

4.- DISCUSIÓN

4.1.- DOMINIOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LA PROTEÍNA HHA

La proteína Hha fue identificada como un modulador de la expresión de la toxina α -hemolisina en *E. coli* (Nieto *et al.*, 1991) y pertenece a la familia de proteínas Hha/YmoA que participan en la termo y osmoregulación de la expresión génica en bacterias entéricas (Cornelis *et al.*, 1991; Nieto *et al.*, 1991; Mouriño *et al.*, 1996). Desde entonces otros miembros de la familia han sido identificados, tanto en el cromosoma de bacterias Gram-negativas como en plásmidos conjugativos (revisado Madrid *et al.*, 2002b).

La proteína Hha interacciona con la proteína H-NS y ambas participan en la regulación del operón hemolítico (*hly*) en *E. coli*.

Para entender mejor el papel biológico de la proteína Hha, tal y como se ha comentado en la introducción de este trabajo, el primer objetivo consistió en determinar los posibles dominios funcionales y estructurales de dicha proteína. Con esta finalidad se decidió analizar qué residuos aminoacídicos concretos o qué regiones de la proteína Hha son importantes para la interacción con la proteína H-NS. Se utilizaron dos tipos de estrategias para realizar dicho análisis. En primer lugar se realizó la construcción de proteínas truncadas de Hha y, en segundo lugar, se obtuvo una colección de proteínas de Hha con diferentes mutaciones puntuales.

Las proteínas truncadas derivadas de Hha fueron obtenidas a través de amplificación por PCR, que permite obtener fragmentos de la longitud deseada para el análisis. En cambio, las diferentes proteínas con mutaciones puntuales se obtuvieron mediante mutagénesis química sobre la cepa de *E. coli* 5K (pANN202-312) y la posterior selección de colonias que presentan un incremento en la producción de hemolisina (aumento del tamaño del halo de hemólisis) en placas de agar-sangre. De un total de 40.000 colonias supervivientes al tratamiento mutagénico fue posible identificar 5 clones que presentaban mutaciones en dicho gen.

Tanto para las variantes truncadas como para los mutantes puntuales de Hha se analizó la capacidad de todas estas proteínas para interactuar con H-NS. De esta forma se pudo observar que todas las proteínas alteradas, exceptuando la proteína HisHha42, eran incapaces de retener a la proteína H-NS (apartado 3.1.3, figura 3.1.8.).

Las mutaciones que alteran la capacidad de la proteína Hha para interactuar con H-NS se localizan a lo largo de toda la secuencia. Asimismo, deleciones tanto en el extremo amino-terminal (HisHhaT3) como en el carboxi-terminal (HisHhaT1, HisHhaT2) presentan el mismo efecto. Estos datos sugieren que la totalidad de la proteína Hha está implicada en la unión con la proteína H-NS y, por tanto, constituiría un único dominio funcional. De una forma más importante está implicado el extremo carboxi-terminal de la proteína ya que la adición de una cola de 6 histidinas en ese extremo impide la interacción con H-NS, mientras que la adición de dicha cola en el extremo amino-terminal no impide la unión entre ambas proteínas. Otros datos que apoyan la mayor implicación del extremo carboxi-terminal hacen referencia al hecho de que la proteína YmoA de *Y. enterocolitica*, a la cual le faltan los 5 primeros aminoácidos de la proteína H-NS y la proteína HisHha42 con una mutación puntual en el aminoácido de la posición 13, todavía continúan manteniendo la capacidad para unirse a la proteína H-NS.

Al igual que se realizó con la proteína Hha, se intentó determinar qué aminoácidos de la proteína H-NS son importantes para la interacción con Hha. También igual que en el caso de Hha se realizó la mutagénesis química, pero en este caso sobre la cepa 5K H29 (pANN202-312). Se analizaron 20.000 colonias resultantes de la mutagénesis química en placas de agar-sangre, pero ninguno de los clones seleccionados por ser no hemolíticos presentaba mutaciones en el gen *hns*. En este caso, el método de mutagénesis química no sirvió para encontrar mutaciones en el gen *hns* que compensaran el fenotipo de un mutante *hha* y permitieran observar los aminoácidos importantes de H-NS en la unión.

