

4. DISCUSIÓN

4.1 YfeR, UNA NUEVA PROTEÍNA LysR QUE SE INDUCE EN FUNCIÓN DE LA OSMOLARIDAD DEL MEDIO

Uno de los resultados del presente trabajo que aparece concluyente es el hecho de que el gen *yfeR* de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium codifica para una proteína de la familia LysR. Los argumentos en este sentido son los siguientes: (i) la búsqueda de homologías, indicando un 51% y un 47% de similitud con las proteínas OxyR y CynR de *E. coli* respectivamente (ambas miembros de la familia LysR); (ii) la presencia en el extremo amino-terminal, de un dominio HTH (“helix-turn-helix”) de unión al ADN; (iii) el tamaño, tanto por lo que hace referencia a su cadena aminoacídica (308 residuos, considerando que muchas proteínas LysR presentan 300+/- 20 AAs), como por su masa molecular estimada (33.980 Da); y (iv) una relación Lys/Arg anómala (Viale *et al.*, 1991), el cociente Lys/Lys+Arg es de 0,19 para YfeR mientras que para las proteínas de *E. coli* es, de media, 0,46.

Es importante resaltar que la familia LysR, ya contaba con 50 miembros cuando fue descrita por Henikoff *et al.* (1988), siendo hoy día uno de los reguladores transcripcionales más común en procariotas. La proteína YfeR aparece ampliamente distribuida en el mundo procariota, ya que presenta homología de un 49% y 55%, respectivamente, con las proteínas codificadas por los genes SC06555 de *Streptomyces coelicolor* y RS00708 de *Ralstonia solanacearum*, especies muy distantes filogenéticamente de las proteobacterias.

Dentro de la gran variedad de ejemplos, los reguladores transcripcionales LysR responden a dos grandes grupos de estímulos. Una parte de ellos responde a estímulos nutricionales, ya sea el catabolismo de diversos sustratos (Neidle *et al.*, 1989; Von Lintig *et al.*, 1991; Seeger *et al.*, 1995; Jourlin-Castelli *et al.*, 2000) o la biosíntesis de aminoácidos (Stragier *et al.*, 1983; Wek y Hatfield, 1986; Plamann y Stauffer, 1987; Otrowsky *et al.*, 1987; Guillouard *et al.*, 2002). En un segundo grupo podríamos considerar los reguladores LysR que responden directamente a estímulos ambientales, tales como situaciones de estrés (Christman *et al.*, 1989; Fang *et al.*, 2000; Toesca *et al.*, 2001; Domenech *et al.*, 2001), quórum sensing (Cao *et al.*, 2001; Sperandio *et al.*, 2002; Kim *et*

al., 2004), o indirectamente a través de la proteína H-NS (Ko y Park, 2000). Es aparente que YfeR se incluye dentro de la categoría de reguladores LysR que responden a estímulos ambientales. En función de la bibliografía existente hasta ahora, además de YfeR solamente existe otro regulador LysR reprimido por estrés osmótico: se trata del regulador RbcR1 de *Anabaena* (Mori *et al.*, 2002).

