



UNIVERSITAT DE BARCELONA



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

4. DISCUSSIÓ

4.1 PROTEÏNES REGULADES PEL COMPLEX HHA/H-NS

4.1.1. REGULACIÓ DE L'OPERÓ *bgl*

L'operó *bgl* d'*Escherichia coli*, que codifica els productes per la fermentació de -glucòsids, és un dels exemples de sistema reprimat per H-NS amb una especificitat excepcional. El silenciament de l'expressió de l'operó per la proteïna H-NS es produeix a dos nivells: repressió de l'inici de la transcripció al promotor CRP-dependent per unió a una seqüència rica en AT ("upstream silencer"), i obstaculització de l'elongació de la transcripció per unió a una seqüència situada a 600-700 pb a 3' de l'inici de la transcripció ("downstream silencer") (Schnetzer, 1995; Dole *et al.*, 2004). Resultats obtinguts en el nostre grup de recerca havien demostrat la interacció de les proteïnes H-NS i Hha, formant complexos responsables de la regulació de l'expressió gènica (Nieto *et al.*, 2000; Madrid *et al.*, 2002b). A més a més, Caramel i Schnetz (1998) havien suggerit que el silenciament de l'operó *bgl* podia ser degut a complexos nucleoproteïcs formats per H-NS i altres factors cel·lulars, fent inaccessible a la RNA polimerasa i a la proteïna CAP el promotor de l'operó. Aquests dos fets ens van induir a pensar que les proteïnes de tipus Hha podien estar implicades en el silenciament de l'operó *bgl*, i es va plantejar estudiar l'expressió d'aquest operó en diferents fons genètics, combinant mutacions *hns*, *hha* i *ydgT*.

L'estudi del possible paper de les proteïnes Hha i YdgT en la regulació de l'expressió de l'operó *bgl* s'ha abordat analitzant directament l'activitat -glucosidasa de les diferents soques estudiades, o mesurant indirectament la transcripció mitjançant la utilització de fusions gèniques a *lacZ*. A més de confirmar el paper rellevant d'H-NS en la repressió de l'operó, els resultats obtinguts mostren que la suma de mutacions *hns* i *hha* incrementa la desrepressió de l'expressió que es dona en mutants *hns*, fet que atorga una funció reguladora a la proteïna Hha. Pel que fa a YdgT, cal tenir present que mutants *ydgT* no presenten fenotips característics, i treballs anteriors han demostrat que la proteïna YdgT podria compensar, al menys parcialment, la manca de proteïna Hha. Per tant, és interessant analitzar els nivells d'expressió de l'operó *bgl* en dobles mutants *hha ydgT*. Aquests resultats, tot i les desviacions que es poden observar entre les diferents aproximacions utilitzades,

suggereixen un paper regulador de les proteïnes tipus Hha en el silenciament de l'operó *bgl*.

L'operó *bgl* està fortament regulat, i en aquesta regulació hi estan implicades un nombre elevat de proteïnes, tot i com ja s'ha esmentat anteriorment, el paper més important és el de la proteïna H-NS, silenciant fortament l'operó. En aquest silenciament hi intervenen, però, altres proteïnes (FIS, RpoS, StpA Hfq, LeuO i BglJ) tot i que el seu paper no sigui tant rellevant. Per tant, no és estrany que tot i observar una implicació d'Hha i d'YdgT en aquest silenciament, aquesta sigui lleugera.

La repressió de l'operó *bgl* està lligada a la xarxa reguladora que controla a *E. coli* la resposta a l'estrès (Madhusudan *et al.*, 2005). L'estricta repressió de l'operó *bgl* suggereix que la utilització de α -glucòsids és perjudicial en certes condicions (Reynolds *et al.*, 1981), mentre que la conservació de l'operó a la majoria de soques d'*E. coli* sembla ser que pot estar relacionada a un paper important dels enzims codificats en determinades condicions ambientals. El fet que l'operó *bgl* sigui un possible operó induït *in vivo*, i que un complex H-NS i Hha estigui implicat en la regulació en funció de canvis ambientals fa interessant un futur estudi del paper d'aquestes proteïnes reguladores en l'expressió de l'operó *in vivo*.

4.1.2 IDENTIFICACIÓ D'ALTRES PROTEÏNES REGULADES PEL COMPLEX HHA-H-NS

Entre els objectius d'aquest treball ens havíem plantejat la identificació de possibles proteïnes regulades pel complex Hha-H-NS. Donada la relació d'aquestes proteïnes amb la regulació per factors ambientals, una possibilitat era intentar identificar possibles canvis en el patró de proteïnes de diferents mutants, *hha*, *hns* o dobles mutants, en diferents condicions de creixement. En aquest cas es va optar per variar les condicions d'osmolaritat. L'anàlisi de diferents extractes proteics ens va permetre identificar, en les fraccions periplasmàtiques, dues proteïnes que presentaven una major expressió en els mutants *hha*, *hns* i doble mutant *hha hns*. Aquestes dues proteïnes, de pes molecular aproximat de 9 i 48 kDa, van poder ser identificades com HdeA i HtrA.

4.1.2.1 HdeA

La proteïna HdeA es va identificar tant en extractes totals com en extractes periplasmàtics com a una proteïna sobreexpressada sobretot en els mutants *hns* i *hns hha*. Aquesta sobreexpressió va ser observada tant en cultius crescuts en condicions de mitja com de baixa osmolaritat.

