



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

4.- DISCUSIÓN

4.1.- ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE LA PROTEÍNA Hha

4.1.1.- ESTRATEGIAS DE PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS Hha Y H-NS

Para la realización de estudios estructurales por RMN de la proteína Hha y de la interacción entre Hha y H-NS fue necesario un primer paso de producción de ambas proteínas en cantidades suficientes y en estado soluble y puro. Tanto la proteína H-NS como la proteína Hha tienen tendencia a oligomerizar, hecho que dificulta en gran medida la realización de estos estudios estructurales. Mientras que la sobreexpresión de H-NS da lugar a una fracción elevada de proteína soluble, suficiente para no tener que modificar las condiciones de cultivo que se conoce que aumentan la solubilidad de algunas proteínas sobreexpresadas, como son el aumento de la osmolaridad del medio o la disminución de la temperatura de incubación (Shirano y Shibata, 1990; Blackwell y Horgan, 1991; Huang *et al.*, 1998; Schlicke y Brakmann, 2005), su elevada tendencia a oligomerizar (Schöeder y Wagner, 2002) hizo necesaria la producción de una proteína H-NS truncada compuesta por los primeros 64 aminoácidos de la proteína que, aunque es incapaz de oligomerizar, no presenta alterada ni su funcionalidad ni su capacidad de dimerización (Esposito *et al.*, 2002). La sobreexpresión de esta proteína H-NS truncada no vio modificado su grado de solubilidad en relación a la proteína H-NS nativa.

Por otro lado, la sobreexpresión de Hha da lugar a proteína mayoritariamente insoluble que se acumula formando cuerpos de inclusión. La utilización de un vector de expresión de la serie pET3b basado en la ARN polimerasa del fago T7 cuya expresión es inducible por IPTG requiere de la presencia de un plásmido pLys en la cepa hospedadora, que codifica para la lisozima del fago T7 y cuyo efecto sobre el crecimiento impide realizar modificaciones en la composición del medio de cultivo o en la temperatura de incubación. Una vez comprobada que la solubilización de la proteína acumulada en cuerpos de inclusión mediante un proceso de desnaturalización con guanidina-HCL y posterior renaturalización con NDSB no devolvía su conformación original a la proteína Hha, se optó por intentar aumentar la fracción soluble de la proteína Hha sobreexpresada sin modificar las condiciones de incubación. El problema de la insolubilidad de la proteína Hha sobreexpresada se resolvió inicialmente mediante la expresión en tándem de las proteínas Hha y H-NS. La interacción entre miembros de

las dos familias de proteínas ya ha sido referenciada, así como el papel de la interacción de ambas proteínas en la regulación del operón *hly* de *E. coli* (Nieto *et al.*, 2000; Nieto *et al.*, 2002). El hecho de que el aumento de la solubilidad de Hha cuando se coexpresa con H-NS venga determinado por la capacidad de interacción entre ambas proteínas y no por un efecto intrínseco de la coexpresión, queda patente al comprobar que la sobreexpresión en tándem de H-NS con una proteína Hha mutante que ha perdido la capacidad de unirse a H-NS no da lugar a un aumento en la fracción soluble de Hha, de la misma manera que sucede cuando dicha proteína Hha mutante se sobreexpresa de forma única.

Finalmente, la utilización de un sistema de expresión basado en un plásmido de la serie pET15b, que presenta incorporado un sistema propio de represión de la expresión en ausencia del inductor IPTG (LacI-*lacO*) y que no requiere la presencia en la cepa hospedadora de un plásmido que codifique para la lisozima de T7, permitió disminuir la temperatura de incubación del cultivo destinado a la producción de Hha tras la inducción con IPTG, resultando en un importante aumento de la fracción soluble de la proteína Hha producida.