La estructura de la proteína Hha ha sido resuelta recientemente a través de estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) mostrando la presencia de 4 dominios hélice α (Yee *et al.*, 2002) en la proteína. Además, en estudios recientes (García *et al.*, 2005), han puesto de manifiesto que tanto la interacción con H-NS como la incubación de preparaciones purificadas de proteína Hha a baja temperatura (25 °C) y posterior incremento de la misma (37 °C), producen alteraciones similares en el espectro de resonancia de Hha. Los residuos afectados por ambos procesos coinciden en muchos casos y se localizan a lo largo de las 3 primeras hélices α y son tanto residuos que se exponen en la superficie como residuos interiores (incluidos algunos en el núcleo hidrofóbico). Estos datos sugieren que la proteína Hha sufre un cambio conformacional cuando se encuentra formando complejos con la proteína H-NS. Se encontraría en una forma “cerrada” cuando se estudia la molécula aislada y “abierta” cuando se encuentra estabilizada por la unión con

H-NS. Además, un cambio conformacional parecido es el que se observa cuando la temperatura aumenta de 25 a 37 °C. En este caso, el cambio en el espectro de resonancia obtenido es debido a la interacción entre monómeros de Hha, generando dímeros y oligómeros.

El equilibrio conformacional de la proteína Hha entre sus formas “abierta” y “cerrada”, es quizá un mecanismo sensor para modular la expresión génica regulada por la proteína H-NS en respuesta a los diferentes cambios ambientales como la temperatura o la osmolaridad.

4.2.- LAS PROTEÍNAS DE LA FAMILIA Hha/YmoA SON FUNCIONALMENTE EQUIVALENTES AL EXTREMO AMINO TERMINAL DE LAS PROTEÍNAS DE LA FAMILIA H-NS

Los datos referidos en el apartado anterior sobre los dominios estructurales y funcionales de la proteína Hha sugirieron la presencia de un único dominio funcional en dicha proteína. Esta hipótesis unida a los datos conocidos sobre la regulación del operón hemolítico (*hly*) (revisado por Madrid *et al.*, 2002b) en el cuál es necesaria la presencia de la proteína H-NS, siendo está última la proteína que se une al ADN, implican que Hha realiza su función principalmente a través de su unión a H-NS u otras proteínas y no a través de su unión directa con el ADN.

En paralelo a la realización de este trabajo, la comparación entre diferentes miembros de la familia de proteínas Hha/YmoA y la secuencia del dominio de oligomerización de diferentes miembros de la familia H-NS realizada por J. M^a Nieto (Figura 3.1.9.), puso de manifiesto, por una parte, la similitud entre la longitud de la secuencia aminoacídica de Hha y del dominio de oligomerización de H-NS y, por otra, también la presencia de diferentes dominios conservados a lo largo de todo el alineamiento. Ello sugiere la posible equivalencia entre las proteínas de la familia Hha y el dominio N-terminal de oligomerización de las proteínas de la familia H-NS (Nieto *et al.*, 2002).

En esta memoria se han realizado una serie de trabajos dirigidos a comprobar si realmente la proteína Hha puede ser equivalente al dominio de N-terminal de la proteína H-NS. Para ello se realizó la construcción de diferentes proteínas híbridas por dos métodos diferentes: a través de la técnica del “megaprimer” (Sarkar y Sommer, 1990) y de la construcción de proteínas híbridas al azar (Sieber *et al.*, 2001).

