FAMÍLIA DE PROTEÏNES HHA/YMOA

La família de proteïnes Hha/YmoA inclou proteïnes petites (al voltant de 8 kDa) i moderadament bàsiques que participen, entre altres processos, en la termo- i osmoregulació de l'expressió gènica (Cornelis *et al.*, 1991; Nieto *et al.*, 1991; Mouriño *et al.*, 1996).

1.3.1 LES PROTEÏNES HHA I YMOA

La proteïna Hha (High Hemolytic Activity) va ser identificada a *E. coli* com un modulador de l'expressió de la toxina α -hemolisina (Godessart *et al.*, 1988; Nieto *et al.*, 1991). Es tracta d'una proteïna petita, 8'6kDa, 72 aminoàcids i que es troba codificada pel gen *hha*, localitzat en el minut 10'5 del genoma d'*E. coli*.

A nivell estructural es tracta d'una proteïna amb motius “hèlix-turn-hèlix”. Aquests motius són típics d'altres proteïnes d'unió al DNA en bacteris (Yee *et al.*, 2002), però la proteïna Hha no té seqüències consens específiques d'unió al DNA (Nieto *et al.*, 1991). En la figura 1.3.1 es mostra l'estructura tridimensional de la proteïna Hha.



Figura1.3.1 Estructura tridimensional de la proteïna Hha. En vermell s'indiquen les estructures -hèlix. Extret de Yee *et al.*, 2002.

El gen *hha* presenta uns nivells de transcripció i expressió més elevats en fase exponencial i decreix quan les cèl·lules arriben a fase estacionària. Precisament en fase exponencial, quan les cèl·lules bacterianes creixen activament, l'osmolaritat del medi de creixement influeix en els nivells intracel·lulars d'Hha. Els nivells d'Hha també depenen de la temperatura, sent més elevats a 37 que a 25°C (Mouriño *et al.*, 1998).

En resposta a canvis ambientals, com la temperatura i l'osmolaritat, Hha pot afectar a l'expressió de diferents gens. A continuació es descriuen alguns d'aquests gens i els seus efectes:

- L'operó *hlyCABD*, que veu incrementada la síntesi de hemolisina (HlyA) (Godessart *et al.*, 1988).

- Diferents proteïnes heteròlogues presenten una síntesi incrementada en *E. coli* com l'aerolisina d'*Aeromonas hydrophila* (Nieto *et al.*, 1991), una endonucleasa de *Clostridium cellulolyticum* (Blanco *et al.*, 1991).

- La toxina CNF2 i l'antigen de superfície (plàsmid Vir) veuen incrementada la seva expressió en funció de la temperatura (Mouriño *et al.*, 1996).

- Diversos gens presenten reprimida la seva expressió depenent de l'osmolaritat, entre ells el gen que codifica per a la proteïna de membrana externa OmpA, l'enzim *crr/IIA^{Glc}* del sistema PTS (sistema fosfotransferasa) i *ahpC* (Alquil superòxid reductasa) membre del reguló d'estrès per l'ió superòxid (Balsalobre *et al.*, 1999).

- La proteïna Hha també s'ha descrit en *Salmonella Typhimurium* (Fahlen *et al.*, 2000) i la mutació *hha* provoca un increment de la transcripció depenent d'osmolaritat i de disponibilitat d'oxigen del gen *hilA* (codifica un activador transcripcional requerit per a la invasió i regulat per factors ambientals).

La proteïna Hha mostra una elevada homologia (82%) amb la proteïna YmoA de *Yersinia enterocolitica* (De la Cruz *et al.*, 1992). La proteïna YmoA, de 8 kDa, es va identificar com un modulador de l'expressió dependent de temperatura de diversos factors de virulència a *Y. enterocolitica*: les proteïnes Yop (Yersinia Outer Proteins) codificades pel reguló *yop*, i l'adhesina YadA (Yersinia Adhesin A) (Cornelis *et al.*, 1991). YadA és la principal adhesina de *Y. enterocolitica* implicada en la unió a cèl·lules eucariotes, i per tant en la colonització de l'intestí. L'adhesina YadA té també una funció protectora front l'acció bactericida del sèrum humà. A través de l'adhesió a la cèl·lula hoste mitjançada per YadA, la bactèria podrà alliberar les proteïnes Yop.

Tant el reguló *yop* com *yadA* es localitzen al plàsmid pYV, i en ambdós casos estan regulats per temperatura (Yother *et al.*, 1986; Cornelis *et al.* 1987; Cornelis *et al.*, 1989). És a dir, la síntesi de les proteïnes Yop i de l'adhesina YadA es produeix a 37°C, però està reprimida a baixa temperatura. A mutants *ymoA*, la transcripció dels gens *yadA* i *yop* està desreprimida a baixa temperatura. A elevada temperatura, el nivell d'expressió d'aquests gens també està incrementat en mutants *ymoA* respecte a la soca salvatge (Cornelis *et al.*, 1991).

Tant mutants *hha* com mutants *ymoA* mostren un fenotip pleiotròpic: alteracions en el grau de superenrotllament de plàsmids, alteracions en la regulació de gens en funció de factors ambientals i un increment en la freqüència de transposició d'elements d'inserció (Cornelis *et al.*, 1991; Carmona *et al.*, 1993; Mouriño *et al.*,

1996; Mikulskis i Cornelis 1994; Balsalobre *et al.*, 1996). Aquest fenotip és similar al que presenten les cèl·lules amb nivells anormals de proteïna H-NS, de manera que es va suggerir que Hha i YmoA podrien ser representatives d'una nova família de proteïnes associades al nucleòide, que modulen l'expressió gènica per alteració de la topologia del DNA en resposta a estímuls ambientals (De la Cruz *et al.*, 1992). També s'ha demostrat que ambdues proteïnes són funcionalment intercanviables (Mikulskis i Cornelis, 1994; Balsalobre *et al.*, 1996), fet que indica que les dues proteïnes són membres d'una nova família de reguladors de l'expressió gènica bacteriana.

1.3.2 REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ D'HEMOLISINA PER HHA

Les soques uropatogèniques d'*E. coli* freqüentment són productores de la toxina α -hemolisina, una citotoxina extracel·lular considerada un factor de virulència (Welch *et al.*, 1981), que ha estat àmpliament estudiada per ser un dels pocs exemples de proteïnes secretades al medi per *E. coli* (Holland *et al.*, 1986).

L'hemolisina d'*E. coli* pertany a una àmplia família de toxines citolítiques que es troben en bacteris Gram-negatius denominada RTX (Repeats in Toxin) (Welch *et al.*, 1981; Menestrina *et al.*, 1994). Aquesta família inclou entre d'altres, la leucotoxina (LktA) de *Pasteurella haemolytica* (Strathdee i Lo, 1987) i l'adenilat ciclase (CyaA) de *Bordetella pertussis* (Glaser *et al.*, 1988). Les toxines pertanyents a aquesta família comparteixen diverses característiques a més de la presència d'una seqüència consens de 8 repeticions d'aminoàcids (repeticions RTX que donen nom a la família), com són la capacitat per a formar porus, l'activitat leucotòxica i l'organització gènica.

El determinant genètic responsable de la síntesi i secreció de la α -hemolisina és un operó altament conservat constituït per quatre gens *hlyCABD* (Figura 1.3.1.2) i que es troba localitzat tant a nivell cromosòmic com plasmídic (Goebel i Schrempf, 1971; O'Hanley *et al.*, 1993). Un dels millors caracteritzats és el del plàsmid pHly152, que pertany al grup d'incompatibilitat IncJ2 (Noegel *et al.*, 1981).

L'operó hemolític (*hly*) té una longitud aproximada de 7 kb i està formada pels gens *hlyC*, *hlyA*, *hlyB*, *hlyD*. El gen *hlyA* codifica per a un polipèptid (pre-hemolisina) de 110 kDa que és activat mitjanant una acilació pel producte gènica del gen *hlyC*

(Hardie *et al.*, 1991; Issartel *et al.*, 1991). En el gen *hlyC* es troba una seqüència denominada *hlyM*, d'unes 200 pb, que s'ha descrit que participa en la modulació de l'expressió de l'hemolisina (Jubete *et al.*, 1995). La secreció de la toxina activa HlyA al medi extern és depenent de les proteïnes HlyB i HlyD (Braun *et al.*, 1993), que pertanyen al sistema de secreció de tipus I.

Com s'ha comentat en l'apartat anterior l'expressió de la toxina α -hemolisina d'*E. coli* està regulada per diferents condicions ambientals. En condicions d'elevada osmolaritat, baixa temperatura o en anaerobiosis, la síntesi de la hemolisina es veu reprimida (Mouriño *et al.*, 1994). La regulació del operó *hly* és complexa i existeixen més regions implicades a part de la regió promotora (revisió Madrid *et al.*, 2002b).

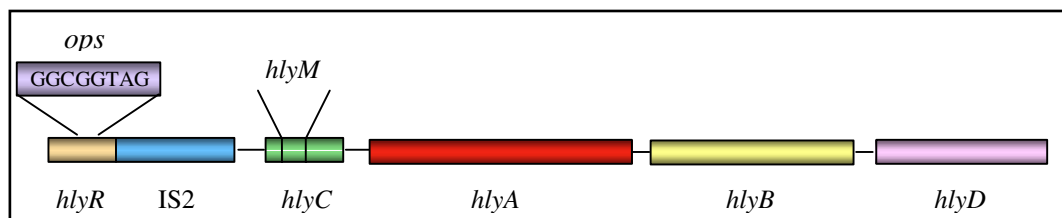


Figura 1.3.2 Estructura del determinant hemolític *hlyCABD* del plàsmid pHly152. Es pot observar la regió reguladora i la regió codificant de l'operó.

Quan es va analitzar la seqüència reguladora de l'operó *hly* present en el plàsmid pHly152, es va observar que inclou la seqüència *hlyR* (Vogel *et al.*, 1988). Aquesta seqüència de 669 pb es troba localitzada a unes 1'5 kpb abans de l'inici del primer gen de l'operó (*hlyC*) i és essencial per a la correcta expressió de l'operó. Quan aquesta seqüència no es troba present, com és el cas del plàsmid pANN202-312 (Godessart *et al.*, 1988) l'expressió de l'operó es troba notablement reduïda (sobretot en el cas dels gens *hlyB* i *hlyD*) malgrat trobar-se en un elevat nombre de còpies (Vogel *et al.*, 1988). A més, a *hlyR* es troba la seqüència moduladora *ops* (Operon Polarity Supresor) de 8 pb (Nieto *et al.*, 1996). Aquest element es troba àmpliament distribuït entre els bacteris Gram-negatius (Nieto *et al.*, 1996) i és un anti-terminador que es localitza en la seqüència no codificant anterior als operons i que actua eliminant la polaritat de la transcripció.

La transcripció de l'operó *hlyCABD* produeix dos transcrits diferents, un majoritari de 4'0 kb (*hlyCA*) i un minoritari de 8'0 kb (*hlyCABD*). L'existència d'aquests dos transcrits explicaria la major afectació dels gens *hlyB* i *hlyD* en absència

de la regió *hlyR*. Ambdós transcrits s'inicien en el mateix promotor situat 400 pb abans del gen *hlyC*, però la transcripció és fortament polar, fenomen accentuat per la formació d'una estructura corbada del DNA ("Stem-loop") entre els gens *hlyA* i *hlyB* que actuaria de terminador (Welch i Pellett, 1988; Koronakis *et al.*, 1988). Es creu que el transcrit policistrònic *hlyCABD* s'origina a l'evitar-se la terminació de la transcripció que habitualment té lloc en aquest terminador rho-independent, fent que el transcrit *hlyCA* sigui més estable (Hess *et al.*, 1986; Welch i Pellett, 1988; Koronakis *et al.*, 1988).

S'ha demostrat que altres gens no pertanyents a l'operó *hly* estan implicats en la síntesi i secreció de la hemolisina. El gen *tolC* intervé en la secreció de la toxina al medi (Wandersman i Delepelaire, 1990) i el producte del gen *rfaH* (*hlyT* o *srfB*) ha estat caracteritzat com activador transcripcional de la síntesi i secreció de la toxina (Bailey *et al.*, 1992).

Com s'ha comentat, el gen *hha* va ser identificat com a modulador de l'expressió de la α -hemolisina. El gen *hha* es va identificar en soques d'*E. coli* portadores del plàsmid pANN202-312, en què hi manca la seqüència *hlyR*, ja que la mutació *hha* restablia els nivells esperats de producció d'hemolisina, tant a nivell extern com intern. Tot i l'absència de la regió reguladora *hlyR* en aquest plàsmid, s'obtenien nivells similars als de la soca portadora del plàsmid pANN202-312R, que sí incorpora la regió reguladora (Nieto *et al.*, 1991).

1.3.3 INTERACCIÓ DE LA PROTEÏNA HHA AMB LA PROTEÏNA H-NS PER MODULAR L'EXPRESSIÓ GÈNICA

Com ja s'ha comentat en apartats anteriors, la proteïna Hha modula l'expressió gènica de l'operó *hly*. Per estudiar el mecanisme d'aquesta regulació es va purificar la proteïna Hha i es va analitzar la seva capacitat per unir-se a les regions reguladores de l'operó hemolític. Es va poder demostrar que Hha s'uneix a les regions reguladores, si bé aquesta unió és no específica, ja que és de baixa afinitat i a més, es requereixen grans quantitats de la proteïna per a la formació dels complexos nucleoproteics (Nieto *et al.*, 2000).

La pobra unió d'Hha al DNA va plantejar la hipòtesi que potser per a la regulació de l'operó *hly* era necessària la intervenció d'altres factors que s'unissin al

DNA. Estudis de possibles interaccions d'Hha amb altres proteïnes, van demostrar que Hha interacciona fortament amb la proteïna H-NS d'*E. coli*. La interacció d'ambdues proteïnes suggereix que estan implicades de forma conjunta en la modulació de l'expressió gènica (Nieto *et al.*, 2000; Madrid *et al.*, 2002a).

La proteïna H-NS és capaç d'unir-se a la regió reguladora de l'operó *hly* de forma específica. La quantitat de la proteïna H-NS necessària per a formar els complexos nucleoproteics és molt menor que la d'Hha. A més quan s'utilitzen ambdues proteïnes juntes (Hha i H-NS) els complexos formats són diferents als formats per cadascuna de les proteïnes per separat (Nieto *et al.*, 2000; Madrid *et al.*, 2002a).

Quan s'analitza l'expressió de l'hemolisina en mutants *hha* i *hns*, en ambdós es produeix la desrepressió parcial de la toxina (a elevada osmolaritat i baixa temperatura) que a més és màxima en el doble mutant (Nieto *et al.*, 2000), suggerint que el complex format per Hha, H-NS i el DNA està implicat en la termo- i osmoregulació de l'operó *hly*.

Prenent el model proposat per Madrid *et al.* (2002a), la proteïna Hha actuaria més com a proteïna d'unió a proteïna que no pas com a proteïna d'unió al DNA. En aquest model es proposa que a baixa temperatura H-NS té una elevada afinitat pels seus llocs d'unió en la regió reguladora de l'operó hemolític, formant complexos nucleoproteics amb ajuda de la proteïna Hha.

S'han definit els llocs d'unió de la proteïna H-NS a l'operó *hly* (Madrid *et al.*, 2002b). Un d'ells (site I) es localitza dins de la seqüència reguladora *hlyR* i l'altre (site II) se solapa parcialment amb la regió promotora de l'operó. Ambdós llocs es troben separats per l'element d'inserció IS2 i una zona de curvatura intrínseca (Figura 1.3.3). Encara no s'ha clarificat el paper de IS2 en la regulació de l'operó *hly*.

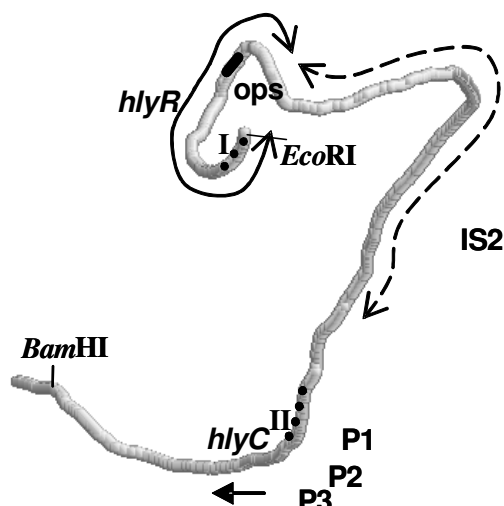


Figura 1.3.3 Predicció *in silico* de la curvatura de la regió reguladora de l'operó *hly*. I i II indiquen els llocs d'unió d'H-NS. Extret de Madrid *et al.*, 2002b.

La presència d'una regió corbada entre els llocs d'unió d'H-NS al DNA ja s'havia descrit per a altres gens reprimits per aquesta proteïna, de forma dependent (*virF*) o independent (*espA*) de la temperatura (Brandi *et al.*, 1999; Falconi *et al.*, 1998).

