



## H-NS<sub>0161</sub> PREDOMINA NO NUCLEOIDE DE *BURKHOLDERIA CENOCEPACIA* DENTRE AS PROTEÍNAS H-NS CODIFICADAS NOS CROMOSSOMOS ESSENCIAIS

Palavras-Chave: REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA, *BURKHOLDERIA CENOCEPACIA*, PROTEÍNAS H-NS

Autores:

ANA JÚLIA VIRGILIO TONHETTA, IB – UNICAMP

Prof. Dr. ROGÉRIO FERREIRA LOURENÇO, IB – UNICAMP

### INTRODUÇÃO:

Proteínas H-NS (*histone-like nucleoid structuring*) são principalmente conhecidas em bactérias Gram-negativas, especialmente enterobactérias como *Salmonella enterica* e *Escherichia coli*<sup>1</sup>, onde estão envolvidas com a regulação da expressão gênica. Possuem preferência por se ligar a regiões do genoma ricas em AT, as quais muitas vezes são regiões que foram adquiridas por transferência horizontal. Ao se ligar e silenciar a expressão de tais regiões, as proteínas H-NS protegem a bactéria de possíveis genes nocivos.<sup>2,3</sup> Por outro lado, regiões ricas em AT também possuem genes de virulência e até mesmo ilhas de patogenicidade, e a evolução de mecanismos de percepção de alterações no ambiente, como temperatura, pH e osmolaridade, permite que as proteínas H-NS silenciem essas regiões apenas quando a capacidade patogênica da bactéria não é requerida<sup>4,5</sup>.

*Burkholderia cenocepacia* é uma espécie Gram-negativa do grupo  $\beta$ -Proteobacteria pertencente ao complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc), que inclui bactérias oportunistas que afetam pacientes imunocomprometidos, como os portadores de fibrose cística, causando infecções respiratórias crônicas<sup>6</sup>. Em *Burkholderia cenocepacia* H111 existem seis genes que expressam proteínas com motivo H-NS, distribuídos entre os três cromossomos presentes na bactéria, sendo cinco deles típicos (codificam proteínas de tamanhos similares aos das demais proteínas da família H-NS) e um atípico (codifica uma proteína com extensão da região amino-terminal em comparação às proteínas da família H-NS e mantém similaridade apenas com a região de ligação ao DNA), para os quais ainda existem poucas informações acerca de seus níveis de expressão, interações moleculares e papéis no funcionamento da bactéria. Desse modo, neste trabalho, buscamos estudar três das proteínas H-NS presentes em *B. cenocepacia* H111 (H-NS<sub>0129</sub>, H-NS<sub>0161</sub> e H-NS<sub>6597</sub>), distribuídas nos cromossomos 1 e 2, em relação à sua expressão na bactéria e possíveis interações com outras proteínas e o DNA.

## **METODOLOGIA:**

- Linhagens e condições de crescimento

Foram utilizadas as linhagens de *E. coli* DH5 $\alpha$ , CC118 $\lambda$ pir e SM10 $\lambda$ pir crescidas a 37°C em meio LB, acrescido de 100  $\mu$ g/ml ampicilina (amp), 50  $\mu$ g/ml trimetoprima (trim) ou 50  $\mu$ g/ml canamicina (can). *B. cenocepacia* (H111 e linhagens derivadas) foi crescida a 37°C em meio LLB ou meio mínimo M9 - usado após conjugação para seleção -, acrescidos de 100 $\mu$ g/ml ampicilina (amp) e/ou 50  $\mu$ g/ml trimetoprima (trim).

- Obtenção das linhagens

Fragmentos de DNA foram gerados por PCR utilizando *Phusion High-Fidelity* (Thermo). Os primers utilizados adicionaram à sequência um sítio de restrição na extremidade 5' e uma sequência FLAG à extremidade 3' do gene. Os fragmentos foram ligados ao vetor de clonagem pJET 1.2 blunt para obtenção de um segundo sítio de restrição na extremidade 3' do fragmento. Após digerido, foi possível ligar o fragmento ao vetor suicida pGPIh-Sce-I, onde foi utilizada a linhagem CC118 $\lambda$ pir para replicação do vetor e SM10 $\lambda$ pir para conjugação com *B. cenocepacia* H111.

A conjugação triparental ocorreu com as linhagens SM10 $\lambda$ pir pGPIh-nsFLAG (*h-ns* se refere a cada um dos três genes) como doadora, *B. cenocepacia* H111 como receptora e DH5 $\alpha$  pRK2013 como auxiliadora, como descrito por Higgins <sup>7</sup>.