4.1.2.- CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA Hha: MUTAGÉNESIS EN LA CISTEÍNA EN POSICIÓN 18

Resultados previos obtenidos en nuestro grupo de investigación (Nieto *et al.*, 2002) pusieron de manifiesto que la capacidad de la proteína Hha de interaccionar con la proteína H-NS implicaba prácticamente a toda la secuencia de la proteína Hha. Tanto experimentos de mutagénesis química al azar como deleciones en los extremos amino y carboxi de la proteína mostraron que, en su interacción con H-NS, Hha estaba formada por un único dominio funcional. El análisis por RMN de la proteína Hha realizado por Yee y colaboradores (2002) puso de manifiesto que esta proteína está formada por cuatro hélices α , interconectadas por regiones flexibles. En el momento de realizar el análisis de la proteína Hha y en el contexto del análisis estructural de otras muchas proteínas, Yee y colaboradores justificaron la estructura hélice-giro-hélice como una estructura típica de las proteínas que se unen al ADN. No obstante, resultados previos de nuestro grupo de investigación claramente sugerían que una de las funciones

esenciales de la proteína Hha no es interaccionar con el ADN, sino con la proteína H-NS (Nieto *et al.*, 2000). El análisis por RMN de las alteraciones estructurales que sufre la proteína Hha cuando interacciona con H-NS (García *et al.*, 2005) confirma los resultados que indican que Hha interacciona con H-NS. También se pudo demostrar que los residuos afectados en esta interacción están distribuidos a lo largo de las cuatro hélices α de la proteína, lo que concuerda con los resultados publicados por nuestro grupo de investigación en cuanto a la existencia de un único dominio funcional en Hha (Nieto *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2005). Es importante destacar que los residuos de Hha afectados por la interacción con H-NS se encuentran tanto en la superficie como en el núcleo hidrofóbico de la estructura de la proteína, hecho que sugiere que la proteína Hha debe sufrir un cambio conformacional cuando interacciona con H-NS. Adicionalmente, en ausencia de H-NS, también ha podido ponerse de manifiesto que la transición de una temperatura de 25° C a 37° C genera un equilibrio entre diferentes conformaciones de Hha (García *et al.*, 2005). Es importante destacar que algunos de los residuos que más significativamente se ven perturbados por las alteraciones inducidas por la temperatura se solapan con los residuos que se ven alterados cuando Hha interacciona con H-NS.

Un modelo que contemple una alteración conformacional de la proteína Hha posiblemente implicaría alteraciones en la estructuración de las hélices α . En este contexto, se focalizó la atención en la cisteína en posición 18, que enlaza las hélices α 1 y 2, y se decidió sustituir este residuo aminoacídico por otros que incrementasen o disminuyesen el volumen, lo que en teoría se traduciría en una “apertura” o “cierre” de la estructura en vértice formada por las hélices α 1 y 2. Los trabajos realizados han permitido obtener los correspondientes mutantes y expresar las correspondientes proteínas. Un aspecto destacable de esta problemática se encuentra en el hecho de que la proteína paróloga de Hha en *E. coli*, YdgT, presenta de forma natural la sustitución de la cisteína en posición 18 por una isoleucina. Se ha descrito que las interacciones YdgT-H-NS son más resistentes a la fuerza iónica del medio que las interacciones Hha-H-NS (Paytubi *et al.*, 2004), lo que podría correlacionarse con una mayor reactividad de la proteína YdgT al tener el ángulo H1/H2 más abierto que en la proteína Hha. Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan esta hipótesis, y la proteína mutante HhaC18I, en la que la cisteína en posición 18 se ha sustituido por una isoleucina, forma complejos con H-NS más resistentes a los lavados con elevada concentración de sal que

la proteína Hha salvaje. Estos resultados apoyarían la hipótesis de que la estructuración de la región entre las hélices H1 y H2 es importante para la interacción con H-NS. Asimismo, mutaciones que sustituyen la cisteína por aminoácidos que, o bien no modifican el volumen o bien lo reducen, no resultan en un incremento de la capacidad de interaccionar con H-NS.

Es importante resaltar que la sustitución de la cisteína en posición 18 por la isoleucina inactiva la función reguladora de la proteína Hha. Esta ausencia de función en la proteína mutante se ha puesto de manifiesto al comprobar que la proteína HhaC18I no es capaz de complementar el defecto en la proteína Hha, como se demuestra en la regulación del operón *hly*: mientras que las proteínas HhaC18S y HhaC18A complementan la mutación *hha* por lo que respecta a la expresión del operón *hly*, la proteína HhaC18I no lo hace. Pero un aspecto todavía más relevante de esta cuestión radica en que la proteína HhaC18I, además de perder funcionalidad, cuando se expresa en el plásmido pBR322 afecta significativamente al crecimiento de la cepa *E. coli* 5K en condiciones de baja osmolaridad. De hecho, hay que tener en cuenta que el complejo HhaC18I-H-NS es más estable que el complejo Hha-H-NS. Por tanto, una hipótesis sería que, en condiciones de baja osmolaridad, complejos Hha-H-NS que deberían estar disociados y ser, por tanto, no funcionales, no lo están, reprimiendo funciones génicas esenciales para el crecimiento del cultivo en condiciones de baja osmolaridad. Estudios posteriores de transcriptómica deberán elucidar este efecto. En cualquier caso, los resultados que se presentan en este trabajo ponen de manifiesto, por una parte, la importancia de la arquitectura de la proteína Hha en su interacción con H-NS, y por tanto, en su funcionalidad, y por otra, el papel regulador de la proteína Hha en condiciones de baja osmolaridad.