Tal y como se puede comprobar en el apartado 3.2.1., con la construcción de una proteína híbrida (de forma dirigida a través de la técnica del “megaprimer”) que no es capaz de complementar los fenotipos típicos de un mutante *hns*, no todas las sustituciones del extremo N-terminal de H-NS por parte de la proteína Hha van a generar proteínas funcionales que puedan reemplazar, al menos parcialmente, a la proteína H-NS.

Por otra parte, la construcción de proteínas híbridas al azar, puso de manifiesto la dificultad para actuar sobre el gen *hns* y poder obtener fragmentos de la longitud deseada. De las diferentes fusiones obtenidas entre el dominio de unión al ADN de H-NS y la proteína Hha, de las cuales se secuenciaron 60, únicamente 3 de ellas se encontraban en pauta de lectura, lo que sugiere que algunas combinaciones entre las secuencias de Hha y H-NS pueden producir proteínas híbridas que resulten tóxicas para la célula bacteriana.

De las 3 proteínas híbridas obtenidas en pauta de lectura, únicamente una de ellas, la proteína HhaHnsHyb2 (que presenta los primeros 60 aminoácidos de la proteína Hha y a continuación los residuos 65-137 de la proteína H-NS) puede compensar, al menos en algunas condiciones, los fenotipos de un mutante *hns*. Las otras dos proteínas híbridas (HhaHnsHyb30 y HhaHnsHyb45) presentan unos niveles de complementación mucho más reducidos.

La proteína HhaHnsHyb2, tal y como se describe en el apartado 3.2.3., puede complementar prácticamente por completo el fenotipo hemolítico (90 %) y en un 60 % el fenotipo β -glucósido de un mutante *hns* cuando se encuentra clonado en un vector de alto número de copias. Cuando HhaHnsHyb2 se encuentra clonada en un vector de bajo número de copias la complementación en ambos fenotipos es mucho menor, de un 50 % en el fenotipo hemolítico y prácticamente nula en el fenotipo β -glucósido. Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de una elevada expresión de la proteína híbrida para que pueda compensar, al menos parcialmente, las funciones de la proteína H-NS.

Otro de los fenotipos que la proteína HhaHnsHyb2 es capaz de complementar, aunque no totalmente, es la deficiencia de un mutante *hns* para crecer en medio mínimo suplementado con serina. En estas condiciones un mutante *hns* presenta una tasa de crecimiento inferior a la de la cepa salvaje (Lejeune *et al.*, 1989). En cambio cuando la

proteína híbrida se encuentra presente en un mutante *hns*, el crecimiento de la cepa se recupera hasta prácticamente la mitad de la salvaje.

Al analizar la secuencia de las diferentes proteínas híbridas obtenidas y de las proteínas Hha y H-NS (Figura 3.2.9.) y su estructura por resonancia magnética nuclear (RMN), se puede intuir por qué algunas de las combinaciones entre Hha y H-NS pueden complementar los fenotipos de un mutante *hns* y otras no. Tal y como se ha descrito en la introducción de este trabajo, la proteína H-NS presenta 3 hélices α en el dominio de oligomerización (Schröder y Wagner, 2002), a continuación aparece la región flexible y finalmente el dominio de unión al ADN. En cambio, la proteína Hha presenta 4 hélices α (Yee *et al.*, 2002). La proteína híbrida HhaHnsHyb2, que es capaz de complementar parcialmente los diferentes fenotipos de un mutante *hns*, incluye las 3 primeras hélices α de la proteína Hha sustituyendo a las 3 presentes en el dominio de oligomerización de H-NS y a continuación la región flexible y el dominio de unión al ADN de H-NS. Tal y como se muestra en la figura 3.1.9., las 3 primeras hélices α de Hha presentan un significativo número de dominios conservados respecto a H-NS. Todo ello sugiere que, la estructura de la proteína HhaHnsHyb2 debe presentar un extremo N-terminal funcionalmente equivalente al de H-NS. En cambio la proteína híbrida HhaHnsHyb45, a pesar de ser muy parecida a HhaHnsHyb2 ya que también presenta las 3 primeras hélices α de la proteína Hha sustituyendo a las de H-NS, presenta una diferencia: a continuación de las hélices α presenta 7 aminoácidos más antes del comienzo de la región flexible y quizá este hecho impide una correcta conformación de la proteína. Finalmente, la proteína HhaHnsHyb30 presenta las 3 primeras hélices α (aunque le falta un aminoácido) de la proteína Hha, pero a continuación únicamente aparecen los últimos 16 aminoácidos de la proteína H-NS, quedando así muy reducido el dominio de unión al ADN. Sorprende el hecho de que la proteína HhaHnsHyb30 puede complementar, al menos parcialmente, el fenotipo hemolítico de un mutante *hns*. Dicha proteína quimérica contiene solamente los primeros 55 aminoácidos de Hha y un corto fragmento correspondiente a los 16 últimos aminoácidos del extremo C-terminal de H-NS. Se trata en realidad de un equivalente a un truncado N-terminal de H-NS. Para la proteína H-NS, las construcciones truncadas pueden ser funcionales en presencia de la proteína StpA (Free *et al.*, 1998), por lo que no se descarta que la funcionalidad de HhaHnsHyb30 esté en función de su interacción con StpA.

