



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Dynamic organization of bacterial chromatin by DNA bridging proteins

Qin, L.

Citation

Qin, L. (2020, September 22). *Dynamic organization of bacterial chromatin by DNA bridging proteins*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/136909>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/136909>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/136909> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Qin, L.

Title: Dynamic organization of bacterial chromatin by DNA bridging proteins

Issue Date: 2020-09-22

Hoofdstuk 7

Samenvatting en vooruitzichten

Bacteriën komen veelvuldig externe uitdagingen tegen in de vorm van veranderingen in omgevingsfactoren of aanvallen van bacteriofagen. Om hiermee om te kunnen gaan, moeten bacteriën zich snel aanpassen aan deze uitdagingen. Belangrijke strategieën om te overleven zijn het aanpassen aan stressfactoren uit de omgeving met name door veranderingen in genexpressie en het verkrijgen van nieuwe genetische eigenschappen door horizontale overdracht van vreemde genen die uitgeschakeld blijven zolang ze geen voordeel bieden, maar essentieel zijn voor competitieve fitheid in specifieke omgevingscondities. Deze adaptatiemechanismen worden aangestuurd vanuit het bacteriële genoom, dat dynamisch opgevouwen en functioneel georganiseerd is.

Het histon-achtige nucleoïde-structurende eiwit (H-NS) is een belangrijke regulator van structuur en functie van het bacteriële genoom. Het eiwit is geconserveerd in enterobacteriën. In het algemeen opereert H-NS als een repressor van transcriptie die de expressie van vele genen en operons onderdrukt. De onderdrukking van genexpressie door H-NS is een gevolg van binding van H-NS langs (delen van) genen en operonen. Karakteristiek voor de werking van H-NS is de vorming van nucleofilamenten langs DNA en door het eiwit gevormde DNA-DNA bruggen. Functionele analogen van H-NS zijn gevonden in andere bacteriesoorten: MvaT in de *Pseudomonas*-familie, Lsr2 in actinomyceten en Rok in de *Bacillus*-familie. Deze eiwitten zijn in staat om te compenseren voor de afwezigheid van H-NS in een *hns*⁻ stam als gevolg van vergelijkbare DNA-bindende eigenschappen. Deze eiwitten verschillen in sequentie, maar zijn functioneel homoloog. H-NS-achtige eiwitten zijn wijdverspreid. Bij voorkeur binden ze aan AT-rijk DNA dat is verkregen door horizontale gen-overdracht en schakelen dat uit. Voor wat betreft hun structuur beschikken ze over een vergelijkbare organisatie in functionele domeinen: een N-terminaal domein dat verantwoordelijk is voor dimerisatie en oligomerisatie, een C-terminaal domein dat aan DNA bindt en een 'linker' die de twee domeinen met elkaar verbindt. Als gevolg van deze specifieke domeinorganisatie, is elk van deze vier eiwitten in staat tot brugvorming tussen twee DNA-duplexen. Vermoedelijk is dit noodzakelijk voor de rol van het eiwit in

genregulatie. De structurele en functionele eigenschappen van deze vier architectonische eiwitten (H-NS, MvaT, Lsr2 en Rok) zijn samengevat in **Hoofdstuk 1**.

Regulerende eiwitten die reageren op stress in bacteriën, vooral H-NS-achtige eiwitten, hebben een functie in het uitschakelen van genen; zij treden op als sensoren die reageren op veranderingen in omgevingscondities. Het bacteriële genoom functioneert als een machine die informatie verwerkt in de vorm van signalen uit de omgeving en deze vertaalt in veranderingen in transcriptie van bepaalde genen die nodig zijn voor aanpassing en overleving. Belangrijk in dit proces is de dynamische organisatie van het bacteriële genoom die verandert in reactie op zulke signalen. De expressie van genen die gereguleerd worden door eiwitten uit de H-NS-achtige eiwitfamilie, wordt vaak bepaald door omgevingsfactoren zoals osmolariteit, pH en temperatuur. H-NS-achtige eiwitten kunnen DNA-duplexen bruggen, wat belangrijk is voor genregulatie en het reageren op veranderende omgevingsfactoren. Er is aangetoond dat divalente ionen kunnen zorgen voor de transitie tussen H-NS-DNA-filamenten gevormd langs DNA en gebrugde DNA-H-NS-DNA-complexen. Het schakelen tussen deze twee soorten complexen vormt vermoedelijk de mechanistische basis voor de functie van H-NS-eiwitten in de organisatie van het bacteriële nucleoïde en de regulatie van transcriptie. De resultaten van simulaties van de moleculaire dynamiek van H-NS in eerdere studies suggereren dat de overgang tussen de twee manieren van DNA binden een gevolg is van een conformatieverandering en wel een overgang van een half-open (ook wel gesloten conformatie genoemd) naar een open conformatie onder invloed van van $MgCl_2$. De precieze moleculaire basis van dit fenomeen is echter nog niet duidelijk. In **Hoofdstuk 2** hebben wij een structureel verkorte versie van H-NS, MvaT van *P. aeruginosa*, gebruikt om de relatie tussen structuur en functie in het kader van veranderingen in omgevingsfactoren te onderzoeken. We hebben methodes uit de structuurbiologie en biochemische assays gecombineerd om de veranderingen in structuur van MvaT te onderzoeken, die de overgang van filamentvorming langs DNA naar DNA-bruggende activiteit onder verschillende zout condities aansturen. Deze structuurveranderingen lijken geconserveerd te zijn in de familie van H-NS-achtige eiwitten: een analyse van de primaire structuur van leden van de H-NS-achtige eiwitfamilie