Es también importante destacar que la proteína YdgT expresada en el mismo vector que la proteína HhaC18I no afecta al crecimiento en condiciones de baja osmolaridad, con lo que cabe relacionar dicho efecto específicamente a propiedades intrínsecas del mutante HhaC18I y no sencillamente a la sustitución de la cisteína en posición 18 por una isoleucina.

4.2.- PAPEL DE LAS PROTEÍNA H-NS E YmoA EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN *Y. enterocolitica*

El descubrimiento de que las proteínas Hha-YmoA interaccionan con H-NS sugirió que H-NS debía jugar un importante papel modulador en *Y. enterocolitica*. Curiosamente, H-NS ha sido identificada en muchos microorganismos Gram-negativos como responsable de la modulación de diferentes genes u operones, pero no en el género *Yersinia*. Sin duda, el motivo radica en que las mutaciones en el gen *hns* de *Yersinia* son letales y, por tanto, mutaciones realizadas al azar para obtener fenotipos de desregulación de la expresión génica no se aíslan en este género. Esto no ocurre en muchos otros géneros, tales como *Escherichia*, *Salmonella* o *Shigella* (Sherrat, 2003). Tal y como se demostró en nuestro grupo de investigación (Rodríguez, 2005) y también en *Y. pseudotuberculosis* (Heroven *et al.*, 2004), el gen *hns* es esencial en *Yersinia*.

Una forma de intentar obtener un mutante cromosómico para el gen *hns* en la cepa W22703 de *Y. enterocolitica* consistió en tratar de complementar en *trans* la mutación con un gen que codificase una proteína diferente de H-NS (ya que, en otro caso, el fenotipo no podría distinguirse de una cepa *hns*⁺) pero que pudiese complementar al menos en parte su función. Por este motivo, se escogió el gen *stpA* de *E. coli* que codifica la proteína paróloga de H-NS, StpA, la cual puede al menos compensar en parte la carencia de H-NS (Shi y Bennett, 1994). Clonando el gen *stpA* en un plásmido pBR322 fue posible obtener una cepa de *Y. enterocolitica* portadora de una mutación *hns* cromosómica. Pero este experimento llevó a la aparición de un resultado inesperado: la expresión del gen *stpA* de *E. coli* en la cepa parental de *Y. enterocolitica* W22703 provoca alteraciones significativas en su fisiología celular. Estas alteraciones fisiológicas se pusieron de manifiesto en cultivos a 30° C y en condiciones de aerobiosis, donde la tasa de crecimiento de la cepa portadora del plásmido pBRStpA se reduce significativamente. Esto no sucede en otras bacterias pertenecientes a la familia de las *Enterobacteriaceae*, tales como *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TR5877, *Klebsiella pneumoniae* C3, *E. coli* 5K y *Proteus mirabilis* TT170. Estos resultados nos llevaron a analizar el efecto de la presencia del plásmido pBRStpA en otras condiciones de cultivo, como anaerobiosis o crecimiento a 37° C. En ambos casos, la presencia de este plásmido causó a la inhibición del crecimiento. Como consecuencia del efecto del plásmido pBRStpA observado sobre el crecimiento de la cepa W22703 en

condiciones anaeróbicas y en presencia de glucosa decidimos analizar la utilización de la glucosa por esta cepa. Parece claro que esta cepa no utiliza la glucosa de forma similar a otras bacterias entéricas: a 25° C no parece ayudar a su crecimiento y, lo que es más destacable, a 37° C lo inhibe. Si ésta es una característica propia de esta cepa o lo es del género *Yersinia* deberá ser investigado posteriormente.

