



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EL PAPEL DE LAS PROTEÍNAS NUCLEOIDES FIS, IHF Y HU SOBRE LA
EXPRESIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA DE *KLEBSIELLA***

PNEUMONIAE

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓLOGA MEJÍA VENTURA SANTA LOURDES JAZMÍN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

DR. MIGUEL ANGEL DE LA CRUZ VILLEGAS

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. VÍCTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLÁN

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

DRA. MARÍA DOLORES ALCANTAR CUIEL

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX, OCTUBRE, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/857/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **21 de junio de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** de la estudiante **MEJÍA VENTURA SANTA LOURDES JAZMÍN** con número de cuenta **309262930** con la tesis titulada **“EL PAPEL DE LAS PROTEÍNAS NUCLEOIDES FIS, IHF Y HU SOBRE LA EXPRESIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA DE *Klebsiella pneumoniae*”**, realizada bajo la dirección del **DR. MIGUEL ÁNGEL DE LA CRUZ VILLEGAS**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS
Vocal: DRA. ROSA LAURA CAMARENA MEJÍA
Vocal: DRA. MARGARITA CAMORLINGA PONCE
Vocal: DR. ERIC MONROY PÉREZ
Secretario: DRA. MARÍA DOLORES ALCÁNTAR CURIEL

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 2 de septiembre de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales

Agradezco al posgrado de ciencias Biológicas UNAM, por el apoyo brindado a lo largo de mi formación académica.

Al programa de becas para estudios de posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo recibido durante el desarrollo de esta tesis (Número de CVU: 959051).

A mi tutor y director de tesis el Dr. Miguel Angel de la Cruz Villegas por su disposición y apoyo para llevar a cabo este proyecto.

A los miembros del comité tutor, el Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán y la Dra. María Dolores Alcantar por sus valiosas aportaciones y comentarios los cuales contribuyeron a mejorar este trabajo.

Agradecimientos personales

A Dios por permitirme llegar a una meta más en mi vida.

A mi madre Dolores Ventura Rosas por apoyarme y alentarme siempre, por ser un ejemplo de esfuerzo y constancia.

A mis abuelitas Agripina y María Isabel por su cariño y aliento.

A mis hermanos Juan, Ángel y Gabriel por su cariño y por escucharme y apoyarme.

A los miembros del jurado, la Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras, la Dra. Rosa Laura Camarena Mejía, la Dra. Margarita Camorlinga Ponce, el Dr. Erick Monroy Pérez y la Dra. María Dolores Alcantar Curiel, por sus aportaciones y sus acertadas observaciones.

Al Dr. Miguel Ares por su asesoría durante mi estancia en el laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Diana, Jorge, Nancy y Gaby por sus constantes consejos y asesoría durante mi estancia. Al Sr. Edgar por su excelente trabajo y disposición para tener listo los materiales y reactivos cuando se requirieran.

A todas las personas que contribuyeron de alguna manera para llevar a cabo este trabajo.

INDICE

1	Resumen	1
2	Abstract	2
3	Introducción	3
3.1	Factores de virulencia de <i>K. pneumoniae</i>	5
3.1.1	Lipopolisacárido	6
3.1.2	Sideróforos	8
3.1.3	Fimbrias	10
3.1.4	Proteínas de la membrana externa	13
3.1.5	Cápsula	15
3.1.6	Proteínas nucleoides	16
4	Antecedentes	22
5	Planteamiento del problema	24
6	Hipótesis	24
7	Objetivo general	25
7.1	Objetivos experimentales	25
8	Metodología	25
8.1	Cepa bacteriana y líneas celulares	25
8.2	Medios de cultivo	25
8.3	Antibióticos	26
8.4	Generación de las cepas mutantes Δfis , $\Delta himA$ y $\Delta hupB$	26
8.4.1	Amplificación del gen de resistencia a kanamicina	26
8.4.2	Preparación de células competentes	27
8.4.3	Diseño de los iniciadores de los genes estudiados en <i>K. pneumoniae</i>	28
8.4.4	Extracción del DNA genómico	29
8.4.5	Amplificación de los genes mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final	30
8.5	Extracción del RNA total	31
8.6	Purificación del RNA	31
8.7	Obtención de cDNA mediante la transcripción reversa (RT) del RNA total	32
8.8	Amplificación de los genes mediante la PCR en tiempo real	33
8.9	Determinación de la expresión genética relativa	33
8.10	Curvas de crecimiento	34
9	Resultados	34
9.1	Generación de las cepas mutantes en los genes <i>fis</i> , <i>himA</i> , <i>hupB</i>	34
9.2	Curvas de crecimiento de las tres cepas de <i>K. pneumoniae</i> silvestre y las mutantes Δfis , $\Delta himA$ y $\Delta hupB$	37

9.3	Extracción de RNA de <i>K. pneumoniae</i>	38
9.4	Expresión de los genes involucrados en la síntesis de la cápsula de <i>K. pneumoniae</i>	39
9.5	Expresión de los genes involucrados en la síntesis del lipopolisacárido de <i>K. pneumoniae</i>	41
9.6	Expresión de los genes involucrados en la síntesis de las fimbrias de <i>K.pneumoniae</i>	42
9.7	Expresión de los genes involucrados en la síntesis de las proteínas de la membrana externa de <i>K. pneumoniae</i>	43
9.8	Expresión de los genes involucrados en la síntesis de los sideróforos de <i>K. pneumoniae</i>	44
10	Discusión	45
11	Conclusiones	54
12	Perspectivas	55
13	Referencias Bibliográficas.....	56

1 Resumen

Klebsiella pneumoniae es una bacteria comensal y oportunista de los seres humanos que en las últimas décadas se ha convertido en uno de los principales agentes causantes de enfermedades asociadas al cuidado de la salud. La capacidad de *K. pneumoniae* de colonizar y parasitar al huésped radica en la expresión de factores de virulencia, siendo los principales de esta bacteria la cápsula, las fimbrias, los sideróforos, el lipopolisacárido y las proteínas de la membrana externa. Uno de los reguladores de la expresión de factores de virulencia en diferentes bacterias patogénicas son las proteínas nucleoides, las cuales tienen la capacidad de unirse al DNA bacteriano para modelar el nucleóide, contribuyendo al empaquetamiento cromosómico y participando en diversos procesos como replicación, transcripción y reparación. Previamente, nuestro grupo reportó el papel de la proteína nucleóide H-NS en la patogénesis de *K. pneumoniae*, sin embargo, se desconoce el efecto de las proteínas FIS, IHF y HU sobre la expresión de los factores de virulencia de esta bacteria. En este trabajo se generaron mutantes nulas en los genes que codifican para las proteínas nucleoides FIS, IHF y HU de *K. pneumoniae*. Las cepas mutantes Δfis , $\Delta himA$ y $\Delta hupB$ estuvieron ligeramente afectadas en el crecimiento de *K. pneumoniae* en comparación con la cepa silvestre. Los resultados de expresión mostraron que la proteína FIS reguló positivamente la expresión de los genes *ompK35*, *galF* y *fhuA*. En contraste, FIS controló negativamente la expresión de los genes *mrkA*, *wzm* y *fhuA*. En el caso de IHF, esta proteína nucleóide activó y reprimió principalmente la expresión de los genes *galF* y *fhuA*, respectivamente. Por último, la ausencia de HU provocó una disminución de la expresión de los genes *ecpA* y *fes* en comparación de la cepa silvestre. En conjunto, estos resultados demuestran que las proteínas nucleoides FIS, IHF y HU regulan de manera diferencial los genes involucrados en la expresión de diferentes factores de virulencia de *K. pneumoniae*.

Palabras clave: *Klebsiella pneumoniae*, proteínas nucleoides, FIS, IHF, HU, factores de virulencia.

2 Abstract

Klebsiella pneumoniae is a commensal and opportunistic bacterium of humans that in recent decades has become one of the main causative agents of diseases associated with health care. The ability of *K. pneumoniae* to colonize and parasitize the host lies in the expression of virulence factors, the main virulence factors of this bacterium being the capsule, fimbria, siderophores, lipopolysaccharide and outer membrane proteins. How the expression of these virulence factors is regulated is not yet clear. One of the regulators of the expression of virulence factors in different pathogenic bacteria are nucleoid proteins, which have the ability to bind to bacterial DNA to model the nucleoid, contributing to chromosomal packaging and participating in various processes such as replication, transcription and repair. Previously, our group already reported the role of the H-NS nucleoid protein in the pathogenesis of *K. pneumoniae*, however, the effect of the FIS, IHF and HU proteins on the expression of virulence factors of this bacterium is unknown. In this work, null mutants were generated in the genes that code for the nucleoid proteins FIS, IHF and HU of *K. pneumoniae*. The Δfis , $\Delta himA$ and $\Delta hupB$ mutant strains were slightly affected in the growth of *K. pneumoniae* compared to the wild-type strain. The results showed that the FIS protein positively regulated the expression of the *ompK35*, *galF* and *fhuA* genes. In contrast, FIS negatively controlled the expression of the *mrkA*, *wzm* and *fhuA* genes. In the case of the IHF protein, this nucleoid protein mainly activated and repressed the expression of the *galF* and *fhuA* genes, respectively. Finally, the absence of HU caused a decrease in the expression of the *ecpA* and *fes* genes compared to the wild strain. Together, these results demonstrate that the nucleoid proteins FIS, IHF and HU differentially regulate the genes involved in the expression of different virulence factors of *K. pneumoniae*.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, nucleoid proteins, FIS, IHF, HU, virulence factors

3 Introducción

El descubrimiento de *K. pneumoniae* probablemente se llevó a cabo en 1875 cuando el patólogo alemán Edwin Klebs observó por primera vez la presencia de bacterias en vías aéreas de pacientes fallecidos a causa de neumonía (Klebs, 1875); pero no está claro si esta bacteria era realmente *Klebsiella* o *Streptococcus* debido a que esta última es la primera causa de neumonía bacteriana (Woodhead, 2002). En 1882 el microbiólogo y patólogo Carl Freidländer, se dio cuenta de que había bacterias en los pulmones de la mayoría de los pacientes que morían de neumonía y observó la ausencia de bacterias en pacientes que morían por otra causa. Con ese descubrimiento llegó a la conclusión que las bacterias eran las causantes de la neumonía y las denominó bacilo de Freidländer (Freidländer, 1883). En 1885 Trevisan dio nombre a uno de los géneros más representativos de la familia *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella* e identificó al bacilo de Freidländer como *Klebsiella pneumoniae*, en honor a Edwin Klebs.

La clasificación de *Klebsiella* ha sido modificada a lo largo del tiempo. La primera clasificación del género se basó en criterios clínicos y permitió diferenciar tres especies: *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* y *K. rhinoscleromatis* (Drancourt *et al.*, 2001). La utilización de métodos taxonómicos moleculares permitió que esta clasificación fuera revisada repetidas ocasiones. Actualmente la clasificación predominante es la de Orzkov en 1984, que clasifica a *Klebsiella* en 5 especies basándose en características fenotípicas y bioquímicas: *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. terrigena*, *K. ornithinolitica* y *K. planticola*. La especie *K. pneumoniae* fue subdividida en tres subespecies: *K. pneumoniae subespecie pneumoniae*, *K. pneumoniae subespecie ozaenae* y *K. pneumoniae subespecie rhinoscleromatis*. Esta clasificación se basa en su fenotipo, características bioquímicas, moleculares y manifestaciones clínicas (Brisse *et al.*, 2006).

Las bacterias que comprenden el género *Klebsiella* son bacilos Gram negativos de la familia *Enterobacteriaceae*, no móviles y encapsulados. Se encuentran de manera ubicua en el ambiente debido a su gran capacidad de adaptación a diferentes nichos ecológicos (Podschun y Ullmann, 1998).

Además, *K. pneumoniae* es un patógeno oportunista común de seres humanos y animales. La microbiota de la nasofaringe y especialmente la del tracto gastrointestinal son los reservorios de *K. pneumoniae* desde estos sitios puede ingresar a otros tejidos. Frecuentemente se asocia a infecciones del tracto urinario y a neumonía en personas sanas (Meatherall, *et al.*, 2009). En individuos inmunocomprometidos, diabéticos, neonatos y ancianos *K. pneumoniae* puede causar infecciones nosocomiales graves, incluyendo bacteriemia y meningitis (Paczosa y Meccas, 2016). *K. pneumoniae* no tiene requerimientos específicos para su crecimiento, puede cultivarse en medios de cultivo sencillos como agar sangre. Las condiciones óptimas para su crecimiento son 37° y pH 7. Son anaerobias facultativas porque pueden crecer en ausencia o presencia de oxígeno; muchas especies que conforman el género pueden sobrevivir utilizando citrato y glucosa como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno. Fermentan la lactosa y el manitol y reducen el nitrato a nitrito. Tienen actividad ureasa positiva (hidroliza la urea a dióxido de carbono y amoníaco) y son indol y ornitina negativas (no degradan el triptófano y no poseen la enzima ornitina descarboxilasa), aunque hay excepciones en algunas especies (Flores *et al.*, 2011). Una variante de esta especie es *K. pneumoniae* hipervirulenta la cual se caracteriza por un fenotipo hipermucoviscoso causado por la sobreproducción de la cápsula.

K. pneumoniae hipervirulenta se ha convertido en un patógeno clínicamente significativo que causa infecciones altamente invasivas en individuos sanos e inmunocomprometidos (Prokesch *et al.*, 2016).

La diseminación es una característica poco común para los bacilos Gram negativos entéricos incluyendo a *K. pneumoniae* (Shon *et al.*, 2013). Así mismo las infecciones nosocomiales causadas por *K. pneumoniae* tienden a ser crónicas debido a la formación de biopelículas *in vivo* que protegen al patógeno de las respuestas inmunes del huésped y los antibióticos. Adicionalmente los aislamientos de *K. pneumoniae* a menudo muestran fenotipos de resistencia a múltiples fármacos; por lo tanto, las opciones de tratamiento son limitadas para las infecciones causadas por *K. pneumoniae* (Hawkey y Jones, 2009).

Es importante resaltar que *K. pneumoniae* también pertenece al grupo ESKAPE el cual se caracteriza por evadir diversas terapias a través de la resistencia a los antimicrobianos. Los patógenos ESKAPE se definieron por primera vez en 2008 y está constituido por: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp* (Rice, 2008).

3.1 Factores de virulencia de *K. pneumoniae*

La capacidad de *K. pneumoniae* para causar infecciones se debe a la expresión de diversos factores de virulencia; implicados en su habilidad de parasitar al huésped y evadir el sistema inmune. Los principales factores de virulencia de *K. pneumoniae* son: el lipopolisacárido (LPS), los sideróforos, las proteínas de membrana externa, las fimbrias y la cápsula; todos ellos le permiten a la bacteria entrar y multiplicarse en el hospedero (Figura 1) (Balestrino *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2014).

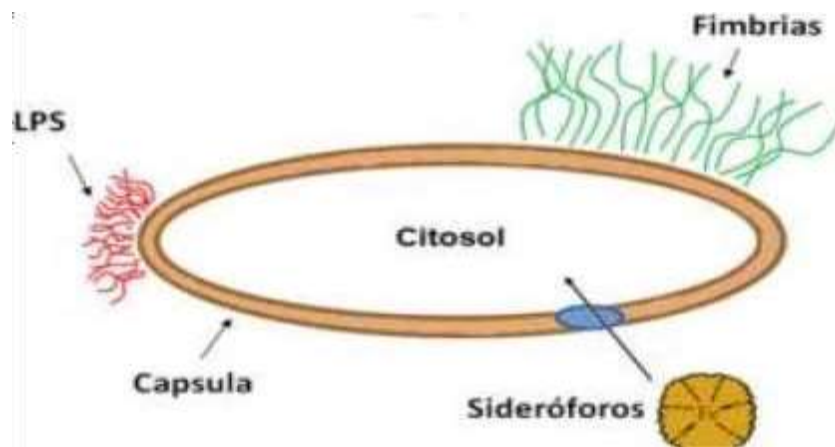


Figura 1. Representación esquemática de los principales factores de virulencia de *K. pneumoniae* (modificado de Podschun y Ullmann, 1998).

3.1.1 Lipopolisacárido

El lipopolisacárido (LPS) es un componente necesario e importante de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, cubriendo el 90% de su superficie en (Alexander y Rietschel, 2001). Son moléculas cargadas negativamente; sin embargo, hay una variación considerable en las estructuras de LPS. Entre las especies bacterianas este típicamente se compone de un dominio hidrófobo conocido como lípido A o endotoxina, un oligosacárido, núcleo o core y un polisacárido o antígeno O. El antígeno O es el componente más externo del LPS y está formado por un polímero de oligosacáridos que se repiten otorgándole una gran variabilidad química. Su función es proteger a las células bacterianas (Raetz *et al.*, 2009). La cadena O de *K. pneumoniae* tiene un papel importante frente al efecto bactericida del suero, ya que enmascara otras estructuras de la superficie bacteriana capaces de activar el sistema de complemento de la vía clásica como son el lípido A y las porinas. Por su parte la cadena O activa principalmente la vía alternativa del sistema de complemento, aunque impide la vía clásica, evitando la formación del complejo de ataque a la membrana y la lisis del microorganismo.

En *K. pneumoniae* se han descrito nueve serotipos diferentes basados en el antígeno O: O1, O2, O2ac, O3, O4, O5, O7, O8 y O12, de los cuales el serotipo O1 es el más frecuente en los aislados clínicos de *K. pneumoniae* (Hsieh *et al.*, 2014).

El núcleo o core del LPS es el punto de unión entre el antígeno O y el lípido A. Es la región más conservada del polisacárido, especialmente dentro de la misma familia de bacterias (Holst y Brade, 1992). El núcleo del polisacárido se subdivide en núcleo externo y núcleo interno, este último es el que se ancla al lípido A (figura 2). En *K. pneumoniae* el núcleo externo está formado por hexosas como; glucosa, galactosa o glucosamina. Mientras que el núcleo interno contiene heptosas y Kdo (ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosónico) (Vinogradov y Perry, 2001; Vinogradov *et al.*, 2002).

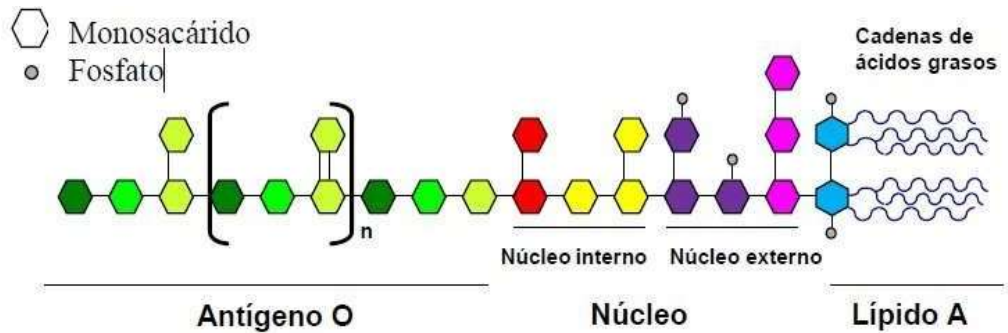


Figura 2. Representación esquemática del lipopolisacárido (Imagen modificada de Pupo y Hardy, 2009).

La mayoría de las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* estudiadas presentan grupos fosfatos substituyendo las heptosas, en cambio las heptosas de *K. pneumoniae* se encuentran substituidas con residuos de ácido galacturónico. Estas substituciones confieren estabilidad a la membrana externa y sirven de punto de anclaje del polisacárido capsular (Friedrich y Whitfield, 2005; Friedrich *et al.*, 2005; Fresno *et al.*, 2006).

El lípido A es la región hidrofóbica del LPS, dicho componente posee propiedades de endotoxina (Poltorak *et al.*, 1998; Akira *et al.*, 2006). La estructura del lípido A de *K. pneumoniae* es relativamente similar a la de otros lípidos A expresados por bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*; es decir, un disacárido de glucosamina hexacilado y fosforilado (Raetz y Whitfield, 2002).

Las endotoxinas se liberan después de la destrucción de la pared celular bacteriana, siendo tóxicas para la mayoría de las células animales. Pueden ser letales si se encuentran en grandes cantidades en el sistema circulatorio, causando la activación de citocinas proinflamatorias. También ocasiona la liberación de óxido nítrico proveniente de macrófagos y células endoteliales. Esto deriva en la activación del complemento, la coagulación y el choque endotóxico. (Paczosa y Mecsas, 2016; Zachary, 2017).

3.1.2 Sideróforos

El hierro es un elemento vital para las bacterias porque se utiliza para catalizar una amplia variedad de reacciones enzimáticas indispensables para el desarrollo (Kramer *et al.*, 2019; Wilson *et al.*, 2016). El hierro también es indispensable para las células del huésped y está estrictamente regulado. El huésped utiliza varios sistemas de transporte de hierro como: ferritina, transferrina, hemo o lactoferrina, por lo tanto, el hierro no se encuentra de forma libre. Para enfrentar este desafío, los microorganismos evolucionaron utilizando sideróforos que son pequeñas moléculas quelantes de hierro férrico (Kramer *et al.*, 2019). Se pueden distinguir cuatro tipos químicos de sideróforos en función de los restos implicados en la quelación del hierro. Estos son los tipos de sideróforos: catecolato, fenolato, hidroxamato y carboxilato. También es común encontrar las mezclas de los diversos tipos.