En aquell moment només es sabia d'HdeA que era una proteïna periplasmàtica amb expressió reprimida per H-NS (H-NS dependent expression) (Yoshida *et al.*, 1993), la seva estructura terciària (Yang *et al.*, 1998), i que està relacionada amb la resistència a pH àcid a *Shigella flexneri* (Waterman i Small, 1996). El gen *hdeA* es transcriu juntament amb *hdeB*, i a més de la regulació per H-NS aquests gens estan regulats per ^S a *E. coli* i a *S. flexneri* (Arnqvist *et al.*, 1994). Posteriorment s'ha descrit HdeA com una proteïna implicada en la resistència a pH àcid en bacteris entèrics patògens (*E. coli* i *S. flexneri*) (Gajiwala i Burley, 2000) i altres patògens com *Brucella abortus* (Valderas *et al.*, 2005). A *E. coli* i a *S. flexneri* la proteïna HdeA seria necessària per resistir el pH àcid de l'estómac, i a *B. abortus* estaria implicada en la resistència al pH àcid dels fagosomes dels macròfags hoste (Valderas *et al.*, 2005). Gajiwala i Burley (2000) han descrit HdeA com una xaperona de l'espai periplasmàtic que es troba formant dímers que es desfan a pH àcid. Els monòmers d'HdeA serien capaços de segrestar les proteïnes desnaturalitzades degut al pH àcid, evitant la formació d'agregats proteics.

Per tant, els resultats obtinguts demostren que la proteïna H-NS està implicada en la regulació de l'expressió d'un gen que codifica una proteïna, HdeA, que contribueix a la resistència de les bacteries a ambients de pH àcid. Segurament en aquesta regulació hi està implicada també la proteïna Hha. El fet, però, de que en el moment d'obtenir aquests resultats no es conegués la funció de la proteïna HdeA, i de que la regulació depenent d'H-NS ja hagués estat descrita, ens va decantar a aprofundir en l'estudi de la regulació de l'altra proteïna identificada, HtrA., ja que en aquest cas si es coneixia la funció, però no la seva regulació depenent d'H-NS i Hha.

4.1.2.2 HtrA

La proteïna HtrA (DegP) d'*Escherichia coli* és una serin-proteasa que s'indueix en resposta a un xoc tèrmic. Està localitzada a la part periplasmàtica de la membrana interna i és indispensable per la supervivència per sobre els 42°C (Pallen i Wren, 1997; Clausen *et al.*, 2002). HtrA degrada les proteïnes mal plegades de l'espai periplasmàtic a elevades temperatures (Kolmar *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1999), mentre que a baixes temperatures funciona com a xaperona (Spiess *et al.*, 1999). HtrA forma part d'una gran família de proteases, els membres de la qual es troben a la majoria d'organismes, incloent els humans. En els bacteris, el principal paper d'HtrA és contribuir a la supervivència davant els estressos ambientals com la temperatura elevada, o els estressos osmòtics i oxidatius (Zumbrunn i Trueb, 1996; Ponting, 1997; Gray *et al.*, 2000). A més a més, s'ha demostrat que aquesta proteasa està implicada en la virulència de molts bacteris Gram-negatius com *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Baumler *et al.*, 1994), *Brucella abortus* (Elzer *et al.*, 1996), i *Yersinia enterocolitica* (Li *et al.*, 1996), o Gram-positius com *Streptococcus pyogenes* (Jones *et al.*, 2001), *Streptococcus pneumoniae* (Sebert *et al.*, 2002; Ibrahim *et al.*, 2004) i *Streptococcus mutans* (Ahn *et al.*, 2005).

La transcripció del gen *htrA* s'activa en condicions d'estrès associats a problemes de plegament de proteïnes, com el xoc tèrmic, i és depenent del factor sigma alternatiu ^E. A més a més de dependre de RpoE, l'activitat del promotor del gen *htrA* també està regulada pel el sistema de dos components CpxA/CpxR (revisat Clausen, 2002; Ehrmann i Clausen, 2004). En aquest sistema, CpxA és el sensor que fosforila CpxR, activant-lo i estimulant la transcripció d'*htrA* (Danese *et al.*, 1995). Una altra proteïna que actua en aquesta via de regulació és CpxP, que es manté unida a CpxA excepte quan interactua amb les proteïnes mal plegades del periplasma, deixant lliure a la proteïna CpxA, que activarà llavors CpxR (Clausen, 2002).

El factor sigma alternatiu ^E està involucrat en la resposta a estressos que afecten a l'embolcall cel·lular (Missiakas i Raina, 1997). L'activitat de ^E està controlada pel factor anti- RseA (Campbell *et al.*, 2003). RseA és una proteïna de membrana interna, amb activitat regulada a nivell de la seva estabilitat (Raivio i Silhavy, 2001). La presència de proteïnes mal plegades al periplasma activa la proteasa DegS, que farà un primer tall proteolític a RseA (Alba *et al.*, 2002). Seguidament, la proteasa YaeL farà un segon tall a RseA, que l'inactivarà i deixarà

lliure al factor ^E (Alba *et al.*, 2002; Kanehara *et al.*, 2002). Finalment ^E activarà la transcripció de diversos gens, entre els quals hi ha *htrA* (Raivio i Silhavy, 2001).

Després de la identificació de la proteïna HtrA com a diferentment expressada en mutants *hns hha*, es va dur a terme l'estudi de la transcripció del gen *htrA*. Els resultats obtinguts confirmen l'osmoregulació del gen *htrA*, així com el paper del complex Hha-H-NS en aquesta regulació a *E. coli*. Els assajos realitzats per a mesurar la transcripció del gen *htrA*, tant mitjançant la utilització de fusions gèniques com per RT-PCR, demostren que l'expressió del gen *htrA* està reprimida en condicions de baixa osmolaritat. Aquesta transcripció es veu incrementada en mutants *hha* i *hns*, sent aquesta desregulació més rellevant en condicions de baixa osmolaritat.

Com ja s'ha esmentat, l'expressió d'*htrA* és dependent de RpoE i del sistema de dos components CpxA/CpxR. Aquest darrer sistema és dependent de diferents proteïnes extracitoplasmàtiques, però el reguló RpoE pot respondre a canvis en els factors ambientals com la temperatura i l'osmolaritat (Missiakas *et al.*, 1996). S'ha descrit que el xoc hiperosmòtic a *E. coli* indueix el reguló ^E (Bianchi i Baneyx, 1999). Així, es podria pensar que l'osmoregulació d'*htrA* seria un resultat d'un canvi en els nivells de RpoE, i que l'efecte de les proteïnes H-NS i Hha seria sobre *rpoE* i indirectament llavors sobre *htrA*. Es va descartar aquesta possibilitat en mesurar l'efecte de mutacions *hha* i *hns* sobre la transcripció de *rpoE*. Els resultats obtinguts demostren que no hi ha alteració en la transcripció de *rpoE*, i per tant, l'efecte de les proteïnes Hha i H-NS és directament sobre l'expressió d'*htrA*. Els resultats obtinguts en els assajos de retard en gel confirmen l'efecte directe sobre *htrA*.