La construcción de la proteína HhaHnsHyb2 demuestra así que es posible obtener una proteína funcional, no tóxica para la célula, entre la proteína Hha y el dominio de unión al ADN de H-NS y que, por tanto, Hha puede ser considerada como equivalente a un dominio funcional e independiente del dominio de oligomerización de la proteína H-NS.

La obtención de la proteína HisHhaHnsHyb2 purificada permitió analizar la capacidad de dicha proteína para unirse al fragmento R0 de la región reguladora del operón hemolítico (*hly*), ya que se conocía la capacidad de la proteína H-NS para unirse a él (Nieto *et al.*, 2000). La proteína híbrida HhaHnsHyb2 es capaz de unirse al fragmento R0 aumentando el tamaño de los complejos ADN-proteína a medida que aumenta la concentración de la misma. Esta unión es menor que la obtenida con la proteína H-NS pero mucho mayor que la obtenida con la proteína Hha (que en las condiciones en que se han llevado a cabo los ensayos, no se une al ADN de forma específica), sugiriendo que la proteína híbrida es capaz de reconocer los lugares de unión de H-NS para realizar su función, aunque de una forma menos efectiva. Además esta unión al ADN es específica, ya que cuando se realiza la unión en competición con un fragmento de la región operadora del operón hemolítico al cual no se une preferencialmente la proteína H-NS, la proteína híbrida tampoco lo hace.

Por otra parte, cuando se forma el complejo entre la proteína híbrida, la proteína Hha y el ADN, se observa que la formación del complejo entre los tres elementos, aunque se produce, es más difícil de conseguir que en el caso de H-NS/Hha/ADN (complejo como ya se ha referido anteriormente responsable de la termo y osmoregulación del operón hemolítico). Estos datos sugieren que quizá esta dificultad para formar el complejo con el ADN y Hha y quizá también de formar oligómeros de elevado orden, es la causante de la reducción de la eficiencia de la proteína híbrida para realizar su función respecto a la proteína H-NS.

Aunque la proteína HhaHnsHyb2 es capaz de complementar parcialmente los diferentes fenotipos de un mutante *hms*, no es capaz de reducir significativamente los niveles de expresión del gen *stpA*. El gen *stpA* presenta unos niveles de expresión muy elevados en un mutante *hms* respecto a la cepa salvaje (Zhang *et al.*, 1996; Sondén y Uhlin, 1996; Free y Dorman, 1997) lo que se considera le permite sustituir parcialmente a la proteína H-NS. Los datos obtenidos en este trabajo indican nuevamente que, aunque la proteína híbrida es una proteína funcional capaz de atenuar los efectos de la mutación *hms*, no es suficiente para sustituir totalmente a la proteína H-NS y por tanto de reducir los niveles de expresión del gen *stpA* a los de una cepa salvaje. Por tanto, no puede descartarse

que la proteína StpA participe, junto con la proteína HhaHnsHyb2, en la modulación de la expresión de los operones *bgl* y *hly*, formando compuestos heteroméricos. En cualquier caso, la presencia de HhaHnsHyb2 es relevante, ya que su sustitución, por ejemplo, por HhaHnsHyb45 implica la manifestación de un fenotipo *hns* convencional.

