



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EL PAPEL DE LOS SISTEMAS DE DOS COMPONENTES PHOBR Y PHOPQ SOBRE
LA EXPRESIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA DE *Klebsiella pneumoniae***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. TÉLLEZ RAMÍREZ SERGIO GERSÁN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

DR. MIGUEL ÁNGEL DE LA CRUZ VILLEGAS

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR:

DR. VÍCTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLÁN

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM.

DRA. BERTHA MARÍA JOSEFINA GONZÁLEZ PEDRAJO

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., AGOSTO, 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/736/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

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 **31 de mayo de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del estudiante **TÉLLEZ RAMÍREZ SERGIO GERSÁN** con número de cuenta **413099448** con la tesis titulada **“EL PAPEL DE LOS SISTEMAS DE DOS COMPONENTES PHOBR Y PHOPQ 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: DR. JUAN MIRANDA RÍOS
Vocal: DR. DIMITRIOS GEORGELLIS
Vocal: DRA. ROSA LAURA CAMARENA MEJÍA
Vocal: DR. ERIC MONROY PÉREZ
Secretario: DRA. BERTHA MARÍA JOSEFINA GÓNZALEZ PEDRAJO

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

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 13 de agosto de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales

El presente trabajo se realizó gracias al posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM y a los apoyos económicos otorgados por el CONACYT con el número de apoyo 735109, bajo la dirección de:

Dr. Miguel Ángel de la Cruz Villegas

con el comité tutor conformado por:

Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán

Dra. Bertha María Josefina González Pedrajo.

Agradecimientos:

Agradezco de manera muy personal a mi familia por estar siempre pendiente de mí durante la etapa de cambio que represento la maestría, gracias por su apoyo incondicional.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio por su ayuda e instrucción durante mi estancia en el laboratorio, especialmente a Diana por ser un gran ejemplo como investigadora.

Agradezco infinitamente a Jessica por ser parte de este gran logro, por apoyarme incondicionalmente, por ser mi amiga, mi compañera, mi colega, mi cómplice y mi gran amor, muchas gracias.

Dedicatoria:

Esta tesis la dedico en memoria de mi abuelo Miguel, por todo el amor, cariño, comprensión y consejo, por todas sus palabras que siempre me alentaron a autosuperarme y alcanzar mis objetivos y sueños.

A mis padres María y Sergio, por enseñarme a perseverar ante las adversidades para lograr cumplir mis metas, por siempre alentarme a seguir mis estudios y siempre estar en continua formación para llegar a convertirme en un profesional integral.

A mi hermana Corinna, por siempre brindarme su apoyo incondicional pese a nuestras constantes diferencias. A mi hermano Alberto por demostrarme que las personas pueden cambiar para bien, construir nuevos principios y luchar por nuestros seres amados.

ÍNDICE

1	Resumen:	1
2	Abstract.....	2
3	Introducción	3
3.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3
3.2	Factores de virulencia de <i>K. pneumoniae</i>	5
3.2.1	Cápsula	7
3.2.2	Fimbrias.....	8
3.2.3	Lipopolisacárido.....	11
3.2.4	Proteínas de membrana externa	13
3.2.5	Sideróforos	14
3.3	Sistemas de dos componentes	16
3.3.1	Sistema PhoBR	17
3.3.2	Sistema PhoPQ	25
4	Justificación y Planteamiento del problema:	32
5	Hipótesis	33
6	Objetivos de la investigación	33
6.1	Objetivo general	33
6.2	Objetivo particular	33
7	Metodología	34
7.1	Material	34
7.1.1	Cepas y líneas celulares.....	34
7.1.2	Medios de cultivo	34
7.1.3	Antibióticos	34
7.2	Métodos	34
7.2.1	Generación de cepas mutantes $\Delta phoBR$ y $\Delta phoPQ$	34
7.2.2	Diseño de los iniciadores de los genes estudiados	36
7.2.3	Extracción del DNA genómico	38
7.2.4	Amplificación de los genes mediante PCR punto final.....	39
7.2.5	Extracción del RNA total.....	39
7.2.6	Obtención de cDNA por transcripción reversa (RT) a partir de RNA total	41
7.2.7	Amplificación de los genes por PCR en tiempo real.....	41
7.2.8	Determinación de la expresión genética relativa	42
7.2.9	Análisis estadístico de los resultados	42

8	Resultados.....	43
8.1	Generación de las cepas mutantes de los genes <i>phoBR</i> y <i>phoPQ</i>	43
8.2	Integridad del RNA extraído	45
8.3	Expresión genética de factores de virulencia en diferentes medios de cultivo.....	46
8.4	Expresión diferencial del regulador de respuesta <i>phoB</i> y <i>phoP</i> en medio TSB y MM-N	47
8.5	Efecto de los sistemas PhoBR y PhoPQ en la expresión genética de la cápsula en <i>K. pneumoniae</i>	48
8.6	Expresión genética de la fimbrias en <i>K. pneumoniae</i> en ausencia de PhoBR y PhoPQ	49
8.7	Expresión genética del lipopolisacárido en <i>K. pneumoniae</i> en las mutantes Δ <i>phoBR</i> y Δ <i>phoPQ</i>	51
8.8	Efecto de PhoBR y PhoPQ en la expresión genética de proteínas de membrana externa en <i>K. pneumoniae</i>	52
8.9	Expresión genética de los sideróforos de <i>K. pneumoniae</i> en las mutantes Δ <i>phoBR</i> y Δ <i>phoPQ</i>	53
9	Discusión de Resultados	54
9.1	Autorregulación de los genes del sistemas PhoBR y PhoPQ	55
9.2	Regulación de los genes de la cápsula	56
9.3	Regulación de los genes de las fimbrias.....	57
9.4	Regulación de los genes del lipopolisacárido.....	58
9.5	Regulación de los genes de las proteínas de membrana externa.....	59
9.6	Regulación de los genes del sistema de captación de hierro a través de sideróforos	59
10	Conclusión y perspectivas	60
11	Referencias bibliográficas.....	63

1 RESUMEN:

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) es una enterobacteria que en los últimos años ha alcanzado relevancia en el área de la salud pública como uno de los patógenos oportunistas causantes de infecciones nosocomiales gracias a su capacidad de multirresistencia a fármacos antimicrobianos. Además de la multirresistencia a fármacos antimicrobianos, *K. pneumoniae* posee factores de virulencia que le proporcionan una gran efectividad para colonizar nichos en el hospedero, tales como la cápsula, los pili o fimbrias, los sideróforos, el lipolisacárido y las proteínas de membrana externa. *K. pneumoniae*, al igual que otras bacterias, perciben y responden a condiciones ambientales cambiantes, a través de sistemas de dos componentes (TCS), los cuales están conformados por una histidín-cinasa (HK), y un regulador de respuesta citoplasmático (RR). Dos TCS relacionados con la limitación de fosfato y bajas concentraciones de calcio-magnesio son los sistemas PhoBR y PhoPQ, los cuales regulan globalmente una gran cantidad de genes entre los que se encuentran los que codifican para diferentes factores de virulencia. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la función reguladora de los sistemas de dos componentes PhoBR y PhoPQ, sobre la expresión de los factores de virulencia de *K. pneumoniae*. Se generaron las mutantes $\Delta phoBR$ y $\Delta phoPQ$ en *K. pneumoniae* por el método de interrupción en un solo paso usando productos de PCR. Se analizó la expresión transcripcional de diferentes genes de virulencia por RT-qPCR, creciendo la cepa silvestre y mutantes en medio rico TSB (alto fosfato) y MM-N (bajo fosfato). A excepción de los sideróforos, la expresión de la mayoría de los factores de virulencia se reprimió en MM-N y esta disminución fue total o parcialmente dependiente de la presencia del sistema PhoBR. Nuestros datos sugieren que el sistema PhoBR es un regulador maestro que reprime los genes de virulencia de *K. pneumoniae* en condiciones de bajo fosfato, probablemente cuando la bacteria pasa de una fase extracelular a una intracelular.

Palabras clave: *Klebsiella pneumoniae*, factores de virulencia, sistemas de dos componentes, PhoBR y PhoPQ.

2 ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) is an enterobacterium that in recent years has gained relevance in the public health area as one of the opportunistic pathogens that cause nosocomial infections thanks to its ability to multi-resistance to antimicrobial drugs. Beside this multi-resistance to antimicrobial drugs, *K. pneumoniae* has virulence factors that provide a great effectiveness in colonizing niches in the host, such as capsule, pili or fimbriae, siderophores, lipopolysaccharide, and outer membrane proteins. *K. pneumoniae*, like other bacteria perceive and respond to changing environmental conditions through two component systems (TCS) which are made of a histidine kinase (HK), and a cytoplasmatic response regulator (RR). Two TCS related with phosphate limitation and low concentrations of calcium-magnesium are the PhoBR and PhoPQ systems, that together regulate globally a many gene among which are genes that codify for virulence factors. The objective of this work was characterizing the regulatory function of the two component systems PhoBR and PhoPQ, on the expression of the virulence factors in *K. pneumoniae*. The mutants $\Delta phoBR$ y $\Delta phoPQ$ in *K. pneumoniae* were generated by the one-step interrupt method using PCR products. The transcriptional expression of different virulence genes was analyzed with RT-qPCR, growing the wild strain and mutants in TSB rich medium (high phosphate) and MM-N (low phosphate). Except for the siderophores, the expression of most of the virulence factors was repressed in MM-N this decrease depended totally or partially of the presence of the PhoBR system. Our data suggest that the PhoBR system is a master regulator that represses the virulence genes of *K. pneumoniae* in low phosphate conditions, probably when the bacteria move from an extracellular to an intracellular phase.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, virulence factors, two component systems, PhoBR and PhoPQ.

3.1 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) es una bacteria aislada por primera vez en 1882 por el microbiólogo alemán Carl Friedlander (Bengoechea & Pessoa, 2018). Friedlander lo describió como un bacilo encapsulado después de aislar la bacteria de los pulmones de individuos que habían muerto de neumonía. Originalmente llamado bacilo de Friedlander, fue renombrada como *Klebsiella* en 1886 (Jondle et al., 2018). *K. pneumoniae* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*; dicha familia incluye patógenos humanos bien estudiados como *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*. *K. pneumoniae* es una bacteria Gram negativa y no móvil, con una distribución ubicua (Rock et al., 2014).

Las especies de *Klebsiella* son diversas, con genomas relativamente grandes que permiten la flexibilidad metabólica, la diversidad bioquímica y el éxito en la colonización de nichos clínicos y ambientales (Bagley, 1985; Podschun et al., 2001). *K. pneumoniae* es el patógeno humano más común del género *Klebsiella* además de ser el patógeno oportunista responsable de un gran número de infecciones nosocomiales (Ristuccia & Cunha, 1984). Particularmente en mamíferos *K. pneumoniae* es miembro de la microbiota intestinal (Conlan et al., 2012). Se puede aislar fácilmente de las superficies de la mucosa humana de la orofaringe y el tracto gastrointestinal, las manos contaminadas por heces, los cuerpos de agua contaminados con aguas residuales e incluso las superficies en todos los hospitales; una vez que la bacteria está en el cuerpo, puede mostrar altos grados de virulencia y resistencia a los antibióticos (Rock et al, 2014).

K. pneumoniae es un patógeno oportunista capaz de causar una gran variedad de infecciones y enfermedades. Esta bacteria es una de las pocas Gram negativas capaces de provocar neumonía primaria y es una de las principales causas de neumonía nosocomial (Ristuccia & Cunha, 1984). Además, es una de las causas más frecuentes de infecciones del tracto urinario adquiridas en hospitales (Magill et al., 2018). Estos tipos de infecciones nosocomiales son más comunes entre los pacientes en condiciones extremas de edad o con inmunodeficiencias subyacentes,

algo que caracteriza en gran medida las infecciones por esta bacteria (Magill et al., 2018). Hoy en día las infecciones por *K. pneumoniae* se considera la causa más común de neumonía adquirida en hospitales, siendo que *K. pneumoniae* representa entre el 3% y el 8% de todas las infecciones bacterianas nosocomiales (Jondle et al., 2018; Ashurst & Dawson, 2020).