A la regulació d'*htrA* ja coneguda mitjançada RpoE i el sistema Cpx (Raivio i Silhavy, 1999), se li ha de sumar l'osmoregulació i el paper rellevant que les proteïnes Hha i H-NS juguen en aquesta. Respecte al paper fisiològic de l'osmoregulació de la transcripció d'*htrA*, és important mencionar que el creixement de *Listeria monocytogenes* en alta concentració de NaCl està restringit en mutants *htrA* (Wonderling *et al.*, 2004). El fet que el gen *htrA* estigui osmoregulat correspon a la necessitat a *E. coli* d'incrementar els nivells de proteïna HtrA quan s'incrementa l'osmolaritat, per tal de reparar les proteïnes mal plegades a conseqüència d'aquest increment. La regulació mitjançada pel complex Hha-H-NS és possiblement un procés gradual, de manera que s'explicaria un increment progressiu de l'expressió de la proteïna HtrA quan l'osmolaritat del medi incrementa.

Tant HtrA com HdeA són proteïnes amb expressió induïda en condicions d'estrès, ja sigui per reparar o degradar proteïnes mal plegades en el cas d'HtrA, o per evitar la formació d'agregats de proteïnes desnaturalitzades en el cas de HdeA. El fet de que les proteïnes H-NS i Hha estiguin implicades en la regulació de l'expressió gènica en funció de canvis ambientals fa pensar que *hdeA* i *htrA* siguin dos exemples més de gens regulats pel complex Hha-H-NS. A més, cal destacar que tant la proteïna HdeA com la proteïna HtrA estan implicades indirectament en la virulència de diferents microorganismes, fent possible que aquests superin les condicions adverses que es poden trobar en els organismes hoste (canvis de temperatura, osmolaritat, i pH).

4.2 REGULACIÓ DE LA CONJUGACIÓ DEL PLÀSMID R27

4.2.1 LES PROTEÏNES HHA I H-NS ESTAN IMPLICADES EN LA TERMOREGULACIÓ DE LA CONJUGACIÓ DE R27

La seqüenciació de diversos plàsmids ha permès la identificació de possibles proteïnes homòlogues a Hha i H-NS, de codificació plasmídica (veure la introducció). Un d'aquests casos és el plàsmid R27 de *Salmonella enterica* serovar Typhi, del grup d'incompatibilitat IncHI. La termoregulació de la transferència és una característica comuna en tots els plàsmids IncHI (Maher i Taylor, 1993). Donat el paper de les proteïnes de les famílies Hha i H-NS en la regulació dependent de factors ambientals, un dels objectius plantejats en aquest treball consistí en esbrinar quin era el paper de les proteïnes tipus Hha i H-NS en la regulació de la conjugació del plàsmid R27. El plàsmid R27 presenta dues ORFs en la seva seqüència que codificarien proteïnes amb elevada homologia a Hha (ORF182) i H-NS (ORF164). La utilització de diferents mutants en els gens de codificació plasmídica, o en els seus homòlegs cromosòmics, o combinats entre ells, ens ha permès analitzar quin és el paper d'aquestes proteïnes en la regulació per temperatura de la conjugació del plàsmid. Els resultats obtinguts demostren que tant les proteïnes de codificació plasmídica com les de codificació cromosòmica intervenen en la termoregulació de la conjugació, tot i que sembla que el paper de les proteïnes de codificació cromosòmica és més

rellevant, ja que mutants *hha hns* causen una major desregulació de la conjugació que no pas els mutants *orf164 orf182*. La major desregulació, però, és la que es produeix en el cas de la manca de tots els al·lels. Aquesta regulació no és exclusiva de la condició d'elevada temperatura, ja que els mutants també presenten desregulació a la temperatura permissiva de la conjugació (25°C). Les dades obtingudes mostren que les proteïnes plasmídiques tipus Hha i H-NS poden, en certa mesura, compensar la manca de les homòlogues cromosòmiques, pel que fa a alguns dels fenotips estudiats.

La possibilitat de que ambdues proteïnes de tipus H-NS, procedents del cromosoma i del plàsmid (o en el seu cas les dues proteïnes tipus Hha) puguin regular la transferència del plàsmid R27 és consistent amb resultats prèviament publicats en què es descriu que la, proteïna Sfh, codificada per un plàsmid IncHI de la soca 2457T de *S. flexneri* 2a i homòloga a H-NS, és capaç d'interaccionar amb les seves homòlogues cromosòmiques, H-NS i StpA, generant heterodímers implicats en la regulació de l'expressió gènica (Beloin *et al.*, 2003).

Els gens implicats en la transferència de R27 estan distribuïts en dues regions del plàsmid, les regions de transferència Tra1 i Tra2. L'estudi de la transcripció de les ORFs d'aquestes es va fer inicialment utilitzant microxips de DNA que es van dissenyar per tal que incloguessin sondes corresponents a totes aquestes ORFs. Després del disseny de les sondes i fabricació dels xips, aquests es van utilitzar per a estudiar els patrons de transcripció que presentaven les diferents soques que combinen les mutacions *hha*, *hns*, *orf164* i *orf182*.

