



Facultad de Biología

Departamento de Microbiología

**La Familia de proteínas Hha-YmoA: estudios estructurales y papel regulador en
*Yersinia enterocolitica***

Programa de Doctorado: Microbiología Ambiental y Biotecnología (2001-2003).

Conformidad del director de tesis

Memoria presentada por J.
Ignacio Pons Ximénez para optar
al título de Doctor por la
Universidad de Barcelona

Dr. Antonio Juárez Giménez

J. Ignacio Pons Ximénez

Barcelona, 2006

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- REGULACIÓN AMBIENTAL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEÍNAS ASOCIADAS AL NUCLEOIDE

Una de las características más importantes que presenta la célula bacteriana es su capacidad de adaptación a las condiciones cambiantes del medio en que se desarrolla, modulando su comportamiento para garantizar su supervivencia en cada una de estas condiciones. Esta plasticidad en su comportamiento requiere un efectivo sistema de detección de señales externas, así como la rápida elaboración de una respuesta, generalmente relacionada con un cambio en el patrón de expresión proteica.

Estas señales externas detectadas por las bacterias pueden tener una naturaleza química, relacionada con aspectos nutricionales o toxicidad, o física, como la temperatura, la presión osmótica o la presión hidrostática, y su detección puede ser de forma directa o indirecta. En ocasiones, el estímulo puede penetrar en el interior de la célula (por ejemplo, el sustrato de una vía metabólica) o, como en el caso del pH y la osmolaridad, ser detectado mediante receptores transmembrana específicos del estímulo que actúan como sensores de la señal a nivel de superficie celular (Ninfa, 1996).

1.1.1.- REGULACIÓN AMBIENTAL DE LA EXPRESIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA

La capacidad de adaptación de las bacterias a ambientes variables queda especialmente patente en los microorganismos patógenos que alternan fases de vida libre y fases infectivas asociadas a un hospedador dentro de su ciclo vital. Las bacterias patógenas han desarrollado un complejo sistema de detección de señales que les permite inducir la expresión de determinados genes cuyos productos son necesarios para llevar a cabo el proceso de colonización e infección del hospedador. Dentro de este conjunto de genes inducidos en presencia del hospedador se encuentran los genes que codifican la síntesis de **factores de virulencia**, tales como toxinas, factores de adhesión, invasinas o cápsulas. Estos factores de virulencia son, generalmente, elementos no esenciales para la fisiología celular durante las fases no infecciosas, siendo únicamente necesarios durante el proceso de infección. Por este motivo, su expresión se encuentra regulada de

forma muy precisa y rara vez se expresan constitutivamente debido al elevado gasto energético que ello supondría (Mahan *et al.*, 1996).

A lo largo de las diversas etapas de un proceso infeccioso son necesarios distintos factores de virulencia, por lo que la bacteria seguirá detectando estímulos del medio y regulando la expresión de los correspondientes genes a lo largo de todo el proceso. Esto implica que no sólo sea importante la regulación de la expresión génica por factores ambientales derivados del paso de vida libre o no patogénica en un organismo reservorio, sino también la regulación derivada de los factores externos que la bacteria se va encontrando a lo largo del proceso infeccioso. De esta forma, la bacteria está continuamente obteniendo información de su entorno y ajusta la expresión de sus genes de virulencia en función de la información recibida. Entre los parámetros ambientales que afectan a la expresión de los factores de virulencia cabe resaltar la temperatura, la osmolaridad, la disponibilidad de hierro, el pH y los niveles de oxígeno.

1.1.1.1.- Hierro

El hierro es un elemento fundamental para el crecimiento de prácticamente todas las formas de vida. Aún siendo un elemento muy abundante en la corteza terrestre, su captación por parte de los seres vivos resulta muchas veces un proceso difícil, ya que en condiciones de aerobiosis y a pH neutro se encuentra en forma de ión férrico (Fe^{3+}), que resulta insoluble. Por otro lado, en condiciones de anaerobiosis, la forma ferrosa Fe^{2+} , soluble y por tanto más fácil de captar, provoca la formación de radicales hidroxilo (OH^{\cdot}) que resultan tóxicos. Este problema, sin embargo, no existe si el ión ferroso se encuentra unido a proteínas transportadoras, como ocurre en el interior de hospedadores animales, en los que se encuentra “secuestrado” por proteínas como la transferrina, lactoferrina o la misma hemoglobina. Las bacterias presentan diversos mecanismos para obtener hierro, como son la captación de grupos hemo (Genco y Dixon, 2001) o la secreción de sideróforos y/o hemóforos que forman complejos con la fuente de hierro y se unen a la superficie bacteriana mediante receptores específicos. La capacidad de las bacterias patógenas de captar el hierro en el organismo hospedador contribuye de forma importante a su capacidad de virulencia, ya que facilita su crecimiento en el interior del organismo (Wooldridge y Williams, 1993).

En algunas bacterias patógenas, los niveles de hierro provocan la expresión de factores de virulencia como cápsulas (Telang *et al.*, 2001), adhesinas (Moreira *et al.*, 2003), y toxinas como la toxina Shiga-like que se induce como respuesta a una baja disponibilidad de hierro (Weinstein *et al.*, 1988). En la tabla 1.1.1. se muestran algunos factores de virulencia regulados por hierro.

Un mecanismo mediante el cual el hierro regula la expresión génica en bacterias Gram-negativas y algunas Gram-positivas viene mediado por la proteína Fur (Ferric uptake regulator), que forma un complejo con Fe^{2+} y reprime la transcripción mediante unión a secuencias promotoras (caja Fur) de genes implicados en la captación del hierro, toxinas como la hemolisina, y genes implicados en la síntesis de pili (Agranoff y Krishna, 2004). Otras proteínas que también intervienen en la regulación de la expresión de virulencia por hierro son DtxR (Diphtheria toxin regulator) aislada en *Corynebacterium diphtheriae*, IdeR en micobacterias y SirR en estafilococos.

Tabla 1.1.1. Ejemplos de algunos factores de virulencia regulados por hierro (Litwin y Calderwood, 1993).

Organismo	Factores de virulencia
<i>Escherichia coli</i>	Aerobactina, toxina tipo Shiga, α -hemolisina
<i>Shigella dysenteriae</i> tipo I	Toxina Shiga
<i>Vibrio cholerae</i>	Proteínas de membrana externa (IrgA)
<i>Vibrio anguillarum</i>	Anguibactina
<i>Yersinia spp.</i>	Proteínas de membrana externa
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Proteína de unión a transferrina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Exotoxina A, elastasa, proteasa alcalina
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Toxina diftérica

1.1.1.2.- pH

Antes de alcanzar el intestino y colonizarlo, las bacterias patógenas han de atravesar el estómago, donde las condiciones de pH llegan a ser extremadamente ácidas. Es por este motivo que estas bacterias, en respuesta a cambios en el pH del medio, han

desarrollado la capacidad de ajustar la actividad y síntesis de proteínas asociadas no sólo a procesos que le permitan su supervivencia en estas condiciones extremas, como el sistema *gad* de resistencia al ácido en *E. coli* (McFall y Newman, 1996; Castanie-Cornet *et al.*, 1999), sino también a procesos relacionados con su capacidad de virulencia. Para estas bacterias, la acidificación del medio es una señal que les indica la presencia de un organismo hospedador, por lo que responden con la expresión de un conjunto de genes entre los que se encuentran genes relacionados con la virulencia.

Un caso extremo lo podemos encontrar en *Helicobacter pylori*, capaz de colonizar la mucosa gástrica y en la que se ha comprobado que el sistema Fur es un componente esencial para la adaptación a pH ácido (Bijlsma *et al.*, 2002).

En *Yersinia pestis* el antígeno pH 6, codificado en el gen *psaA* y que se encuentra implicado en la patogénesis de la peste bubónica, sólo se expresa si el pH del medio es inferior a 6,7 y la temperatura es superior a 37° C (Lindler *et al.*, 1990).

1.1.1.3.- Oxígeno

La reducida tensión de oxígeno en el hospedador, así como los elevados niveles de CO₂, son importantes señales para las bacterias patógenas y provocan alteraciones en la expresión génica esenciales para su capacidad de patogénesis (Ernst *et al.*, 1990; Shimamura *et al.*, 1985).

En diversos patógenos bacterianos, la inducción *in vitro* de genes de invasión en condiciones de baja concentración de oxígeno refleja la situación *in vivo* en la que estos genes se expresan, es decir, el ambiente propio del tracto intestinal. Este efecto queda patente en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, en la que las bajas concentraciones de oxígeno inducen la capacidad de la bacteria de invadir células de mamífero (Mahan *et al.*, 1996). Uno de los genes implicados en la invasividad bajo condiciones de reducida presión parcial de oxígeno es el gen *orgA* (oxigen regulated gene); los mutantes en este gen presentan atenuada su capacidad de virulencia en el proceso de internalización en las células del epitelio intestinal (Mahan *et al.*, 1996).

1.1.1.4.- Temperatura

La temperatura es otro de los factores ambientales que presenta un importante efecto sobre los procesos celulares, por lo que las bacterias presentan diversos termosensores moleculares que les permiten ajustar su patrón de expresión proteica ante cambios en este parámetro. Existen tres factores que intervienen en los diferentes mecanismos de termorregulación de la expresión génica: la estructura del ARN mensajero, el plegamiento proteico y la topología del ADN (Hurme y Rhen, 1998), que viene determinada por el superenrollamiento del ADN y su curvatura.

En relación a la **estructura del ARN mensajero**, se han descrito diferentes efectos sobre la traducción dependiente de temperatura. Uno de ellos es el cambio en la conformación de la secuencia Shine-Dalgarno (Hoe y Goguen, 1993). Un posible mecanismo mediante el cual la temperatura regula la maquinaria traduccional incluye cambios en la estructura del ARN mensajero o las proteínas ribosómicas, o, simplemente, un cambio en la cinética de traducción provocado por la temperatura (Hurme y Rhen, 1998). También es importante la formación de “R-loops” en el proceso de elongación de la transcripción. La formación de “R-loops” se produce por hibridación de la molécula de ARN que está siendo sintetizada con el dúplex de ADN, formándose un bucle constituido por un dúplex ADN-ARN y una cadena sencilla de ADN de idéntica secuencia al ARN hibridado. La formación de esta estructura, que viene determinada por la topología del ADN y su secuencia nucleotídica, bloquearía la elongación de la cadena de ARN mensajero (Huertas y Aguilera, 2003; Baaklini *et al.*, 2004; Drolet, 2006).

El **plegamiento proteico** también juega un importante papel en la termosensibilidad: variaciones en la temperatura pueden provocar cambios en el plegamiento de determinadas proteínas reguladoras, alterando su capacidad de unión al ADN. Se ha descrito que los dominios denominados “coiled-coil” (bucles superenrollados) son estructuras versátiles presentes en gran número de proteínas y responsables de mantener un equilibrio entre los monómeros libres y los oligómeros agrupados. Este equilibrio depende tanto de la temperatura como de la concentración de la proteína y puede ser utilizado como sensor de la temperatura incluso cuando la proteína no es un regulador de la expresión génica (Hurme y Rhen, 1998). Se ha comprobado, por ejemplo, que la capacidad de oligomerización de la proteína reguladora H-NS está influida por la temperatura (Stella *et al.*, 2006).

El **superenrollamiento del ADN**, negativo en todos los organismos vivos excepto en bacterias termófilas extremas, es un proceso regulado por la influencia combinada de varios factores, como las proteínas de unión al ADN, la transcripción, la replicación, y el balance en la actividad de dos enzimas: la topoisomerasa I (y IV), que disminuye el superenrollamiento negativo y la ADN girasa, que lo aumenta. Mientras que la reacción mediada por la topoisomerasa I, que provoca una relajación del ADN, es independiente de ATP, la actividad de la ADN girasa requiere energía. La actividad de la ADN girasa no depende de la concentración de ATP libre sino de la relación $[ATP] / [ADP]$ intracelular, que es un parámetro indicativo de la carga energética de la célula. Por este motivo, el grado de superenrollamiento del ADN es sensible al balance $[ATP] / [ADP]$ celular. La topoisomerasa I (y IV) corta una única hebra de la cadena de ADN, relajando la estructura superenrollada y permitiendo la incorporación de la maquinaria transcripcional y replicativa. En cambio, la ADN girasa corta las dos hebras de ADN y devuelve el estado de superenrollamiento habitual a la molécula de ADN (Muñoz *et al.*, 1995).

Las modificaciones en la actividad de algunos promotores bacterianos en respuesta a cambios en la temperatura tiene una clara correlación con cambios en la topología del ADN, y estos cambios en su topología pueden permitir de forma más o menos eficaz la unión de proteínas reguladoras (Falconi *et al.*, 1998). Un ejemplo de este efecto se observa en la termorregulación dependiente de YmoA de la expresión de factores de virulencia en *Yersinia enterocolitica* (Rohde *et al.*, 1994).

También, en relación a la topología del ADN, hay que tener en cuenta el grado de **curvatura del ADN**, factor que también está influido por la temperatura (Rohde *et al.*, 1999).

1.1.1.5.- Osmolaridad

La osmolaridad es otro de los factores ambientales que intervienen en la regulación de la expresión de factores de virulencia en diversos microorganismos patógenos. En la regulación de la expresión génica ante cambios en la osmolaridad está implicado el grado de superenrollamiento del ADN. Un choque osmótico hace aumentar hasta 4 veces la relación $[ATP] / [ADP]$ intracelular, aumentando al mismo tiempo el grado de superenrollamiento global del cromosoma bacteriano (Higgins *et al.*, 1988).

Podemos encontrar ejemplos de la osmorregulación de la expresión de factores de virulencia en distintos géneros bacterianos: en *E. coli*, la expresión del operón *sfa* que codifica la adhesina fimbrial S (Morschhauser *et al.*, 1993), la producción de fimbrias I de adherencia agregativa en *E. coli* enteroagregativas (Nataro *et al.*, 1994) y la expresión de la α -hemolisina (Mouriño *et al.*, 1994). En *Salmonella*, el sistema de secreción de tipo III (TTSSs) presente en la isla de patogenicidad 1 (SP-1) se induce en condiciones de elevada osmolaridad (Bajaj *et al.*, 1996), mientras que el sistema de secreción III presente en la isla de patogenicidad 2 (SP-2) se induce en condiciones baja osmolaridad (Lee *et al.*, 2000; Garmendia *et al.*, 2003). En mutantes *ymoA* de *Y. enterocolitica*, la regulación de los genes que codifican las proteínas Yop es dependiente de la osmolaridad (Cornelis *et al.*, 1991).

1.1.2.- PROTEÍNAS ASOCIADAS AL NUCLEOIDE

Las proteínas asociadas al nucleoide, inicialmente denominadas proteínas “tipo histona”, son uno de los factores que regulan el estado de superenrollamiento del ADN. El cromosoma bacteriano presenta una longitud muy superior al tamaño celular por lo que es necesario su empaquetamiento y condensación en una estructura a la que se denomina nucleoide bacteriano. Además, el nucleoide bacteriano se estructura de una forma compleja en dominios independientes, por lo que cambios topológicos en uno de ellos, no afectan al resto de los dominios que conforman el cromosoma (Pettijohn, 1996). Esta gran condensación y superenrollamiento del ADN no puede interferir en los procesos fundamentales de replicación y transcripción, por lo que los cambios en la topología del ADN a nivel local que permiten estos procesos vienen determinados por las topoisomerasas. Además de los factores ya mencionados, también se atribuye un papel importante en la condensación del ADN a las fuerzas de agregación macromolecular ejercidas por el citoplasma (Zimmerman y Murphy, 1996; Odijk, 1998).

Las proteínas asociadas al nucleoide permiten un mayor empaquetamiento del ADN sin necesidad de aumentar el grado de superenrollamiento. Se considera que la condensación del ADN mediada por las proteínas asociadas al nucleoide es capaz de compensar la mitad del superenrollamiento teórico del cromosoma bacteriano, el denominado superenrollamiento restringido. Estas proteínas de unión al ADN se

caracterizan por su bajo peso molecular, por ser ricas en aminoácidos cargados y por encontrarse en elevado número en el interior de la célula (Rimsky, 2004). Aunque no se conoce el papel específico de cada una de estas proteínas en la condensación del nucleoide pueden afectar de forma drástica a la estructura local o global del cromosoma, e intervienen en otros procesos asociados con el ADN, como son la regulación de la expresión, la replicación, la recombinación o la reparación.