El incremento en el número de infecciones y el número de cepas resistentes a antibióticos, han convertido a *K. pneumoniae* en una amenaza grave para la salud. Las infecciones simples del tracto urinario se vuelven resistentes al tratamiento, y las infecciones severas tales como la neumonía y la bacteriemia, son prácticamente imposibles de tratar (Kuehn, 2013). En general, *K. pneumoniae* es la principal responsable de infecciones en las que se incluyen, neumonía, sepsis, infecciones urinarias, bacteriemia, meningitis y abscesos hepáticos piógenos (Paczosa & Meccas, 2016).

Como ya se mencionó, los pacientes con un sistema inmunológico comprometido por alguna enfermedad crónica o degenerativa tienden a adquirir infecciones por cepas de *K. pneumoniae* con mayor frecuencia. Sumado a esto, algunos factores de riesgo como la diabetes, enfermedades hepáticas, trasplantes de órganos, diálisis, tratamientos con corticosteroides y quimioterapia, aumentan la posibilidad de contraer una infección provocada por *K. pneumoniae* (Meatherall et al., 2009).

Para el desarrollo exitoso de una infección, *K. pneumoniae* debe enfrentarse primeramente a las defensas del hospedero, lo que implica una interacción temprana con el sistema inmune innato, incluyendo las barreras mecánicas y químicas, y al sistema inmune adaptativo humoral y celular (Zhang et al., 2000). Las principales barreras mecánicas y químicas son, el aparato mucociliar del tracto respiratorio, el pH y el flujo de la orina en el tracto genitourinario, y la peristalsis, la bilis y las enzimas digestivas (DeVinney et al, 2001; Paczosa & Meccas, 2016).

Cuando *K. pneumoniae* supera las barreras físicas y químicas del sistema inmune innato, las defensas del sistema de complemento, las colectinas, los péptidos antimicrobianos, la fagocitosis y la producción de citocinas inflamatorias, que forman parte del sistema inmune adaptativo humoral y celular, le hacen frente a la infección

(Batra et al., 2012; Bengoechea & Pessoa, 2018). Para ello, *K. pneumoniae* protege sus patrones moleculares que se asocian a los receptores de reconocimiento de patógenos (PRR), evitando su interacción con células del sistema inmune y, por lo tanto, prevenir la activación de respuestas antimicrobianas (Paczosa & Meccas, 2016).

Actualmente *K. pneumoniae* forma parte de un grupo de bacterias de importancia médica resistentes a antimicrobianos las cuales, han sido catalogadas por la Organización Mundial de la Salud e integradas en el Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (por su siglas en inglés GLASS) desde el año 2015, con la finalidad de priorizar la investigación en el uso de medicamentos antimicrobianos y la resistencia a los antimicrobianos para así encontrar alternativas terapéuticas que le hagan frente al aumento a la resistencia antimicrobiana (OMS, 2020).

3.2 Factores de virulencia de *K. pneumoniae*

La patogenicidad o la capacidad de causar enfermedades de una bacteria está regulada por sus factores de virulencia. Las bacterias utilizan los factores de virulencia para destruir las células fagocíticas, bloquear la fagocitosis, evadir la fusión con los lisosomas, bloquear la muerte dentro de los fagocitos, así como mejorar la replicación dentro de los mismos. Los factores de virulencia son moléculas, a menudo glucoproteínas o glucolípidos, derivados de genes bacterianos. Su expresión determina los procesos utilizados por las bacterias para colonizar con éxito las mucosas, infectar células, crecer y replicarse, o causar lisis celular (Zachary, 2017).

Los factores de virulencia de las bacterias son moléculas que influyen en las interacciones con otras bacterias, células o sustancias diana que intervienen en procesos, tales como la adherencia a las membranas celulares, la colonización e invasión de la piel o mucosas, la endocitosis o fagocitosis, el crecimiento, la replicación, la propagación, entre otros (Paczosa & Meccas, 2016). Además, se ha demostrado que los factores de virulencia tienen un papel central en la inhibición

de la respuesta inmune innata y adaptativa, lo que permite a la bacteria evadir los mecanismos de defensa del hospedero, y así proliferar en un ambiente hostil.

Entre los factores de virulencia bacteriana más estudiados se encuentran las proteasas, lipasas, DNasas, toxinas, los mediadores fisiológicos, los agentes líticos, los factores de adhesión, biopelículas, cápsulas bacterianas hechas de carbohidratos y factores antifagocíticos (Paczosa & Meccas, 2016; Zachary, 2017).

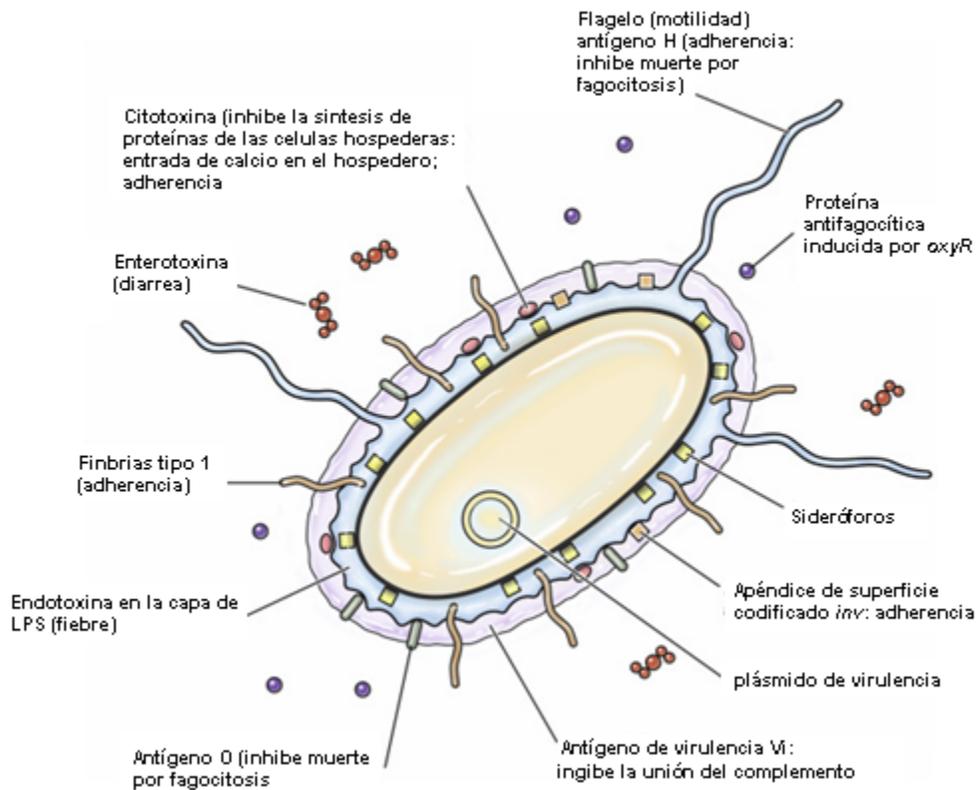


Figura 1. Factores de virulencia utilizados por las bacterias para causar enfermedades. Modificado de Zachary, 2017, Pathologic Basis of Veterinary Disease.

K. pneumoniae utiliza los factores de virulencia como estrategia para crecer y sobrevivir a expensas del hospedero, aumentando su efectividad como patógeno, y de esta forma eludir y suprimir la respuesta temprana del sistema inmunológico y colonizar nuevos nichos dentro del hospedero (Cortés et al. 2002; Cross, 2008).

Los principales factores de virulencia que *K. pneumoniae* utiliza son: la cápsula, las fimbrias o pilis, el lipopolisacárido, las proteínas de membrana externa y los sideróforos (Li et al., 2014).

3.2.1 Cápsula

Las bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* son capaces de elaborar una capa de polisacáridos asociados con la membrana externa, a esta capa se le denomina cápsula. La cápsula bacteriana es un factor de virulencia que protege a la bacteria de la fagocitosis mediada por células del sistema inmune tales como los neutrófilos y los macrófagos, durante la respuesta inmunitaria aguda inflamatoria y adaptativa. La cápsula secretada por la bacteria está firmemente adherida a la pared celular y es una gran reserva de nutrientes y agua (Paczosa & Meccas, 2016; Zachary, 2017). La composición exacta de la cápsula varía entre las diferentes especies de esta familia, y esta variación determina el antígeno capsular K que caracteriza a cada especie. Pese a la gran diversidad, todas las cápsulas están principalmente formadas por largas cadenas de polisacáridos llamados polisacáridos capsulares (CPS) (Schembri et al., 2004).

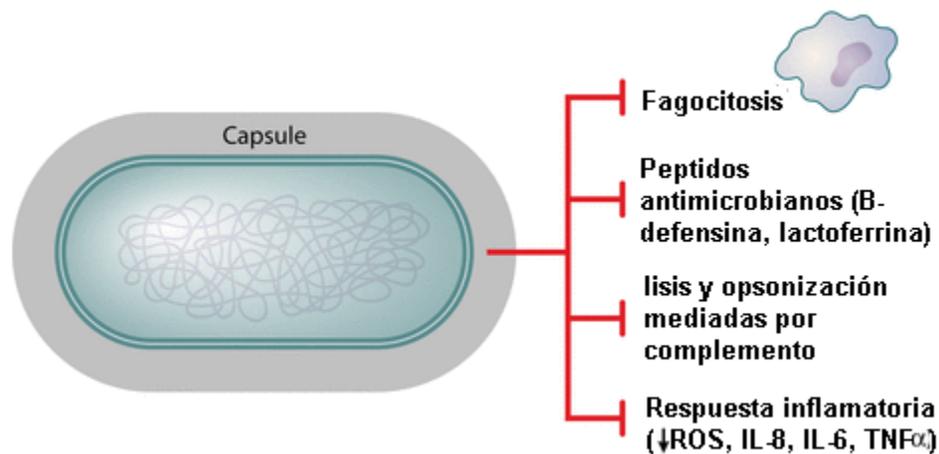


Figura 2. Papel de la cápsula en la virulencia de *K. pneumoniae*. Modificado de Paczosa & Meccas, 2016.

Los polisacáridos que conforman a la cápsula le brindan protección contra la desecación y el ataque de los fagocitos, además son los principales determinantes del grado de virulencia (Schembri et al., 2004; Pan, 2015). Los CPS suelen tener

carga negativa, gracias a ello es que esta capa está altamente hidratada (Willis & Whitfield, 2013).

La cápsula es un factor de virulencia muy importantes en *K. pneumoniae*, la gran mayoría de los aislados de esta bacteria expresan una cápsula prominente que cubre toda la superficie, resultando en un fenotipo mucoso muy característico cuando se cultiva en placas de agar (Struve & Krogfelt, 2003). Además, se ha demostrado que la cápsula media la protección contra la fagocitosis y el efecto bactericida del suero (Yoshida et al., 2000).

3.2.2 Fimbrias

Al mecanismo mediante el cual las bacterias se fijan y colonizan algunas superficies se le conoce como adherencia. La adherencia es posible gracias a la presencia de proteínas localizadas en la superficie de las bacterias Gram negativas y en algunos casos de Gram positivas. Estas proteínas adherentes se encuentran apiladas en estructuras largas y filamentosas que se extienden hasta por varios micrómetros por fuera de la célula. A estos apéndices se les denomina fimbrias o pili (Rijavec et al., 2008).

Las fimbrias tienen un papel fundamental en la colonización de superficies bióticas y abióticas (Figura 3) (Epstein et al., 2009), y en la adhesión entre bacterias contiguas con el fin de construir comunidades microbianas complejas denominadas biopelículas. La formación de biopelículas ayuda a crear una matriz extracelular adherente que brinda resistencia al daño mecánico, a la desecación y a algunos agentes tóxicos para la bacteria (Rijavec et al., 2008; Proft & Baker, 2009).