L'afinitat d'H-NS pel DNA varia en funció de la temperatura i és més elevada a baixa temperatura. Aquest fet concorda amb les dades d'expressió de l'hemolisina en mutants *hns*, i el fet de que la repressió de l'expressió d'aquest operó per part d'H-NS és més eficient a baixa temperatura. La flexibilitat del DNA també augmenta a baixa temperatura (augment del grau de superenrotllament del DNA) permetent el contacte entre molècules d'H-NS per a la generació d'un complex nucleoproteic major. Aquest complex provocaria l'oclusió de la seqüència *ops* i de la regió promotora, reprimint la transcripció i eliminant l'efecte anti-terminador de l'element *ops*. Existeix un equilibri entre l'afinitat d'H-NS pels seus llocs d'unió i l'efecte de la temperatura, de manera que es dona un procés modulad.

La proteïna YmoA de *Y. enterocolitica* també interacciona amb H-NS d'*E.coli*, i mitjançant l'anàlisi d'interacció de proteïnes, s'ha identificat la proteïna H-NS de *Y. enterocolitica*, precisament per la seva unió a YmoA (Nieto *et al.*, 2002).

Per tant, possiblement el mecanisme de regulació de l'expressió gènica mitjançant complexos nucleoproteics entre membres de les famílies Hha/YmoA i H-NS es pot fer extensiu a altres gèneres de bacteris Gram-negatius.

Un estudi de diverses mutacions puntuals o delecions de la proteïna Hha ha demostrat que la totalitat de la proteïna és necessària per a la unió a H-NS (Nieto *et al.*, 2002). Per una altra banda, l'anàlisi de l'homologia entre seqüències d'aminoàcids de proteïnes de la família Hha/YmoA, amb el domini d'oligomerització d'H-NS, han permès constatar que existeix un cert grau de similitud a nivell d'aminoàcids, a més de presentar una gran semblança en la mida. Aquest fet ha permès hipotetitzar que proteïnes de la família Hha/YmoA podrien ser considerades com a dominis d'oligomerització independents d'H-NS (Nieto *et al.*, 2002).

Els resultats de l'estudi de García *et al.* (2005), donen suport al paper d'Hha com un modulador de l'estat d'oligomerització d'H-NS. A més, s'ha suggerit un possible mecanisme pel qual els canvis ambientals afectarien a l'equilibri conformacional d'Hha, causant canvis en l'expressió dels gens controlats conjuntament amb H-NS.

1.3.4 ALTRES PROTEÏNES DE LA FAMÍLIA HHA/YMOA

Recentment, han estat descrits altres membres de la família Hha/YmoA, codificats tant a nivell cromosòmic com plasmídic (revisat a Madrid *et al.*, 2002b).

Mitjançant la cerca d'homologies amb Hha/YmoA, es va trobar una regió propera a la regió distal del promotor de l'operó *tra* en el plàsmid R100 de *E. coli*, que contenia una ORF putativa amb elevada homologia a Hha i YmoA (Nieto i Juárez, 1996). La proteïna resultant d'aquest gen es va anomenar RmoA. La mutació *rmoA* causa un augment en la freqüència de conjugació del plàsmid R100 en condicions de baixa osmolaritat (Nieto *et al.*, 1998). Aquest fet suggeria que la proteïna RmoA podia actuar com a modulador de la transferència plasmídica en resposta a determinats factors ambientals així com l'osmolaritat. En realitzar estudis de complementació però, es va poder determinar que ni Hha ni RmoA tenen la capacitat de complementar recíprocament les funcions entre elles (Nieto *et al.*, 1998). També ha estat identificada la proteïna RmoA al plàsmid pCTX-M3 de *Citrobacter freundii*.

La proteïna Hha també ha estat identificada al genoma de *Salmonella* Typhimurium, i s'ha relacionat amb la virulència (Fahlen *et al.*, 2001; McClelland *et al.*, 2001). El fenotip invasiu de soques de *Salmonella* està regulat per condicions ambientals. El gen *hila* es troba a l'illa de patogenicitat 1 (SPI-1) i codifica per un activador transcripcional que es requereix per a la invasió que està regulada ambientalment. Ha estat descrit que la proteïna Hha de *Salmonella* està implicada en la repressió del fenotip invasiu a través de la modulació en l'expressió d'*hila* en resposta a senyals ambientals (Fahlen *et al.*, 2001). De nou, la seqüenciació del genoma complert de *Salmonella* Tiphyl (Parkhill *et al.*, 2001) i *S. flexneri* (Jin *et al.*, 2002) també ha permès identificar Hha en aquests microorganismes.

La publicació de la seqüència complerta del genoma d'*E. coli* (Blattner *et al.*, 1997) va permetre identificar una hipotètica proteïna de 8,4 kDa, YdgT, que mostra un 38 % d'identitat i un 66 % de similitud a nivell d'aminoàcids amb la proteïna Hha. La posterior seqüenciació del genoma d'altres microorganismes com *S. tiphyl* (Parkhill *et al.*, 2001), *S. typhimurium* (McClelland *et al.*, 2001) i *S. flexneri* (Jin *et al.*, 2002) va permetre la identificació de la proteïna YdgT en altres enterobacteris. La proteïna YdgT d'*E. coli* té 71 aminoàcids i és capaç d'atenuar parcialment el fenotip dels mutants *hha*, com per exemple en el cas de l'operó hemolític (Paytubi *et al.*,

2004). Un altre fet que s'ha constatat és que en soques *hha* hi ha un increment significatiu de la transcripció del gen *ydgT*. Igual que Hha, YdgT també és capaç d'unir-se a H-NS (de forma més estable que no pas Hha) i a StpA, a més d'unir-se a la seva homòloga Hha (Paytubi *et al.*, 2004)

El plàsmid R446 d'*E.coli* conté la *orf5*, implicada en l'expressió dependent de temperatura d'un pili conjugatiu (Tietze i Tschäpe, 1994). La seqüència de la proteïna codificada per *orf5* presenta homologia amb la proteïna Hha (Nieto i Juárez, 1996). Aquesta seqüència està situada just abans i lleugerament superposada a la d'*orf4*, que presenta homologia amb la família de proteïnes H-NS. Ambdues proteïnes es transcriuen en la mateixa direcció (Nieto i Juárez, 1999).

La disponibilitat de la seqüència complerta de DNA del plàsmid de virulència pO157 d'*E.coli* O157:H7 ha permès la identificació de l'homòleg de la proteïna Hha en aquest plàsmid (Burland *et al.*, 1998). Altres homòlegs s'han identificat a diferents plàsmids, com és el cas de la proteïna YdfA del plàsmid R721 d'*E.coli* (Kim i Komano, 1992), l'homòleg codificat en el plàsmid pHCM1 de *S. tify* (Parkhill *et al.*, 2001) i l'Orf21 del plàsmid pACM1 de *K. oxytoca* (Preston *et al.*, 2000).

Recentment, ha estat identificat en el plàsmid de virulència pWR501 de *Shigella flexnerii* un altre membre de la família de proteïnes Hha/YmoA, la proteïna codificada pel gen *hmo*, descrita com a regulador putatiu (Venkatesan *et al.*, 2001).

En el plàsmid R27 de resistència a antibiòtic de *Salmonella typhi* també s'ha descrit un altre membre de la família Hha/YmoA, així com també un homòleg d'H-NS (Sheburne *et al.*, 2000).

A la figura 1.3.4 es comparen les seqüències d'aminoàcids entre els diferents membres de proteïnes de l'extensiva família de proteïnes Hha/YmoA.

1.4 PAPER DE LES FAMÍLIES DE PROTEÏNES HHA/YMOA I H-NS EN LA REGULACIÓ DE LA CONJUGACIÓ DELS PLÀSMIDS

És important assenyalar la connexió entre les proteïnes associades al nucleoide i el elements genètics importats. Un exemple n'és la proteïna IHF (Integration Host Factor), que rep el seu nom degut al paper que juga integrant i escindint el fag (Robertson i Nash, 1988). La proteïna Fis també té un paper en la integració i escissió del mateix fag a *E. coli* (Ball i Johnson, 1991). També és conegut que els elements mòbils genètics a vegades contenen gens que els permeten inactivar reguladors de l'hoste. Com a exemple tenim la proteïna codificada pel gen 5,5 del bacteriòfag T7, que inactiva la proteïna H-NS i causa una desrepressió tant de gens de l'hoste com del virus (Liu i Richardson, 1993). Un fet del qual se'n té coneixement des de fa menys és que molts cops són els propis elements mòbils els que codifiquen proteïnes associades al nucleoide (Dorman, 2004).

La transferència horitzontal de gens a un bacteri, doncs, pot resultar en un canvi de certs aspectes regulatoris. El que no es coneix és si els gens adquirits per transferència horitzontal s'incorporen immediatament a les xarxes de regulació de la cèl·lula hoste, o són entitats independents amb els seus propis reguladors, o potser recluten els reguladors cel·lulars existents o s'adapten a ells per tal de ser sensibles a les vies de senyalització de la cèl·lula.

Si la resposta a aquest problema és que els gens adquirits són controlats pels reguladors cel·lulars existents, els millors candidats per dur a terme aquesta regulació són aquells que són promiscus alhora d'unir-se als promotors (Dorman, 2004). Les proteïnes associades al nucleoide tenen aquesta característica i ja s'han descrit gens adquirits horitzontalment regulats per H-NS. Un exemple és el plàsmid de virulència de *Shigella* i de soques d'*E. coli* enteroinvasives, que conté els gens necessaris per la invasió de les cèl·lules epitelials (Buchrieser *et al.*, 2000). S'ha observat que H-NS reprimeix l'expressió de cadascun dels gens reguladors i estructurals d'aquest reguló (Beloin i Dorman, 2003). A *Salmonella*, els gens de l'illa de patogenicitat SPI-1, un element genètic originat fora dels bacteris entèrics, estan regulats positivament per Fis (Wilson *et al.*, 2001), i sembla ser que altres proteïnes associades al nucleoide, com H-NS, tenen un paper en la seva regulació (Schechter *et al.*, 2003). De la mateixa manera, el reguló de virulència de *V. cholerae*, que és un mosaic de gens

adquirits ancestralment de forma horitzontal, utilitza la proteïna H-NS com a repressor dels gens adquirits (Yu i DiRita, 2002; Nye i Taylor, 2003; Cerdan *et al.*, 2003). L'expressió dels gens de virulència de la illa de patogenicitat LEE de les soques d'*E. coli* enteropatogèniques està reprimida per H-NS. Aquesta illa, que sembla ser que s'ha adquirit per transferència horitzontal, codifica la proteïna Ler, que és un antagonista d'H-NS ja que té el mateix domini d'unió al DNA, però en canvi li falta el domini d'oligomerització (Bustamante *et al.*, 2001; Haack *et al.*, 2003). Aquesta podria ser una estratègia per superar la repressió d'H-NS, competint pels mateixos llocs d'unió. S'han identificat altres proteïnes que contenen el domini C-terminal d'H-NS fusionat a un altres domini N-terminal no relacionat (Dorman *et al.*, 1999; Cusick i Belfort, 1998), per tant, aquest podria ser un mecanisme força comú per atenuar la repressió d'H-NS (Dorman, 2004).

Un altre exemple el trobem en els plàsmids conjugatius, entre els quals un dels grups més ben estudiats són els plàsmids IncF. Els gens de transferència del plàsmid F estan regulats per tres proteïnes codificades al plàsmid: TraJ, TraM i TraY (Frost *et al.*, 1994). Les proteïnes TraJ i TraM estan codificades en operons monocistrònics i *traY* és el primer gen de l'operó que codifica tota la resta de gens de transferència (Silverman *et al.*, 1991). La proteïna TraJ és el principal activador de l'operó *tra* i en la majoria de plàsmids F està regulada post-transcripcionalment pel sistema de RNA antisentit FinOP (van Biesen i Frost, 1994). En el plàsmid F però, el gen *finO* es troba inactivat per la inserció d'un IS3 que fa que la síntesis de TraJ estigui desreprimida (Cheah i Skurray, 1986). TraY és un activador de l'expressió de *traM* i de l'operó *tra*, tot i que també hi ha evidències de que actua de repressor de l'operó *tra* (Silverman i Sholl, 1996; Taki *et al.*, 1998). TraM és un autorepressor de la seva transcripció (Penfold *et al.*, 1996). A més dels reguladors transcrits pels plàsmids IncF, en la seva regulació també hi intervenen proteïnes codificades al cromosoma. L'activació de l'operó *tra* duta a terme per TraJ també hi intervé la proteïna ArcA (Silverman *et al.*, 1991; Strohmaier *et al.*, 1998). IHF és essencial per la formació del relaxosoma (Nelson *et al.*, 1995). S'ha demostrat també que CpxA és necessària per l'expressió de *traJ* (Silverman *et al.*, 1993). L'expressió de *traJ* està regulada positivament també per Lrp i CRP (Camacho i Casadesús, 2002; Star *et al.*, 2003). En els plàsmids F, pSLT i R100 també hi ha una regulació per la metilació Dam que s'explica per una activació de la síntesis del RNA de FinP i una repressió de la transcripció de *traJ* (Torreblanca *et al.*, 1999; Camacho i Casadesús, 2005). En el cas del plàsmid

pRK100 (IncF), H-NS, juntament amb Lrp, activen l'expressió de *traJ* i la falta de la proteïna H-NS causa una disminució de la freqüència de conjugació (Star i -Erjavec *et al.*, 2003). Sembla ser que H-NS i Lrp s'unirien al DNA causant un canvi de conformació del promotor de *traJ*, que facilitaria la unió de CRP al seu lloc d'unió al promotor i activaria la seva transcripció (Star i -Erjavec *et al.*, 2003). En els seu treball, Star i -Erjavec *et al.* (2003), comproven que els llocs d'unió de CRP, Lrp i H-NS estan conservats en les seqüències de altres plàsmids IncF i que per tant, aquest mecanisme d'actuació podria ser el mateix en altres plàsmids IncF. Tot i així, en el plàsmid F, H-NS té un paper repressor de l'expressió de *traJ* i de *traM* durant l'inici de la fase estacionària fent que la transferència del plàsmid F sigui sensible a l'estat fisiològic de la cèl·lula (Will *et al.*, 2004). Sembla ser que H-NS s'uneix al DNA en els mateixos llocs d'unió de CRP i Lrp, per tant aquestes proteïnes competirien pels mateixos llocs d'unió. En la fase exponencial, Lrp i CRP podrien actuar d'antagonistes d'H-NS i en la fase estacionària H-NS tindria més afinitat pel DNA que els seus competidors (Will *et al.*, 2004). Recentment, s'ha demostrat que H-NS també reprimeix la l'expressió dels gens de l'operó *tra* del plàsmid F, i que la proteïna TraJ en realitat no és necessària per l'activació de l'expressió de l'operó *tra*. Sembla ser que TraJ evitaria la formació del complex repressor d'H-NS al promotor de l'operó *tra* (P_Y) en la fase exponencial (Will i Frost, 2006). En el plàsmid pSLT (IncF) H-NS també és un repressor parcial de *traJ*, però en aquest cas és independent de la fase estacionària (Camacho *et al.*, 2005). Els plàsmids pRK100 i R100 (IncF) a més han adquirit proteïnes homòlogues a Hha. En el cas de R100 s'ha demostrat que RmoA (la proteïna homòloga a Hha) actua com a regulador positiu de la conjugació (Nieto *et al.*, 1998). En conclusió podem dir que els plàsmids IncF en general comparteixen un model de regulació, però podem trobar aspectes reguladors específics per cadascun d'ells.

La informació disponible sobre proteïnes associades al nucleoide codificades per elements genètics mòbils prové dels estudis de seqüenciació, però en pocs casos s'han estudiat experimentalment. Un d'aquests casos és el de la proteïna Sfh, paràloga a H-NS i codificada en un plàsmid de la soca 2457T de *S. flexneri* 2a, que mostra que les proteïnes associades al nucleoide de codificació plasmídica poden regular altres funcions a més de les codificades al plàsmid (Beloin *et al.*, 2003). A més, aquest cas és doblement interessant, ja que el plàsmid IncHI d'aquesta soca també codifica una proteïna homòloga a Hha (Beloin *et al.*, 2003). Trobem altres

exemples de plàsmids que codifiquen homòlegs d'aquestes dues proteïnes: R27, R446, R478 o pHCM1. Això fa pensar que hi ha un conjunt de proteïnes reguladores ancestrals adquirides horitzontalment que duen a terme una regulació de l'expressió gènica.

El fet d'adquirir noves proteïnes reguladores pot aportar nous mecanismes de regulació a la cèl·lula, però dins d'uns cert límits (Dorman, 2004). Les proteïnes associades al nucleòide controlen aspectes fonamentals de la viabilitat de les cèl·lules, que no són aspectes accessoris, com podria ser el cas de gens de virulència. Per exemple, la maquinària de traducció cel·lular està sota el control de Fis i H-NS (Schneider *et al.*, 2003), ja que aquestes proteïnes actuen antagonísticament sobre els promotors *rrn*. Tot el programa regulador global d'una cèl·lula pot resultar alterat, encara que sigui subtilment, per l'adquisició de noves proteïnes reguladores (Dorman, 2004). Un altre aspecte a tenir en compte és que els plàsmids que codifiquen les seves pròpies proteïnes Hha i H-NS podrien assegurar certs aspectes regulatoris propis en el cas que el bacteri hoste no codifiqués aquestes proteïnes (Madrid *et al.*, 2002a)

1.5 ELS PLÀSMIDS

Un plàsmid és una col·lecció de mòduls genètics funcionals organitzats en una entitat auto-replicative o replicó, el qual és més petit que el cromosoma bacterià i normalment conté gens no essencials per a les funcions cel·lulars. Normalment els plàsmids són molècules circulars de DNA de doble cadena. Tot i així s'han descrit casos de plàsmids linears de DNA de doble cadena (Hinnebusch i Tilly, 1993; Chaconas i Chen, 2005; Stewart *et al.*, 2005). Els plàsmids contenen els gens essencials que codifiquen les funcions de replicació i un conjunt de gens accessoris que codifiquen funcions en principi diferents a les codificades al cromosoma.