laten zien dat geladen residuen in specifieke gebieden zitten, ondanks de lage overeenkomst in sequentie. Dit suggereert dat de gevoeligheid voor zout wordt veroorzaakt door elektrostatische interacties tussen de N-terminale en DNA-bindende domeinen.

Bacteriofagen komen voor op elke plek waar bacteriën leven. Daarmee vormen ze een constante bedreiging voor bacteriën. Bacteriën en hun bijbehorende bacteriofagen co-evolueren in een constante strijd, waarbij ze van beide kanten verdedigende en aanvallende mechanismes ontwikkelen of aanpassen. De interactie en co-evolutie tussen een bacteriofaag en zijn bacteriële gastheer spelen een belangrijke rol in de ecologische en evolutionaire processen van microbiologische gemeenschappen. Voor succesvolle infectie van een bacterie door een bacteriofaag moet deze zich kunnen verdedigen tegen de afweermechanismen van de bacterie. Bacteriële repressoren van vreemd DNA, zoals H-NS-achtige eiwitten, spelen een belangrijke rol in de verdediging tegen fagen en in de evolutie van bacteriële genomen door het onderdrukken van de expressie van inkomende genen en genen opgenomen door horizontale genoverdracht. Om de effecten van deze H-NS-achtige eiwitten tegen te gaan codeert het genoom van bacteriofagen voor eiwitten die de uitschakeling van genen door H-NS-achtige eiwitten te niet doen. De *Pseudomonas* faag LUZ24 codeert voor het eiwit Mip dat bindt aan het H-NS-achtige eiwit MvaT van *Pseudomonas aeruginosa*. Voorheen werd aangenomen dat het binden van Mip leidde tot het tegen gaan van de onderdrukking van genen op het LUZ24 faag-DNA door MvaT te remmen. Het mechanisme waarmee Mip de functie van MvaT moduleert was echter nog onduidelijk. In **Hoofdstuk 3** beschrijven we studies aan de DNA-bindende eigenschappen van MvaT en de wijze waarop deze worden beïnvloed door Mip. Ook verduidelijken we hoe Mip en MvaT aan elkaar binden en hoe dat zich vertaalt in veranderingen in het type complexen gevormd tussen MvaT en DNA. Dit onderzoek maakt duidelijk dat Mip een negatieve invloed heeft op de vorming en stabiliteit van het gebrugde MvaT-DNA complex. Dit effect wordt veroorzaakt door de interactie van Mip met zowel de dimerisatie, als het DNA-bindende domein van MvaT. Op basis van deze waarnemingen postuleren we dat het binden van Mip de half-open, niet-bruggende

conformatie van MvaT induceert, wat tot het opheffing leidt van MvaT-gemedieerde onderdrukking van genexpressie.

Rok is een DNA-bindend eiwit dat in hoge concentratie aanwezig is in *Bacillus subtilis* en functionele gelijkenissen vertoont met de H-NS-achtige eiwitten die in veel proteobacteriën voorkomen. Rok bindt langs het hele genoom, met een voorkeur voor A/T-rijk DNA. Dit DNA bevat vaak genen van andersoortige oorsprong, die worden uitgeschakeld door het binden van Rok. Rok lijkt ook betrokken te zijn bij de globale organisatie van het *B. subtilis* genoom. Hoe Rok aan DNA bindt, en op welke manier dit leidt tot het onderdrukken van transcriptie is echter nog onduidelijk. Het is ook nog onbekend of Rok-gemedieerde genonderdrukking geïnduceerd of verminderd kan worden door veranderingen in fysisch-chemische leefcondities, zoals aangetoond voor H-NS-achtige eiwitten. In **Hoofdstuk 4** onderzochten we de DNA-bindingseigenschappen van Rok en bepaalden het effect van fysisch-chemische condities op die eigenschappen. We laten zien dat Rok een DNA-bruggend eiwit is, vergelijkbaar met de H-NS-achtige eiwitten van *E. coli* (H-NS), *Pseudomonas sp.* (MvaT) en Mycobacteria (Lsr2). Opvallend is dat, ondanks deze gelijkenis, het vermogen van Rok om DNA te bruggen niet afhangt van veranderingen in fysisch-chemische condities. Niet kunnen dienen als een directe sensor van veranderingen in zulke condities onderscheidt Rok van andere H-NS-achtige eiwitten. Dit impliceert het bestaan van andere (eiwit-gemedieerde) mechanismen die gen-uitschakeling door Rok kunnen opheffen, als reactie op veranderingen in fysisch-chemische leefcondities..