En tots els casos en que es van trobar gens diferencialment expressats, a les dues temperatures estudiades, la diferència sempre era en la mateixa direcció: augment de l'expressió en les soques en les que mancaven les còpies cromosòmiques, plasmídiques o ambdues a la vegada dels gens *hha* i *hns*. La complementació d'aquest estudi mitjançant RT-PCR va corroborar la influència del fons genètic *hha hns* en la transcripció dels gens de transferència. En ambdós estudis, utilitzant microxips o per RT-PCR, s'observa que a la temperatura de 25°C (temperatura permissiva per a la conjugació) hi ha una repressió de l'expressió dels gens en la soca salvatge respecte les soques mutants, fet que també s'observa a 33°C. La desregulació en mutants *hha hns* dels gens de transferència a la temperatura permissiva (25°C) no és sorprenent, ja que la desregulació en mutants *hha* o *hns* en condicions permissives ha estat descrita en altres ocasions (Atlung i Ingmer, 1997; Nieto *et al.*, 2000).

Probablement això és un reflex del fet que en alguns casos les condicions permissives en un laboratori no són equivalents a les condicions permissives en el medi ambient.

Els resultats obtinguts, tant en la utilització de microxips com per RT-PCR, han confirmat el paper més rellevant de les còpies cromosòmiques de les proteïnes Hha i H-NS, que no pas les plasmídiques, ja que la desregulació és superior en el cas de manca de les còpies cromosòmiques, tal i com s'observava en analitzar les freqüències de conjugació presentades per les diferents soques.

Els resultats de l'estudi de la transcripció dels gens de transferència es veuen reforçats per l'observació per microscopi electrònic de cèl·lules portadores del plàsmid R27, ja que es poden observar pilis conjugatius en cèl·lules crescudes a 33°C portadores de R27 mutants per totes les còpies dels al·lels *hha* i *hns*, mentre no són observables en cèl·lules de la soca salvatge.

Recentment, Alonso *et al.* (2005) han descrit l'organització en operons de les regions Tra1 i Tra2. S'han identificat tres operons per la regió Tra1: l'operó F que inclou els gens *trhF*, *trhH* i *trhG*, gens que formen part del complex Mpf; l'operó R que conté els gens *trhR* i *trhY*, possibles reguladors de la conjugació; i per últim l'operó H amb els gens *traH*, *orf121*, *traI*, *traG*, *orf118*, *traJ*, *orf116* i *orf115*, gens que formen part del relaxosoma (*traH*, *traI* i *traJ*), el gen que codifica la proteïna d'acoblament (*traG*) i gens que no estan relacionats amb la conjugació (*orf121*, *orf118*, *orf116* i *orf115*). El gen *trhX* no s'ha pogut incloure en cap dels operons descrits. La regió Tra2 està organitzada també en tres operons: l'operó AC conté els gens *trhA*, *trhL*, *trhE*, *trhK*, *orf30*, *trhB*, *orf28*, *htdT*, *trhV* i *trhC*; l'operó Z està format pels gens *trhO*, *orf16*, *orf17* i *trhZ*; i l'operó AN que conté els gens *htdA*, *htdF*, *htdK*, *orf9*, *trhP*, *trhW*, *trhU*, i *trhN*.

Segons els resultats obtinguts en aquest treball en l'anàlisi de la transcripció dels gens de les regions Tra1 de R27, només els gens *trhF* i *trhH* de l'operó F presenten expressió diferencial depenent de les proteïnes Hha-H-NS, mentre que *trhG* no varia la seva expressió en un fons genètic *hha hns*. Per tant, tot i formar part del mateix operó, sembla ser que *trhG* podria tenir una regulació diferent de la dels gens *trhF* i *trhH*. Aquests gens formen part del complex Mpf, mentre que la proteïna TrhG només és important per l'estabilització de l'aparellament. Potser aquesta funció més específica podria explicar els resultats obtinguts. Els gens de l'operó R, *trhR* i *trhY*, estan sobreexpressats en mutants *hha hns*, i els valors relatius d'expressió són molt semblants pels dos gens, tant a 25 com a 33°. Sembla ser que aquests serien gens co-

regulats pel complex Hha-H-NS, fortament reprimits a 33°C. És interessant esmentar que aquests dos gens són possibles reguladors positius de la conjugació, per tant, el complex Hha-H-NS estaria implicat no només en la regulació de gens implicats en la transferència, sinó també en la regulació de gens reguladors de la transferència. Respecte a l'operó H, els tres gens que formen part del relaxosoma, *traI*, *traJ* i *traH*, i el gen que codifica la proteïna d'acoblament, *traG*, estan sotmesos a regulació pel complex Hha-H-NS. L'expressió d'*orf118*, tot i no tenir cap paper en la conjugació, sembla ser que també està influenciada per l'absència dels gens *hha* i *hns*, potser pel fet de formar part de l'operó H. El gen *trhX*, que no forma part de cap operó, no mostra una expressió diferencial en un fons genètic *hha hns*, fet que es podria explicar perquè no forma part dels gens necessaris per a la conjugació.

Pel que fa a la regió Tra2, podem observar que tots els gens de l'operó AC estan sobreexpressats en absència dels gens *hha hns*, fins i tot els gens que no són essencials per a la conjugació (*orf30*, *orf28* i *htdT*); tot i així hi ha una excepció, el gen *trhL*, que manté la mateixa expressió en les diferents soques mutants respecte la salvatge, i sembla ser que la seva expressió tampoc es veu afectada pel canvi de temperatura. Els gens de l'operó AC, necessaris per a la conjugació, formen part del complex Mpf i són essencials per la síntesi del pili. De fet el primer gen de l'operó codifica la pilina i aquest és el gen que es veu més desreprimit en l'absència dels gens *hha* i *hns* a 25°C. L'operó AN es comporta de manera molt similar al operó AC, ja que tots els seus gens estan sobreexpressats en les soques mutants pels diferents al·lels d'*hha* i d'*hns* tant si els gens són essencials o no per a la conjugació, amb una excepció, el gen *htdF*, gen no implicat en la conjugació i que manté sempre el mateix nivell d'expressió. En aquest operó hi trobem gens que formen part del complex Mpf (*trhW*, *-U* i *-N*), el gen que codifica la proteïna que processa la pilina (*trhP*), i el gen *htdA*, un regulador negatiu de la conjugació. Per tant, trobem un altre cop un gen regulador de la conjugació reprimit pel complex Hha-H-NS. Per últim, l'operó Z està constituït per dos gens no essencials per a la conjugació (*orf16* i *orf17*) i dos gens que són possibles reguladors positius de la conjugació, *trhZ* i *trhO*. L'únic gen de l'operó Z pel que presenta una expressió diferencial en un fons genètic *hha hns* és *trhZ*.