E. coli presenta al menos 240 proteínas con capacidad de unirse al ADN (Robinson *et al.*, 1998), de las cuales sólo una pequeña porción interviene en el proceso de estructuración y condensación del nucleoide. En la tabla 1.1.2. se enumeran algunas de las proteínas asociadas al nucleoide mejor caracterizadas. En general, aunque depende de la especie tratada, puede considerarse que ninguna de estas proteínas es esencial para la viabilidad celular, aunque la combinación de ciertas mutaciones pueden ser muy perjudicial e incluso letal para la bacteria (McLeod y Johnson, 2001).

Tabla 1.1.2. Ejemplo de algunas proteínas asociadas al nucleoide en *E. coli* con función estructural. Basado en Azam e Ishihama (1999) y Azam y colaboradores (2000).

Nombre	Función que la define	Unión al ADN	Distribución en el nucleoide
H-NS	<u>H</u> istone-like <u>N</u> ucleoid Structure protein	inespecífica	uniforme
FIS	<u>F</u> actor for <u>i</u> nversion <u>s</u> timulation	específica	irregular
HU	<u>H</u> istone-like protein from <i>E. coli</i> <u>U</u> 93	inespecífica	uniforme
IHF	<u>I</u> ntegration <u>H</u> ost <u>F</u> actor	específica	uniforme
Lrp	<u>L</u> eucine-responsive <u>r</u> egulatory <u>p</u> rotein	específica	irregular

La concentración en el citoplasma de algunas de estas proteínas varía dependiendo de las condiciones y fase de crecimiento (Azam *et al.*, 1999). El hecho de que algunas de estas proteínas asociadas al nucleoide presenten una función como reguladoras de la expresión génica, ya sea actuando directa o indirectamente como activadores o represores, implica una expresión diferencial de muchos genes en función de la fase de crecimiento (Ishihama, 1999). Una de las características de las proteínas asociadas al nucleoide es que regulan la expresión génica en respuesta a factores

ambientales, como son la osmolaridad y la temperatura, y por tanto participan en la regulación de la expresión de factores de virulencia (McLeod y Johnson, 2001).

La proteína **FIS** fue inicialmente identificada por su capacidad de promover las reacciones de inversión del ADN catalizadas por la familia de recombinasas Hin (Johnson y Simon, 1985; Kahmann *et al.*, 1985). Esta proteína se constituye en un homodímero cuyas subunidades están codificadas en el gen *fis* (Thompson *et al.*, 1987) y presenta una estructura típica hélice-giro-hélice involucrada en la unión al ADN (Dame, 2005). De carácter básico, se encuentra altamente conservada en bacterias entéricas y es una de las proteínas asociadas al nucleóide de *E. coli* más abundantes en la fase exponencial del crecimiento, llegando a alcanzar un máximo de 60.000 moléculas por célula (Azam *et al.*, 1999). Además, de la misma forma que las proteínas IHF, HU y en menor grado H-NS, es capaz de generar curvatura en el ADN. Inicialmente, la proteína FIS fue descrita como cofactor de la recombinación de lugar específico, pero actualmente se considera que juega un papel importante en la regulación de la expresión génica y en la modulación del superenrollamiento local del ADN (Dorman y Deighan, 2003). Esta proteína reconoce una secuencia de 15 pares de bases muy poco conservada, aunque también se une al ADN de forma inespecífica. Estudios bioinformáticos han revelado que el cromosoma de *E. coli* contiene aproximadamente unos 68.000 posibles lugares de unión de esta proteína, o lo que es lo mismo, un lugar de unión cada 230 nucleótidos (Hengen *et al.*, 1997). La proteína FIS regula la expresión de un elevado número de genes, tanto de forma directa a nivel del inicio de la transcripción como de forma indirecta (Xu y Johnson, 1995; González-Gil *et al.*, 1996; Schneider *et al.*, 1999), y entre los que podemos encontrar genes implicados en la virulencia de bacterias patógenas, como en el caso de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Wilson *et al.*, 2001), *E. coli* enteropatógenas (Goldberg *et al.*, 2001) y *Shigella flexneri* (Falconi *et al.*, 2001). La proteína FIS también regula genes responsables de la formación de biofilm en *E. coli* enteroagregativas (Sheikh *et al.*, 2001). Además, se ha propuesto un importante papel de la proteína FIS como reguladora de la expresión de los genes que codifican ARN ribosómico (Dennis *et al.*, 2004; Asato, 2005) y como moduladora del superenrollamiento local del ADN, probablemente por represión de los genes *gyrA* y *gyrB* que codifican la ADN girasa de *E. coli* (Schneider *et al.*, 1999) y por activación de

uno de los promotores del gen *topA*, que codifica la topoisomerasa I mediante un mecanismo que es sensible al estrés oxidativo (Weinstein-Fischer *et al.*, 2000).

La proteína **HU** fue identificada inicialmente como una proteína tipo histona presente en la cepa de *E. coli* U93 (Rouvière-Yaniv y Gros, 1975). Esta proteína se constituye en un homodímero o heterodímero formado por dos subunidades intercambiables, HU- α de 9,2 kDa y HU- β de 9,5 kDa, muy similares entre sí (aproximadamente un 70 % de similitud a nivel de secuencia aminoacídica) en *E. coli*, *S. enterica* serovar Typhimurium, *Erwinia chrysanthemi* y *S. flexneri*. Los genes que codifican las subunidades de la proteína HU, *hupA* (subunidad α) y *hupB* (subunidad β), están reguladas de forma diferente (Claret y Rouvière-Yaniv, 1996). Parece ser que la presencia de formas heterodimérica de proteína HU es una característica común de las bacterias entéricas, mientras que otros grupos bacterianos únicamente presentan un homodímero (Oberto y Rouvière-Yaniv, 1996). En *E. coli*, la proteína HU puede presentarse en forma de α -homodímero, β -homodímero o $\alpha\beta$ -heterodímero (Claret y Rouvière-Yaniv, 1997). Mientras que el α -homodímero predomina en la fase exponencial del crecimiento, la supervivencia del cultivo en fase estacionaria requiere de la presencia del heterodímero (Claret y Rouvière-Yaniv, 1997). De esta forma, la presencia en *E. coli* de los genes parálogos *hupA* y *hupB* permite que la composición de la proteína HU sea dinámica, lo que afecta tanto a su capacidad de influir en la estructura del nucleoide como en la modulación que realiza de la expresión génica. Su capacidad de unión al ADN viene determinada por la presencia de cargas positivas en su superficie (Swinger *et al.*, 2003) y, aunque presenta una pequeña especificidad de secuencia, se une preferencialmente al ADN de forma inespecífica y al ADN que presenta algún tipo de lesión en una de sus cadenas o alguna alteración estructural (Shindo *et al.*, 1992).

Históricamente se ha considerado a la proteína HU como homóloga procariota de las histonas eucariotas (Drlica y Rouvière-Yaniv, 1987) e incluso se le ha atribuido la capacidad de formar estructuras tipo nucleosoma con el ADN (Tanaka *et al.*, 1984), aunque, actualmente, no hay pruebas de la formación de estas estructuras (Dame y Goosen, 2002). La modulación de la topología del ADN por la proteína HU presenta distinto comportamiento en función de su concentración (van Noort *et al.*, 2004; Skoko *et al.*, 2004): mientras que a bajas concentraciones presenta un efecto de compactación del ADN debido a la generación de curvatura, a elevadas concentraciones el ADN se

muestra más extendido por la agregación de la proteína a lo largo de la doble cadena. En la figura 1.1.1. se muestran los dos modelos propuestos de formación de los filamentos de ADN-HU (van Noort *et al.*, 2004).

No existen muchos detalles sobre el papel de la proteína HU en la regulación de la expresión génica, aunque sí es conocida su implicación en la regulación del operón *gal* (Kar y Adhya, 2001) y el antagonismo que presenta con H-NS tanto a nivel de estructuración del nucleóide como a nivel de modulación de la expresión génica (Dame y Goosen, 2002; Morales *et al.*, 2002).

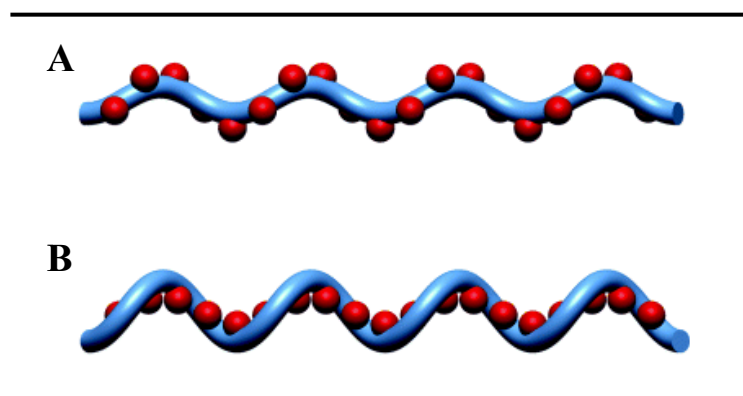


Figura 1.1.1. Modelos de formación de filamentos HU-ADN. (A), la proteína HU se agrega en la cara externa de la doble hélice del ADN limitando su curvatura; (B), la proteína HU se agrega en la cara interna de la doble hélice del ADN permitiendo su curvatura. Extraído de Dame (2005).

La proteína **IHF** fue inicialmente identificada por estar implicada en la integración del fago λ tanto *in vivo* como *in vitro* (Williams *et al.*, 1977). Es una proteína formada por dos subunidades, denominadas IHF α e IHF β , que están codificadas en los genes *himA* y *himD* respectivamente. Es una proteína básica y abundante en la fase estacionaria temprana (25.000-30.000 dímeros por célula) (Azam *et al.*, 1999). De igual forma que la proteína HU, la interacción de IHF con el ADN se establece gracias a las cargas positivas que recubren la superficie de la proteína y, aunque se ha establecido la existencia de una secuencia consenso de unión al ADN (Ali *et al.*, 2001), esta unión también puede ser inespecífica. Mientras que su capacidad de curvar el ADN parece estar determinada por su unión a lugares específicos, su capacidad de compactación del ADN está determinada por su unión inespecífica. El cromosoma de *E. coli* presenta aproximadamente 1.000 lugares de unión específica de

IHF (Ussery *et al.*, 2001) que se cree que están ocupados permanentemente, por lo que el resto de las moléculas se unen de forma inespecífica al ADN interviniendo en el proceso de compactación del cromosoma. La proteína IHF modula la expresión de gran cantidad de genes que intervienen en una amplia gama de funciones (Freundlich *et al.*, 1992; Goosen y van de Putte, 1995; McLeod y Johnson, 2001), entre los que hay ejemplos de genes relacionados con la virulencia bacteriana en *S. flexneri* (Porter y Dorman, 1997) y *S. enterica* serovar Typhimurium (Marshall *et al.*, 1999).

La proteína **Lrp** fue identificada inicialmente por modular la expresión de determinados operones en respuesta a la concentración del aminoácido leucina en el medio de cultivo (Austin *et al.*, 1989; Lin *et al.*, 1990; Platko *et al.*, 1990). La proteína Lrp de *E. coli* se constituye generalmente en homodímeros. Su concentración varía en función de la fase de crecimiento y de la composición del medio de cultivo. Se calcula que su concentración es de aproximadamente 3.000 dímeros por célula creciendo en un medio mínimo, valor que disminuye en gran medida si el crecimiento se realiza en medio rico. La proteína Lrp contribuye al empaquetamiento del cromosoma (D'Ari *et al.*, 1993). Estudios en microchips de ADN han revelado que afecta a la transcripción del 10 % de los genes de *E. coli* (Tani *et al.*, 2002), y que, aunque presenta especificidad en la secuencia de unión al ADN (C/TAGC/A/TAA/TATTT/ATG/T/ACTG/A), ésta también puede ser inespecífica (Tapias *et al.*, 2000). Estudios estructurales revelan que el extremo N-terminal de la proteína consiste en un dominio hélice-giro-hélice, dominio generalmente asociado a la interacción con el ADN. Existen dos formas mediante las cuales la proteína Lrp se une al ADN: por un lado, la proteína Lrp de *Bacillus subtilis* puede formar puentes entre dúplex de ADN (Tapias *et al.*, 2000) de forma similar a como lo hace la proteína H-NS (Beloin *et al.*, 2003a), generando bucles de ADN. Por otro lado, Lrp puede agruparse formando un octámero globular que envolvería la molécula de ADN. En *E. coli*, la proteína Lrp actúa coordinadamente con otros reguladores globales como IHF y H-NS (Levinthal *et al.*, 1994; Paul *et al.*, 2001; Pul *et al.*, 2005). La regulación de la expresión génica por Lrp incluye muchos genes implicados en el metabolismo de aminoácidos y un pequeño número de genes que intervienen en la síntesis de algunos tipos de pili (Calvo y Matthews, 1994; Newman y Lin, 1995).

Por lo que a la proteína **H-NS** se refiere, su importancia dentro de este trabajo hace que se le dedique un capítulo entero de esta introducción.

El papel de cada una de estas proteínas en la estructuración del nucleoide no está demasiado claro. Su efecto sobre la topología del ADN puede variar en función de las condiciones, así como la función en la estructuración del nucleoide de cada una de ellas puede ser reemplazada por la acción de las otras proteínas. En general se puede decir que las proteínas asociadas al nucleoide se agrupan en dos grupos: las que curvan el ADN, como FIS, IHF y HU, y las formadoras de puentes entre distintos dúplex de ADN, como H-NS y Lrp (Dame, 2005). La organización de estas proteínas dentro de los bucles de ADN es importante tanto para la compactación del cromosoma como para la modulación de la transcripción. En la figura 1.1.2. se muestra de forma esquemática el efecto de las proteínas asociadas al nucleoide mejor caracterizadas sobre la estructuración de un plásmido.

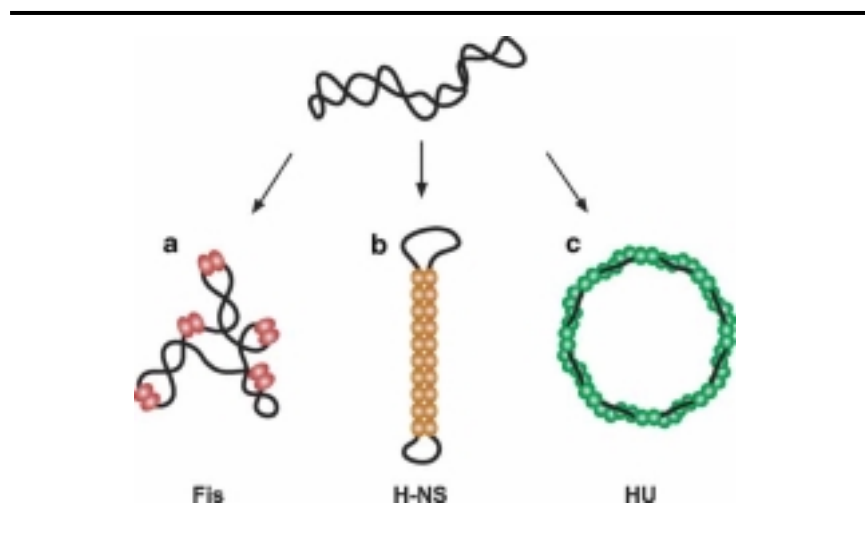


Figura 1.1.2. Efecto de las proteínas asociadas al nucleoide FIS, H-NS y HU en la estructuración de un plásmido: **a**, la unión de FIS promueve la formación de dominios en el ADN superenrollado; **b**, a elevadas concentraciones, H-NS forma puentes entre dos cadenas de ADN; **c**, a elevadas concentraciones, HU se agrega a lo largo del ADN formando un filamento de ADN-HU. Extraído de Thanbichler y colaboradores (2005).

