



Memoria del 47º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

## Efecto de las proteínas nucleoides en la transcripción de factores de virulencia en *Klebsiella pneumoniae*.

### Effect of the nucleoid proteins on the transcription of virulence factors in *Klebsiella pneumoniae*.

De la Cruz, Miguel A.<sup>1\*</sup>; Ares, Miguel A.<sup>1</sup> y Mejía-Ventura, Jazmín<sup>1</sup>.

1. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, UMAE Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

\* Correspondencia: Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores. Cuauhtémoc, CDMX, CP 06720, Tel. +52 (55) 5627-6900 Ext. 22408, [miguel\\_angel\\_81@live.com](mailto:miguel_angel_81@live.com)

#### Resumen

*K. pneumoniae* es un patógeno que infecta principalmente a pacientes inmunocomprometidos que son hospitalizados y sufren de enfermedades severas. Los factores de virulencia más importantes de *K. pneumoniae* son: la cápsula, los pilis, el lipolisacárido, las proteínas de membrana externa y los sideróforos. El genoma de las enterobacterias codifica para proteínas nucleoides, las cuales estructuran el DNA bacteriano y regulan la expresión transcripcional de diversos genes. H-NS, FIS, IHF y HU son proteínas asociadas al nucleóide que estructuran el genoma bacteriano y se han involucrado en la regulación de la expresión genética de diversos factores de virulencia en muchas bacterias patógenas. En este trabajo, nuestro grupo de investigación describió el efecto de H-NS, FIS, IHF y HU sobre la transcripción de los genes que codifican para la cápsula, los pilis, el lipolisacárido, las proteínas de membrana externa y los sideróforos de *K. pneumoniae*. Nuestros resultados muestran que estas proteínas nucleoides actúan como reguladores maestros que controlan la expresión de los factores de virulencia de *K. pneumoniae*.

**Palabras clave:** *Klebsiella pneumoniae*, proteínas asociadas al nucleóide, H-NS, FIS, IHS, HU.

#### Abstract

*K. pneumoniae* is a pathogen that mainly infects immunocompromised patients that are hospitalized and suffer from severe diseases. The most important virulence factors of *K. pneumoniae* are: the capsule, pilis, lipopolysaccharide, outer membrane proteins and siderophores. The genome of the enterobacteria encodes nucleoid proteins, which structure the bacterial DNA and regulate the transcriptional expression of many genes. H-NS, FIS, IHF and HU are nucleoid associated proteins that structure the bacterial genome and have been involved in the regulation of the genetic expression of various virulence factors in many pathogenic bacteria. In this work, our research group describes the effect of H-NS, FIS, IHF and HU on the transcription of the genes that code for the capsule, pilis, lipopolysaccharide, outer membrane proteins and siderophores of *K. pneumoniae*. Our results show that these nucleoid proteins act as master regulators that control the expression of virulence factors of *K. pneumoniae*.

**Key words:** *Klebsiella pneumoniae*, nucleoid associated proteins, H-NS, FIS, IHS, HU.

## Introducción

### *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, no móvil y capsulado perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, está presente de manera ubicua en el ambiente y es saprófito natural del tracto gastrointestinal y de la nasofaringe en humanos y animales [1]. *K. pneumoniae* es considerado uno de los patógenos oportunistas, el cual se asocia frecuentemente a infecciones del tracto urinario y a neumonía en personas sanas [2]. Sin embargo, en personas inmunocomprometidas puede ocasionar infección biliar, peritonitis, meningitis, septicemia y abscesos hepáticos [3]. Además, es una de las bacterias aisladas con mayor frecuencia de pacientes, tanto adultos como pediátricos, con infección nosocomial en diferentes regiones del mundo, incluyendo América Latina [4-6].

Una de las características más importantes de *K. pneumoniae* es su alta resistencia a los antibióticos, principalmente a los beta-lactámicos; esto debido principalmente a la producción de beta-lactamasas, las cuales hidrolizan a dichos antibióticos inhibiendo su actividad [7].

### Factores de virulencia de *K. pneumoniae*

Al ser un microorganismo oportunista, *K. pneumoniae* sólo puede dañar al hospedero cuando alcanza tejidos que normalmente son estériles o cuando afecta a pacientes inmunocomprometidos. Los principales factores implicados en la virulencia de *K. pneumoniae* son: el lipopolisacárido (LPS), los sideróforos, las proteínas de membrana externa, los pili y la cápsula; todos ellos le permiten a la bacteria entrar y multiplicarse en el hospedero [8,9].

La cápsula es un polisacárido compuesto principalmente por glucosa, galactosa, fucosa, manosa, ramnosa y ácidos urónicos [10]. Esta cápsula es importante para la bacteria ya que le permite evadir al sistema inmunológico impidiendo la fagocitosis [11]. La cápsula de *K. pneumoniae* le proporciona una alta resistencia a la desecación, así como protección frente a la fagocitosis mediada por los polimorfonucleares y macrófagos [12].

Los pili o fimbrias son estructuras filamentosas no flagelares que permiten la adherencia de la bacteria sobre superficies bióticas y abióticas. Los principales pili descritos en *K. pneumoniae* son: el pilus tipo 1, el pilus “*Escherichia coli* common

pilus” (ECP) y el pilus tipo 3 [13]. El pilus tipo 1 reconoce receptores de las superficies celulares que contienen manosa y está involucrado en la adherencia a las células del epitelio renal, considerándose indispensable para producir infección de vías urinarias. El pilus ECP está presente en todos los patotipos y cepas comensales de *E. coli* [14] y también está presente en *K. pneumoniae*, expresándose durante la formación de biopelículas y al contacto con células epiteliales HeLa [13]. El pilus tipo 3 en *K. pneumoniae* juega un papel importante en su patogenicidad, confiriendo adherencia a células eucariotas y durante la formación de biopelículas [13,15-17].

El LPS tiene actividad endotóxica debido al lípido A, que provoca la activación de los macrófagos e induce una respuesta inflamatoria con un efecto pirogénico. Por otro lado, las cadenas de polisacárido del antígeno “O” facilitan el proceso inicial de adherencia y confieren resistencia al microorganismo contra la actividad bactericida del suero [1].

Los sideróforos constituyen otro factor de virulencia en *K. pneumoniae* ya que son moléculas que le permiten captar hierro bajo condiciones limitantes de dicho metal en el hospedero, siendo el hierro un factor esencial para el crecimiento bacteriano, funcionando principalmente como catalizador de reacciones de óxido-reducción de proteínas que participan en transporte de electrones y oxígeno [1].