Los siderofóros son generalmente más afines al hierro que las proteínas y moléculas del huésped. Esto les permite a las bacterias competir por la adquisición de hierro con el huésped (Paczosa y Meccas, 2016; Kramer *et al.*, 2019). Después de la captura de hierro, los sideróforos férricos se importan a las bacterias a través de receptores específicos (Figura 3). Una vez dentro de la bacteria el hierro es utilizado en procesos importantes para el crecimiento y la colonización durante el desarrollo de la infección. Las células inmunitarias del hospedero como macrófagos y neutrófilos pueden secretar sustancias como: lipocalina 2 (Lcn2), lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL) y siderocalina; estas sustancias son utilizadas para combatir a los sideróforos. En *K. pneumoniae* varios sideróforos pueden expresarse; incluida la enterobactina, layersiniabactina, la salmoquelina y la aerobactina, (Figura 3).

La enterobactina es considerada como el principal sistema de captación de hierro utilizado por *K. pneumoniae*. La expresión de varios sideróforos puede ser un medio para optimizar la colonización exitosa de diferentes tejidos y contar con un sistema de captación a pesar de la neutralización de un tipo de sideróforo (Paczosa y Meccas 2016).

La afinidad de estos sideróforos por el hierro varía. La aerobactina tiene la afinidad más baja mientras que la enterobactina cuenta con la afinidad la más alta (Brock *et al.*, 1999; Perry *et al.*, 1999).

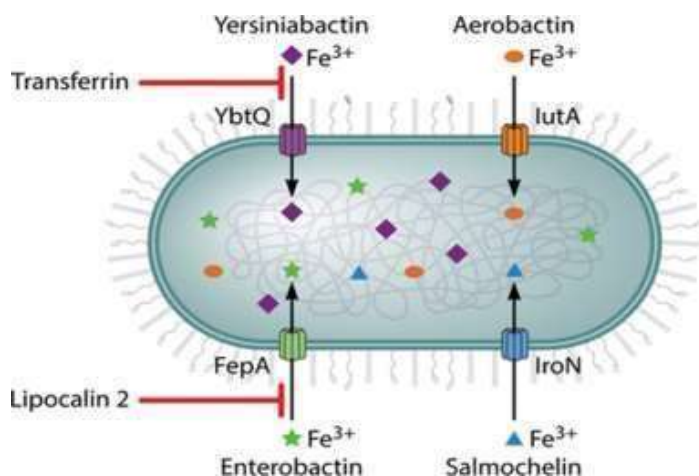


Figura 3. Representación esquemática de sideróforos y transportadores específicos en *K. pneumoniae* tomado de Paczosa y Mecsas 2016.

La expresión de enterobactina es casi ubicua entre las cepas clásicas e hipervirulentas de *K. pneumoniae*, por esto, se considera que es el principal sistema de absorción de hierro utilizado por esta bacteria (Podschn *et al.*, 1993; El FertasAissani *et al.*, 2013). La yersiniabactina se descubrió originalmente en *Yersinia* como parte de una isla de alta patogenicidad, pero este sideróforo se ha identificado en otras bacterias, incluida *K. pneumoniae*. La yersiniabactina se ha observado en el 18% de los aislamientos clínicos clásicos de *K. pneumoniae*, pero en el 90% de los aislados hipervirulentos (Hsieh *et al.*, 2008; Bachman *et al.*, 2011). La salmoquelina es una forma c-glucosilada de enterobactina. Esta modificación previene la unión de la salmoquelina por la lipocalina-2, evitando así la neutralización del sideróforo y la inducción de inflamación dependiente de la lipocalina-2. La salmoquelina mejora la colonización de la nasofaringe por *K. pneumoniae*. Se estima que se encuentra en un porcentaje del 2% al 4% de las cepas nosocomiales clásicas de *K. pneumoniae* y es más prevalente en cepas hipervirulentas. Un estudio informó su presencia en el 90% de *K. pneumoniae*

hipervirulentas asociadas a absceso hepático piógeno (El Fertas-Aissani *et al.*, 2013; Hsieh *et al.*, 2008).

La aerobactina es un sideróforo de citrato-hidroxamato. Es poco común encontrarlo en aislados clínicos nosocomiales clásicos de *K. pneumoniae*, ya que se encuentra en alrededor del 6% de las cepas clásicas, sin embargo, está presente en el 93% al 100% de *K. pneumoniae* hipervirulentas.

La presencia de aerobactina siempre se asocia con una hipercápsula (Pacozosa y Meccas *et al.*, 2016). Esta asociación se debe al hecho de que el grupo de genes de aerobactina *iucABCD*, junto con el transportador de aerobactina *iutA*, se transportan en el mismo plásmido de virulencia que transporta *rmpA*, un potenciador de la producción de cápsulas (Nassif *et al.*, 1989; Hsieh *et al.*, 2008; Nassif y Sansonetti, 1986; Tang *et al.*, 2010). Además, se ha reportado que la aerobactina, pero no la enterobactina, la yersiniabactina o la salmoquelina, es necesaria para una infección exitosa por cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae* en modelos de infección de ratón neumónica y subcutánea (Russo *et al.*, 2014; Russo *et al.*, 2015).

3.1.3 Fimbrias

La capacidad que tienen las bacterias para adherirse a células del huésped se debe a la presencia de adhesinas. En *K. pneumoniae* esta habilidad es conferida por la presencia de fimbrias. Las fimbrias son estructuras filamentosas no flagelares, las cuales le permiten a la bacteria adherirse sobre superficies bióticas y abióticas (Rijavec *et al.*, 2008)

Las principales fimbrias descritas en *K. pneumoniae* son: el pilus tipo 1, el pilus tipo ECP (“*Escherichia coli* common pilus”) y el pilus tipo 3. Diversos estudios han demostrado que estas fimbrias son importantes para la adherencia de la bacteria a las células epiteliales del tracto intestinal, células del aparato urinario y células del sistema respiratorio. Estas adhesinas reconocen receptores específicos de superficie ó proteínas de la matriz extracelular (Alcántar-Curiel *et al.*, 2013; Struve *et al.*, 2008).

3.1.3.1 Las fimbrias tipo 1

Las fimbrias tipo 1 son las más comunes en *Klebsiella* y en la familia *Enterobacteriaceae*. Estas estructuras miden entre 5 y 7 nm, son rígidas y su capacidad de adhesión se debe a la presencia de la adhesina FimH que se encuentra al final de las fimbrias.

Las fimbrias tipo 1 se encuentran codificadas en el clúster de genes *fim*, que contiene todos los genes necesarios para la síntesis y el ensamblaje de la fimbria. Este tipo de fimbria está compuesto por la proteína FimA, la cual codifica para la subunidad mayor de la fimbria, mientras *fimF* y *fimG* codifican la subunidad menor. En tanto *fimK* que regula la expresión de la fimbria únicamente se encuentra en *K.pneumoniae* (Figura 4) (Sturve *et al.*, 2008)

Las fimbrias tipo 1 se unen a moléculas de manosa presentes en las células del huésped y por lo tanto se les denomina “sensibles a manosa” estas fimbrias están asociadas con la patogénesis del tracto urogenitario y del tracto respiratorio, pero no son necesarias para la formación de biopelículas en superficies abióticas (Struve *et al.*, 2009).

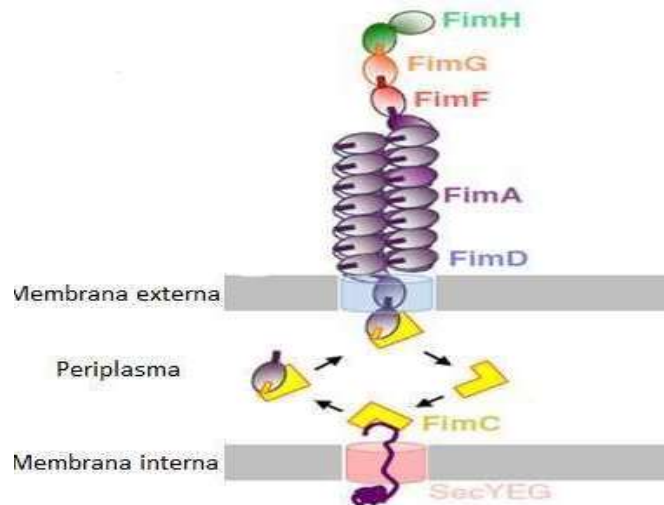


Figura 4. Disposición de las subunidades de la fimbria tipo 1. Las subunidades de la fimbria tipo 1 pasan por la membrana interna a través de la vía secretora Sec. Las subunidades son secretadas a la membrana externa por medio de la proteína Usher (FimD) y con la ayuda de la proteína chaperona (FimC). Tomado de lillington *et al.*, 2014.

3.1.3.2 Las fimbrias tipo 3

Las fimbrias tipo 3 son filamentos en forma de hélice, con un tamaño de 2 a 5 nm de diámetro y de 0.5 a 2 µm de largo. Estas fimbrias intervienen en la adherencia de las células endoteliales y epitelios del tracto urinario y respiratorio. Se encuentran en la mayoría de los aislamientos clínicos de *K. pneumoniae*. A diferencia de las fimbrias tipo 1, las fimbrias de tipo 3 son insensibles a manosa y se ha demostrado que se unen a colágeno específicamente de tipo IV y V (Sebghati *et al.*, 1998). Las fimbrias tipo 3 no son necesarias para las infecciones pulmonares o del tracto urinario, pero sí para la formación de biopelículas en superficies abióticas (Schroll *et al.*, 2010).

El operon *mrk* (del inglés “mannose resistant Klebsiella-like hemagglutination”) está compuesto por seis genes requeridos para la expresión de fimbrias tipo 3. El gen *mrkA* codifica para la pilina principal y mayoritaria; el gen *mrkB* codifica para una proteína chaperona de pilinas; el gen *mrkC* codifica para una proteína integral de la membrana externa denominada Usher; el gen *mrkD* codifica para una proteína que se localiza en el extremo final de la fimbria; la cual funciona como adhesina y el gen *mrkF* codifica para una pilina minoritaria (Stahlhut *et al.*, 2013; Khater *et al.*, 2015).

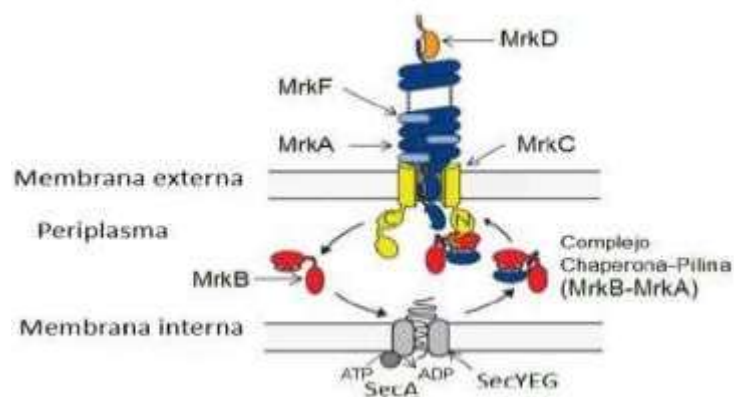


Figura 5. La maquinaria para la formación y el ensamblaje de la fimbria tipo 3 de *K. pneumoniae*. El sistema de secreción de la fimbria tipo 3 es de la clase “Chaperona-Usher”, el cual consta de la proteína chaperona de pilinas MrkB y de la proteína Usher MrkC, cuya función es actuar como translocón de la membrana externa para el correcto ensamblaje de las subunidades de pilina y posterior secreción de la fimbria. Adaptado de Thanassi *et al.*, 2012.

3.1.3.3 Las fimbrias tipo ECP

Las fimbrias tipo ECP están presentes en todos los patotipos de *E. coli* y son considerados un factor indispensable para la formación de biopelículas en superficies abióticas y para la colonización de diferentes líneas celulares epiteliales humanas (Saldaña *et al.*, 2014). Se ha reportado que las fimbrias tipo ECP también están presente en *K. pneumoniae*, mediante estudios de microscopía electrónica y microscopía de inmunofluorescencia se ha demostrado que dichas estructuras se expresan durante la formación de biopelículas y al contacto con células epiteliales HeLa (Alcántar-Curiel *et al.*, 2013).

3.1.4 Proteínas de la membrana externa

Las proteínas de membrana externa (OMPs del inglés outer membrane proteins) representan aproximadamente el 60% del peso de la membrana en *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium y *E. coli* (Nakae, 1989). Las proteínas de membrana externa pueden ser lipoproteínas o proteínas integrales de membrana con estructura de barril β . Las principales proteínas de membrana externa presentes en *K. pneumoniae* son: la proteína A de la membrana externa (OmpA), la porina OmpK35 y la porina OmpK36. Se ha observado que varias OMPs son importantes para la virulencia de *K. pneumoniae*, incluida la proteína OmpA. La proteína OmpA es una de las proteínas más abundantes en la membrana externa de bacterias Gram negativas y está altamente conservada entre los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (March *et al.*, 2013).

La proteína OmpA tiene un papel importante en el mantenimiento de la integridad celular, en la conjugación, en la división celular y en la habilidad para invadir células de mamíferos. En *K. pneumoniae*, OmpA ayuda a la resistencia contra los péptidos catiónicos antimicrobianos y a la evasión de la fagocitosis mediada por macrófagos alveolares (March *et al.*, 2013); no obstante, los resultados de experimentos con la proteína OmpA son controversiales. Se ha demostrado que la proteína OmpA purificada se une a las células epiteliales bronquiales, así como a las células

dendríticas (CD) y los macrófagos. Lo que conduce a una mayor producción de citocinas (Pichavant *et al.*, 2003; Jeannin *et al.*, 2005; Jeannin *et al.*, 2002). Por otro lado, la presencia de OmpA purificada en los pulmones induce la regulación positiva de la producción de citocinas y quimiocinas, lo que conduce a un posterior reclutamiento transitorio de neutrófilos (Pichavant *et al.*, 2003).

Una mutante en OmpA provocó una producción amplificada de IL-8 (Interleukin) en células epiteliales bronquiales *in vitro* y un aumento de los niveles de TNF- α (Tumor Necrosis Factor) e IL-6 en pulmones de ratón en comparación con una cepa isogénica que expresa OmpA (March *et al.*, 2011). Además, esta mutante con delección en *ompA* atenuó la neumonía en un modelo ratón. Las proteínas OmpK35 y OmpK36 constituyen las porinas de mayor importancia en *K. pneumoniae* a través de las cuales se produce un paso selectivo de moléculas hidrófilas, tales como nutrientes y antibióticos. Las cepas mutantes en 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 (Tsai *et al.*, 2011). Mientras que una regulación a la baja de estas porinas confiere una mayor resistencia a antibióticos, ya que las porinas probablemente sirven como canales que permiten la entrada de los antibióticos a la bacteria. (Hernandez-Alles *et al.*, 2000). En términos de virulencia, la ausencia de las porinas OmpK35 y OmpK36 puede resultar perjudicial para *K. pneumoniae* (Tsai *et al.*, 2011). Se ha demostrado que *ompK36* es importante para la virulencia de *K. pneumoniae*. Esta mutante puede colonizar el hígado, pero no puede persistir, después de la inyección intraperitoneal (Chen *et al.*, 2010). Asimismo, en un modelo de ratón, las mutantes con delección en *ompK36*, provocaron una mortalidad significativamente menor en comparación a la mortalidad provocada por la cepa silvestre (Chen *et al.*, 2010; March *et al.*, 2013).

3.1.5 Cápsula

La cápsula de *K. pneumoniae* es un polisacárido ácido, que llega a medir hasta 160 nm de ancho, compuesto generalmente de unidades repetitivas de 3 a 6 azúcares como: glucosa, galactosa, fucosa, manosa, ramnosa, además de ácidos urónicos (Clements *et al.*, 2008). Las variantes en la composición del polisacárido de la cápsula permiten la clasificación de *K. pneumoniae* en 78 serotipos de acuerdo a este antígeno. Los antígenos K1, K2, K5, K54 y K57 poseen mayor relevancia clínica porque han sido los que se han aislado con mayor frecuencia de pacientes con patologías graves (Turton *et al.*, 2010; D'Andrea *et al.*, 2014).

Los genes que codifican para la cápsula de *K. pneumoniae* varían de acuerdo al serotipo capsular, entre 16 a 20 genes, los cuales están organizados en tres unidades transcripcionales consecutivas que dan origen a un gran número de proteínas involucradas en la biosíntesis (*galF*, *PPC*, *gmd*, *wcaG*, *wcaH*, *wcaI*, *wcaJ*, *gnd*, *manC*, *manB*, *ugd*) y exportación (*wzi*, *wza*, *wzb*, *wzc*, *wzx*, *wzy*) de los componentes de dicha estructura molecular sobre la superficie bacteriana (D'Andrea *et al.*, 2014).

La cantidad de la cápsula se ha relacionado con la virulencia de los aislados (Paczosa y Meccas, 2016). Los serotipos capsulares K1 y K2 son los que presentan mayor cantidad de cápsula (Mizuta *et al.*, 1983; Podschun y Ullmann *et al.*, 1998). Estos serotipos son los más virulentos en el modelo de infección murino (Tsay *et al.*, 2002). La cápsula actúa como un escudo y confiere resistencia contra la actividad bactericida del suero; evitando que la proteína C3 del complemento se una a la membrana de la bacteria. La cápsula también brinda protección a la bacteria contra las células fagocíticas; impidiendo el reconocimiento de antígenos que se encuentran en su membrana, (Figura 6).

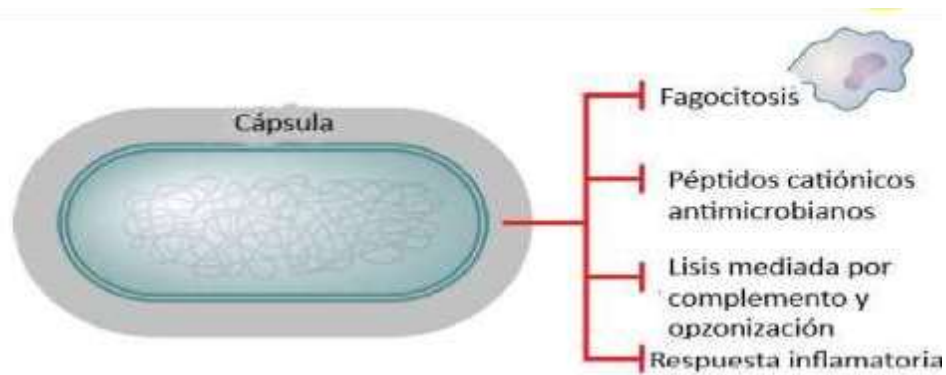


Figura 6. Funciones de la cápsula en *K. pneumoniae*. Tomado de Paczosa y Mecsas, 2016.

3.1.6 Proteínas nucleoides

Las proteínas nucleoides o más recientemente nombradas proteínas asociadas al nucleoide inicialmente se describieron como piezas arquitectónicas para el mantenimiento del cromosoma y posteriormente se descubrió que participan en la regulación de diversos procesos del DNA bacteriano (Dorman y Deighan 2003).

3.1.6.1 FIS

La proteína FIS (factor de estimulación para la inversión, por sus siglas en inglés) se identificó por primera vez en 1985 en *E. coli*, como un factor requerido para estimular las reacciones de inversión sitio específicas mediada por la familia de DNA recombinasas Hin, Gin y Cin (Haffter y Bickle, 1987). La proteína FIS está conformada por cuatro hélices α . Posee un peso de 11.2 kDa y existe como homodímeros en solución. FIS se une al DNA por medio de un motivo hélice giro-hélice ubicado dentro de la mitad C-terminal de la molécula (Koch *et al.*, 1991; Kostrewa *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 1986, Koch y Kahmann, 1986). El gen codificante de la proteína FIS se ha encontrado en proteobacterias gama y beta, pero no en bacterias Gram positivas. FIS se une de manera específica a una secuencia palindrómica de 15 pb. Se estima que la curvatura creada por la unión de FIS a uno de estos sitios específicos varía de 45° a 90° . La proteína FIS no es esencial para la supervivencia, pero es un regulador global de la expresión génica

en muchas bacterias Gram negativas (Ishihama, 1999). 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 se une de manera específica 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. La proteína FIS influye en el estado topológico del DNA en la célula reprimiendo la DNA girasa y estimulando la expresión genética de la topoisomerasa I (Schneider *et al.*, 1999). De esta manera, FIS actúa para preservar las formas intermedias superenrolladas de DNA evitando cambios extremos.

FIS también puede funcionar como un represor de la transcripción evitando la unión de la RNA polimerasa con la región promotora. Una de las características comunes en los promotores reprimidos por FIS es la presencia de múltiples sitios de unión dentro y alrededor del sitio de unión a la RNA polimerasa. Asimismo, FIS funciona como un activador de la transcripción de manera semejante a la represión; los genes activados por FIS tienen varios sitios de unión cerca de su región promotora. Se sabe de dos mecanismos para la activación de la expresión génica por parte de FIS. La primera es la interacción directa con el dominio C-terminal de la subunidad α (α CTD) de la RNA polimerasa. El contacto entre FIS y α CTD promueve la unión de la RNA polimerasa que conduce a la formación y aumento de vida de los complejos abiertos (Bokal *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1994; Bartlett *et al.*, 2000). El segundo mecanismo propuesto para la activación de la transcripción por medio de FIS es a través de la estabilización de un microbucle de DNA corriente arriba del promotor (Travers y Muskhelishvili, 1998). FIS también puede funcionar de manera indirecta para mejorar la transcripción, por ejemplo, puede actuar como un antagonista de la represión causada por H-NS (Afflerbach *et al.*, 1999; Falconi *et al.*, 1996, Falconi *et al.*, 2001; Tippner *et al.*, 1994). La recombinación por inversión sitio-específica es otro de los procesos en los que participa la proteína FIS. Este proceso es catalizado por un grupo de invertasas (Johnson, 2002) y se lleva a cabo dentro de un complejo de nucleoproteínas llamado invertasoma. Los sitios de recombinación unidos por la DNA invertasa están en contacto con FIS unida a una

región de DNA denominada como potenciador (Heichman y Johnson, 1990). El invertasoma se ensambla en la base de una rama dentro del DNA superenrollado; los sitios de recombinación son alineados de tal manera que el intercambio de hebras de DNA resulta en la inversión del DNA intermedio; dichas reacciones ocurren tanto en los cromosomas bacterianos como en genomas de fagos y plásmidos (Johnson *et al.*, 2005).