La adhesión de las bacterias como *K. pneumoniae* a las superficies mucosas del hospedero, se considera un paso esencial en el desarrollo de la infección. La unión de un número suficiente de bacterias en el portal de entrada apropiado inicia una etapa temprana de infección bacteriana denominada colonización. La mayoría de los aislados clínicos de *K. pneumoniae* son capaces de producir principalmente dos fimbrias adherentes, del tipo 1 y del tipo 3 (Struve et al., 2009).

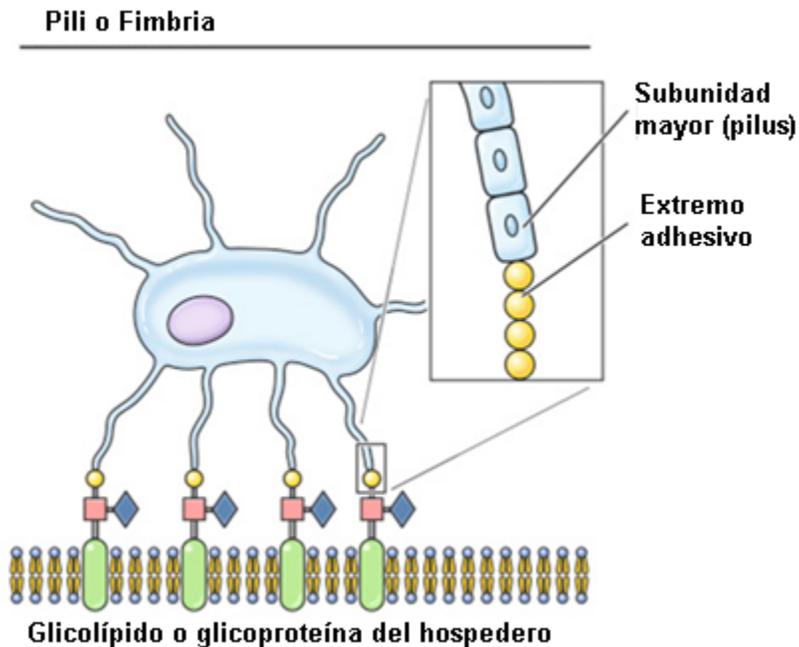


Figura 3. Adhesinas fimbriales (Pilus). Las fimbrias compuestas en su mayoría por una pilina mayoritaria y moléculas de adhesina apiladas en serie (molécula amarilla); la adhesina es capaz de unirse a moléculas situadas en la superficie de la célula blanco ya sean glicolípidos o glicoproteínas (molécula rosa y azul). Modificado de Zachary, 2017

Las fimbrias del tipo 1 y 3 se sintetizan y se ensamblan en la superficie de *K. pneumoniae*. La fimbria del tipo 1 es la más caracterizada, y la más prevalente entre los integrantes de la familia *Enterobacteriaceae*; se compone principalmente de subunidades estructurales de las proteínas FimA y la adhesina FimH, este última, le confiere la capacidad de adherirse a superficies con manosa, como la superficie de algunas células epiteliales (Schembri et al., 2004; Cruz et al., 2014).

Las fimbrias tipo 1 se caracterizan por ser protuberancias finas en forma de hilo en el 90% de la superficie de *K. pneumoniae* (Figura 4), así como en los miembros de las *Enterobacteriaceae* (Stahlhut et al., 2009). Las fimbrias del tipo 1 se unen específicamente a moléculas de glicoproteínas D-manosiladas, por lo que esta unión se denomina frecuentemente como, unión sensible a manosa (Kline et al., 2009)

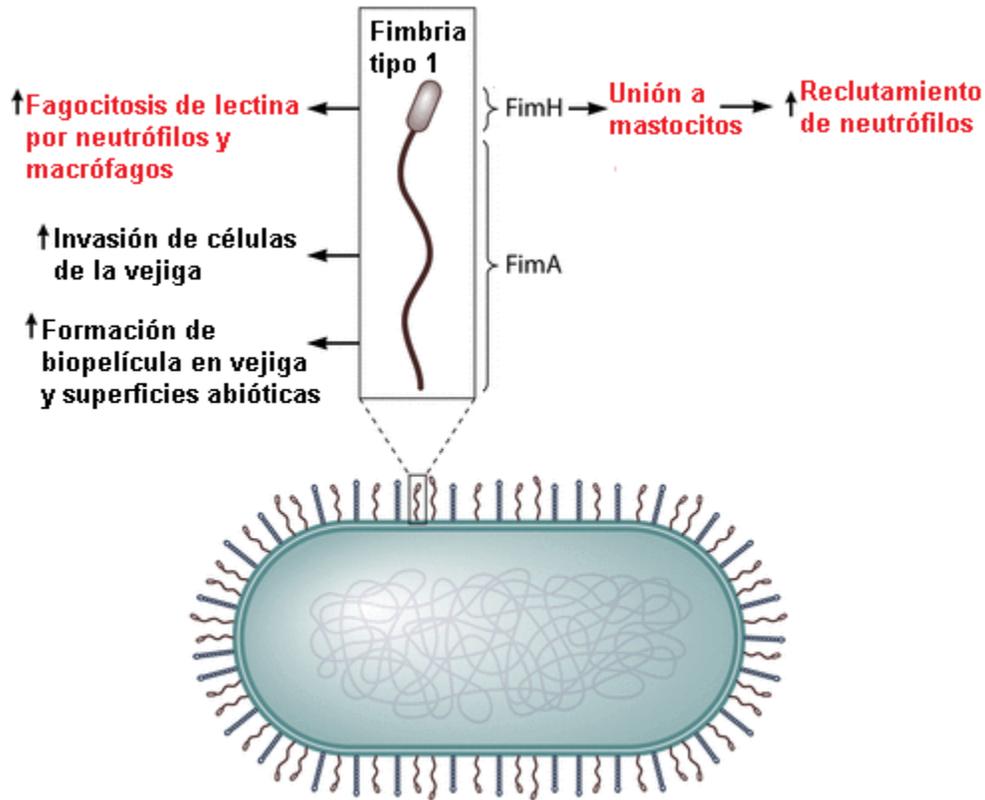


Figura 4. Funciones de las fimbrias tipo 1 durante la infección por *K. pneumoniae*. Las fimbrias de tipo 1 son estructuras adhesivas filamentosas, unidas a la membrana, compuestas principalmente de subunidades FimA, con la subunidad FimH en la punta. Estas fimbrias tienen un papel en la invasión y la formación de biopelículas en las superficies bióticas y abióticas. Modificado de Paczosa & Meccas, 2016.

A diferencia de las anteriores, las fimbrias del tipo 3, son filamentos en forma de hélice (Figura 5). En *K. pneumoniae* intervienen en el reconocimiento de proteínas, que a diferencia de las fimbrias del tipo 1, estas no son sensibles a la presencia de manosa situada en la superficie del tejido hospedero, sin embargo, se ha demostrado que es capaz de unirse a proteínas de la matriz extracelular como los colágenos tipo IV y V (Sebghati et al., 1998). Estas fimbrias actúan como un importante contribuyente en la formación de biopelículas, sin embargo, se ha demostrado que esto no juega un papel crucial en infecciones intestinales y pulmonares (Struve et al., 2009).

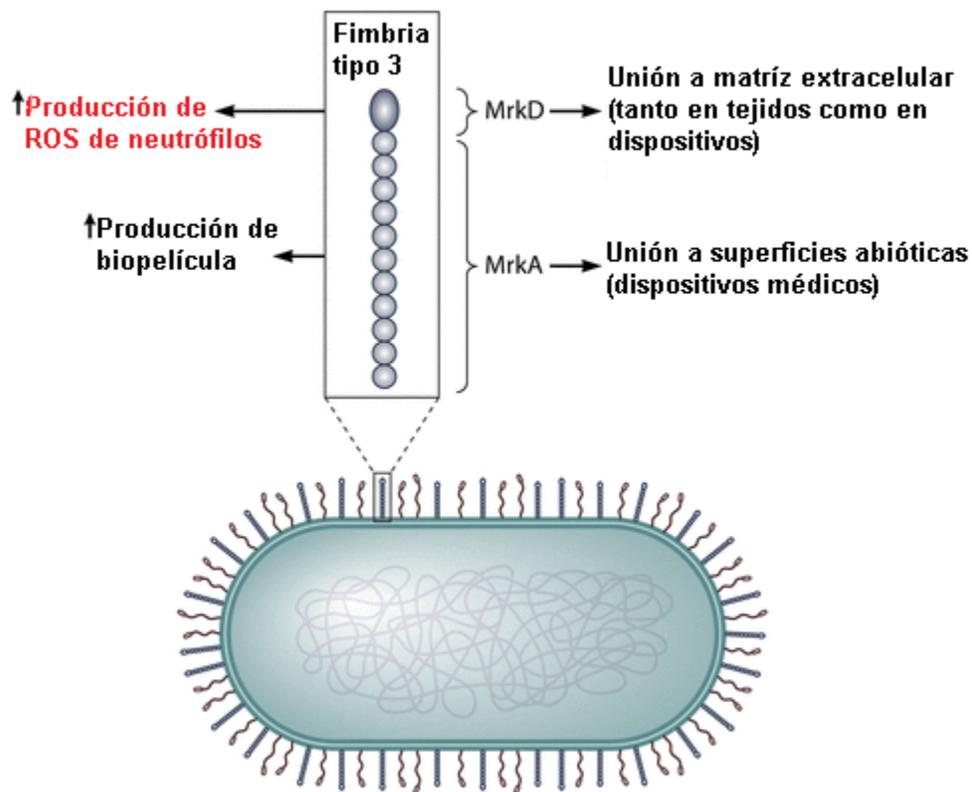


Figura 5. Funciones de las fimbrias tipo 3 durante la infección por *K. pneumoniae*. Las fimbrias tipo 3 son estructuras adhesivas de tipo hélice, unidas a la membrana, en la superficie de *K. pneumoniae*. Están compuestas principalmente de subunidades MrkA, con la subunidad MrkD en la punta. Las fimbrias tipo 3 son necesarias para la producción de biopelículas de *K. pneumoniae* y su unión a dispositivos médicos. Modificado e Paczosa & Meccas, 2016.

3.2.3 Lipopolisacárido

Las bacterias Gram negativas, tales como *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Haemophilus spp.*, *Bordetella spp.* y *K. pneumoniae* pueden liberar endotoxinas en los tejidos vascularizados del organismo hospedero cuando mueren. Endotoxina es un término general utilizado para caracterizar cualquier toxina de la pared celular asociada a la membrana externa, sin embargo, el término se refiere comúnmente al complejo lipopolisacárido (Zachary, 2017).

El lipopolisacárido (LPS) es el componente principal de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, cubriendo el 90% de su superficie (Alexander & Rietschel, 2001). Son moléculas cargadas negativamente, las cuales están constituidos comúnmente por un dominio hidrófobo conocido como lípido A o

endotoxina, un oligosacárido o núcleo, y un polisacárido o antígeno O (Figura 6). Esta barrera formada por LPS sirve como barrera física contra diferentes agentes antimicrobianos, impidiéndoles atravesar la membrana externa hacia el citoplasma (Raetz & Whitfield, 2002; Rosenfeld & Shai, 2006). La toxicidad del LPS es atribuible al complejo lípido A del LPS, mientras que la inmunogenicidad es atribuible a componentes de polisacárido del antígeno O (Rosenfeld & Shai, 2006).

Esta barrera de la membrana externa funciona como una barrera protectora contra las moléculas grandes nocivas y los compuestos hidrófobos en el medio ambiente, como las sales biliares, las moléculas tóxicas, la lisozima y los medicamentos antimicrobianos. A su vez se ha demostrado que la membrana tiene la capacidad de impedir la fagocitosis mediada por macrófagos, facilitar la colonización de las células diana, y participar en el proceso de variación genómica en la membrana externa para evadir la respuesta inmune innata y adquirida del hospedero (Paczosa & Meccas, 2016; Zachary, 2017).