Si se analizan los genes regulados, podríamos considerar que la mayoría de reguladores LysR regulan de forma específica la transcripción de un determinado gen u operón, que presenta en su región promotora secuencias específicas de unión. En muchos de los modelos estudiados, el gen que codifica para la proteína tipo LysR, se encuentra adyacente al gen u operón que regula y se transcribe de forma divergente, teniendo, en ocasiones, sus promotores solapados. Sin embargo, se han descrito también proteínas tipo LysR que presentan un rango de acción mucho más amplio y controlan la expresión de un conjunto de genes u operones distribuidos por todo el cromosoma de la bacteria y relacionados con una misma función. Este es el caso de la proteína OxyR, un regulador positivo de la transcripción de genes inducibles por estrés oxidativo en *E.coli* y *Salmonella enterica* (Christman *et al.*, 1989). En estos casos las proteínas LysR, más que ser reguladores específicos locales, cumplen una función de regulador global. Otro ejemplo es la proteína LrhA de *E. coli*, implicada en una red de regulación que afecta a RpoS (Gibson y Silhavy, 1999), y también en la regulación de la biosíntesis del flagelo, actuando a nivel del regulón *flhDC* (Lehnen *et al.*, 2002). En función de los resultados obtenidos en este trabajo y que se discuten más adelante, YfeR se presenta como una proteína implicada en una red de regulación global. Además, recientemente se está poniendo de manifiesto que algunas proteínas tipo LysR que habían sido caracterizadas como reguladores del gen adyacente, intervienen también como factores de transcripción de otros genes y están implicadas en redes regulatorias más extensas. Un ejemplo lo constituye NhaR que, en respuesta al Na⁺, es un regulador positivo de la expresión del gen adyacente *nhaA* que codifica para un antiporter de Na⁺ (Rahav-Manor *et al.*, 1992) y a su vez participa en la inducción del gen *osmC* que responde a distintos tipos de estrés ambiental (Toesca *et al.*, 2001; Sturny *et al.*, 2003).

4.1.1 UNIÓN DE YFER A SECUENCIAS ADYACENTES. AUTORREGULACIÓN. PAPEL DE YFER EN LA REGULACIÓN DE *yfeH*

Una de las características de las proteínas LysR es que sus secuencias dianas de reconocimiento en el ADN, en muchos casos, están localizadas en la región intergénica entre el propio gen que las codifica y el gen regulado adyacente que se transcribe de forma divergente. Este hecho, mediante un control bidireccional de la transcripción, conduce tanto a un proceso de autoregulación de la propia proteína LysR como de regulación del gen adyacente (Beck y Warren, 1988; Schell, 1993; Rhee *et al.*, 1999). Es importante resaltar que si bien normalmente la activación de la transcripción del gen regulado requiere la presencia de un metabolito de bajo peso molecular (coinductor) que, interaccionando con el regulador altera la conformación del complejo regulador-ADN aumentando, generalmente, la afinidad de la ARN polimerasa, este coinductor no es necesario para la unión de la proteína tipo LysR a su secuencia de reconocimiento en el ADN (Carmel *et al.*, 1997; Rhee *et al.*, 1998).

Por lo que hace referencia a la proteína YfeR, se pudo detectar una hipotética secuencia diana para proteínas LysR en la región intergénica entre los genes *yfeR* y *yfeH*, y sobreexpresando la proteína YfeR queda demostrada su capacidad de unión a dicha región. Sin embargo, los estudios llevados a cabo en el presente trabajo no indican que YfeR regule el gen adyacente *yfeH*. Estudios iniciales llevados a cabo analizando la expresión de una fusión *yfeH::lacZ* en la cepa YFER (*yfeR::MudJ*) no mostraron alteraciones en la transcripción de *yfeH*, en comparación con la cepa parental TT1704. Ante la posibilidad de que la inserción del fago MudJ en la región promotora de *yfeR* posibilitase un cierto nivel de transcripción del gen, enmascarando esto un posible efecto sobre *yfeH*, se decidió obtener un nuevo mutante *yfeR* en el que se delecionase la mayor parte de su secuencia. La utilización de esta nueva cepa mutante (YFER2) para analizar la expresión de *yfeH* proporcionó resultados idénticos a los obtenidos con el mutante YFER: en las condiciones utilizadas en el laboratorio, la expresión de *yfeH* es independiente de YfeR. Teniendo en cuenta que en muchos casos las proteínas tipo LysR requieren de un coinductor para modular la expresión del gen que regulan, no podemos descartar que, para ejercer su función reguladora sobre *yfeH*, *yfeR* requiera de la interacción de un coinductor, no presente en las condiciones en las que se obtuvieron los cultivos. No obstante, el hecho de que la regulación de *yfeR* (sensible a la osmolaridad) e *yfeH* (insensible a la

osmolaridad, inducción en fase estacionaria) siguen patrones diferentes, refuerza la hipótesis de que YfeR no regula el gen adyacente *yfeH*.