1.2.- LA FAMILIA DE PROTEÍNAS H-NS

Los miembros de la familia de proteínas H-NS se encuentran ampliamente distribuidos en bacterias Gram-negativas (Bertin *et al.*, 1999; Bertin *et al.*, 2001; Tendeng *et al.*, 2003a; Tendeng y Bertin, 2003), sin haber sido descrito hasta el momento ningún miembro de esta familia en bacterias Gram-positivas. En la actualidad, se conocen más de 70 proteínas relacionadas a nivel de secuencia aminoacídica con H-NS en diferentes microorganismos. Podemos encontrar representantes de esta familia no sólo en γ -proteobacterias, sino también en α -proteobacterias, como es el caso de *Silicibacter pomeroyi*, y β -proteobacterias, como la proteína BpH3 de *Bordetella pertussis* (Goyard y Bertin, 1997). Además, algunas especies presentan más de un miembro de esta familia de proteínas, como es el caso de *Pseudomonas putida*, *Xanthomonas axonopodis*, *S. enterica* serovar Typhimurium o *E. coli* (Tendeng y Bertin, 2003). En *E. coli* están presentes H-NS, StpA (paróloga de H-NS) y Ler (Tendeng y Bertin, 2003). Esta última proteína, antagonista funcional de H-NS, viene codificada en una isla de patogenicidad de cepas enteropatógenas de *E. coli* y, aunque muestra homología con H-NS en el dominio de unión a ácidos nucleicos, ésta es inexistente en el dominio de oligomerización. A continuación, se desarrolla el apartado dedicado a la proteína H-NS de *E. coli* y su paróloga StpA.

1.2.1.- LA PROTEÍNA H-NS

1.2.1.1.- Características generales de la proteína H-NS

La proteína H-NS (Histone-like Nucleoid Structuring protein) fue caracterizada por primera vez como proteína asociada al nucleoide bacteriano por Varshavsky y colaboradores (1977), aunque no fue descrita como tal hasta siete años después (Lammi *et al.*, 1984; Spassky *et al.*, 1984). La proteína H-NS ha sido estudiada principalmente en *E. coli* y *S. enterica* serovar Typhimurium, donde interviene en la organización del nucleoide y en la expresión de genes involucrados en la adaptación a cambios ambientales (Schröder y Wagner, 2002). Es una proteína termoestable y de pequeño tamaño (aproximadamente 15,6 kDa y 137 aminoácidos) pero muy abundante (20.000 copias por célula) (Azam *et al.*, 1999). Los niveles de expresión de la proteína H-NS se

mantienen relativamente constantes a lo largo de las distintas fases de crecimiento (Schroder y Wagner, 2002), aunque hay autores que consideran que se produce un ligero incremento en sus niveles en el inicio de la fase estacionaria (Dersch *et al.*, 1993) y otros que consideran que lo que se produce es una disminución de sus niveles en esta fase del crecimiento (Azam *et al.*, 2000). Estos niveles también permanecen constantes en crecimientos a 26° C y 37° C, aunque modulan de forma distinta la expresión de los genes que están bajo su influencia (Göransson *et al.*, 1990).

A diferencia de la mayor parte de proteínas asociadas al nucleoide, la proteína H-NS presenta un punto isoeléctrico neutro, pero contiene agrupaciones de aminoácidos con carga que permiten su unión al ADN (Rimsky, 2004). La proteína H-NS puede presentar tres isoformas con puntos isoelectricos de 5,1, 6,5, y 7,5, siendo las dos últimas las predominantes (Spassky *et al.*, 1984), aunque sus niveles relativos varían en función de la fase de crecimiento. La presencia de estas tres isoformas es debida probablemente a modificaciones post-traduccionales (Atlung e Ingmer, 1997).

Las mutaciones en el gen *hns*, que codifica la proteína H-NS en *E.coli*, fueron inicialmente descritas debido a la alteración que producen en la expresión de diferentes genes que están regulados por temperatura y osmolaridad. Estas mutaciones son altamente pleiotrópicas y afectan, entre otros, a procesos de recombinación no homólogos, a las frecuencias de transposición de elementos de inserción y a la frecuencia de aparición de deleciones cromosómicas (Lejeune y Danchin, 1990; Falconi *et al.*, 1991).

El gen *hns* se encuentra localizado en el minuto 27,8 del cromosoma, presenta una única copia, se transcribe independientemente de los genes que lo flanquean y se autorregula negativamente a nivel de la transcripción (Hulton *et al.*, 1990; Dersch *et al.*, 1993; Ueguchi *et al.*, 1993; Falconi *et al.*, 1993). Las proteínas asociadas al nucleoide FIS y Csp pueden activar la expresión de *hns* (Falconi *et al.*, 1996). La expresión de H-NS se induce por choque frío a través de la proteína CspA (La Teana *et al.*, 1991) y por aumento de la presión hidrostática (Welch *et al.*, 1993). Además, la producción de H-NS está vinculada con el ciclo celular a través de una correlación positiva entre la transcripción del gen *hns* y la replicación del cromosoma (Free y Dorman, 1995), mecanismo de regulación por el cual los niveles de H-NS se mantendrían más o menos constantes a lo largo del crecimiento.

La proteína H-NS ejerce un papel muy importante no sólo en la regulación de la expresión génica sino también en la estabilidad del cromosoma (Atlung y Hansen,

2002), donde se dispone de manera más o menos uniforme (Azam *et al.*, 2000). Al contrario que los típicos reguladores transcripcionales que reconocen secuencias específicas, la unión de H-NS al ADN es independiente de secuencia, aunque preferentemente se une regiones curvadas que son regiones ricas en nucleótidos A y T (Bracco *et al.*, 1989, Yamada *et al.*, 1990; Owen-Hughes *et al.*, 1992). También puede provocar curvatura en ADN no curvado (Spurio *et al.*, 1997). Existe un gran número de regiones en el genoma de *E. coli* que presentan dichas zonas curvadas (Bracco *et al.*, 1989). En algunos casos, como el del gen *proU*, estas regiones se encuentran tras el promotor (Owen-Hughes *et al.*, 1992), denominándose DRE (Downstream Regulatory Element).

La proteína H-NS es considerada como un regulador global de la transcripción ya que modula la expresión de más de 200 genes en *E. coli* (más del 5% del total de genes), una fracción importante de los cuales están relacionados con adaptaciones a cambios ambientales (Hommais *et al.*, 2001). Numerosos fenotipos han sido asociados con una mutación en *hns*, como son la desrepresión del metabolismo de β -glucósidos (Defez y De Felice, 1981), el incremento de resistencia a pH ácido y elevada osmolaridad (Hommais *et al.*, 2001) y la pérdida de motilidad (Soutourina *et al.*, 1999). Además, está implicada en la regulación de la expresión de factores de virulencia de cepas uropatógenicas (Göransson *et al.*, 1990; Madrid *et al.*, 2002a) y enterotoxigénicas (Trachman y Maas, 1998) de *E. coli*, de *S. flexneri* (Maurelli y Sansonetti, 1988), de *S. enterica* serovar Typhimurium (Higgins *et al.*, 1988) y de *Vibrio cholerae* (Nye *et al.*, 2000; Tendeng *et al.*, 2000).

Es destacable que en otras especies bacterianas no ha podido caracterizarse el papel regulador de H-NS ya que no ha sido posible obtener cepas mutantes para el gen *hns* como, por ejemplo, en *Proteus mirabilis* (Coker *et al.*, 2000) o *Bordetella bronchiseptica* (Goyard y Bertin, 1997).

1.2.1.2.- Estructura de la proteína H-NS

La proteína H-NS presenta tres componentes estructurales; un dominio N-terminal que se extiende desde el residuo aminoacídico 1 hasta el 65 (considerando la metionina del extremo amino-terminal el residuo en posición 1), un dominio C-terminal que se extiende desde el residuo 90 hasta el 137, y una región de unión flexible entre ambos (residuos del 66 al 89) que permite la actuación de forma independiente de ambos dominios (Dorman *et al.*, 1999; Badaut *et al.*, 2002; Esposito *et al.*, 2002; Bloch *et al.*, 2003). En el dominio N-terminal recae la capacidad de dimerización / oligomerización, mientras que en el dominio C-terminal recae la capacidad de unión a ácidos nucleicos. La estructura tridimensional de ambos dominios por separado ha sido resuelta, pero no la estructura tridimensional de la proteína completa, cuya resolución es probablemente impedida por la flexibilidad de la región conectora entre ambos dominios. En la figura 1.2.1. se muestra un esquema de la proteína H-NS.

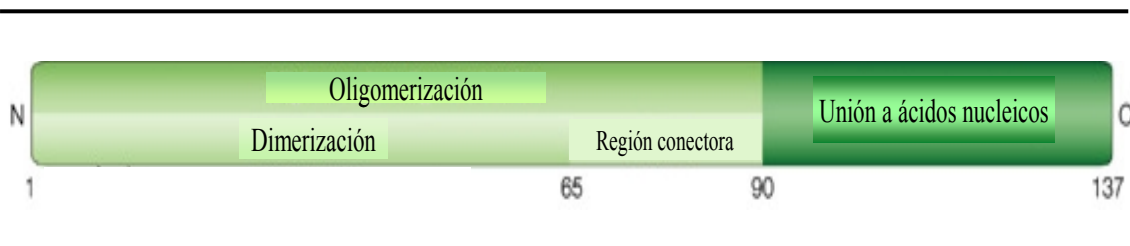


Figura 1.2.1. Representación esquemática de los dominios funcionales de la proteína H-NS. Extraído de Dorman (2004).

1.2.1.2.1.- Dominio N-Terminal

El dominio de oligomerización / dimerización de la proteína H-NS se sitúa en el extremo N-terminal de la proteína. Aunque se trata de una región bastante conservada entre los distintos miembros de la familia de proteínas H-NS, su grado de conservación es inferior al dominio C-terminal de unión a ácidos nucleicos (Tendeng y Bertin, 2003). Esta variabilidad está determinada por las distintas adaptaciones específicas de las bacterias que presentan esta proteína, como puede ser la adaptación a baja temperatura

(Tendeng *et al.*, 2003b), o la diferente especificidad o afinidad de interacción con otras proteínas o el ADN (Bloch *et al.*, 2003).

El dominio mínimo de dimerización está constituido por los primeros 64 aminoácidos (Badaut *et al.*, 2002; Esposito *et al.*, 2002), pero para la formación de unidades de oligomerización mayores se requiere al menos parte de la región conectora (Smyth *et al.*, 2000).

La estructura secundaria del dominio N-terminal de la proteína H-NS tanto de *E. coli* como de *S. enterica* serovar Typhimurium está constituida por tres hélices α : $\alpha 1$ (residuos del 3 al 9), $\alpha 2$ (residuos del 13 al 21) y $\alpha 3$ (residuos del 23 al 51). Los residuos de esta última hélice α conforman una estructura “coiled-coil” que ha sido identificada como elemento de oligomerización en muchos factores de transcripción (Lupas, 1996). En la figura 1.2.2. se muestra la estructura del dominio N-terminal de la proteína H-NS.

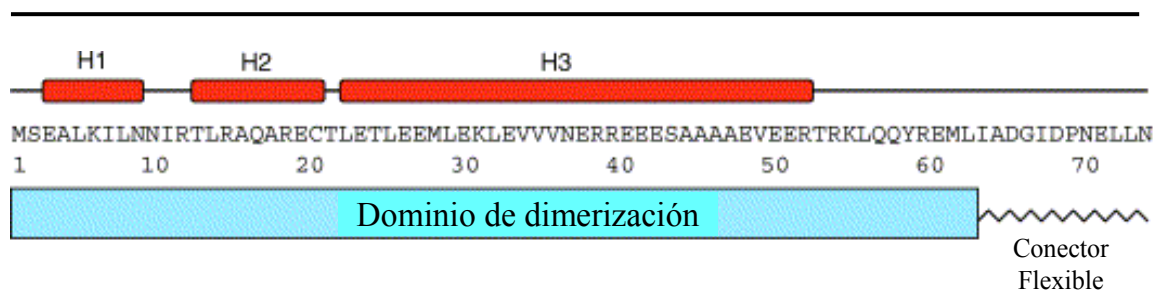


Figura 1.2.2. Secuencia aminoacídica del dominio de oligomerización de la proteína H-NS (dominio N-terminal), en la que se muestran la localización de las tres hélices α (H1, H2, H3). Extraído de Tendeng y Bertin (2003).

Existen dos modelos distintos que intentan explicar cómo se orientan las estructuras en hélice α dentro del dominio N-terminal en el proceso de dimerización: por un lado, el análisis por RMN del dominio N-terminal de H-NS de *S. enterica* serovar Typhimurium, sugiere una dimerización en paralelo (Esposito *et al.*, 2002), en la que la tercera hélice α (H3) de cada monómero se sitúa de forma paralela respecto a la otra y la oligomerización se llevaría a cabo siguiendo una estructura cabeza-cola (“head-to-tail”). Por otro lado, el análisis por RMN del dominio N-terminal de la proteína H-NS de *E. coli* y el análisis por rayos-X del mismo dominio de la proteína H-NS de *Vibrio cholerae* indican una dimerización antiparalela (Bloch *et al.*, 2003;

Cerdan *et al.*, 2003), en la que la segunda y tercera hélices α (H2 y H3) de cada monómero junto con la región conectora formarían una estructura en forma de U invertidas entre los monómeros que conforman el dímero. En esta estructura, la primera hélice α (H1) se sitúa en sentido perpendicular en relación a la estructura en forma de U. Ambos modelos permiten explicar la formación de puentes entre dos dúplex de ADN o diferentes regiones de un mismo dúplex por acción de la proteína H-NS. En la figura 1.2.3. se muestra de forma esquemática estos dos modelos que intentan explicar la disposición que adquiere la proteína H-NS en la formación de puentes entre dúplex de ADN.

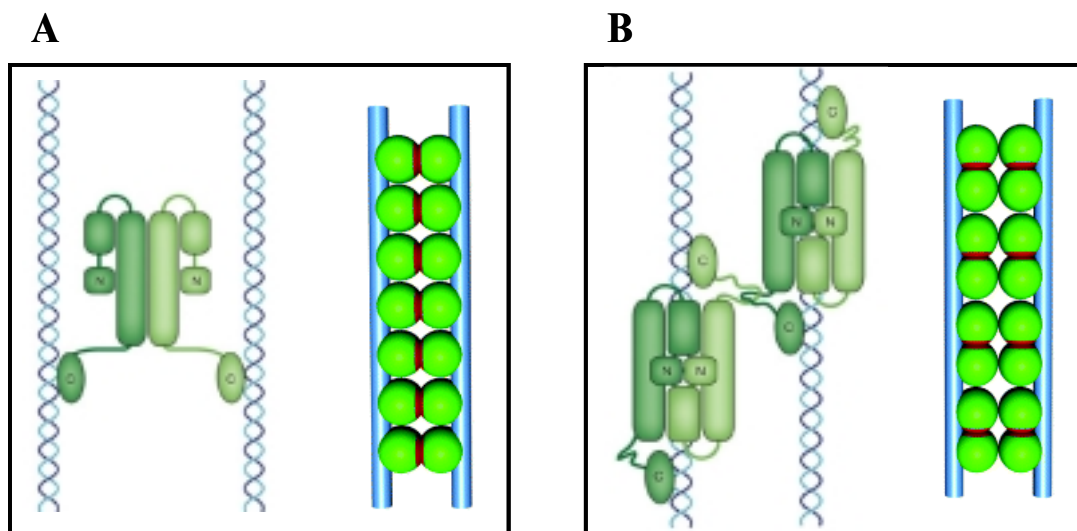


Figura 1.2.3. Modelos que intentan explicar la formación de puentes entre dúplex de ADN por la proteína H-NS. **A**, modelo basado en la dimerización de H-NS en paralelo (Esposito *et al.*, 2002); **B**, modelo basado en la dimerización de H-NS en forma de U invertidas (Bloch *et al.*, 2003; Cerdan *et al.*, 2003). N, extremo N-terminal; C, Extremo C-terminal; esferas verdes, monómeros de H-NS. Extraído de Dorman (2004) y Dame (2005).

Además, es posible la visualización de estos puentes entre dúplex de ADN, tal y como se muestra en la figura 1.2.4.

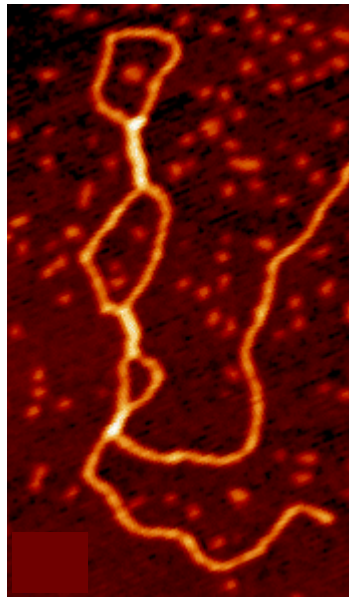


Figura 1.2.4. Formación de puentes entre dúplex de una molécula de ADN del fago λ por la proteína H-NS, que inducen la formación de un bucle o lazo (“loop”). Extraído de Dame

En solución, la proteína H-NS forma dímeros pero también oligómeros de elevado orden en los que el número de subunidades que los conforman es proporcional a la concentración (Smyth *et al.*, 2000). Como ya habíamos comentado, la formación de estos oligómeros de elevado orden requiere la integridad de la región central de la proteína (residuos del 46 al 90), que incluye la región conectora flexible (Bloch *et al.*, 2003). Para llevar a cabo su papel represor sobre la expresión génica es necesaria la formación de estos oligómeros (Rimsky *et al.*, 2001; Badaut *et al.*, 2002).