*K. pneumoniae* presenta tres principales proteínas de membrana externa (PME): OmpA, OmpK35 y OmpK36. La proteína OmpA es una de las PME mayoritarias en bacterias Gram negativas y en *K. pneumoniae* ayuda a la resistencia contra los péptidos catiónicos antimicrobianos y a la evasión de la fagocitosis mediada por macrófagos alveolares [18]. Las proteínas OmpK35 y OmpK36 constituyen las porinas de mayor importancia en *K. pneumoniae* a través de las cuales difunden moléculas hidrofílicas, tales como nutrientes, hacia el interior de la bacteria y son expulsadas hacia el exterior moléculas dañinas para la bacteria, como los antibióticos. Se ha demostrado que la ausencia de dichas porinas remodelan la superficie de *K. pneumoniae* e incrementan la adherencia de la bacteria a los macrófagos, lo que origina una mayor susceptibilidad a la fagocitosis [19].

### Proteínas asociadas al nucleóide

Las proteínas asociadas al nucleóide (NAPs, por sus siglas en inglés) se describieron inicialmente en el mantenimiento de la arquitectura del cromosoma y posteriormente en la regulación de diversos procesos del DNA bacteriano [20]. La mayoría de las NAPs poseen actividad de unión al DNA y una habilidad para alterar la trayectoria de la molécula de DNA ya sea doblándolo, envolviéndolo o puenteándolo. Además, muchas NAPs pueden influir en la transcripción de manera positiva o negativa. De las NAPs más estudiadas en enterobacterias se encuentran H-NS (Histone-like Nucleoid Structuring), FIS (Factor of Inversion Stimulation), IHF (Integration Host Factor) y HU (Histone-U93 strain).

#### H-NS

H-NS es una proteína de unión a DNA compuesta de 137 aminoácidos (~15 KDa) y de gran abundancia en las bacterias (~20,000 copias). Es una molécula que contiene un dominio de oligomerización en el extremo amino terminal y un dominio de unión a DNA en el extremo carboxilo terminal; ambos dominios se encuentran conectados por un enlazador flexible [21,22]. H-NS en solución forma dímeros que tienen la capacidad de formar puentes DNA-H-NS-DNA, ya sea entre moléculas de DNA separadas o entre diferentes regiones de la misma molécula de DNA; es considerado un regulador maestro que reprime la transcripción de un 5% al 12% del genoma en enterobacterias [23-25]. H-NS se une a secuencias ricas en A+T y puede formar sitios de nucleación que son de alta afinidad para la unión de la proteína H-NS, donde esta podría extenderse lateralmente en todo el DNA, formando estructuras tipo horquillas [26,27]. H-NS actúa como un silenciador de los genes adquiridos por transferencia horizontal, tales como las islas de patogenicidad, permitiéndoles ser incorporados dentro del genoma en un estado quiescente, evitando que su expresión descontrolada comprometa su viabilidad celular [21,28].

#### HU

La proteína HU tiene dos subunidades: HU $\alpha$  y HU $\beta$ . La forma funcional de HU es dimerica y el heterodímero  $\alpha\beta$  es la forma dominante [29]. Las interacciones HU-DNA parecen ser inespecíficas, pero esta proteína tiene una preferencia por la unión a regiones distorsionadas del DNA [30], como las curvas o las uniones de cuatro vías, siendo consistente con el papel de HU en la recombinación.

Las interacciones HU-DNA pueden dar lugar a curvaturas si actúan como dímeros individuales, pero cuando actúan de manera cooperativa en un modo de unión lado a lado, estabilizan la hélice del DNA en el nucleóide [31]. La participación de la proteína HU para modelar la topología del DNA demostró que desempeña un papel en la modulación de los perfiles de transcripción en *E. coli*, lo que tiene importante impacto en la fisiología celular [32]. La influencia de HU en *E. coli* incluyen la expresión de genes involucrados en respiración anaeróbica, respuestas celulares al estrés osmótico, al estrés ácido y la respuesta al daño del DNA [32-34]. En *Salmonella Typhimurium*, HU controla tres regulones que coordinan la virulencia, respuesta al estrés y fisiología general [35]. En *Helicobacter pylori*, la proteína HU está involucrada en la reparación por recombinación y es capaz de proteger al DNA contra el daño oxidativo [36].

#### IHF

La proteína IHF (factor de integración al hospedero, por sus siglas en inglés) es una proteína de unión al DNA con funciones en la organización estructural del DNA local, está conformada por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  codificadas en diferentes genes; las dos subunidades tienen aproximadamente un 35% de identidad entre sí [37]. La proteína IHF reconoce un sitio asimétrico específico en el DNA con una secuencia consenso de 13 pb WATCAANNNTTR, donde W representa A o T y R representa A o G [38]. Esta proteína participa en la regulación transcripcional en bacterias Gram negativas e inicialmente fue descrita como un cofactor en la recombinación de sitio específico del fago lambda [39]. La función principal de la proteína IHF es inducir curvas de hasta 180° sobre el DNA. La proteína IHF tiene algunas de las características de un factor de transcripción convencional, siendo capaz de reclutar a la RNA polimerasa hacia los promotores blanco. Además de su actividad de doblado del DNA, puede influir en la transcripción facilitando el contacto entre las proteínas reguladoras y la RNA polimerasa [40]. La proteína IHF de *S. Typhimurium* y *Vibrio cholerae* regulan la expresión de proteínas de la fase estacionaria y genes de virulencia [41,42]. En *E. coli* la proteína IHF activa la expresión de un conjunto específico de genes necesarios para la resistencia a ácido [43].

#### FIS

La proteína FIS (factor de estimulación para la inversión, por sus siglas en inglés) es una pequeña proteína de unión al DNA que consiste en cuatro

hélices  $\alpha$  que existen como homodímeros en solución [44,45]. La proteína FIS no es esencial para la supervivencia bacteriana pero es un regulador global de la expresión genética en muchas bacterias Gram negativas [46]. FIS fue originalmente identificado como un factor requerido para estimular las reacciones de inversión de DNA específicas del sitio mediada por la familia de recombinasas de DNA Hin, Gin y Cin [47], y está involucrada en muchos de los aspectos fundamentales de la vida de la célula, tales como el inicio de la replicación del DNA cromosómico. Se sabe que FIS tiene un sitio de unión específico en las posiciones 206 a 221 dentro del OriC de *E. coli*; la unión de FIS a este sitio resulta en un impedimento estérico para la unión de la proteína DnaA y por lo tanto representa un punto de control en el proceso de replicación [48]. La proteína FIS dobla el DNA causando inversiones y otros cambios en la topología y regula positivamente la transcripción a través del contacto con la subunidad  $\alpha$  de la RNA polimerasa [20,49]. La participación de FIS en el proceso de la transcripción ha sido descrita en *E. coli* donde FIS se une a una región de activación de secuencias arriba, contribuyendo a la actividad extremadamente alta del promotor *rrnB* P1 de *E. coli* [50]. En esta misma bacteria, FIS es un activador directo de muchos genes involucrados en la traducción y la motilidad flagelar [51]. En *Pasteurella multocida* FIS regula la expresión de varios factores de virulencia, incluidos los de la producción de cápsula [52]. En *Salmonella Typhimurium*, FIS participa en la patogenicidad de esta bacteria ya que regula 63 de los 94 genes de las islas de patogenicidad 1 y 2 [53].