1.5.1 REPLICACIÓ, NOMBRE DE CÒPIES, SEGREGACIÓ I INCOMPATIBILITAT

Per tal de mantenir-se estables en la població els plàsmids s'han de replicar, controlar el seu nombre de còpies i assegurar la seva herència a les cèl·lules filles en

la divisió cel·lular. El conjunt d'aquests tres processos dona lloc a un fenomen anomenat incompatibilitat (Inc), definit com la incapacitat de plàsmids amb el mateix mecanisme de replicació de coexistir en una mateixa cèl·lula (revisat a Frost *et al.*, 2005).

1.5.1.1 Replicació i control del nombre de còpies plasmídiques

Tot plàsmid ha de contenir un origen de replicació (*ori*), ja que sense ell el plàsmid seria incapaç de replicar-se dins la cèl·lula i al llarg de les generacions es perdria. Hi ha una gran varietat de mides de plàsmids i de nombre de còpies de plàsmid per cèl·lula. Tot i així cada plàsmid és manté en un nombre de còpies estable en un bacteri hoste donat. La clau per l'existència d'un plàsmid en un estat extracromosòmic i en un nombre de còpies determinat és la seva capacitat de regular la freqüència d'inici de la replicació (Kittell i Helsinki, 1993).

Els replicons bàsics, sovint de menys de 3 kbp, consisteixen en un origen de replicació i un o més elements reguladors adjacents. La majoria de plàsmids codifiquen poques o cap de les proteïnes necessàries per a la replicació, i per tant utilitzen les proteïnes codificades al cromosoma de l'hoste. Els plàsmids solen utilitzar la DNA polimerasa III i la DNA polimerasa I de l'hoste per a la replicació. Hi ha alguns plàsmids que utilitzen la RNA polimerasa per a la síntesi de encebadors, DNA helicases, DNA primases i proteïnes d'unió al DNA de cadena senzilla.

La majoria dels replicons inclouen un gen (*rep*) requerit específicament per a l'inici de la replicació, ja que ajuda a obrir la doble cadena de DNA. El gen *rep* pot codificar una proteïna iniciadora de la transcripció o un RNA que també ajuda a iniciar la transcripció (revisat a Kittell i Helsinki, 1993). S'ha de tenir en compte que hi ha plàsmids que contenen més d'un origen de replicació dins la seva seqüència, com per exemple els plàsmids del grup IncF (Berquist *et al.*, 1986). Això fa que la proteïna codificada pel gen *rep* pugui actuar en *trans* en un origen de replicació diferent del que prové. Tot i així hi ha proteïnes Rep que només actuen en *cis* (Couturier *et al.*, 1988).

S'han examinat en detall una varietat de sistemes de control de la replicació i en tots els casos s'ha identificat un sistema de control per "feedback" negatiu capaç de respondre als canvis del nombre de còpies plasmídiques durant el creixement cel·lular

(Scott, 1984; Novick, 1987; Kues i Stahl, 1989; Nordstorm, 1990). Aquestes sistemes de regulació responen a l'augment o disminució del nombre de còpies i mantenen el nivell de còpies característic de cada plàsmid en particular. Aquesta regulació no només és crítica pel manteniment del plàsmid durant el creixement en fase exponencial de la població bacteriana sinó que també funciona incrementant el nombre de còpies del plàsmid en un període de temps curt sota circumstàncies en què una sola còpia de plàsmid entra dins la cèl·lula com en una transformació, conjugació o transducció (Kittell i Helsinki, 1993). Diversos estudis han arribat a la conclusió de que hi ha dos sistemes bàsics pels quals els plàsmids regulen negativament la seva replicació.

1. **Control de la replicació per RNA:** en aquest cas els plàsmids codifiquen una molècula de RNA petita i difusible que actua com un transcrit antisentit per regular negativament alguns aspectes de la replicació. Aquestes molècules de RNA es transcriuen a partir d'una regió coincident amb un gen implicat en l'inici de la replicació. Com que la transcripció d'aquest petit RNA es fa en sentit contrari a la transcripció del gen d'inici de la replicació, els dos RNAs són homòlegs i poden hibridar. L'expressió dels petits RNAs antisentit és constitutiva i el seu nivell és proporcional al nombre de còpies del plàsmid. D'aquesta manera es regula el nombre de còpies del plàsmid, depenent també de la funció exacta del gen d'inici de la replicació:

- pot codificar una proteïna iniciadora de la replicació, com és el cas dels plàsmids IncFII, on el RNA antisentit evita la traducció del mRNA d'aquesta proteïna (Nordstorm *et al.*, 1984; Rownd *et al.*, 1985; Novick, 1987; Womble i Rownd, 1988);

- pot codificar una proteïna d'inici de la replicació, però en aquest cas el RNA antisentit regula la transcripció d'aquest gen. Aquest és el cas de molts dels plàsmids de Gram-positius (Novick, 1987; Gruss i Ehrlich, 1989);

- per últim, pot codificar un RNA que actuarà de encebador per a l'inici de la replicació, com en els plàsmids tipus ColEI (Novick, 1987; Polisky, 1988; Kues i Stahl, 1989).

2. **Control de la replicació per iterons:** la majoria de plàsmids que no controlen el seu nombre de còpies mitjançant petits RNAs tenen una sèrie de característiques comunes que semblen estar implicades en el control de la replicació. Aquests plàsmids contenen una sèrie de repeticions directes, anomenades iterons, localitzades a l'origen de replicació, que són necessàries tant per la iniciació de la replicació com pel control del nombre de còpies. Molts cops trobem els iterons separats en dues zones, una correspon al control de l'inici de la replicació i l'altre al control del nombre de còpies (aquesta última no sempre hi és present) (Murotsu *et al.*, 1981; Stalker *et al.*, 1981; Kamio i Terawaki, 1983; Abeles *et al.*, 1984; Nozue *et al.*, 1988). Els membres d'aquest grup també codifiquen una proteïna iniciadora de la replicació que actua en *trans*, contenen una regió adjacent als iterons rica en A+T i zones d'unió específica a DnaA (Bramhill i Kornberg, 1988; Filutowicz *et al.*, 1985). La proteïna iniciadora de la replicació en alguns plàsmids autoregula la seva expressió, en d'altres la regulació la duu a terme una altra proteïna del sistema de control de la replicació (revisat a Kues i Stahl, 1989). Aquesta proteïna inicia la replicació unint-se als iterons (Abeles, 1986; Filutowicz *et al.*, 1986; Tokino *et al.*, 1986; Kamio *et al.*, 1988; Masson i Ray, 1986; Pickney *et al.*, 1988; Perri *et al.*, 1991), però en alguns casos aquesta proteïna pot actuar negativament en el control de la regulació de la replicació (Filutowicz *et al.*, 1986; Pal i Chattoraj, 1988; Durland *et al.*, 1990).

1.5.1.2 Segregació dels plàsmids en la divisió cel·lular

Els diferents mecanismes de regulació del nombre de còpies plasmídiques tenen en comú la capacitat de regular les fluctuacions estocàstiques del nombre de còpies durant la divisió cel·lular. En la divisió cel·lular, cada cèl·lula filla resultant hereta diferents còpies del plàsmid (revisat a Nordstorm i Austin, 1989; Ebersbach i Gerdes, 2005).

En general en el cas de plàsmids d'alt nombre de còpies hi ha suficients còpies del plàsmid per a què les dues cèl·lules filles heretin alguna còpia, per tant en aquest cas no cal un mecanisme de segregació de plàsmids entre les cèl·lules filles.

Quan es tracta de plàsmids de baix nombre de còpies, la segregació correcta en la divisió cel·lular és un procés crític. Per aquesta raó els plàsmids de nombre de còpies baix inclouen un mecanisme per la correcta segregació del plàsmid: els mòduls de segregació. Aquests mòduls consisteixen en un centròmer adjacent a dos gens co-regulats, un codifica una ATPasa i l'altre codifica una proteïna d'unió específica al centròmer (Gordon i Wright, 2000). Gerdes *et al.* (2000) han proposat l'existència de dos tipus de segregació tenint en compte el tipus d'ATPasa. El mòdul tipus I està format per ATPases tipus Walker com les del sistema ParA/SopA dels plàsmids P1 i F, respectivament. El mòdul tipus II codifica ATPases tipus actina, com la ParM del plàsmid R1. Les proteïnes d'unió al centròmer són ParB/SopB en els plàsmids P1 i F, i la proteïna ParR del plàsmid R1.

El centròmer està format per un conjunt de repeticions directes on s'hi uneixen les proteïnes ParB o ParR formant un complex mitjançant el qual s'aparellen els plàsmids (Jensen *et al.*, 1998; Edgar *et al.*, 2001). La unió de ParR al centròmer a més serveix de regulació pels gens *parM* i *parR*, ja que el seu promotor es troba dins la zona del centròmer (Jensen *et al.*, 1994). En canvi, la unió de ParB i SopB als centròmers de P1 i F, respectivament, provoca una extensió de ParB/SopB cap a les seqüències adjacents provocant un silenciament dels gens *parA* i *parB* en el cas de P1 i dels gens *sopA* i *sopB* en el cas del plàsmid F (Rodionov *et al.*, 1999; Yates *et al.*, 1999). El complex de segregació amb els plàsmids aparellats es localitza a la meitat de la cèl·lula, i després de la duplicació aquests es divideixen i es mouen ràpidament cap al centre de les cèl·lules filles (Gordon *et al.*, 1997; Niki i Hiraga, 1997). No se sap què és el que fa que el complex de segregació es mantingui en aquestes posicions concretes, però pot ser que algun factor de la cèl·lula hoste hi estigui implicat (Hiraga, 2000). Les ATPases codificades al mòdul de segregació són citoplasmàtiques i la seva activitat és essencial per a la segregació (Davis *et al.*, 1992; Watanabe *et al.*, 1992; Jensen *et al.*, 1997). Les ATPases interactuen amb la corresponents proteïnes d'unió al centròmer (Jensen *et al.*, 1997; Radnedge *et al.*, 1998), suggerint que la hidròlisi de l'ATP aniria lligada al moviment del complex de segregació del centre de la cèl·lula en divisió cap al centre de les cèl·lules filles. S'ha demostrat que ParM del plàsmid P1 forma filaments semblants als de l'actina de polimerització ATP-

depenent. Sembla ser que les filaments formats per ParM començarien a formar-se en el complex de segregació i proporcionarien la força motriu per desplaçar-lo (Moller-Jensen *et al.*, 2002).

1.5.1.3 El fenomen de la incompatibilitat

No tots els plàsmids poden coexistir establement en la mateixa cèl·lula bacteriana. Dos plàsmids genèticament diferents que no es poden mantenir estables en una determinada cèl·lula hoste són membres del mateix grup d'incompatibilitat (Inc) (Datta, 1979). Generalment, si dos plàsmid pertanyen al mateix grup d'incompatibilitat, la introducció d'un dels dos plàsmids per transformació, conjugació o transducció dins una cèl·lula portadora de l'altre plàsmid, desestabilitza l'herència del plàsmid resident. El fenomen de la incompatibilitat ha proporcionat la base per a la classificació inicial d'alguns plàsmids. S'han definit grups d'incompatibilitat per plàsmids de les Enterobacteriàcies (26 grups), de Pseudomonas (14 grups) i dels estafilococs (uns 18 grups). Els plàsmids que contenen més d'un replicó presenten una complicació alhora de classificar-los per grups d'incompatibilitat, ja que aquests plàsmids generalment no es desestabilitzen per la presència d'un segon plàsmid que conté un replicó homòleg a algun dels replicons del primer plàsmid (Couturier *et al.*, 1988).

La incompatibilitat dels plàsmids és una conseqüència del fet de que dos plàsmids tinguin els mateixos elements responsables del seu manteniment dins la cèl·lula, és a dir, que tinguin el mateix sistema de control de la replicació i/o el mateix sistema de segregació (Novick, 1987). La incompatibilitat també és depenent del fet que, almenys pels plàsmids coneguts tant en Gram-positius com en Gram-negatius, la selecció dels plàsmids per a la replicació i per a la segregació es fa a l'atzar a partir de tot el "pool" de plàsmids presents a la cèl·lula (Rownd, 1969; Bazaral i Helsinki, 1970; Projan i Novick, 1984; Novick, 1987). Quan hi ha una interferència entre el sistema de control de replicació o el mecanisme de segregació d'un plàsmid amb un segon plàsmid del mateix grup d'incompatibilitat, es perd un dels dos plàsmids al llarg del creixement de la població bacteriana.

Un exemple senzill per explicar la incompatibilitat és el cas en què una cèl·lula conté dos plàsmids A i B amb el mateix control de replicació: un cop hi hagués prou

proteïna iniciadora de la replicació a la cèl·lula, aquesta s'uniria a un dels dos plàsmids a l'atzar, per exemple al plàsmid A. Per tant, després de la replicació la cèl·lula tindria dos plàsmids A i un B. A partir d'aquí, és molt més probable que la proteïna iniciadora de la replicació s'unís al plàsmid A i no pas al B. Així al llarg de les generacions s'acabaria perdent el plàsmid B. Si el cas hagués estat amb dos plàsmids amb el mateix sistema de segregació, es podria explicar igual: les proteïnes responsables de la segregació correcta del plàsmid durant la divisió cel·lular, s'unirien a l'atzar a un dels dos plàsmids, afavorint la seva herència al llarg de les generacions, i fent que l'altre plàsmid es perdés.

En el cas que el sistema de control de la replicació sigui el responsable de la incompatibilitat de dos plàsmids, els elements responsables d'aquesta incompatibilitat són bàsicament els RNAs antisentit en el cas dels plàsmids amb un control de la replicació per RNA (Molin i Nordstorm, 1980; Tomizawa i Itoh, 1981; Lacatena i Cesareni, 1981; Brady *et al.*, 1983; Tamm i Polisky, 1983; Carleton *et al.*, 1984; Novick *et al.*, 1984; Iordanescu, 1987; Novick, 1987; Highlander i Novick, 1990). En el cas dels plàsmids amb un control de la replicació per iterons, són els propis iterons els que fan que hi hagi incompatibilitat entre plàsmids (Kamio i Terawaki, 1983; Tsutsui *et al.*, 1983; Yamaguchi i Yamaguchi, 1984; Abeles *et al.*, 1984; Lin i Meyer, 1986; McEachern *et al.*, 1986; Persson i Nordstorm, 1986).

La incompatibilitat també pot ser deguda a la interacció entre components del sistema de segregació comuns de dos plàsmids (Nordstorm i Austin, 1989; revisat a Austin i Nordstorm, 1990).

1.5.2 ALTRES GENS PLASMÍDICS

A més de l'origen de replicació i del control de la segregació, els plàsmids naturals poden contenir una gran varietat de gens. Una font important d'aquests gens són les recombinacions homòlogues i no homòlogues (insercions) entre els plàsmids i els cromosomes. Tot i així, molts d'aquests gens no es troben entre els més comuns codificats al cromosoma. Encara que la quantitat de DNA plasmídica és petita en comparació al cromosoma d'un bacteri, els efectes en el comportament de la cèl·lula hoste són importants (revisat a Frost *et al.*, 2005).

Uns dels gens més importants que porten alguns plàsmids són els determinants de resistència a antibiòtics (Hughes i Datta, 1983). Degut a l'ampli ús d'antibiòtics, els plàsmids portadors de gens de resistència han estat selectivament amplificats en les poblacions bacterianes, sobretot entre les microorganismes patògens (Mazel i Davies, 1999). Es poden trobar gens de resistència per quasi tots els antibiòtics i desinfectants. A més dels gens que confereixen resistència a antibiòtics, els plàsmids poden portar gens que proporcionen resistència als metalls pesats, a la llum UV, als bacteriòfags, a enzims que lisen els bacteris, a agents mutagènics i a altres agents que poden danyar o matar als bacteris.

Els plàsmids naturals poden incorporar també gens que codifiquen diferents enzims metabòlics. Aquests gens permeten la utilització de fonts de carboni o nitrogen diferents a les que permeten utilitzar els gens del cromosoma. A vegades són gens per la degradació de proteïnes o àcids nucleics, gens per la síntesi d'aminoàcids, cofactors, vitamines, pigments, etc. Un cas especial en aquest grup són els gens responsables de la bioremediació. S'han trobat plàsmids naturals que codifiquen gens per a la biotransformació d'hidrocarburs (Wade, 1980; Kellogg *et al.*, 1981).

Altres plàsmids porten gens que codifiquen toxines (Novick, 2003) i altres factors de virulència, com també gens implicats en la colonització de cèl·lules eucariotes i patogenicitat (Shipley *et al.*, 1978; Schell *et al.*, 1979).