El dominio de oligomerización de la proteína H-NS le permite interactuar no sólo con otra copia de sí misma sino también con otras proteínas que muestren este mismo dominio (Dorman *et al.*, 1999). Esta formación de heterómeros permite una diferente modulación de la expresión génica. El heterómero mejor caracterizado es el que se establece entre H-NS y su proteína paróloga StpA (Williams *et al.*, 1996; apartado 1.2.2.), que estabiliza a la proteína StpA protegiéndola de la degradación por la proteasa Lon (Johansson *et al.*, 2001). La cepa 2457T de la bacteria patógena enteroinvasiva *S. flexneri* serotipo 2A expresa tres proteínas de la familia H-NS ya que, además de H-NS y StpA, esta bacteria expresa la proteína Sfh, que presenta un 62 % de homología a nivel de secuencia con StpA y un 59 % con H-NS y que está codificada en

un plásmido del grupo de incompatibilidad IncHI (Beloin *et al.*, 2003b). La proteína Sfh es capaz de interactuar tanto con H-NS como StpA (Deighan *et al.*, 2003).

La proteína H-NS también interactúa con el regulador post-transcripcional Hfq (proteína de unión al ARN) que, junto con DrsA, participa en la regulación del gen *rpoS* (Muffler *et al.*, 1996), con el producto génico 5.5 del fago T7, que suprime la actividad inhibitoria de H-NS en la transcripción tanto *in vivo* como *in vitro* (Liu y Richardson, 1993), y con la proteína motora flagelar FliG (Dorman, 2004).

Finalmente, H-NS interactúa con proteínas de la familia Hha / YmoA (Nieto *et al.*, 2000; 2002). Esta interacción será comentada en posteriores apartados.

1.2.1.2.2.- Dominio C-Terminal

El dominio de unión a ácidos nucleicos de la proteína H-NS se encuentra situado en el extremo C-terminal y engloba los residuos aminoacídicos del 90 al 137. En la figura 1.2.5. se muestra la secuencia aminoacídica de este dominio C-terminal formado por cuatro bucles flexibles (L1, L1', L2 y L3) entre los que se disponen dos láminas β (B1 y B2) y dos hélices α (H4 y 3_{10}).

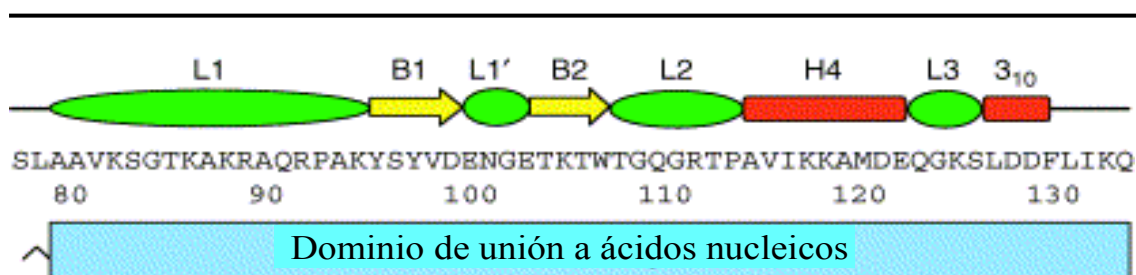


Figura 1.2.5. Secuencia aminoacídica del dominio de unión a ácidos nucleicos de la proteína H-NS. Extraído de Tendeng y Bertin (2003).

La estructura del dominio C-terminal de la proteína H-NS fue identificada por primera vez por Shindo y colaboradores (1995). Se considera que las regiones que están directamente implicadas en la unión con el ADN son las que forman el bucle 2 (L2) y que se encuentran entre unas estructuras secundarias rígidas (B2 y H4) (Ueguchi *et al.*, 1996). La comparación de secuencias de proteínas de la familia H-NS muestra un

motivo presente en esta región (aminoácidos del 108 al 116) que contiene residuos altamente conservados, TWTGXGRXP, donde X puede ser cualquier aminoácido (Dorman *et al.*, 1999). El triptófano (W) en posición 109 parece estar íntimamente relacionado con la interacción con el ADN (Tippner y Wagner, 1995), mientras que la prolina (P) en posición 116 está relacionada con la discriminación entre regiones curvadas y no curvadas del ADN (Spurio *et al.*, 1997). Aún así, en distintas especies pertenecientes al género *Pseudomonas*, tanto el triptófano 109 como la prolina 116 no se encuentran conservados y la proteína H-NS de estas especies es capaz de complementar algunos fenotipos en un mutante *hns* de *E. coli* (Tendeng y Bertin, 2003). El aminoácido tirosina en posición 97, así como la glicina en posición 127, son residuos que también se encuentran altamente conservados en las distintas proteínas relacionadas con H-NS (Tendeng y Bertin, 2003).

Mientras que la capacidad de dimerización / oligomerización de la proteína H-NS es independiente de la integridad del dominio C-terminal, las sustituciones del residuo arginina en las posiciones 12 y 15 del dominio N-terminal tienen un efecto deletéreo sobre la capacidad de unión de la proteína H-NS al ADN (Bloch *et al.*, 2003).

1.2.1.3.- Modulación de la expresión génica por la proteína H-NS

La regulación de la expresión génica por H-NS responde a cambios en factores ambientales como son la temperatura y la osmolaridad, y actúa como un represor transcripcional. Los raros ejemplos que hay descritos en los que H-NS afecta de forma positiva a la expresión génica es mediante mecanismos indirectos o post-transcripcionales (Schröder y Wagner, 2002).

Se han propuesto dos mecanismos mediante los cuales se produciría la modulación de la transcripción por parte de la proteína H-NS. Estos dos mecanismos se conocen como **silenciamiento transcripcional** (Göransson *et al.*, 1990) y **represión vía topología del ADN** (Hulton *et al.*, 1990; Tupper *et al.*, 1994) y no son excluyentes. Estos modelos se basan en la presencia de regiones de ADN con curvatura intrínseca que flanquean secuencias promotoras para un gen y en la unión de proteína H-NS, dando lugar a un proceso de nucleación y polimerización a lo largo de la secuencia de ADN (Williams y Rimsky, 1997). Esta polimerización es la responsable del control de la actividad del promotor. En cambio, los dos modelos difieren en como el complejo H-

NS / ADN puede afectar a la actividad de la ARN polimerasa: mientras que el modelo denominado silenciamiento transcripcional propone que la formación del complejo nucleoproteico H-NS / ADN impide la transcripción, ya sea por captura de la ARN polimerasa (figura 1.2.6.) o por oclusión de su lugar de unión (figura 1.2.7.) (Lucht *et al.*, 1994; Falconi *et al.*, 1993), en el modelo de represión vía topología del ADN la formación del complejo nucleoproteico H-NS / ADN modificaría la topología local del ADN, impidiendo la correcta unión de la ARN polimerasa para la formación del complejo de transcripción (Hulton *et al.*, 1990).

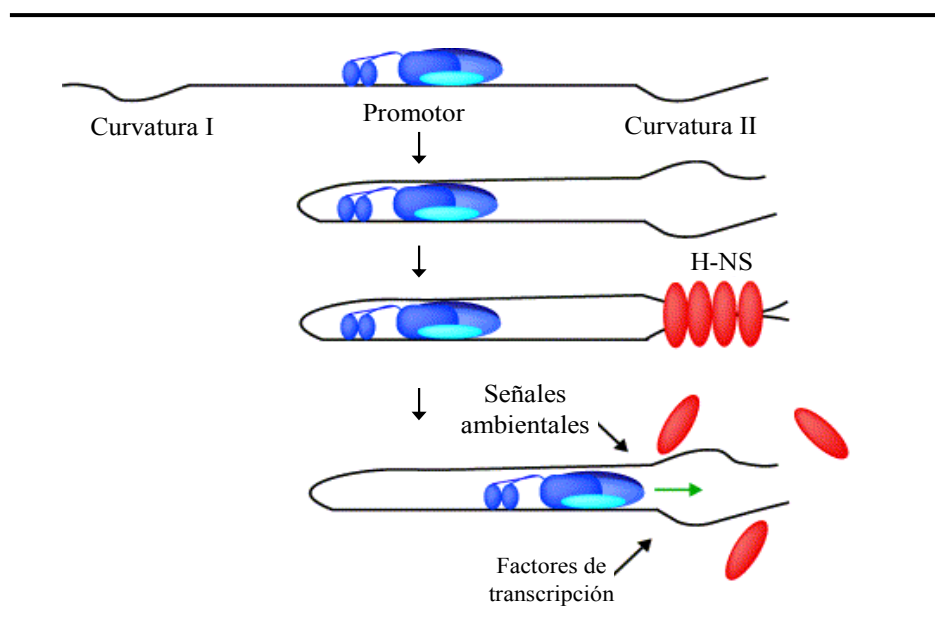


Figura 1.2.6. Represión de la transcripción por H-NS mediante captura de la ARN polimerasa. El ADN envuelve a la ARN polimerasa, aproximando las regiones de curvatura y permitiendo, mediante la unión de la proteína H-NS, la formación del complejo represor que atrapa a la ARN polimerasa. Este complejo se deshace debido a señales ambientales o por la intervención de activadores transcripcionales. Extraído de Dorman y Deighan (2003).

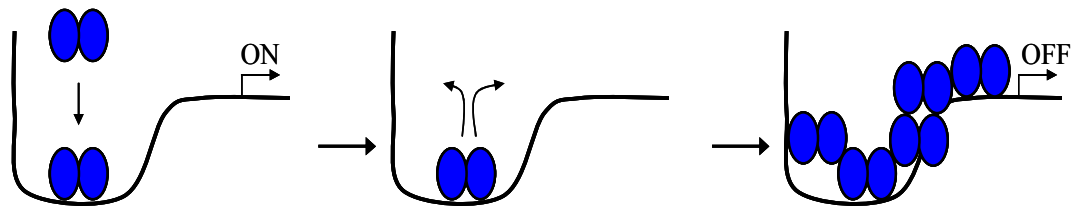


Figura 1.2.7. Represión de la transcripción por H-NS mediante oclusión del lugar de unión de la ARN polimerasa. La unión de la proteína H-NS a una región del ADN con curvatura intrínseca, así como el reclutamiento y polimerización de otras moléculas de H-NS a lo largo de la cadena de ADN, conlleva la ocupación del lugar de unión de la ARN polimerasa impidiendo de esta forma su unión. Extraído de Williams y Rimsky (1997).

La mayoría de los genes cuya expresión es reprimida por la proteína H-NS requieren la presencia de activadores transcripcionales para superar la represión (Schröder y Wagner, 2002) y, en algunos casos, la disrupción del complejo de represión viene determinado por factores ambientales, como la temperatura o la osmolaridad, dos parámetros que se conoce que afectan a la topología del ADN (Dorman, 2002).

A continuación, se cita un ejemplo bien caracterizado de regulación de la expresión génica por H-NS en función de la temperatura.

- **El gen *virF* de *S. flexneri*:** la expresión de factores de virulencia en *S. flexneri* viene determinada por la acción de dos proteínas de unión al ADN, denominadas VirF y VirB y que están codificadas en los genes *virF* y *virB* respectivamente, presentes en el plásmido pINV (Adler *et al.*, 1989). Estas proteínas actúan en cascada para activar la expresión de factores de virulencia en respuesta a un incremento de la temperatura, que actúa como señal para la bacteria de la presencia del hospedador. La proteína VirF es un regulador transcripcional de la familia AraC que activa la expresión del gen regulador *virB*, cuyo producto activa la expresión de distintos factores de virulencia. A 28° C, la proteína H-NS reprime tanto la transcripción de los genes *virF* y *virB* como la de genes que codifican distintos factores de virulencia, mientras que a 37° C desaparece el efecto represor de H-NS sobre *virF*, permitiendo la expresión de este regulador transcripcional que pone en marcha la cascada del gene regulador de la virulencia *virB* (figura 1.2.8.).

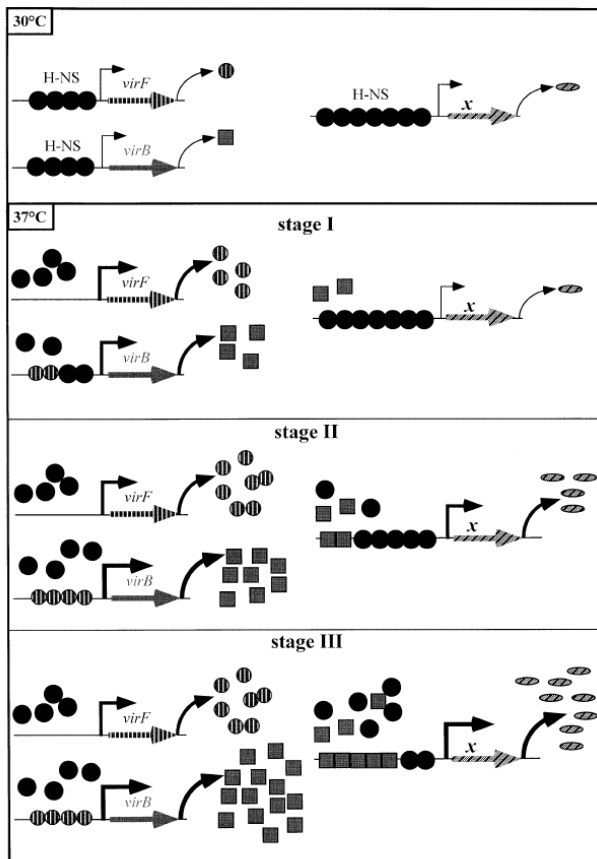


Figura 1.2.8. Cascada de activación de factores de virulencia en *S. flexneri*: a 30° C, H-NS (esfera negra) reprime la expresión de *virF*, *virB* y de genes que codifican factores de virulencia (*x*). A 37° C, deja de producirse la represión de *virF*, aumentando los niveles de VirF (esfera rallada) que activa la transcripción de *virB*. El aumento de la concentración de VirB (cuadrados) desplaza a H-NS de su unión a secuencias promotoras de genes que codifican para distintos factores de virulencia, activando de esta forma su expresión (estructuras ovaladas). Extraído de Beloin y Dorman (2003).

Esta transición de una temperatura restrictiva a una no restrictiva conlleva cambios en la topología del ADN. La proteína H-NS se une a dos lugares distintos (posición -1 y -250 con respecto al inicio de transcripción) de la región promotora del gen *virF*. Estos lugares de unión de la proteína H-NS se encuentran separados por una región de curvatura intrínseca que es sensible a la temperatura: mientras que a 28° C la topología de ADN permite la unión a través de H-NS de estas dos regiones, reprimiendo la expresión de *virF*, a 37° C cambios en la topología de esta región de curvatura del ADN conllevan la pérdida de contacto entre las moléculas de H-NS situadas en las distintas posiciones, provocando la desrepresión de la transcripción (Falconi *et al.*, 1998; figura 1.2.9.A). Falconi y colaboradores (1998) proponen que esta curvatura actuaría como un sensor de temperatura, que sufriría una transición conformacional a 32° C, permitiendo o impidiendo el efecto regulador de H-NS sobre la transcripción de *virF*.

La influencia negativa de H-NS sobre el promotor del gen *virF* es antagonizada por la proteína asociada al nucleóide FIS, que también presenta lugares de unión cercanos a este promotor (posiciones +55, -1,-130,-200 con respecto al inicio de

transcripción) y cuya unión desestabiliza el complejo de represión de H-NS (Falconi *et al.*, 2001; figura 1.2.9.B).