## Material y métodos

### *Cepa bacteriana, líneas celulares y medios de cultivos*

Para este estudio se empleó la cepa de *K. pneumoniae* 123/01 [54]. Los cultivos bacterianos se realizaron en el medio Luria Bertani (LB) (DIFCO). Los medios de cultivo se suplementaron con antibióticos. La concentración final de los antibióticos utilizados fueron las siguientes: ampicilina a 200  $\mu\text{g/ml}$ , kanamicina a 50  $\mu\text{g/ml}$  y cloranfenicol a 30  $\mu\text{g/ml}$ .

### *Generación de mutantes nulas*

A partir de la cepa silvestre de *K. pneumoniae* se inactivaron los genes *hns*, *fis*, *himA*, *hupB*, presentes en el cromosoma bacteriano, reemplazando su secuencia nucleotídica por un gen de resistencia a kanamicina; dicho gen se generó por PCR,

utilizando oligonucleótidos que contienen ciertas secuencias homólogas de los genes a mutar. Debido a esto las secuencias permitieron la recombinación homóloga, mediante la recombinasa lambda-Red (pKD119), en las regiones flanqueantes a cada gen [55].

### *RT-PCR cuantitativa*

La extracción del RNA total se realizó utilizando el método del fenol ácido [56]. El DNA residual se eliminó usando DNasa TURBO (Ambion, Inc.) y la calidad del RNA se evaluó utilizando un NanoDrop (ND-1000; ThermoScientific) y un bionalizador Agilent 2100 con Picochip (Agilent Technologies). El cDNA se preparó con 1  $\mu\text{g}$  de RNA, hexámeros de "random primers" (0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) y M-MuLV-RT (20U/ $\mu\text{l}$ ). Se diseñaron oligonucleótidos específicos usando el software Primer3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) y son listados en la Tabla I. Para las reacciones qPCR se realizó la siguiente mezcla: 3.0  $\mu\text{l}$  de agua, 1.0  $\mu\text{l}$  (10  $\mu\text{M}$ ) de cada oligonucleótido, 10  $\mu\text{l}$  de Master Mix 2xSYBRGreen I y 5.0  $\mu\text{l}$  de cDNA (50–100 ng). Una placa de 96 pozos fue sellada y centrifugada a 1500 g. La reacción de amplificación fue realizada por triplicado para cada muestra usando las siguientes condiciones: desnaturalización (95°C/10min); amplificación y cuantificación repetida por 45 ciclos (95°C/10s, 57°C/20s, 72°C/30s con una fluorescencia sencilla); curva de desnaturalización (95°C/10s, 65°C/60s con fluorescencia continua a 97°C); y finalmente la etapa de enfriamiento a 4°C/10s. El rRNA 16S fue usado como gen de referencia para la normalización y la expresión relativa fue calculada usando el método de  $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$  [57].

**Tabla I. Lista de primers usados en este estudio**

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Referencia
<i>rrsH-5'</i>	CAG CCA CAC TGG AAC TGA GA	[54]
<i>rrsH-3'</i>	GTT AGC CGG TGC TTC TTC TG	[54]
<i>galF-5'</i>	CAA AGG CAA TTC CAA AGG AG	[54]
<i>galF-3'</i>	TGC GTC ACC AGA ACA ATC TC	[54]
<i>wzi-5'</i>	CAG GGG TTT GGT CAG ACA CA	[54]
<i>wzi-3'</i>	CGT TGA AGC GTG ATC CGT TG	[54]
<i>manC-5'</i>	AGC GGC ATG TTT ATG TTC CG	[54]
<i>manC-3'</i>	AAA TGT CAT GCG GGA TGC TG	[54]
<i>wzm-5'</i>	ACG CTG AAC CTG TTT TTC CG	[58]
<i>wzm-3'</i>	ATA CTC GCT AGC GGA TTG TAG G	[58]

<i>msbA</i> -5'	CGG TCT GTT CGT GAT GAT GTT C	[58]
<i>msbA</i> -3'	TTG CGA AAA CGC TTG GAG AC	[58]
<i>rfaD</i> -5'	AAG CGC TGA ATG ACA AAG GC	[58]
<i>rfaD</i> -3'	TGT AGT CAG CGA TGT TCA GGT C	[58]
<i>ompK35</i> -5'	AGC GAC GAT ACC ACC TAT GC	[58]
<i>ompK35</i> -3'	ACG CGT CCA TGT TGT ATT CC	[58]
<i>ompK36</i> -5'	CGG TAA AAT TGA CGG TCT GCA C	[58]
<i>ompK36</i> -3'	GTT GAT CTG GGT TTC GCC TTT C	[58]
<i>ompA</i> -5'	ACA CTC AGC TGA GCA ACA TG	[58]
<i>ompA</i> -3'	AGC TGC TGG TTG TAA GCT TC	[58]
<i>fhuA</i> -5'	TAT CGT CAG CAT GGT CAG CAA G	Este trabajo
<i>fhuA</i> -3'	AAA CGC CGG CAT CAT CAA TG	Este trabajo
<i>fes</i> -5'	TTA AGG ACA GGA AGC GAG GAG	Este trabajo
<i>fes</i> -3'	ACC AGA ACG TTA CCT CGA TGG	Este trabajo
<i>mrkA</i> -5'	CCA TGC AGC TGA TAC CAA TG	[54]
<i>mrkA</i> -3'	GCA GCC TGG CAG TTA GAG AC	[54]
<i>fimA</i> -3'	CTG GAT ACC GAT GCC GAT AC	[54]
<i>fimA</i> -5'	ACT GTT ACC ACC ACC GAA GC	[54]
<i>ecpA</i> -5'	ACC TCG CGT CTT ATC ACC AA	[54]
<i>ecpA</i> -3'	CCG CTG ATG ATG GAG AAA G	[54]

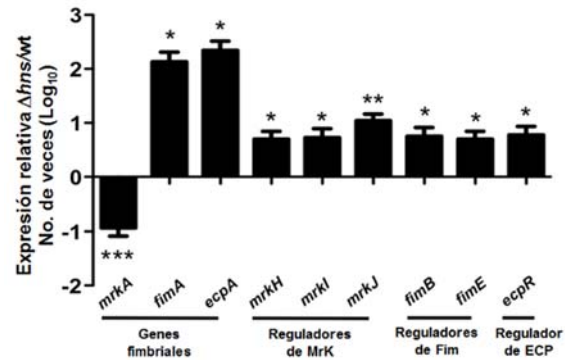
## Antecedentes

*H-NS* regula diferencialmente los genes que codifican para los pilis y la cápsula de *K. pneumoniae*.