Un altre tipus de gens codificats en plàsmids són els que permeten una simbiosi entre el bacteri i un eucariota. Un exemple és un plàsmid del gènere *Rhizobium* que codifica les funcions per a la fixació del nitrogen (Crossman, 2005). Aquest és un plàsmid conjugatiu de més de 250 kpb que també codifica els gens necessaris per a la invasió de les cèl·lules vegetals de les arrels d'algunes plantes. Aquesta invasió fa que hi hagi una relació simbiòtica entre el bacteri i la planta: el bacteri converteix el nitrogen (N_2) en amoni, que serà utilitzat per la planta, i la planta proporcionarà a *Rhizobium* els carbohidrats necessaris.

Un altre tipus de gens plasmídics àmpliament estudiats són els que permeten la mobilització, és a dir, dirigeixen la transferència del plàsmid a una altra cèl·lula. Aquest procés s'anomena conjugació bacteriana, i constitueix una de les rutes més importants de la transferència horitzontal de gens entre procariotes (De la Cruz i Davies, 2000). Molts dels plàsmids conjugatius estan dotats amb els elements necessaris per poder transferir-se entre un ampli rang d'hostes entre bacteris Gram-negatius, i alguns d'aquests plàsmids inclús són capaços de transferir-se a bacteris

Gram-positius (Trieu-Cuot *et al.*, 1987; Gormley i Davis, 1991; Charpentier *et al.*, 1999; Kurenbach *et al.*, 2003). Però la promiscuïtat de la conjugació bacteriana va més enllà dels procariotes, ja que en condicions de laboratori s'ha observat que és possible la transferència de DNA mitjançant la conjugació de bacteris cap a llevats, plantes i cèl·lules animals (Buchanan-Wollaston *et al.*, 1987; Heinemann i Sprage Jr., 1989; Waters, 2001). Un exemple d'aquesta versatilitat és el sistema de transferència de DNA d'*Agrobacterium tumefaciens* (Zupan *et al.*, 2000), que utilitza una maquinària amb una gran homologia a l'aparell conjugatiu dels bacteris Gram-negatius per tal de transferir DNA cap al nucli de cèl·lules vegetals (Lessl i Lanka, 1994).

1.6 LA CONJUGACIÓ BACTERIANA

La conjugació bacteriana és un procés especialitzat que implica una transferència unidireccional de DNA d'una cèl·lula donadora a una cèl·lula receptora mitjançant un contacte específic entre les dues cèl·lules. Aquest procés està codificat en diversos plàsmids i transposons conjugatius, constituint la ruta més important per a la transferència horitzontal de material genètic. La conjugació ha evolucionat per mobilitzar eficaçment els plàsmids entre les cèl·lules. Els sistemes conjugatius són importants en la transferència de DNA entre un ampli rang de gèneres bacterians, i en alguns casos en la transferència de DNA de bacteris cap a fongs i plantes. Això ha fet que la conjugació hagi estat i sigui un punt clau en la plasticitat genètica dels bacteris, potenciant canvis significatius en la medicina, medi ambient i evolució (Mazodier i Davies, 1991). La conjugació també ha proporcionat una eina per a l'estudi de la genètica bacteriana.

Molts dels estudis sobre la conjugació s'han centrat en el grup d'enterobacteris, ja que aquest procés es va descobrir amb el plàsmid F d'*Escherichia coli* K-12 (Lederberg i Tatum, 1946). El plàsmid F encara continua essent el paradigma de la conjugació. El sistema de conjugació d'aquest plàsmid és complex i requereix uns 40 gens de transferència. D'aquests gens, només quatre participen en el processament del plàsmid. La majoria de gens codifiquen la maquinària d'aparellament, que inclou el pili conjugatiu i les proteïnes que estableixen els agregats de cèl·lules que s'aparellen (Ippen-Ihler i Minkley, 1986; Willetts i Skurray, 1987; Ippen-Ihler i Skurray, 1993;

Frost, 1993; Frost *et al.*, 1994). Tot i així també s'han fet avenços en l'estudi d'altres sistemes conjugatius com el dels plàsmid del grup IncP (Guiney i Lanka, 1989; Guiney, 1993; Pansegrau *et al.*, 1994). També han estat importants els estudis de plàsmids mobilitzables, com els del grup IncQ (Frey i Bagdasarian, 1989; Guiney, 1993). Els plàsmids mobilitzables contenen un nombre limitat de gens (anomenats gens *mob*) pel processament del propi DNA en la conjugació, però en canvi requereixen la presència d'un altre plàsmid conjugatiu que proporcioni les altres funcions essencials per a què es doni la conjugació del plàsmid mobilitzable.

Hi ha un gran nombre de plàsmids conjugatius que poden ser agrupats segons el grup d'incompatibilitat al què pertanyen, ja que els membres d'un mateix grup Inc solen tenir sistemes de conjugació estretament relacionats.

En el model general de conjugació en les Proteobactèries, la molècula de DNA a transferir té un origen de transferència o *oriT*, una petita seqüència de DNA on s'inicia i es finalitza tot el procés. La resta de la maquinària conjugativa està codificada en un mínim de 15 gens que duen a terme diverses funcions, incloent les reaccions de processament del DNA i el seu transport a la cèl·lula receptora. La maquinària conjugativa es pot dividir en tres mòduls (Llosa i de la Cruz, 2005):

- El relaxosoma: complex nucleoproteic format per l'*oriT*, una relaxasa i altres proteïnes accessòries. La relaxasa talla l'*oriT* en la cadena de DNA que s'ha de transferir en el lloc "nic". La relaxasa s'unirà covalentment a la cadena tallada i presumiblement la relligarà al final de la transferència. La cadena tallada serà transferida a la cèl·lula receptora en sentit 5' → 3'. El DNA de cadena senzilla està associat normalment a la DNA polimerasa III per tal de replicar la cadena senzilla tant en la cèl·lula donadora com en la receptora (Willetts i Wilkins, 1984).
- El conducte transmembrana: complex multiproteic format per unes 10 proteïnes diferents que va des de la membrana interna a la membrana externa. Els seus components pertanyen a la família de proteïnes transportadores del sistema de secreció tipus IV (T4SS) (Cascales i Christie, 2003; Llosa i O'Callaghan, 2004). Aquestes proteïnes estan implicades en la polimerització del pili, gràcies al qual s'estableix el contacte cèl·lula-cèl·lula en Gram-negatius. A més, aquest es el conducte per on passarà el DNA a transferir.

- La proteïna d'acoblament (CP): és la que posarà en contacte el relaxosoma amb el conducte transmembrana. A més, en base a la seva estructura i similaritat amb altres transportadors, sembla ser que bombeja activament el DNA cap a la cèl·lula receptora (Llosa *et al.*, 2002).

S'han trobat elements conjugatius en moltes famílies de bacteris Gram-positius i Gram-negatius. Trobem exemples de plàsmids conjugatius en agrobacteris (Farrand, 1993), enterococs (Clewell, 1993a; Clewell, 1993b), estafilococs (Firth *et al.*, 1993; Macrina i Archer, 1993), estreptococs (Macrina i Archer, 1993) i estreptomicets (Hopwood i Kieser, 1993), així com transposons conjugatius (Scott, 1992; Clewell i Flannagan, 1993). Aquests darrers són elements de DNA mòbils que codifiquen totes les funcions necessàries per a la transposició intracel·lular i per a la conjugació intercel·lular. Estan presents en una gran varietat de bacteris Gram-negatius i Gram-positius i són importants per la disseminació de gens de resistència a antibiòtics (Clewell *et al.*, 1995; Salyers *et al.*, 1995; Scott i Churchward, 1995; Merlin *et al.*, 2000;). Alguns transposons conjugatius són molt petits (unes 16 kpb) indicant que els seu sistema de transferència és menys complex que l'utilitzat pels plàsmids conjugatius. Un altre tipus d'unitat transmissible són els element d'inserció (IS) mobilitzables, que tenen el seu propi oriT i com a mínim un gen *mob*. Un exemple són els NBU: petits segments del cromosoma de *Bacterioides* spp., que poden ser escindits i mobilitzats pels transposons conjugatius que codifiquen la resistència a la tetraciclina i que són específics d'aquest gènere (Speer *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1995).

Un fet significatiu de la transferència de plàsmids recau en el fet de que molts poden dirigir la transferència de DNA cromosòmic (Wilkins i Frost, 2001). Un exemple el trobem en els plàsmids F i la seva alta freqüència de recombinació, com també la capacitat de mobilitzar el cromosoma pels plàsmids de *Streptomyces* sp. Aquests plàsmids conjugatius s'integren al genoma de l'hoste i transfereixen grans parts de cromosoma juntament amb part del plàsmid dins de la cèl·lula receptora. Quan una cèl·lula presenta un plàsmid F integrat dins el cromosoma, s'anomena soca Hfr. Aquests plàsmids integrats es poden escindir del cromosoma, i molts cops en el procés d'escissió el plàsmid inclou algun gen del cromosoma. En aquest cas el plàsmid passa a anomenar-se F'. Els plàsmids F' proporcionen una diploïdia parcial de locus del cromosoma, permetent l'evolució de funcions alterades (Wilkins i Frost,

2001). La mobilització del cromosoma és un tret poc estudiat, però sembla ser que depèn de cada tipus de plàsmid i de la presència en el cromosoma i en el plàsmid de transposons o altres elements mòbils que serveixin de llocs per a la recombinació homòloga.

Hi ha diferents tipus de mecanismes de conjugació, i les diferències més grans es troben entre els sistemes de conjugació de bacteris Gram-positius i de Gram-negatius. En els següents apartats ens centrarem en la conjugació plasmídica en bacteris Gram-negatius.

1.6.1 LA CONJUGACIÓ EN ELS BACTERIS GRAM-NEGATIUS

El marc genètic de la conjugació ha estat agrupat en dues parts funcionals, una part pertany a la transferència i replicació del DNA (Dtr o “DNA transfer and replication”) i l'altra part a la formació del complex d'aparellament (Mpf o “mating pair formation”) (Willetts, 1981). El sistema Dtr, també conegut com a relaxosoma, és el responsable de la replicació i del processament del plàsmid conjugatiu per tal de convertir-lo en un intermediari capaç de ser transferit (complex DNA-proteïna). El complex Mpf és essencial per a la producció dels pilis i la formació del canal que travessarà tots els embolcalls cel·lulars i que servirà de conducte per a la transferència del DNA. Una tercera funció que unirà els dos sistemes, Dtr i Mpf, és la que resideix en la proteïna d'acoblament (CP). Aquesta proteïna entrega el substrat DNA-proteïna format pel sistema Dtr al canal format pel complex Mpf i molt probablement participa en la secreció activa del substrat DNA-proteïna (revisat a Schröder i Lanka, 2005).

Una part significativa del genoma plasmídica està implicat en la conjugació. Els plàsmids F, uns dels més ben estudiats (Willetts i Skurray, 1980), tenen tots els gens responsables de la transferència (gens *tra*) localitzats en la mateixa zona ocupant una tercera part del plàsmid, unes 33 kpb (Willetts i Wilkins, 1984). Els plàsmids del grup IncN també tenen els gens *tra* localitzats en una sola zona (Thatte i Iyer, 1983) i en el plàsmid R46 els gens *tra* també es troben tots en una zona de 22,5 kpb. En canvi, els plàsmids RP4 (IncP) i R91-4 (IncP10) tenen els gens *tra* distribuïts en 2 o tres regions separades (Barth, 1979; Moore i Krischnapillai, 1982). La distribució dels gens *tra* en el plàsmid Ti també està en més d'una zona (Holsters *et al.*, 1980). Al plàsmid R27 (IncHI) els gens *tra* estan distribuïts en dues zones (Taylor *et al.*, 1985).

1.6.1.1 El complex Mpf com a part del sistema de secreció tipus IV (T4SS)

Treballs recents han mostrat que diversos patògens utilitzen sistemes de secreció per tal de transferir molècules efectores a les cèl·lules eucariotes, i que les subunitats d'aquests sistemes estan evolutivament relacionades amb les dels complexos Mpf. Un exemple el trobem en el plàsmid Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*, un fitopatogen que indueix el creixement tumoral de teixits vegetals infectats. Aquest bacteri transfereix un DNA oncogènic i diverses proteïnes efectores al nucli de les cèl·lules vegetals (Vergunst *et al.*, 2000). *Helicobacter pylori*, causant de patologies gàstriques, utilitza un sistema semblant per introduir la proteïna CagA dins de les cèl·lules animals (Odenbrerit *et al.*, 2000). Diversos patògens intracel·lulars, com *Legionella pneumophila*, *Brucella* spp. i *Bartonella* spp., sembla que introdueixen proteïnes efectores als macròfags per sobreviure dins la cèl·lula (revisat a Christie, 2001). Tot i així, no hi ha sempre un contacte cèl·lula-cèl·lula, com en el cas del sistema Ptl de *Bordetella pertussis*, l'agent causal de la tosferina. Aquest sistema exporta una toxina a l'ambient extracel·lular, on després estableix contacte amb la cèl·lula animal (Farizo *et al.*, 2000).

Els sistemes de transferència ancestralment relacionats amb els sistemes conjugatius Mpf són anomenats sistemes de secreció tipus IV (T4SS), tal i com va ser proposat per primer cop per Salmond (1994). Aquesta nomenclatura distingeix els sistemes relacionats amb la conjugació d'altres sistemes de secreció bacteriana. El complex Mpf que s'utilitza per la translocació de DNA ha estat el progenitor del qual han evolucionat els altres sistemes de secreció IV (Christie i Vogel, 2000). La característica comuna a tots els T4SS és la capacitat de transportar proteïnes. Els sistemes de conjugació, doncs, sembla que són un subgrup de T4SS que ha evolucionat cap a la capacitat addicional de transportar complexos de DNA-proteïna.

Els T4SSs o complexos Mpf dels plàsmids conjugatius es poden dividir en dos subgrups, tipus P i tipus F, segons els següents criteris (Lawley *et al.*, 2003b): les proteïnes tipus VirB11 són característiques del grup P, mentre que el grup F codifica proteïnes amb moltes cisteïnes conservades i proteïnes tipus DsbC amb predicció de plegaments tipus tioredoxina. La pilina cíclica i la seva corresponent ciclase són típiques també del grup P (Kalkum *et al.*, 2004; Lai *et al.*, 2002). Dins del grup F hi trobem els plàsmids dels grups IncF, IncHI, IncJ i IncT entre altres. El grup P està format pels plàsmids del grup IncP, IncW i IncN entre d'altres (Lawley *et al.*, 2003b)

El primer pas per tal de dur a terme la conjugació és trobar una cèl·lula receptora a la qual es pugui transferir el DNA i apropar-se a ella fins a arribar a un contacte íntim entre les dues cèl·lules formant les unions conjugatives (“conjugative junctions”) formades per les proteïnes del complex Mpf (Dürrenberger *et al.*, 1991; Samuels *et al.*, 2000). El pili conjugatiu o sexual és el que duu a terme les funcions de reconeixement i unió de la cèl·lula receptora. Els pilis són apèndixs tubulars i llargs de les cèl·lules, mitjançant els quals és duu a terme el contacte inicial entre les cèl·lules donadora i receptora i les acosta perquè hi hagi un contacte entre les seves superfícies. Els pilis sexuals s’han identificat en la majoria de sistemes conjugatius (Frost, 1993), com també en el sistema VirB/VirD4 de transferència d’*Agrobacterium tumefaciens*, en aquest cas anomenats T-pilis (Fullner *et al.*, 1996; Lai i Kado, 2000). Hi ha dos tipus majoritaris de pilis que corresponen als dos tipus de T4SSs (Lawley *et al.*, 2003b):

- Pilis tipus F: produïts pels plàsmids dels grups IncF, IncH, IncT i IncJ. Són pilis llargs i flexibles, de 2 a 22 μm de llarg i de 8 nm d’ample, amb un lumen central de 2 nm.
- Pilis tipus P: produïts pels plàsmids dels grups IncP, IncN, IncW i IncI. Al contrari que els pilis tipus F, aquests són més curts (0,2-1 μm) i rígids, per tant, són fàcils de trencar.

El nombre de pilis per cèl·lula sol anar de 1 a 4, depenent del bacteri hoste (Novotny i Lavin, 1971). Bradley (1980) va definir la síntesi dels pilis en base a l’observació per microscopi electrònic com a constitutiva (20 o més pilis per requadre en una reixeta de microscopi electrònic) o com a reprimida (menys d’un pili per requadre en una reixeta de microscopi electrònic). Generalment els pilis es poden trobar en qualsevol lloc de la superfície cel·lular, tant en el pols com en el centre. En canvi, els T-pilis d’*Agrobacterium tumefaciens* són més abundants als pols de la cèl·lula (Lai *et al.*, 2000). La localització del pili determinarà la localització on les cèl·lules donadora i receptora es posaran en contacte (Lawley *et al.*, 2002b).