4.2 EL GEN *yfeH*. REGULACIÓN Y FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA YfeH

La secuenciación del gen *yfeR* y la confirmación de que codificaba para una proteína de la familia LysR planteó el análisis de las secuencias adyacentes, lo que llevó a la identificación del gen *yfeH*. La búsqueda de homologías asocian este gen de *S. Typhimurium* con una hipotética citocromo oxidasa de *E. coli* (YFEH) o con proteínas de membrana de otras bacterias Gram negativas. La proteína YfeH también presenta homología de un 66% con las proteínas codificadas por los genes SC0556 y RS00712 *Streptomyces coelicolor* y *Ralstonia solanacearum*, respectivamente, conservando además la estructura divergente de los genes *yfeR* y *yfeH*. Posteriores estudios bioinformáticos, realizando una búsqueda de dominios estructurales, asignaron a la proteína YfeH tres hipotéticos dominios, relacionados respectivamente con los presentes en proteínas cotransportadoras de Na⁺ y ácidos biliares, en proteínas transportadoras dependientes de Na⁺ y en proteínas transmembrana implicadas en la resistencia a compuestos de arsénico (Hagenbuch *et al.*, 1991; Bobrowicz *et al.*, 1997). Tanto estos resultados como el hecho de que YfeH presente 9 hélices transmembrana según el programa TMHMM (Krogh *et al.*, 2001), apoyan la hipótesis de que el gen *yfeH* codifica para una proteína asociada a las envueltas celulares de *S. Typhimurium*.

Una vez identificado el gen *yfeH*, conociendo la osmoregulación de *yfeR* y no disponiendo todavía de la información correspondiente a la independencia de la expresión de *yfeH* de *yfeR*, se planteó inicialmente que *yfeH* seguiría un patrón de regulación similar a *yfeR*, y que su expresión sería osmosensible. De forma inesperada pudo ponerse de manifiesto que la expresión de *yfeH* no responde a la osmolaridad del medio, sino a la fase de cultivo, induciéndose en fase estacionaria, incluso en condiciones de elevada osmolaridad. Si bien la inducción de muchos genes de fase estacionaria es dependiente en bacterias entéricas del producto del gen *rpoS*, éste no parece ser el caso de *yfeH*, ya que el mismo se induce en una cepa *rpoS*⁻. YfeH parece en efecto una proteína que no se sintetiza

cuando las células se encuentran en una fase activa de crecimiento. Utilizando fusiones génicas, solamente se detecta una expresión basal en fase exponencial, incrementándose la transcripción de *yfeH* entre 40 y 80 veces en fase estacionaria.

Asumiendo que sólo se detecta una expresión significativa en fase estacionaria, en este trabajo se han encontrado también otros dos factores que influyen la expresión de *yfeH*: el pH, inhibiendo el pH ácido la expresión del gen, y la limitación de fósforo, incrementándose la transcripción de *yfeH* en condiciones de limitación de fósforo. Estos últimos resultados están en concordancia con la homología que YfeH presenta con una proteína que se induce tras un crecimiento con limitación de fósforo (Kragelund *et al.*, 1997), y apoyan la hipótesis de que YfeH se induce en fase estacionaria para facilitar el transporte de determinados metabolitos.

Las diferentes aproximaciones experimentales que realizamos en este trabajo no han permitido asociar un fenotipo a los mutantes *yfeH*. Comparados con la cepa parental, tales mutantes no presentan alteraciones en la viabilidad, en la supervivencia en fase estacionaria o en la capacidad de reiniciar el crecimiento. Asimismo, tampoco parecen tener una sensibilidad diferencial a compuestos antimicrobianos, sales biliares o derivados del arsénico. Razones para ello pueden ser el que no hayamos podido reproducir en el laboratorio condiciones en la mutación *yfeH* juegue un papel esencial, o bien que la proteína YfeH es parte de un sistema que mejora el transporte de metabolitos en fase estacionaria, siendo la pérdida de su función cubierta por otras proteínas, y no causando un fenotipo detectable en el cultivo en laboratorio.