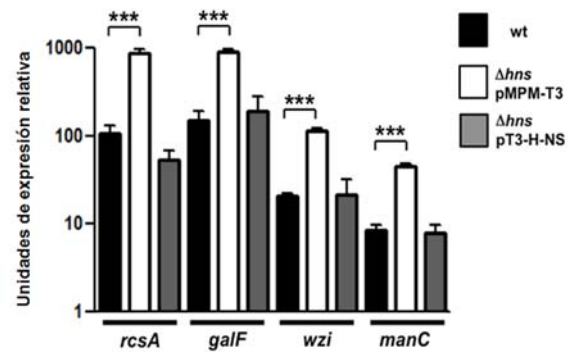
La expresión relativa de los genes implicados en la síntesis de los pili tipo 1, tipo 3 y ECP de *K. pneumoniae* fue previamente reportada por nuestro grupo de trabajo [54]. Los resultados transcripción se expresaron como un cociente que se obtuvo al dividir los valores de expresión de la cepa mutante  $\Delta hns$  entre los valores de la cepa silvestre. El gen *mrkA* disminuyó 10 veces su expresión, mientras que los genes *fimA* y *ecpA* incrementaron la expresión más de 100 veces en la cepa mutante  $\Delta hns$  con respecto a la cepa silvestre. Interesantemente, todos los genes reguladores incrementaron su expresión alrededor de 10 veces en la cepa mutante en el gen *hns* al comparar con la cepa silvestre (Figura 1).

Genéticamente, los genes que codifican para la cápsula se encuentran en los genes *cps*, el cual incluye tres unidades transcripcionales, siendo *galF*, *wzi* y *manC*, los primeros genes para cada promotor. Estos genes son activados por el regulador

transcripcional RcsA, que se encuentra codificado en el gen *rscA*. Tanto los genes capsulares, como el gen activador de estos, son desreprimidos entre seis y ocho veces en la ausencia de la proteína nucleóide H-NS [54]. La cepa complementada  $\Delta hns$  pT3-H-NS restableció el fenotipo de la cepa silvestre ya que ambas cepas presentaron niveles muy similares de expresión genética (Figura 2).



**Figura 1. Expresión relativa de los genes fimbriales de *K. pneumoniae*.** Análisis de la expresión genética de genes fimbriales y sus reguladores al dividir los niveles de expresión de la cepa mutante  $\Delta hns$  pMPM-T3 entre los de la cepa silvestre. Los niveles están expresados en el número de veces que se incrementa o disminuye la expresión genética en escala logarítmica de la cepa mutante  $\Delta hns$  con respecto a la cepa silvestre. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ : diferencias estadísticamente significativas con respecto a la cepa silvestre (figura tomada y modificada de la referencia 54).



**Figura 2. Expresión de genes involucrados en la síntesis de la cápsula de *K. pneumoniae*.** Unidades de expresión genética relativa en la cepa silvestre (wt), mutante en el gen *hns* ( $\Delta hns$  pMPM-T3) y mutante complementada ( $\Delta hns$  pT3-H-NS). Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes con la desviación estándar correspondiente. \*\*\* $p < 0.001$ : diferencia estadísticamente significativa con respecto a la cepa silvestre (wt) (figura tomada y modificada de la referencia 54).

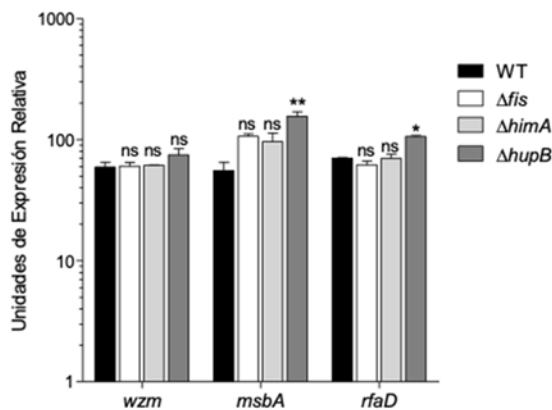
Con base en estos resultados nuestro grupo de investigación decidió analizar el efecto de H-NS sobre los otros factores de virulencia restantes: lipopolisacárido, proteínas de membrana externa y

sideróforos. Además, analizamos el efecto de otras NAPs como FIS, HU e IHF en la expresión transcripcional de los factores de virulencia de *K. pneumoniae*.

## Resultados

### Efecto de FIS, IHF y HU en la expresión de los genes involucrados en la síntesis del lipopolisacárido de *K. pneumoniae*

El análisis de la expresión genética del lipopolisacárido de *K. pneumoniae* se realizó para tres genes: *wzm* (involucrado en la síntesis del antígeno O), *msbA* (involucrado en la síntesis del lípido A) y *rfaD* (involucrado en la síntesis del “core”) (Figura 3). Los niveles de expresión genética del gen *msbA* aumentó 1.92, 1.74 y 2.81 veces en la mutante  $\Delta fis$ ,  $\Delta himA$  y  $\Delta hupB$ , respectivamente (Figura 3). El gen *rfaD* tuvo un ligero incremento de 1.51 veces con respecto a la cepa silvestre en la mutante  $\Delta hupB$  (Figura 3). De nota, el gen *wzm* no tuvo cambios significativos en ninguna de las 3 cepas mutantes analizadas.



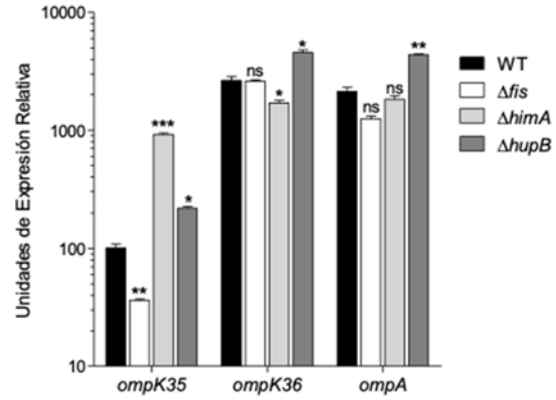
**Figura 3.** Expresión de genes involucrados en la síntesis del lipopolisacárido de *K. pneumoniae*. Unidades de expresión genética relativa en la cepa silvestre wt y mutantes  $\Delta fis$ ,  $\Delta himA$  y  $\Delta hupB$ . Los experimentos se realizaron por triplicado con la desviación estándar correspondiente. ns, no significante. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ : diferencias estadísticamente significativas con respecto a la cepa silvestre.