Els gens *trhI* i *orf4*, tot i no formar part de cap dels operons esmentats ni ser essencials per a la conjugació, presenten una sobreexpressió en la soca que no té cap dels gens *hha* ni *hns*. Aquest resultat suggereix que tot i no ser necessaris per a la

conjugació, si que hi podrien intervenir. De fet, *trhI* codifica una proteïna amb dominis helicasa II, funció que podria ajudar al desenrotllament del DNA a transferir.

La comparació dels resultats obtinguts en l'anàlisi transcriptòmic i la distribució dels operons identificada recentment, planteja algunes diferències en quant a la possible regulació conjunta per les proteïnes Hha i H-NS dels gens del mateix operó, que caldria analitzar en més detall per tal d'establir un mapa precís de l'efecte d'aquestes proteïnes.

Pel que fa a les diferències d'expressió segons la temperatura, és important remarcar que en l'anàlisi transcriptòmic comparant l'expressió dels gens en una mateixa soca a les dues temperatures assajades (25°C i 33°C) no es detecten diferències en la major part dels casos en cap de les quatre soques, a excepció de pocs gens, i aquests s'observen sobretot en la soca mutant pels gens cromosòmics *hha hns* i en la soca que no té cap de les còpies dels gens *hha* i *hns*. Els gens identificats que presenten major expressió a 25°C són: *trhA* (que codifica la pilina), alguns gens del complex Mpf (*trhE*, *trhK*, *trhV* i *trhC*, *trhF*), el gen *traH* (que forma part del relaxosoma), i per últim *htdA* (un regulador negatiu de la conjugació). Els dos únics gens més expressats a 33°C són *trhY* i *trhR*, uns possibles reguladors positius. El fet que aquests gens reguladors tinguin una expressió dependent de temperatura en els mutants *hha hns*, ens permet hipotetitzar aquesta seria possiblement una de les claus de la regulació dependent de temperatura per les proteïnes del complex Hha/H-NS. No podem descartar, però, la regulació directa per temperatura d'altres gens, ja que els resultats de les RT-PCR mostren clares diferències entre la transcripció a 25 i 33°C dels gens estudiats. Fins ara només s'havien descrit dos gens de transferència que presenten una expressió disminuïda a altes temperatures, *trhC* (Gilmour *et al.*, 2001) i *traG* (Gunton *et al.*, 2005).

Els assajos de retard en gel suggereixen una interacció d'H-NS a diferents llocs de les regions Tra1 i Tra2. Recentment, Alonso *et al.* (2005) han determinat possibles llocs d'unió de la proteïna H-NS en els promotors dels operons H i R, i han definit zones de DNA corbat en els tres operons de la regió Tra1 i en els operons AC i Z. El fet que els gens que presenten una expressió Hha-H-NS dependent pertanyin a diferents unitats transcripcionals i que H-NS mostri una unió preferencial en diferents seqüències suggereix la formació de múltiples interaccions DNA-proteïna al llarg de les regions Tra1 i Tra2. Un fet remarcable és que una de les seqüències per la qual H-NS mostra una unió preferencial és *oriT*. A més a més, la presència de la proteïna

Hha en les barreges H-NS/DNA facilita la generació de complexos heteroligomèrics d'ordre més elevat. Aquests resultats són similars als obtinguts en l'estudi de la regulació de l'operó de l'hemolisina pel complex Hha/H-NS (Nieto *et al.*, 2000)

El fet que la soca Hha3 hns R27-hha-hns transfereixi el plàsmid amb una elevada eficiència a 33°C però no a 37°C, suggereix que a més de la termoregulació dependent de les proteïnes Hha i H-NS, la temperatura afecta a altres aspectes en el procés de la conjugació. Tot i que s'ha demostrat que els pilis H sintetitzats a 27°C són estables morfològicament a 37°C (Maher *et al.*, 1993), un pols de tant sols 30 segons a 37°C d'un cultiu d'aparellament redueix significativament la freqüència de conjugació de R27 (Sherburne *et al.*, 2000). Per tant, a part de la repressió Hha-H-NS-dependent de diversos gens *tra*, els mecanismes de termoregulació de la transferència de R27 inclouen també alteracions estructurals d'una o més proteïnes del sistema conjugatiu.

La participació d'H-NS (amb o sense Hha) en la termoregulació d'altres processos està normalment associada a una repressió de l'expressió a baixes temperatures. Falconi *et al.* (1998) han proposat un model que relaciona la temperatura, la flexibilitat del DNA i l'habilitat d'H-NS d'unir-se a les seqüències promotores a baixa temperatura. Un exemple que dona suport a aquest model és la termoregulació de l'expressió de l'hemolisina mitjançada per Hha i H-NS (Madrid *et al.*, 2002b). Els resultats presentats en aquest treball mostren que aquestes proteïnes també són capaces de reprimir la transcripció a altes temperatures. En el cas de la proteïna YmoA de *Yersinia enterocolitica*, s'ha descrit el seu paper com a regulador negatiu de l'expressió de gens d'invasió en a 37°C (Ellison *et al.*, 2003). Seria interessant, doncs, aprofundir en l'estudi de l'estructura i les propietats dels diferents complexos H-NS-DNA (o H-NS-Hha-DNA) que duen a terme una repressió de diferents promotors sota estímuls físics aparentment diferents (elevada i baixa temperatura). Un altre exemple de regulació diferencial H-NS-dependent el trobem en els plàsmids IncF: H-NS actua de repressor de la transferència del plàsmid F en l'inici de la fase estacionària (Will *et al.*, 2004), però en canvi actua d'activador de la conjugació en el plàsmid pRK100 juntament amb Lrp (Starcic-Erjavec *et al.*, 2003). És possible, doncs, que cada plàsmid presenti les seves característiques reguladores específiques en resposta als senyals ambientals o fisiològics, i fins i tot diferents estratègies per disseminar-se en les poblacions bacterianes. De fet, l'ensamblatge de l'aparell Mpf i la transferència coordinada del DNA representen un procés biològic