3.1.6.2 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. Esta proteína está conformada por las subunidades alfa y delta codificadas en diferentes genes; las dos subunidades tienen aproximadamente un 35% de identidad entre sí. El peso de las subunidades es de 9.5 y 11 kDa, respectivamente (Nash, 1981). La proteína IHF se une a secuencias de 30 a 35 pb de longitud, siendo estos sitios asimétricos. Los sitios de unión contienen un elemento central con la secuencia consenso WATCAANNNTTR (donde W es A o T, R es una purina y N es cualquier base). Esta proteína participa en la regulación transcripcional en bacterias Gram negativas. La proteína IHF se requiere para el desarrollo de diversos virus incluso el bacteriófago lambda. De hecho, IHF se describió originalmente como una proteína huésped que se requiere para la integración sitio-específica del genoma lambda en *E. coli*. La función principal de la proteína IHF es inducir curvas de hasta 180°. La proteína IHF tiene algunas de las características de un factor de transcripción convencional, ya que es capaz de reclutar a la RNA polimerasa hacia los promotores blanco. Además de su actividad de doblado del DNA, puede influir durante la transcripción donde facilita el contacto entre las proteínas reguladoras y la RNA polimerasa (Santero *et al.*, 1992). La flexión del DNA también proporciona un medio para favorecer el contacto físico entre segmentos distantes de DNA o proteínas que están unidas a esos segmentos de DNA; este mecanismo es particularmente importante en promotores que dependen del factor sigma σ^{54} . Los cuales son activados por una proteína que se une

aproximadamente a 150 bp río arriba del sitio promotor, en un sitio conocido con el nombre de potenciador o enhancer. La flexión de 180° del DNA por IHF facilita el contacto físico entre el activador de la transcripción unido al potenciador y la RNA polimerasa unida al promotor (Bertoni *et al.*, 1998; Carmona y Magasanik, 1996). De manera contraria, IHF puede inhibir directamente la transcripción en varios sistemas al unirse a sitios específicos que se superponen a las regiones -10 ó -35 del promotor en cuestión. Otra forma en la que IHF regula la transcripción genética es mediante la transmisión del estrés torsional (Johnson *et al.*, 2005). La curvatura inducida por IHF en el DNA del fago lambda también es crucial para una recombinación eficiente, ya que IHF funciona como un elemento arquitectónico específico de secuencia en el ensamblaje de estructuras de nucleoproteínas llamadas intasomas (Azaro y Landy, 2002; Snyder *et al.*, 1989). IHF regula la expresión de diversos genes que están involucrados en una gran cantidad de procesos, además de la transposición (Haniford, 2006; Saha *et al.*, 2013), replicación de plásmidos y la transferencia de plásmidos mediada por conjugación (Karl *et al.*, 2001). También se sabe que la proteína IHF interactúa con la proteína DnaA para determinar su posición dentro del origen de la replicación cromosómica (Polaczek *et al.*, 1998). La expresión de diversos genes es influenciada de manera indirecta por la proteína IHF. Por ejemplo, IHF regula la expresión de genes necesarios para la respiración anaeróbica, porque la expresión de FNR es regulada entre otros factores por IHF (Douglas *et al.*, 2000). Además, se ha propuesto que IHF funciona directamente como un anti-activador de CRP; a su vez, CRP activa a *acs* que codifica la acetil-coenzima A sintetasa, una enzima de alta afinidad que permite a las células buscar el acetato durante la inanición de carbono. IHF también ha demostrado tener un papel en la regulación de genes que participan en respuesta a condiciones de alta osmolaridad como el operon *proU* que codifica para un sistema de transporte el cual media la acumulación de solutos compatibles (Khodr *et al.*, 2014).

3.1.6.3 HU

El descubrimiento de la proteína HU se realizó en 1975; se aisló como una pequeña proteína de unión al DNA de la cepa U93 de *E. coli*. En un principio fue denominada como factor U, sin embargo, debido a sus propiedades y características parecidas

a las histonas eucariotas se le denominó proteína “HU” (Rouvière-Yaniv y Gros, 1975). La proteína HU existe como homodímero en la mayoría de las bacterias, pero en las *Enterobacteriaceae* forma un heterodímero (Pettijohn, 1988). En *E. coli*, la proteína HU puede formar un heterodímero que consta de dos subunidades: HU-a y HU-b, codificados por los genes *hupA* y *hupB*. El heterodímero es la forma predominante y muestra una mayor afinidad inespecífica de secuencia por el DNA bicatenario. La unión de HU da como resultado una torsión y un enrollamiento del dúplex mediante la inserción de dos residuos de prolina separados por nueve pares de bases a lo largo del contorno del DNA (Johnson *et al.*, 2005). En *Mycobacterium tuberculosis* HU es un homodímero que consta de una sola subunidad HU-b, codificada por el gen *hupB* (Bhowmick *et al.*, 2014). En la bacteria *Clostridium difficile*, por el contrario, solo el gen *hupA* ha sido identificado (Oliveira Paiva *et al.*, 2019).

La proteína HU se encuentra entre las proteínas asociadas al nucleóide más abundantes y conservadas (Azam *et al.*, 1999); está presente en todo el ciclo de crecimiento con hasta una proteína HU por 300-400 pares de bases en la fase logarítmica que es donde se encuentra la mayor abundancia alcanzando 30,000 a 55,000 moléculas por célula en *E. coli* (Azam *et al.*, 1999). La unión de la proteína HU a todos los ácidos nucleicos y sus híbridos se lleva a cabo de una manera no específica de secuencia (Balandina *et al.*, 2002), pero exhibe una alta afinidad por estructuras de DNA anormales como uniones de cuatro vías, huecos o mellas que se generan, por ejemplo, durante el daño del DNA (Kamashev y Rouvière-Yaniv, 2000). Aunque HU se une de manera independientemente de secuencia, presentados modos de unión al DNA: se une con baja afinidad al DNA lineal a través de un mecanismo de bloqueo de fosfato, pero se une al DNA dañado (retorcido) o cruciforme específicamente y con alta afinidad a través de

sus largos brazos de lámina β (Kamashev y Rouviere-Yaniv, 2000; Swinger *et al.*, 2003). Las interacciones HU-DNA puede dar lugar a curvaturas de 150° a 180° si actúa como dímeros individuales este complejo HU-DNA es más flexible en comparación al DNA desnudo debido a la flexión inducida en el dúplex. No obstante, cuando actúa de manera cooperativa en un modo de unión lado a lado, estabilizan la hélice del

DNA en el nucleóide (Van Noort *et al.*, 2004). De esta manera se puede formar un filamento de nucleoproteína con aproximadamente un dímero de HU por cada nueve pares de bases (Guttula *et al.*, 2018).

La proteína HU participa en una serie de procesos regulatorios que controlan la expresión de diversos genes. Se ha sugerido que HU actúa como un aislante funcional de las unidades de transcripción al limitar el superenrollamiento del DNA generado por la transcripción (Berger *et al.*, 2016). HU puede participar en la represión de la transcripción, como en la expresión del gen *gal* en *Salmonella* (Mangan *et al.*, 2011). En *E. coli* esto ocurre con la formación de un complejo de represión en los que la proteína HU induce una curvatura que favorece la represión ejercida por las proteínas GalR. También, la proteína HU tiene la capacidad de inducir un superenrollamiento negativo en moléculas de DNA relajadas en presencia de topoisomerasa I, por lo tanto, puede influir en la expresión génica de diversos genes (Rouvière-Yaniv *et al.*, 1979).

La proteína HU también participa en la traducción de proteínas. Un ejemplo de ello es la proteína RpoS, donde se ha demostrado que HU puede unirse de manera específica al RNAm de RpoS (Balandina *et al.*, 2001). En *B. subtilis*, HU se une a un dominio Alu de RNA citoplasmático (Nakamura *et al.*, 1999); además, HU también reconoce el RNAm de la proteína DsrA que modula la traducción de reguladores celulares clave como RpoA o H-NS (Lease y Belfort, 2000). Otro de los procesos en los que interviene HU es la recombinación sitio-específica donde apoya la formación de complejos en bucle del DNA; por ejemplo, en el sistema de variación de fase flagelar de *Salmonella enterica serotipo Typhimurium* (Johnson *et al.*, 2005). HU también favorece el ensamblaje del transposoma facilitando la transposición. En el caso del fago Mu, se ha sugerido que la proteína HU funciona como un “sensor” de superenrollamiento para regular la

transposición en función del nivel de superenrollamiento de la célula donante (Kobryn, Lavoie y Chaconas, 1999). Otra de las funciones descritas para la proteína HU es la reparación en donde esta proteína tiene un papel importante en la resolución de las uniones de Holliday.

El recubrimiento del DNA por la proteína HU proporciona una protección indirecta. Se ha demostrado que HU protege al DNA de las roturas inducidas por la radiación, ayuda a la estabilización del ácido nucleico contra la desnaturalización térmica (Rouvière-Yaniv *et al.*, 1977) e inhibe la degradación nucleolítica del DNA dañado (Boubrik and Rouviere-Yaniv, 1995; Bi *et al.*, 200). HU también juega un papel importante en el inicio de la replicación del DNA (Bonneyoy y Rouvière-Yaniv, 1992) y la división celular (Preobrajenskaya *et al.*, 1994).

En *E. coli*, la proteína HU controla la expresión del 8% del genoma gracias a la remodelación de la topología del DNA. Estos cambios en la expresión de los perfiles de transcripción están asociados con la adaptación al ambiente hostil de la célula huésped o con respuesta al estrés y tienen importantes impactos en la fisiología celular (Kar *et al.*, 2005; Oberto *et al.*, 2009), incluyendo la expresión de genes involucrados en respiración anaeróbica, respuestas celulares al estrés osmótico, al estrés ácido y la respuesta al daño del DNA (Oberto *et al.* 2009; Kar *et al.*, 2005; Bi *et al.*, 2009).

En *Salmonella enterica serotipo Typhimurium*, HU controla tres regulones que coordinan la virulencia, respuesta al estrés y su fisiología general (Mangan *et al.*, 2011). En *H. pylori*, la proteína HU está involucrada en la reparación por recombinación y es capaz de proteger al DNA contra el daño oxidativo (Wang *et al.*, 2012). En *M. tuberculosis*, la proteína HU es un objetivo potencial para el desarrollo de terapias contra la tuberculosis (Bhowmick *et al.*, 2014).

4 Antecedentes

Las proteínas nucleoides han sido ampliamente estudiadas en muchas bacterias patógenas, y estas proteínas pueden regular la expresión de diversos genes incluyendo genes que codifican para factores de virulencia. La ausencia de

proteínas nucleoides genera efectos que difieren según la bacteria que se estudie. Por ejemplo, en términos de la proteína FIS, la ausencia de esta no es letal en *Vibrio cholerae*, pero genera un retraso en el crecimiento bacteriano durante el inicio de la fase logarítmica (McLeod *et al.*, 2006). Trabajos de transcriptómica han demostrado que FIS regula la expresión de diversos genes relacionados con la expresión de la cápsula en *Pasteurella multocida* (Steen *et al.*, 2010), mientras que en *Shigella flexneri* y *E. coli* se ha relacionado con la virulencia bacteriana (Steinman y Derrsch, 2013; Saldaña *et al.*, 2009). En *Vibrio cholerae*, FIS regula la expresión de HarP, un regulador maestro del “quórum sensing” (Lenz y Bassler 2007). La ausencia de la proteína IHF puede generar un defecto en el crecimiento en *Salmonella enterica serotipo Typhimurium* y *E. coli* (Mangan *et al.*, 2006; Friedman, 1988). La ausencia de IHF provoca una menor formación de biopelículas en *E. coli* uropatógena, *Haemophilus influenzae* y *Salmonella enterica serotipo Enteritidis* (Devaraj *et al.*, 2015; Devaraj *et al.*, 2017; Leite *et al.*, 2017). Asimismo, trabajos de transcriptómica han revelado que IHF regula la expresión de genes relacionados con la resistencia al estrés ácido en *E. coli* (Bi y Zhang 2014) y genes relacionados con la expresión de un sistema de secreción tipo VI en *Vibrio fluvialis* (Pan *et al.*, 2018).

En el caso de HU, la ausencia de esta proteína nucleoide provoca inviabilidad celular en *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae* y otros organismos Gram positivos (Ferández *et al.*, 2018; Li y Waters 1998; Bartels *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2009), mientras que en *E. coli* genera un fenotipo leve (Wada *et al.*, 1988). En otras bacterias, la ausencia de HU provoca una expresión diferencial de genes involucrados con la virulencia bacteriana. En *Francisella tularensis* y *Salmonella enterica serotipo Typhimurium*, HU regula la expresión de genes que pertenecen a islas de patogenicidad (Stojkova *et al.*, 2018; Mangan *et al.*, 2011).

Específicamente en *Salmonella*, HU regula la expresión de SPI-1 y SPI-2 por lo que está involucrado en la invasión del lumen intestinal del huésped y la sobrevivencia dentro de las vacuolas de los macrófagos (Dillon y Dorman 2010; Ó Croínin, 2006). En *Vibrio parahaemolyticus*, HU regula la expresión de genes que codifican para proteínas que pertenecen a sistemas de secreción tipo 3

(Phan *et al.*, 2015). En *E. coli*, HU regula la expresión de genes relacionados con la protección al DNA por estrés ácido y estrés por alta osmolaridad (Oberto *et al.*, 2009). En *Porphyromonas gingivalis* HU se ha relacionado con la producción de polisacáridos capsulares, síntesis de la pared celular, la división celular y la absorción de hierro (Priyadarshini *et al.*, 2013).

En el caso de la proteína nucleoide H-NS, nuestro grupo de trabajo reportó que la ausencia de H-NS en *K. pneumoniae* da como resultado un fenotipo hipermucoviscoso generado por la sobreexpresión de genes relacionados con la expresión de la cápsula lo cual produjo una disminución en la fagocitosis mediada por macrófagos (Ares *et al.*, 2016). Además, la ausencia de H-NS produjo una menor expresión de la pilina *mrkA*, originando una baja producción de biopelículas y afectando la adherencia a macrófagos y células epiteliales (Ares *et al.*, 2016).

5 Planteamiento del problema

K. pneumoniae es uno de los principales patógenos causantes de enfermedades nosocomiales. Los principales factores de virulencia de esta bacteria son: la cápsula, las fimbrias, el lipopolisacárido, las proteínas de membrana externa y los sideróforos. Las proteínas nucleoides tienen la capacidad de regular la expresión de factores de virulencia en diversas bacterias patógenas. Actualmente no existen reportes sobre el papel de las proteínas nucleoides FIS, IHF y HU en la expresión de factores de virulencia de *K. pneumoniae*.

Con base en la información anterior este trabajo está dirigido a responder la siguiente pregunta:

¿Qué efecto tienen las proteínas nucleoides FIS, IHF y HU en la expresión de factores de virulencia de *K. pneumoniae*?

6 Hipótesis

Sí las proteínas nucleoides FIS, IHF y HU regulan la expresión de factores de virulencia en otras bacterias, entonces en las cepas de *K. pneumoniae* mutadas

en los genes que codifican dichas proteínas, se observará una alteración en la expresión de los factores de virulencia como la cápsula, las fimbrias, el lipopolisacárido, las proteínas de membrana externa y los sideróforos.

7 Objetivo general

Caracterizar la función reguladora de las proteínas nucleoides FIS, IHF y HU sobre la expresión de los factores de virulencia de *K. pneumoniae*.

7.1 Objetivos experimentales

- Generar mutantes nulas en los genes que codifican para las proteínas nucleoides FIS, IHF y HU en *K. pneumoniae*.
- Analizar la expresión de los genes que codifican para la cápsula, las fimbrias, el LPS, las proteínas de membrana externa y los sideróforos en las cepas mutantes Δfis $\Delta himA$ y $\Delta hupB$, y compararla con la cepa silvestre de *K. pneumoniae*.

8 Metodología

8.1 Cepa bacteriana y líneas celulares

Para este proyecto se utilizó la cepa de *K. pneumoniae* designada 123/01, la cual previamente se aisló de un paciente pediátrico con neumonía nosocomial a partir de un lavado bronquial en el Hospital Civil de Guadalajara. La cepa se mantuvo en glicerol al 15% a -70 °C hasta su uso.

8.2 Medios de cultivo

Los cultivos bacterianos se realizaron en medio TSB (Tryptic Soy Broth) (BD), que contiene bacto Tryptone (digerido pancreático de caseína) 17,0 g/L, bacto Soytone (digerido péptico de harina de soja) 3,0 g/L, glucosa (dextrosa) 2,5 g/L, cloruro sódico 5,0 g/L, fosfato dipotásico de hidrógeno 2.5 g/L.

El medio LB fue utilizado para cultivar el inóculo primario. El medio LB (lysogenia

broth) (DIFCO) contiene 10 g/L de peptona de caseína, 5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de NaCl. El agar LB también se empleó y se preparó añadiendo 15 g/L de agar bacteriológico (DIFCO) al medio LB.

8.3 Antibióticos

Cuando fue necesario, los medios de cultivo se suplementaron con antibióticos. Estos antibióticos se añadieron al medio estéril a partir de una solución concentrada conservada a -20 °C de acuerdo a las instrucciones establecidas por Sambrook y colaboradores (1989). La concentración final de los antibióticos utilizados fueron las siguientes: ampicilina a 200 µg/mL, kanamicina a 50 µg/mL y tetraciclina a 10 µg/mL.

8.4 Generación de las cepas mutantes Δfis , $\Delta himA$ y $\Delta hupB$

A partir de la cepa silvestre 123/01 de *K. pneumoniae*, a la que previamente se introdujo el plásmido pKD119 (el cual posee un promotor inducible con arabinosa, λ -Red y un gen de resistencia a tetraciclina), se inactivaron los genes *fis*, *himA* y *hupB*, presentes en el cromosoma bacteriano, se reemplazó su secuencia nucleotídica por un gen de resistencia a kanamicina, este gen se generó por PCR utilizando oligonucleótidos que contienen las secuencias homólogas de los genes a mutar. Debido a esto, las secuencias permitieron la recombinación homóloga, en las regiones flanqueantes a cada gen (Datsenko y Wanner, 2000).

8.4.1 Amplificación del gen de resistencia a kanamicina

El gen de resistencia a kanamicina del plásmido pKD4 se amplificó utilizando oligonucleótidos que en su extremo 5' contienen secuencias homólogas (de 45 nucleótidos) a los genes *fis*, *himA* y *hupB* (H1 y H2), más las secuencias correspondientes a los extremos flanqueantes (de 20 nucleótidos) al gen de resistencia a kanamicina, los cuales se denominan P1 y P2.

8.4.2 Preparación de células competentes

El inóculo primario de la cepa 123/01 se realizó tomando 10 μ L de un vial de 2 mL que se encontraba a -70°C al 15% de glicerol, se cultivó en 5 mL de medio TSB a temperatura ambiente durante toda la noche; posteriormente, se inocularon 500 μ L del cultivo primario en 10 mL de medio TSB suplementado con L-arabinosa a una concentración final de 10 mM (Sigma) y 10 μ g/ml de tetraciclina. El cultivo se incubó a temperatura ambiente en agitación hasta alcanzar una D.O. entre 0.7 y

0.8 a 600mn (aproximadamente 3 h). Después las células se cosecharon por centrifugación a 3000 x g a 4°C durante 15 min y se realizaron tres lavados con 10 mL de agua fría.

Las células competentes (aproximadamente 75 μ L) se electroporaron con 100 ng del producto de PCR. Una vez sometidas al pulso eléctrico, las células se resuspendieron en 1 mL de medio TSB fresco y se incubarán a 30°C durante 3 h para favorecer la recombinación y permitir la expresión de la resistencia al antibiótico. La selección de las mutantes se realizó sembrando del cultivo anterior, 100 μ L en agar LB suplementado con kanamicina. Las placas se incubaron a 37

$^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Posteriormente, para eliminar el plásmido pKD119 se sembró en agar LB sin antibiótico y se incubó a 42°C durante 24.

Las posibles colonias mutantes se sometieron a una amplificación por medio de PCR con oligonucleótidos flanqueantes de los genes *fis*, *himA* y *hupB* para comprobar la inserción del gen de resistencia al antibiótico. La amplificación se comprobó mediante un corrimiento electroforético a 80V por 60 min en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio a una concentración de 0.83 μ g/mL, colocando en el pozo 5 μ L de producto de PCR y usando como regulador TAE 1X.

8.4.3 Diseño de los iniciadores de los genes estudiados en *K. pneumoniae*

Los genes que se estudiaron en el presente trabajo se muestran en la Tabla 1, donde se señala el producto para el cual codifican y la función de cada uno de ellos. Como gen normalizador para el análisis de la expresión genética se utilizó el gen constitutivo *rrsH*, el cual codifica para el rRNA 16S de *K. pneumoniae*. Los iniciadores se diseñaron utilizando el programa “Primer 3 plus”; dichos iniciadores se seleccionaron con base en los siguientes criterios: la Tm de entre 57 °C y 61 °C y el tamaño del amplicón generado debe estar entre 95 y 205 pb. Una vez diseñados, los iniciadores se mandaron a sintetizar al Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Tabla 1. Genes involucrados en la síntesis de la cápsula, de las fimbrias, del lipopolisacárido, de las proteínas de membrana externa y de los sideróforos de *K. pneumoniae*.