La comparación de los patrones de expresión proteica de las cepas W22703 y W22703 (pBRStpA) nos ayudó a entender el efecto de la proteína StpA en la fisiología de la cepa W22703 de *Y. enterocolitica*. Algunas de las proteínas afectadas por la expresión de la proteína StpA resultaron estar relacionadas con la virulencia, como la adhesina Ail (que pertenece a la familia OmpX) o el regulador RovA. Otras proteínas afectadas están relacionadas o bien con vías biosintéticas, como por ejemplo, la orotato fosforibosiltransferasa o el represor de la vía biosintética de la arginina, o con vías catabólicas centrales, como por ejemplo, los enzimas del ciclo de Krebs succinato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa. El hecho de que la expresión de la proteína StpA afecte a enzimas pertenecientes a vías metabólicas centrales puede justificar algunas de las alteraciones fisiológicas causadas por la expresión del gen *stpA* en la cepa W22703 y que afectan a su tasa de crecimiento en diferentes medios y condiciones de cultivo.

Es importante destacar que algunas de las proteínas identificadas en este trabajo cuya expresión se encuentra alterada por la presencia del plásmido pBRStpA pertenecen a familias de proteínas que ya han sido referenciadas por tener su expresión afectada por la proteína H-NS, bien en *E. coli* (OmpX y diferentes proteínas ribosómicas) (Hommais *et al.*, 2001) o en *Y. pseudotuberculosis* (RovA) (Heroven *et al.*, 2004). Adicionalmente, de las 16 proteínas afectadas por la presencia de StpA que pudieron ser identificadas en este trabajo, 10 han sido referenciadas por otros autores como afectadas en la transición de una temperatura de crecimiento de 25° C a 37° C en *Y. pestis* (Han *et al.*, 2004; Motin *et al.*, 2004). Cabría resaltar que el papel de la proteína H-NS como pieza de un mecanismo regulador de la expresión génica en función de la temperatura ha sido destacado recientemente (Ono *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, una hipótesis de trabajo es que la proteína H-NS participa de alguna forma de modulando la expresión de las proteínas que presentan expresión alterada en la cepa W22703 (pBRStpA).

Un aspecto clave de este problema lo plantea el hecho de que la expresión de los genes *hns* e *ymoA* se encuentre reprimida en presencia de pBRStpA. Teniendo en cuenta que la proteína StpA puede al menos parcialmente compensar para la pérdida de H-NS en *E. coli* (Sondén y Uhlin, 1996), los efectos de la presencia de la proteína StpA en *Y. enterocolitica* cabe considerarlos básicamente como debidos a una muy significativa represión de YmoA y a una represión parcial de H-NS (ya que StpA debería compensar en parte la falta de proteína H-NS). De hecho, la complementación al menos parcial de funciones de H-NS por StpA es demostrable por el hecho de que pueden aislarse fácilmente mutantes *hns* en presencia del plásmido pBRStpA y no en células libres de este plásmido. Por tanto, los severos defectos en la fisiología de la cepa W22703H están causados muy probablemente por la drástica disminución en los niveles de YmoA y por las alteraciones causadas debido a que StpA cubre sólo parcialmente los defectos de la pérdida de H-NS. Dada la semejanza en el patrón de expresión proteica entre el efecto de la presencia de StpA y la transición de una temperatura de crecimiento de 25° C a 37° C, y teniendo en cuenta que en *Y. pestis* los niveles de YmoA disminuyen a 37° C debido a un proceso proteolítico (Jackson *et al.*, 2004), una explicación a los efectos en el patrón de expresión de proteínas en esta transición de temperaturas en *Y. pestis* puede encontrarse en la disminución de los niveles de YmoA.