El lípido A o endotoxina sirve como como medio de unión entre el LPS y la membrana celular de las bacterias Gram negativas (Raetz & Whitfield, 2002). El core se subdivide en core externo formado por hexosas y en core interno formado por heptosas (Romero & Iregui, 2010). El polisacárido o antígeno O es un polímero de unidades repetidas de glicósidos altamente variable en longitud, y su composición depende de la especie de bacteria (Alexander & Rietschel, 2001).

Las endotoxinas se liberan después de la destrucción de la pared celular bacteriana y son tóxicas para la mayoría de las células animales (especialmente células endoteliales, plaquetas y macrófagos), tejidos y órganos. Las endotoxinas pueden ser letales en grandes cantidades dentro del sistema circulatorio, causando la activación de citocinas proinflamatorias en macrófagos y células endoteliales. Todo esto conduce finalmente a la activación de las cascadas del complemento, la coagulación y al shock endotóxico caracterizado por fiebre, hipoglucemia, trombosis, shock hipotensor y muerte (Paczosa & Meccas, 2016; Zachary, 2017).

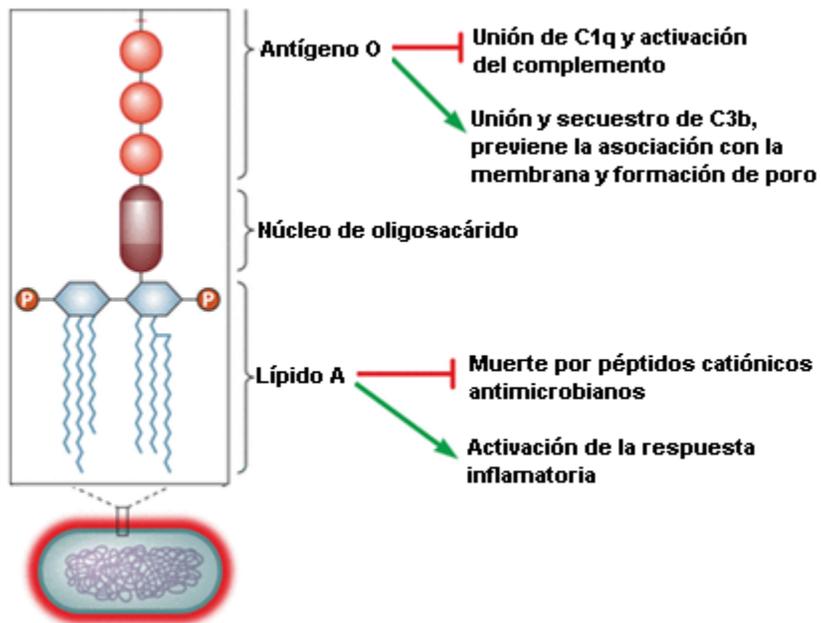


Figura 6. Papel de los LPS en la virulencia de *K. pneumoniae*. Modificado de Paczosa & Meccas, 2016.

3.2.4 Proteínas de membrana externa

Muchos microorganismos patógenos hacen uso de proteínas localizadas en la membrana externa (OMP) interactuando con el medio del hospedero con el fin de inducir la expresión de factores de virulencia, invadir tejidos y evadir el sistema inmunológico (Rasko & Sperandio, 2010).

OmpA es una de las principales proteínas en la membrana externa de las bacterias Gram negativas que se caracteriza por ser muy conservada entre las integrantes de la familia *Enterobacteriaceae* (Sugawara et al., 2016). Se ha demostrado que esta proteína está involucrada en la adherencia a células epiteliales, la inducción de muerte de células epiteliales y en la formación de biopelículas (Krishnan & Prasadarao, 2012).

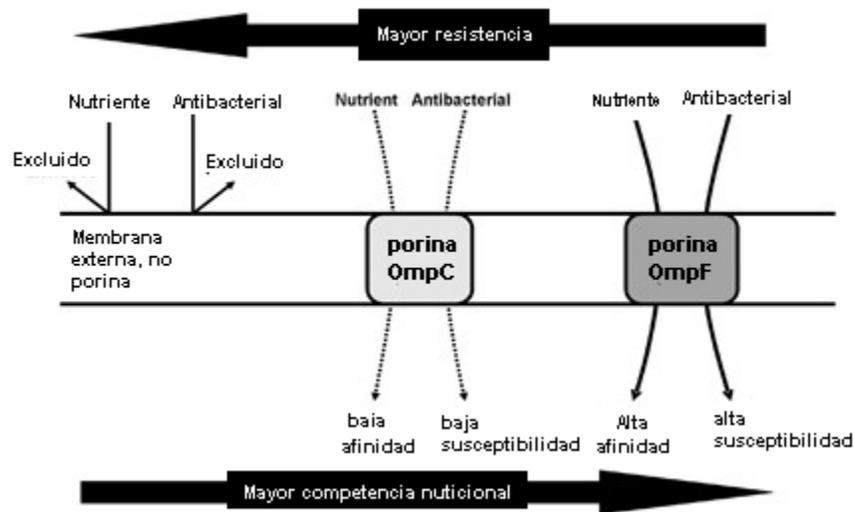


Figura 7. Efectos de la permeabilidad de la membrana con las principales porinas de *E. coli*. La membrana externa excluye los nutrientes polares y los compuestos antibacterianos, mientras que la porina OmpC con permeabilidad limitada proporciona una permeabilidad general más baja que OmpF, que es la porina más permeable en *E. coli*. Modificado de Phan, & Ferenci, 2013.

Por otra parte, *K. pneumoniae* presenta dos proteínas de membrana características, OmpK35 y OmpK36, las cuales son homólogas a las proteínas OmpF y OmpC respectivamente (Figura 7). Se ha descubierto que en *E. coli*, estas porinas intervienen en la difusión pasiva de diferentes compuestos presentes en el medio (Sugawara et al., 2016). En algunos trabajos se ha reportado que, en un medio rico en nutrientes, se fomenta la expresión de la porina OmpK36 (OmpC) la cual tiene un canal más pequeño que el de OmpK35 (OmpF), limitando la afluencia de moléculas grandes y cargadas (sales y antibióticos) con el fin de mantener el nivel osmótico bajo (Yoshida et al., 2006; Masi & Pagés, 2013).

3.2.5 Sideróforos

Las bacterias requieren hierro para la colonización de las mucosas. El hierro, a diferencia de otros nutrientes como el nitrógeno, fósforo y potasio, es muy abundante, sin embargo, no se encuentra de forma libre en el medio que ofrece un organismo hospedero debido a que se encuentra fuertemente unido a las moléculas hemo, ferritina, transferrina o lactoferrina, por tal motivo es un factor limitante para el crecimiento de los microorganismos. Es por la limitación de este nutriente que los microorganismos como *K. pneumoniae* utilizan moléculas llamadas sideróforos con

el fin de secuestrar moléculas de hierro del propio organismo hospedero (Krewulak & Vogel, 2008; Zachary, 2017).

Los sideróforos son factores de virulencia que median la liberación de las reservas intracelulares de hierro (Paczosa & Mecsas, 2016; Zachary, 2017). Los sideróforos son moléculas secretadas por bacterias Gram negativas en condiciones de deficiencia de hierro, con un peso molecular de apenas unos 0.5 a 1 KDa (Aguado et al., 2012). Su principal característica es su elevada constante de disociación la cual promueve una gran afinidad a las moléculas de hierro, algo que facilita la adquisición de este compuesto de otras moléculas (Clark, 2004).

De acuerdo con el grupo funcional quelante de hierro que poseen los sideróforos se clasifican en catecolatos (con un grupo funcional catecol), hidroximatos (con un grupo funcional hidroxámico) e hidroxicarboxilatos (con un grupo funcional ácido hidroxicarboxílico) (Crosa y Walsh, 2002). Las enterobacterias en la mayoría de sus especies sintetizan un par de sideróforos específicos, la enterobactina y la aerobactina. La enterobactina es el sideróforo más eficiente con una constante de formación de complejos férricos más elevada; disocia con facilidad el hierro de proteínas acarreadoras como la transferrina (Aguado et al., 2012).

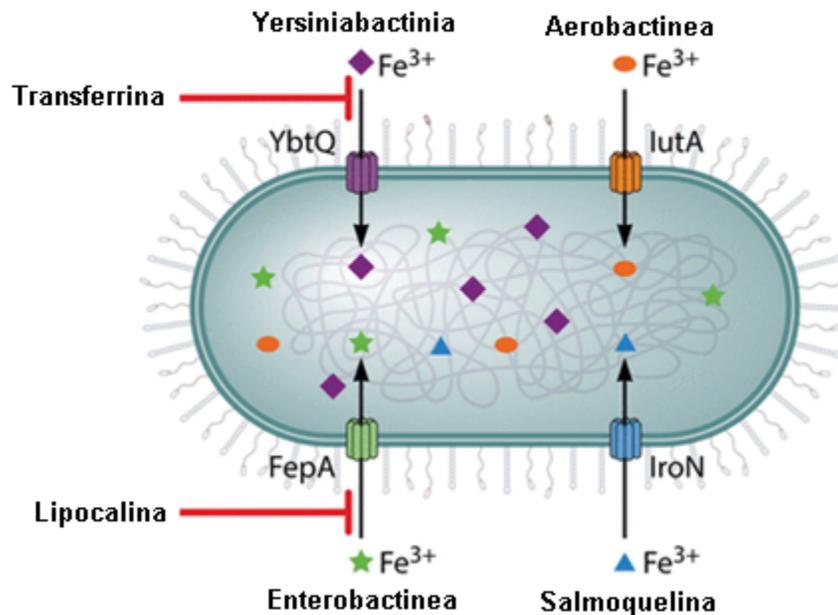


Figura 8. Producción de sideróforos y roles en la virulencia de *K. pneumoniae*. Modificado de Paczosa & Meccas, 2016.

Una vez que se forma un complejo entre el sideróforo y la molécula de hierro, los mecanismos de transporte específicos llevan a cabo un reconocimiento específico a través de proteínas ancladas a la membrana y posteriormente su transporte al interior de la célula (Figura 8) (Morrissey et al., 2000).

3.3 Sistemas de dos componentes

Las bacterias en general tienen un fino mecanismo de respuesta a las diferentes perturbaciones ambientales a través de sistemas de dos componentes (TCS) compuestos principalmente por un sensor histidina cinasa (HK) y un regulador de respuesta (RR) (Bhate et al., 2015).

El sensor HK tiene actividad autocinasa, fosfotransferasa y fosfatasa; esta última regula el nivel de fosforilación del regulador RR afín (Gao & Stock, 2017). La activación de este sistema se produce por estímulos que interactúan con la cinasa y su actividad de fosfatasa, provocando un cambio en el nivel de fosforilación de RR y la modulación de la respuesta de salida de la regulación transcripcional (Gao & Stock, 2009).

Existe una gran diversidad de sistemas de dos componentes que regulan la adaptación al medio ambiente, pero en bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, los sistemas PhoBR y PhoPQ destacan como reguladores maestros de los factores de virulencia en respuesta a limitación de fosfatos y magnesio (Pratt et al., 2010).

3.3.1 Sistema PhoBR

El fósforo es una molécula esencial para la vida. Está presente principalmente en su estado de oxidación +5, como fosfato inorgánico (Pi). Debido a que el Pi es esencial para el crecimiento, las células han desarrollado sistemas sofisticados para adquirir Pi cuando está limitado en el medio ambiente, y para hacer frente al exceso de Pi cuando se acumula a niveles altos dentro de la célula (Carmany et al., 2003).

El operón *phoBR* codifica para un sistema de dos componentes que regula la expresión de genes implicados en la adquisición de Pi llamado PhoBR (Figura 9). Este sistema regula la asimilación de fósforo en respuesta a la limitación de las concentraciones de Pi. (Stock et al., 2000). PhoBR se activa cuando la concentración de Pi extracelular baja de 0.4 μM , induciendo la transcripción de genes pertenecientes al regulón de Pho mediante la unión de PhoB fosforilado a la secuencia de DNA denominadas cajas Pho. La unión de PhoB induce o reprime la transcripción de los genes que conforman el regulón Pho, incluyendo genes que regulan el transporte y metabolismos de Pi (Hsieh & Wanner, 2010).