No es coneix si hi ha receptors específics que permetin que el pili s’uneixi a la cèl·lula receptora. La proteïna de membrana externa OmpA i l’estructura del lipopolisacàrid (LPS) d’*Escherichia coli* són necessaris en la cèl·lula receptora per un aparellament correcte en medi líquid pel plàsmid F, però no s’ha observat contacte directe entre aquests dos components amb el pili (Skurray *et al.*, 1974; Achtman *et al.*, 1978; Anthony *et al.*, 1994). El fet de que la conjugació es dugui a terme entre

diferents bacteris, i fins i tot de bacteris a llevats, a plantes i a cèl·lules animals fa pensar que el mecanisme de transferència de DNA no sigui específic per la cèl·lula receptora (Buchanan-Wollaston *et al.*, 1987; Heinemann i Sprague, 1989; Waters, 2001). Sembla ser que, en molts casos, la conjugació pugui transferir DNA sigui quin sigui el tipus de barrera que es pugui trobar (de dues a quatre bicapes lipídiques, parets bacterianes, lipopolisacàrids). Potser aquest és un procés més agressiu del que es pugui pensar, i que en realitat sigui un sistema capaç de perforar tots els tipus de membranes biològiques (Llosa *et al.*, 2002).

Un cop el pili ha interaccionat amb la cèl·lula receptora, les dues cèl·lules s'acosten. Sembla que aquest procés d'acostament en els pilis de tipus F es duu a terme mitjançant retracció del pili que s'aconsegueix amb una despolimerització de les seves subunitats (Curtiss, 1969; Achtman *et al.*, 1978). Pels sistemes que produeixen pilis rígids (pilis tipus P) s'exclou, però, aquest sistema de retracció.

Els pilis tipus F (llargs i flexibles) permeten l'aparellament tant en medi líquid com en medi sòlid amb aproximadament la mateixa eficiència. En canvi, els pilis tipus P (rígids) s'aparellen millor en medi sòlid (Bradley *et al.*, 1980; Bradley, 1980). Això és degut al fet que els pilis F es retrauen i permeten l'estabilització de l'aparellament, facilitant així l'aparellament en medi líquid. La retracció del pili F sembla ser que es duu a terme en resposta a una senyal d'aparellament que ve de la punta del pili quan contacta amb una cèl·lula receptora (Novotny i Fives-Taylor, 1974; Novotny i Fives-Taylor, 1978; Paranchych i Frost, 1988; Lawley *et al.*, 2003b).

La conjugació amb una cèl·lula receptora que ja té el plàsmid que es vol transferir és específicament inhibida per un sistema d'exclusió d'entrada (Eex) codificat en els plàsmids conjugatius (Achtman *et al.*, 1977; Riede i Eschbach, 1986; Haase *et al.*, 1996). Cada plàsmid té el seu propi sistema d'exclusió, però alguns plàsmids codifiquen sistemes Eex relacionats els uns amb els altres, fent que s'inhibeixi l'entrada de qualsevol plàsmid pertanyent a aquest mateix grup Eex.

1.6.1.1 Components del complex Mpf

El T4SS tipus P (T4SS-P) està format, apart dels plàsmids dels grups d'incompatibilitat esmentats anteriorment, pel plàsmid Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*. Totes les proteïnes que formen part del complex Mpf tipus P

s'anomenen segons la nomenclatura de les proteïnes del plàsmid Ti (VirB1-VirB11 i VirD4) o dels plàsmids IncP (proteïnes Trb). En el T4SS tipus F (T4SS-F), la nomenclatura utilitzada serà la del plàsmid F (proteïnes Tra) amb alguna excepció. S'ha de tenir en compte però que cada plàsmid té la seva pròpia nomenclatura. A la figura 1.6.1.1.1 hi podem veure un esquema del complex Mpf o T4SS, on hi podem veure la disposició de les proteïnes que en formen part. Seguidament es fa un repàs de les proteïnes que formen part del T4SS:

La pilina: en el T4SS-P les proteïnes tipus VirB2 (TrbC pels plàsmids IncP) són les subunitats estructurals de la pilina i en el T4SS-F són les proteïnes tipus TraA. Tenen entre 100 i 150 aa i sofreixen diversos processaments: un tall N-terminal del pèptid senyal (Majdalani *et al.*, 1996; Majdalani i Ippen-Ihler, 1996), una acetilació a l'extrem N-terminal per la proteïna TraX en el cas de les proteïnes tipus TraA (Moore *et al.*, 1993) i un processament per una ciclasi, en el cas de les pilines de tipus VirB2, que unirà els seus extrems C- i N-terminals de manera que quedarà una proteïna cíclica (Eisenbrandt *et al.*, 1999). Els plàsmids R27, R391 i pNL1 codifiquen el complex Mpf tipus F, però en canvi la seva pilina és més semblant a la dels plàsmids amb el T4SS-P, de manera que es pensa que podrien ser processades també per la ciclasi (Lawley *et al.*, 2003a, 2003b). Diversos estudis indiquen que la pilina és emmagatzemada a la membrana interna per després ser polimeritzada per formar el pili (Moore *et al.*, 1981; Shirasu i Kado, 1993). En el T4SS-F, la proteïna TraQ actua de xaperona per la correcta inserció i acumulació de la pilina a la membrana interna (Lu *et al.*, 2002). Segons s'ha demostrat pel plàsmid R27, el pili és ensamblat incorporant les subunitats de pilina a la base del pili (Maher *et al.*, 1993). La retracció del pili en resposta al contacte amb una cèl·lula receptora sembla ser que es faria per un procés invers a l'ensamblatge (Frost *et al.*, 1985), i les subunitats de pilina tornarien a la membrana estabilitzant l'aparellament.

Muramidasa: és troba només en el T4SS-P, són les proteïnes tipus VirB1. Pertanyen a la superfamília de les glicosilases tipus lisozim (Koraimann, 2003). Els membres d'aquesta família són capaços de trencar el peptidoglicà de la paret dels bacteris Gram-negatius en punts localitzats, facilitant la formació del complex Mpf. Les proteïnes tipus VirB1 tenen un pèptid senyal i es localitzen al periplasma (Bayer *et al.*, 2000).

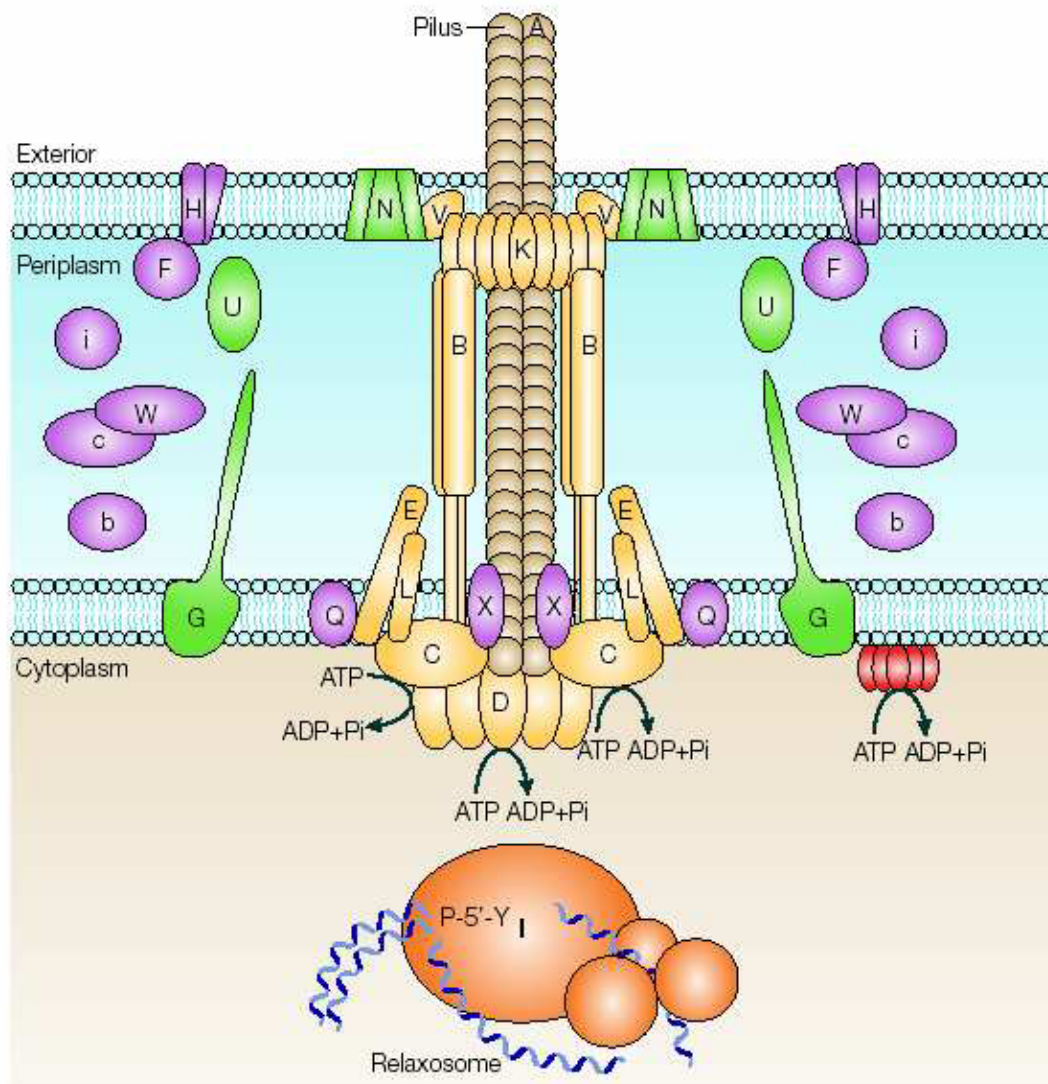


Figura 1.6.1.1 Proteïnes més importants dels sistemes conjugatius en els bacteris Gram-negatius. El sistema conjugatiu tipus F està localitzat a la membrana interna, membra externa i a través del periplasma. Les proteïnes Tra (nomenclatura dels plàsmids IncF del T4SS-F) estan marcades en majúscula i les proteïnes Trb (nomenclatura dels plàsmids IncP del T4SS-P) amb lletres minúscules. Aquelles proteïnes que tenen ortòlegs en el sistema de conjugació tipus P estan en color groc. Les proteïnes específiques del tipus F són les de color violeta en el cas de les que estan implicades en l'assemblatge del pili, i de color verd les que estan implicades en l'estabilització de l'aparellament. L'ATPasa típica del sistema de conjugació tipus P és de color vermell. Figura extreta de Frost *et al.* (2005).

Proteïnes tipus VirB3/TraL: les proteïnes tipus VirB3 (als plàsmids IncP, TrbD) són petites (93-108 aa) i es troben a la membrana interna i externa, però majoritàriament a la membrana externa (Shirasu i Kado, 1993). Les proteïnes tipus TraL del T4SS-F sembla que es localitzen a la membrana interna (Grahn *et al.*, 2000). L'únic que se sap d'aquestes proteïnes és que VirB3 interacciona amb les proteïnes VirB4 i VirB5 en el T4SS-P (Jones *et al.*, 1994; Strauch *et al.*, 2003; Shamaei-Tousi *et al.*, 2004), i que TrhL de R27 (homòloga a TraL del plàsmid F) interacciona amb les proteïnes TrhC i TrhE de R27 (homòlogues a TraC i TraE del plàsmid F respectivament) (Gilmour *et al.*, 2001).

Proteïnes tipus VirB4/TraC (TrbE a plàsmids IncP): aquestes són proteïnes de gran tamany (799-893 aa) i es localitzen a la membrana interna. Tots els membres d'aquesta família de proteïnes contenen dominis conservats Walker A i Walker B (dominis d'unió de nucleòtids que catalitzen la seva hidròlisi), de manera que sembla ser que proporcionen l'energia necessària per l'ensamblatge del pili i en general per a la secreció (Fullner *et al.*, 1994; Cao i Saier Jr., 2001; Rabel *et al.*, 2003). Aquestes proteïnes formen homomultímers necessaris per a la formació del canal que transportarà el DNA. Probablement els dominis amb activitat NTPasa donaran l'energia necessària per la formació del canal, mentre que la resta de dominis de la proteïna formaran el canal juntament amb altres proteïnes del complex Mpf (revisat a Schröder i Lanka, 2005).

Proteïnes tipus VirB5/TraE (TrbJ a plàsmids IncP): són proteïnes d'entre 130 i 261 aa. TraE i TrbJ formen part de la membrana interna (Frost *et al.*, 1994; Grahn *et al.*, 2000), mentre que VirB5 es troba en el pili (Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999a,b), però també es pot trobar al citoplasma i a la membrana interna (Thorstenson *et al.*, 1993). S'ha proposat que VirB5 podria ser una adhesina que ajudaria a la unió entre les dues cèl·lules (Yeo *et al.*, 2003).

Proteïnes tipus VirB6/TraG (TrbL a plàsmids IncP): aquestes proteïnes formen homomultímers, amb un domini N-terminal localitzat a la membrana interna i un domini C-terminal que s'expandeix a través del periplasma formant un canal (Cascales i Christie, 2004b; Jakubowski *et al.*, 2004). Sembla ser que aquestes proteïnes juguen un paper important en la biogènesis i elongació del pili (Firth i Skurray, 1992; Hapfelmeier *et al.*, 2000; Krall *et al.*, 2002; Jakubowski *et al.*, 2003). TraG està implicada també en l'estabilització de l'aparellament juntament amb TraN

(Firth i Skurray, 1992). A més, TraG està implicada en el sistema d'exclusió de l'entrada (Eex) d'un mateix plàsmid des d'una altra cèl·lula donadora..

Proteïnes tipus VirB7/TraV (TrbH a plàsmids IncP): aquestes són petites lipoproteïnes localitzades a la part interior de la membrana externa (Fernandez *et al.*, 1996; Sagulenko *et al.*, 2001; Harris i Silverman, 2002). Totes elles conserven dues cisteïnes que els hi permeten establir ponts disulfur per tal de formar homodímers i heterodímers amb les proteïnes VirB9, en el cas de VirB7 (Baron *et al.*, 1997; Das *et al.*, 1997), i amb TraK, en el cas de TraV (Harris *et al.*, 2001). Sembla ser que VirB7 connectaria el pili amb el canal central del complex Mpf (Krall *et al.*, 2002).

Proteïnes tipus VirB8: la proteïna VirB8 està localitzada a la membrana interna, amb la major part de la proteïna exposada a l'espai periplasmàtic (Buhdorf *et al.*, 2003; Das i Xie, 1998; Thorstenston i Zambriski, 1994). A *Agrobacterium tumefaciens* forma part del canal central del complex T4SS juntament amb VirB9 i VirB10 (Das i Xie, 2000; Krall *et al.*, 2002; Kumar i Das, 2001). La interacció d'aquestes tres proteïnes constitueix el pont entre les membranes interna i externa per secretar el DNA i les subunitats de pilina (revisat a Schröder i Lanka, 2005). Aquesta proteïna no té homòlegs al T4SS-F.

Proteïnes tipus VirB9/TraK (TrbG en els plàsmids IncP): les proteïnes tipus TraK estan localitzades al periplasma o a la membrana externa (Frost *et al.*, 1994; Grahn *et al.*, 2000; Harris *et al.*, 2001). La regió C-terminal té un domini i un domini S típics de les secretines (Lawley *et al.*, 2003a). El domini formaria un anell a la membrana externa i el domini S interactuaria amb la lipoproteïna TraV, que li serviria de xaperona (Guilvout *et al.*, 1999). El domini N-terminal interactuaria amb la proteïna de membrana interna TraB (Harris *et al.*, 2001). El complex format per TraB, TraK i TraV formaria el canal central del complex Mpf, similar al complex format per VirB8, VirB9 i VirB10 del T4SS del plàsmid Ti (Baron *et al.*, 2002). La proteïna VirB9 està localitzada a la membrana externa juntament amb VirB8 i VirB10, però també la podem trobar a la membrana interna (Shirasu i Kado, 1993; Thortenson *et al.*, 1993; Fernandez *et al.*, 1996; Kumar *et al.*, 2000). Forma ponts disulfur amb la proteïna VirB7 (Beaupré *et al.*, 1997), de manera que la seva funció podria ser la unió del canal central a la membrana externa.

Proteïnes tipus VirB10/TraB (TrbI als plàsmids IncP): la proteïna VirB10 forma el canal central juntament amb VirB8 i VirB9. VirB8 serveix d'unió a la membrana externa i VirB9 serveix d'unió a la membrana interna de manera que

VirB10 es localitza entre les dues membranes (Fernandez *et al.*, 1996). VirB10 també interactua amb els components que tenen activitat NTPasa, VirB4 i VirD4 (CP) (Ward *et al.*, 2002; Llosa *et al.*, 2003). La unió VirB10-VirD4 podria ser crucial en l'inici de la transferència del DNA. La conclusió del treball de Cascales i Christie (2004a) és que VirB10 forma un pont o el desfà entre el canal central i les proteïnes de membrana interna VirB4/VirD4, d'aquesta manera obriria una porta cap al canal central o la tancaria per la transferència del DNA (Schröder i Lanka, 2005). Les proteïnes tipus TraB tenen un zona d'unió a la membrana interna a l'extrem N-terminal, i la resta de la proteïna s'expandeix al llarg del periplasma. La regió N-terminal de TraB conté dominis "coiled-coil" implicats en la multimerització de la proteïna, i a més té una zona rica en prolines típica d'estructures que s'estenen (Gilmour *et al.*, 2003). S'ha demostrat que la proteïna TrhB de R27 (homòloga a TraB del plàsmid F) interacciona amb ella mateixa i amb la proteïna d'acoblament (CP), evidenciant que hi ha una unió entre el relaxosoma i el T4SS (Gilmour *et al.*, 2003).