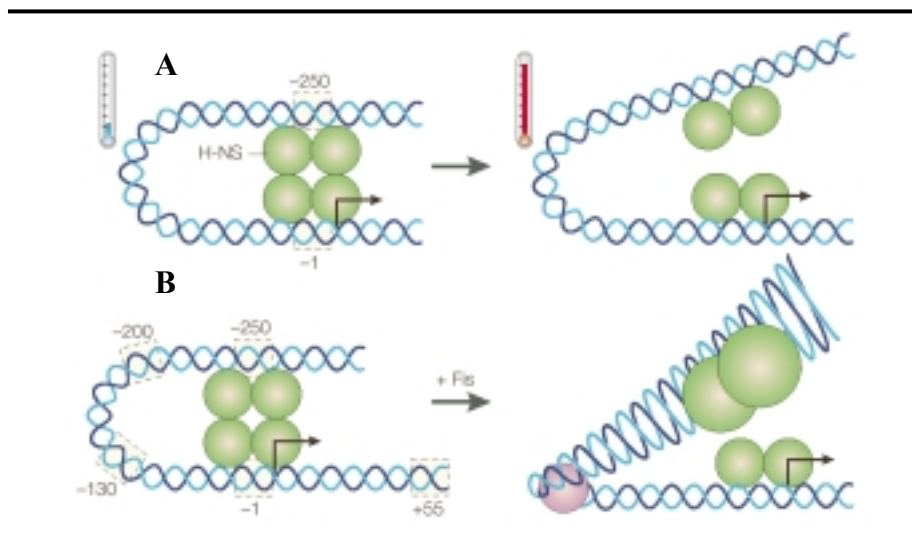


Figura 1.2.9. Papel modulador de H-NS sobre la expresión de *virF* en *S. flexneri*. (A) La transición de una temperatura restrictiva (28° C) a una no restrictiva (37° C) conlleva cambios en la topología del ADN, desestabilizando el complejo represor de H-NS. (B) la unión de la proteína FIS a esta región promotora también contribuye a desestabilizar el complejo de represión. Extraído de Dorman (2004).

1.2.2.- LA PROTEÍNA StpA

La proteína StpA (Supresor of T*d* mutant phenotype A) fue inicialmente identificada como supresor multicopia del fenotipo *Td* de los bacteriófagos T4 defectivos en el procesamiento de intrones (Zhang y Belfort, 1992). Posteriormente fue caracterizada por su capacidad, cuando se encuentra sobreexpresada, de complementar algunos de los fenotipos de un mutante *hns* (Shi y Bennett, 1994). Esta proteína ha sido descrita en *E. coli*, *S. enterica* serovar Typhimurium y *S. flexneri*.

Los genes *hns* y *stpA* son parálogos: se han generado por duplicación a partir de un gen ancestral y evolución de forma independiente dentro de un mismo genoma. El gen *stpA* se localiza en el minuto 60,24 del cromosoma de *E. coli* (Berlyn *et al.*, 1996) y codifica una proteína de 134 aminoácidos y 15,3 kDa (Zhang *et al.*, 1995). La proteína

StpA es bastante más básica que la proteína H-NS, ya que su pI teórico es de 9,08, lo que podría explicar su mayor afinidad, en relación a H-NS, por unirse al ADN (Sonnenfield *et al.*, 2001). La proteína StpA presenta un 58 % de identidad y un 67 % de similitud a nivel de secuencia aminoacídica con la proteína H-NS: esta identidad es mayor en el extremo C-terminal (73 % a partir del residuo 91) que en el extremo N-terminal (51 % hasta el residuo 90) (Cusik y Belfort, 1998). Ambas proteínas presentan una organización estructural similar, se distribuyen de forma más o menos uniforme a lo largo del cromosoma bacteriano (Azam *et al.*, 1999), se unen a regiones curvadas del mismo (Sonnenfield *et al.*, 2001) y actúan como represores transcripcionales. Además, ambas proteínas presentan actividad chaperona del ARN (Zhang *et al.*, 1995; 1996). De hecho, la proteína StpA fue inicialmente descrita como chaperona ya que promueve el correcto plegamiento del ARN en ausencia de traducción (Clodi *et al.*, 1999). Esta actividad de chaperona de ARN reside en el extremo C-terminal de la proteína (Cusick y Belfort, 1998) y es unas 10 veces más eficiente que en la proteína H-NS (Zhang *et al.*, 1996). La proteína StpA también es capaz de formar puentes entre moléculas de ADN y lo hace con una mayor eficacia que la proteína H-NS (Dame *et al.*, 2000; 2005), lo que probablemente es un reflejo de su mayor afinidad por el ADN.

Aunque ambas proteínas presentan similar función y modo de acción (Azam *et al.*, 1999), también existen características diferenciales entre ellas, como la ya comentada eficiencia de unión al ADN, niveles celulares, regulación y capacidad de oligomerización. Los niveles de StpA en la célula son relativamente bajos en comparación con los de H-NS y, mientras que los niveles de H-NS se mantienen más o menos constantes a lo largo del crecimiento, la expresión de StpA es dependiente de las características del medio de cultivo y de la fase de crecimiento, aumentando en la fase estacionaria. La expresión de StpA se encuentra fuertemente inducida en condiciones de estrés osmótico, aumento de la temperatura y crecimiento en medio mínimo (Free y Dorman, 1997). En este último caso, la inducción de la expresión de StpA es dependiente de la proteína asociada la nucleoide Lrp por ausencia de leucina en el medio de cultivo (Sondén y Uhlin, 1996).

En cuanto a su regulación, las proteínas StpA y H-NS autorregulan su expresión y se regulan en *trans*, lo que permite el mantenimiento de la concentración adecuada de cada proteína (Zhang *et al.*, 1996). Pero además, la proteína StpA sufre una regulación por proteólisis llevada a cabo por la proteasa Lon. Parece ser que la presencia de una fenilalanina en posición 21 en lugar de la cisteína presente en H-NS contribuye a la

sensibilidad de la proteína StpA ante la acción de la proteasa Lon (Johansson y Uhlin, 1999). La formación de heterodímeros en *E. coli* entre H-NS y StpA protege a la segunda de la proteólisis (Johansson y Uhlin, 1999), lo que implica que la proteína StpA se encuentre de forma predominante formando heterodímeros con H-NS. Esta regulación por proteólisis podría explicar en parte como en mutantes *hns* la sobreexpresión de StpA únicamente complementa de forma parcial el fenotipo mutante.

En cuanto a la capacidad de formar oligómeros de elevado orden que se extienden a lo largo de una molécula de ADN, la proteína StpA presenta una capacidad reducida en relación a la proteína H-NS, por lo que su efecto sobre la estructuración del cromosoma se reduce a la formación de puentes entre moléculas de ADN sin que, en el rango de concentración sometido a estudio, sea capaz de realizar una compactación de elevado orden (Dame *et al.*, 2005). Aunque las propiedades de la oligomerización de la proteína StpA no han sido caracterizadas bioquímicamente, las diferencias existentes a nivel de secuencia en la región conectora entre las proteínas H-NS y StpA podrían explicar la menor capacidad de StpA para formar largas estructuras oligoméricas y, consecuentemente, la menor capacidad de compactación de elevado orden del ADN (Dame *et al.*, 2005). En contra de los estudios que revelan una reducida capacidad de compactación del ADN por StpA, trabajos recientes (Keatch *et al.*, 2005) muestran cómo la presencia de la proteína StpA inhibe la actividad endonucleasa ejercida por los enzimas de restricción *DNasa I* y *EcoKI* sobre el ADN, lo que se considera una prueba de que esta proteína sí es capaz de inducir la condensación del ADN.

En cuanto al papel de StpA como regulador de la expresión génica, su efecto sólo ha sido caracterizado en mutantes *hns* en los que, como se ha mencionado anteriormente, los niveles de la proteína StpA se incrementan, pero no se conocen todavía ejemplos claros de esta regulación de la expresión génica en un fondo genético *hns* (Dorman, 2004).

1.3.- LA FAMILIA DE PROTEÍNAS HHA / YMOA

La familia de proteínas Hha / YmoA está formada por proteínas de bajo peso molecular (alrededor de 8 kDa), moderadamente básicas y que participan, entre otros procesos, en la termo y osmorregulación de la expresión génica (Cornelis *et al.*, 1991; Nieto *et al.*, 1991; Mouriño *et al.*, 1996). Las proteínas Hha e YmoA han sido los miembros de esta familia mejor caracterizados y han sido considerados miembros de una familia de moduladores de la expresión génica (Mikulskis y Cornelis, 1994; De la Cruz *et al.*, 1992). A continuación, se desarrolla el apartado dedicado a la proteína Hha, mientras que las características de la proteína YmoA vienen desarrolladas en el apartado 1.4.3.1.

1.3.1.- LA PROTEÍNA HHA

1.3.1.1.- Características generales

La proteína Hha (High hemolytic activity) fue identificada como modulador de la expresión de la α -hemolisina en *E. coli* (Godessart *et al.*, 1988). De bajo peso molecular (8,6 kDa), está compuesta por 72 aminoácidos muchos de los cuales presentan carga, lo que le confiere propiedades hidrofílicas. Su estructura ha sido resuelta por RMN (figura 1.3.1.; Yee *et al.*, 2002), mostrándonos que está formada por 4 hélices α que conforman motivos hélice-giro-hélice.

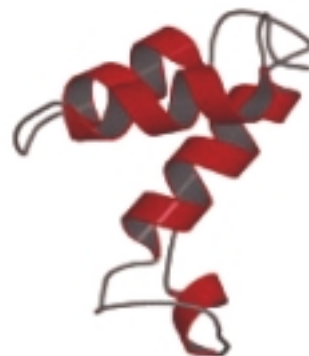


Figura 1.3.1. Estructura tridimensional de la proteína Hha. En rojo se remarcan las estructuras en hélice α . Extraído de Yee y colaboradores (2002).

La proteína Hha está codificada en el gen *hha*, que se localiza en el minuto 10,5 del cromosoma de *E. coli*. Los mutantes *hha* de *E. coli* presentan un fenotipo pleiotrópico: alteraciones en la topología del ADN plasmídico, alteraciones en la regulación de la expresión génica y alteración en la frecuencia de transposición de secuencias de inserción (Carmona *et al.*, 1993; Mikulskis y Cornelis, 1994; Balsalobre *et al.*, 1996; Mouriño *et al.*, 1996). Por este motivo, al presentar los mutantes *hha* características similares a los mutantes *hns*, inicialmente se planteó que la proteína Hha podría ser representativa de una nueva familia de proteínas asociadas al nucleoide (De la Cruz *et al.*, 1992; Mikulskis y Cornelis, 1994).

En cuanto a los niveles de expresión, Hha es una proteína poco abundante en la célula bacteriana y su expresión es más elevada en fase exponencial que en fase estacionaria.

Además de modular la expresión del operón *hly* en *E. coli*, apartado que se desarrollará a continuación de forma más amplia, la proteína Hha afecta a la expresión de distintos genes en respuesta a cambios en la temperatura y la osmolaridad, como el gen que codifica la adhesina Vir presente en el plásmido Vir (Mouriño *et al.*, 1996), el gen *ompA* que codifica la proteína de membrana externa OmpA y el gen *crr* que codifica el enzima IIA^{Glc} del sistema de la fosfotransferasa (Balsalobre *et al.*, 1999), el gen *hilA* de *S. enterica* serovar Typhimurium que codifica un activador transcripcional requerido para el proceso de invasión (Fahlen *et al.*, 2001), el gen *ler* presente en la cepa enterohemorrágica O157:H7 (Sharma y Zuerner, 2004) y el gen *htrA* que codifica la proteasa HtrA (Forns *et al.*, 2005b). También recientemente se ha puesto de manifiesto el papel de Hha en la regulación de la formación de biofilms en *E. coli* (Barrios *et al.*, 2006) y en la termorregulación de la transferencia por conjugación del plásmido R27 (Forns *et al.*, 2005a).

Estudios sobre la proteína Hha demuestran como toda su secuencia aminoacídica se corresponde con un único dominio funcional de unión a proteínas, mostrando secuencias conservadas con el dominio de oligomerización de H-NS (Nieto *et al.*, 2002). Además, la sustitución de este dominio N-terminal de la proteína H-NS por la secuencia completa de la proteína Hha genera una proteína quimérica funcional, capaz de complementar algunos de los fenotipos de un mutante *hns* (Rodríguez *et al.*, 2005).

1.3.1.2.- Regulación de la expresión de la α -hemolisina por la proteína Hha

La α -hemolisina es una citotoxina extracelular secretada por cepas uropatogénicas de *E. coli* que tiene la capacidad de inducir una disfunción celular que provoca la lisis en células de mamífero (Suttorp *et al.*, 1990).

La α -hemolisina de *E. coli* es un factor de virulencia que pertenece a una amplia familia de toxinas citolíticas presentes en bacterias Gram-negativas denominada RTX (Repeats in Toxin) (Welch *et al.*, 1981; Menestrina *et al.*, 1994). Esta familia incluye, entre otros, la leucotoxina (LktA) de *Pasteurella haemolytica* (Strathdee y Lo, 1987) y la adenilato ciclase (CyaA) de *Bordetella pertussis* (Glaser *et al.*, 1988). Las toxinas que pertenecen a esta familia comparten una serie de características como la capacidad de formar poros, la actividad leucotóxica, una organización génica común y la presencia de una secuencia consenso de 8 repeticiones de aminoácidos que dan nombre a la familia (repeticiones RTX).

Las proteínas responsables de la síntesis y secreción de la α -hemolisina están codificadas en el operón *hly*, que se localiza tanto a nivel cromosómico como plasmídico (Goebel y Schrempf, 1971; O'Hanley *et al.*, 1993). Uno de los ejemplos mejor caracterizados es el plásmido pHly152, que pertenece al grupo de incompatibilidad IncJ2 (Noegel *et al.*, 1981). El operón *hly* tiene una longitud aproximada de 7 kb y está formado por los genes *hlyC*, *hlyA*, *hlyB*, *hlyD* (figura 1.3.2.). El gen *hlyA* codifica una proteína precursora (pre-hemolisina) de 110 kDa. El gen *hlyC* codifica una proteína de 170 aminoácidos (Juárez *et al.*, 1984) de localización citoplasmática y responsable de la activación de la proteína HlyA mediante acilación (Hardie *et al.*, 1991; Issartel *et al.*, 1991). En el interior del gen *hlyC* se encuentra una secuencia de unas 200 pares de bases denominada *hlyM*, que participa en la modulación de la expresión de la hemolisina y cuya delección provoca un aumento de la expresión del operón *hly* (Jubete *et al.*, 1995). Las proteínas HlyB y HlyD, codificadas respectivamente en los genes *hlyB* y *hlyD*, intervienen en el proceso de secreción de la toxina activa y conforman, junto con la proteína TolC (Wandersman y Delepelaire, 1990), el sistema de secreción de tipo I (Holland *et al.*, 2005). HlyB es una proteína de membrana interna con un dominio citoplasmático de unión a ATP (ABC, ATP binding cassette), que interacciona con el extremo C-terminal de la proteína HlyA y la bombea al espacio periplásmico (Koronakis *et al.*, 1995). HlyD es una proteína de fusión a la membrana (MFP, membrane fusion protein) que forma un canal hasta la membrana

externa y que, a través de un cambio conformacional provocado por su unión con HlyA, permite el reclutamiento de TolC (Balakrishnan *et al.*, 2001). TolC es una proteína de membrana externa cuya asociación en trímeros genera un poro de salida a través del cual se secreta la proteína HlyA (Wandersman y Delepelaire, 1990). La secreción de la proteína HlyA mediante este sistema de secreción de tipo I es dependiente de la presencia, en el extremo C-terminal de esta proteína, de una secuencia señal compuesta por entre 50 y 60 aminoácidos, y es independiente de la presencia de un intermediario periplásmico (Gray *et al.*, 1989; Blight y Holland, 1994).

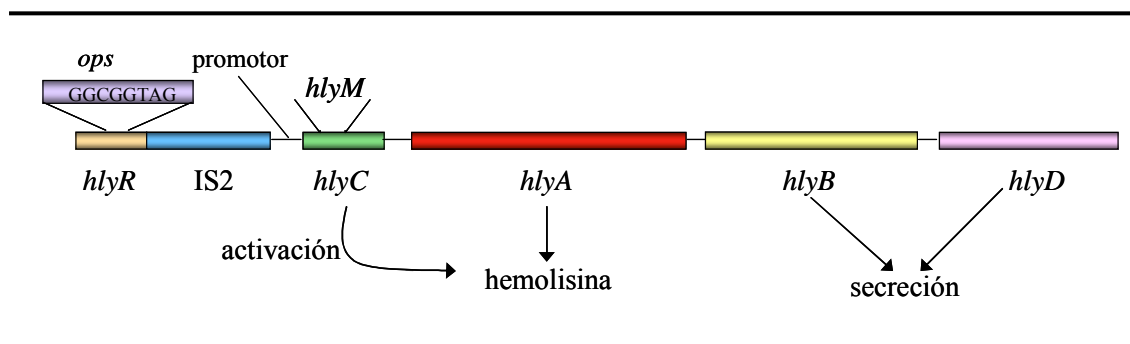


Figura 1.3.2. Estructura del operón hemolítico *hly* y su región reguladora presente en el plásmido pHly152.