Los genes miembros del regulón Pho son aquellos regulados directamente por PhoB, y no incluye otros genes cuya expresión cambia debido a la limitación de Pi. Tras el agotamiento de Pi, los patrones de expresión de numerosos genes son regulados de forma diferencial independiente de PhoB, algo que denota los complejos esquemas reguladores de la célula y la importancia del Pi para el metabolismo celular (Jiang et al., 2018). El regulador de respuesta PhoB y la histidina quinasa PhoR fueron de los primeros miembros conocidos de la familia de proteínas de sistemas de dos componentes (Wanner, 1996).

PhoR es una histidina autocinasa / fosfo-PhoB fosfatasa homodimérica y bifuncional. Cuando el Pi ambiental es limitado, se autofosforila en un residuo de

histidina conservado y posteriormente dona este grupo fosforilo a PhoB, pero cuando Pi es abundante elimina el grupo fosforilo de fosfo-PhoB (Carmany et al., 2003). Por lo tanto, PhoR como muchas otras histidín cinasas, muestra funciones de autocinasa, fosfotransferasa y fosfatasa (Stock et al., 2000). PhoR tiene una longitud de 431 aminoácidos y una masa de 49.498 kDa. Es una proteína integral de membrana que a diferencia de muchas otras histidín cinasas unidas a la membrana, no contiene un dominio periplasmático. PhoR tiene una región de expansión de membranas, una región citoplásmica cargada positivamente (CR), un dominio Per-ARNT-Sim (PAS), un dominio de dimerización y fosforilación de histidina (DHp), y un dominio catalítico (CA) (Figura 9) (Etzkorn et al., 2008).

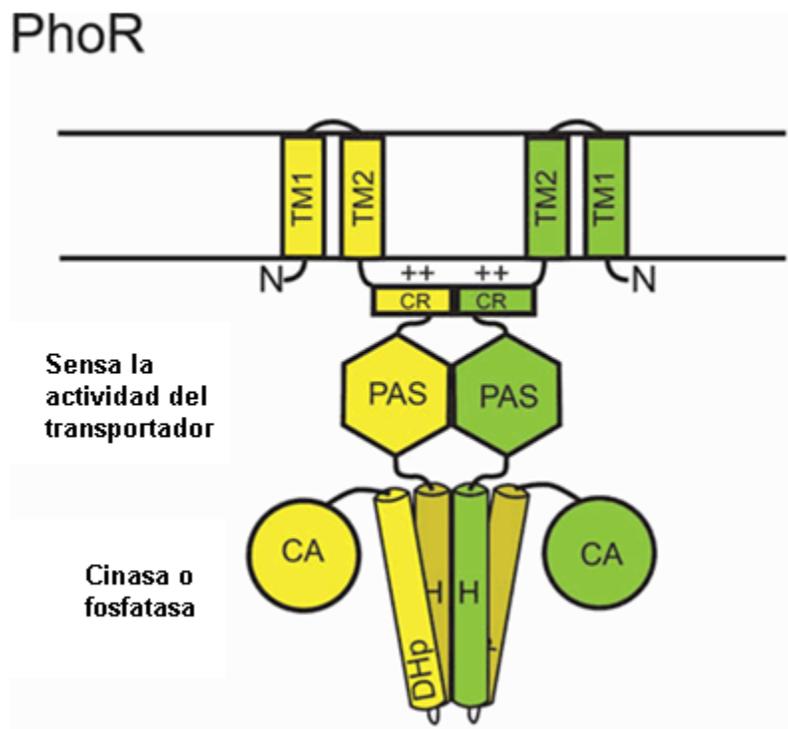


Figura 9. Estructura de dominio predicha de PhoR. PhoR, al igual que otros sensores histidín cinasa, es un dímero que se compone de varios dominios. Se autofosforila en su His-213. (TM, dominio transmembranal; CR, región cargada; Dominio PAS; DHp, dominio de la dimerización y la fosforilación de histidina; CA, dominio catalítico y de enlace ATP. Tomado de Gardner & McCleary, 2019.

Por su parte, PhoB es una proteína reguladora de respuesta de este sistema de dos componentes que se compone de un dominio receptor N terminal y un dominio de

enlace a DNA (DBD) C terminal (Solá et al., 1999). Esta familia de proteínas se define por el dominio del receptor N terminal de aproximadamente 120 aminoácidos. El dominio del receptor contiene el sitio de fosforilación aspartilo, que en PhoB es el Asp53, un residuo altamente conservado (Gardner & McCleary, 2019).

El dominio receptor de PhoB contiene los residuos catalíticos necesarios para transferir un grupo fosforilo a partir del residuo de fosfo-histidina de fosfo-PhoR. Los residuos conservados Glu-9 y Asp-10 que rodean al residuo Asp-53, tienen una importante función en la unión de iones metálicos, lo que facilita un ataque nucleófilo al átomo de fósforo por el residuo de fosfo-histidina PhoR (McCleary & Stock, 1994; Gardner & McCleary, 2019). El dominio efector de PhoB participa en la unión al DNA y en las interacciones de la RNA polimerasa. Esta estructura de 99 aminoácidos consiste en un motivo hélice-vuelta-hélice (HTH) que contiene la hélice de reconocimiento de DNA. Cuando PhoB se fosforila, forma un dímero estable que se une cooperativamente a las secuencias de la caja Pho en el DNA (Galperin, 2010; Finn et al., 2016).

Cada protómero PhoB dentro del dímero se une a una repetición directa de 11 pares de bases dentro de la caja Pho de 22 pares de bases. El reconocimiento del motivo TGTCA dentro del surco mayor del DNA está mediado por la hélice de reconocimiento (Gardner & McCleary, 2019). Estas secuencias cortas denominadas cajas Pho se encuentran corriente arriba de los genes del regulón Pho las cuales son el blanco de unión de la RNA polimerasa reclutada por PhoB. La fosforilación estabiliza la conformación dimérica lo cual mejora la unión al DNA y la activación transcripcional (Blanco, 2002). El dímero PhoB se une y dobla el DNA que contiene una secuencia de caja Pho e interactúa con el dominio 4 de la subunidad σ de la RNA polimerasa para reclutar dicha enzima al sitio de inicio de la transcripción (Canals et al., 2012).

3.3.1.1 Sistema de transporte PstSCAB

Uno de los blancos principales del sistema de dos componentes PhoBR son las proteínas PstSCAB que forman un transportador de Pi de alta afinidad. Estas proteínas son miembros de la superfamilia de transportadores ABC. Esta

superfamilia proteica emplea la hidrólisis de ATP para transportar sustratos a través de membranas biológicas, tanto como importadores como exportadores (Davidson et al., 2008). Las proteínas PstSCAB utilizan una proteína periplásmica de unión al sustrato extracitoplasmático que se encargan de presentar al sustrato sus proteínas de membrana (Quiocho & Ledvina, 1996).

PstS es la proteína periplasmática de unión al sustrato del sistema Pst, con un peso molecular de 34 kDa. Su estructura contiene dos dominios globulares separados por un vinculador con el sitio de enlace a Pi situado en una hendidura entre los dos dominios. PstS une el Pi en condiciones fisiológicas con una constante de disociación de 10 μ M (Luecke & Quiocho, 1990). PstC y PstA son los componentes de membrana del transportador (Gardner & McCleary, 2019). La característica más conservada dentro de la superfamilia es el dominio de unión de nucleótidos, también llamado casete de unión a ATP, el cual se une a una molécula de ATP para ser hidrolizada con el fin de proporcionar la energía necesaria para el transporte. PstB contiene el dominio de unión de nucleótidos para este transportador (Beis, 2015).

Se ha propuesto que el sistema PstSCAB, al igual que otros transportadores de esta superfamilia, utiliza un mecanismo de acceso alternativo para transportar sus sustratos, en el que alternan entre estados orientados hacia el interior y hacia el exterior que son impulsados por la unión de sustratos, la hidrólisis de ATP, la liberación de ADP y la posterior unión de ATP (Figura 10) (Beis, 2015). La unión de ATP a través de la interfaz del dímero PstB se cierra la hendidura y conduce a una estructura orientada hacia el exterior, la cual es capaz de recibir Pi de las proteínas PstS periplasmática cargadas de sustrato (Gardner & McCleary, 2019). Este evento desencadenaría la hidrólisis ATP, que giraría los componentes de la transmembrana orientados hacia el exterior a una conformación orientada hacia el interior, abriendo así la puerta y permitiendo que Pi obtenga acceso al citoplasma (Gardner & McCleary, 2019).

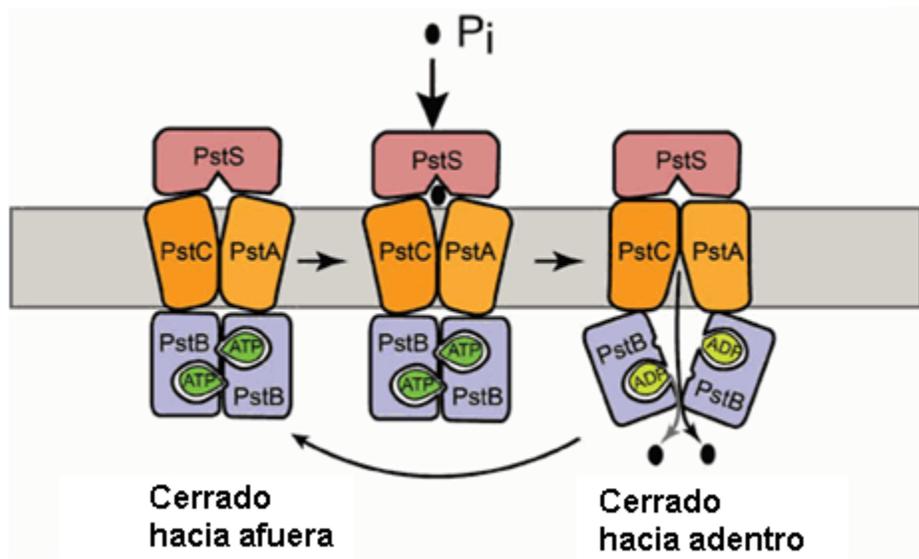


Figura 10. Ciclo de transporte del transportador PstSCAB. La proteína PstS es la proteína de unión al fosfato periplasmático que une y presenta Pi a los componentes transmembranas PstC y PstA. PstB enlaza ATP, que estabiliza un dominio de enlace de nucleótidos cerrado sin PstC y PstA adoptando una conformación orientada hacia el exterior. Pi-PstS desencadena hidrólisis de ATP, que causa un cambio de conformación entre los protómeros PstB que cambian las proteínas PstC/PstA en una estructura orientada hacia el interior. El enlace de ATP restablece el sistema a la estructura orientada hacia el exterior. Tomado de Gardner & McCleary, 2019.

El transportador Pst se expresa más cuando los niveles ambientales de Pi son bajos. Por esta razón, se asumió que desempeña su papel más importante en el transporte de Pi en condiciones limitantes, sin embargo, se ha propuesto en trabajos recientes que participa en el transporte de Pi en todas las condiciones (Hsieh & Wanner, 2010). La expresión de los genes *pstSCAB* está controlada por el sistema de dos componentes PhoBR. El principal promotor de este operón, y el que está regulado por los niveles de Pi se encuentra corriente arriba del gen *pstS* (Hsieh & Wanner, 2010). Otros promotores dentro operón han sido identificados corriente arriba de los genes *pstC*, *pstB* y *phoU* y son bastante débiles, pero pueden desempeñar un papel en el mantenimiento de los niveles basales de las proteínas PstSCAB cuando las concentraciones de Pi son altas (Spira et al., 2010; Gardner & McCleary, 2019).