complex amb una demanda d'energia. Per tant, no és sorprenent que la conjugació sigui un procés fortament regulat en funció dels estímuls ambientals, i R27 és un bon exemple, tal i com es mostra en aquest treball. La conjugació de R27 està regulada tant per proteïnes codificades al propi plàsmid, dins i fora de les regions de transferència, com per proteïnes codificades al cromosoma. S'ha descrit que H-NS sovint actua amb altres proteïnes en els processos de regulació, i la termoregulació de la conjugació del plàsmid R27 n'és un exemple. A més d'H-NS, hi intervé l'homòleg d'H-NS de codificació plasmídica, les proteïnes tipus Hha i possibles reguladors de la conjugació codificats a les mateixes regions de transferència del plàsmid, com són HtdA, TrhZ, TrhY, TrhO i TrhZ.

4.2.2 IMPLICACIÓ DE LES PROTEÏNES PLASMÍDIQUES EN LA REGULACIÓ DE FUNCIONS CEL·LULARS

La regulació de l'expressió de gens d'origen plasmídic per part d'H-NS ja ha estat descrita, així com el possible paper de les proteïnes associades al nucleoide en la regulació de la conjugació (Dorman, 2004). Sembla força raonable que en molts casos les proteïnes associades al nucleoide, tant si estan codificades al cromosoma com als plàsmids, estiguin implicades en la modulació de funcions plasmídiques o participin en la regulació de gens cromosòmics. Els resultats obtinguts en aquest treball demostren que les proteïnes homòlogues a Hha i H-NS, de codificació plasmídica, poden intervenir en la regulació de l'expressió de gens cromosòmics, que estan sotmesos a regulació Hha o H-NS-depenent: la presència dels gens *orf164* i/o *orf182* pot compensar alguns dels fenotips causats per mutacions *hha* i/o *hns*.

Les proteïnes Hha i H-NS interactuen, i formen complexos que intervenen en la regulació gènica (Nieto *et al.*, 2000). La proteïna homòloga a H-NS de codificació plasmídica també interactua amb la proteïna Hha de codificació cromosòmica, i no es pot descartar que hi hagi altres interaccions entre el conjunt de proteïnes de les famílies Hha i H-NS. Per tant, l'adquisició d'un plàsmid que codifica proteïnes associades al nucleoide pot aportar a la cèl·lula nous elements a intervenir en els sistemes de regulació. Recentment, s'ha identificat la proteïna Sfh homòloga a H-NS, codificada a un plàsmid IncHI de *Shigella flexneri* 2a soca 2457T. Sfh interacciona i forma herterodímers amb les seves proteïnes homòlogues H-NS i StpA. A més, el gen

sfh és capaç de complementar la mutació *hns*. S'ha demostrat també que quan les cèl·lules de *S. flexneri* entren en fase estacionària, els nivells intracel·lulars d'H-NS incrementen i els de Sfh disminueixen (Deighan *et al.*, 2003). Això suggereix una regulació diferent per l'expressió d'H-NS i Sfh. La regulació de l'expressió de les proteïnes homòlogues a Hha i H-NS codificades al plàsmid R27 no es coneix, però si la regulació de l'expressió d'aquests dos determinants plasmídics és diferent a la dels al·lels cromosòmics, l'adquisició dels plàsmid R27 pot portar a alteracions en les xarxes reguladores centrals de la cèl·lula hoste. La presència de còpies addicionals de proteïnes Hha i H-NS pot modificar la regulació de la cèl·lula bacteriana. Aquests canvis en la regulació global de la cèl·lula poden portar a modificacions en l'eficiència dels bacteris a adaptar-se i créixer en diferents condicions ambientals

Els bacteris portadors de plàsmids IncH s'han identificat tant en aïllaments clínics com en el medi ambient (sòls, aigües residuals, etc.). Aquests plàsmids són promiscus i es transfereixen de forma òptima a temperatura ambient (Maher i Taylor, 1993; Smith *et al.*, 1978). A més de resistència a antibiòtics, els plàsmids IncH poden codificar determinants de resistència a altres agents antimicrobians com metalls pesats, tel·luri i colicines (Alonso *et al.*, 2002; Rodríguez-Lemoine, 1992), conferint a les hoste avantatges selectius que els permeten sobreviure en ambients hostils, així com facilitar la disseminació d'aquestes resistències a bacteris que es puguin trobar al medi ambient (Maher i Taylor, 1993). Proteïnes plasmídiques i cromosòmiques, com Hha i H-NS, sembla que formen part dels mecanismes regulatoris de la conjugació dels plàsmids IncH en resposta als canvis ambientals. Per tant, aquestes proteïnes estan implicades en l'èxit de la transferència i manteniment dels plàsmids IncH en la població bacteriana.

4.3 REGULACIÓ GLOBAL DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA A MUTANTS *hns* I *hha ydgT*

La proteïna H-NS està implicada en la regulació d'un gran nombre de gens, aproximadament el 5% dels gens d'*Escherichia coli* estan afectats directa o indirectament en un mutant *hns* (Hommais *et al.*, 2001). La interacció de la proteïna H-NS amb d'altres proteïnes és un fet conegut, així com també el paper d'aquestes interaccions en la regulació de l'expressió d'alguns operons, com és el cas de l'operó

de l'hemolisina d'*E. coli* (Nieto *et al.*, 2000). El plantejament de partida d'aquesta part del treball va ser analitzar quins gens estan afectats en un mutant *hha ydgT*, és a dir, regulats per les proteïnes de tipus Hha, i quina és la seva relació respecte al conjunt de gens regulats per H-NS. La hipòtesi inicial plantejada era que possiblement els gens regulats per Hha/YdgT serien una part dels regulats per H-NS. L'aproximació experimental utilitzada va ser l'anàlisi transcriptòmic mitjançant l'ús de microxips de DNA.