La regulación de la transcripción del operón *hly* es un mecanismo complejo en el que, además de la región promotora, están implicadas otras secuencias. La región reguladora del operón *hly* presente en el plásmido pHly152 incluye una secuencia de 669 pares de bases, denominada *hlyR* (Vogel *et al.*, 1988), localizada a 1,5 kb de *hlyC* y que es esencial para la correcta expresión del operón *hly*. La ausencia de esta secuencia provoca una notable disminución de la expresión del operón, principalmente de los genes *hlyB* y *hlyD* (Vogel *et al.*, 1988). En el interior de *hlyR* se encuentra una secuencia moduladora de 8 pares de bases denominada *ops* (operon polarity suppressor), que se encuentra ampliamente distribuida en operones largos de bacterias Gram-negativas (Nieto *et al.*, 1996). Esta secuencia es un anti-terminador presente en la región no codificante anterior al inicio del operón que podría actuar eliminando la polaridad en la transcripción de los operones que la presentan.

Entre las secuencias *hlyR* y *hlyC* existe una secuencia de inserción IS2 que, aunque no es necesaria para la correcta expresión de la hemolisina, seguramente proporciona una distancia adecuada entre la región reguladora *hlyR* y el lugar de inicio de transcripción del operón *hly* (Vogel *et al.*, 1988).

La transcripción del operón *hly* genera dos transcritos diferentes: uno mayoritario de 4,0 kb (*hlyCA*) y uno minoritario de 8,0 kb (*hlyCABD*). La presencia de estos dos transcritos explicaría la disminución de la expresión relativa de los genes *hlyB* y *hlyD* en ausencia de *hlyR*. Ambos transcritos se inician en el mismo promotor, situado a 400 bases antes del gen *hlyC*, pero la transcripción es fuertemente polar. Esta polaridad se encuentra acentuada por la formación de un bucle de ADN (“Stem-loop”) entre los genes *hlyA* y *hlyB* (Welch y Pellet, 1988; Koronakis *et al.*, 1988). Probablemente, el transcrito policistrónico *hlyCABD* se origina al evitarse la terminación de la transcripción que habitualmente tiene lugar en este terminador rho-independiente. También se ha observado distinta estabilidad de los dos transcritos, siendo *hlyCA* el transcrito más estable (Hess *et al.*, 1986; Welch y Pellet, 1988; Koronakis *et al.*, 1988).

La expresión de la hemolisina es además sensible al grado de superenrollamiento del ADN. Así, la regulación del operón *hly* de pHly152 clonado en el plásmido pANN202-312 es sensible a factores conocidos como causantes de la relajación del ADN o de la reducción del superenrollamiento negativo, como son la mutación del gen *gyr*, la presencia de novobiocina o la disminución de la osmolaridad del medio (Carmona *et al.*, 1993).

Se han caracterizado otros genes no pertenecientes al operón *hly* que están implicados en la síntesis y secreción de α -hemolisina: el gen *tolC*, que codifica la proteína ya mencionada TolC, y el producto del gen *rfaH* (*hlyT* o *srfB*), que ha sido caracterizado como activador transcripcional de los genes que intervienen en la síntesis y secreción de la α -hemolisina (Bailey *et al.*, 1992).

El gen *hha* fue identificado al obtener mutantes para este gen en cepas de *E. coli* portadoras del plásmido pANN202-312 en las que se producía un incremento de la producción de la α -hemolisina a pesar de la ausencia de la región reguladora *hlyR* (Nieto *et al.*, 1991).

De la misma forma que con otras toxinas sintetizadas por bacterias entéricas, la expresión de la α -hemolisina de *E. coli* está regulada por distintos parámetros ambientales, como son la osmolaridad, la temperatura y la presión parcial de oxígeno.

En condiciones de baja temperatura y elevada osmolaridad la síntesis de la α -hemolisina se encuentra reprimida (Mouriño *et al.*, 1994), mientras que los mutantes para el gen *hha* presentan desreprimida la producción de α -hemolisina en ambas condiciones (Carmona *et al.*, 1993; Nieto *et al.*, 1991).

1.3.1.3.- Interacción de la proteína Hha con la proteína H-NS para modular la expresión génica

Estudios sobre la interacción de la proteína Hha purificada con la región reguladora del operón *hly* pusieron de manifiesto que esta unión se producía de forma no específica y con baja afinidad, siendo requeridas grandes cantidades de proteína Hha para la formación de complejos nucleoproteicos (Nieto *et al.*, 2000). Por este motivo, se planteó la posibilidad de que en la regulación del operón *hly* fuera necesaria la intervención de alguna otra proteína además de Hha, por lo que se realizaron estudios de interacción de Hha con otras proteínas. Estos estudios revelaron que la proteína Hha se une con elevada afinidad con la proteína H-NS de *E. coli* (Nieto *et al.*, 2000) por lo que se contempló la posibilidad de que el complejo Hha / H-NS estuviera implicado en la regulación del operón *hly*. Al analizar la expresión de la α -hemolisina tanto en mutantes *hha* como *hns*, se observó una desrepresión parcial de la expresión de la α -hemolisina en condiciones de elevada osmolaridad y baja temperatura, desrepresión que es máxima en el doble mutante *hha hns* (Nieto *et al.*, 2000). Estos datos sugirieron que el complejo formado por Hha y H-NS con el ADN está implicado en la termo y osmorregulación del operón *hly*.

Estos estudios demostraron además que la proteína H-NS es capaz de unirse a la región reguladora del operón *hly*, siendo esta unión dependiente de concentración. La cantidad de proteína H-NS necesaria para la formación de complejos nucleoproteicos es muy inferior a la requerida para Hha. Además, los complejos nucleoproteicos formados conjuntamente por Hha y H-NS son diferentes que los formados por cada una de las proteínas por separado.

Han sido identificados dos lugares de unión de la proteína H-NS al operón *hly* (Madrid *et al.*, 2002a): el primero de ellos (lugar I) se localiza en el interior de la secuencia reguladora *hlyR*, mientras que el segundo (lugar II) se solapa con la región

promotora del operón. Ambos lugares de unión de la proteína H-NS se encuentran separados por una zona de curvatura intrínseca (figura 1.3.3.) (Madrid *et al.*, 2002a).

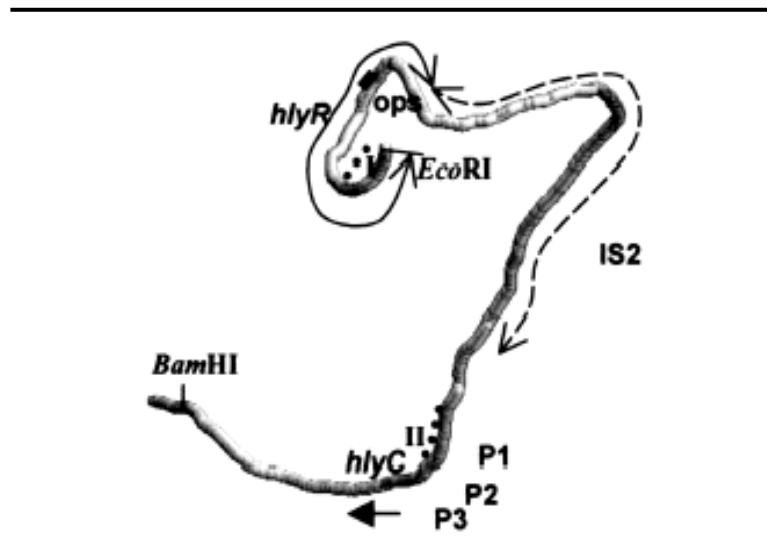


Figura 1.3.3. Predicción *in silico* de la curvatura de la región reguladora del operón *hly*. I y II indican los lugares de unión de la proteína H-NS. Extraído de Madrid y colaboradores (2002a).

La presencia de una región curvada entre los lugares de unión al ADN de la proteína H-NS también ha sido descrita para otros genes cuya expresión se ve reprimida por H-NS, ya sea de forma dependiente de temperatura, como el caso ya descrito del gen *virF* (Falconi *et al.*, 1998), o independiente de temperatura, como el gen *cspA* (Brandi *et al.*, 1999).

La temperatura influye en la afinidad de la proteína H-NS por sus dianas (I y II) de la región reguladora del operón *hly*. Esta afinidad es más elevada en condiciones de baja temperatura, hecho que concuerda con los datos fenotípicos del mutante *hns* y con la más eficiente represión de la transcripción por H-NS en condiciones de baja temperatura (Madrid *et al.*, 2002a).

En el modelo propuesto (Madrid *et al.*, 2002a), la flexibilidad del ADN aumentaría a baja temperatura, lo que permitiría el contacto entre las moléculas de H-NS localizadas en los dos lugares de unión de la región reguladora del operón *hly*, generando un complejo nucleoproteico en el que también intervendría la proteína Hha. La formación de este complejo nucleoproteico provocaría la oclusión de la secuencia *ops* y de la región promotora, reprimiendo la transcripción y eliminando el efecto anti-

terminador del elemento *ops*. A elevada temperatura, el efecto sería el contrario aunque la desrepresión no es total ya que existe un balance entre la afinidad moderada de H-NS por sus lugares de unión y el efecto que provoca la temperatura en la estructura y flexibilidad del ADN.

1.3.1.4.- Otras proteínas de la familia Hha / YmoA

En los últimos años se han descrito otros miembros de la familia de proteínas Hha / YmoA codificados tanto a nivel cromosómico como nivel plasmídico (Madrid *et al.*, 2002b).

Uno de estos miembros es la proteína RmoA. Esta proteína, codificada en el gen *rmoA* del plásmido R100 de *E.coli*, fue identificada mediante búsqueda de homología con las proteínas Hha e YmoA (Nieto y Juárez, 1996). La proteína RmoA podría actuar como moduladora de la transferencia plasmídica en respuesta a determinados factores ambientales, como la osmolaridad, ya que la mutación *rmoA* causa un aumento en la frecuencia de conjugación del plásmido R100 en condiciones de baja osmolaridad (Nieto *et al.*, 1998). Mediante estudios de complementación se ha podido constatar que ni Hha ni RmoA son capaces de complementar recíprocamente las funciones entre ellas (Nieto *et al.*, 1998).

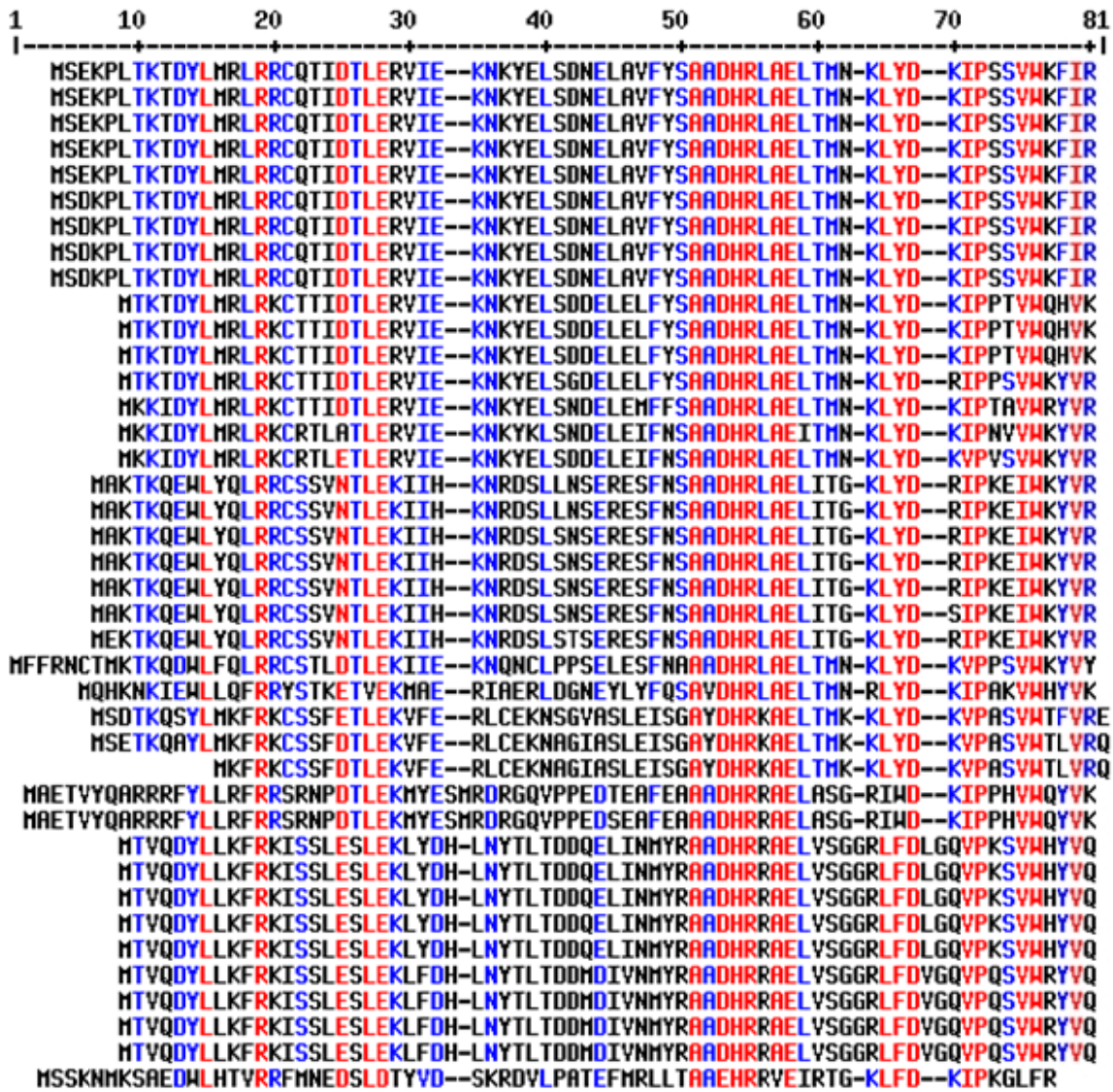
Otro miembro identificado de esta familia mediante un análisis completo del genoma de *E. coli* es la proteína YdgT. Esta proteína, de 71 aminoácidos y 8,4 kDa, presenta un 38 % de identidad y un 67 % de similitud a nivel de aminoácidos con la proteína Hha. La proteína YdgT se encuentra sobreexpresada en mutantes *hha* y atenúa el efecto de esta mutación sobre la expresión del operón *hly*. Además, es capaz de unirse de forma estable a proteínas de la familia H-NS (Paytubi *et al.*, 2004).

El plásmido R446 de *Proteus morgani* presenta una pauta abierta de lectura (ORF) que codifica Orf5 y que está implicada en la expresión dependiente de temperatura del pili conjugativo (Tietze y Tschäpe, 1994). La secuencia codificada en *orf5* presenta homología con la proteína Hha (Nieto y Juárez, 1996). Esta secuencia se encuentra situada justo antes y ligeramente superpuesta con *orf4*, cuyo producto presenta homología con la familia de proteínas H-NS (Nieto y Juárez, 1999).

En el plásmido de virulencia pO157 de la cepa de *E. coli* O157:H7 también se ha identificado una proteína homóloga de Hha (Burland *et al.*, 1998). Otros homólogos

se han identificado en diferentes plásmidos, como YdfA en el plásmido R721 de *E. coli* o el producto del gen *hmo* en el plásmido de virulencia pWR501 de *S. flexneri*, que ha sido descrito como un hipotético regulador (Venkatesan *et al.*, 2001). En el plásmido R27 de *S. enterica* serovar Typhi se han descrito genes que codifican proteínas homólogas tanto de Hha como de H-NS (Sherburne *et al.*, 2000). Estudios recientes han puesto de manifiesto que las proteínas Hha y H-NS codificadas tanto a nivel del plásmido R27 como a nivel cromosómico están implicadas en el proceso de transferencia del plásmido R27 ya que, en los mutantes *hha* y *hns* la transcripción de los genes necesarios para el proceso de transferencia por conjugación se encuentran desreprimidos (Forns *et al.*, 2005a). Además, este efecto de las proteínas Hha y H-NS sobre el proceso de transferencia del plásmido R27 es dependiente de la temperatura, ya que la desrepresión de los genes responsables de la transferencia por conjugación es mayor a 33° C que a 25° C (Forns *et al.*, 2005a).