4.2.1 OSMOREGULACIÓN E INDUCCIÓN EN FASE ESTACIONARIA

La caracterización del sistema *yfeR-yfeH* en *S. typhimurium* plantea aparentemente dos estrategias diferentes de regulación para los dos genes: influencia de la osmolaridad o de la fase estacionaria. Es importante resaltar aquí que, en *E. coli*, existe un grupo de genes que se induce en fase estacionaria y, al mismo tiempo, su expresión es sensible a la osmolaridad, como sucede con *osmY* (Lange *et al.*, 1993; Hengge-Aronis, 1993; Hengge-Aronis *et al.*, 1993). Diferencias importantes con el sistema *yfeR-yfeH* son el hecho de que RpoS sea requerido para la inducción de tales genes (en este trabajo demostramos que éste

no es el caso para *yfeH*), y que la osmoregulación implica inducción a elevada osmolaridad, y no represión (como es el caso de *yfeR*). También es importante resaltar que en el caso de la proteína YfeR cuantitativamente la osmoregulación parece ser el mecanismo más importante, pero también existe una ligera inducción en fase estacionaria. La falta de conexión entre la regulación entre *yfeR* e *yfeH* podría interpretarse como resultante de una divergencia evolutiva, partiendo ambos genes de un sistema común regulado por osmolaridad y por fase estacionaria, al igual que *osmY*, habiéndose posteriormente separado la interacción entre ambos productos génicos y, por tanto, la interacción a nivel de regulación.

Otro aspecto relevante es el hecho de que para *osmY*, los moduladores Lrp, CRP e IHF juegan un papel importante en su regulación (Lange *et al.*, 1993). El regulador global Lrp está implicado en la regulación de diferentes genes de inducción en fase estacionaria, como *osmC*, *osmY*, *otsA*, *otsB*, *dps*, *fbaB*, etc. (Tani *et al.*, 2002). Tal y como se discute en el siguiente apartado, en este trabajo hemos encontrado una relación entre los niveles de Lrp y de YfeR. Aunque probablemente no existe una relación directa entre el sistema *yfeR-yfeH* de *S. Typhimurium* y el grupo de genes osmoregulados e inducible en fase estacionaria en *E. coli*, es muy probable que compartan algún regulador común a procesos similares, como podría ser la proteína Lrp.

4.3 LA PROTEÍNA YfeR INTEGRADA EN UNA RED DE REGULACIÓN GLOBAL EN *S. Typhimurium*

Tanto la diferencia en los patrones de regulación de los genes *yfeR* e *yfeH*, como la independencia de la expresión de *yfeH* de *yfeR* sugirieron que éste último gen estuviese implicado en la regulación de genes diferentes a *yfeH*. El análisis del proteinograma en dos dimensiones de extractos crudos de las cepas TT1704 e YFER2 confirma esta hipótesis. Existen diferentes proteínas mostrando una expresión diferencial entre ambas cepas. De ellas, dos pudieron ser identificadas por análisis MALDI-TOF y CUT-OFF: corresponden a las proteínas IbpA y Lrp.

IbpA, junto con IbpB, son proteínas de 16 kDa implicadas en la respuesta al choque térmico (Allen *et al.*, 1992). Ambas parecen parte del mismo regulón, dependiendo inicialmente para su expresión del producto del gen *rpoH* (Allen *et al.*, 1992; Chuang *et al.*, 1993). Además de estar implicadas en la respuesta al choque térmico, también parecen estar implicadas en la respuesta al estrés oxidativo (Kitagawa *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la expresión de IbpA es dependiente de YfeR. Tanto el análisis proteómico como el análisis transcripcional por RT-PCR sugieren que YfeR modula positivamente la expresión de IbpA, relacionando por tanto a YfeR con la respuesta al estrés térmico y oxidativo.