### Expresión de los genes involucrados en la síntesis de las proteínas de membrana externa y los sideróforos de *K. pneumoniae*

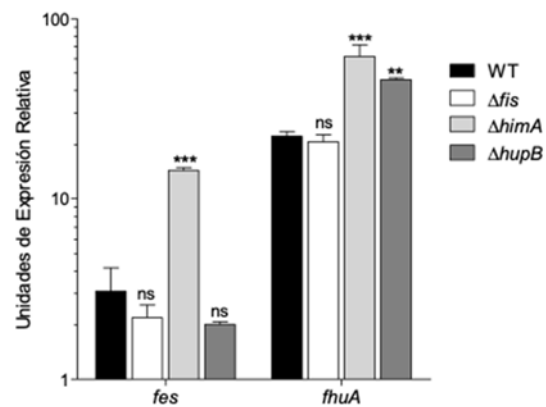
La expresión de los genes que codifican para las proteínas de membrana externa *ompK35*, *ompK36* y *ompA* se evaluó en la cepa silvestre y las mutantes  $\Delta fis$ ,  $\Delta himA$  y  $\Delta hupB$ . Para el gen *ompK35* se observó que su expresión disminuyó y aumentó tres y nueve veces, en la mutante  $\Delta fis$  y  $\Delta himA$ ,

respectivamente (Figura 4A). La transcripción del gen *ompK36* y *ompA* no presentó un cambio significativo en las mutantes de las NAPs (Figura 4A).

## A



## B



**Figura 4.** Expresión relativa de los genes que codifican para proteínas de membrana externa y sideróforos de *K. pneumoniae*. Análisis de la expresión genética de genes que codifican para PME y sideróforos, al dividir los niveles de expresión de las cepas mutantes  $\Delta fis$ ,  $\Delta himA$  y  $\Delta hupB$  entre los de la cepa silvestre. Los niveles están expresados en el número de veces que se incrementa o disminuye la expresión genética en escala logarítmica de la cepa mutantes  $\Delta fis$ ,  $\Delta himA$  y  $\Delta hupB$  con respecto a la cepa silvestre. ns, no significante. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ : diferencias estadísticamente significativas con respecto a la cepa silvestre.

Los resultados de expresión genética de los dos genes que codifican para los sideróforos enterobactina (*fes*) y ferricromo (*fhuA*) mostraron un incremento significativo en la mutante  $\Delta himA$ , mostrando una desrepresión de cuatro y dos veces, en los genes *fes* y *fhuA*, respectivamente, con respecto a la cepa silvestre (Figura 4B). No se presentaron cambios evidentes de la expresión genética de los genes *fes* y *fhuA* en las otras mutantes de genes nucleoides.

## Discusión

*K. pneumoniae* es una enterobacteria que en los últimos años ha alcanzado relevancia en el área de la salud pública, no solo porque es considerada uno de los patógenos oportunistas más importantes causantes de infecciones nosocomiales y un gran número de brotes intrahospitalarios, sino por su capacidad de multirresistencia hacia los antimicrobianos [6,9]. A comparación de otros patógenos intrahospitalarios como *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*, existen muy pocos reportes acerca de la regulación de la expresión genética de los factores de virulencia de *K. pneumoniae*. En este contexto, las NAPs poseen tanto funciones estructurales como regulatorias en bacterias. Las proteínas H-NS, FIS, IHF y HU son reguladores globales de la expresión de diversos genes incluyendo factores de virulencia de varios enteropatógenos [59]. Este estudio describe por primera vez el papel de las NAPs H-NS, FIS, IHF y HU en la expresión de factores de virulencia de *K. pneumoniae*.

La cápsula de *K. pneumoniae* es considerada su principal factor de virulencia, ya que cepas hipervirulentas de dicho microorganismo poseen grandes cantidades de polisacárido capsular, característica que les confiere un fenotipo de hipermucoviscosidad y alta resistencia a la fagocitosis [60,61]. En nuestro estudio, se observó que la cepa mutante  $\Delta hns$  fue hipermucoviscosa con respecto a la cepa silvestre y además dicha hipermucoviscosidad correlacionó con un incremento en la transcripción y la producción del ácido glucurónico capsular [54]. Con respecto a esto, Ebel y Trempey (1999) reportaron que la ausencia de H-NS causó también un fenotipo hipermucoviscoso en *E. coli* [62].

Se sabe que los pili bacterianos son relevantes para la adherencia a las células del hospedero, así como para la formación de biopelículas sobre superficies bióticas y abióticas. Previamente nuestro grupo reportó que los genes fimbriales *fimA* y *ecpA* se incrementaron en la ausencia de H-NS; en contraste, disminuyó la expresión del gen *mrkA* en la cepa mutante  $\Delta hns$  al compararla con la cepa silvestre. Algunos estudios previos han demostrado que la proteína H-NS reprime la expresión genética de las pilinas FimA y EcpA en *E. coli* y por lo tanto en la ausencia de dicha proteína reguladora se incrementa la expresión de los genes que codifican para tales pilinas [63,64]. Esto último concuerda con nuestros resultados en cuanto a la desrepresión en la cepa mutante  $\Delta hns$  de los genes *fimA* y *ecpA*, los

cuales codifican para el pilus tipo 1 y ECP, respectivamente.

La expresión de los genes *wzm* (involucrado en la síntesis del antígeno O), *msbA* (involucrado en la síntesis del lípido A) y *rfaD* (involucrado en la síntesis del “core”), implicados en la síntesis del lipopolisacárido de *K. pneumoniae*, se incrementó en la cepa  $\Delta hns$  con respecto a la cepa silvestre. Estos resultados coinciden con los observados en dos estudios previos en *E. coli*, en donde el gen *hns* fue mutado y los genes relacionados con el LPS fueron desreprimidos [25,65]. Las proteínas FIS, IHF y HU tuvieron un ligero efecto negativo sobre el gen *msbA*, mientras que el gen *wzm* no fue afectado por la ausencia de estas proteínas.

Al evaluar la expresión de los genes que codifican para las proteínas de la membrana externa de *K. pneumoniae* se observó una disminución considerable para el gen *ompK35* en la cepa mutante  $\Delta hns$  al comparar con la cepa silvestre. Por otro lado, los genes *ompK36* y *ompA* incrementaron significativamente su expresión en dicha cepa mutante con respecto a la cepa silvestre. Estos resultados concuerdan con observaciones previas reportadas en un estudio transcriptómico global por microarreglos para la cepa de *E. coli*, en el cual en la ausencia de H-NS se reprimió el gen *ompF*, homólogo a *ompK35* y se desreprimió el gen *ompC*, homólogo a *ompK36*. En cuanto al gen *ompA*, en dicho estudio no se observaron diferencias en la expresión entre las cepas silvestre y mutante en el gen *hns* [25]. Sin embargo, en un estudio previo se demostró que la ausencia de H-NS originó un incremento en la producción de la proteína OmpA al analizar mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, preparaciones de la membrana externa de las cepas silvestre y mutante en el gen *hns* de *E. coli* [66]. Estas observaciones sugieren que la proteína H-NS regula diferencialmente a estas proteínas de la membrana externa. La expresión de los genes *ompK35*, *ompK36* y *ompA* también se evaluó en las mutantes  $\Delta fis$ ,  $\Delta himA$  y  $\Delta hupB$ . Para el gen *ompK35* se observó que su expresión disminuyó y aumentó tres y nueve veces, en la mutante  $\Delta fis$  y  $\Delta himA$ , respectivamente. Interesantemente FIS e IHF también tuvieron un efecto positivo y negativo sobre el gen *ompF* (homólogo a *ompK35*), respectivamente, en *Escherichia coli* [67,68]. La transcripción del gen *ompK36* y *ompA* no presentó un cambio significativo en las mutantes  $\Delta fis$ ,  $\Delta himA$  y  $\Delta hupB$ .