Proteïnes tipus VirB11: aquesta és una proteïna de membrana interna exclusiva del T4SS-P que forma anells hexamèrics (Krause *et al.*, 2000) i pertany a la família de NTPases Pule (Whitchurch *et al.*, 1991; Motallebi-Veshareh *et al.*, 1992; Planet *et al.*, 2001). Sembla ser que VirB11 juntament amb VirB4 i VirD4 són els responsables d'energitzar tota la maquinària del T4SS, proporcionant energia tant per l'ensamblatge del complex Mpf, com per la producció del pili i per la secreció del DNA. El treball de Machón *et al.* (2002) suggereix que VirB11 facilitaria la inserció a la membrana dels components del complex Mpf. S'ha observat que VirB11 interacciona amb les proteïnes VirB1, VirB4, VirB8, VirB9 i VirB10 (Malek *et al.*, 2004; Ward *et al.*, 2002). En general, les proteïnes tipus VirB11 serien uns transductors mecànics proporcionant la força necessària pel reclutament, ensamblatge i desensamblatge dels components del T4SS facilitant així la inserció de l'aparell de secreció a la membrana interna i la translocació del substrat (Savvides *et al.*, 2003).

Proteïnes tipus TraF: aquestes proteïnes són exclusives del T4SS-F. Comparteixen similitud amb la superfamília de les tioredoxines i es localitzen al periplasma. El fet que les proteïnes TraB, -P, -G, -H, -V, -U i -N es trobin al periplasma i tinguin residus de cisteïna conservats, fa pensar que TraF podria estar implicada en la formació de ponts disulfur en aquestes proteïnes (Lawley *et al.*,

2003a). S'ha proposat també que TraF podria actuar de xaperona evitant interaccions inapropiades entre les proteïnes (Collet i Bardwell, 2002).

Proteïnes tipus TraH: els membres d'aquesta família estan localitzats al periplasma i a la membrana externa i tenen dominis "coiled-coil" a la regió C-terminal, suggerint que poden formar tant homo- com heteroligòmers (revisat a Lawley *et al.*, 2003b).

Proteïnes tipus TraW-TrbC: aquests són membres exclusius del T4SS-F. TrbC està fusionat a l'extrem N-terminal de TraW en els plàsmids R27 i R391, mentre que resten com a proteïnes separades en els plàsmids F, pED208 i pNL1. Són proteïnes localitzades al periplasma i el fet que en alguns plàsmids siguin una sola proteïna suggereix que tenen una funció conjunta (revisat a Lawley *et al.*, 2003a).

Proteïnes tipus TraN: aquesta família de proteïnes és exclusiva del T4SS-F, i són unes de les proteïnes característiques que defineixen el T4SS-F (Klimke *et al.*, 2005). Es localitzen a la membrana externa i sembla que actuen com a adhesines. Estabilitzen l'aparellament (Klimke i Frost, 1998) i interactuen amb TraV (Klimke *et al.*, 2005).

Proteïnes tipus TraU: aquesta família també és exclusiva del T4SS-F. Són proteïnes periplasmàtiques implicades en la transferència del DNA, estabilitzant l'aparellament i ajudant en la formació del porus (Moore *et al.*, 1990).

1.6.1.2 Processament del DNA i el relaxosoma en la conjugació bacteriana

En la conjugació, el substrat transmès consisteix en una còpia de cadena senzilla linear del plàsmid conjugatiu o mobilitzable, la qual té enllaçada covalentment al seu extrem 5' la relaxasa. La formació del substrat DNA-proteïna, anomenat relaxosoma, implica dos processos: un tall del plàsmid en un lloc i en una cadena específics i la replicació de la cadena senzilla del plàsmid pel model del cercle rodant (RCR). El primer dels dos processos el duen a terme les relaxases, catalitzant el tall en el lloc específic (*nic*) que es troba dins de l'origen de transferència (*oriT*) del plàsmid.

L'origen de transferència o *oriT* es troba localitzat en les regions on hi ha codificats els gens de transferència dels plàsmids. Té una mida de fins a 500 pb i la seva seqüència és similar només entre plàsmids del mateix grup d'incompatibilitat.

La regió de reconeixement de la relaxasa, però, és de només 10 nucleòtids. Els orígens de transferència tenen algunes característiques en comú: són regions riques en A+T, mapen asimètricament respecte els gens de transferència (*tra*), de manera que en la majoria de plàsmids són els últims d'entrar a la cèl·lula receptora; tenen una sèrie de repeticions directes i indirectes, en alguns casos associades a llocs d'unió a proteïnes; contenen plegaments on s'hi uneixen proteïnes que facilitaran l'accés de proteïnes al lloc de tall; inclouen promotors per a l'expressió de gens *tra* i en la majoria de casos la transcripció es fa de forma divergent des de l'*oriT*.

La reacció de tall es realitza mitjançant un atac nucleofílic dut a terme pel grup hidroxil d'un residu de tirosina de la relaxasa sobre el grup fosfat del DNA. Aquesta reacció de transesterificació dóna com a resultat un enllaç estable fosfotirosil i un grup 3' hidroxil lliure en la cadena del plàsmid que serà transferida a la cèl·lula donadora (revisat a Pansegrau i Lanka, 1996b). El tall de la cadena a transferir es realitza preferencialment en DNA superenrotllat i requereix, a part de la relaxasa, altres proteïnes accessòries (revisat a Lanka i Wilkins, 1995).

En els plàsmids F la relaxasa s'anomena TraI (Reygers *et al.*, 1991; Matson i Morton, 1991) i s'ha demostrat que les proteïnes TraM, TraY i IHF estan implicades en el processament del DNA a transferir (Tsai *et al.*, 1990; Di Laurenzin *et al.*, 1992; Wilkins i Lanka, 1993; Nelson *et al.*, 1993; Luo *et al.*, 1994). De fet TraY s'uneix específicament a l'*oriT* (Lahue i Matson, 1990; Inamoto *et al.*, 1991; Frost *et al.*, 1994).

En els plàsmids IncP, la relaxasa és la proteïna TraI (Pansegrau *et al.*, 1990). A més, al relaxosoma hi trobem les proteïnes TraJ, que s'uneix específicament a l'*oriT* (Ziegelin *et al.*, 1989), i la proteïna TraH que s'uneix a TraI i TraJ i estabilitza la unió DNA-proteïna (Cole *et al.*, 1993).

Per tal que es pugui transferir el DNA de cadena senzilla, hi ha d'haver alguna helicasa que desenrotlli el DNA, codificada al plàsmid o a la cèl·lula hoste (Matson i Kaiser-Rogers, 1990). Aquest procés s'ha estudiat sobretot en els plàsmids IncF, ja que la relaxasa (TraI) també té activitat helicasa (Geider i Hoffmann-Berling, 1981). TraI desenrotlla el DNA en direcció 5' a 3' (Kuhn *et al.*, 1979; Lahue i Matson, 1988) formant agregats al llarg de la cadena senzilla de DNA. No es descarta que altres proteïnes puguin intervenir en aquest procés (Willets i Skurray, 1987; Traxler i Minkley, 1988). En els plàsmids IncP, IncQ i Ti no s'han trobat helicases.

El substrat relaxasa-DNA és secretat unidireccionalment (en direcció 5' → 3') cap a la cèl·lula receptora. La transferència és produïda per la maquinària del Mpf i per la CP i probablement està lligada a la replicació del plàsmid per cercle rodant. Després de la transferència completa de la cadena de DNA dins de la cèl·lula receptora, la relaxasa reconeix el lloc de tall (*nic*) reconstituït i duu a terme una segona reacció de transesterificació donant com a resultat la recircularització de la cadena transferida (Pansegrau i Lanka, 1996a; Llosa *et al.*, 2002). El fet que la relaxasa interaccioni amb la proteïna d'acoblament (Pansegrau i Lanka, 1996b; Szpirer *et al.*, 2000; Schröder *et al.*, 2002; Llosa *et al.*, 2003) i que sigui secretada a la cèl·lula receptora (Luo i Isberg, 2004; Vergunst *et al.*, 2005; Wegrzyn, 2005), fa pensar que és la relaxasa la proteïna pilot que dirigeix el DNA lligat covalentment cap a la cèl·lula receptora gràcies a la interacció amb la CP (Schröder i Lanka, 2005). La transferència del DNA de cadena senzilla va associada amb la seva replicació, tant en la cèl·lula donadora com en la receptora, utilitzant la DNA polimerasa III de la cèl·lula hoste (revisat a Lanka i Wilkins, 1995).

No se sap si durant la transferència la relaxasa es manté a la cèl·lula donadora prop del canal de transferència o si és transferida a la cèl·lula receptora. S'ha descrit que en alguns sistemes de conjugació hi ha proteïnes que es transfereixen juntament amb el DNA. Exemples d'això els trobem en els plàsmids ColIb (IncI), R1162 (IncQ) i RP4 (IncP), on es pot trobar gran quantitat de primasa codificada pel plàsmid al citoplasma de la cèl·lula receptora (Merryweather *et al.*, 1986; Rees i Wilkins, 1989; Rees i Wilkins 1990; Henderson i Meyer, 1999). Aquesta primasa actuarà sintetitzant encebadors per iniciar la replicació de la cadena de DNA plasmídica transferida (Rees i Wilkins, 1989; Rees i Wilkins 1990; Wilkins i Lanka, 1993).

1.6.1.3 La proteïna d'acoblament: unió entre el relaxosoma i el complex Mpf

Les proteïnes d'acoblament (CP) sembla ser que són les responsables d'enllaçar el relaxosoma amb el complex Mpf. Generalment es parla de la família de proteïnes TraG, que inclou diferents membres: VirD4 al plàsmid Ti, TraG al plàsmid RP4, TrwB al plàsmid R388 i TraD al plàsmid F, entre d'altres (revisat a Christie, 2001). Aquestes proteïnes no són necessàries per la formació del relaxosoma, el tall a l'*oriT* ni per la producció del pili, però en canvi són necessàries per a la transferència del

DNA (Pansegrau *et al.*, 1990; Bolland *et al.*, 1990; Waters *et al.*, 1992; Howard *et al.*, 1995; Llosa *et al.*, 1995; Scheiffele *et al.*, 1995; Tinland *et al.*, 1995). Les següents propietats de les CPs fa que siguin unes bones candidates per a la funció d'acoblament:

- Tenen un o més dominis transmembrana a la regió N-terminal responsables de l'ancoratge a la membrana interna, i una domini C-terminal en contacte amb el citoplasma (Llosa *et al.*, 1994; Das i Xie, 1998; Lee *et al.*, 1999; Grahn *et al.*, 2000).
- Tenen seqüències conservades tipus Walker, per tant hi ha la possibilitat que siguin capaces d'hidrolitzar ATP per proporcionar energia al procés de transferència (Balzer *et al.*, 1994; Moncalián *et al.*, 1999; Gomis-Rüth *et al.*, 2002)
- La proteïna TrwB s'uneix a DNA de cadena simple i doble de forma inespecífica (Moncalián *et al.*, 1999) i és possible que TraG i TraD també s'hi uneixin (Panicker i Minkley, 1992; Baron *et al.*, 2002).
- Són intercanviables entre elles (Cabezón *et al.*, 1994). Utilitzant complexos Mpf i relaxosomes de diferents orígens, les proteïnes d'acoblament tenen diferents eficiències en el seu funcionament, depenent del tipus de relaxosoma i complex Mpf utilitzat (Cabezón *et al.*, 1997; Hamilton *et al.*, 2000). Aquesta és una evidència indirecta de que les CP serveixen de contacte entre el complex Mpf i el relaxosoma. A més hi ha diverses publicacions que demostren una unió directa entre les proteïnes d'acoblament i els relaxosomes (Disque-Kochem i Dreiseikelmann, 1997; Sastre *et al.*, 1998; Szpirer *et al.*, 2000; Baron *et al.*, 2002).
- La estructura 3D del domini citoplasmàtic de la proteïna TrwB mostra una forma esfèrica formada per un hexàmer amb un canal central de 7-8 Å (Gomis-Ruth *et al.*, 2001).
- En el plàsmid Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* s'ha descrit que la CP interactua amb VirB4, VirB10 i VirB11 (Gilmour *et al.*, 2003; Llosa *et al.*, 2003; Atmakuri *et al.*, 2004; Malek *et al.*, 2004), tots ells components del complex Mpf de membrana interna.

- Les CPs interactuen específicament amb la relaxasa (Pansegrau i Lanka, 1996b; Szpirer *et al.*, 2000; Schröder *et al.*, 2002; Llosa *et al.*, 2003).

En resum, sembla que les CPs actuarien de porta d'obertura del complex de secreció Mpf. Les interaccions específiques amb components del relaxosoma podrien funcionar com una clau que obriria la porta per al transport dels substrats. El fet que la CP interactuï amb els membres del complex Mpf capaços d'unir i hidrolitzar NTPs (VirB4 i VirB11) suggereix que els tres components actuarien com un motor localitzat a l'extrem citoplasmàtic del canal de secreció que donaria la força necessària per al transport del substrat DNA-proteïna (Schröder i Lanka, 2005).

1.6.1.4 Evolució dels plàsmids i significat ecològic

El fet que s'hagin pogut construir sistemes conjugatius quimèrics funcionals (consistents en el relaxosoma de IncQ, la proteïna d'acoblament de IncP i el sistema Mpf de Ti) (Hamilton *et al.*, 2000), ens dona a entendre que els plàsmids, sobretot els de gran tamany, han evolucionat adquirint i combinant components de diferents sistemes de transferència. Tots els sistemes conjugatius tenen uns components centrals comuns conservats i altres components específics de cada sistema conjugatiu. Els components comuns revelen un ancestre comú dels sistemes de conjugació i els elements no conservats reflexen l'evolució divergent dels diferents grups per tal d'adaptar-se a diferents ambients. El sistema de transferència de la subfamília IncF (que inclou també els plàsmids IncH/T/J) produeix pilis flexibles i llargs i és capaç de transferir DNA amb la mateixa eficiència en líquid que en sòlid mentre que la subfamília IncP (que inclou també els plàsmids IncN/W), que produeix pilis curts i rígids, transfereix el DNA millor en sòlid (Bradley *et al.*, 1980). A més, les proteïnes no conservades són responsables, probablement, de les diferències en les capacitats d'aparellament. Per exemple, les proteïnes TraN (Klimke i Frost, 1998) i TraG (Manning *et al.*, 1981) del T4SS-F, que no es troben en el T4SS-P, estan implicades en l'estabilització de l'aparellament de forma que en un ambient líquid poden millorar l'establiment de l'aparellament en contra de les forces que s'estableixen en un ambient fluid (Lawley *et al.*, 2003b).

Un altre fet important que distingeix els T4SS F i P és que no hi ha cap T4SS-F que secreti factors de virulència, de fet, no s'ha descrit cap T4SS-F que secreti proteïnes (Rees i Wilkins, 1990); en canvi, el T4SS-P és capaç de secretar diferents tipus de macromolècules: DNA, proteïnes, factors de virulència (Rees i Wilkins, 1990; Covacci i Rappuoli, 1993; Weiss *et al.*, 1993; Segal *et al.*, 1999; Wilkins i Thomas, 2000; Zhu *et al.*, 2000; Backert *et al.*, 2000; Stein *et al.*, 2000; Hofreuter *et al.*, 2001). Un altre fet a destacar és que els plàsmids amb T4SS-P tenen un ampli rang d'hostes (Guiney, 1993), mentre que els plàsmids amb T4SS-F solen tenir un espectre d'hostes restringit (Lawley *et al.*, 2003b).

Totes aquestes observacions són consistents amb els estudis sobre ecologia dels plàsmids conjugatius. Els plàsmids IncF/H estan presents normalment en bacteris entèrics, que es troben normalment en el tracte digestiu dels mamífers o en aigües residuals, dos ambients que poden tenir fases sòlides i líquides i són generalment ambients rics en nutrients (van Elsas *et al.*, 2000). En canvi, el T4SS-P sol estar associat a bacteris del sòl, com *Pseudomonas* i *Klebsiella*, i la transferència és més eficaç en sòls amb poc nutrients (Lebaron *et al.*, 1993; Pukall *et al.*, 1996). Per tant, pot ser que les diferències entre els sistemes de conjugació reflecteixin les diferències en els nínxols ecològics dels sistemes de transferència.

1.6.2 LA TRANSFERÈNCIA DE DETERMINANTS DE RESISTÈNCIA A ANTIBIÒTICS A BACTERIS PATÒGENS MITJANÇANT LA CONJUGACIÓ

Abans de la introducció dels antibiòtics com a agents terapèutics de malalties infeccioses, ja existien bacteris resistents a antibiòtics. Els bacteris patògens han desenvolupat diferents estratègies per resistir l'acció dels antibiòtics, incloent la modificació i inactivació de l'antibiòtic, l'exclusió de l'antibiòtic o la modificació de la diana. L'increment de la prevalença dels bacteris resistents a antibiòtics és el resultat de la pressió evolutiva i selectiva duta a terme pel gran ús dels antibiòtics en medicina, veterinària, alimentació animal i en l'agricultura. L'origen dels gens de resistència a antibiòtics a bacteris patògens no està clar. El període de temps des de l'inici de l'ús dels antibiòtics (fa una 50-60 anys) a l'emergència de bacteris que expressaven mecanismes de resistència és massa curt per explicar el desenvolupament

de resistències mitjançant mutacions espontànies (revisat a Grohmann *et al.*, 2003; Wain i Kidgell, 2004).