Gen	Secuencia del iniciador (5 - 3')	Amplicón (pb)	Función
KP1_3726 (<i>galF</i>)	F: CAAAGGCAATTCCAAAGGAG R: TCGTCCACCAGAACAATCTC	109	Producción de subunidades de glucosa para la cápsula
KP1_3721 (<i>wzi</i>)	F: CAGGGGTTTGGTCAGACACA R: CGTTGAAGCGTGATCCGTTG	136	Ensamblaje de los polisacáridos capsulares sobre la superficie
KP1_3703 (<i>manC</i>)	F: AGCGGCATGTTTATGTTCCG R: AAATGTCATGCGGGATGCTG	139	Producción de subunidades de manosa para la cápsula
KP1_4561 (<i>mrkA</i>)	F: CCATGCAGCTGATACCAATG R: GCAGCCTGGCAGTTAGAGAC	201	Pilina mayoritaria del pili tipo 3
KP1_4571 (<i>fimA</i>)	F: ACTGTTACCACCACCGAAGC R: CTGGATACCGATGCCGATAC	199	Pilina del pili tipo 1
KP1_1146 (<i>ecpA</i>)	F: ACCTCGCGTCTTATCACCAA R: CCGCTGATGATGGAGAAAG	183	Pilina del pili ECP
KP1_3698 (<i>wzm</i>)	F: ACGCTGAACCTGTTTTTCCG R: ATACTCGCTAGCGGATTGTAGG	126	Síntesis del antígeno “O” del lipopolisacárido

KP1_1914 (<i>msbA</i>)	F: CAAAGGCAATTCCAAAGGAG R: TCGGTCACCAGAACAATCTC	97	Síntesis del lípido "A" del lipopolisacárido
KP1_5313 (<i>rfaD</i>)	F: CAGGGGTTTTGGTCAGACACA R: CGTTGAAGCGTGATCCGTTG	100	Síntesis del "core" del lipopolisacárido
KP1_1929 (<i>ompK35</i>)	F: CAAAACGGACGCACTGTTTA R: TGTCCTCTTTTCAGCCAGTT	102	Porina OmpF
KP1_3869 (<i>ompK36</i>)	F: CAAAGGCAATTCCAAAGGAG R: TCGGTCACCAGAACAATCTC	132	Porina OmpC
KP1_1958 (<i>ompA</i>)	F: ACGGTATCGTCGCATAAAGG R: AGGTGATGTTTTCGGTCAGC	119	Proteína integral de membrana externa OmpA
KP1_1002 (<i>fhuA</i>)	F: CAAAGGCAATTCCAAAGGAG R: TCGGTCACCAGAACAATCTC	112	Captación de hierro
KP1_1548 (<i>fes</i>)	F: CAGGGGTTTTGGTCAGACACA R: CGTTGAAGCGTGATCCGTTG	104	Captación de hierro
KP1_6121 (<i>rrsH</i>)	F: CAGCCACACTGGAAGTGA R: GTTAGCCGGTGCTTCTCTG	204	Gen normalizador

8.4.4 Extracción del DNA genómico

La extracción del DNA genómico se realizó de acuerdo a la metodología descrita por González-y-Merchand y colaboradores (1996). Para esto, 10 mL de las cepas de *K. pneumoniae* crecidas toda la noche se centrifugaron a 2500 x g durante 10 min; el sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en 500 µL de regulador de lisis (cloruro de guanidinio 6 M, Tween 80 al 10%, EDTA 0.5 M y βMercaptoetanol 14.7 M). Posteriormente, la suspensión se transfirió a tubos de 2 mL con tapón de rosca. Inmediatamente después los tubos se sometieron a tres ciclos de choque térmico, cada uno de 10 min a -70 °C en un ultracongelador y 10 min a 65 °C en un thermoblock (Eppendorf). Posteriormente, se adicionó un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y las mezclas se agitaron suavemente en el vórtex y se centrifugarona 16000 x g a temperatura ambiente durante 5 min. La fase acuosa se recuperó y se le agregaron dos volúmenes de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1); se agitaron en vórtex para

después proceder a centrifugarnuevamente bajo las mismas condiciones. La fase acuosa se recuperó nuevamente y el DNA se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto; inmediatamente después los tubos se colocaron a una temperatura de -20°C durante 24 h para favorecer la precipitación. Los tubos se centrifugaron nuevamente durante 15 min a $16000 \times g$ a temperatura ambiente, posteriormente se eliminó el sobrenadante y la pastilla se lavó con $500 \mu\text{L}$ de etanol al 70%, después se eliminó el exceso de etanol secando el DNA en el secador “DNA110 speedvac” (ThermoScientific; USA). La muestra se resuspendió en $50 \mu\text{L}$ de agua destilada estéril. El DNA se cuantificó por espectrofotometría utilizando el Nano Drop-1000 (ND1000); se determinó su calidad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%; finalmente se almacenó a -20°C hasta su uso.

8.4.5 Amplificación de los genes mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final

Con el fin de confirmar que los iniciadores amplificaron el producto esperado se realizaron las PCR de punto final empleando las siguientes condiciones de la mezcla de reacción: $0.25 \mu\text{L}$ que corresponde a 1U de Taq polimerasa (Invitrogen), $2.5 \mu\text{L}$ de amortiguador de PCR 10X (Tris-HCl 200 mM pH = 8.4; KCl 500 mM) (Invitrogen), $1.5 \mu\text{L}$ de MgCl_2 a una concentración de 25 mM (Invitrogen), $0.5 \mu\text{L}$ de dNTPs a una concentración de 10 mM (Invitrogen), $1.0 \mu\text{L}$ de cada uno de los iniciadores a una concentración de $20 \mu\text{M}$ (Invitrogen), $1.0 \mu\text{L}$ de DNA genómico a una concentración de $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se llevó a un volumen final de $25 \mu\text{L}$ adicionando $17.5 \mu\text{L}$ de agua estéril libre de nucleasas.

Los tubos con la mezcla de reacción se colocaron en un termociclador Mastercycler® de Eppendorf; la amplificación consistió de un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 5 min, posteriormente 30 ciclos con las siguientes condiciones: 95°C por 1 min, 55°C por 30 s y 72°C por 1 min y finalmente un ciclo de extensión a 72°C por 10 min. Una vez terminada la reacción se comprobó la amplificación mediante un corrimiento electroforético a 80 V por 60 min, en gel

de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (0.83 µg/mL), colocando en cada pozo 5 µL de producto de PCR y usando como regulador TAE 1X.

8.5 Extracción del RNA total

La extracción del RNA se llevó a cabo de la siguiente manera: Rompimiento celular: el cultivo de bacterias (10 mL) en fase logarítmica se centrifugó a 8000 x g durante 10 min. El sobrenadante se desechó y la pastilla obtenida se resuspendió en 500 µL de solución de lisis (SDS 0.5%, Acetato de sodio 10 mM, EDTA 10 mM), la suspensión se colocó en microtubos de 2 mL.

Las bacterias se rompieron con vórtex de la siguiente manera: 3 ciclos de 1 min a velocidad máxima seguido de 1 min en incubación en hielo. Al lisado celular se añadirán 500 µL de fenol ácido (Sigma) precalentado a 65 °C, los tubos se agitaron vigorosamente y se incubaron a 65 °C durante 5 min en el thermoblock (Eppendorf; Alemania).

Después de la incubación, los tubos se centrifugaron a 16000 x g a 4 °C por 5 min y el lisado celular se recuperó en tubos limpios. A cada tubo se les agregaron dos volúmenes de etanol absoluto frío, dejando precipitar el RNA a -20 °C toda la noche.

Precipitación del RNA: los tubos obtenidos en la fase anterior se centrifugaron a 16,000 x g durante 10 min a 4 °C. El etanol se eliminó teniendo cuidado de no llevarse la pastilla obtenida y se lavó con 1 mL de etanol al 70%, se centrifugó a 16000 x g durante 5 min. El etanol se eliminó de la pastilla y se secó en "speedvac" por 10 min. Las pastillas se resuspendieron en 100 µL de agua DEPC para evitar degradación del RNA.

8.6 Purificación del RNA

A los tubos del paso anterior se les adicionaron 10 µL de regulador para DNasa y 1 µL de DNasa TURBO 10X (Ambion); posteriormente, se incubaron a 37 °C durante 30 min.

Pasado el tiempo de incubación, a cada tubo se le adicionó 10 µL del agente de inactivación de la DNasa y se mezclaron suavemente; se incubaron a

temperatura ambiente durante 5 min y se centrifugaron a 8,000 x g durante 2 min. La fase acuosa que contenía al RNA se transfirió a un tubo estéril.

Para comprobar la ausencia de DNA en las muestras de RNA, se tomaron 2 µL de cada RNA total extraído, para emplearlo en una PCR en tiempo real empleando iniciadores específicos para el gen del rRNA16S de *K. pneumoniae* (KPN16SF: 5' CAGCCACACTGGAAGTGA 3' y KPN16R: 5' GTTAGCGGTGCTTCTTCTG 3'); como control positivo de la PCR, se empleó el DNA genómico de la cepa silvestre. En forma simultánea se estableció la calidad del RNA, en este caso; 3 µL de cada muestra se analizaron mediante corrimiento electroforético a 80 V por 60 min en gel de agarosa al 2%, adicionado con hipoclorito de sodio al 1% y teñido con bromuro de etidio (0.83 µg/mL), se usó como regulador TAE 1X preparado con agua DEPC. Finalmente, las muestras de RNA se mantuvieron a -70 °C hasta su uso.

8.7 Obtención de cDNA mediante la transcripción reversa (RT) del RNA total

La transcripción reversa (RT) se realizó empleando el Kit "First Strand cDNA Synthesis" de Thermo Scientific®; USA.

Se realizó la siguiente mezcla de reacción en microtubos estériles:

- 1 µg de RNA total; el volumen necesario a partir de los extractos.
- 1 µL de iniciadores hexámeros al azar (150 ng/µL).
- El volumen necesario de agua libre de nucleasas contenida en el kit para llevar a un volumen final de 11 µL.

Se mezcló suavemente y se incubó a 65 °C por 5 min con la finalidad de eliminar las estructuras secundarias del RNA.

Posteriormente, la mezcla se colocó en hielo y se continuó con una segunda mezcla de reacción adicionando al tubo:

- 4 µL de regulador RT 5X.
- 1 µL de inhibidor de RNasa RiboLock (20 U/µL).
- 2 µL de una mezcla de dNTP's 10 mM.
- 2 µL de Transcriptasa reversa M-MuLV (100 U/µL).

La mezcla final de reacción se mezcló suavemente y se incubó a 25 °C por 5 min.

Posteriormente, se incubó a 42 °C durante 60 min. La enzima se inactivó calentando a 70 °C durante 5 min. La mezcla se colocó en hielo y finalmente se almacenó a -70 °C hasta su uso.

8.8 Amplificación de los genes mediante la PCR en tiempo real

Después de obtener el cDNA correspondiente a cada muestra, se procedió a cuantificar la expresión de los genes en estudio, mediante PCR en tiempo real, para lo cual, se empleó el kit comercial “LightCycler® 480 SYBR Green I Master” de Roche (USA). Las reacciones para los ensayos de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en placas de plástico de 96 pozos especiales para el equipo LightCycler® 480.

La mezcla de reacción para cada pozo consistió de:

- 1.5 µL de agua grado PCR contenida en el kit comercial.
- 1.0 µL de la mezcla de los iniciadores 20 µM.
- 5.0 µL de “LightCycler® 480 SYBR Green I Master” 10 X • 2.5 µL de cDNA.

Cada reacción se realizó por triplicado.

Con la mezcla de reacción se llenó cada pozo de la placa, se selló con una lámina plástica adherente y se centrifugó a 800 x g por 2 min.

Posteriormente se colocó en el equipo LightCycler® 480 (Roche) aplicando posteriormente el programa recomendado por el manual del usuario, el cual se describe a continuación: un ciclo a 95 °C durante 5 min, 45 ciclos en las siguientes condiciones: 95 °C durante 10 s, temperatura de alineamiento correspondiente a 59 °C y temperatura de elongación correspondiente a 72 °C durante 10 s (en este punto se hace la medición de fluorescencia), posteriormente un ciclo en las siguientes condiciones: 95 °C durante 5 s a una velocidad de 4.4 °C/s, 65 °C durante 1 min a una velocidad de 2.2 °C/s y 97 °C durante 5 s (durante esta fase se medirá la fluorescencia en forma continua para construir la curva de disociación) y un ciclo final de enfriamiento a 40 °C durante 10 s.

8.9 Determinación de la expresión genética relativa

Se determinó la expresión de los genes mencionados en la tabla 1, en las cepas de *K. pneumoniae* wt, Δ *fis*, Δ *himA*, Δ *hupB*. El método descrito por Livack y Schmittgen (2001), se utilizó para determinar la expresión genética en unidades de expresión relativa mediante la aplicación de la fórmula matemática $2^{-\Delta\Delta CT}$. La

Δ CT se determinó al restar el valor de CT (“crossing treshold”) del gen en estudio al valor de CT del gen normalizador ARNr 16S (*rrsH*). Todos los valores obtenidos se multiplicarán por el factor 1×10^6 con la finalidad de que el resultado final fuera mayor o igual a 1.

8.10 Curvas de crecimiento

Las curvas de crecimiento de la cepa silvestre, Δ *fis*, Δ *himA* y Δ *hupB* de *K. pneumoniae* se llevaron a cabo para determinar si existían diferencias en el crecimiento de las cepas mutantes con respecto a la cepa silvestre. Para esto, se incubaron en el medio TSB a 37 °C, en agitación constante de 150 rpm. La absorbancia de los cultivos se midió a 600 nm cada hora, durante 8 h.

9 Resultados

9.1 Generación de las cepas mutantes en los genes *fis*, *himA*, *hupB*

La generación de las cepas mutantes se llevó cabo mediante la eliminación de la secuencia que codifican los genes *fis*, *himA* y *hupB*. A diferencia de FIS, las proteínas IHF y HU son heterodímeros, por lo que la secuencia codificante del gen *fis* se eliminó completamente. Para IHF y HU se eliminaron los genes *himA* y *hupB*, que corresponden a la subunidad α y β de las proteínas IHF y HU, respectivamente. Los genes eliminados fueron sustituidos por un casete de resistencia a kanamicina. Para esto se utilizó el método de interrupción en un solo paso usando productos de PCR descrito por Datsenko y Wanner en el 2000. La figura 7 muestra la amplificación del casete de resistencia al antibiótico kanamicina para los genes *fis*, *himA* y *hupB*, el cual se amplificó usando como templado el plásmido pKD4. Las amplificaciones tienen el mismo peso en pares de bases, correspondientes a un peso aproximado de 1600 pares de bases (pb); esto nos indica que el casete de resistencia a kanamicina se amplificó correctamente.

La figura 8 muestra el diseño de los iniciadores los cuales poseen una región P (P1 y P2) cuya finalidad es la síntesis del gen de resistencia a kanamicina a partir del plásmido pKD4. Unida a la región P, se encuentra la región H (H1 y H2) esta regiones la encargada del reconocimiento homólogo entre el gen blanco y los extremos del casete de resistencia ya amplificada; lo que nos permite tener como resultado de amplificación un casete con el gen de resistencia a kanamicina flanqueado por secuencias homólogas al gen blanco.

La figura 9 muestra la amplificación del gen de resistencia al antibiótico kanamicina en las cepas mutantes. La inserción del gen de resistencia a kanamicina sustituyendo a los genes *fis*, *himA* y *hupB*, en las cepas mutantes, se corroboró por medio de PCR para lo cual se utilizaron iniciadores específicos que flanqueaban cada uno de los genes. Se utilizó como control el DNA genómico de la cepa silvestre en donde se obtuvo un amplicón menor a 500 pb para los genes *fis*, *himA* y *hupB*. El amplicón resultante de las cepas mutantes tuvo un peso de 1600 pb, tamaño correspondiente al gen de resistencia a kanamicina.

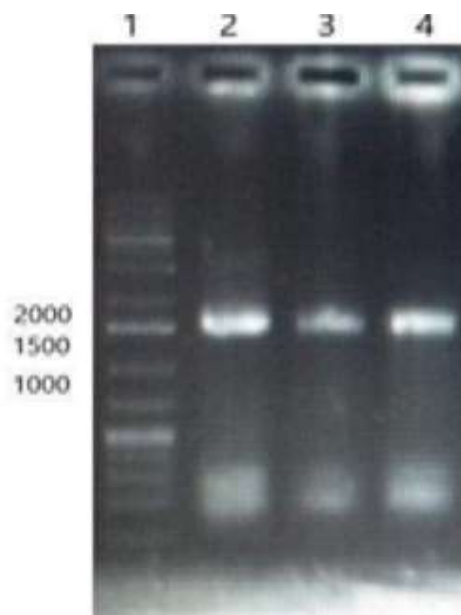


Figura 7. Electroforesis del gen de resistencia al antibiótico kanamicina amplificados con los iniciadores específicos para los genes *fis*, *himA* y *hupB*. Carril 1, marcador de peso molecular 1 KBplus Invitrogen®. Carril 2, 3 y 4 genes de resistencia a kanamicina

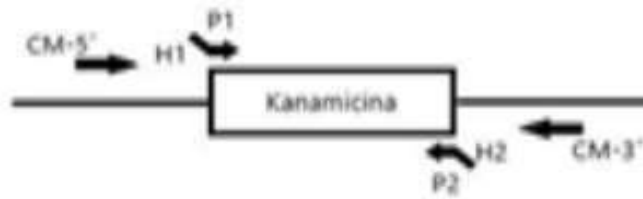


Figura 8. Diseño esquemático de los iniciadores para amplificar el gen de resistencia a kanamicina en del plásmido pKD4 (H1P1-H2P2) y diseño esquemático de iniciadores empleados para caracterizar la inserción del gen de resistencia a kanamicina (CM 5' - CM 3') en las mutantes

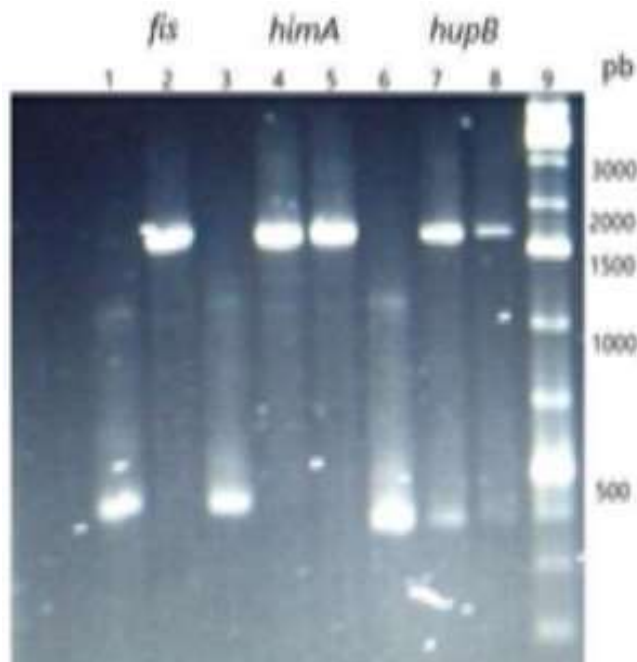


Figura 9. Electroforesis de la PCR utilizada para confirmar la mutación en los genes *fis*, *himA* y *hupB*. Carril 1, gen *fis*; carril 3, gen *himA*; carril 6, gen *hupB* (DNA genómico de la cepa silvestre). Carril 2, 4, 5, 7 y 8 genes de resistencia a kanamicina (DNA genómico de la cepa mutante). Carril 9, marcador de tamaño molecular 1 KB plus Invitrogen®. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1%.

9.2 Curvas de crecimiento de las tres cepas de *K. pneumoniae* silvestre y las mutantes Δfis , $\Delta himA$ y $\Delta hupB$

La gráfica de la absorbancia de los cultivos de las cuatro cepas de *K. pneumoniae* con respecto al tiempo de crecimiento mostró que a partir de las 2 horas hay una diferencia significativa en el crecimiento de las cepas mutantes con respecto a la silvestre. La cepa mutante $\Delta hupB$ fue la más afectada durante las 8 horas, sin embargo, las 3 cepas mutantes alcanzaron la fase estacionaria con lecturas de absorbancia similares a la cepa silvestre (Figura 10).