- Obtenção de extratos proteicos e co-imunoprecipitação de proteínas

*B. cenocepacia* H111 e as três linhagens derivadas, cada uma expressando uma H-NSFLAG, foram cultivadas até a fase exponencial, coletadas, lavadas com 20mM Tris-Cl pH 7.5, 150mM NaCl, 10% glicerol, ressuspendidas no mesmo tampão suplementado com *cOmplete™*, *Mini Protease Inhibitor Cocktail* (Roche) e lisadas por sonicação (6-7 ciclo de 1 min, sendo 2s ON e 10s OFF; amplitude 50% ). As amostras foram centrifugadas a 30min/4°C/20.000xg e o extrato solúvel foi coletado. A concentração de proteínas foi medida utilizando Bradford (Sigma-Aldrich) com BSA (Sigma-Aldrich) para padronização. Os experimentos de co-imunoprecipitação (co-IP) foram realizados com a adição da resina ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel (Sigma-Aldrich) lavada com tampão ao extrato e incubação por 16h/4°C. As amostras foram resultado de eluições realizadas com um peptídeo 3X FLAG - que compete pela resina com as proteínas ligadas, liberando-as - ou com SDS - liberando, por fim, todas as proteínas da resina.

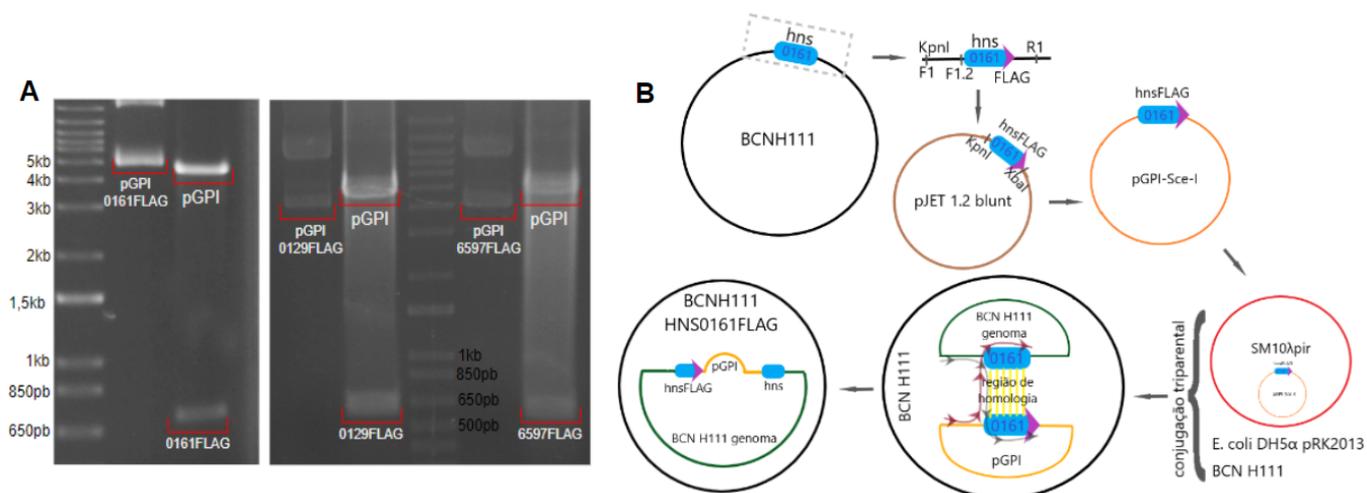
- Análise das proteínas obtidas

As amostras proteicas foram separadas em gel desnaturante de poliacrilamida 15%, sendo analisados os resultados a partir da coloração com Nitrato de Prata ou *western blotting* - após eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana PVDF 0.22  $\mu$ m (Cytiva) e esta foi incubada com o anticorpo primário monoclonal ANTI-FLAG M2 (Sigma-Aldrich) em diluição de 1:2000

por 16h/4°C. O anticorpo secundário utilizado foi *Anti-Mouse IgG-Peroxidase* (Sigma-Aldrich) em diluição 1:5000. Para a detecção das proteínas ligadas aos anticorpos, foram utilizados os reagentes *Amersham ECL Prime para Western Blotting* (Cytiva).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