Un papel esencial de los niveles de YmoA en la fisiología de *Y. enterocolitica* también se pone de manifiesto cuando sobreexpresamos la proteína H-NS en lugar de la proteína StpA. Los efectos de la sobreexpresión de H-NS son equivalentes a los de la presencia del plásmido pBRStpA: reducción de la tasa de crecimiento, represión de la expresión de *ymoA* y alteración en la expresión de genes tales como *ail* o *galF*. Por tanto, el efecto del plásmido pBRStpA en *Y. enterocolitica* cabe atribuirlo a que la expresión ectópica de StpA equivale a un incremento en la concentración intracelular de H-NS.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el complejo H-NS-YmoA juega un papel esencial en la modulación de la expresión génica en *Yersinia*. Los niveles de H-NS se muestran bastante constantes, al menos bajo las condiciones de crecimiento utilizadas en este trabajo. Niveles variables de YmoA o una capacidad reducida de YmoA de interactuar con H-NS influirían en la capacidad y/o eficiencia

de esta última reprimiendo bloques de genes específicos. Al menos en *Y. pestis*, un procesamiento proteolítico de YmoA a 37° C provocaría niveles reducidos de YmoA, lo que modificaría las propiedades moduladoras de H-NS. La modulación por proteólisis ha sido considerada como una estrategia desarrollada para proporcionar a la célula bacteriana una respuesta muy rápida a estímulos específicos (Jenal y Hengge-Aronis, 2003). Por tanto, una respuesta reduciendo los niveles de YmoA por proteólisis podría facilitar la adaptación de diferentes cepas de *Yersinia* a la transición de temperatura que sufren cuando entran o dejan el hospedador. Asimismo, condiciones que provoquen un incremento en los niveles de H-NS (condiciones de estrés) tendrían como consecuencia la represión de YmoA y alteraciones significativas en la fisiología celular.

Tal y como se menciona en la introducción (apartados 1.4.3.2. y 1.4.3.3.), diferentes autores sugieren que, además de la proteína YmoA, la topología del ADN está implicada en la regulación de genes que codifican para factores de virulencia, como los genes *yop* (Rohde *et al.*, 1994; 1999). De hecho, hipotetizan que una proteína asociada al nucleóide estaría directamente implicada en la regulación de los genes *virF* y *yop*. Una hipotética regulación de la expresión génica llevada a cabo por el complejo YmoA-H-NS tanto del gen *virF* como de los genes *yop* explicaría los resultados existentes hasta la actualidad. Es importante tener en cuenta que los sistemas reprimidos por Hha-H-NS también lo son parcialmente por H-NS en ausencia de Hha (Nieto *et al.*, 2000). A 25° C., el complejo YmoA-H-NS reprime tanto *virF* como los genes *yop*. Una mutación en el gen *ymoA* provoca una desrepresión parcial de *virF*, lo que llevaría a una inducción parcial de los genes *yop*, todavía reprimidos por H-NS. Alternativamente, cambios en la topología del ADN a 25° C inducidos por ciertas concentraciones de novobiocina impiden que el complejo H-NS-YmoA reprima los genes *yop* (simulando la situación de 37° C). Por tanto, el nexo entre la proteína YmoA y la topología del ADN es la proteína H-NS, tal y como Rohde y colaboradores postularon (Rohde *et al.*, 1994; 1999).

Un papel central de las proteínas H-NS e YmoA en procesos fisiológicos de adaptación a la temperatura justificaría la letalidad de mutaciones en ambos genes, tal y como también ha sido descrita para mutaciones *ymoA* en algunas cepas de *Yersinia* (Ellison *et al.*, 2003).

En función de los resultados obtenidos, parece razonable que no pudiésemos aislar un mutante *hns* en ausencia del plásmido pBRStpA. A pesar de que para su posible selección se utilizaron medios en los que se aportaban factores de crecimiento, diferentes fuentes de carbono y energía y diferentes precursores biosintéticos, la compleja red metabólica que muy probablemente sufre alteraciones en mutantes *hns* de *Yersinia* hará muy difícil la manipulación de tales mutantes en condiciones de laboratorio.

Por lo que respecta a la cepa mutante *hns* W22703H, su fenotipo queda probablemente enmascarado por el propio efecto de la proteína StpA sobre el gen *ymoA*. En esta cepa, los niveles de StpA aumentan en relación a la cepa salvaje W22703 debido a la desaparición total de H-NS. Este fenotipo ya ha sido descrito en otros mutantes *hns* (Sonnenfield *et al.*, 2001). Los otros tres genes que exhiben expresión diferencial en la cepa W22703H corresponden a proteínas con función diferente (transporte, biosíntesis y plegamiento de proteínas). Probablemente en estos genes la proteína StpA no puede reemplazar completamente el defecto en H-NS y, por tanto, su expresión se ve modificada en la cepa W22703H.