En la figura 1.3.4. se comparan las secuencias aminoacídicas entre diferentes miembros de la familia de proteínas Hha / YmoA.



- Hha *Escherichia coli* (NP_414993)
- Hha *Shigella boydii* (YP_406900)
- Hha *Shigella dysenteriae* (YP_402156)
- Hha *Shigella flexneri* (NP_836131)
- Hha *Shigella sonnei* (YP_309458)
- Hha *Salmonella typhimurium* (NP_459468)
- Hha *Salmonella typhi* (NP_455070)
- Hha *Salmonella paratyphi* (YP_151447)
- Hha *Salmonella cholerasuis* (YP_215502)
- YmoA *Yersinia pestis* (NP_406613)
- YmoA *Yersinia pseudotuberculosis* (YP_069519)
- YmoA *Yersinia enterocolitica* (CAA41091)
- Hha *Photobadus luminescens* (NP_931058)
- Hha *Erwinia carotovora* (YP_049271)
- Hha *Wigglesworthia glossinidia* (NP_871527)
- Hha *Sodalis glossinidius* (YP_454361)
- Hha pAPEC-O2-R *E.coli* (AAW58926)
- RmoA R100 *E.coli* (CAA74268)
- Hmo pSS *Shigella sonnei* (YP_313455)
- Hmo pSB4_227 *Shigella boydii* (YP_406355)
- Hmo pWR501 *Shigella flexneri* (AAK18587)
- RmoA pAPEC-O2-CoIV *E.coli* (YP_443950)
- Hha pO157 *E.coli* (YP_325564)
- YdfA R721 *E.coli* (NP_065337)
- Hha pSG1 *Sodalis glossinidius* (YP_456113)
- Hha R478 *Serratia marcescens* (NP_941134)
- Hmc1-135 pHMC1 *Salmonella typhi* (CAD09732)
- Hha R27 *Salmonella typhi* (NP_058394)
- RmoA pEL60 *Erwinia amylovora* (NP_943230)
- RmoA pCTX-M3 *Citrobacter freundii* (AAN87663)
- YdgT *E.coli* (P64467)
- YdgT *S. boydii* (YP_407954)
- YdgT *S. dysenteriae* (P64470)
- YdgT *S. flexneri* (NP_837311)
- YdgT *S. sonnei* (YP_309458)
- YdgT *S. Typhimurium* (Q7CQK5)
- YdgT *S. typhi* (CAD01906)
- YdgT *S. paratyphi* (YP_150645)
- YdgT *S. cholerasuis* (YP_216466)
- Orf21 pACM1 *Klebsiella oxytoca* (AAD_33822)

Figura 1.3.4. Comparación de las secuencias aminoácidas de proteínas de la familia Hha / YmoA.

1.4.- *Yersinia enterocolitica*

1.4.1.- CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Y. enterocolitica*

Las bacterias que pertenecen al género *Yersinia* son bacilos o cocobacilos Gram-negativos no esporulados y anaerobios facultativos, que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Tres de las 11 especies incluidas en este género (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*) presentan cepas patógenas para el hombre. Esta capacidad de virulencia viene determinada, principalmente, por la presencia de un plásmido de 70 kb, denominado pYV en *Y. enterocolitica*, que codifica el sistema de secreción de tipo III Ysc / Yop (Cornelis *et al.*, 1998; Cornelis, 2002a) y que permite la adaptación de la bacteria a una temperatura de 37° C, facilitando la adhesión, la invasividad, la capacidad antifagocítica y la modulación de la respuesta inmune (Naktin y Beavis, 1999).

La primera referencia a *Y. enterocolitica* que podemos encontrar en la literatura proviene de la primera mitad del siglo XX cuando, con el nombre de *Flavobacterium pseudomallei*, fue aislada a partir de dos abscesos faciales presentes en un granjero (McIver y Pike, 1934). *Y. enterocolitica* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y posee reservorios acuáticos y animales, siendo el cerdo el reservorio más importante de las cepas patógenas para la especie humana. El ser humano se infecta mediante la ingestión de agua o alimentos contaminados (Roberts *et al.*, 1996; Cover y Robins-Browne, 2002), aunque también se han descrito casos de transmisión a través de transfusiones de derivados sanguíneos con eritrocitos almacenados en refrigeración (Neumeister *et al.*, 1997) debido a su capacidad de crecimiento a temperaturas inferiores a 0° C (Bergann *et al.*, 1995; Robins-Browne, 1997). Recientes investigaciones especulan sobre la posibilidad que algunos biotipos de *Y. enterocolitica* incluyan una etapa de asociación con insectos en su ciclo vital (Bresolin *et al.*, 2006), algo que ya ha sido referenciado en *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis* (Perry y Fetherston, 1997; Joshua *et al.*, 2003).

Bioquímicamente, *Y. enterocolitica* se caracteriza por fermentar carbohidratos sin producción de gas, ser móviles a 25° C pero no a 37° C, no descarboxilar la lisina, no desaminar la fenilalanina y no tener actividad arginina dehidrolasa.

Los aislamientos de *Y. enterocolitica* pueden ser biotipados, serotipados y fagotipados, lo que tiene importancia epidemiológica y patogénica (tabla 1.4.1). La heterogeneidad bioquímica y genética de esta bacteria ha hecho que se divida en seis biogrupos, denominados 1A, 1B, 2, 3, 4 y 5, que se pueden diferenciar mediante test bioquímico (Wauters *et al.*, 1987; tabla 1.4.2). Estos biogrupos pueden agruparse en tres líneas en función de su capacidad patogénica: una primera línea (biogrupo 1A) que no presenta el plásmido pYV y que ha sido considerado tradicionalmente no patogénico, aunque la tendencia actual es a considerarlo un grupo heterogéneo formado por cepas patógenas y no patógenas (Grant *et al.*, 1998; Grant *et al.*, 1999; Tennant *et al.*, 2005); una segunda línea (biogrupos del 2 al 5) de patogenicidad moderada y también denominadas cepas del “Viejo mundo” por ser identificadas principalmente en Europa y Japón, y una tercera línea (biogrupo 1B) de elevada patogenicidad y denominadas cepas del “Nuevo mundo” por ser identificadas predominantemente en Norteamérica.

Tabla 1.4.1. Patogenicidad de *Y. enterocolitica* en función de los serotipos y biotipos.

Serotipo (antígeno O)	Biotipo	Reservorio	Distribución geográfica	Patogenicidad humana
1,2,3	3	Chinchilla	Europa, USA	+
2,3	5	Liebre, cabra, conejo, mono	Europa	+
3	4	Cerdo, perro, gato, rata, pollo	Europa, Japón, América, África, Australia	+
4,32	1B	Ambiental	USA	+
5,27	2,3	Cerdo	Norteamérica, Japón, Europa, Australia	+
8	1B	Cerdo, ambiental	Norteamérica	+
9	2, 3	Cerdo, perro, gato, rata	Europa, Japón, Canadá, Australia	+
13a, 13b	1B	Mono, ambiental	Norteamérica	+
18	1B	Ambiental	USA	+
20	1B	Ambiental	USA	+
21	1B	Ambiental, pulga de la rata	Norteamérica	+
5; 6,30; 7,8; 18; 46; No tipables	1A	Cerdo, humano, ambiental	Norteamérica	+/-

Tabla 1.4.2. Pruebas bioquímicas utilizadas para identificar los biogrupos de *Y. enterocolitica* (25° C). +/-; reactividad variable según la cepa. 1; pruebas referidas a la producción de ácido a partir de esos sustratos.

	Biogrupo					
	1A	1B	2	3	4	5
Actividad lipasa	+	+	-	-	-	-
Xilosa ¹	+	+	+	+	-	+/-
Trealosa ¹	+	+	+	+	+	-
Sorbosa ¹	+	+	+	+	+	-
Inositol ¹	+	+	+	+	+	-
Salicina ¹	+	-	-	-	-	-
Hidrólisis de la esculina	+	-	-	-	-	-
Indol	+	+	+/-	-	-	-
Ornitina descarboxilasa	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+
Pirazinamidasa	+	-	-	-	-	-
Reducción de nitrato	+	+	+	+	+	-
DNasa	-	-	-	-	+	+
Prolina peptidasa	+/-	-	-	-	-	-
β -O-glucosidasa	+	-	-	-	-	-

Y. enterocolitica es un patógeno intestinal que presenta tropismo por tejidos linfáticos donde se multiplica extracelularmente aún en presencia de macrófagos y leucocitos polimorfonucleados (Simonet *et al.*, 1990), causando gastroenteritis aguda, enterocolitis, linfadenitis mesentérica e ileítis terminal. Estas bacterias colonizan el tracto intestinal, atraviesan la mucosa y penetran en el interior de las células presentadoras de antígenos de las placas de Peyer (Hanski *et al.*, 1989; Grutzkau *et al.*, 1990). Además, secreta una enterotoxina termoestable con capacidad de penetrar en la mucosa intestinal y concentrarse en las placas de Peyer y en los nódulos linfáticos (Pai y Mors, 1978; Delor *et al.*, 1990). En esta localización provocan microabscesos, ulceración del epitelio adyacente y respuesta inflamatoria. La inflamación puede extenderse posteriormente a los ganglios linfáticos mesentéricos, donde puede causar

abscesos de gran tamaño. Los cuadros de septicemia provocados por *Y. enterocolitica* no son frecuentes, pero pueden aparecer tanto en pacientes normales como en inmunodeprimidos por ingestión del patógeno o por transfusión sanguínea.

1.4.2.- FACTORES DE VIRULENCIA DE *Y. enterocolitica*

Como ya ha sido mencionado anteriormente, la capacidad de virulencia de *Y. enterocolitica* (y de las bacterias relacionadas *Y. pseudotuberculosis* y *Y. pestis*) viene determinada en gran medida por la presencia del plásmido de virulencia pYV (plasmid of *Yersinia* virulence, Cornelis *et al.*, 1987), que capacita a la bacteria para sobrevivir y replicarse en el interior del hospedador. Este plásmido codifica dos proteínas de membrana externa, denominadas YadA e YlpA, 14 proteínas de secreción, denominadas proteínas Yop (*Yersinia* outer proteins), y las proteínas Ysc, que conforman el sistema de secreción de tipo III responsable de la inyección al interior de las células eucariotas de las proteínas Yop (Michiels *et al.*, 1991).

La adhesina YadA (*Yersinia* adhesin A) es una proteína de membrana externa involucrada en la interacción entre *Yersinia* y la célula hospedadora (Cornelis *et al.*, 1991). YadA tiene un peso molecular de 41 a 47 kDa dependiendo de la especie, forma complejos triméricos anclados en la membrana externa y funciona como una adhesina no fimbrial, siendo responsable de la autoaglutinación (Skurnik *et al.*, 1984). En la figura 1.4.1. se muestra un modelo del dominio transmembrana de la proteína YadA. Esta proteína puede unirse a una gran variedad de moléculas de la superficie celular eucariota y, por tanto, está implicada en la colonización. Además, presenta una función protectora de la bacteria sobre la acción bactericida del suero humano. Esta adhesión a la célula hospedadora permite la liberación de las proteínas Yop. Por otro lado, YlpA es una lipoproteína cuya secuencia aminoacídica presenta elevada homología con la proteína TraT codificada en los plásmidos R100, F y el plásmido de virulencia de *S. enterica* serovar Typhimurium (China *et al.*, 1990).



Figura 1.4.1. Modelo estructural del dominio transmembrana de la proteína YadA, extraído de Wollmann y colaboradores (2006).

Las proteínas Yop intervienen en procesos de adherencia, internalización, resistencia al suero, autoaglutinabilidad, resistencia a fagocitosis y citotoxicidad (Laird y Cavanaugh, 1980; Martínez, 1989; Rosqvist *et al.*, 1990; Bliska *et al.*, 1993; China *et al.*, 1994). Estas proteínas pueden representar el 20 % del total de las proteínas celulares (Cornelis *et al.*, 1998). Las proteínas Yop se encuentran altamente conservadas en el género *Yersinia* y se pueden dividir en dos grupos (Cornelis *et al.*, 1998): (a) las efectoras, que son aquellas que se liberan y translocan dentro de la célula eucariota y no presentan una secuencia señal típica y (b) las translocadoras, que son aquellas involucradas en la translocación de las proteínas efectoras al interior de la célula eucariota mediante la formación de algún tipo de poro.

Dentro de las proteínas efectoras cabe destacar:

- YopH (51 kDa): Inicialmente llamada Yop51, es una proteína con actividad tirosín-fosfatasa que actúa sobre las proteínas tirosín-fosforiladas de los macrófagos impidiendo la adhesión. También inhibe la proliferación de linfocitos (Yao *et al.*, 1999).

- YopE (23 kDa): Proteína citotóxica que de forma indirecta causa la despolimerización de la estructura de microfilamentos de actina de las células HeLa y ayuda a evitar la fagocitosis.

- YopO / YpkA (81 kDa): Proteína con actividad serín-treonín quinasa. Se sitúa sobre la superficie interna de la membrana plasmática e interfiere sobre algunas señales de transducción de la célula eucariota.

- YopM (41,6 kDa): Proteína quinasa ácida que hace posible la unión a la trombina e inhibe la agregación plaquetaria. Aunque su función aún no está muy clara se ha comprobado que, una vez introducida en la célula eucariota, viaja hasta el núcleo celular (Skrzypek *et al.*, 1998).

Las proteínas efectoras YopH, YopE y YopO/YpkA impiden la fagocitosis por desestabilización del citoesqueleto de la célula eucariota (Rosqvist *et al.*, 1990; Iriarte y Cornelis, 1996; Hakansson *et al.*, 1996). Estas proteínas, excepto YopH, forman parte de la familia Rho de GTPasas monoméricas.

Dentro de las proteínas translocadoras cabe destacar:

- YopB (41,8 kDa) y Yop D (33,3 kDa): Ambas proteínas están implicadas en la formación del poro a través del cual las proteínas efectoras pueden ser translocadas. Además, YopB induce la respuesta inflamatoria en la célula hospedadora (Viboud *et al.*, 2003).

- LcrV (37 kDa): aunque existe controversia en cuanto a la función e importancia de esta proteína, parece que interviene en tres procesos: regulación de la secreción de proteínas Yop, formación del poro y modulación de la respuesta inmune en la célula eucariota (Marenne *et al.*, 2003).

El plásmido pYV también codifica una serie de proteínas denominadas Ysc que conforman el sistema de secreción de tipo III denominado inyectoria (TTSS). La actividad de este sistema de secreción se encuentra modulada por diferentes señales ambientales tanto de forma positiva como negativa (DeBord *et al.*, 2003). El inyectoria (figura 1.4.2.) está formado por dos regiones; un cuerpo basal constituido por 10 proteínas similares a las proteínas del cuerpo basal del flagelo y una parte externa. Esta estructura presenta un poro central de aproximadamente 50 Å, una longitud de 60-80 nm y un diámetro de 6-7 nm (Cornelis, 2002a; Cornelis, 2002b). La formación de los inyectorias se produce cuando la bacteria detecta que la temperatura ha aumentado a 37° C y, por sí solo, es suficiente para liberar proteínas Yop al medio extracelular, pero para la translocación de efectores Yop a través de la membrana de la célula eucariota son indispensables los translocadores Yop.