Por otra parte, la proteína Lrp es conocida como un modulador global implicado en la inducción de genes requeridos después de una alteración nutricional como genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos, así como en la represión de genes que ya no se requieren en esas condiciones, por ejemplo genes implicados en el transporte de aminoácidos (revisado en Calvo y Matthews, 1994). Adicionalmente a estos estímulos, Lrp también parece implicado en la regulación de genes que se inducen en fase estacionaria y en respuesta a cambios ambientales. En este punto, es esencial comentar que un estudio reciente de análisis global del patrón de expresión génica en fondos genéticos *lrp⁻* y *lrp⁺* muestra a IbpA como una de las proteínas que se inducen en mutantes *lrp* (Hung *et al.*, 2002). Aunque no existen más evidencias experimentales de esta interacción, tanto los datos de nuestro trabajo como los anteriormente referidos establecen una relación entre YfeR, Lrp e IbpA (ver más adelante el modelo que se propone, fig. 4.3.1). A nivel de los resultados presentados en este trabajo el único aspecto discordante es que, mientras que los niveles de proteína Lrp se incrementan en un fondo genético *yfeR* (lo cual concuerda con el modelo), los ensayos de RT-PCR no muestran un aumento de la transcripción del gen *lrp* en un mutante *yfeR*, aun cuando no es descartable que ello sea debido a un problema de la técnica. Hasta este punto, la proteína YfeR aparecería como un intermediario en respuestas de estrés ambiental, induciendo directa o indirectamente a IbpA. Como la proteína Lrp aparece como un represor de IbpA, el efecto de YfeR podría ser reprimiendo a Lrp. Curiosamente, tanto los genes *lrp* como *ibpA* presentan secuencias de unión a proteínas de la familia LysR.