A pesar de que existen pocos reportes acerca de la expresión genética de los sideróforos en la ausencia de H-NS, estos son controversiales. En *E. coli*, se encontró que el gen *fhuA* (que codifica para el sideróforo ferricromo) disminuyó considerablemente su expresión en la mutante en el gen *hns* al comparar con la cepa silvestre [69]. En contraste, Müller y colaboradores (2006) reportaron que el gen *fes* (que codifica para el sideróforo enterobactina) no presentó diferencias significativas en la expresión al comparar los resultados obtenidos en las cepas de *E. coli* silvestre y mutante en el gen *hns* [70]. En nuestro estudio, la expresión de los genes *fhuA* y *fes*, los cuales codifican para los sideróforos ferricromo y enterobactina respectivamente, se observó un incremento considerable en la expresión de ambos genes en la cepa mutante  $\Delta hns$  con respecto a la cepa silvestre. Estos resultados sugieren el posible papel represor de la proteína H-NS sobre los sideróforos de *K. pneumoniae*. La proteína IHF también reprimió los

genes *fes* y *fhuA*, mostrando un incremento significativo en la mutante  $\Delta hmsA$  de cuatro y dos veces, respectivamente, con respecto a la cepa silvestre. Estas observaciones están en línea con los reportados para *E. coli*, *Legionella pneumophila*, *Vibrio fischeri* donde la ausencia de una proteína IHF funcional incrementó la expresión de los genes que codifican para sideróforos [71-73]. No se presentaron cambios evidentes de la expresión genética de los genes *fes* y *fhuA* en las otras mutantes de genes nucleoides.

## Conclusión

Este estudio describe por primera vez el papel importante de H-NS, FIS, IHF y HU en *K. pneumoniae*, demostrando que similar a lo que ocurre en otros enteropatógenos, estas NAPs actúan como reguladores maestros que controlan la expresión de los factores de virulencia de *K. pneumoniae*.

## Referencias

- Podschun, R., and Ullmann, U. (1998) Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical microbiology reviews* **11**, 589-603
- Meatherall, B. L., Gregson, D., Ross, T., Pitout, J. D., and Laupland, K. B. (2009) Incidence, risk factors, and outcomes of Klebsiella pneumoniae bacteremia. *The American journal of medicine* **122**, 866-873
- Wu, K. M., Li, L. H., Yan, J. J., Tsao, N., Liao, T. L., Tsai, H. C., Fung, C. P., Chen, H. J., Liu, Y. M., Wang, J. T., Fang, C. T., Chang, S. C., Shu, H. Y., Liu, T. T., Chen, Y. T., Shiau, Y. R., Lauderdale, T. L., Su, I. J., Kirby, R., and Tsai, S. F. (2009) Genome sequencing and comparative analysis of Klebsiella pneumoniae NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis. *Journal of bacteriology* **191**, 4492-4501
- Marra, A. R., Wey, S. B., Castelo, A., Gales, A. C., Cal, R. G., Filho, J. R., Edmond, M. B., and Pereira, C. A. (2006) Nosocomial bloodstream infections caused by Klebsiella pneumoniae: impact of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) production on clinical outcome in a hospital with high ESBL prevalence. *BMC infectious diseases* **6**, 24
- Tsering, D. C., Das, S., Adhiakari, L., Pal, R., and Singh, T. S. (2009) Extended Spectrum Beta-lactamase Detection in Gram-negative Bacilli of Nosocomial Origin. *Journal of global infectious diseases* **1**, 87-92
- Ares, M. A., Alcantar-Curiel, M. D., Jimenez-Galicia, C., Rios-Sarabia, N., Pacheco, S., and De la Cruz, M. A. (2013) Antibiotic resistance of gram-negative bacilli isolated from pediatric patients with nosocomial bloodstream infections in a Mexican tertiary care hospital. *Chemotherapy* **59**, 361-368
- Chong, Y., Ito, Y., and Kamimura, T. (2011) Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **11**, 1499-1504
- Balestrino, D., Ghigo, J. M., Charbonnel, N., Haagsen, J. A., and Forestier, C. (2008) The characterization of functions involved in the establishment and maturation of Klebsiella pneumoniae in vitro biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides. *Environmental microbiology* **10**, 685-701
- Li, B., Zhao, Y., Liu, C., Chen, Z., and Zhou, D. (2014) Molecular pathogenesis of Klebsiella pneumoniae. *Future microbiology* **9**, 1071-1081
- Clements, A., Gaboriaud, F., Duval, J. F., Farn, J. L., Jenney, A. W., Lithgow, T., Wijburg, O. L., Hartland, E. L., and Strugnell, R. A. (2008) The major surface-associated saccharides of Klebsiella pneumoniae contribute to host cell association. *PLoS one* **3**, e3817
- Lee, C. H., Chang, C. C., Liu, J. W., Chen, R. F., and Yang, K. D. (2014) Sialic acid involved in hypermucoviscosity phenotype of Klebsiella pneumoniae and associated with resistance to neutrophil phagocytosis. *Virulence* **5**, 673-679
- Nypaver, C. M., Thornton, M. M., Yin, S. M., Bracho, D. O., Nelson, P. W., Jones, A. E., Bortz, D. M., and Younger, J. G. (2010) Dynamics of human complement-mediated killing of Klebsiella pneumoniae. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **43**, 585-590
- Alcantar-Curiel, M. D., Blackburn, D., Saldana, Z., Gayosso-Vazquez, C., Iovine, N. M., De la Cruz, M. A., and Giron, J. A. (2013) Multi-functional analysis of Klebsiella pneumoniae fimbrial types in adherence and biofilm formation. *Virulence* **4**, 129-138
- Rendon, M. A., Saldana, Z., Erdem, A. L., Monteiro-Neto, V., Vazquez, A., Kaper, J. B., Puente, J. L., and Giron, J. A. (2007) Commensal and pathogenic Escherichia coli use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 10637-10642
- Langstraat, J., Bohse, M., and Clegg, S. (2001) Type 3 fimbrial shaft (MrkA) of Klebsiella pneumoniae, but not the fimbrial adhesin (MrkD), facilitates biofilm formation. *Infection and immunity* **69**, 5805-5812
- Jagnow, J., and Clegg, S. (2003) Klebsiella pneumoniae MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. *Microbiology* **149**, 2397-2405
- Di Martino, P., Cafferini, N., Joly, B., and Darfeuille-Michaud, A. (2003) Klebsiella pneumoniae type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Research in microbiology* **154**, 9-16