Todos estos resultados y evidencias referidos hasta ahora apoyan la idea de que la proteína Hha tiene como función básica unirse a otras proteínas y no al ADN. No obstante, estudios recientes (Fahlen *et al.*, 2001, Sharma y Zuerner, 2004) han sugerido que la función de la proteína Hha modulando la expresión del promotor de *hilA* en *S. enterica* serovar *typhimurium* y del promotor *ler* en la cepa de *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 respectivamente, se realiza al unirse específicamente a los promotores de dichos genes. En ambos ejemplos, los autores purifican la proteína Hha utilizada para los ensayos específicos de unión al ADN a través de protocolos de fusión de proteínas, ya sea a través de una fusión a la proteína GST o a la proteína MBP. En ninguno de los dos casos los autores demuestran que la proteína Hha haya sido purificada libre de la proteína H-NS. De esta forma, no se puede descartar que exista una contaminación por parte de H-NS y que sea ésta última la causante de la unión específica al ADN.

En los diferentes trabajos que se han llevado a cabo en nuestro grupo de investigación, las diferentes estrategias para purificar a la proteína Hha, ya sea unión a níquel a través de una cola de histidinas, o por técnicas de fusión de proteínas, siempre han rendido preparaciones de Hha contaminadas con la proteína H-NS. Debido a que el peso molecular de la proteína Hha es aproximadamente la mitad que el de H-NS y que Hha tiende a dimerizar y oligomerizar en solución, la proteína H-NS podría confundirse con un dímero de Hha y la única manera de evidenciar la contaminación por H-NS es a través del análisis de las preparaciones de Hha por inmunodetección utilizando anticuerpos específicos anti-H-NS. Un ejemplo claro de este hecho se muestra en la figura 3.1.7. de este trabajo, en la cual el dímero de la proteína Hha-C-His (carril 8) se confunde con la proteína H-NS en un gel de acrilamida, pero en cambio no reacciona con los anticuerpos específicos anti-H-NS en el ensayo de inmunodetección.

Curiosamente para el promotor del gen *hilA*, dos estudios independientes han identificado a Hha y H-NS como moduladores de dicho gen, pero no se ha establecido una relación entre ambas (Fahlen *et al.*, 2001; Schechter *et al.*, 2003). Aunque no puede descartarse por completo que las proteínas de la familia Hha puedan unirse específicamente al ADN en ciertas dianas, los resultados presentados en esta memoria apoyan fuertemente la hipótesis de que la principal actividad biológica de las proteínas de

la familia Hha es la unión a otras proteínas y que miembros de esta familia interactúan específicamente con miembros de la familia de proteínas H-NS para generar complejos heterooligoméricos que eficientemente modulan la expresión génica en bacterias Gram-negativas. Además los recientes estudios estructurales expuestos anteriormente y los que se están llevando a cabo actualmente, nos ayudarán a entender mejor la naturaleza de los complejos heterooligoméricos que se forman entre las proteínas de las familias Hha y H-NS.

Recientemente se ha puesto de manifiesto que una cepa enteropatógena de *E. coli* expresa, en adición a la proteína H-NS, una forma truncada de la misma (Williamson y Free, 2005). Dicha forma truncada corresponde al extremo N-terminal de la proteína y presenta una fuerte afinidad por H-NS. Al contrario de lo que sucede con la interacción entre H-NS y Hha, la interacción de H-NS con la proteína H-NST_{EPEC} la inactiva. Por tanto, los diferentes procesos de interacción de H-NS con ella misma, con otros miembros de la familia de tamaño equivalente (StpA), la interacción con formas truncadas, ya sea con proteínas de la familia Hha/YmoA o con proteínas tipo H-NST_{EPEC}, son capaces de modificar la bioactividad de la proteína H-NS, ya sea potenciándola (interacción con Hha/YmoA) o reprimiéndola (H-NST_{EPEC}).