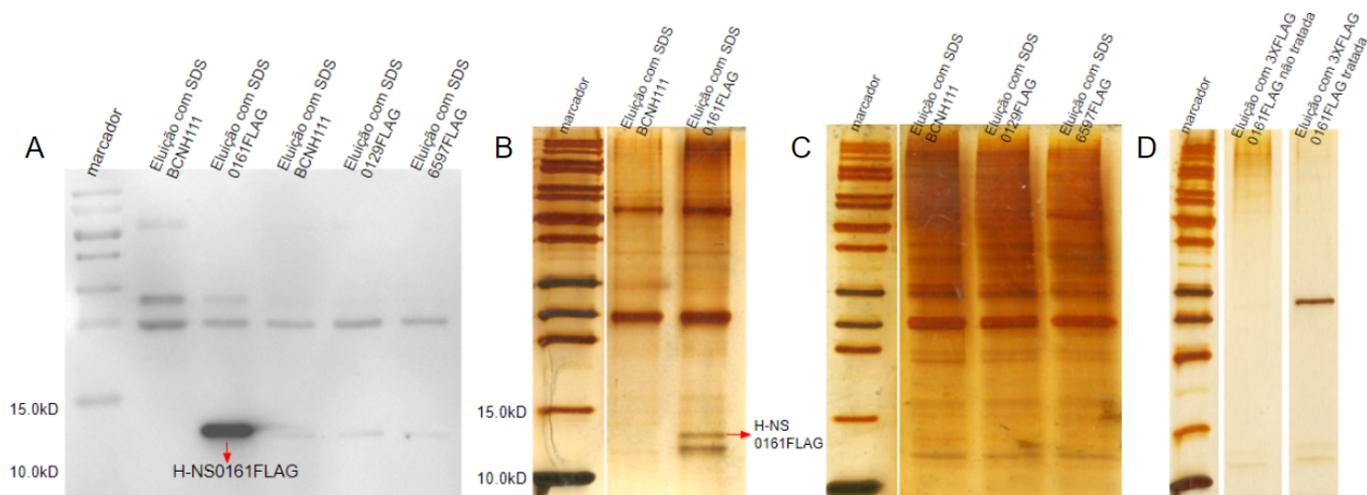
Para investigar a expressão de H-NS<sub>0129</sub>, H-NS<sub>0161</sub> e H-NS<sub>6597</sub> e as interações dessas proteínas com outras moléculas, fragmentos referentes aos genes I35\_0161, I35\_0129 e I35\_6597 e suas respectivas regiões a montante, onde espera-se estar presente a região promotora de cada um deles, foram amplificados do genoma de *B. cenocepacia* H111 e clonados no vetor suicida pGPI-Sce-I. Todas as construções carregam a sequência nucleotídica referente à cauda FLAG imediatamente antes do códon de parada do gene. Após a conjugação, cada vetor, que possui uma região de homologia com uma parte do genoma da bactéria, referente à sequência do gene inserido e sua região a montante, passou por recombinação homóloga, fazendo com que o vetor pGPI com o fragmento se integrasse no genoma da bactéria e resultasse em duas cópias do gene, uma com FLAG e a outra sem (Fig. 1A). Assim, foram geradas três linhagens, cada uma expressando uma proteína H-NS fusionada ao FLAG.



**Figura 1.** A) Confirmação da presença dos fragmentos contendo os genes *h-ns* fusionados à sequência nucleotídica do FLAG no vetor pGPI-Sce-I. Amostras não digeridas e digeridas são mostradas para cada construção. B) Esquema demonstrando o processo de integração do vetor construído em *B. cenocepacia* H111. O esquema mostra a obtenção da linhagem expressando H-NS<sub>0161</sub>-FLAG, mas pode ser usado para ilustrar as três linhagens merodiplóides construídas. O fragmento contendo *h-ns* fusionado à sequência do FLAG foi clonado no vetor pJET1.2 blunt e então subclonado em pGPI-Sce-I. A construção foi inserida em SM10λpir, linhagem que foi utilizada para conjugação triparental juntamente de *E. coli* DH5α pRK2013 para transferência dos plasmídeos para *B. cenocepacia* H111.

Extratos proteicos das linhagens construídas foram usados em experimentos de imunoprecipitação. Foi observada, a partir de análises por *western blotting* (Fig. 2) das amostras imunoprecipitadas, a presença de uma banda na amostra da linhagem que expressa H-NS<sub>0161</sub>-FLAG, que não apareceu nas amostras das demais linhagens. Esta banda provavelmente é referente à

proteína H-NS<sub>0161</sub>-FLAG, de tamanho aproximado de 11.8kDa. As outras linhagens construídas não apresentaram bandas diferentes daquelas presentes na linhagem parental, sendo possível que a expressão das proteínas H-NS<sub>0129</sub> e H-NS<sub>6597</sub> não ocorra em níveis tão altos a ponto de serem visíveis nas concentrações utilizadas.