3.3.1.2 PhoU

Además de la proteína PstSCAB, PhoU también es necesario para la transducción de señales inducidas por Pi, pero no es necesario para el transporte a través del complejo (Steed & Wanner, 1993). PhoU es una proteína que modula el transporte de Pi a través del complejo PstSCAB. Cuando Pi es abundante, PhoU actúa como un freno para evitar demasiada importación de Pi, con su consiguiente hidrólisis de ATP (Rice et al., 2009).

Cuando el gen *phoU* es mutado o eliminado, PhoR es constitutivamente activa como una autocinasa, lo que provoca un alto nivel de expresión de los genes del regulón Pho. Las mutantes *phoU* muestran un crecimiento deficiente y con frecuencia acumulan mutaciones compensatorias en los genes *phoR*, *phoB* o *pstSCAB*. Esto sugiere que el crecimiento celular se ve afectado cuando los niveles intracelulares de Pi son demasiados altos (Rice et al., 2009).

3.3.1.3 Regulación de Pi

Se ha aceptado que el regulón Pho se activa cuando los niveles ambientales de Pi caen por debajo de 0.4 μM (Wanner, 1996). Debido a que la proteína PhoR no tiene un dominio periplasmático significativo, se pensó que esta cinasa de histidina sensora no percibía el Pi directamente de medio ambiente. El estímulo de Pi requiere al transportador PstSCAB y PhoU. La actividad bioquímica predeterminada de PhoR es como una autocinasa y las funciones de señalización del transportador Pst y PhoU son regular negativamente esta actividad además de estimular su actividad fosfatasa en respuesta al Pi del medio ambiente (Gardner & McCleary, 2019).

La proteína PhoR puede interactuar con el transportador Pst para detectar su actividad de señalización mediante el reconocimiento de conformaciones alternativas del transportador, y también puede censar niveles citoplasmáticos de Pi. (Gardner & McCleary, 2019). En condiciones normales de crecimiento, los niveles intracelulares de Pi se amortiguan para permanecer casi constantes, pero cuando el transporte de Pi a través del complejo Pst se reduce porque las concentraciones de Pi extracelulares son demasiado bajas, entonces una señal

representada por el estado de conformación del transportador sería enviada a PhoR incitando su conformación autocinasa (Peterson et al., 2005).

Cuando el transportador Pst está importando activamente Pi, la proteína PstB hidroliza ATP, incitando que PhoR adopte su conformación fosfatasa. Las conformaciones adoptadas por el complejo de señalización también pueden ser sensibles a los niveles intracelulares de Pi, particularmente si existe un equilibrio entre los dos estados conformacionales (Hsieh & Wanner, 2010).

Alternativamente, cuando los niveles intracelulares de Pi se agotan, como cuando se inhibe la síntesis de proteínas y se elevan los niveles de ATP, las conformaciones del complejo de señalización pueden desplazarse hacia las conformaciones de la autocinasa (Figura 11) (Rice et al., 2009).

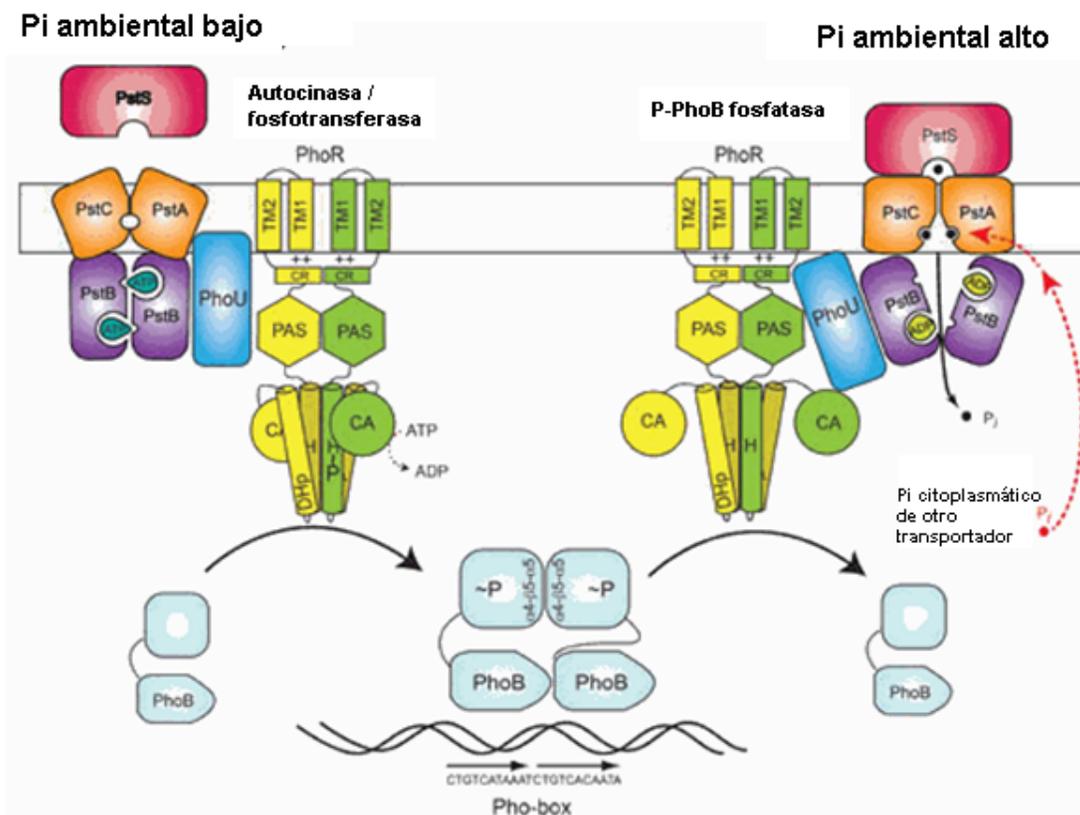


Figura 11. Modelo de transducción de señal transmembrana para regular el regulón Pho en *E. coli*. La salida de este sistema de transducción de señal se basa en la cantidad y el estado de fosforilación del regulador de respuesta PhoB. Fosfo-PhoB forma un dímero y se une a secuencias de ADN que contienen una caja Pho. El estado de fosforilación de PhoB es, a su vez, controlado por las actividades de autocinasa/fosfotransferasa y fosfatasa opuestas de PhoR, la SHK del sistema. Las

actividades de PhoR son controladas en última instancia por el transportador PstSCAB y PhoU. Cuando los niveles ambientales de Pi son altos, el transportador señala a través de PhoU para favorecer a PhoR en su conformación de fosfatasa. Cuando los niveles ambientales de Pi son bajos, el transportador y PhoU señalan PhoR para favorecer su conformación autocinasa. En un mecanismo alternativo (o suplementario), el transportador PstSCAB también puede indicar la suficiencia Pi a PhoR a través de un proceso en el que su conformación es sensible a los niveles Intracelulares de Pi mediante la unión Pi en un sitio de baja afinidad, accesible al citoplasma. Tomado de Gardner & McCleary, 2019.

3.3.1.4 Regulación de PhoBR en otros organismos

Otros sistemas también pueden contribuir a la regulación del regulón Pho interactuando con PhoR para controlar su actividad. El sistema PhoBR regula la expresión de genes relacionados con la quimiotaxis, la resistencia a los antibióticos y la atenuación de la virulencia. Por tal motivo este sistema es clave en la regulación metabólica de la bacteria ante condiciones adversas (Srinivasan et al., 2012).

En *E. coli* el sistema Pst y el sistema de dos componentes PhoBR están perfectamente coordinados para la detección de Pi. El sistema Pst se encarga de la captación de Pi de alta afinidad además de la detección de los niveles de Pi, que a su vez regulan la expresión del regulón Pho (Hsieh & Wanner, 2010).

Cabe resaltar que el regulón Pho y la virulencia bacteriana están conectados, ya que la inducción del regulón Pho modifica la expresión de genes específicos del patógeno y afecta a la supervivencia de muchos organismos bacterianos (Jacobsen et al., 2008). Entre los atributos de virulencia alterados por la inducción del regulón Pho se encuentran: la reducción significativa en la cantidad de antígeno capsular en la superficie celular, la resistencia al efecto bactericida del suero, a los péptidos antimicrobianos catiónicos y al estrés ácido y oxidativo, y la producción de las fimbrias tipo 1 (Bertrand et al., 2010).

En otros estudios, usando como modelo a la cepa *Vibrio cholerae*, se ha demostrado en el sistema de dos componentes PhoBR es independiente del sistema de detección de quórum, y que este es capaz de inducir un cambio en su estilo de vida, pasando de un comportamiento agregado (en biopelículas) a uno planctónico a través de la transcripción diferencial de exopolisacáridos, en donde la formación de biopelícula disminuye drásticamente (Sultan et al., 2010). Esto quiere decir que el

sistema PhoBR regula negativamente la formación de biopelícula cuando las condiciones del medio no son las adecuadas.

En otro modelo como lo es *E. coli*, se ha demostrado que PhoB fosforilado (o activado) se une a las regiones promotoras de varios genes, entre los que se encuentran: *phoE*, que codifica para una porina de fosfato de membrana externa, *pstSCABphoU* un transportador de fosfato de alta afinidad, *ugpBAECQ* un transportador ABC de glicerol-3-fosfato, *phoBR* el sistema regulador de dos componentes PhoBR, y *phnSTUV*, un transportador de aminoetilfosfonato; además de activar la transcripción del regulón Pho involucrado en el transporte de fosfato y la homeostasis (Lamarche *et al.*, 2008).

Para remarcar la importancia del sistema de dos componentes PhoBR, en otro grupo de trabajo se ha descubierto en *E. coli* a través de microarreglos, que 287 genes se expresan diferencialmente al ser inducido este sistema, de los cuales solo 19 son regulados directamente por PhoB. Entre estos 287 genes regulados, 22 son reguladores transcripcionales, y a su vez seis de estos contienen una caja Pho (sitio de unión específico del regulador PhoB) entre los cuales se encuentran *cusR*, *feaR*, *phoB*, *prpR*, *ydfH* y *yhjC* (Yang *et al.*, 2012). En resumen, PhoB transfiere la señal de limitación de fosfatos a 6 reguladores, que a su vez regulan a otros 15 reguladores, que así mismo regulan a los 265 genes restantes que se expresan diferencialmente.

3.3.2 Sistema PhoPQ

El sistema de dos componentes PhoPQ es conocido como un regulador maestro de la virulencia en bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y un regulador de numerosas actividades celulares en varias especies Gram negativas (Waterman & Holden, 2003). El Mg^{2+} y Ca^{2+} son las principales señales fisiológicas detectadas por el sensor de histidina cinasa PhoQ. El crecimiento en concentraciones micromolares de Mg^{2+} en el entorno intracelular de la bacteria, conduce a la activación del sistema PhoPQ, por otra parte, una alta concentración de Mg^{2+} conduce a su inactivación (Groisman, 2001). Se ha demostrado que los iones bivalentes Mg^{2+} , Ca^{2+} y Mn^{2+} pueden reprimir la transcripción de genes activados

por PhoP, mientras que Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} y Ba^{2+} no tienen efecto sobre este sistema (Véscovi et al., 1996; Groisman, 2001).