La majoria de substàncies antimicrobianes utilitzades són derivats de metabòlits d'organismes que habiten al sòl, sobretot fongs i actinomicets. Tots els mecanismes de resistència a antibiòtics, incloent les RNA metilases, transportadors ATP-dependents, fosfotransferases d'aminoglucòsids i β -lactamases, ja existien en els propis productors d'antibiòtics. Probablement els gens de resistència a antibiòtics van evolucionar en els productors d'antibiòtics per tal de protegir-se ells mateixos de l'efecte del seu propi antibiòtic. Posteriors transferències genètiques haurien escampat els determinants de resistència a altres bacteris (revisat a Grohmann *et al.*, 2003; Wain i Kidgell, 2004). La conjugació és un dels mecanismes principals en la transferència horitzontal de gens, i els plàsmids d'ampli espectre d'hostes portadors de gens de resistència podrien ser uns dels responsables de l'emergència de bacteris patògens resistents a antibiòtics (Davies, 1994; Bates *et al.*, 1998; Waters, 1999). Un altre problema afegit és l'aparició dels plàsmids resistents a múltiples antibiòtics, definits com aquells que confereixen resistència als tres principals grups d'antibiòtics: ampicil·lina, co-trimoxazol i cloramfenicol.

Es coneix que una proporció significativa de resistència a antibiòtics en bacteris està associada a l'adquisició de plàsmids (Gomez-Lus, 1998). Un exemple clar de múltiple resistència a antibiòtics el trobem en l'agent causal de la febre tifoidea, *Salmonella enterica* serovar Typhi, que ara es planteja com una amenaça pel tractament de la malaltia (White, 1999). S'ha determinat que *S. enterica* serovar Typhi resistent a múltiples antibiòtics pot ser portadora de diferents plàsmids conjugatius, però els plàsmids del grup IncHI1 són particularment força comuns a *S. enterica* (Taylor i Brose, 1985; Hampton *et al.*, 1998). Els plàsmids del grup d'incompatibilitat HI1 són conjugatius i codifiquen múltiples resistències a antibiòtics i són un factor significatiu en la re-emergència i persistència de *S. enterica* serovar Typhi (Kariuki *et al.*, 2004; Wain i Kidgell, 2004). La prevalença continuada dels plàsmids IncHI1 pot ser atribuïda parcialment a les funcions de transferència d'aquests plàsmids, ja que la transferència horitzontal manté un plàsmid dins la població bacteriana. Per tant, el sistema de conjugació pot ser una bona diana per aturar la disseminació dels plàsmids que codifiquen resistència a antibiòtics.

1.6.3 EL PLÀSMID R27: PROTOTIP DELS PLÀSMIDS DEL GRUP IncHI1

Els plàsmids del grup d'incompatibilitat H (IncH) estan dividits en dos subgrups, HI i HII (Bradley *et al.*, 1982). Els plàsmids IncHI són característics per la seva conjugació termosensible, de manera que la seva transferència és òptima entre els 22°C i els 30°C i s'inhibeix als 37°C (Rodríguez-Lemoine *et al.*, 1975; Taylor i Levine, 1980). No es coneix quina pot ser l'avantatge que dona la transferència termosensible, però Smith (1974) va suggerir que els plàsmids que es transfereixen a baixes temperatures podrien ser vectors importants en la disseminació de gens de resistència a antibiòtics en sòls i medis aquàtics. La síntesi de pilis en plàsmids IncHI és reprimida (Bradley, 1980), en canvi els plàsmids IncHII no tenen una conjugació termosensible i la seva síntesi és constitutiva (Bradley *et al.*, 1982). El grup IncHI està dividit en tres subgrups més, IncHI1, IncHI2 i IncHI3 (Roussel i Chabbert, 1978; Whiteley i Taylor, 1983). Aquesta subdivisió s'ha fet principalment en base a estudis d'homologia de DNA i de reaccions d'incompatibilitat. La majoria de plàsmids IncH aïllats pertanyen als subgrups IncHI1 i IncHI2.

R27, prototip dels plàsmids IncHI1, és un plàsmid conjugatiu de gran tamany (uns 180 kpb) capaç de transferir-se entre membres de la família *Enterobacteriaceae* i altres Gram-negatius (Maher i Taylor, 1993). En el seu treball, Maher i Taylor (1993), van transferir el plàsmid R27 des d'*E. coli* a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Shigella sonnei*, *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida*, *Erwinia carotorova*, *Klebsiella oxytoca* i *Yersinia ruckeri*. Gràcies a la seqüenciació del plàsmid R27 (Sherburne *et al.*, 2000), a estudis de les regions implicades en al transferència, replicació i segregació del plàsmid, i a estudis de la resta de gens del plàsmid, s'ha pogut arribar a una descripció força profunda de l'estructura del plàsmid i de les funcions que codifica.

1.6.3.1 Propietats generals de la seqüència del plàsmid

El plàsmid R27 té 180461 pb que corresponen a 210 Orfs. S'han trobat homologies amb altres proteïnes per 76 de les Orfs. Totes les Orfs putatives ocupen un 84,4% del plàsmid, deixant 28098 pb de zones intergèniques. No s'ha identificat cap Orf implicada directament en la patogènesis. El contingut de G+C és de 45,8%, que és

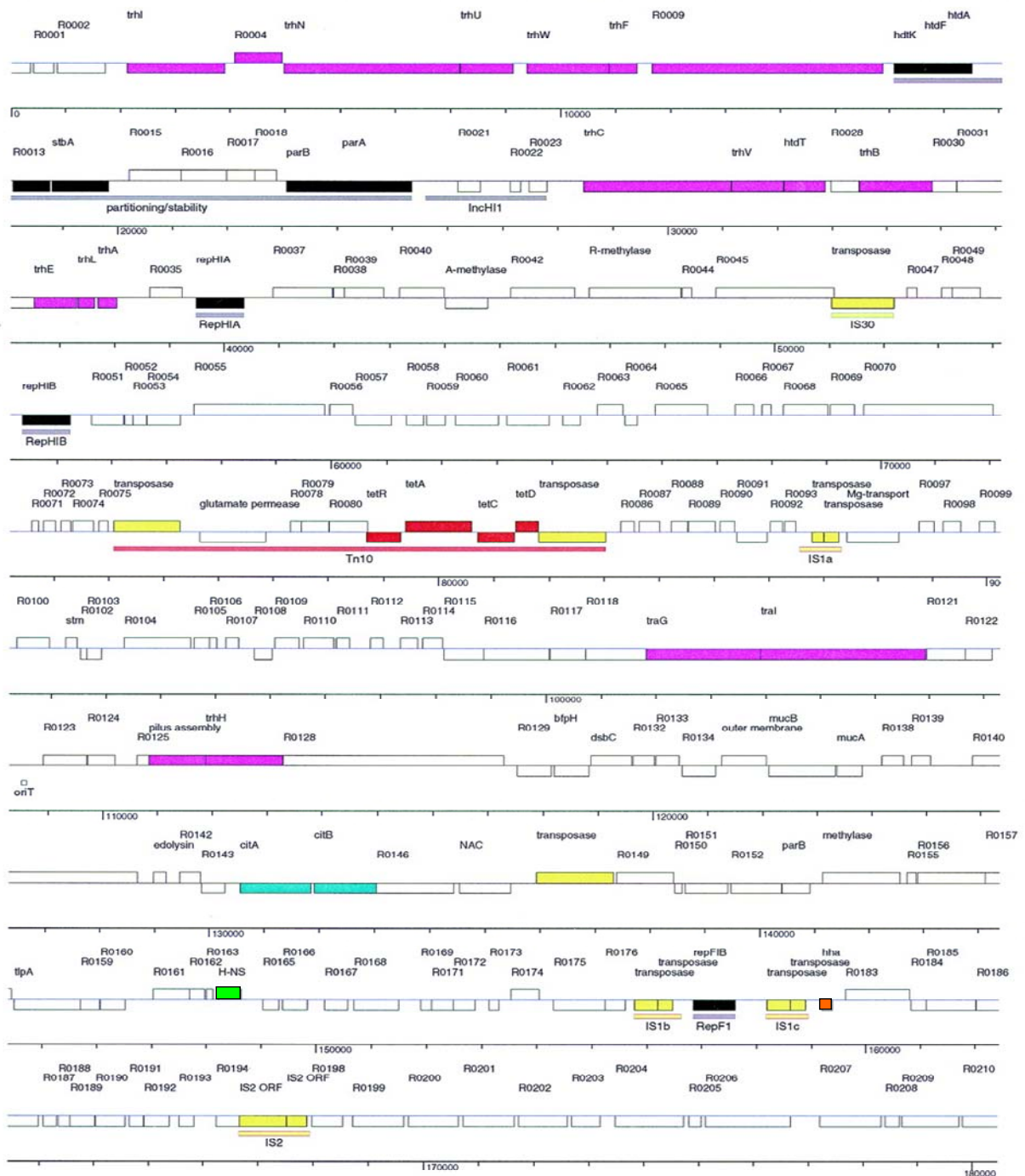


Figura 1.6.3.1 Representació lineal de R27. Els rectangles superiors són les ORFs transcrites en sentit directe, els inferiors són les ORFs transcrites en sentit revers. En groc hi ha els transposons, en negre els gens de replicació i segregació, en vermell els determinants de resistència a la tetraciclina, en blau els gens d'utilització del citrat i en rosa els gens de la transferència. La *orf164* està en verd i la *orf182* en toronja. Extret de Sherburne *et al.* (2000).

baix en comparació amb al 50-53% de *S. enterica* serovar Typhi (Hill, 1966), un hoste habitual del plàsmid (Sherburne *et al.*, 2000). A la figura 1.6.3.1 es mostra un mapa lineal de R27 amb la seva organització funcional.

1.6.3.2 Els elements transposables

R27 conté cinc seqüències d'inserció i un transposó, Tn10. A més, Orf148 presenta un 47,1% d'identitat amb una transposasa del plàsmid pNGR234 de *Rhizobium* sp. Hi trobem tres còpies de IS1 (anomenades a, b i c). IS1a es troba a 13 kb de la regió Tra1 i segurament és inactiu per l'acumulació de mutacions. IS1b i IS1c es troben flanquejant la ORF179, que mostra un 94,8% de similaritat amb la proteïna de replicació RepE del plàsmid F. Els altres dos elements d'inserció, IS2 i IS30, codifiquen cadascun la seva transposasa, i tot indica que són actives (Sherburne *et al.*, 2000).

El determinant de resistència a tetraciclina de R27 està codificat en el transposó Tn10, en els gens *tetABC*, i està controlat per repressor Tet (ORF082-ORF084 i ORF081, respectivament) (Lawley *et al.*, 2000). Tant el determinant de resistència a tetraciclina, com les transposases (ORF076 i ORF085) del transposó Tn10 estan ben conservats respecte els seus homòlegs a *E. coli*.

1.6.3.3 Les regions de replicació

R27 conté dos replicons específics de IncHI1 i un replicó parcial IncFIA (Gabant *et al.*, 1993; Gabant *et al.*, 1994). El control del nombre de còpies es fa mitjançant iterons, en els quals s'hi uneix la proteïna d'inici de la replicació. Ambdós determinants de la replicació RepHI1A i RepHI1B són capaços de dur a terme la replicació del plàsmid i actuen independentment un de l'altre (Newnham i Taylor, 1994) de manera que mantenen el nombre de còpies en una o dues per origen de replicació (Taylor i Brose, 1988). Cada replicó especifica la seva incompatibilitat (Gabant *et al.*, 1993; Newnham i Taylor, 1994), segurament degut a les diferències en les seqüències repetides que determinen els iterons. Les proteïnes d'inici de la replicació dels dos replicons són similars en la seva organització, encara que només

tenen un 34,9% de similaritat en la seqüència (Newnham i Taylor, 1994). El replicó RepFIA no és capaç de replicar el plàsmid, però en canvi si que determina incompatibilitat amb els plàsmids IncF, degut a l'expressió de la seva proteïna d'inici de replicació, RepE (Sherburne *et al.*, 2000).

El fet que R27 tingui múltiples replicons li podria donar una avantatge competitiva enfront altres plàsmids amb un sol replicó i podria incrementar el seu rang d'hostes dins de les *Enterobacteriaceae* (Sherburne *et al.*, 2000).

1.6.3.4 Les regions de segregació

L'anàlisi de la seqüència de R27 ha identificat dos mòduls de segregació localitzats dins la regió Tra2, separats per 2,7 kb i transcrits en la mateixa direcció (Lawley *et al.*, 2003b, Sherburne *et al.*, 2000). El mòdul de segregació 1 (Par1) conté dos gens, els productes dels quals són homòlegs a les famílies de proteïnes ParA/SopA i ParB/SopB. Aquestes dues famílies de proteïnes són les que trobem en els mòduls de segregació dels plàsmids P1 i F (Gerdes *et al.*, 2000). El mòdul de segregació 2 (Par2) conté dos gens, els productes dels quals són homòlegs a les proteïnes ParM i ParR dels plàsmids R1 (Gerdes *et al.*, 2000). A més, Par1 conté cinc repeticions directes de 31 pb suficients per donar incompatibilitat. Par2 conté 21 repeticions de 50 pb, els quals contenen els 31 pb de Par1. Les repeticions de Par2 donen només un cert nivell d'incompatibilitat (Gabant *et al.*, 1993).

Per tant, R27 conté dos mòduls de segregació funcionals i independents, Par1 i Par2, que pertanyen a les dues famílies de mòduls de segregació tipus I i tipus II, respectivament (Gerdes *et al.*, 2000). Tot i així, Par1 és el determinant de l'estabilitat de R27 més important, mentre que Par2 contribueix en menor grau a l'estabilitat (Lawley i Taylor, 2003).

El fet que R27 tingui dos mòduls de segregació pot proporcionar una manera d'evitar la competició entre plàsmids amb un sol mòdul de segregació homòleg, que portaria a la incompatibilitat dels plàsmids. Per tant, el fet de tenir dos mòduls de segregació seria una manera de millorar la supervivència dels plàsmids dins les comunitats bacterianes (Lawley i Taylor, 2003).

1.6.3.5 Les regions de transferència: Tra1 i Tra2

Anàlisis de restricció i mutagènesis amb transposons han mostrat que els gens responsables de la transferència del plàsmid R27 estan distribuïts en dos regions, Tra1 i Tra2, separades per 63 kpb (Taylor *et al.*, 1985). Tra1 conté l'origen de transferència i nou gens essencials per la transferència que codifiquen proteïnes del complex Mpf, la proteïna d'acoblament i les proteïnes del relaxosoma (Lawley *et al.*, 2002a). Tra2 conté 11 gens del complex Mpf essencials per la conjugació (Lawley *et al.*, 2003a). Aquests 20 gens essencials per la conjugació probablement codifiquen l'aparell de transferència sencer de R27, ja que comparant-los amb els sistemes de transferència dels plàsmids IncP i IncF s'han pogut identificar tots els gens equivalents a aquests sistemes de transferència.

1.6.3.5.1 La regió Tra1

La regió Tra1 de R27 codifica proteïnes per la formació del complex Mpf i per la síntesi del pili, la proteïna d'acoblament i les proteïnes necessàries per a la replicació i transferència del DNA. A més, conté l'origen de transferència (*oriT*). Conté 14 ORFs, de les quals 9 són essencials per a la conjugació. Aquestes ORFs estan organitzades en tres regions formades per vuit, dues i quatre ORFs separades per dues regions intergèniques de 757 i 400 pb. Totes les ORFs estan transcrites divergents a partir de la regió intergènica de 757 pb (figura 1.6.3.5.1).

La regió intergènica de 757 pb té diverses característiques típiques de les regions *oriT*: està localitzat entre dues ORFs divergents (*traH* i *trhR*), té un alt contingut en A+T i un conjunt de repeticions directes i invertides (Sherburne *et al.*, 2000; Lawley *et al.*, 2002a). Totes aquestes característiques són típiques dels orígens de transferència (Wilkins i Lanka, 1993). A més, s'ha definit dins dels 757 pb una regió mínima de 258 pb capaç de ser mobilitzada a una freqüència de conjugació de 10^{-3} transconjugants/cèl·lula donadora (Lawley *et al.*, 2002a). Aquesta és la freqüència normal de conjugació de R27 a les temperatures òptimes de conjugació.