Es va dissenyar l'experiment de manera que es comparessin entre si diferents fons genètics: *wt / hha ydgT*, *wt / hns* i *hns / hha ydgT*.

Els resultats obtinguts en els diferents experiments, després del processament de les dades obtingudes, demostren l'elevat efecte pleiotròpic que causa una mutació *hns*: dels 4288 possibles gens representats en el microxip, 580 presenten una expressió alterada. De tota manera, si limitem aquest nombre a aquells que estan o bé expressats per un factor de 2, o bé per un factor de 0,5, el conjunt de gens afectats es redueix a 311, el que representa aproximadament un 7% del total de gens d'*E.coli*. D'aquests gens expressats diferencialment en un mutant *hns*, el 68,4% presenten una sobreexpressió en aquesta soca, fet que es correlaciona amb el paper majoritàriament repressor de la proteïna H-NS.

El conjunt de gens regulats per H-NS inclou gens implicats en la traducció; en el transport i metabolisme d'aminoàcids, sucres, nucleòtids, lípids o compostos inorgànics; gens que codifiquen proteïnes reguladores; gens implicats en la síntesi de membranes, paret cel·lular i altres estructures extracel·lulars; gens implicats en la motilitat; gens que codifiquen proteases, xaperones i altres proteïnes responsables de modificacions post-traduccionals; gens que codifiquen proteïnes implicades en la producció i conversió d'energia; gens implicats en la síntesi, transport i metabolisme de metabolits secundaris; gens implicats en la replicació, reparació i recombinació del DNA; i altres de funció desconeguda.

Les xarxes de regulació en les que estaria implicada la proteïna H-NS inclouen, entre d'altres, les que responen a estressos o canvis ambientals, com la resposta a l'osmolaritat (*osmY*, *osmC*, *osmB*, *osmE*, *proV*), a un xoc àcid (*xasA*, *asr*, *cadA*, *cadB*, *gadA*), a un xoc fred (*cspI*, *cspC*), i a un xoc tèrmic (*dnaK*, *htpG*, *grpE*, *mopA*, *hslU*, *ibpA*, *ibpB*, *hslV*, *clpB*, *htpX*, *lon*, *htrA*, *cbpA*).

Moltes de les diferències d'expressió trobades en aquest anàlisi ja havien estat descrites anteriorment, ja sigui en estudis globals o en estudis particulars de l'efecte

de la proteïna H-NS. De tota manera, les condicions en què s'ha realitzat aquest estudi, i la soca *hns* analitzada són diferents dels estudis transcriptòmics de mutants *hns* ja publicats (Hommais *et al.*, 2001). Així, en aquest treball s'han descrit algunes diferències d'expressió entre la soca *hns* i la soca salvatge que no s'havien descrit anteriorment, com és el cas del gen *htrA*, altres gens implicats en la resposta a un xoc tèrmic, o els gens que codifiquen el sistema de dos components de resposta a nivell de nitrats (*narX* i *narL*)

En fer l'anàlisi de l'expressió diferencial entre les soques BSN26HY i BSN27, es pretenia establir la relació entre el patró de regulació global conseqüència de l'activitat de les proteïnes Hha/YdgT i H-NS. El resultat ha demostrat que la regulació de l'expressió gènica que presenta la soca BSN26HY segueix majoritàriament els mateixos patrons que la soca salvatge BSN26, ja que la major part de diferències trobades entre la soca *hha ydgT* i la soca *hns* són les mateixes que ja s'havien identificat en la comparació entre la soca *hns* i la soca salvatge. Hi ha un conjunt de gens, però, pels que trobem diferències d'expressió entre les soques *hns* i salvatge, i pels que no es detecten diferències entre les soques *hha ydgT* i *hns*, el que indicaria que en aquests casos, la regulació a la soca *hns* i la soca *hha ydgT* és equivalent (taula 5 annex 2). En aquests casos, els resultats suggereixen que la regulació de l'expressió d'aquests gens a la soca *hha ydgT* és similar a la que es dona a la soca *hns*. La majoria d'aquestes diferències, però, són inferiors al doble o superiors a la meitat. D'entre les que presenten raons d'expressió més elevades, es poden destacar alguns gens, com els implicats en la síntesi de curli, que presenten una sobreexpressió en la soca *hns* respecte la salvatge. De tota manera, aquestes diferències no són detectables en analitzar les diferències en l'expressió entre la soca doble mutant *hha ydgT* i la soca salvatge.

La comparació en els nivells d'expressió gènica entre la soca *hha ydgT* i la soca salvatge ha proporcionat diferències significatives en 22 gens, dels quals 18 presenten una sobreexpressió a la soca *hha ydgT*. D'aquests 22, n'hi ha 12 que coincideixen amb els regulats per H-NS. En tots aquests casos es manté una raó d'expressió en el mateix sentit, tot i que sempre és més alterada en mutants *hns*. Aquests serien els gens pels que trobaríem una regulació conjunta per part de les proteïnes H-NS i Hha/YdgT: *htrL* (implicat en la biosíntesi de LPS), *cspI* (del reguló del xoc fred), *cutC* (relacionat amb l'homeostasi del coure), *sucD* (subunitat de la succinil-coA-

sintetasa), *pspC* (relacionat amb la infecció per fags), i altres que codifiquen hipotètiques proteïnes, o de funció desconeguda.

D'entre els gens regulats per Hha/YdgT, és a dir, amb expressió diferencial entre les soques *hha ydgT* /salvatge, però no afectats segons aquests resultats per H-NS, es poden destacar *ompC*, *rseA* i *rpoE*. En el primer cas es dona una sobreexpressió, mentre que per *rseA* i *rpoE* les diferències són molt poc acusades (raons d'expressió de 1,09 i 0,78 respectivament).