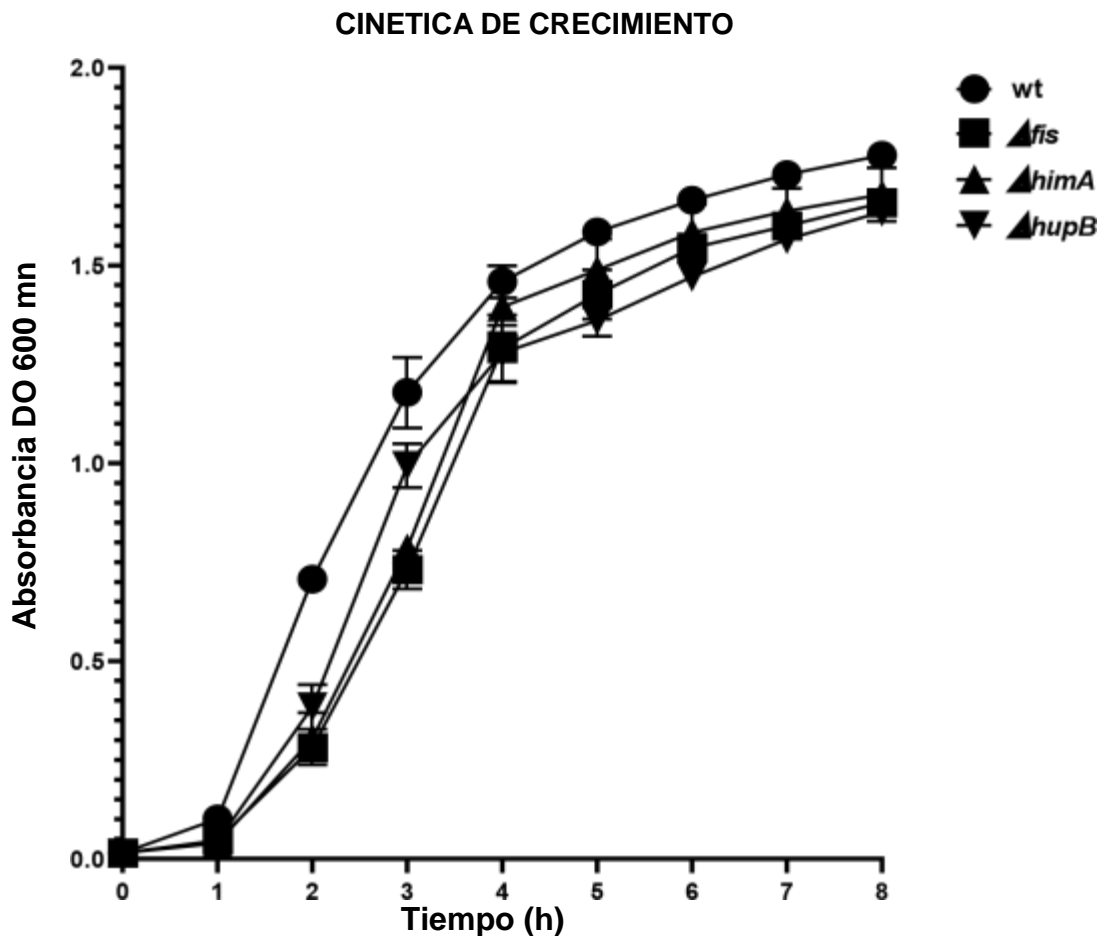


Figura 10. Curvas de crecimiento de las cepas de *K. pneumoniae*. Las cuatro cepas en estudio: silvestre y mutantes Δfis , $\Delta himA$ y $\Delta hupB$ se cultivaron en medio TSB y se incubaron a 37 °C en agitación constante durante 8 h. La absorbancia se midió cada hora a una densidad óptica de 600 nm.

9.3 Extracción de RNA de *K. pneumoniae*

El RNA total de *K. pneumoniae* silvestre y mutantes Δfis , $\Delta himA$ y $\Delta hupB$ se obtuvo a partir de cultivos en fase logarítmica de crecimiento en medio TSB.

La cuantificación de la concentración de RNA se llevó a cabo en el equipo Nanodrop ND-1000. Se obtuvieron valores promedio entre 1375 y 704.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, mientras que los valores de pureza promedio fueron de 2.05 a 2.01 según el cociente de absorción A260/280 nm y de 2.15 a 2.02 según el cociente de absorción A260/230 nm (tabla 2).

Cepas	$\mu\text{g}/\text{ml}$	260/280	260/230
<i>Wt</i>	1375	2.05	2.15
Δfis	704.3	2.04	2.02
$\Delta himA$	729.9	2.01	2.05
$\Delta hupB$	814.2	2.04	2.07

Tabla 2. Cuantificación de RNA de la cepa silvestre y mutantes Δfis , $\Delta himA$ y $\Delta hupB$ de *K. pneumoniae*.

La calidad del RNA se comprobó mediante el análisis de 1 μg de muestra empleando un gel de agarosa al 2% en condiciones desnaturizantes mediante la adición de hipoclorito de sodio al 1% a dicho gel. El RNA de las 4 cepas presentó una calidad adecuada, ya que después de la electroforesis se observó de manera clara las bandas correspondientes al rRNA 23S y al rRNA 16S (Figura 11).

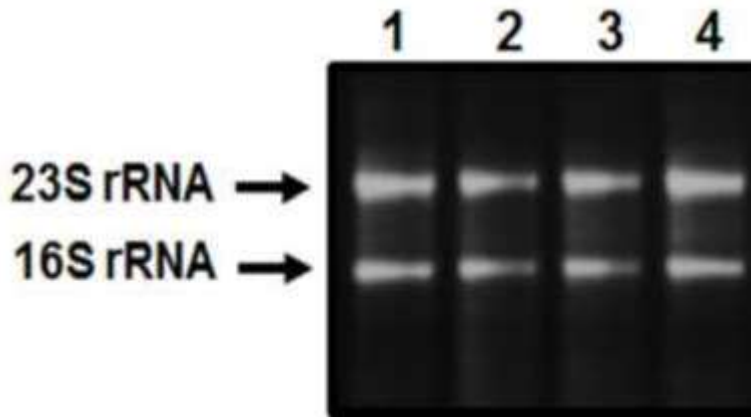


Figura 11. Electroforesis del RNA total de *K. pneumoniae*. El RNA fue obtenido a partir de cultivos en fase logarítmica en medio TSB. El RNA total obtenido de cada cepa se indica a continuación, Carril 1: cepa silvestre; carril 2: Δfis , carril 3: $\Delta himA$, carril 4: $\Delta hupB$. La electroforesis se efectuó en gel de agarosa al 2% adicionado con hipoclorito de sodio al 1% (condiciones desnaturalizantes).

9.4 Expresión de los genes involucrados en la síntesis de la cápsula de *K. pneumoniae*

La expresión transcripcional de los genes *galF*, *wzi* y *manC* fue evaluada por medio de RT-PCR en la cepa silvestre y las mutantes Δfis , $\Delta himA$ y $\Delta hupB$ de *K. pneumoniae*. Estos genes son los primeros de cada unidad transcripcional que controla la biosíntesis de la cápsula en *K. pneumoniae*. El gen *galF* mostró una disminución del 50% en la expresión genética en las cepas Δfis y $\Delta himA$ con respecto a la cepa silvestre. El gen *galF* pertenece a la primera unidad transcripcional, codifica la UTP-glucosa-1fosfato-Uridiltransferasa y se encarga de la producción de subunidades de glucosa. De manera interesante no se observaron expresiones significativamente diferentes en los genes *wzi* y *manC*. Los cuales codifican para una proteína de membrana externa (*wzi*) y la GTP-manosa-1 fosfato guanililtransferasa (*manC*). Estos genes encargan del ensamblaje de los polisacáridos capsulares y la producción de subunidades de manosa respectivamente (Figura 12).

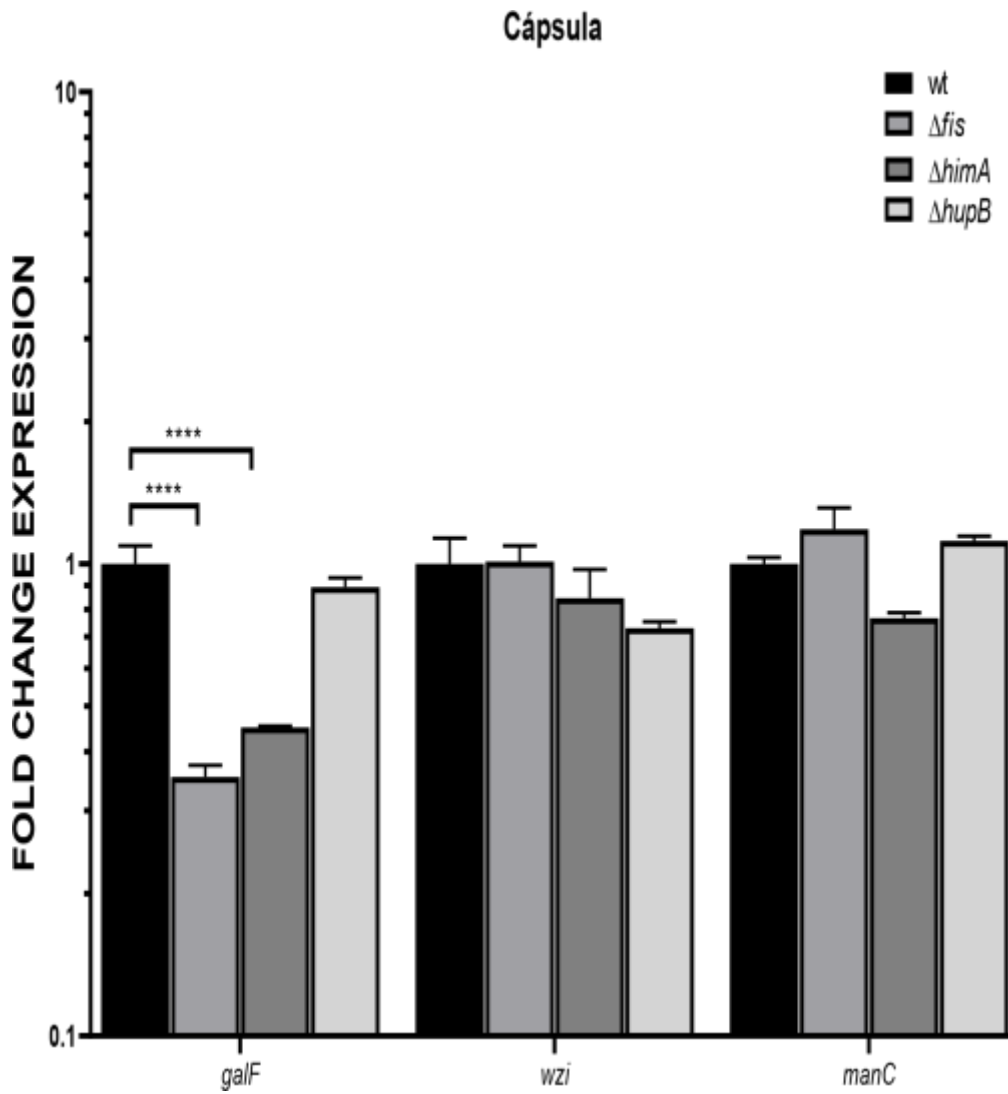


Figura 12. Expresión de genes involucrados en la síntesis de la cápsula de *K. pneumoniae*. Unidades de expresión genética relativa en la cepa silvestre wt y mutantes Δfis , $\Delta himA$ y $\Delta hupB$. Los experimentos se realizaron por triplicado con la desviación estándar correspondiente. **** $p < 0.0001$: diferencia estadísticamente significativa con respecto a la cepa silvestre (wt).

9.5 Expresión de los genes involucrados en la síntesis del lipopolisacárido de *K. pneumoniae*

El análisis de la expresión genética del lipopolisacárido se realizó por medio de RT-PCR en la cepa silvestre y las mutantes Δfis , $\Delta himA$ y $\Delta hupB$ de *K. pneumoniae*. Se evaluaron tres genes del lipopolisacárido: *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 2). Con respecto a la cepa silvestre, la expresión de los genes *wzm* y *msbA* aumentó 3 y 2 veces en la mutante en *fis*, respectivamente.

Mientras que en las mutantes $\Delta himA$ y $\Delta hupB$, el gen *wzm* aumentó 2 veces su expresión. La expresión del gen *rfaD* no se alteró en ninguna de las mutantes (Figura 13).

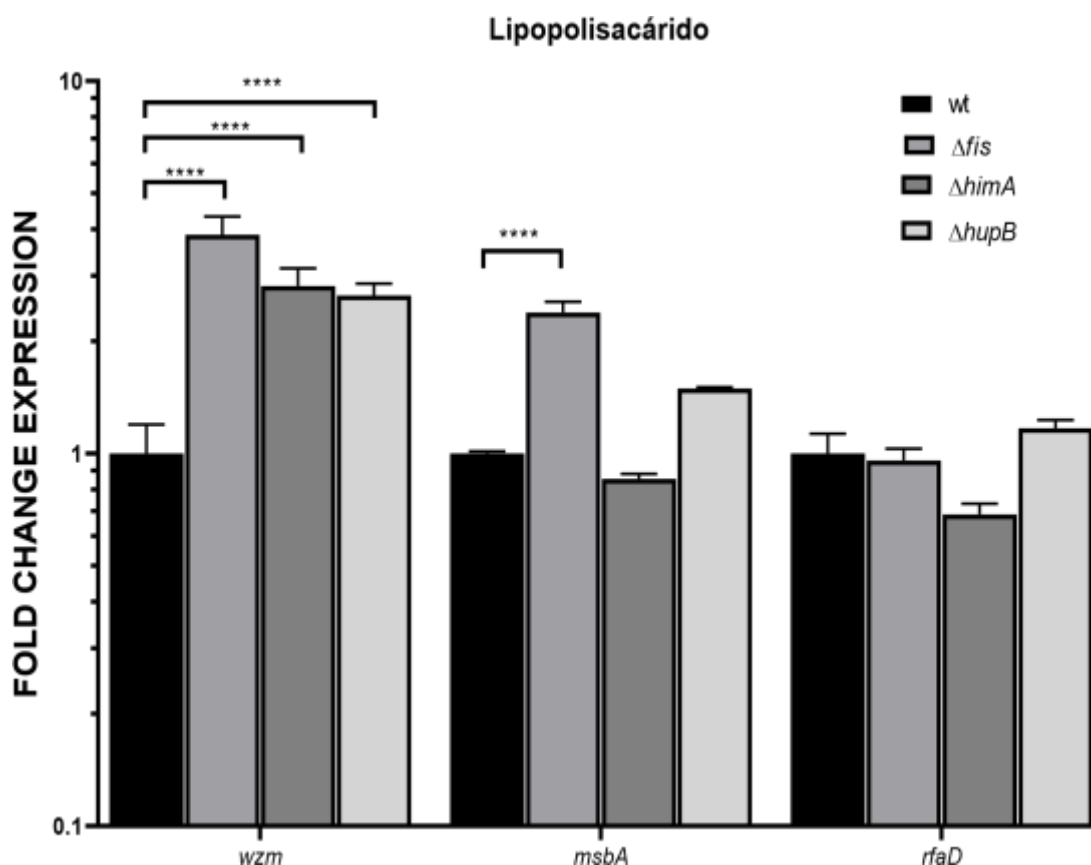


Figura 13. Expresión de genes involucrados en la síntesis del lipopolisacárido de *K. pneumoniae*. Unidades de expresión genética relativa en la cepa silvestre (wt) y mutantes Δfis , $\Delta himA$ y $\Delta hupB$. Los experimentos fueron realizados por triplicado con la desviación estándar correspondiente. **** $p < 0.0001$: diferencia estadísticamente significativa con respecto a la cepa silvestre (wt).

9.6 Expresión de los genes involucrados en la síntesis de las fimbrias de *K. pneumoniae*

La expresión genética de las fimbrias tipo I, III y ECP se analizó por medio de la cuantificación de los genes *mrkA*, *fimA* y *ecpA*, los cuales codifican para las pilinasmayoritarias de las fimbrias tipo I, III y ECP, respectivamente. La expresión del genfimbrial *mrkA* aumentó significativamente siete veces en la mutante Δfis con respecto a la cepa silvestre; en contraste, la expresión del gen *ecpA* disminuyó dosveces en la mutante $\Delta hupB$. Interesantemente la expresión del gen *fimA* no se vioafectada en ninguna de las mutantes (Figura 14).

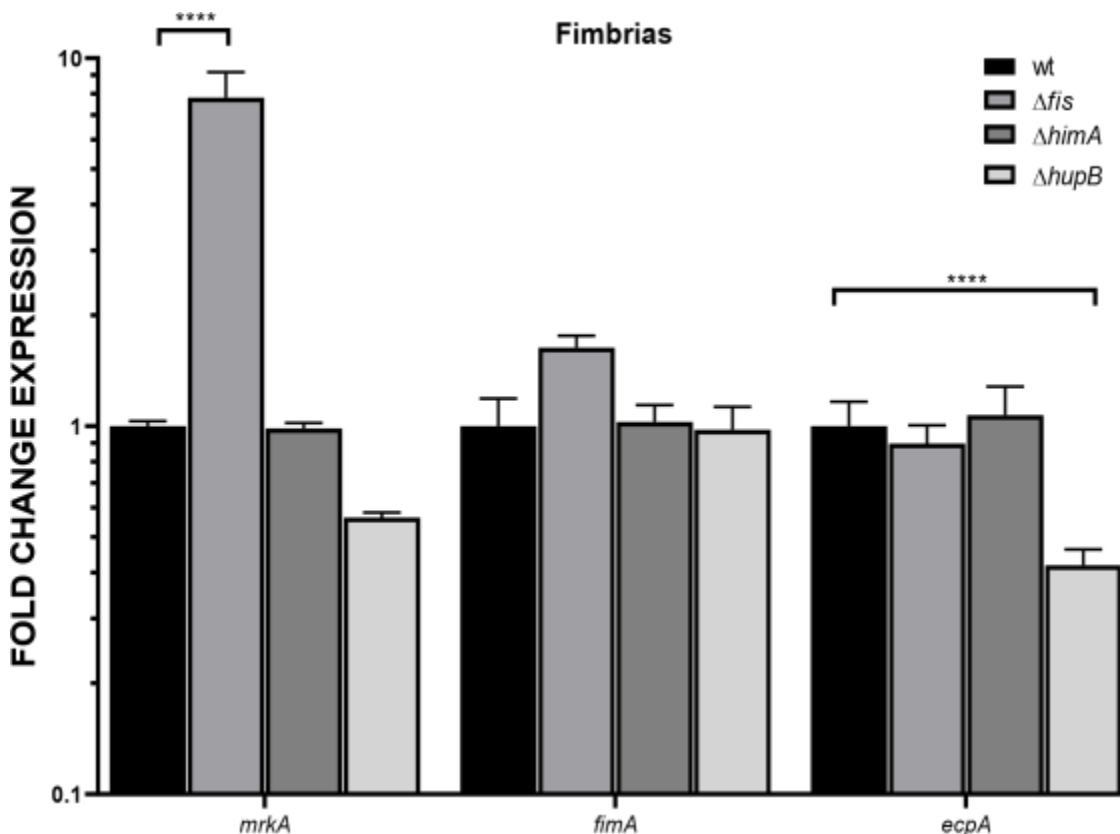


Figura 14. Expresión relativa de los genes fimbriales de *K. pneumoniae*. Unidades de expresión genética relativa en la cepa silvestre (wt) y mutantes Δfis , $\Delta himA$ y $\Delta hupB$. Los experimentos fueron realizados por triplicado con la desviación estándar correspondiente. **** $p < 0.0001$: diferencia estadísticamente significativa con respecto a la cepa silvestre (wt).

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

La expresión genética relativa de las proteínas de membrana externa se determinó por medio de RT-PCR en la cepa silvestre y las mutantes Δfis , $\Delta himA$ y $\Delta hupB$ de

K. pneumoniae. Se evaluó la expresión de los genes *ompK35*, *ompK36* y *ompA*. El gen *ompK35* disminuyó su expresión siete veces en la mutante Δfis con respecto a la cepa silvestre. Las expresiones de los genes restantes no fueron significativamente afectadas en ninguna de las mutantes, (Figura 15).

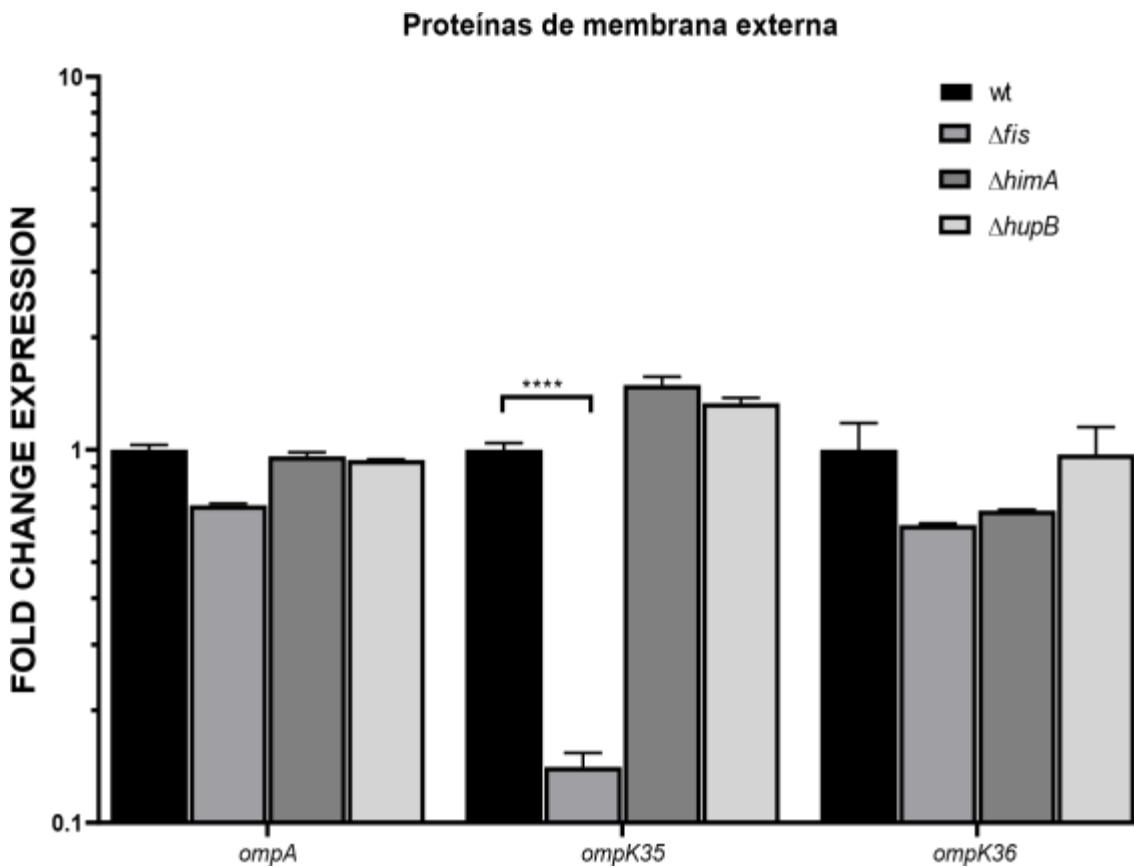


Figura 15. Expresión de genes involucrados en la síntesis de las proteínas de membrana externa de *K. pneumoniae*. Unidades de expresión genética relativa en la cepa silvestre (wt) y mutantes Δfis , $\Delta himA$ y $\Delta hupB$. Los experimentos se realizaron por triplicado con la desviación estándar correspondiente. **** $p < 0.0001$: diferencia estadísticamente significativa con respecto a la cepa silvestre (wt).