18. March, C., Cano, V., Moranta, D., Llobet, E., Perez-Gutierrez, C., Tomas, J. M., Suarez, T., Garmendia, J., and Bengoechea, J. A. (2013) Role of bacterial surface structures on the interaction of *Klebsiella pneumoniae* with phagocytes. *PLoS one* **8**, e56847
19. Tsai, Y. K., Fung, C. P., Lin, J. C., Chen, J. H., Chang, F. Y., Chen, T. L., and Siu, L. K. (2011) *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**, 1485-1493
20. Dorman, C. J., and Deighan, P. (2003) Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Current opinion in genetics & development* **13**, 179-184
21. Dorman, C. J. (2007) H-NS, the genome sentinel. *Nature reviews. Microbiology* **5**, 157-161
22. Dorman, C. J. (2004) H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nature reviews. Microbiology* **2**, 391-400
23. Navarre, W. W., Porwollik, S., Wang, Y., McClelland, M., Rosen, H., Libby, S. J., and Fang, F. C. (2006) Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science* **313**, 236-238
24. Banos, R. C., Vivero, A., Aznar, S., Garcia, J., Pons, M., Madrid, C., and Juarez, A. (2009) Differential regulation of horizontally acquired and core genome genes by the bacterial modulator H-NS. *PLoS genetics* **5**, e1000513
25. Hommais, F., Krin, E., Laurent-Winter, C., Soutourina, O., Malpertuy, A., Le Caer, J. P., Danchin, A., and Bertin, P. (2001) Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Molecular microbiology* **40**, 20-36
26. Rimsky, S., Zuber, F., Buckle, M., and Buc, H. (2001) A molecular mechanism for the repression of transcription by the H-NS protein. *Molecular microbiology* **42**, 1311-1323
27. Lang, B., Blot, N., Bouffartigues, E., Buckle, M., Geertz, M., Gualerzi, C. O., Mavathur, R., Muskhelishvili, G., Pon, C. L., Rimsky, S., Stella, S., Babu, M. M., and Travers, A. (2007) High-affinity DNA binding sites for H-NS provide a molecular basis for selective silencing within proteobacterial genomes. *Nucleic acids research* **35**, 6330-6337
28. Navarre, W. W., McClelland, M., Libby, S. J., and Fang, F. C. (2007) Silencing of xenogeneic DNA by H-NS-facilitation of lateral gene transfer in bacteria by a defense system that recognizes foreign DNA. *Genes & development* **21**, 1456-1471
29. Dorman, C. J. (2014) H-NS-like nucleoid-associated proteins, mobile genetic elements and horizontal gene transfer in bacteria. *Plasmid* **75**, 1-11
30. Castaing, B., Zelwer, C., Laval, J., and Boiteux, S. (1995) HU protein of *Escherichia coli* binds specifically to DNA that contains single-strand breaks or gaps. *The Journal of biological chemistry* **270**, 10291-10296
31. van Noort, J., Verbrugge, S., Goosen, N., Dekker, C., and Dame, R. T. (2004) Dual architectural roles of HU: formation of flexible hinges and rigid filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 6969-6974
32. Kar, S., Edgar, R., and Adhya, S. (2005) Nucleoid remodeling by an altered HU protein: reorganization of the transcription program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 16397-16402
33. Oberio, J., Nabti, S., Jooste, V., Mignot, H., and Rouviere-Yaniv, J. (2009) The HU regulon is composed of genes responding to anaerobiosis, acid stress, high osmolarity and SOS induction. *PLoS one* **4**, e4367
34. Bi, H., Sun, L., Fukamachi, T., Saito, H., and Kobayashi, H. (2009) HU participates in expression of a specific set of genes required for growth and survival at acidic pH in *Escherichia coli*. *Current microbiology* **58**, 443-448
35. Mangan, M. W., Lucchini, S., T, O. C., Fitzgerald, S., Hinton, J. C. D., and Dorman, C. J. (2011) Nucleoid-associated protein HU controls three regulons that coordinate virulence, response to stress and general physiology in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology* **157**, 1075-1087
36. Wang, G., Lo, L. F., and Maier, R. J. (2012) A histone-like protein of *Helicobacter pylori* protects DNA from stress damage and aids host colonization. *DNA repair* **11**, 733-740
37. Freundlich, M., Ramani, N., Mathew, E., Sirko, A., and Tsui, P. (1992) The role of integration host factor in gene expression in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **6**, 2557-2563
38. Craig, N. L., and Nash, H. A. (1984) *E. coli* integration host factor binds to specific sites in DNA. *Cell* **39**, 707-716
39. Peacock, S., Weissbach, H., and Nash, H. A. (1984) In vitro regulation of phage lambda cII gene expression by *Escherichia coli* integration host factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**, 6009-6013
40. Santero, E., Hoover, T. R., North, A. K., Berger, D. K., Porter, S. C., and Kustu, S. (1992) Role of integration host factor in stimulating transcription from the sigma 54-dependent nifH promoter. *Journal of molecular biology* **227**, 602-620
41. Mangan, M. W., Lucchini, S., Danino, V., Croinin, T. O., Hinton, J. C., and Dorman, C. J. (2006) The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular microbiology* **59**, 1831-1847
42. Stonehouse, E., Kovacicova, G., Taylor, R. K., and Skorupski, K. (2008) Integration host factor positively regulates virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Journal of bacteriology* **190**, 4736-4748
43. Bi, H., and Zhang, C. (2014) Integration host factor is required for the induction of acid resistance in *Escherichia coli*. *Current microbiology* **69**, 218-224
44. Koch, C., Ninnemann, O., Fuss, H., and Kahmann, R. (1991) The N-terminal part of the *E. coli* DNA binding protein FIS is essential for stimulating site-specific DNA inversion but is not required for specific DNA binding. *Nucleic acids research* **19**, 5915-5922
45. Kostrewa, D., Granzin, J., Koch, C., Choe, H. W., Raghunathan, S., Wolf, W., Labahn, J., Kahmann, R., and Saenger, W. (1991) Three-dimensional structure of the *E. coli* DNA-binding protein FIS. *Nature* **349**, 178-180
46. Ishihama, A. (1999) Modulation of the nucleoid, the transcription apparatus, and the translation machinery in bacteria for stationary phase survival. *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms* **4**, 135-143
47. Haffter, P., and Bickle, T. A. (1987) Purification and DNA-binding properties of FIS and Cin, two proteins required for the bacteriophage P1 site-specific recombination system, cin. *Journal of molecular biology* **198**, 579-587
48. Filutowicz, M., Ross, W., Wild, J., and Gourse, R. L. (1992) Involvement of Fis protein in replication of the *Escherichia coli* chromosome. *Journal of bacteriology* **174**, 398-407
49. Schneider, R., Lurz, R., Luder, G., Tolksdorf, C., Travers, A., and Muskhelishvili, G. (2001) An architectural role of the *Escherichia coli* chromatin protein FIS in organising DNA. *Nucleic acids research* **29**, 5107-5114
50. Gille, H., Egan, J. B., Roth, A., and Messer, W. (1991) The FIS protein binds and bends the origin of chromosomal DNA replication, oriC, of *Escherichia coli*. *Nucleic acids research* **19**, 4167-4172
51. Bradley, M. D., Beach, M. B., de Koning, A. P. J., Pratt, T. S., and Osuna, R. (2007) Effects of Fis on *Escherichia coli* gene expression during different growth stages. *Microbiology* **153**, 2922-2940