In **Hoofdstuk 5** en **Hoofdstuk 6** beschreven we twee methoden die zeer geschikt zijn om de interactie tussen H-NS-achtige eiwitten te analyseren: een DNA-bruggingstest en akoestische krachtspectroscopie (AFS). Deze technieken kunnen helpen bij het verduidelijken van het mechanisme waarmee eiwitten of andere moleculen de DNA-bruggende eigenschappen van H-NS-achtige eiwitten moduleren. De DNA-bruggingstest kan bijvoorbeeld gebruikt worden om dit soort eiwitten en andere moleculen te identificeren.

Vooruitzichten

Het ontrafelen van de (dynamische) organisatie van chromosomen in bacteriën is een lange reis. De afgelopen paar decennia zijn er echter technieken ontwikkeld die op de schaal van een volledig genoom ons begrip over bacteriële genoomvouwing verbeteren. Bacteriële DNA-bruggende eiwitten spelen een belangrijke rol in genoomorganisatie en genregulatie doordat zij binden aan bepaalde regionen verspreid over het gehele genoom. De vorming van DNA-DNA-bruggen en de modulatie hiervan, lijken geconserveerd over verschillende soorten. Dit biedt ons nieuwe mogelijkheden om te begrijpen hoe genomen dynamisch georganiseerd worden door vergelijkende functionele en evolutionaire analyses op functioneel geconserveerde DNA-bruggende eiwitten van verschillende soorten. Het belang van het begrijpen van genoomorganisatie en een belangrijke uitdaging ligt in het beter bepalen van de effecten van omgevingsfactoren op lokale vouwing van DNA en het begrijpen hoe deze veranderingen andere nucleïnezuurtransacties beïnvloeden in levende cellen. Vooralsnog zijn door gebruik van biofysische en biochemische technieken structuren bepaald van H-NS en H-NS-DNA-complexen. Dit verduidelijkt *in vitro* hoe deze interacties worden gemoduleerd door lokale veranderingen in fysisch-chemische condities. Het blijft echter nog onduidelijk hoe dit transcriptie *in vivo* beïnvloedt. Hoewel we inmiddels begrijpen hoe een enkel nucleïnezuur-associërend eiwit DNA kan organiseren, is het nog niet duidelijk hoe meerdere van dit soort eiwitten tezamen functioneren in de cel. Naast omgevingsfactoren en eiwitpartners, kunnen ook post-translationele modificaties een rol spelen in het moduleren van DNA-bindende eigenschappen en functies van bacteriële nucleïnezuur-associërende eiwitten. Dit aspect van ons begrip over de dynamische organisatie van het bacteriële genoom behoeft echter meer uitgebreid onderzoek.

Het is aangetoond dat bacteriële eiwitten en bacteriofagen kunnen interfereren met de functie van H-NS-eiwitten. Deze interferentie kan gebeuren tijdens elke stap in het proces van vorming van een gebrugd H-NS-DNA complex, oftewel tijdens het initiële binden van DNA, de multimerisatie langs DNA, of het proces van DNA-brugging. Een beter begrip van hoe virale eiwitten H-NS kunnen tegenwerken is nodig om eiwitten of andere moleculen te kunnen ontwerpen die een

faaginfectie kunnen tegengaan. Potentiële toepassingen van zulke moleculen zijn te vinden in de biotechnologische sector, waar faaginfecties een bedreiging vormen voor grootschalige culturen, of in faagtherapie, waar zij voor een verbetering kunnen zorgen in het vermogen van fagen om hun bacteriële gastheer te doden. Door hun brede rol in genregulatie in bacteriën, vormen H-NS-achtige eiwitten potentiële targets voor medicijnen tegen bacteriële infecties. Om zulke ontwikkelingen te realiseren is het van belang om goed te begrijpen hoe de activiteit van H-NS-achtige eiwitten wordt gemoduleerd op een moleculair en mechanistisch niveau.