9.8 Expresión de los genes involucrados en la síntesis de los sideróforos de *K. pneumoniae*

La expresión genética relativa de genes relacionados con la captación de hierro se realizó por medio de RT-PCR en la cepa silvestre y las mutantes Δfis , $\Delta himA$ y $\Delta hupB$ de *K. pneumoniae*. Se evaluaron dos genes: *fes* (codifica al sideróforo enterobactina) y *fhuA* (codifica al siderofo ferricromo). En la mutante $\Delta himA$, los genes *fes* y *fhuA* mostraron un incremento significativo de 3 y 15 veces, respectivamente, con respecto a la cepa silvestre. Por otro lado, en la mutante Δfis se sobreexpresó el gen *fhuA* cinco veces. De manera interesante, el gen *fes* fue subexpresado dos veces en la cepa $\Delta hupB$, (Figura 16).

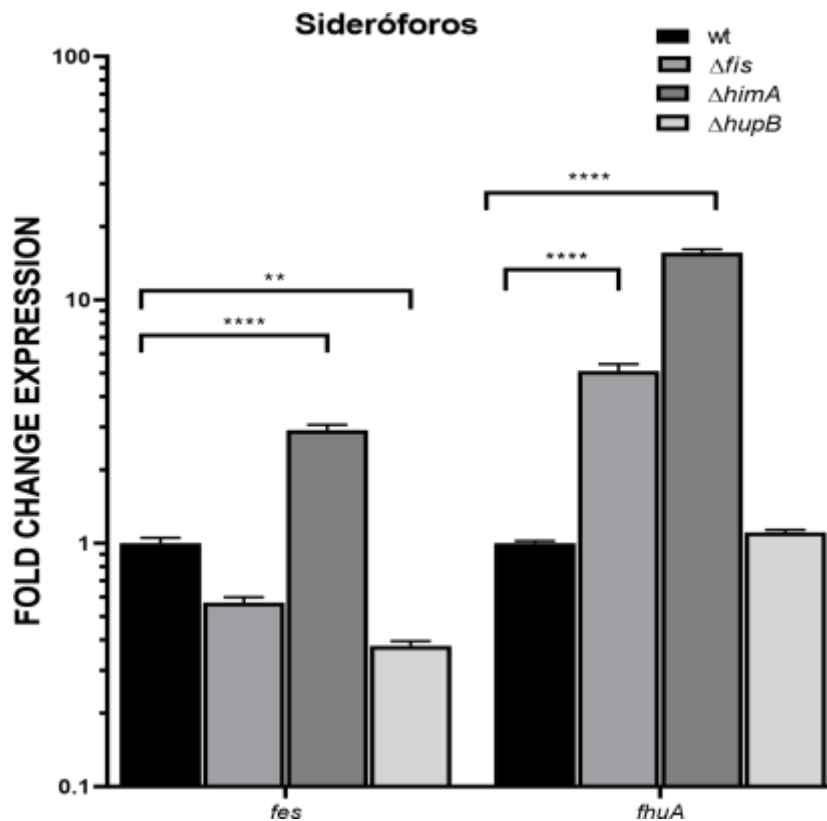


Figura 16. Expresión de genes involucrados en la síntesis de los sideróforos de *K. pneumoniae*. Unidades de expresión genética relativa en la cepa silvestre (wt) y mutantes Δfis , $\Delta himA$ y $\Delta hupB$. Los experimentos se realizaron por triplicado con la desviación estándar correspondiente. ** $p < 0.01$, **** y $p < 0.0001$: diferencia estadísticamente significativa con respecto a la cepa silvestre (wt).

10 Discusión

Las proteínas FIS, IHF y HU son reguladores globales de la expresión de diversos genes incluyendo factores de virulencia de varios enteropatógenos (Dilon *et al.*, 2010). Este estudio describe por primera vez el papel de las proteínas FIS, IHF y HU en la expresión de factores de virulencia de *K. pneumoniae*.

La ausencia de FIS, IHF y HU provocó un ligero defecto en el crecimiento de *K. pneumoniae* en medio TSB a 37 °C, observándose una diferencia significativa a partir de las 2 horas; este ligero retraso en el crecimiento se observó para las tres cepas mutantes. En contraste, se ha reportado que la mutante en la subunidad β de la proteína HU mejora el crecimiento en *Salmonella* Typhimurium donde el crecimiento de la mutante en el gen *hupB* mostró un mayor crecimiento con respecto a la cepa silvestre cuando se cultivó en caldo LB en condiciones aeróbicas a 37 °C (Mangan *et al.*, 2011). El efecto en el crecimiento provocado por la ausencia de la subunidad β de la proteína HU puede variar según la bacteria que se estudie, ya que la mutante en *hupB* de *E. coli* resulta en un crecimiento igual al de la cepa silvestre (Bi *et al.*, 2009). De manera similar, el crecimiento de la cepa mutante en *hupB* de *Vibrio parahaemolyticus* no mostró un crecimiento significativamente diferente al de la cepa silvestre, lo que significaría que cada dímero de la proteína HU puede compensar la falta del otro durante el crecimiento de *V. parahaemolyticus* como lo sugieren Phan y colaboradores en 2015.

El ligero retraso en el crecimiento observado en la mutante Δfis de *K. pneumoniae* es parecido al efecto producido en otras bacterias en ausencia de la proteína FIS. Esto genera un efecto negativo en el crecimiento sobre todo en la fase de crecimiento exponencial. En *V. cholerae* la mutante en *fis* creció casi de forma idéntica a la cepa silvestre, pero tuvo una fase de retraso ligeramente larga durante la etapa de crecimiento inicial (McLeod *et al.*, 2006). La eliminación de *fis* en *Haemophilus ducreyi* de tipo silvestre dio como resultado un defecto de crecimiento significativo que fue evidente durante el crecimiento exponencial (Labandeira-Rey *et al.*, 2013). Las mutantes nulas en *fis* de *E. coli* y *S. enterica* serotipo Typhimurium son viables, pero muestran fenotipos pleiotrópicos. Se ha reportado que las tasas

de crecimiento de las mutantes Δfis en ambientes ricos en nutrientes pueden ser de un 20% a 30% más lentas en comparación con las cepas silvestres (Nilsson y Emilsson, 1994; Nilsson *et al.*, 1990; Osuna *et al.*, 1995). El defecto en el crecimiento que muestran estas bacterias mutantes en *fis* puede deberse a que FIS participa en un proceso conocido como regulación dependiente de la fase de crecimiento. En este proceso los niveles de FIS alcanzan su punto máximo durante el crecimiento exponencial temprano con más de 50 000 moléculas por célula y luego disminuyen hasta que se vuelven muy bajos durante la fase estacionaria (Ballet *et al.*, 1992). Además, FIS es importante para el inicio de la replicación en condiciones de crecimiento rápido (Flåtten y Skarstad, 2013). En la fase de crecimiento exponencial FIS estimula la expresión de RNAt y RNAr para ayudar a satisfacer la demanda de síntesis de proteínas en condiciones de crecimiento rápido. Cabe destacar que FIS también tiene un papel importante en la expresión de compuestos del catabolismo de carbono, compuestos del metabolismo central y metabolismo energético (Bradley, 2007).

Uno de los efectos causados por la ausencia del gen *fis* es la tendencia a formar minicelulas (Spaeny-Dekking *et al.*, 1995). Esta característica puede ser un defecto moderado en la división celular, aunque la asincronía del ciclo celular asociada con mutantes FIS también puede contribuir a este fenotipo (Boubrik y Rouviere-Yaniv, 1995). Los reportes de mutantes nulas en FIS que crecen en medios ricos requieren de esta proteína, pero no las que crecen en medios pobres en nutrientes. Es interesante que FIS también colabora con CRP-cAMP para regular la transcripción de *crp*. Se sabe que CRP es uno de los reguladores globales que controla un mayor número de blancos (Gonzalez-Gil *et al.*, 1998). Los genes que FIS regula de manera negativa son activados por CRP-cAMP (Gonzalez-Gil *et al.*, 1996; Xu y Johnson, 1995), por consiguiente, se puede pensar que estos dos reguladores generalmente tienen papeles opuestos en la célula. En condiciones óptimas de crecimiento los niveles de FIS son altos y los niveles de CRP-cAMP son relativamente bajos, mientras que en condiciones de crecimiento pobres pasalo contrario. El comportamiento de FIS y CRP-cAMP es un ejemplo de como FIS es parte de una compleja red de regulación en la expresión de diversos genes.

En esta red de regulación donde participa FIS es importante en la fase de crecimiento, así como el entorno en el que se encuentra la bacteria (Johnson *et al.*, 2015).

Los reportes de bacterias deficientes de IHF indican que estas son viables, pero tienen fenotipos sutiles. El crecimiento bacteriano en *Salmonella* Typhimurium no es drásticamente afectado en ausencia de IHF, teniendo un crecimiento similar de las cepas mutantes con respecto a la cepa silvestre, cuando se cultivan en medio LB a 37°C (Mangan *et al.*, 2006). En *V. cholerae*, la mutante en *himA* tuvo una fase de retraso larga y no alcanzó una densidad de saturación tan alta como la cepa de tipo silvestre. En *E. coli* se han descrito resultados similares en mutantes *himA* (McLeod *et al.*, 2006). En *Pseudomonas putida* la ausencia de IHF no afectó el crecimiento durante la fase exponencial. Asimismo, las expresiones de genes relacionados con el metabolismo central de esta mutante tampoco mostraron una diferencia significativa con respecto a la cepa silvestre. En este trabajo se observó una pequeña disminución en el crecimiento de la cepa Δ *himA* de *K. pneumoniae*. Este ligero defecto puede deberse a la redundancia en actividades de otras proteínas nucleoides por lo que la ausencia de la proteína IHF no tiene un efecto drástico. También es importante destacar que los reguladores globales en diferentes especies pueden estar adaptados para controlar diferentes funciones (Cases y Lorenzo 2001, Milanesio *et al.*, 2011).

Las proteínas FIS, IHF y HU regulan de manera diferencial la expresión de genes que participan en la expresión de factores de virulencia como cápsula, sideróforos, proteínas de la membrana externa, fimbrias y lipopolisacárido. En la mayoría de los casos, la ausencia de las proteínas nucleoides FIS, IHF y HU tuvieron un ligero efecto en la expresión transcripcional de los genes que participan en: la síntesis de la cápsula (*galF*, *wzi* y *manC*), el lipopolisacárido (*wzm*, *msbA* y *rfaD*), las proteínas de la membrana externa (*ompK35*, *ompK36* y *ompA*), las pilinas mayoritarias de las fimbrias tipo 1, 3 y ECP (*fimA*, *mrkA* y *ecpA*) y los sideróforos ferricromo y enterobactina (*fes* y *fhuA*).

Las proteínas asociadas al nucleoide pueden tener funciones redundantes; por este motivo, algunas veces la ausencia de una sola de estas proteínas no suele

producir un efecto importante en la expresión de genes que codifican para factores de virulencia (Yasuzawa *et al.*, 1992). En este estudio, la ausencia del gen *himA* provocó una expresión diferencial notoria en los genes *galF* y *fhuA*, los cuales participan en la expresión de la cápsula y el sideróforo enterobactina, respectivamente. La cápsula es considerada el principal factor de virulencia de *K. pneumoniae*. Esto se debe a que las cepas hipervirulentas de dicha bacteria poseen grandes cantidades del polisacárido capsular (Lin *et al.*, 2004). En este estudio se demostró que la ausencia de *himA* genera una subexpresión del gen *galF*, es decir, IHF está funcionando como un activador de la transcripción de este gen. En *E. coli* kps IHF es parte de la red de regulación de un conjunto de promotores (PR1-1, PR1-2 y PR1-3). Estos promotores participan en la regulación de la expresión de la cápsula donde IHF es un activador de PR1-1 (Jia *et al.*, 2017). En contraste, los genes *fes* y *fhuA* presentan una sobreexpresión de cinco y 15 veces, respectivamente; por tanto, en este caso IHF actúa como un represor de la expresión de estos genes. Se ha demostrado que mutaciones en *himA* pueden ocasionar una menor expresión de sideróforos en *Vibrio fischeri* (Foxall *et al.*, 2015). En *E. coli*, la mutante *himA* genera un aumento en la transcripción de genes relacionados con la adquisición de hierro (Arfin *et al.*, 2001). Los pocos genes que se ven afectados en ausencia de IHF y las ligeras variaciones en la expresión de genes que codifican para factores de virulencia de *K. pneumoniae* concuerdan con reportes en otras bacterias. En *E. coli* y *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium las mutantes deficientes en la subunidad alfa de IHF muestran ligeros cambios en las expresiones de diversos genes. La mayoría de los genes que están afectados por esta proteína solo muestran diferencias de dos a cinco veces con respecto a la cepa silvestre, sin embargo, hay ciertos sistemas en los que la ausencia de IHF genera cambios más significativos como los sistemas de recombinación de sitios específicos. En *E. coli* los operones activados por NifA, NarL y TdcR muestran reducciones en la actividad en ausencia de IHF. Las proteínas inducidas por estos reguladores sintetizan amoníaco a partir de fuentes alternativas de nitrógeno y solo se expresan en condiciones anaeróbicas (Johnson *et al.*, 2005). Esto sugiere que

IHF podría ser esencial para responder a condiciones de anaerobiosis y nitrógenolimitado (Johnson *et al.*, 2005).

Es posible que IHF sea necesario en algunos promotores para proporcionar una estructura de orden superior adecuada para interacciones óptimas de DNA-proteína. Por ejemplo, la función de IHF como regulador global se ha reportado para sistemas específicos como el sistema SOS (Mechulam *et al.*, 1987). También se ha reportado la habilidad de IHF para doblar el DNA donde se encuentra el promotor e influir en la función de proteínas como OmpF (Johnson *et al.*, 2005). Adicionalmente, la falta de fenotipos fuertes en mutantes IHF podría explicarse por la capacidad de otros miembros de esta clase de modificadores para sustituir funcionalmente a IHF, por ejemplo, se ha reportado que HU puede reemplazar a IHF en varios sistemas (Friedman, 1988).

La mutante *hupB* provocó una disminución de la expresión en los genes *ecpA* y *fes* que codifican para la pilina mayoritaria del pilus tipo ECP y el sideróforo ferricromo, respectivamente; por lo tanto, HU regula de manera positiva la expresión de estos genes. La disminución en la expresión de *fes* concuerda con información reportada en *Porphyromonas gingivalis*, en donde las expresiones de genes involucrados en la captación de hierro muestran una disminución en ausencia de *hupB* (Priyadarshini *et al.*, 2013). La disminución de la expresión de *ecpA* y *fes* causada por la ausencia de *hupB* solo fue de dos veces; por lo tanto, estos genes podrían estar regulados por HU de manera muy discreta. Los escasos cambios en las expresiones de genes que codifican para factores de virulencia de *K. pneumoniae* observados en la ausencia de *hupB* puede deberse a que la subunidad *hupA* aún está presente. Se ha reportado que en *E. coli* son funcionales los dímeros HU $\beta\beta$, HU $\alpha\alpha$ y el heterodímero de la proteína HU y que su abundancia relativa varía en cada etapa de crecimiento. Esta variación en la abundancia de las diferentes conformaciones oligoméricas de HU durante el crecimiento también se ha reportado en *Legionella pneumophila* (Azam *et al.*, 1999). El heterodímero es la forma dominante proteína HU en la mayoría de las etapas de crecimiento, excepto en la etapa más temprana de la fase exponencial cuando predomina la forma HU $\alpha\alpha$. El homodímero HU $\beta\beta$ es detectable principalmente en la fase estacionaria

tardía (Claret y Rouviere-Yaniv, 1997). Esto apunta a que las diferentes conformaciones de la proteína HU tiene roles distintos en la arquitectura nucleoydey la expresión génica durante la fase exponencial y la estasis (Remesh *et al.*, 2020). En *Salmonella enterica serotipo Typhimurium* se ha demostrado con trabajos de transcriptómica que la mutante en *hupB* no fue relevante en la expresión de genes relacionados con la virulencia y el metabolismo de esta bacteria, sino que, la subunidad HU β regula de manera positiva miembros del regulon RpoS que es propio de la fase estacionaria, apoyando la idea que la abundancia de las diferentes conformaciones de HU varía según la fase de crecimiento (Mangan *et al.*, 2011). Además, existe la posibilidad de que las formas homodiméricas de HU tengan funciones redundantes en la regulación de la expresión genética, sobre todo para el homodímero HU $\alpha\alpha$ (Prieto *et al.*, 2011). Las mutaciones dobles en la proteína HU generan efectos más notables en el crecimiento y virulencia lo que respalda la idea de funciones redundantes para los dímeros de HU (Mangan *et al.*, 2011; Oberto., 2009). En este trabajo solo se analizó la expresión de genes involucrados en la virulencia de *K. pneumoniae* durante la fase exponencial, por lo tanto, los efectos de *hupB* podrían no ser tan relevantes si su comportamiento concuerda con el de *E. coli* y *Salmonella entérica serotipo Typhimurium*.

La ausencia de la proteína FIS generó una expresión diferencial en una mayor cantidad de genes involucrados en la expresión de diferentes factores de virulencia. La expresión del gen *galF* que está involucrado en la expresión de la cápsula disminuyó su expresión casi tres veces. Se ha reportado que la proteína FIS, en *Pasteurella multocida*, tiene una remarcada relevancia en la expresión de genes que codifican para componentes de la cápsula. Esto se debe a que en la ausencia de *fis* se observa una pérdida de la cápsula (Steen *et al.*, 2010). Para el gen *mrkA*, el cual codifica para la pilina mayoritaria de la fimbria tipo 3, se observó un aumento de siete veces en ausencia de *fis* con respecto a la cepa silvestre, por lo que en este caso FIS está funcionando como un represor de la expresión de este gen. Esta función de FIS como un represor se ha reportado en la expresión del curlin *E. coli* enteropatógena (EPEC) (Saldaña *et al.*, 2009). De manera contraria, en

E. coli enteroagregativa FIS favorece la expresión de fimbrias de adherencia agregativa (Sheikh *et al.*, 2008). La ausencia de FIS también dio como resultado que el gen *wzm*, que está involucrado en la expresión del antígeno O del lipopolisacárido, se sobreexpresara tres veces. En *E. coli* se han observado resultados similares; en este caso, FIS reprime la expresión de genes relacionados con la expresión del lipopolisacárido y la organización de la fimbria de una manera indirecta (Gawade *et al.*, 2019). En el gen *fhuA*, que codifica para el sideróforo ferricromo, la ausencia de FIS ocasionó un aumento de cinco veces en su expresión, lo cual puede deberse entre otras cosas a que FIS puede funcionar como un activador indirecto de *fur*, siendo Fur un represor de la expresión de los sideróforos (Gawade *et al.*, 2019; Troxell y Hassan, 2013). El papel de FIS como activador también se observó en el gen *ompK35* que codifica para una porina de membrana externa. En este caso, la ausencia de FIS generó una disminución de la expresión de siete veces en comparación con la cepa silvestre. En *E. coli* se ha demostrado que FIS regula positivamente y de manera directa la expresión de la porina OmpF, ya que FIS puede unirse a la región promotora de *ompF* y la ausencia de FIS genera una menor expresión de esta porina (Croizat *et al.*, 2011).

La proteína FIS es un regulador de la expresión de genes implicados en la patogenicidad bacteriana. La expresión de FIS depende de la fase de crecimiento y el ambiente. En este sentido, la entrada de un patógeno a un huésped puede significar un aumento de nutrientes, lo que conduce al aumento de los niveles de FIS en sincronía con los efectos reguladores positivos de la misma proteína sobre genes cuyos productos están implicados en las primeras etapas de la infección. Es importante resaltar que algunos de los efectos globales de FIS sobre la expresión genética son indirectos, produciéndose mediante el control de reguladores específicos que a su vez regulan una cantidad considerable de genes. Por ejemplo, FIS regula negativamente la transcripción de genes *cytR*, *deoC* y *glpR* (Gonzalez-Gil *et al.*, 1996) y aumenta la transcripción de los activadores de genes de virulencia *hilA*, *invF*, *ler*, *aggR* y *virF* (Falconi *et al.*, 2001; Goldberg *et al.*, 2001; Sheikh *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2001).