52. Steen, J. A., Steen, J. A., Harrison, P., Seemann, T., Wilkie, I., Harper, M., Adler, B., and Boyce, J. D. (2010) Fis is essential for capsule production in *Pasteurella multocida* and regulates expression of other important virulence factors. *PLoS pathogens* **6**, e1000750
53. Wang, H., Liu, B., Wang, Q., and Wang, L. (2013) Genome-wide analysis of the salmonella Fis regulon and its regulatory mechanism on pathogenicity islands. *PloS one* **8**, e64688
54. Ares, M. A., Fernandez-Vazquez, J. L., Rosales-Reyes, R., Jarillo-Quijada, M. D., von Bargen, K., Torres, J., Gonzalez-y-Merchand, J. A., Alcantar-Curiel, M. D., and De la Cruz, M. A. (2016) H-NS Nucleoid Protein Controls Virulence Features of *Klebsiella pneumoniae* by Regulating the Expression of Type 3 Pili and the Capsule Polysaccharide. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **6**, 13
55. Datsenko, K. A., and Wanner, B. L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 6640-6645
56. Jahn, C. E., Charkowski, A. O., and Willis, D. K. (2008) Evaluation of isolation methods and RNA integrity for bacterial RNA quantitation. *Journal of microbiological methods* **75**, 318-324
57. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408
58. Ares, M. A., Sansabas, A., Rodriguez-Valverde, D., Siqueiros-Cendon, T., Rascon-Cruz, Q., Rosales-Reyes, R., Jarillo-Quijada, M. D., Alcantar-Curiel, M. D., Cedillo, M. L., Torres, J., Giron, J. A., and De la Cruz, M. A. (2019) The Interaction of *Klebsiella pneumoniae* With Lipid Rafts-Associated Cholesterol Increases Macrophage-Mediated Phagocytosis Due to Down Regulation of the Capsule Polysaccharide. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **9**, 255
59. Dillon, S. C., and Dorman, C. J. (2010) Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nature reviews. Microbiology* **8**, 185-195
60. Lin, J. C., Chang, F. Y., Fung, C. P., Xu, J. Z., Cheng, H. P., Wang, J. J., Huang, L. Y., and Siu, L. K. (2004) High prevalence of phagocytic-resistant capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae* in liver abscess. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **6**, 1191-1198
61. Regueiro, V., Campos, M. A., Pons, J., Alberti, S., and Bengoechea, J. A. (2006) The uptake of a *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide mutant triggers an inflammatory response by human airway epithelial cells. *Microbiology* **152**, 555-566
62. Ebel, W., and Trempy, J. E. (1999) *Escherichia coli* RcsA, a positive activator of colanic acid capsular polysaccharide synthesis, functions To activate its own expression. *Journal of bacteriology* **181**, 577-584
63. Schembri, M. A., Olsen, P. B., and Klemm, P. (1998) Orientation-dependent enhancement by H-NS of the activity of the type 1 fimbrial phase switch promoter in *Escherichia coli*. *Molecular & general genetics: MGG* **259**, 336-344
64. Martinez-Santos, V. I., Medrano-Lopez, A., Saldana, Z., Giron, J. A., and Puente, J. L. (2012) Transcriptional regulation of the *ecp* operon by EcpR, IHF, and H-NS in attaching and effacing *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **194**, 5020-5033
65. Landini, P., and Zehnder, A. J. (2002) The global regulatory *hns* gene negatively affects adhesion to solid surfaces by anaerobically grown *Escherichia coli* by modulating expression of flagellar genes and lipopolysaccharide production. *Journal of bacteriology* **184**, 1522-1529
66. Suzuki, T., Ueguchi, C., and Mizuno, T. (1996) H-NS regulates *OmpF* expression through *micF* antisense RNA in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **178**, 3650-3653
67. Tsui, P., Helu, V., and Freundlich, M. (1988) Altered osmoregulation of *ompF* in integration host factor mutants of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **170**, 4950-4953
68. Crozat, E., Hindre, T., Kuhn, L., Garin, J., Lenski, R. E., and Schneider, D. (2011) Altered regulation of the *OmpF* porin by Fis in *Escherichia coli* during an evolution experiment and between B and K-12 strains. *Journal of bacteriology* **193**, 429-440
69. White-Ziegler, C. A., and Davis, T. R. (2009) Genome-wide identification of H-NS-controlled, temperature-regulated genes in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology* **191**, 1106-1110
70. Muller, C. M., Dobrindt, U., Nagy, G., Emody, L., Uhlin, B. E., and Hacker, J. (2006) Role of histone-like proteins H-NS and StpA in expression of virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **188**, 5428-5438
71. Arfin, S. M., Long, A. D., Ito, E. T., Toller, L., Riehle, M. M., Paegle, E. S., and Hatfield, G. W. (2000) Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of integration host factor. *The Journal of biological chemistry* **275**, 29672-29684
72. Foxall, R. L., Ballok, A. E., Avitabile, A., and Whistler, C. A. (2015) Spontaneous phenotypic suppression of GacA-defective *Vibrio fischeri* is achieved via mutation of *csrA* and *ihfA*. *BMC microbiology* **15**, 180
73. Pitre, C. A. J., Tanner, J. R., Patel, P., and Brassinga, A. K. C. (2013) Regulatory control of temporally expressed integration host factor (IHF) in *Legionella pneumophila*. *Microbiology* **159**, 475-492



## DR. MIGUEL ÁNGEL DE LA CRUZ

Es Investigador Titular en la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría en el Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Realizó el Doctorado en Ciencias Bioquímicas en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Realizó dos estancias postdoctorales, una en el Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy (Francia) y otra en el Emerging Pathogens Institute en la Universidad de Florida (USA).

El laboratorio de Microbiología Molecular que dirige tiene una amplia experiencia en el análisis transcripcional de la expresión de factores de virulencia de diversas bacterias patógenas, como *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Escherichia coli*.

Actualmente está realizando proyectos de investigación analizando la expresión y función de sistemas toxina-antitoxina, sistemas de secreción y fimbrias en diversos modelos bacterianos.

Ha publicado más de 20 artículos y ha dirigido 11 tesis de licenciatura, dos de maestría y una de doctorado. Perteneció al Sistema Nacional de Investigadores Nivel 2.