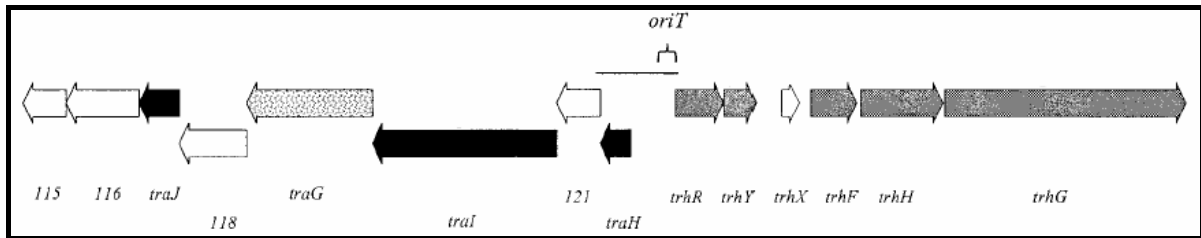


Figura 1.6.3.1 Mapa de les ORFs de la regió Tra1. Les ORFs en negre participen en la formació del relaxosoma. Les ORFs en gris fosc són necessàries per la formació del complex Mpf i la síntesi del pili. La ORF en gris clar és la proteïna d'acoblament. En blanc hi ha les ORFs no essencials per a la conjugació (extret de Lawley *et al.*, 2002a).

A la regió Tra1 hi trobem cinc gens que formen el complex Mpf i es transcriuen tots en la mateixa direcció. Els tres gens *trhF*, *trhH* i *trhG* codifiquen proteïnes omòlogues a TraF, TraH i TraG dels plàsmids IncF. En el sistema T4SS-F aquestes tres proteïnes són necessàries per la formació de complex Mpf i per la síntesi del pili, tot i així, TraG només és important per l'estabilització de l'aparellament durant la conjugació (Frost *et al.*, 1994; Firth *et al.*, 1996; Anthony *et al.*, 1999). Aquests tres gens, juntament amb 10 gens de la regió Tra2 (veure més endavant), codifiquen tot el complex Mpf de R27. Sembla ser que el complex Mpf dels plàsmids IncHI1 i IncF comparteixen un mateix ancestre (Lawley *et al.*, 2002a).

Els altres dos gens del complex Mpf de la regió Tra1, *trhR* i *trhY*, no comparteixen homologia amb cap altre component dels sistemes de conjugació coneguts; per tant, sembla que són exclusius del T4SS dels plàsmids IncHI1 (Lawley *et al.*, 2002a). En general, els gens que regulen la conjugació es troben al voltant de l'*oriT* i solen ser els components menys conservats en els sistemes conjugatius (Zechner *et al.*, 2000). Per aquestes raons, i perquè la sobreexpressió d'aquestes proteïnes augmenta la freqüència de conjugació, aquests dos gens podrien tenir un paper en la regulació de la conjugació (Lawley *et al.*, 2002a).

A la regió Tra1 hi trobem també els gens que formen el relaxosoma. El component més important del relaxosoma és la proteïna TraI. Segons els dominis característics de les relaxases, TraI té més homologia amb les relaxases dels plàsmids IncP (Sherburne *et al.*, 2000). Les relaxases es classifiquen en base a la presència o absència d'un domini helicasa a la regió C-terminal, responsable del desenrotllament del DNA. Les relaxases dels grups IncF i IncW contenen aquest domini helicasa,

mentre que les del grup IncP no el tenen (Byrd i Matson, 1997). TraI de R27 no conté el domini helicasa, fet que confirma que podria pertànyer al mateix llinatge de les relaxases del grup IncP. Els altres components accessoris del relaxosoma podrien ser les proteïnes codificades pels gens *traJ* i *traH*, ja que són essencials per la transferència del plàsmid però no per la formació del pili (Lawley *et al.*, 2002a).

La proteïna d'acoblament de R27 està codificada pel gen *traG* de la regió Tra1. La proteïna TraG comparteix poca homologia amb les altres proteïnes d'acoblament conegudes, tot i que els dominis WalkerA i WalkerB són més conservats, indicant la importància de la funcionalitat d'aquests dominis (Lawley *et al.*, 2002a). Sembla doncs, que les proteïnes d'acoblament dels plàsmids IncHI1 estan poc relacionades amb les altres proteïnes d'acoblament conegudes (Lawley *et al.*, 2002a).

A més dels gens de transferència, a la regió Tra1 hi ha quatre gens que semblen no tenir cap paper en al conjugació. Altres sistemes de transferència, com els dels plàsmids IncP i IncF, també contenen gens dins les seves regions *tra* no essencials per a la conjugació en condicions de laboratori (Lessl *et al.*, 1992; Frost *et al.*, 1994). Aquests gens no conjugatius estan dispersats entre els gens de transferència donant una organització intermitent a les regions *tra*. Aquesta organització dificulta l'assignament de fronteres de la regió Tra1. Sembla ser que la regió Tra1 estaria entre els gens *traJ* i *trhG*, per tant eliminaríem la *orf116* i la *orf115* de la regió Tra1. Tot i així, pot ser que altres gens que no estiguin en aquesta regió tinguin una funció en la conjugació (Lawley *et al.*, 2002a). Un exemple podria ser la *orf130*, que comparteix homologia amb la família de les muramidases, enzims que es troben en altres sistemes conjugatius (Bayer *et al.*, 2001).

L'anàlisi de la regió Tra1 indica que el sistema conjugatiu dels plàsmids IncHI1 comparteix ancestres comuns amb múltiples sistemes conjugatius. La regió Tra1 manté una estructura en mosaic, com indica la presència de gens no conjugatius, que reflexa la complexa història evolutiva dels plàsmids IncHI1 (Sherburne *et al.*, 2000; Lawley *et al.*, 2002a).

1.6.3.5.2 La regió Tra2

La regió Tra2 té 36 kb i conté 28 ORFs, 4 de les quals pertanyen als dos mòduls de segregació (figura 1.6.3.5.2). Totes les ORFs es transcriuen en al mateixa direcció excepte *Orf4* i les ORFs que van de la *trhO* a la *trhZ*.

La regió Tra2 codifica 11 proteïnes essencials per a la conjugació i d'aquestes, 9 són homòlogues a proteïnes del complex Mpf dels plàsmids IncF (T4SS-F) (Rooker *et al.*, 1999; Sherburne *et al.*, 2000; Lawley *et al.*, 2003a). D'aquestes 9 proteïnes, TrhL, -E, -K, -B, -V, -C i -W són essencials per la biosíntesi del pili i tenen les mateixes funcions assignades que els seus homòlegs del plàsmid F (Frost *et al.*, 1994). Les dues proteïnes restants, TrhU i TrhN no són essencials per la síntesi del pili però sembla que tenen un paper auxiliar en el seu ensamblatge. En base a l'homologia amb TraU (Moore *et al.*, 1990) i TraN (Maneewannakul *et al.*, 1992) del plàsmid F, s'ha proposat que TrhU i TrhN podrien jugar un paper en la transferència del DNA i en l'estabilització de l'aparellament, respectivament (Lawley *et al.*, 2003a). Incloent les tres proteïnes del complex Mpf de Tra1, R27 conté 12 proteïnes equivalents de les 13 proteïnes del T4SS-F, el que suggereix que el sistema de secreció IV dels plàsmids IncH i dels plàsmids IncF tenen un ancestre comú. Tot i que s'ha descrit que aquestes proteïnes formen part del complex Mpf i que estan implicades en la síntesi del pili i la transferència de DNA, el paper individual de cadascuna d'elles encara no es coneix.

TrhC, una putativa ATPasa, forma complexos associats a membrana dependents de la presència de TrhB, TrhE i TrhL (Gilmour *et al.*, 2001). Això suggereix que aquestes proteïnes podrien formar un complex multiproteic. A més, la presència dels dominis WalkerA i WalkerB fa pensar que TrhC podria estar implicada en proporcionar energia per la síntesi del pili i la transferència del DNA.

Una altra observació recent és que TrhK i altres proteïnes tipus TraK (T4SS-F) són similars a les secretines (Nouwen *et al.*, 2000; Preston *et al.*, 2001). Les secretines formen multímers a la membrana externa que actuen de porus (Linderoth *et al.*, 1996). Sembla ser que el domini C-terminal seria el responsable de la inserció a la membrana externa i de la interacció amb TrhV, que actuaria estabilitzant el complex.

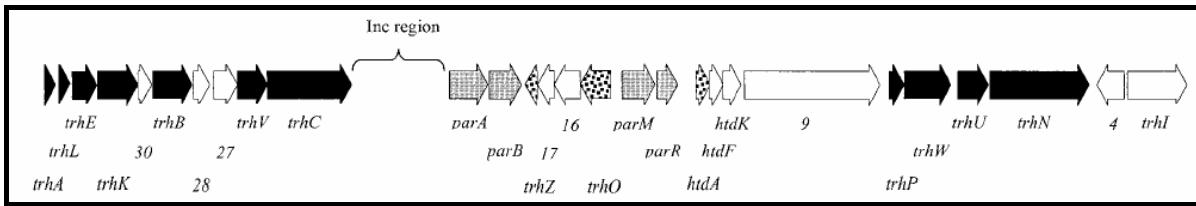


Figura 1.6.3.5.2 Mapa de la regió Tra2. Les ORFs en negre són essencials per a la conjugació. Les ORFs blanques amb punts negres són reguladors de la conjugació. Les ORFs blanques no són essencials per a la conjugació. Les ORFs grises són els gens del mòdul de segregació. La regió Inc és on hi ha les seqüències repetides del mòdul de segregació responsables de la incompatibilitat (veure apartat de les regions de segregació). (extret de Lawley *et al.*, 2003a).

Les altres dues ORFs essencials per la formació del complex Mpf i el pili són TrhA i TrhP, que són homòlogues a la pilina i a la peptidasa que processa la pilina del T4SS-P. Tot i que la homologia amb la pilina és petita, la presència de la peptidasa implica que el procés de maduració pot ser anàleg al dels pilis tipus P. Encara que la pilina sigui més semblant a la dels plàsmids tipus P, el pili conjugatiu de R27 és un pili tipus F: llarg, flexible, d'uns 11 nm de diàmetre que permet l'aparellament tant en medi sòlid com en medi líquid (Bradley, 1980; Bradley *et al.*, 1980). La síntesi del pili és reprimida en condicions permissives, ja que s'observen en petit nombre per microscòpia electrònica (Bradley, 1980). A més la taxa de creixement del pili és molt baixa, per exemple per a la síntesi d'un pili H madur són necessaris 15 minuts, mentre que per un pili F només 30 segons (Novotny *et al.*, 1969). És en cèl·lules portadores del plàsmid R27 on s'ha demostrat que la síntesi del pili es fa afegint monòmers de pilina a la base del pili (Maher *et al.*, 1993).

La resta de gens de la regió Tra2 no són essencials per a la conjugació de R27, tot i que a alguns d'ells ja se'ls ha pogut assignar una funció relacionada amb la conjugació. Els gens *trhZ* i *trhO* sembla ser que són reguladors positius de la conjugació (Lawley *et al.*, 2003a). El gen *htdA* és un repressor de la conjugació, ja que un plàsmid mutant per aquest gen és un plàsmid desreprimat per a la conjugació (Whelan *et al.*, 1994; Sherburne *et al.*, 2000). D' Orf4 i la Orf17 només es coneix que són lipoproteïnes, i de la proteïna TrhI que té dominis conservats DNA helicasa II (Lawley *et al.*, 2003a).

L'anàlisi de les regions Tra1 i Tra2 indica que els components de la transferència de R27 tenen un ancestre comú amb els sistemes IncP i IncF (Lawley *et*

al., 2002a). El relaxosoma, la pilina i la seva peptidasa provenen del mateix llinatge que els plàsmids IncP, mentre que el complex Mpf (T4SS) és del mateix llinatge que IncF. La naturalesa quimèrica del sistema de transferència de R27 podria ser deguda a fenòmens de recombinació entre plàsmids, que posteriorment haurien perdut els gens redundants (Lawley *et al.*, 2003a). El fet que hi hagi una separació entre Tra1 i Tra2 podria ser una conseqüència de la pèrdua de DNA redundant. De fet, s'ha proposat que el plàsmid Ti ha evolucionat d'una manera similar (Alt-Morbe *et al.*, 1996).

R27 té una organització en mosaic dels components genètics principals (conjugació, replicació i segregació), cosa que ens suggereix una història evolutiva complexa (Lawley *et al.*, 2000).

1.6.3.6 Conjugació sensible a la temperatura

La termosensibilitat de la conjugació és una característica distintiva dels plàsmids de grup HI (Smith, 1974; Anderson, 1975; Taylor *et al.*, 1978). Un procés semblant a la conjugació bacteriana que també es dona només a baixes temperatures és la transferència del T-DNA d'*A. tumefaciens* (Fullner i Nester, 1996; Christie, 1997). Les altes temperatures reprimeixen l'expressió dels gens de transferència del T-DNA i l'estabilitat d'almenys una de les proteïnes de transferència (Haase i Lanka, 1997; Riker, 1926; Jin *et al.*, 1993). A més, la transferència per conjugació del plàsmid Ti és també termosensible (Tempe *et al.*, 1977).

La transferència dels plàsmids IncHI1, incloent R27, és termosensible i està inhibida a 37°C (Taylor i Levine, 1980). La transferència de R27 és dependent de la temperatura de creixement de les cèl·lules donadores prèviament a l'aparellament (Taylor i Levine, 1980). Hi pot haver diversos mecanismes per regular aquesta termosensibilitat: inestabilitat dels mRNAs dels gens de transferència, inestabilitat de les proteïnes de transferència o del pili, i per últim, una pèrdua d'unió DNA-proteïna o proteïna-proteïna o una unió diferencial d'una o diverses proteïnes repressores en un rang de temperatures, que porten a una repressió de l'expressió dels gens de transferència (Sherburne *et al.*, 2000).

Hi ha diferents observacions que donen suport a aquesta hipòtesi. Primer, Maher *et al.*, (1993) van trobar que els cultius crescuts a 37°C no expressaven pilis, però quan cultius crescuts a 27°C es canviaven a 37°C, aquests mantenien el pili.

Això implica que hi ha o bé una repressió de l'expressió dels gens de transferència o una inestabilitat del mRNA d'aquests gens a 37°C. Un altre fet que dona suport a la hipòtesi anterior és que els cultius crescuts a 37°C un cop es canvien a 27°C, necessiten 3 hores per a formar nous pilis (Maher *et al.*, 1993). Aquestes tres hores serien les necessàries per a la transcripció dels gens de transferència, per la seva traducció i per l'ensamblatge del complex Mpf i el pili (Sherburne *et al.*, 2000).

En cultius crescuts a 27°C i incubats posteriorment a 37°C durant 30 min no s'observen cèl·lules aparellades (Maher *et al.*, 1993). Fins i tot un pols d'un minut a 37°C redueix la freqüència de conjugació (Sherburne *et al.*, 2000). Aquesta resposta ràpida a la temperatura és deguda a una inactivació dels elements de transferència, possiblement el pili o altres proteïnes implicades en l'aparellament (Sherburne *et al.*, 2000).

L'anàlisi de la seqüència de R27 ha permès identificar diverses ORFs els productes de les quals són homòlegs a proteïnes implicades en la termorepressió en altres sistemes (Sherburne *et al.*, 2000). S'han trobat proteïnes homòlogues a TlpA (Orf158) i a H-NS (Orf164), que són proteïnes d'unió al DNA que regulen l'expressió de gens en funció de la temperatura, i s'ha trobat també una proteïna homòloga a Hha (Orf182), que està implicada en la termoregulació de l'expressió de l'hemolisina a *E. coli* juntament amb H-NS. La proteïna TlpA està codificada en un plàsmid de virulència de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, i actua de repressor termosensible (Hurme *et al.*, 1997). La regió C-terminal de TlpA forma estructures "coiled-coil" d'unió al DNA (Hurme *et al.*, 1996). La Orf158 presenta una 21,9% d'identitat amb TlpA i les dues proteïnes presenten un perfil molt similar en la predicció d'estructures "coiled-coil" (Berger *et al.*, 1995). Per la descripció de les proteïnes Hha i H-NS veure la primera part de la introducció.

1.7 OBJECTIUS DEL TREBALL

Donada la interacció entre els membres de les famílies de proteïnes Hha i H-NS, i els resultats que desmostren una participació conjunta en la regulació de l'expressió en el cas de l'hemolisina d'*Escherichia coli*, ens vam plantejar com a primer objectiu en aquest treball determinar si aquesta participació conjunta es podia fer extensiva a altres operons regulats per H-NS, com per exemple l'operó *bgl*, descrit com a silenciats per H-NS.

Així mateix, també ens vam plantejar analitzar la regulació de l'expressió gènica depenent de les proteïnes Hha i H-NS en diferents condicions d'osmolaritat per tal d'identificar les proteïnes diferencialment expressades.

Coneguda la seqüència completa del plàsmid R27, es va determinar que codifica proteïnes homòlogues a Hha i H-NS. Ja que la conjugació d'aquest plàsmid està sotmesa a regulació per temperatura, i donat que es coneix la relació de les proteïnes tipus Hha i H-NS en la regulació de l'expressió gènica depenent de paràmetres ambientals, es pretenia determinar el paper de les proteïnes Hha i H-NS, tant pel que fa a les còpies cromosòmiques com plasmídiques, en la regulació de la conjugació del plàsmid R27, així com també la possible intervenció de les proteïnes de codificació plasmídica en la fisiologia de la cèl·lula portadora del plàsmid.

Finalment, es va realitzar un anàlisi transcriptòmic de l'efecte de les mutacions *hns* o *hha ydgT* en el patró d'expressió gènica a *Escherichia coli*, per tal de determinar quins gens estaven afectats en cadascun dels fons genètics i establir la relació entre la regulació per H-NS i per Hha/YdgT.