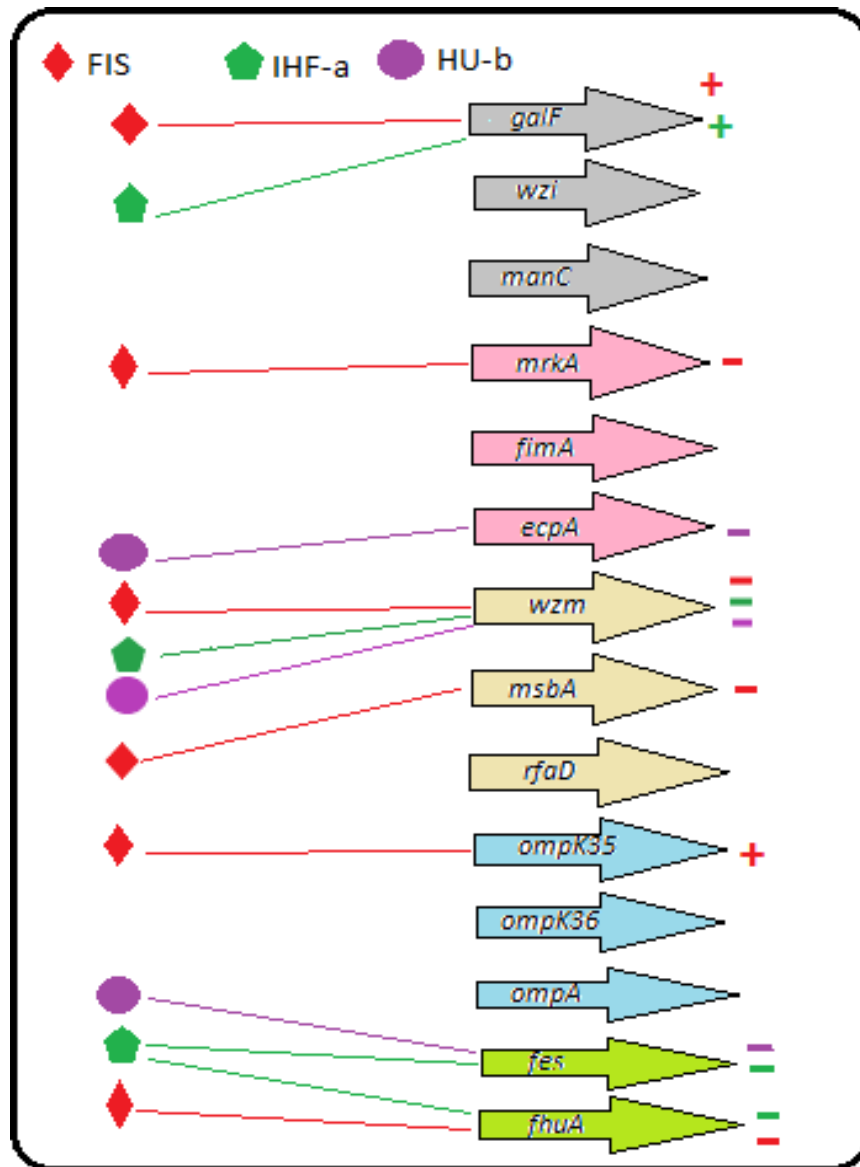


Figura 15. Representación esquemática de los genes regulados por las proteínas FIS, IHFa y HU-b. La proteína FIS tiene un efecto positivo en la expresión de los genes *galF* y *ompK35*. De manera contraria FIS tiene un efecto negativo en la expresión de los genes *wzm*, *mrkA* y *fhuA*. La mutante en *himA* regula de manera positiva el gen *galF* y de manera negativa el gen *fes* y *fhuA*. Mientras que la mutante *hupB* regula positivamente la expresión de los genes *ecpA* y *fes*. Es posible que que el efecto en la expresión de estos genes sea indirecto y/o que haya más factores que estén interviniendo.

La ausencia de la proteína FIS ocasiona una menor expresión del gen *galF* el cual participa en la expresión de la cápsula, específicamente en la producción de subunidades de glucosa, pudiendo afectarse el grosor de la cápsula. En contraste, un aumento en la expresión de los genes *wzm* y *mrkA*, que codifican para componentes de la fimbria tipo 3 y el antígeno O, respectivamente, podría generar una mayor formación de biopelículas, debido a que la fimbria tipo 3 es especialmente importante en este proceso (Flemming y Wingender, 2010; Ares *et al.*, 2016). El incremento en la formación de biopelículas, tienen el potencial de aumentar la persistencia e infecciones crónicas por parte de *K. pneumoniae*, por su capacidad de formarse en superficies bióticas y abióticas. Gracias a las biopelículas, las bacterias obtienen una mayor tolerancia a los antibióticos y productos químicos desinfectantes, además de resistir la fagocitosis y otros componentes del sistema de defensa del huésped (Paczosa y Mecsas, 2016). Por otro lado, el aumento en la expresión de *mrkA* y *wzm* podría implicar una respuesta más rápida por parte de células del sistema inmunológico, porque que estos componentes son blancos para el reconocimiento por parte de células como macrófagos y neutrófilos (Paczosa y Mecsas, 2016). En el caso de las proteínas de membrana externa, la disminución en la expresión de *ompK35* también puede ocasionar una mayor resistencia a antibióticos. Este efecto se ha observado en ausencia de porinas, sin embargo, específicamente la delección de *ompK35* es capaz de aumentar la resistencia a antibióticos solo en condiciones de baja osmolaridad. Además, la porina OmpK35 es importante para la captación de nutrientes; no obstante, se ha demostrado que la delección de *ompK35* en *K. pneumoniae* no afecta su metabolismo (Tsai *et al.*, 2011). Los sideróforos permiten la proliferación bacteriana y un aumento de las unidades formadoras de colonias bacterianas, probablemente porque el hierro es importante para diversos procesos incluidos la replicación del DNA y el metabolismo del oxígeno y es utilizado como cofactor de muchas reacciones celulares (Gkouvatsos *et al.*, 2011). Por estos motivos, el incremento en la expresión del ferricromo tiene el potencial de incrementar la proliferación, pero, en este trabajo no se observó un crecimiento mayor que el de la cepa silvestre. El aumento en la expresión de *fes* no es suficiente

para generar este efecto. Es importante señalar que los sideróforos también favorecen la formación de biopelículas. *In vitro*, los sideróforos agotan el hierro de las células epiteliales, inducen la secreción de citocinas y activan la proteína factor de transcripción maestro inducible por hipoxia factor-1 α (HIF-1 α), la cual es una proteína que controla la permeabilidad vascular y la expresión de los genes inflamatorios (Holden *et al.*, 2016). Los huéspedes utilizan varios sistemas importantes de transporte de hierro como transferrina cargada con hierro, lactoferrina y hemo, pero, las afinidades de los sideróforos bacterianos por el hierro son generalmente mucho más altas que las de las proteínas y moléculas del huésped, lo cual permite que los patógenos compitan por la adquisición de hierro. En respuesta a la amenaza del sideróforo, las células inmunitarias de los mamíferos (por ejemplo, macrófagos, neutrófilos) secretan lipocalina, siderocalina y lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL), interceptando la captación bacteriana de sideróforos cargados de hierro (Holden *et al.*, 2018). En resumen, la ausencia de FIS podría aumentar la persistencia e infección crónica además de un aumento en la reacción inflamatoria de igual manera podría permitir un reconocimiento más eficiente por parte de células del sistema inmunológico antes de que *K. pneumoniae* pueda encontrar condiciones favorables para proliferar y diseminarse.

En conclusión, este trabajo mostró que las proteínas asociadas al nucleóide FIS, IHF y HU, participan en una compleja red de regulación en *K. pneumoniae*, controlando la expresión de factores de virulencia de este patógeno oportunista.

11 Conclusiones

- La proteína nucleóide FIS reguló un mayor número de genes, que codifican factores de virulencia en *K. pneumoniae*, en comparación con IHF o HU.
- La ausencia de los genes *fis*, *himA* y *hupB* afectó ligeramente el crecimiento de *K. pneumoniae*.

- La delección del gen *fis* ocasionó una disminución en la expresión de los genes *galF* (involucrado en la expresión de la cápsula) y *ompK35* (que codifica para la proteína de membrana externa OmpK35).
- La mutación en el gen *fis* produjo un aumento de la expresión de los genes *fhuA* (involucrado en la expresión de la enterobactina), *mrkA* (que codifica la pilina del pili tipo 3), así como de *wzm* y *msbA* que codifican componentes del lipopolisacárido.
- En la mutante Δ *himA* la expresión del gen *galF* disminuyó.
- Las expresiones de los genes *fes* y *fhuA* (relacionados con la captación de hierro) y *wzm* (que codifica para el antígeno O del lipopolisacárido) aumentaron en la mutante Δ *himA*.
- La ausencia del gen *hupB* causó una disminución en la expresión del gen *ecpA* (que codifican la pilina del pili tipo ECP) y *fes* (que codifica al sideróforo ferricromo).
- La delección del gen *hupB* produjo una mayor expresión del gen *wzm*.

12 Perspectivas

- Realizar la complementación de la mutante Δ *fis* para restaurar el fenotipo silvestre en cuanto al crecimiento y la expresión de los genes *galF*, *wzm*, *mrkA*, *ompK35* y *fhuA*.
- Investigar si la proteína FIS regula de manera directa la expresión de los genes *galF*, *wzm*, *mrkA*, *ompK35* y *fhuA* por medio de ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA).
- Analizar los efectos en la virulencia de *K. pneumoniae* en ausencia de FIS por medio de ensayos de formación de biopelículas, adherencia a células epiteliales y fagocitosis mediada por macrófagos.

13 Referencias Bibliográficas

- Afflerbach, H., Schroder, O., Wagner, R. (1999). Conformational changes of the upstreamDNA mediated by H-NS and FIS regulate *E. coli* *rrnB* P1 promoter activity. *J Mol Biol*, 286, 339-353.
- Alcántar-Curiel, M., Blackburn, D., Saldaña, Z., Gayosso-Vázquez, C., Iovine, N., De la Cruz, M., Girón, J. (2013). Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. *Vir*, 15, 129-138.
- Alexander, C., Rietschel, E. (2001). Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res*, 69, 183-215.
- Ares, M., Alcántar-Curiel, M., Jiménez-Galicia, C., Rios-Sarabia, N., Pacheco, S., De la Cruz, M. (2013). Antibiotic Resistance of Gram-Negative Bacilli Isolated from Pediatric Patients with Nosocomial Bloodstream Infections in a Mexican Tertiary Care Hospital. *Chemther*, 59, 361-8.
- Arfin, Long, S., Ito, E., Toller, L., Riehle, M., Paegle, E., Hatfield, W. (2000). Global Gene Expression Profiling in *Escherichia coli* K12: The Effects of Integration Host Factor. *Jour of Biol Chem*, 275, 38, 29672-29684.
- Azam, A., Iwata, A., Nishimura, A., Ueda, S., and Ishihama, A. (1999). Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J Bacteriol*, 181, 6361-6370.
- Azaro, A., and Landy, A. (2002). *I integrase and the I Int family*. Washington; ASM Press, p. 118-148.
- Bachman, M., Oyler, J., Burns, S., Caza, M., Lepine, F., Dozois, C., Weiser, J. (2011). *Klebsiella pneumoniae* yersiniabactin promotes respiratory tract infection through evasion of lipocalin 2. *Infect Immun*, 79, 3309-3316.
- Balandina, A., Claret, L., Hengge-Aronis, R., and Rouviere-Yaniv, J. (2001). The *Escherichia coli* histone-like protein HU regulates *rpoS* translation. *Mol Microbiol*, 39, 1069-1079.
- Balandina, A., Kamashev, D., and Rouviere-Yaniv, J. (2002). The bacterial histone-like protein HU specifically recognizes similar structures in all nucleic acids DNA, RNA, and their hybrids. *J. Biol. Chem*, 277, 27622-27628.

Balestrino, D., Ghigo, J., Charbonnel, N., Haagensen, J., 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. *Env Microbiol*, **10**, 685-701.

Ball, C., Osuna, R., Ferguson, K., Johnson, R. (1992). Dramatic changes in Fis levels upon nutrient upshift in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **174**, 8043-8056.

Bartlett, S., Gaal, T., Ross, W., Gourse, R. (2000). Regulation of rRNA transcription is remarkably robust: FIS compensates for altered nucleoside triphosphate sensing by mutant RNA polymerases at *Escherichia coli* *rrn* P1 promoters. *J Bacteriol*, **182**, 1969-1977.

Bartels, F., Fernández, S., Holtel, A., Timmis, K., De Lorenzo, V. (2001). The essential HupB and HupN proteins of *Pseudomonas putida* provide redundant and non-specific DNA bending functions. *J Biol Chem*, **276**, 16641-16648.

Berger, M., Gerganova, V., Berger, P., Rapiteanu, R., Lisicovas, V., Dobrindt, U. (2016). Genes on a wire: the nucleoid-associated protein HU insulates transcription units in *Escherichia coli*. *Sci Rep*, **6**, 31512.

Bertoni, G., Fujita, N., Ishihama, A., and De Lorenzo, V. (1998). Active recruitment of sigma 54-RNA polymerase to the Pu promoter of *Pseudomonas putida*: role of IHF and alpha CTD. *Embo*, **17**, 5120-5128.

Bhowmick, T., Ghosh, S., Dixit, K., Ganesan, V., Ramagopal, U., Dey, D. (2014). Targeting *Mycobacterium tuberculosis* nucleoid-associated protein HU with structure-based inhibitors. *Nat Commun*, **5**, 4124.

Bi, H., Sun, L., Fukamachi, T., Saito, H., Kobayashi, H. (2009). HU participates in expression of a specific set of genes required for growth and survival at acidic pH in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol*, **5**, 443-448.

Bi, H., Zhang, C. (2014). Integration host factor is required for the induction of acid resistance in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol*, **69**, 218-224.

Bokal, A., Ross, W., Gourse, R. (1995). The transcriptional activator protein FIS: DNA interactions and cooperative interactions with RNA polymerase at the *Escherichia coli* *rrnB* P1 promoter. *J Mol Biol*. **245**: 197-207.

Bonnefoy, E., Rouvière-Yaniv, J. (1992). HU, the major histone-like protein of *E. coli*, modulates the binding of IHF to *oriC*. *Embo J*, 11, 4489-4496.

Boubrik, F., Rouviere-Yaniv, J. (1995). Increased sensitivity to gamma irradiation in bacteria lacking protein HU. *Proc Natl Acad Sci*, 92, 3958-3962.

Bradley, M. (2007). Effects of Fis on *Escherichia coli* gene expression during different growth stages. *Microbiol*, 153, 2922-2940.

Brock, J., Williams, PH., Liceaga, J., Wooldridge, K. (1991). Relative availability of transferrin-bound iron and cell-derived iron to aerobactin- producing and enterochelin- producing strains of *Escherichia coli* and to other microorganisms. *Infect Immun*, 59, 185-3190.

Bullen, J., Rogers, H., Griffiths, E. (1972). Iron binding proteins and infection. *Br J Haematol*, 23, 389-392.

Carmona, M., Magasanik, B. (1996). Activation of transcription at sigma 54dependent promoters on linear templates requires intrinsic or induced bending of the DNA. *J Mol Biol*. 261. 348-356.

Cases, I., De Lorenzo, V. (2001). The black cat/white cat principle of signal integration in bacterial promoters. *Embo J*, 20, 1-11.

Chen, J., Siu, L., Fung, C., Lin, J., Yeh, K., Chen, T., Tsai, Y., Chang, F. (2010). Contribution of outer membrane protein K36 to antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*, 6, 986-990.

Claret, L., Rouviere-Yaniv, J. (1997). Variation in HU composition during growth of *Escherichia coli*: the heterodimer is required for long term survival. *J Mol Biol*, 273,93-104.

Clements, A., Gaboriaud, F., Duval, J., Farn, J., Jenney, A., Lithgow, T., Wijburg, O., Hartland, E., Strugnell, R. (2008). The major surface-associated saccharides of *Klebsiella pneumoniae* contribute to host cell association. *PLoS One*, 3, e3817.

Crozat, E., Hindre, T., Kühn, L., Garin, J., Lenski, R., 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. *J Bacteriol*. 429-440

D'Andrea, M., Amisano, F., Giani, T., Conte, V., Ciacci, N., Ambretti, S., Santoriello, L., and Rossolini, G. (2014). Diversity of capsular polysaccharide gene clusters in

Kpc-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates of sequence type 258 involved in the Italian epidemic. *PLoS One*, 9, e96827.

Datsenko, K., Wanner, B. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in

Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci*, 6, 6640-6645.

Devaraj, A., Buzzo, J., Rocco, C., Bakaletz, L. (2017). The DNABII family of proteins comprised of the only nucleoid associated proteins required for nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilm structure. *Microbiol*, 7, e00563.

Devaraj, A., Sheryl, J., Bakaletz, L., Goodman, S. (2015). DNABII proteins play a central role in UPEC biofilm structure. *Mol Microbiol*, 96, 1119-1135.

Dorman, C., Deighan, P. (2003) Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr Opin Genet Dev*, 13, 179-184.

Dorman, C. (2015). Function of Nucleoid-Associated Proteins in Chromosome Structuring and Transcriptional Regulation. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 24, 316-331.

Douglas, F., Browning, J., Stephen, J. (2000). Suppression of FNR-dependent transcription activation at the *Escherichia coli nir* promoter by Fis, IHF and H-NS: modulation of transcription initiation by a complex nucleoid-protein assembly. *Mol Microbiol*, 37, 1258±1269.

El Fertas-Aissani, R., Messai, Y., Alouachem, S., Bakour, R. (2013). Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathol Biol*, 61, 209-216.

Falconi, M., Brandi, A., La Teana, A., Gualerzi, C., Pon, C. (1996). Antagonistic involvement of FIS and H-NS proteins in the transcriptional control of hns expression. *Mol Microbiol*, 19, 965-975.

Falconi, M., Prosseda, G., Giangrossi, M., Beghetto, E., Colonna, B. (2001). Involvement of FIS in the H-NS-mediated regulation of virF gene of Shigella and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 42, 439-452.

Ferrández, M., Carreño, D., Ayora, S., De la Campa, A. (2018). HU of *Streptococcus pneumoniae* is essential for the preservation of DNA supercoiling. *Front Microbiol*, 9.

Flåtten, I., Skarstad, K. (2013.) The Fis Protein Has a Stimulating Role in Initiation of Replication in *Escherichia coli* In Vivo. *PLoS One*, 8, e83562.

- Flores, D., Charry, J., Cuellar, L. (2011). Caracterización epidemiológica de *Klebsiella pneumoniae* en las ucis del hospital universitario de neiva en el año 2009 y de enero a septiembre de 2010. Tesis doctoral. Universidad Surcolombiana.
- Foxall, R., Ballok, A., Avitabile, A., Whistler, A. (2015). Spontaneous phenotypic suppression of GacA-defective *Vibrio fischeri* is achieved via mutation of *csrA* and *ihfA*. *BMC Microbiology*, 15, 180.
- Friedman, D. (1988). Integration host factor: a protein for all reasons. *Cell*, 55, 545- 554.
- Gawade, P., Gunjalb, G., Sharmab, A., Ghosha, P. (2019). Reconstruction of transcriptional regulatory networks of Fis and H-NS in *Escherichia coli* from genomewide data analysis *Gen*, 112, 1264-1272.
- Gille, H., Egan, J., Roth, A., Messer, W. (1991). The FIS protein binds and bends the origin of chromosomal DNA replication, oriC, of *Escherichia coli*. *Nucleic AcidsRev*, 19, 4167-4172.
- Goldberg, D., Johnson, M., Hinton, C., Williams, P. (2001). Role of the nucleoid-associated protein Fis in the regulation of virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 41,549- 559.
- Gonzalez-Gil, G., Bringmann, P., Kahmann, R. (1996). FIS is a regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 22, 21-29.
- Gonzalez-Gil, G., Kahmann, G. Muskhelishvili. (1998). Regulation of *crp* transcription by oscillation between distinct nucleoprotein complexes. *EMBO J*. 17:2877-2885.
- González-y-Merchand, J., Estrada-García, I., Colston, M. (1996). Cox R.A. A novel method for isolation of mycobacterial DNA. *Fems Microbiol Lett*, 13, 71-77.
- Guttula, D., Liu, F., Van Kan, J., Arluison, V., Van der Maarel, J. (2018). Effect of HU protein on the conformation and compaction of DNA in a nanochannel. *Soft Matter*, 14, 2322-2328.
- Haffter, P., Bickle, T. (1987). Purification and DNA-binding properties of FIS and Cin, two proteins required for the bacteriophage P1 site-specific recombination system, *cin*. *J Mol Biol*, 198, 579-587.

Haniford, D. (2006). Transpososome dynamics and regulation in Tn 10 transposition.

Crit Rev Biochem Mol Biol, 41, 407-424.

Hawkey, M., Jones, M. (2009) The changing epidemiology of resistance. *Antimicrob. Chemother*, 64, 3-7.

Heichman, K., Johnson, R. (1990). The Hin invertasome: protein-mediated joining of distant recombination sites at the enhancer. *Science*, 249, 511-517.

Hernandez-Alles, S., Conejo, M., Pascual, A., Tomas, J., Benedi, V., MartinezMartinez, L. (2000). Relationship between outer membrane alterations and susceptibility to antimicrobial agents in isogenic strains of *Klebsiella pneumoniae*. *JAntimicrob Chemother*, 46, 273-277.

Holden, V., Breen, P., Houle, S., Dozois, C., Bachman, M. (2016). *Klebsiella pneumoniae* Siderophores Induce Inflammation, Bacterial Dissemination, and HIF1 α Stabilization during Pneumonia. *mBio*, 7, 5, e01397-16.

Hsieh, P., Lin, T., Lee, C., Tsai, SF., Wang, J. (2008). Serum-induced iron acquisition systems and TonB contribute to virulence in *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess. *J Infect Dis*, 197, 1717-1727.

Hsieh, P., Wu, M., Yang, F., Chen, C., Lou, T., Chen, Y., Wu, S., Sheu, J., Wang, J. (2014). D-galactan II is an immunodominant antigen in O1 lipopolysaccharide and affects virulence in *Klebsiella pneumoniae*: implication in vaccine design. *FrontMicrobiol*, 5, e608.