**Figura 2.** A) Western blotting para verificação da produção das proteínas H-NS fusionadas com cauda FLAG a partir das linhagens construídas, apenas H-NS<sub>0161</sub>-FLAG confirmada. As proteínas H-NS<sub>0129</sub>-FLAG e H-NS<sub>6597</sub>-FLAG apareceriam na altura de 12kDa e 12,2kDa, respectivamente. B) Gel com coloração de Nitrato de Prata. Visíveis duas bandas entre 10.0 e 15.0 kD nas amostras contendo H-NS<sub>0161</sub>-FLAG e arraste no topo do gel. C) Sem bandas diferentes do controle nas amostras com H-NS<sub>0129</sub>-FLAG e H-NS<sub>6597</sub>-FLAG. D) Tratamento com nuclease na amostra de H-NS<sub>0161</sub>-FLAG, evidenciando o desaparecimento do arraste no início do gel.

A análise das eluições obtidas na imunoprecipitação por SDS-PAGE seguida de coloração por nitrato de prata revelou a presença de um arraste no topo do gel, maior nas amostras de células expressando H-NS<sub>0161</sub>-FLAG, que corresponde a fragmentos de DNA que foram co-purificados, uma vez que este desaparece após o tratamento com nuclease. Também são visíveis duas bandas próximas ao tamanho esperado da proteína H-NS<sub>0161</sub>-FLAG, onde a mais alta parece ser a proteína com FLAG. A segunda banda, logo abaixo, pode corresponder à proteína H-NS<sub>0161</sub> original, uma vez que as proteínas H-NS são capazes de dimerizar e oligomerizar entre si. Considerando que após a recombinação a bactéria manteve ambos os genes, com e sem a adição da sequência FLAG, em seu genoma, é possível que tenham sido produzidas ambas as proteínas, que, por interagirem entre si, foram purificadas juntas pelo anticorpo anti-FLAG e separadas pela desnaturação das proteínas que ocorre durante o preparo das amostras, assim dividindo-as em duas bandas durante a corrida do gel pela diferença de massa causada pela presença do FLAG.

Em relação às demais linhagens, novamente não foi possível observar (Fig. 2C) claramente a existência de bandas do tamanho esperado das proteínas H-NS<sub>0129</sub>-FLAG e H-NS<sub>6597</sub>-FLAG que não estivessem presentes também na amostra controle, reafirmando a possibilidade de seus níveis de expressão serem baixos.

## CONCLUSÕES:

Considerando os resultados obtidos é possível confirmar a produção da proteína H-NS<sub>0161</sub>-FLAG a partir da linhagem construída, além de observar que os níveis dessa proteína são maiores do que as proteínas H-NS<sub>0129</sub>-FLAG e H-NS<sub>6597</sub>-FLAG. Também, a partir dos dados, é sugerido que a proteína H-NS<sub>0161</sub>-FLAG se liga ao DNA e se autoassocia, existindo a interação entre proteínas com e sem a cauda FLAG. Com isso, são necessárias análises que tragam mais informações sobre os níveis de produção dessas proteínas e de que forma isso está relacionado com o papel de cada proteína H-NS na bactéria, além da confirmação da autoassociação da proteína H-NS<sub>0161</sub>-FLAG com a proteína original.

## BIBLIOGRAFIA

1. Navarre, W. W., Porwollik, S., Wang, Y., McClelland, M., Rosen, H., Libby, S. J. and Fang, F. C. **Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*.** Science, 313, 236–238. 2006.
2. Lucchini, S., Rowley, G., Goldberg, M. D., Hurd, D., Harrison, M. and Hinton, J. C. **H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria.** PLoS Pathog., 2, e81. 2006.
3. Ono, S., Goldberg, M. D., Olsson, T., Esposito, D., Hinton, J. C. and Ladbury, J. E. **H-NS is a part of a thermally controlled mechanism for bacterial gene regulation.** Biochem. J., 391, 203–213. 2005.
4. Soutourina, O. A., Krin, E., Laurent-Winter, C., Hommais, F., Danchin, A., & Bertin, P. N. **Regulation of bacterial motility in response to low pH in *Escherichia coli*: the role of H-NS protein.** Microbiology, 148(5), 1543-1551. 2002.
5. Shahul Hameed, U. F., Liao, C., Radhakrishnan, A. K., Huser, F., Aljedani, S. S., Zhao, X., Arold, S. T. **H-NS uses an autoinhibitory conformational switch for environment-controlled gene silencing.** Nucleic Acids Research. 2018.
6. Mahenthiralingam, E., Urban, T. A., and Goldberg, J. B. **The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex.** Nat. Rev. Microbiol. 3, 144–156. doi: 10.1038/nrmicro1085. 2005.
7. Higgins S., Sanchez-Contreras M., Gualdi S., Pinto-Carbó M., Carlier A., Eberl L. **The essential genome of *Burkholderia cenocepacia* H111.** J Bacteriol 199:e00260-17. 2017.