Les porines OmpC i OmpF són els constituents majoritaris de la membrana externa d'*Escherichia coli*, i representen aproximadament el 2% del contingut proteic total de la cèl·lula (revisat a Nikaido, 1996). Aquestes proteïnes formen canals que permeten la difusió passiva de soluts hidrofílics a través de la membrana externa. Hi ha diversos factors ambientals que alteren l'expressió d'aquestes porines, com l'osmolaritat, la temperatura, el pH, la disponibilitat de nutrients o la presència de toxines. En condicions d'elevada osmolaritat s'expressa majoritàriament *ompC*, mentre que l'expressió d'*ompF* és predominant quan disminueix l'osmolaritat. S'ha suggerit que la regulació diferencial de les dues porines podria proporcionar un equilibri entre la necessitat d'accedir a nutrients i la de protegir-se de las toxines. La complexa regulació ambiental de l'expressió de les porines OmpC i OmpF depèn del sistema de dos components EnvZ-OmpR i dels RNAs MicF i MicC. Els resultats obtinguts en aquest treball han posat de manifest la sobreexpressió de la porina OmpC en mutants *hha ydgT*. La regulació d'*ompC* per les proteïnes Hha i YdgT ja es va posar de manifest en estudis anteriors, mitjançant l'anàlisi de patrons proteics de mutants *hha ydgT* (Paytubi, 2004). Aquests mateixos treballs van posar de manifest la regulació d'OmpC per part de la proteïna H-NS, ja que també es trobava sobreexpressió de la porina en mutants *hns*. A més a més, aquesta sobreexpressió també ha estat descrita en mutants *hns* en anàlisis transcriptòmics previs (Hommais *et al.*, 2001). Per tant, el conjunt de resultats indiquen que les proteïnes Hha/YdgT i H-NS estan implicades en la regulació de l'expressió d'*ompC*, reprimint en tots els casos l'expressió d'aquesta porina. La relació entre aquesta regulació i els altres reguladors d'*ompC* requerirà posteriors estudis per tal d'establir quina és la xarxa de regulació.

L'anàlisi dels resultats obtinguts en l'estudi transcriptòmic que es presenta en aquest treball complementa els resultats obtinguts en l'anàlisi proteòmic anterior (Paytubi *et al.*, 2004). És important esmentar que treballs anteriors havien identificat

proteïnes diferencialment expressades en la soca salvatge respecte les soques mutants *hha ydgT* o *hns* que no s'han trobat en el present treball. Per exemple, la subexpressió de l'enzim triptofanasa, codificat pel gen *tnaA*, identificada en mutants *hha ydgT*, no s'ha detectat en el present estudi. En canvi, mentre que a nivell de proteïna no s'havia detectat una diferència en la quantitat de TnaA en mutants *hns*, ni s'havia descrit la seva expressió diferencial en els treballs de Hommais *et al.* (2001), els estudis mitjançant xips de DNA realitzats en aquesta tesi han determinat que mutants *hns* presenten nivells d'expressió del gen *tnaA* inferiors als de la soca salvatge. Per tant, cal tenir present que els resultats obtinguts poden ser complementaris des de diferents aproximacions experimentals.

En iniciar aquests treballs, i establerta la interacció funcional entre les proteïnes de la familiar Hha i la família H-NS, la hipòtesi plantejada va ser que probablement un elevat nombre dels gens dependents d'H-NS també estarien afectats per les proteïnes Hha/YdgT. Creixent en condicions d'absència d'estrès (medi LB, 37°C), l'anàlisi transcriptòmic ha mostrat que, mentre que en mutants *hns* el nombre de gens afectats de manera significativa és elevat (prop del 7% del total de gens d'*E.coli*), en mutants *hha ydgT* només es troba expressió diferencial per a un petit nombre de gens, 22, pels que no per tots es troba coregulació amb H-NS. Aquests resultats indicarien que les proteïnes de la família Hha, en absència d'estrès, restringeixen el seu efecte a un nombre reduït de gens. No es pot descartar, però, que en obtenir un doble mutant *hha ydgT* es produeixin mutacions compensatòries, que fessin que Hha fos dispensable per la proteïna H-NS. L'aparició de mutacions compensatòries en mutants *hns stpA* ja ha estat descrita amb anterioritat (Johansson *et al.*, 2000). També és important considerar la possibilitat de que proteïnes de tipus Hha siguin importants cofactors de la proteïna H-NS en condicions d'estrès (alta o baixa osmolaritat, baixa temperatura, etc.), fent més eficient la repressió mitjançada per H-NS. De fet, estudis anteriors realitzats per 2D-PAGE van evidenciar un paper regulador de la proteïna Hha més important en condicions d'alta osmolaritat (Balsalobre *et al.*, 1996). Finalment, cal tenir present, però, que la regulació per proteïnes de tipus Hha s'ha descrit majoritàriament per a gens d'origen plasmídic (com *hlyCABD*), o pertanyents a illes de patogenicitat (com *hila*), i si a aquest fet hi sumem la presència d'homòlegs de la proteïna Hha en molts plàsmids, així com el seu paper en la regulació d'aquests plàsmids (com en al cas del plàsmid R27 descrit en aquesta memòria), no seria descartable pensar que les proteïnes de tipus Hha estiguin implicades majoritàriament

en la regulació de funcions plasmídiques, o lligades a elements adquirits per transferència gènica horitzontal. Així, es podria hipotetitzar que la presència del gen *hha* al cromosoma podria garantir la correcta regulació d'elements genètics de nova adquisició. Aquesta hipòtesi implicaria que els promotors regulats per H-NS es subdividirien en dues categories: els corresponents a molts gens regulats exclusivament per H-NS, i els corresponents a un nombre restringit de gens cromosòmics, gens plasmídics i gens d'illes de patogenicitat que requeririen també de la proteïna Hha per a una correcta regulació.