PhoQ es un sensor de histidina cinasa (HK) y PhoP es su regulador de respuesta afín (RR). PhoQ se encuentra como dímero en la membrana interna bacteriana y tiene dos regiones transmembranales en el extremo N-terminal, lo que da como resultado un dominio sensor periplasmático y un dominio citoplasmático. El dominio citoplasmático contiene un conector HAMP cerca de la membrana, un sitio de autofosforilación conservado (caja de histidina) y un dominio C-terminal que se une a ATP para lograr la actividad de cinasa y fosfatasa. En presencia de estímulos específicos, PhoQ se trans-autofosforila dentro del dímero en un residuo de histidina conservado en el dominio citoplasmático, y el fosfato se transfiere posteriormente a un aspartato en PhoP. El PhoP-fosfato se une al DNA para controlar la expresión de genes, de los cuales se han identificado más de 200 (Monsieurs et al., 2005). Por lo tanto, la transcripción dependiente de PhoP se controla de forma coordinada mediante la actividad de fosforilación, fosfotransferasa y fosfatasa de PhoQ (Prost & Miller, 2008)

Cuando se cultiva en presencia de Mg^{2+} , PhoQ reduce la transcripción de genes activados por PhoP (Chamnongpol & Groisman, 2000). *In vitro*, Mg^{2+} estimula la desfosforilación de fosfo-PhoP al incubar esta proteína con membranas enriquecidas para la proteína PhoQ. Se ha propuesto que la desfosforilación de fosfo-PhoP implica la inversión de la transferencia de fosfato desde el Asp57 en PhoP a la His243 en PhoQ porque una proteína PhoQ mutante que alberga un residuo valina en la posición 243 no muestra actividad fosfatasa (Castelli et al., 2000).

En muchos de los casos, las bacterias llegan a encontrarse en los tejidos linfoides donde sobreviven dentro de los macrófagos del huésped. En este entorno, las bacterias encuentran numerosos mecanismos antimicrobianos del hospedero, que incluyen especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, péptidos antimicrobianos, proteasas y un pH ácido (Prost & Miller, 2008). Como la capacidad de sobrevivir dentro de los macrófagos es necesaria para la virulencia, las bacterias deben ser

capaces de detectar su entorno intracelular y activar mecanismos específicos para evitar la muerte. PhoQ se activa dentro de los fagosomas de macrófagos acidificados (Merighi et al., 2005), lo que indica que PhoQ puede detectar las condiciones del medio intracelular del hospedador, y quizá algunos estímulos extracelulares. PhoPQ regula una variedad de funciones de virulencia bacteriana que incluyen; invasión, mortalidad, transporte de moléculas pequeñas, tolerancia al pH ácido, resistencia a péptidos antimicrobianos y remodelación de la superficie bacteriana (Adams et al., 2001).

3.3.2.1 Represión por unión a cationes divalentes

PhoQ se une directamente a los cationes divalentes Mg^{2+} , Ca^{2+} o Mn^{2+} a través de su dominio periplásmico, aunque no hay evidencia que sugiera cuál de los iones metálicos están realmente unidos *in vivo* (Bader et al., 2005). El mecanismo de represión mediada por cationes divalentes de PhoQ es a través de un aumento en la actividad de fosfatasa, de tal manera que, en ausencia de metal, domina la actividad autocinasa de PhoQ. Por lo tanto, la unión de cationes divalentes es importante para mantener PhoQ en un estado reprimido (Prost & Miller, 2008).

Se ha especulado ampliamente que PhoQ puede activarse en el fagosoma por una baja concentración de iones metálicos, en particular el Mg^{2+} , ya que PhoP regula un transportador de magnesio inducible (Prost & Miller, 2008). Sin embargo, este transportador no es esencial para la virulencia o la supervivencia intracelular, y no parece que las bacterias intracelulares encuentren los bajos niveles micromolares prolongados de catión divalente necesarios para mediar dicha activación. Aunque no se conocen las concentraciones periplásmicas reales de iones metálicos en el momento de los cambios extracelulares, las concentraciones de iones Ca^{2+} aumentan con la acidificación del fagosoma y normalmente están presentes en 0.5 a 1 mM en fagosomas no infectados (Christensen et al., 2002).

La concentración de Mg^{2+} en el fagosoma se estabiliza rápidamente alrededor de 1mM durante la infección de macrófagos cuando se activa la expresión génica mediada por PhoQ (Orozco et al., 2006). A esta concentración de cationes divalentes, PhoQ se activa como fosfatasa con bastante fuerza, por lo tanto, el papel

principal del catión divalente es mantener a PhoQ en dicho estado por lo que se requiere de otras señales para la activación de PhoQ en presencia de iones metálicos *in vivo* (Orozco et al., 2006).

3.3.2.2 Activación por péptidos antimicrobianos

Cuando los cationes divalentes se unen a PhoQ, este cambia su conformación a fosfatasa, y es poco probable que la concentración baja de cationes sea el mecanismo de activación *in vivo* por que los iones metálicos son abundantes en los tejidos del hospedero. En cambio, se espera que factores fagocíticos específicos conduzcan a la activación de PhoQ. De hecho, la exposición a concentraciones sub inhibitorias de péptidos antimicrobianos catiónicos (CAMP) activa al sistema PhoPQ en presencia de concentraciones milimolares de metal (Bader et al., 2003; Bader et al., 2005). CAMP puede activar la expresión génica en bacterias como respuesta al daño de la membrana, como parece ocurrir para la activación del factor sigma alternativo RpoS (Bader et al., 2003). Sin embargo, para PhoQ la activación de la expresión génica se produce a través de la unión directa de CAMP al dominio periplásmico de PhoQ.

En algunos trabajos se demostró que al usar la proteína PhoQ purificada reconstruida en vesículas de membrana, la exposición de PhoQ a CAMP conduce a un aumento de los niveles de fosfo-PhoP, incluso en presencia de Mg^{2+} 1mM. Sin embargo, en presencia de concentraciones más altas de Mg^{2+} , la activación por concentraciones micromolares de CAMP puede competir, lo que indica que CAMP se une a los mismos sitios en PhoQ que el catión divalente por una afinidad mucho mayor (Figura 12) (Bader et al., 2005; Prost & Miller, 2008).

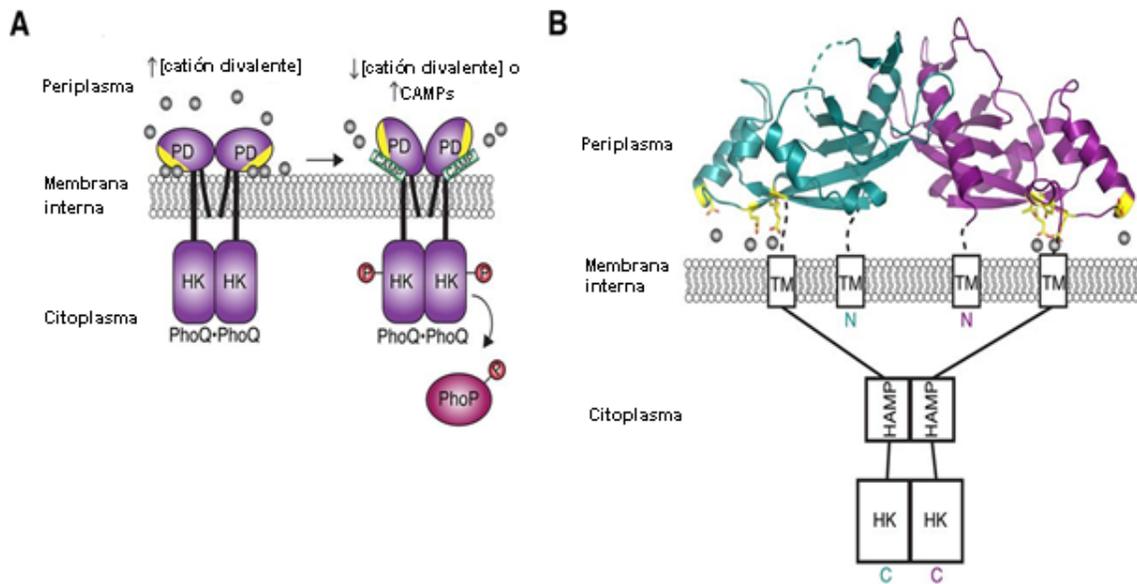


Figura 2. (A) Los CAMP son detectados por el PhoQ. Cuando los CAMP no están presentes, los cationes divalentes (esferas grises) puentean el parche ácido (amarillo) del PhoQ (PD) y los grupos de fosfato IM cargados negativamente, atan el PhoQ PD a la membrana y lo bloquean en un estado reprimido. Cuando los CAMP están presentes, compiten por la unión al parche ácido PhoQ PD y desplazan los cationes divalentes enlazados, lo que libera el PhoQ PD de su estado de bloqueo de membrana e induce un cambio conformación que activa la actividad de PhoQ HK. El dominio HK activado de PhoQ entonces fosforila a PHOP(B) La estructura cristalina de PhoQ PD en estado divalente a cationes (esferas grises) (PDB ID 1YAX). Las hélices N- y C-terminal TM, el dominio HAMP y el dominio HK se representan como rectángulos. Los residuos de parches ácidos (palos amarillos) coordinan cationes (esferas grises) en la interfaz externa del prospecto IM. Tomado de De Nisco et al., 2018

3.3.2.3 Activación por pH

PhoQ es activado dentro del fagosoma el cual tiene un pH ácido de 5.0 a 6.5, el pH ácido es una señal de activación directa para PhoQ (Orozco et al., 2006). La expresión génica dependiente de PhoP es inducida dramáticamente en algunas bacterias durante la fagocitosis por los macrófagos, y esta activación es abolida por la neutralización de pH fagosómico. La activación de la expresión génica mediada por PhoPQ también ocurre en el crecimiento de bacterias en un medio de crecimiento ligeramente ácido con un pH similar al del fagosoma (Prost et al., 2007).

El reconocimiento directo del pH por el dominio periplásmico PhoQ a una concentración de cationes divalente que se encuentra dentro del fagosoma (1mM) se demostró en experimentos en los que PhoQ se incorporó en vesículas de membrana (Prost et al., 2007). En las vesículas de membrana, lo efectos de los

péptidos antimicrobianos y el pH son aditivos sobre la fosforilación de PhoP, lo que sugiere mecanismos distintos de detección inicial y activación para las dos señales estimuladoras (Prost & Miller, 2008).

A través de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) se descubrió que el dominio periplásmico de PhoQ permanece estable y se pliega a pH 3.5, lo que indica que puede haber evolucionado como un sensor de pH. En general la acidificación induce una pérdida de rigidez estructural en el núcleo de la proteína, que también puede ser imitado por mutaciones en residuos que mantienen esta rigidez (Prost & Miller, 2008). Se ha postulado que esta rigidez es esencial para el estado reprimido con el fin de compensar la repulsión electrostática restante no neutralizada por los puentes metálicos. Tal pérdida de rigidez permite a las hélices $\alpha 4$ / $\alpha 5$ una mayor flexibilidad para alejarse de la membrana, activando así la proteína de una manera análoga a CAMP forzando a esas mismas hélices a moverse. Tales movimientos podrían alterar la orientación de las regiones que abarcan la membrana y acercar los dominios citoplasmáticos para lograr la fosforilación de histidina dentro del dímero (Prost & Miller, 2008).

3.3.2.4 Papel de PhoQ como sensor

PhoQ actúa como un sensor del ambiente al detectar señales específicas encontradas durante la infección. Debido a que PhoQ se activa dentro de los fagosomas, una función probable de PhoQ es la de detectar el entorno extracelular. Se espera que tanto el pH ácido como los CAMP están presentes dentro de los fagosomas, y los datos descritos anteriormente han demostrado que PhoQ puede activarse directamente por estas dos señales. Las evidencias también sugieren que PhoQ podría detectar péptidos antimicrobianos y pH ácido dentro del estómago y la luz intestinal (Merighi et al., 2005).

El sensor PhoQ controla un gran regulón involucrado en varios aspectos de la patogénesis y se ha generado un modelo de cómo detecta y responde a las señales. PhoQ está reprimido por concentraciones milimolares de cationes divalentes, que se unen a un parche ácido en el dominio periplásmico de PhoQ y atan la proteína a la membrana en un estado estructuralmente rígido (Prost et al., 2007). En ausencia

de catión, la repulsión de carga entre el parche ácido y la membrana interna hace que parte de la proteína, las hélices $\alpha 4 / \alpha 5$, se aleje de la membrana, lo que lleva a la activación (Moss et al., 2000). En presencia de CAMP, que se une a los mismos sitios en el parche ácido que los cationes divalentes, las hélices $\alpha 4 / \alpha 5$ se vuelven a alejar de la membrana para dejar espacio al péptido (Oyston et al., 2000).