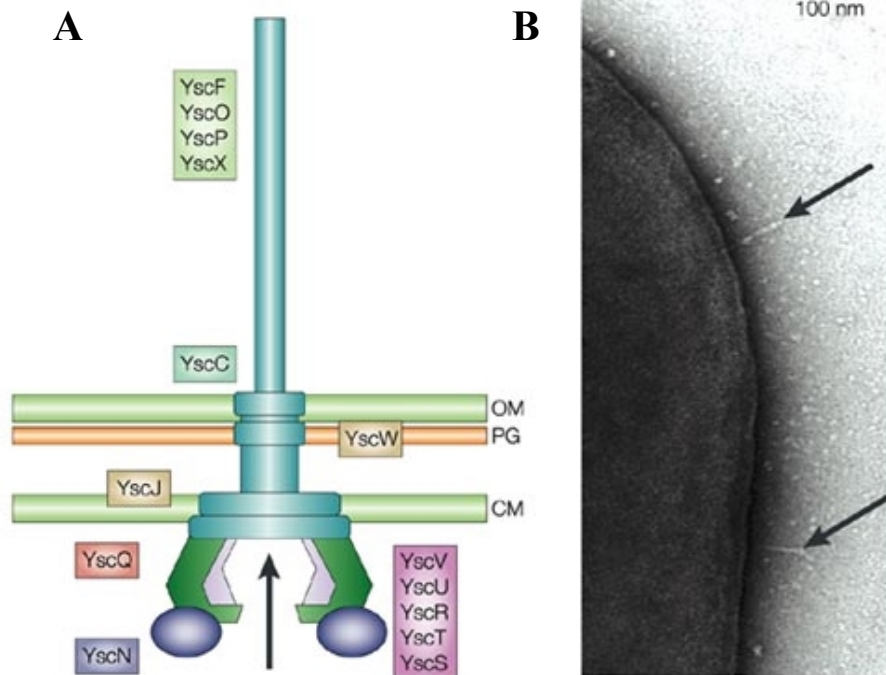


Figura 1.4.2. Representación esquemática del inyectosoma Ysc (A) y micrografía electrónica de la superficie de *Y. enterocolitica* (B) en la que, marcados con flechas, podemos observar inyectosomas. CM, membrana citoplasmática; PG, capa de peptidoglicano; OM, membrana externa. Extraído de Cornelis (2002b).

El plásmido pYV impone un requerimiento de calcio para crecer a 37° C y en su ausencia se produce la secreción de las proteínas Yop (Cornelis *et al.*, 1987). Esta imposición viene determinada por la proteína YopN y una región de 20 kb conservada entre plásmidos de distintas especies.

La proteína YopN (32,3 kDa) está implicada en el control de la secreción de proteínas Yop mediada por calcio (LRC; Low-calcium response): ante la falta de calcio se desregula la función de YopN y, consecuentemente, la liberación de proteínas Yop. Mutantes en el gen que codifica esta proteína secretan gran cantidad de proteínas Yops a 37° C incluso en presencia de iones calcio (Forgsberg *et al.*, 1991; Boland *et al.*, 1996).

La región conservada de 20 kb, además de estar implicada en el fenómeno dependiente de calcio, también es importante para la expresión coordinada de los genes *yop* (Cornelis *et al.*, 1987). En esta región se encuentra el gen *virF*, que codifica el activador transcripcional VirF. Esta proteína, de 30,8 kDa y 271 aminoácidos, es responsable de la activación de la expresión de los genes *yop*, *yadA* e *ylpA* (Cornelis *et*

al., 1987; Lambert de Rouvroit *et al.*, 1992). La proteína VirF pertenece a la familia de proteínas reguladoras AraC y en solución se constituye formando dímeros (Cornelis *et al.*, 1989; Lambert de Rouvroit *et al.*, 1992). VirF autorregula su propia expresión que, además, se encuentra fuertemente regulada por temperatura. El gen *virF* también ha sido descrito en *Y. pestis* con el nombre de *lcrF* (Yother *et al.*, 1986).

Otros factores de virulencia importantes pero de codificación cromosómica son: (i) la invasina Inv, codificada en el gen *inv* (Pepe y Miller, 1993), que es una proteína de membrana externa de 92 kDa que se une a varios miembros de la familia de las integrinas y promueve la invasión de los tejidos del epitelio intestinal. Se expresa en fase exponencial tardía en respuesta a cambios en las condiciones de crecimiento y su expresión se encuentra regulada por la proteína YmoA (Ellison *et al.*, 2003), y (ii) la enterotoxina Yst (Pai y Mors, 1978), que únicamente se expresa a baja temperatura y en fase tardía de crecimiento.

Mientras que *yadA* y los genes *yop* presentan una máxima expresión a 37° C, los genes *yst* e *inv* presentan una máxima expresión a 23° C aunque, en condiciones de pH inferiores a 5,5, se produce un aumento significativo de la expresión de *inv* a 37° C (Pepe *et al.*, 1994).

Finalmente, para que se produzca la secreción de las proteínas Yop al interior de la célula eucariota es necesaria la asociación en el citoplasma de la célula bacteriana de cada una de estas proteínas con su correspondiente chaperona de la familia Syc. En la figura 1.4.3. se muestra de forma esquemática la formación del inyector y la translocación de las proteínas Yop al interior de la célula eucariota.

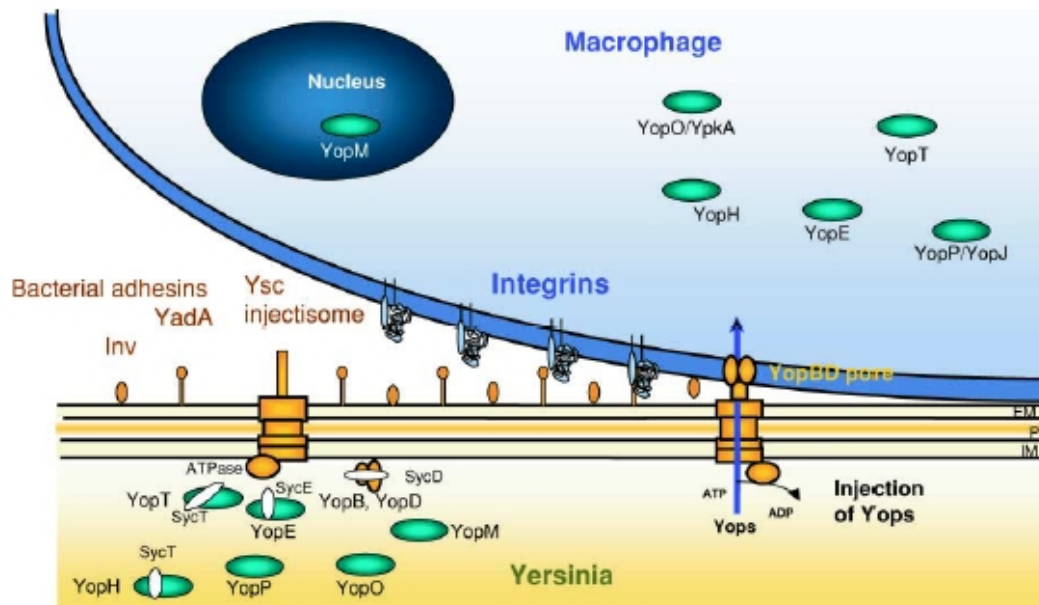


Figura 1.4.3. Secreción de las proteínas Yop mediante el inyectosoma Ysc y la translocación a través de la membrana celular eucariota. El contacto entre células se produce a través de las adhesinas bacterianas y las integrinas de la superficie celular. Cuando aumenta la temperatura se produce la formación del inyectosoma y el contacto entre las proteínas Yop y sus correspondientes chaperonas Syc. Finalmente, se produce la secreción de las proteínas efectoras a través del canal en el que intervienen las proteínas translocadoras YopB y D. Extraído de Cornelis (2002a).

1.4.3.- TERMORREGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA EN *Y. enterocolitica*

Y. enterocolitica ha desarrollado la capacidad de crecer saprofiticamente (o tal como ya ha sido indicado, incluir una etapa en su ciclo vital de permanencia en insectos) o invadir y persistir intracelularmente en el sistema reticuloendotelial de mamíferos. La transición entre los distintos ambientes en los que se desarrolla requiere de la regulación coordinada de un conjunto de genes codificados ya sea en el plásmido de virulencia pYV o en su cromosoma. En *Y. enterocolitica*, la transición de una temperatura de crecimiento de 25° C a 37° C conlleva importantes cambios a nivel morfológico y fisiológico: su morfología pasa de cocobacilo a bacilo, pierde motilidad, crece formando cortas cadenas, la composición proteica de su membrana externa se ve drásticamente modificada (no se sintetizan porinas), no expresa el enzima ureasa, autoaglutina y desarrolla dependencia al calcio y auxotrofia para determinados factores de crecimiento (Cornelis *et al.*, 1987). Un aspecto muy importante que relaciona la

transición de temperatura de crecimiento de 25° C a 37° C en *Y. enterocolitica* lo constituye el hecho de que a 37° C pasan a expresarse factores de virulencia tales como las proteínas Yop y la adhesina YadA. El mecanismo implicado en la termorregulación de la expresión de factores de virulencia en este microorganismo no es conocido en su totalidad, pero existen estudios que lo relacionan con proteínas asociadas nucleóide y con cambios en la topología del ADN.

1.4.3.1.- La proteína YmoA participa en la termorregulación de la expresión de factores de virulencia en *Y. enterocolitica*

El gen *ymoA* (*Yersinia* modulator) fue identificado en *Y. enterocolitica* al caracterizar mutaciones que causaban la expresión en condiciones de baja temperatura (25° C) de factores de virulencia que se encuentran habitualmente reprimidos en estas condiciones. Estos trabajos pusieron de manifiesto que la mutación *ymoA* afecta a la expresión del gen *virF*, que juega a su vez un papel como regulador positivo de la expresión de los genes que codifican las proteínas Yop y la adhesina YadA (Cornelis *et al.*, 1991). El gen *ymoA* codifica una proteína de bajo peso molecular (aproximadamente 8 kDa), denominada YmoA. Esta proteína es extremadamente rica en residuos cargados (36 %) y presenta un elevado grado de similitud con la proteína Hha de *E. coli* (De la Cruz *et al.*, 1992). Ambas proteínas son funcionalmente intercambiables en un proceso dependiente de dosis (Mikulskis y Cornelis, 1994; Balsalobre *et al.*, 1996), sugiriendo que forman parte de una familia de moduladores (De la Cruz *et al.*, 1992; Mikulskis y Cornelis, 1994). De la misma forma que sucedió al caracterizar mutantes *hha*, los mutantes *ymoA* son pleiotrópicos, presentando fenotipos similares a los que presentan mutantes *hns*. Todos estos datos llevaron a plantear que, de la misma forma que sucede con la proteína Hha, la proteína YmoA forma parte de una familia de proteínas asociadas al nucleóide (Cornelis *et al.*, 1991; Mikulskis y Cornelis, 1994). YmoA también está implicada en la regulación de la expresión génica a través de otros factores ambientales como el estrés osmótico (Lambert de Rouvroit *et al.*, 1992). Tras la realización de estos estudios iniciales, el mecanismo de acción mediante el cual la proteína YmoA modula la expresión génica no ha sido investigado hasta fechas recientes.

1.4.3.2.- Superenrollamiento del ADN y regulación de la expresión de factores de virulencia en *Y. enterocolitica*

Paralelamente a la identificación de la proteína YmoA como regulador de la expresión de factores de virulencia en *Y. enterocolitica*, otros estudios pusieron de manifiesto que el nivel de superenrollamiento del ADN también afecta a la expresión de las proteínas Yop (Rohde *et al.*, 1994). Cultivos crecidos a 25° C en condiciones de estimulación de la ADN girasa, que implican un moderado incremento en el nivel de superenrollamiento del ADN (condiciones topológicas equivalentes a las existentes a 37° C), provocan la expresión de las proteínas Yop de forma independiente al regulador VirF. Por otro lado, el plásmido pYV posee regiones de curvatura del ADN sensibles a la temperatura (Rohde *et al.*, 1999). Ambos estudios sugieren que la expresión de los genes que codifican las proteínas Yop, además de ser dependientes de VirF en un sistema regulado por YmoA, también son sensibles a la topología del ADN. Así, la expresión de estos genes a 37° C sería el resultado tanto de la activación por VirF como de un cambio topológico en la región promotora de los mismos.

1.4.3.3.- Estudios recientes sobre la regulación de la expresión génica en *Y. enterocolitica* por la proteína YmoA

Trabajos recientes han permitido obtener información complementaria que permite entender mejor el papel de YmoA como modulador de la expresión génica en *Y. enterocolitica* y, adicionalmente, establecer una relación entre el papel de esta proteína y la regulación por cambios topológicos en el ADN.

Estudios llevados a cabo en nuestro grupo de investigación han revelado que, de la misma forma que sucede con Hha, YmoA también interacciona con la proteína H-NS (Nieto *et al.*, 2002). Estos estudios otorgan un papel a la proteína YmoA en la regulación de la expresión génica por H-NS. Por otra parte, la proteína YmoA también ha sido descrita como un regulador negativo de la expresión de la invasina (*inv*), necesaria para el proceso de invasión de la célula hospedadora (Ellison *et al.*, 2003). La expresión de esta invasina se encuentra también regulada de forma positiva por el regulador transcripcional RovA (Revell y Miller, 2000), miembro de la familia de reguladores transcripcionales MarR, y de forma negativa por la proteína H-NS (Heroven

et al., 2004). Tal y como los estudios realizados en nuestro grupo de investigación habían postulado, los trabajos de Ellison y Miller indican que las proteínas YmoA y H-NS forman un complejo de represión del promotor del gen *inv*, en el que la proteína H-NS proporciona la especificidad de unión al ADN e YmoA interactúa específicamente con H-NS, de forma análoga al mecanismo de represión llevado a cabo por el complejo Hha / H-NS en la regulación del operón *hly* de *E. coli* (Ellison y Miller, 2006). Por tanto, la proteína YmoA sería un factor de regulación en un sistema dependiente de la proteína H-NS. Con respecto a esta última proteína, se ha puesto de manifiesto en muchos casos que los genes regulados por H-NS son también sensibles a cambios en la topología del ADN, por lo que la hipótesis sobre la regulación de los genes *yop* por YmoA y por cambios topológicos en el ADN probablemente tengan un nexo en común: la proteína H-NS.

Es importante mencionar también que la proteína YmoA se encuentra a su vez termorregulada en *Y. pestis* por la acción de las proteasas ClpXP y Lon (Jackson *et al.*, 2004), que la degradan de forma específica a 37° C pero no a 17° C. Esto implica que los niveles de YmoA también pueden ser importantes en el proceso de termorregulación de la expresión de factores de virulencia en *Y. enterocolitica*.

1.5.- OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO

En el momento del inicio de este trabajo, algunos de los objetivos de nuestro grupo de investigación eran obtener información estructural sobre la proteína Hha y de cómo ésta interacciona con la proteína H-NS. Otro aspecto relevante de la investigación, tal y como se ha mencionado en la introducción, era entender mejor el papel regulador de la proteína H-NS en *Y. enterocolitica*. El hecho de que se hubiese podido demostrar que la proteína YmoA (homóloga de Hha en *Yersinia*) interacciona con la proteína H-NS (Nieto *et al.*, 2002), sugiere que este complejo puede jugar un importante papel en la regulación de la expresión génica en este microorganismo y, por tanto, en la expresión de la virulencia. Trabajos iniciados por Rodríguez (2005) han revelado que, a diferencia de lo que sucede en *Escherichia* o *Salmonella*, la proteína H-NS es esencial en *Y. enterocolitica*. Por este motivo, se decidió profundizar más en estrategias alternativas para estudiar el fenotipo de mutantes *hns* en *Y. enterocolitica*.

El primer objetivo de este trabajo fue encontrar un sistema para obtener proteínas Hha y H-NS puras y con una concentración suficiente como para poder realizar estudios estructurales, trabajo llevado a cabo por el grupo del Dr. M. Pons del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química de la Universidad de Barcelona. Como extensión de este trabajo, el análisis estructural de la proteína Hha por parte del grupo del Dr. Pons sugirió la posibilidad de que la misma sufriese cambios conformacionales cuando interacciona con H-NS. Por este motivo, el segundo objetivo de este trabajo fue analizar cómo la sustitución de la cisteína en posición 18 (aminoácido situado entre las hélices α 1 y 2) afectaba a la bioactividad de la proteína Hha y a su capacidad de interaccionar con H-NS.

El tercer objetivo consistió en proseguir los trabajos de Rodríguez (2005) y estudiar en que condiciones se puede obtener un mutante *hns* de *Y. enterocolitica*. Estos trabajos tuvieron continuidad analizando las propiedades de mutantes *hns* obtenidos en presencia del plásmido pBRStpA y han puesto de manifiesto la importancia de las proteínas H-NS e YmoA en la regulación de la expresión génica en *Yersinia*.