Ishihama, A. (1999). Modulation of the nucleoid, the transcription apparatus, and the translation machinery in bacteria for stationary phase survival. *Gen Cel*, 4, 135-143.

Jia, J., King, J., Goldrick, M., Aldawood, E., and Roberts, I. (2017). Three tandem promoters, together with IHF, regulate growth phase dependent expression of the *Escherichia coli* kps capsule gene cluster. *Sci Rep*, 7, 17924.

Johnson, R. (2002). *Bacterial site-specific DNA inversion systems*. Washington; Am soc Microbiol. p. 230-271.

Johnson, R., Ball, C., Pfeffer, D., Simon, M. (1988) Isolation of the gene encoding the Hin recombinational enhancer binding protein. *Proc Natl Acad Sci*, 85, 3484-3488.

Johnson, R., Bruist, M., Simon, M. (1986). Host protein requirements for in vitro sitespecific DNA inversion. *Cell*, 46, 531-539.

Johnson, R., Johnson, L., Schmidt, J., Gardner, J. (2005). *Major Nucleoid Proteins in the Structure and Function of the Escherichia coli Chromosome*. Washington; The Bacterial Chromosome.

Johnson, C., Simon, M. (1985). Hin-mediated sitespecific recombination requires two 26 bp recombination sites and a 60 bp recombinational enhancer. *Cell*, 41,781-791.

Kahmann, R., Rudt, F., Koch, C., Mertens, G. (1985). Inversion in bacteriophage Mu DNA is stimulated by a site within the invertase gene and a host factor. *Cell*, 41,771-780.

Kamashev, D., Rouviere-Yaniv, J. (2000). The histone-like protein HU binds specifically to DNA recombination and repair intermediates. *Embo J*, 19, 6527-6535.

Kar, S., Edgar, R., Adhya, S. (2005). Nucleoid remodeling by an altered HU protein: reorganization of the transcription program. *Proc Natl Acad Sci*, 102, 16397-16402.

Karl, W., Bamberger, M., Zechner, E. (2001) Transfer protein TraY of plasmid R1 stimulates Tral-catalyzed oriT cleavage in vivo. *J Bacteriol*, 183, 909-914.

Khodr, A., Fairweather, V., Bouffartigues, E., Rimsky, S. (2014). IHF is a trans-acting factor implicated in the regulation of the proU P2 promoter. *Fems Microbiol Lett*, 362, 1-6.

Kobryn, K., Lavoie, B., Chaconas, G. (1999). Supercoiling- dependent site-specific binding of HU to naked Mu DNA. *J Mol Biol*, 289, 777-784.

Koch, C., Kahmann, K. (1986). Purification and properties of the *Escherichia coli* host factor required for inversion of the G segment in bacteriophage Mu. *J Biol Chem*, 261, 15673-15678.

Koch, C., Ninnemann, O., Fuss, H., Kahmann, R. (1991). The N-terminal part of the *E. coli* DNA binding protein FIS is essential for stimulating sitespecific DNA

inversion but is not required for specific DNA binding. *Nucleic Acids Res*, 19, 5915-5922.

Kostrewa, D., Granzin, J., Koch, C., Choe, H., Raghunathan, S., Wolf, W., Labahn, J., Kahmann, R., Saenger, W. (1991). Three-dimensional structure of the *E. coli* DNA-binding protein FIS. *Nature*, 349, 178-180.

Labandeira-Rey, M., Dodd, D., Brautigam, C., Fortney, K., Spinola, S., Hansen, J. (2013). The *Haemophilus ducreyi* Fis Protein Is Involved in Controlling Expression of the *IspB-IspA2* Operon and Other Virulence Factors. *Infect Immun*, 11, 4160-70.

Lease, R., Belfort, M. (2000). A trans-acting RNA as a control switch in *Escherichia coli*: DsrA modulates function by forming alternative structures. *Proc Natl Acad Sci*, 97, 9919-9924.

Jeannin, P., Magistrelli, G., Goetsch, L., Haeuw, J., Thieblemont, N., Bonnefoy, J., Delneste, Y. (2002). Outer membrane protein A (OmpA): a new pathogen-associated molecular pattern that interacts with antigen presenting cells—impact on vaccine strategies. *Vaccine*, 20, A23-A27.

Jeannin, P., Bottazzi, B., Sironi, M., Doni, A., Rusnati, M., Presta, M., Maina, V., Magistrelli, G., Haeuw, J., Hoeffel, G., Thieblemont, N., Corvaia, N., Garlanda, C., Delneste, Y., Mantovani, A. (2005). Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors. *Immunity*, 22, 551-560.

Leite, B., Hirsch, C., Pinheiro, C., Borin, B., Paier, G., Fabricio, F., Palma, M., Alvarez, C., Martinez, B., Brocchi, M. (2017). Integration host factor is important for biofilm formation by *Salmonella enterica* Enteritidis. *Pat and Dis*, 75, ftx074.

Li, B., Zhao, Y., Liu, C., Chen, Z., Zhou, D. (2014) Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Fut Microbiol*, 9, 1071-1081.

Lin, J., Chang, F., Fung, C., Xu, J., Cheng, H., Wang, J., Huang, L., Siu, L. (2004) High prevalence of phagocytic-resistant capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae* in liver abscess. *Microbes Infect*, 6, 1191-1198.

Li, S., Waters, R. (1998). *Escherichia coli* strains lacking protein HU are UV sensitive due to a role for HU in homologous recombination. *J Bacteriol*, 180, 3750- 3756.

Liu, D., Yumoto, H., Murakami, K., Hirota, K., Ono, T., Nagamune, H., Kayama, S., Matsuo, T., and Miyake, Y. (2008). The essentiality and involvement of *Streptococcus intermedius* histone-like DNA-binding protein in bacterial viability and normal growth. *Mol Microbiol*, 68, 1268- 1282.

Livak, K., Schmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402408.

Lenz, DH., Bassler, B. (2007). The small nucleoid protein Fis is involved in *Vibrio cholerae* quorum sensing. *Mol Microbiol*, 63, 859-871.

Lu, M., Campbell, J., Boye, E., Kleckner, N. (1994). SeqA: a negative modulator of replication initiation in *E. coli*. *Cell*, 77, 413-426.

Mangan, M., Lucchini, S., Croinin, T., Fitzgerald, S., Hinton, J., Dorman, C. (2011). Nucleoid-associated protein HU controls three regulons that coordinate virulence, response to stress and general physiology in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiol*, 157, 1075-1087.

Mangan, M., Lucchini, S., Danino, V., Croinin, T., Hinton, J., Dorman, J. (2006). The integration host factor (IHF) integrates stationary phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol*, 59, 1831-1847.

March, C., Cano, V., Moranta, D., Llobet, E., Pérez-Gutiérrez, C., Tomás, J., Suárez, T., Garmendia, J., Bengoechea, J. (2013). Role of bacterial surface structures on the interaction of *Klebsiella pneumoniae* with phagocytes. *PLoS One*. 8. e56847.

March, C., Moranta, D., Rigueiro, V., Llobet, E., Tomas, A., Garmendia, J., Bengoechea, J. (2011). *Klebsiella pneumoniae* outer membrane protein A is required to prevent the activation of airway epithelial cells. *J Biol Chem*, 286, 9956-9967.

McLeod, S., Burrus, V., Waldor, M. (2006). Requirement for *Vibrio cholerae* Integration Host Factor in Conjugative DNA Transfer. *J Bacter*, 16, 5704-5711.

Meatherall, B., Gregson, D., Ross, T., Pitout, J., Laupland, K. (2009) Incidence, risk factors, and outcomes of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Am J Med*, 122, 866873.

Mechulam, Y., Blanquet, S., G, Fayat. (1987). Dual level control of the *Escherichia coli* pheST-himA operon expression. tRNA(Phe)-dependent attenuation and transcriptional operator-repressor control by himA and the SOS network. *J Mol Biol*, 197, 453-470.

Milanesio, P., Arce-Rodriguez, A., Munoz, A., Calles, B., De Lorenzo, V. (2011). Regulatory exaptation of the catabolite repression protein (Crp)-cAMP system in *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol*, 13, 324-339.

Mizuta, K., Ohta, M., Mori, M., Hasegawa, T., Nakashima, I., Kato, N., Murphy, C., Mortensen, M., Krogfelt, K., Clegg, S. (1983). Virulence for mice of *Klebsiella* strains belonging to the O1 group: relationship to their capsular (K) types. *Infect Immun*, 40, 1, 56-6.

Nakae, Taiji. (1986). Outer-Membrane Permeability of Bacteria. *CRC Crit Rev in Microbiol*, 13, 1, 1-62.

Nakamura, K., Yahagi, S., Yamazaki, T., Yamane, K. (1999). *Bacillus subtilis* histone-like protein, HBSu, is an integral component of a SRP-like particle that can bind the Alu domain of small cytoplasmic RNA. *J Biol Chem*, 274, 13569-13576.

Nash, H. (1981). Integration and excision of bacteriophage lambda: the mechanism of conservation site specific recombination. *Annu Rev Genet*, 15, 143-167.

Nassif, X., Honore, N., Vasselon, T., Cole, S., Sansonetti, P. (1989). Positive control of colanic acid synthesis in *Escherichia coli* by rmpA and rmpB, two virulence plasmid genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Mol Microbiol*, 3, 1349-1359.

Nassif, X., Sansonetti, P. (1986). Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. *Infect Immun*, 54, 603-608.

Nguyen, H., De la Tour, C., Toueille, M., Vannier, F., Sommer, S., Servant, P. (2009). The essential histone-like protein HU plays a major role in *Deinococcus radiodurans* nucleoid compaction. *Mol Microbiol*, 73, 240-252.

Nilsson, L., Emilsson, V. (1994). Factor for inversion stimulation-dependent growth rate regulation of individual tRNA species in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 269, 9460-9465.

Nilsson, L., Vanet, A., Vijgenboom, E., Bosch, L., (1990). The role of FIS in trans activation of stable RNA operons of *E. coli*. *Embo J*, 9,727-734.

Oberto, J., Nabti, S., Jooste, V., Mignot, H., 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.

Oliveira Paiva M, Friggen A, Qin L, Douwes R, Dame RT, Smits K. (2019). The bacterial chromatin protein HupA can remodel DNA and associates with the nucleoid in *Clostridium difficile*. *J Mol Biol*, 431, 653-672.

Osuna, R., Lienau, K., Hughes, T., Johnson, R. (1995). Sequence, regulation, and functions of Fis in *Salmonella Typhimurium*. *J Bacteriol*, 177,2021-2032.

Paczosa, M., Meccas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiol*, 80, 629-661.

Pan, J., Zhao, M., Huang, Y., Li, J., Liu, X., Ren, J., Kan, B., Liang, W. (2018). Integration Host Factor Modulates the Expression and Function of T6SS2 in *Vibrio fluvialis*. *Front Microbiol*, 9, 962.

Pichavant, M., Delneste, Y., Jeannin, P., Fourneau, C., Brichet, A., Tonnel, A., Gosset, P. (2003). Outer membrane protein A from activates bronchial epithelial cells: implication in neutrophil recruitment. *J Immunol*, 171, 6697- 6705.

Phan, Q., Uebanso, T., Shimohata, T., Nakahashi, M., Mawatari, K., Takahashi, A. (2015). DNA-binding protein HU coordinates pathogenicity in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol*, 197, 2958-2964.

Perry, R., Balbo, P., Jones, H., Fetherston, J., DeMoll, E. (1999). Yersiniabactin from *Yersinia pestis*: biochemical characterization of the siderophore and its role in iron transport and regulation. *Microbiol*, 145, 1181-1190.

Pettijohn, D. (1988). Histone-like proteins and bacterial chromosome structure. *J Biol Chem*. 263.12793-1279.

Podschun, R., Ullmann, U. (1998) *Klebsiella spp.* as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinic Microbiol*, 11, 589- 603.

Podschun, R., Sievers, D., Fischer, A., Ullmann, U. (1993). Serotypes, hemagglutinins, siderophore synthesis, and serum resistance of *Klebsiella* isolates causing human urinarytract infections. *J Infect Dis*, 168, 1415- 1421.

Polaczek, P., Kwan, K., Campbell, J. (1998) Unwinding of the *Escherichia coli* originof replication (oriC) can occur in the absence of initiation proteins but is stabilized by DnaA and histone-like proteins IHF or HU. *Plasmid*,39, 77-83.

Preobrajenskaya, O., Boullard, A., Boubrik, F., Schnarr, M., Rouvière-Yaniv, J. (1994). The protein HU can displace the LexA repressor from its DNA-binding sites.*Mol Microbiol*, 13, 459-467.

Priyadarshini, R., Cugini, C., Arndt, A., Chen, T., Tjokro, N., Goodman, S. (2013). The nucleoid-associated protein HU β affects global gene expression in *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol* 159. 219-229.

Prokesch, C., TeKippe, M., Kim, J., Raj, P., TeKippe, M., Greenberg, D. (2016) Primary osteomyelitis caused by hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet Infect Dis*, 16, e190-e195.

Raetz, C., Guan, Z., Ingram, B., Six, D., Song, F., Wang, X., Zhao, J. (2009) Discovery of new biosynthetic pathways: the lipid A story. *J Lipid Res*. 50, S103-S108.

Rijavec, M., Müller-Premru M., Zakotnik, B., Žgur-Bertok, D. (2008). Virulence Factors and Biofilm Production among *Escherichia coli* Strains Causing Bacteraemia of Urinary Tract Origin. *Jour of medi microbiol*. 57,1329-34.

Remesh, S., Verma, S., Chen, J., Ekman, A., Larabell, C. (2020). Nucleoid remodeling during environmental adaptation is regulated by HU-dependent DNA bundling. *Nat Commun*, 9.

Rice, L. (2008). Federal funds for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens no ESKAPE. *J Infect Dis*, 197, 1079-1081.

Ross, W., Thompson, J., Newlands, J., Gourse, R. (1990). *E. coli* Fis protein activates ribosomal RNA transcription in vitro and in vivo. *Embo J*, 9, 3733-3742.

- Rouvière-Yaniv, J., Gros, F. (1975). Characterization of a novel, low-molecularweight DNA-binding protein from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci*, 72,3428- 3432.
- Rouvière-Yaniv, J., Gros, F., Haselkorn, R., Reiss, C. (1977). *Histone-Like Proteinsin Prokaryotic Organisms and Their InteractionWith DNA*. New York; Academic Press, 211-231.
- Rouvière-Yaniv, J., Yaniv, M., Germond, J. (1979). *E. coli* DNA binding protein HUforms nucleosomelike structure with circular double-stranded DNA. *Cell*, 17, 265- 274
- Russo, T., Olson, R., Macdonald, U., Metzger, D., Maltese, L., Drake, E., Gulick, A.(2014). Aerobactin mediates virulence and accounts for increased siderophore production under iron-limiting conditions by hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*, 82, 2356-2367.
- Russo, T., Olson, R., MacDonald, U., Beanan, J., Davidson, B. (2015). Aerobactin, but Not Yersiniabactin, Salmochelin, or Enterobactin, Enables the Growth/Survival of Hypervirulent (Hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* Ex Vivo and In Vivo. *Infect Immun*, 83, 3325-3333.
- Saha, R., Lou, Z., Meng, L., Harshey, R. (2013). Transposable prophage Mu is organized as a stable chromosomal domain of *E. coli*. *PLoS Genet*, 9, e1003902.
- Saldaña, Z., Xicohtencatl-Cortes, J., Avelino, F., Phillips, A., Kaper, J., Puente, J., Girón, J. (2010). Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli. *Environ Microbiol*, 11,4, 992-1006.
- Saldaña, Z, De la Cruz, M., Carrillo-Casas, E., Duran, L., Zhang, Y., HernandezCastro, R., Puente, J., Giron, J. (2014). Production of the *Escherichia coli* common pilus by uropathogenic *E. coli* is associated with adherence to HeLa and HTB-4 cells and invasion of mouse bladder urothelium. *PloS one*. 9. e101200.
- Sambrook, E., Fritsch, F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. New york; Cold Spring Harbor.

Santero, E., Hoover, T., North, K., Berger, D., Porter, C., Kustu, S. (1992). Role of integration host factor in stimulating transcription from the σ_{54} -dependent *nifH* promoter. *J Mol Biol*, 227, 602-620.

Schneider, R. (1999). A DNA architectural protein couples cellular physiology and DNA topology in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 34, 953-964.

Schneider, R., Lurz, R., Luder, G., Tolksdorf, C., Travers, A., Muskhelishvili, G. (2001). An architectural role of the *Escherichia coli* chromatin protein FIS in organising DNA. *Nucleic Acids Res*, 29, 5107-5114.

Schroll, C., Barken, K., Krogfelt, K., Struve, C. (2010). Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiol*, 10, 179.

Sebghati, T., Korhonen, T., Hornick, D., Clegg, S. (1998). Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. *Infect Immun*, 66, 2887-2894.

Sheikh, J., Hicks, M., Dall'Agnol, A., Phillips, N., Nataro, J. (2001). Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 41, 983-997.

Shon, A., Bajwa, R., Russo, T. (2013). Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Vir*, 4, 107-118.

Snyder, U., Thompson, J., Landy, A. (1989). Phasing of protein-induced DNA bends in a recombination complex. *Nature*, 341, 255-257.

Spaeny-Dekking, L., Nilsson, A., Von Euler, P., Van de Putte, A., Goosen, N. (1995). Effects of N-terminal deletions of the *Escherichia coli* protein Fis on growth rate, tRNA(2Ser) expression and cell morphology. *Mol Gen Genet*, 246, 259-265.

Steen, J., Steen, J., Harrison, P., Seemann, T., Wilkie, I., Harper, M., Adler, B., Boyce, J. (2010). Fis is essential for capsule production in *Pasteurella multocida* and regulates expression of other important virulence factors. *PLoS Pathog*, 6, e1000750.

Steinmann, R., Dersch, P. (2013). Thermosensing to adjust bacterial virulence in a fluctuating environment. *Future Microbiol*, 8, 85-105.

Stojkova, P., Spidlova, P., Lenco, J., Rehulkova, H., Kratka, L., Stulik, J. (2018). HU protein is involved in intracellular growth and full virulence of *Francisella tularensis*. *Vir*, 9, 754-770.

Stonehouse, E., Kovacikova, G., Taylor, R., Skorupski, K. (2008). Integration host factor positively regulates virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*, 190, 4736-4748.

Struve, C., Bojer, M., Krogfelt, A. (2009). Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. *Infect Immun*, 77, 5016-5024.

Swinger, K., Lemberg, M., Zhang, Y., Rice, P. (2003). Flexible DNA bending in HUDNAcocrystal structures. *EMBO J*, 22, 3749-3760.

Tang, H., Chiang, M., Liou, W., Chen, Y., Peng, H., Chiou, C., Liu, K., Lu, M., Tung, K., Lai, Y. (2010). Correlation between *Klebsiella pneumoniae* carrying pLVPK-derived loci and abscess formation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 29, 689-698.

Tippner, D., Afflerbach, H., Bradaczek, C., Wagner, R. (1994). Evidence for a regulatory function of the histone-like Escherichia coli protein H-NS in ribosomal RNA synthesis. *Mol. Microbiol*, 11, 589-604.

Travers, A., Muskhelishvili, G. (1998). DNA microloops and microdomains: a general mechanism for transcription activation by torsional transmission. *J Mol Biol*, 279, 1027-1043.

Troxell, B., Hassan, H. (2013). Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol*, 3 (59).

Tsai, YK., Fung, CP., Lin, J., Chen, J., Chang, F., Chen, T., Siu, L. (2011). *Klebsiella* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 1485-1493.

Tsay, R., Siu, L., Fung, C., Chang, F. (2002). Characteristics of bacteremia between community-acquired and nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infection: risk factor for mortality and the impact of capsular serotypes as a herald for community-acquired infection. *Arch Intern Med*, 162, 1021-1027.

Turton, J., Perry, C., Elgohari, S., Hampton, C. (2010). PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. *J Med Microbiol*, 5, 541-547.

- Ussery, D., Hinton, J., Jordi, B., Granum, P., Seirafi, A., Stephen, R., Tupper, A., Berridge, G., Sidebotham, J., Higgins, F. (1994). The chromatin-associated protein H-NS. *Bioch*, 76, 968-980.
- Van Noort, J., Verbrugge, S., Goosen, N., Dekker, C., Dame, R. (2004). Dual architectural roles for HU: formation of flexible hinges and rigid filaments. *Proc Natl Acad Sci*, 101, 6969-6974.
- Wang, G., Lo, L.F., Maier, R. (2012). A histone-like protein of *Helicobacter pylori* protects DNA from stress damage and aids host colonization. *DNA Repair*, 11, 733-740.
- Wang, H., Liu, B., Wang, Q., Wang, L. (2013). Genome-Wide Analysis of the *Salmonella* Fis Regulon and Its Regulatory Mechanism on Pathogenicity Islands. *PLoS One*, 8, e64688.
- Wada, M., Kano, Y., Ogawa, T., Okazaki, T., Imamoto, F. (1988). Construction and characterization of the deletion mutant of *hupA* and *hupB* genes in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol*, 204, 581-591.
- Wilson, R., Libby, S., Freet, A., Boddicker, J., Fahlen, T., Jones, B. (2001). Fis, a DNA nucleoid-associated protein, is involved in *Salmonella* Typhimurium SPI-1 invasion gene expression. *Mol. Microbiol*, 39:79-88.
- Xu, J., Johnson, R. (1995). Identification of genes negatively regulated by Fis: Fis and RpoS comodulate growth-phase-dependent gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*, 177, 938-947.
- Yasuzawa, K., Hayashi, N., Goshima, K., Kohno, F., Kano, Y. (1992). Histone-like proteins are required for cell growth and constraint of supercoils in DNA. *Gene*, 122, 9-15.