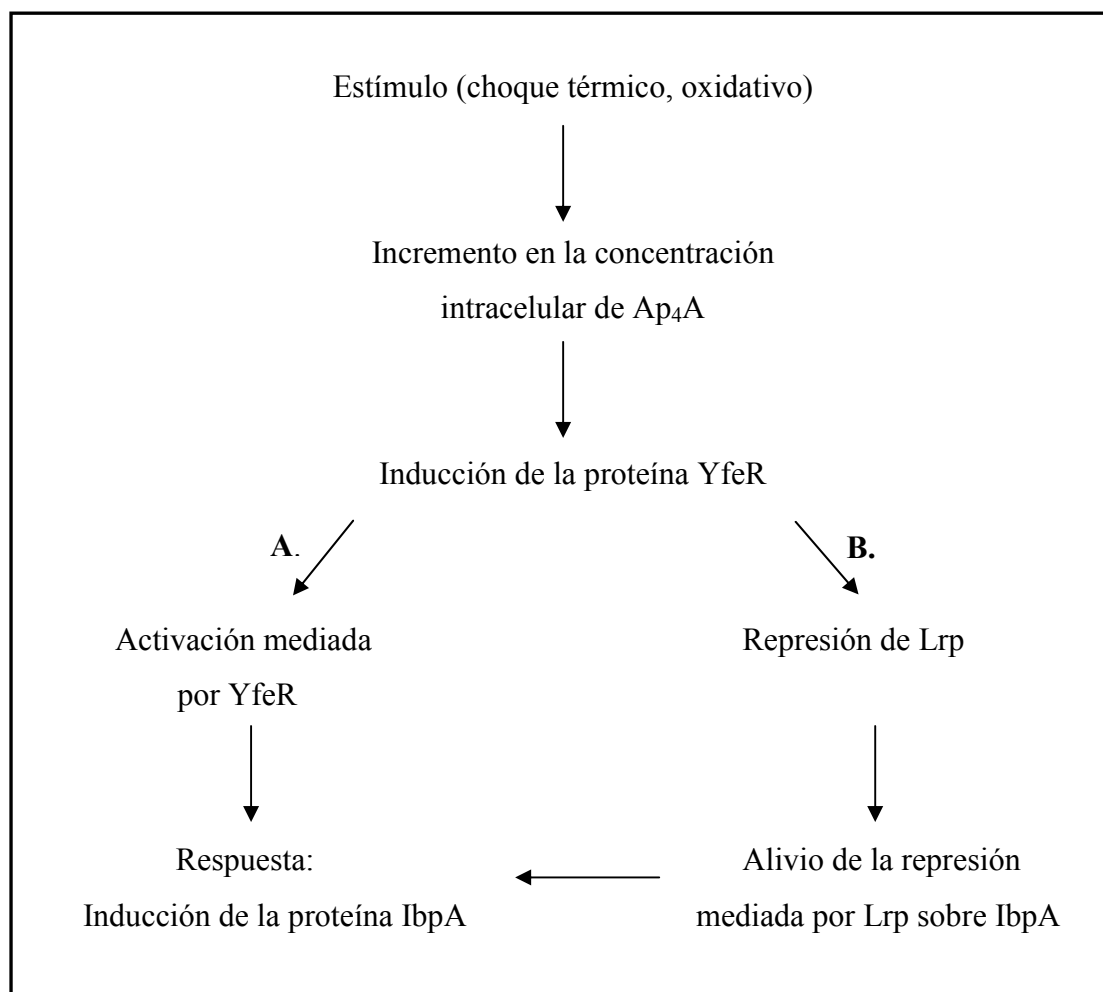


Fig 4.3.1. Inducción de la síntesis de la proteína IbpA como respuesta a diferentes tipos de estrés ambiental. **A** y **B** representan dos posibles vías, no excluyentes entre sí.

Posiblemente un eslabón esencial en la cadena de regulación que implica a YfeR es la proteína YgdP. La actividad de este enzima es la hidrólisis de tetra, penta y hexafosfatos de diadenosina (Bessman *et al.*, 2001). En *Salmonella enterica* serovar Typhimurium existen dos hidrolasas de dinucleósidos polifosfatos: YgdP y ApaH. Este último enzima está relacionado con la familia de fosfatos serina/treonina, y su delección incrementa la concentración intracelular de Ap_xN de 10 a 100 veces (Ismail *et al.*, 2003). Por lo que respecta a YgdP, este enzima pertenece a la familia de hidrolasas Nudix. Este tipo de enzimas son comunes en organismos eucariotas (Conyers y Bessman, 1999; Cartwright y McLennan, 1999). En procariotas, la primera descrita fue la proteína IalA, codificada por el gen *ialA* de *Bartonella bacilliformis* e implicada en su patogénesis (Conyers y Bessman, 1999; Cartwright y McLennan, 1999). El gen *ygdP* de *E.coli* codifica para otro miembro de la familia Nudix y ha sido asociado con la capacidad invasiva de este patógeno (Badger *et al.*, 2000). Ismail *et al.* (2003) describen el homólogo de *ygdP* en *Salmonella enterica*

serovar Typhimurium, demostrando el incremento en la concentración intracelular de Ap_xN en los mutantes *ygdP* y sugiriendo que este incremento en el nivel de Ap_xN intracelular sería el responsable de la pérdida de su capacidad de invasión.