4.3.- INTERACCIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS YMOA Y H-NS DE *Y. enterocolitica*

La familia de proteínas H-NS se encuentra ampliamente distribuida entre las bacterias Gram-negativas (revisado Tendeng y Bertin, 2003). En la introducción de este trabajo ya se ha hablado de la capacidad de la proteína H-NS para interactuar con otras proteínas (apartado 1.2.3.). H-NS interactúa con el producto génico 5.5 del bacteriofago T7 suprimiendo la actividad supresora de H-NS (Liu y Richardson, 1993), con HF-I participando en la regulación de *rpoS* (Muffler *et al.*, 1996), con la proteína del rotor flagelar FliG (revisado Dorman, 2004) y también con sus proteínas homólogas (StpA, Sfh) formando una especie híbrida que modula la expresión de un gran número de genes, además de consigo misma.

Tal y como se ha referido anteriormente en trabajos previos del grupo de investigación (Nieto *et al.*, 2000; Madrid *et al.*, 2002b) se observó la interacción entre las proteínas Hha y H-NS, sugiriendo la existencia de un complejo entre ambas proteínas con un importante papel en la termo y osmoregulación de la toxina α -hemolisina. Por otra parte también se ha descrito la unión de la proteína YdgT (parálogo de la proteína Hha de *E. coli*) a la proteína H-NS. La unión entre ambas proteínas es fuerte y sugiere un papel estructural o regulador significativo del complejo (Paytubi *et al.*, 2004). Además Hha e YdgT también interaccionan con la proteína StpA (paróloga de H-NS) y esta interacción previene la degradación proteolítica de esta última proteína (Paytubi *et al.*, 2004).

Ya se ha comentado en este trabajo la similitud existente entre las proteínas YmoA de *Y. enterocolitica* y Hha (De la Cruz *et al.*, 1992) de *E. coli*, que además presentan funciones intercambiables (Balsalobre *et al.*, 1996; Mikulskis y Cornelis, 1994). Parecía, por tanto, importante estudiar si YmoA es también capaz de interaccionar con H-NS.

En los resultados obtenidos en este trabajo, la proteína YmoA de *Y. enterocolitica* es capaz de unirse a la proteína H-NS de *E. coli* (apartado 3.3.1.) y esto hizo pensar que quizás existiría un miembro de la familia H-NS en *Y. enterocolitica*. La utilización de la proteína HisYmoA junto con un extracto de *Y. enterocolitica* permitió identificar a la proteína H-NS en este microorganismo. La secuenciación N-terminal por el método de Edman de la proteína H-NS de *Y. enterocolitica* puso de manifiesto que ésta presenta un extremo N-terminal idéntico a la proteína H-NS de *E. coli*. Este hecho explicaría que HisYmoA sea capaz de unirse a H-NS de *E. coli* y sugiere que las proteínas H-NS de ambos microorganismos tienen capacidades similares para interaccionar con otras proteínas.

La estrategia que se ha utilizado para clonar el gen de *hns* de *Y. enterocolitica* consistió en construir una genoteca con el ADN de dicho microorganismo y analizar su capacidad para complementar el fenotipo β -glucósido de un mutante *hns* de *E. coli*. Después de analizar aproximadamente 4.000 clones, se obtuvo uno que contenía el gen *hns* de *Y. enterocolitica* (poseía una pauta de lectura abierta con una elevada homología con otros genes de la familia *hns* conocidos). Esta estrategia permitió mostrar que la proteína H-NS de *Y. enterocolitica* es capaz de complementar en *E. coli* algunos de los defectos causados por la mutación en el gen *hns*, en este caso la del fenotipo β -glucósido, pero también es capaz de complementar la desregulación de la expresión de la toxina α -hemolisina. Además, la proteína H-NS de *Y. enterocolitica* reacciona con los anticuerpos

específicos de la proteína H-NS de *E. coli*. Estos datos unidos al elevado grado de similitud que presentan ambas proteínas (Figura 3.3.10.), sugiere que son funcionalmente intercambiables.