Tanto los trabajos de Eva Urós (2003, máster experimental) como los que se presentan en este trabajo relacionan a los genes *ygdP* e *yfeR*. La acumulación de Ap₄A como consecuencia de una mutación en el gen *ygdP* (Bessman *et al.*, 2001) ha sido asociada a la pérdida de la capacidad de invasión de células eucariotas por *S. Typhimurium*. Asimismo, la acumulación de Ap₄N se ha asociado también al estrés térmico y oxidativo, al igual que IbpA, (Lee *et al.*, 1983; Johnstone y Farr, 1991). Si bien un mecanismo de acción de Ap₄A parece ser la unión directa a proteínas de los choques térmico y oxidativo tales como DnaK, GroEL, E89, C45 y C40 (Johnstone y Farr, 1991), los resultados presentados en esta memoria sugieren que YfeR también actúa como un intermediario en situaciones de acúmulo de Ap₄A, induciendo, entre otros, el sistema IbpA. También es importante resaltar que no existe información acerca de la regulación del gen *ygdP*. En este trabajo, el constatar la relación entre la mutación *ygdP* y la expresión de la proteína YfeR, y teniendo en cuenta que ésta se encuentra osmoregulada, ello nos indujo a estudiar la osmoregulación de *ygdP*. Los estudios de transcripción pusieron de manifiesto que, tal y como se podía hipotetizar, *ygdP* se reprime a baja osmolaridad. Es interesante mencionar aquí el ejemplo del regulador LeuO, que pertenece a la familia LysR. Bajo condiciones de estrés su expresión depende de ppGpp. La expresión de *leuO* se ha asociado a fase estacionaria y a condiciones de estrés nutricional (Fang y Wu, 1998). El descenso en la tasa de crecimiento en estas condiciones de estrés lleva a un incremento en los niveles de ppGpp (Landgraf, *et al.*, 1996). Fang *et al.* (2000) indican que ppGpp es la señal de estrés que induce la expresión de *leuO* cuando las células entran en fase estacionaria, sugiriendo que esta acción es indirecta vía el incremento de los niveles de Lrp en respuesta a un incremento de ppGpp debido a un descenso en la tasa de crecimiento. Aún cuando parecen dos sistemas diferentes, es interesante el paralelismo de la inducción de *leuO* por ppGpp y de *yfeR* por Ap_xN. Además, en ambos sistemas la proteína Lrp parece jugar también un papel intermediario. .

Un nexa adicional que refuerza la interacción entre las proteínas YgdP, YfeR y Lrp lo constituyen los resultados encontrados en este trabajo que muestran que las proteínas flagelares FliC y FljB, cuya expresión es dependiente de cambio de fase en *S.*

typhimurium, se ven alteradas en mutantes *ygdP*, *yfeR ygdP* y *lrp*. La expresión de ambas flagelinas está sometida a un complejo sistema de regulación, en el que parecen participar YgdP, YfeR y también Lrp. En la figura 4.3.2 se presenta un modelo que permite explicar la interacción de las tres. Esta sería la primera descripción de la participación de las tres proteínas en la regulación de la expresión de las flagelinas en *S. Typhimurium*. No obstante, la participación de Lrp en la regulación de la flagelina FliC de *Proteus mirabilis* ha sido sugerida previamente (Hay *et al.*, 1997), y también ha sido descrita la participación de un nuevo miembro de la familia LysR (HdfR) que hace de intermediario en la modulación que H-NS efectúa en la regulación del operón *flhDC*, que se encuentra situado al inicio de la cadena de regulación de los componentes del flagelo en *E. coli*.

1. En la cepa salvaje, predomina FliC. Las proteínas YfeR y Lrp reprimen *fljB*.
Expresión ocasional de *fljB* (cambio de fase).
 2. Un mutante *ygdP* incrementa los niveles de YfeR. Producción predominante de FliC. La expresión ocasional de *fljB* se reduce.
 3. Un mutante *ygdP yfeR*: incrementaría la producción de Lrp, pero por sí sola esta proteína reprime ineficientemente *fljB*. Por ello, aumenta FljB, existiendo niveles bajos de *fliC*.
 4. Un mutante *lrp*: en este caso YfeR es poco eficiente reprimiendo *fljB*.
Predomina FljB, pero hay niveles basales de FliC.
-

Fig. 4.3.2. Corregulación de la expresión de los genes *fliC* y *fljB* por YfeR y Lrp. Este modelo contempla la interacción entre YfeR y Lrp para reprimir conjuntamente *fljB*.