El hecho de que la proteína H-NS de *Y. enterocolitica* interaccione con la proteína YmoA, un conocido modulador de la expresión de genes de virulencia (Cornelis *et al.*, 1991), sugiere que H-NS pueda jugar un papel importante modulando la expresión de la virulencia en *Y. enterocolitica*.

4.4.- LA PROTEÍNA H-NS DE *Y. enterocolitica*: UN MODULADOR GLOBAL EN ESTE MICROORGANISMO?

La proteína H-NS de *E. coli* fue descrita hace más de 30 años como una proteína asociada al nucleóide y presenta un importante papel en la regulación global de la expresión génica. En la mayoría de los casos, los procesos de regulación génica que requieren a la proteína H-NS responden a cambios ambientales como la osmolaridad, el pH o la temperatura (Ussery *et al.*, 1994). Por tanto, no es sorprendente que la proteína H-NS tenga un papel importante en la regulación de la expresión de la virulencia en muchos géneros de *Enterobacteriaceae* y bacterias Gram-negativas relacionadas.

Hasta ahora, la regulación de la expresión de la virulencia en *Y. enterocolitica* ha sido ampliamente estudiada, siendo muy importante la termorregulación (Cornelis *et al.*, 1987; Cornelis *et al.*, 1991). Si bien en el proceso de termoregulación de la expresión de factores de virulencia en *Y. enterocolitica* participa la proteína reguladora YmoA (Cornelis *et al.*, 1991), la implicación de H-NS nunca ha sido demostrada. De hecho, hasta los resultados presentados en este trabajo (y paralelamente en el trabajo de Bertin *et al.*, 2001, que se limita a la identificación de la secuencia de nucleótidos) no se conocía la existencia de este miembro de la familia de proteínas H-NS.

Teniendo en cuenta que el complejo entre Hha y H-NS en *E. coli* es importante para la regulación de la expresión génica, y que los miembros de ambas familias existentes en *Y. enterocolitica* también son capaces de interactuar, se planteó la posibilidad de que el complejo YmoA/H-NS sea importante para la regulación de la expresión de factores de virulencia en *Y. enterocolitica*.

Aunque H-NS es una de las proteínas asociadas al nucleóide más abundantes y ha sido tradicionalmente considerada como no esencial (Sherrat, 2003). Mutaciones en el gen *hns* han sido obtenidas de forma rutinaria en diferentes especies bacterianas como *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella* o *Vibrio* (Göransson *et al.*, 1990; Trachman y Maas, 1998; Maurelli y Sansonetti, 1998; Higgins *et al.*, 1998; Nye *et al.*, 2000; Tendeng *et al.*, 2000).

Para la obtención de una cepa mutante en el gen *hns* de *Y. enterocolitica* se utilizaron las metodologías clásicas de reemplazamiento alélico. Estas metodologías se basan en la recombinación homóloga entre el gen mutante que se incorpora en un plásmido suicida y la copia cromosómica del gen. En los resultados de este trabajo (apartado 3.4.1. y 3.4.2.) se puede observar cómo es posible detectar la inserción de la copia mutante del gen *hns* en el cromosoma (la mutación del gen se realizó mediante la inserción de un casete de resistencia a estreptomicina), pero no eliminar la copia salvaje, por lo que, no se consigue la obtención de una cepa mutante para el gen *hns*. Estos datos sugerían que la mutación en el gen *hns* es letal en *Y. enterocolitica* y estarían apoyados también otros estudios existentes que también han fallado en la obtención de mutantes en *hns* en diferentes especies bacterianas como *Proteus mirabilis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Y. pseudotuberculosis* (Coker *et al.*, 2000; Goyard y Bertin, 1997; Heroven *et al.*, 2004) y *A. hydrophila* (en este último caso son resultados del grupo de investigación sin publicar).

La confirmación de que el gen *hns* es esencial para *Y. enterocolitica* viene dada por los estudios de complementación en *trans*. En primer lugar se realizó la complementación a través del plásmido R27. Este plásmido conjugativo pertenece al grupo de incompatibilidad HI y codifica para un homólogo natural del gen *hns* (Sherburne *et al.*, 2000). A través de la incorporación de este plásmido en la cepa de *Y. enterocolitica* portadora de la copia mutante y salvaje del gen *hns* se pudo obtener la pérdida de la copia salvaje y la obtención de la mutación. Además esta complementación es debida precisamente al homólogo de *hns* presente en R27 ya que la utilización de un plásmido con una mutación en este gen ya no permite obtener el mutante *hns* cromosómico.

En segundo lugar la complementación en *trans* se realizó a través del plásmido pJOB101 al que se le introdujo una copia del gen *hns*. De esta forma también se obtuvo la mutación en el gen *hns* de *Y. enterocolitica*. Este plásmido, a pesar de presentar un promotor inducible, tenía una expresión basal suficiente para compensar al menos dos de los fenotipos asociados a un mutante *hns* en *E. coli* (la sobreexpresión del operón hemolítico y la desrepresión del operón β -glucósido). La dificultad para reprimir en determinadas condiciones los diferentes sistemas de expresión utilizados, no ha permitido

la obtención de un mutante letal condicional, aunque si la obtención de un mutante *hns* con diferentes grados de afectación en el crecimiento.

Como ya se ha comentado anteriormente, la obtención de mutantes *hns* ha sido posible en ciertos microorganismos pero ha fallado en otros. Se ha propuesto que para un microorganismo como *Bordetella* la incapacidad de obtener la mutación viene dada por la ausencia del parálogo de H-NS, StpA, proteína que si se encuentra presente en *E. coli* (Goyard y Bertin, 1997). Precisamente en *E. coli*, los mutantes *hns* muestran incrementados los niveles del gen *stpA* y ha podido evidenciarse que la sobreproducción de la proteína StpA afecta a la expresión de al menos alguno de los operones regulados por *hns* (Sónnden y Uhlin, 1996).

Es importante remarcar que las especies en las que se ha podido obtener la mutación en el gen *hns*, como *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella* presentan en su genoma el gen *stpA* (los números de acceso en el NCBI son respectivamente P30017, NP_838208 y AAL21684). Al realizar una búsqueda con StpA de *E. coli* en la página de Internet del Institute Sanger (www.sanger.ac.uk) sobre el genoma completo de *Y. enterocolitica* 8081, se vio que este microorganismo presenta una copia simple del gen *hns* y no se encuentra el gen de *stpA*. En esta memoria se aportan nuevos datos que apoyan la hipótesis de que la presencia de StpA permite la viabilidad de los mutantes *hns* y es que cuando se introduce un plásmido con una copia del gen *stpA* en *Y. enterocolitica* es posible obtener la mutación a pesar de sus deficiencias para el crecimiento. También se ha de tener en cuenta cuando se intenta la obtención de mutantes *hns* en especies poco conocidas, que el fenotipo de la mutación puede ser atenuado por la presencia de genes tipo *hns* ya sea en el cromosoma o en plásmidos permanentes.

Estos resultados abren el estudio del papel de H-NS en la regulación de la virulencia en *Yersinia* y de cuál o cuales son sus funciones fisiológicas que hacen que sea una proteína esencial en este género y en otras especies de bacterias Gram-negativas.