Finalmente, bajo condiciones de pH ácido, la rigidez estructural en la región de unión de hidrógeno de la lámina β del núcleo está comprometida, permitiendo que las mismas hélices $\alpha 4 / \alpha 5$ se liberen de los puentes metálicos (Derzelle et al., 2004). En presencia de CAMP y pH ácido, la combinación de péptidos que obligan a las hélices a alejarse de la membrana y la pérdida de rigidez estructural en el núcleo podrían conducir juntos a una activación máxima (Derzelle et al., 2004).

Por lo tanto, PhoQ es capaz de integrar tres señales diferentes para controlar el estado de activación de PhoP, controlando a su vez la expresión génica corriente abajo. Este modelo para la activación de PhoQ también puede ser válido para otros organismos patógenos, lo que sugiere que esta molécula desempeña un papel central en la patogénesis bacteriana al detectar el entorno del huésped y mediar una respuesta adecuada (Prost & Miller, 2008).

3.3.2.5 Regulación de PhoPQ en organismos

Se ha demostrado que los genes regulados por la activación del sistema PhoPQ están involucrados directamente en la expresión de fenotipos virulentos. Estos genes le confieren a la bacteria la capacidad de sobrevivir dentro de células fagocíticas, la resistencia a péptidos antimicrobianos, la resistencia a pH ácido, la invasión de células epiteliales y la presentación de antígeno. Estas propiedades son otorgadas principalmente gracias a las modificaciones de los componentes en la envoltura celular regulados por el sistema PhoPQ (Derzelle et al., 2004).

El mecanismo de la represión mediado por cationes divalentes de PhoQ es a través de un aumento en la actividad de la fosfatasa (Castelli et al., 2000). En ausencia de iones divalentes, domina la actividad de la autocinasa PhoQ. Por lo tanto, la unión del catión divalente es importante para mantener PhoQ en un estado reprimido. (Prost & Miller, 2008).

En respuesta a las bajas concentraciones externas de Mg^{2+} detectadas por PhoQ, el regulador de respuesta PhoP regula la resistencia a la polimixina B y a péptidos antimicrobianos a través de la regulación positiva de *arnBCADTEF*. Este operón codifica una vía para la adición de 4-aminoarabinosa al lípido A del lipopolisacárido, reduciendo la carga negativa neta del lipopolisacárido y limitando su interacción con los antibióticos policatiónicos como la polimixina B y los péptidos catiónicos (Moskowitz et al., 2004).

En *Salmonella enterica* es donde se ha reportado el mayor número de estudios en el que se involucra este sistema de dos componentes. Se ha reportado que PhoP se une a regiones promotoras de los loci *phoP*, *mgtA*, *slyB*, *pmrD*, *pcgL*, *phoN*, *pagC* y *mgtCB* (Lejona et al., 2003).

Además, en este mismo modelo de estudio, se ha encontrado que PhoQ además de detectar niveles de Mg^{2+} , también detecta niveles de pH ácido y péptidos antimicrobianos, componentes que se pueden encontrar dentro del fagosoma de un macrófago (Groisman, 2001). PhoQ activa a PhoP, el cual promueve la transcripción de genes dependientes de PhoP, incluido *mgtC*. MgtC le permite a *Salmonella* promover la transcripción de genes Pho en respuesta a las señales de activación de PhoPQ, además de la señal de activación del sistema PhoBR. Se ha reportado que MgtC se une a la histidina cinasa PhoR y así activa la transcripción dependiente de PhoB al promover la actividad de autofosforilación de PhoR (Choi et al., 2019).

4 JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

K. pneumoniae es un patógeno oportunista emergente causante de infecciones nosocomiales debido a la presencia de factores de virulencia tales como la cápsula, las fimbrias, el LPS y los sideróforos, principalmente. Los sistemas de dos componentes PhoBR y PhoPQ controlan la expresión de genes involucrados en la síntesis de los factores de virulencia en muchas bacterias patógenas, sin embargo, no existen reportes acerca del efecto regulatorio de estos sistemas en la transcripción de genes relacionados a la síntesis de factores de virulencia en *K. pneumoniae*.

Con base a lo anterior, el presente estudio se dirige a contestar la siguiente pregunta:

¿Cuál es el efecto de los sistemas de dos componentes PhoBR y PhoPQ sobre la transcripción de los genes que dan origen a los factores de virulencia de *K. pneumoniae*?

5 HIPÓTESIS

Si los sistemas de dos componentes PhoBR y PhoPQ pueden controlar la expresión de genes de factores de virulencia en condiciones de bajo fosfato y magnesio, entonces en las cepas de *K. pneumoniae* en las que se han mutado dichos sistemas de dos componentes se observará una expresión diferencial de los genes involucrados en la biosíntesis de la cápsula (*galF*, *wzi*, *manC*), las fimbrias (*mrkA*, *fimA*, *ecpA*), el LPS (*wzm*, *msbA*, *rfaD*), proteínas de membrana externa (*ompK35*, *ompK36*, *ompA*) y los sideróforos (*fhuA* y *fes*), cuando la bacteria es crecida en un medio rico (alta concentración de fosfato y magnesio) y uno mínimo (baja concentración de fosfato y magnesio).

6 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

6.1 Objetivo general

Caracterizar la función reguladora de los sistemas de dos componentes PhoBR y PhoPQ, sobre la expresión de los genes involucrados en la expresión de factores de virulencia tales como la capsula, fimbrias, lipopolisacárido, proteínas de membrana externa y sideróforos, en *K. pneumoniae*.

6.2 Objetivo particular

Cuantificar la expresión transcripcional de los genes involucrados en la biosíntesis de la cápsula (*galF*, *wzi*, *manC*), las fimbrias (*mrkA*, *fimA*, *ecpA*), el LPS (*wzm*, *msbA*, *rfaD*), proteínas de membrana externa (*ompK35*, *ompK36*, *ompA*) y los

sideróforos (*fhuA* y *fes*) de *K. pneumoniae* en las mutantes sencillas Δ *phoBR* y Δ *phoPQ* cuando la bacteria es crecida en un medio rico (alta concentración de fosfato y magnesio) y uno mínimo (baja concentración de fosfato y magnesio).

7 METODOLOGÍA

7.1 Material

7.1.1 Cepas y líneas celulares

Se usó la cepa silvestre de *K. pneumoniae* 123/01, preservada en glicerol 20% a -70°C.

7.1.2 Medios de cultivo

Los cultivos bacterianos se realizaron en el medio Soya Tryptona (TSB) (DIFCO), que contiene 10 g/L de peptona de caseína, 5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de NaCl. El agar TSB también se empleó y se preparó añadiendo 15 g/L de agar bacteriológico (DIFCO) al medio TSB.

También se utilizó el medio mínimo-N (MM-N) para los cultivos bacterianos, que contiene 0.3728 g/L de KCl, 0.991 g/L de (NH₄)₂SO₄, 0.087 g/L de K₂SO₄, 0.136 g/L de KH₂PO₄, 15.756 g/L de TRIS-HCl, 1.0 g/L de cas aminoácidos y 400 µl/L de MgCl₂ (Bustamante et al., 2008).

7.1.3 Antibióticos

La concentración final de los antibióticos a utilizar fue la siguiente: ampicilina a 200 µg/mL y kanamicina a 50 µg/mL.

7.2 Métodos

7.2.1 Generación de cepas mutantes Δ *phoBR* y Δ *phoPQ*

A partir de la cepa silvestre de *K. pneumoniae* se reemplazaron los genes *phoBR* y *phoPQ* por un gen de resistencia a kanamicina, el cual se generó previamente por PCR, utilizando oligonucleótidos que contienen secuencias homólogas de los genes

a mutar (Tabla 1). Las mutantes se generaron con el método de recombinación homóloga, mediante la recombinasa lambda-Red, en las regiones flanqueantes a cada gen (Datsenko y Wanner, 2000).

Tabla 1. Secuencia de los iniciadores empleados para mutar y caracterizar las diferentes cepas de *K. pneumoniae*

Iniciador para mutar	Secuencia 5' -- 3'
phoBR-H1P1	CGGAGAGAAAGGCTTGGTGATGTAGTCATCCGCGCCGGTCTCCAG - TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
phoBR-H2P2	ACCGCGTGTTTGACGATCGCCAGTCCCAGGCCACTGCCCCCGTT- CATATGAATATCCTCCTTAG
phoPQ-H1P1	TCGTACCGTGGTTAACCCTTAAGTTGTGACGAGGCTACAAAATGG - TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
phoPQ-H2P2	AGTCACGCGAGCAGCAGAATAGATTTTTAATATTATCTTGTGCAC - CATATGAATATCCTCCTTAG
Iniciador para caracterizar	Secuencia 5' -- 3'
phoBR CM 5'	AATCTGTCACAAAAGTGACGC
phoBR CM 3'	CACGCTCATTAAATAGGCGAG
phoPQ CM 5'	GGGGCCCTTTTTATAAAAAGC
phoPQ CM 3'	CAGGGATTATAACGGATGCGGC

7.2.1.1 Amplificación del gen de resistencia a kanamicina

El gen de resistencia a kanamicina se amplificó a partir del plásmido pKD4, utilizando oligonucleótidos que en su extremo 5' contienen secuencias homólogas a los genes *phoBR* y *phoPQ* (H1 y H2), más las secuencias correspondientes a los extremos flanqueantes al gen de resistencia a kanamicina, los cuales se denominan P1 y P2. De esta forma, al amplificar el gen de resistencia a kanamicina a partir del plásmido pKD4, se generó un fragmento que tenía la resistencia al antibiótico y las secuencias homólogas al gen que se quería mutar.

7.2.1.2 Preparación de células competentes

Se preparó un cultivo a partir de un vial de 2 mL de la cepa *K. pneumoniae* pKD119 crio-preservada a -70°C en glicerol al 15% tomando una alícuota de 10 µL en 10 mL de medio LB. Se incubó a 30°C en agitación (200 rpm) durante una noche. Posteriormente, se realizó una dilución 1:100 en 10 mL de medio TSB suplementado con L-arabinosa al 1% y se incubó a 30 °C hasta una densidad óptica (DO) de entre 0.6 y 0.8 (~3 h) a 600 nm.

El cultivo se enfrió en hielo y se realizaron cuatro lavados con agua fría estéril, centrifugando a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C. Las células se mantuvieron en hielo hasta el momento de la electroporación.

7.2.1.3 Transformación de la cepa *K. pneumoniae* pKD119

Se electroporaron 25 µL de células competentes con 100 ng del producto de PCR. Una vez sometidas al pulso eléctrico, las células se resuspendieron en 1 mL de medio TSB y se incubaron 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 transformado, 200 µL en agar LB suplementado con kanamicina (50 µg/mL). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h. Posteriormente, las colonias candidatas fueron sembradas nuevamente en medio agar LB suplementado con kanamicina y se crecieron a 42°C para curar las bacterias del plásmido pKD119, el cual es termosensible.

Las posibles colonias mutantes se sometieron a una amplificación por la PCR con oligonucleótidos flanqueantes de los genes *phoBR* y *phoPQ* para comprobar la inserción del gen de resistencia al antibiótico. La amplificación se comprobó mediante una electroforesis horizontal a 85 V por 40 min en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio a una concentración de 0.83 µg/mL, con 5 µL de producto de PCR.

7.2.2 Diseño de los iniciadores de los genes estudiados

Los genes que se estudiaron en el presente trabajo (Tabla 2), son miembros de los operones que componen al sistema de biosíntesis de la cápsula, las fimbrias el lipopolisacárido, las proteínas de membrana externa y el sistema de captación de

hierro a través de sideróforos. Si bien, no son todos los genes involucrados en la biosíntesis, la expresión de estos nos proporcionó una visión general de la expresión de dichos factores de virulencia. Por último y 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” y se mandaron a sintetizar en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Tabla 2. Secuencia, tamaño de los amplicones y función en *K. pneumoniae* de los 14 genes a evaluar en este trabajo.

Gen	Secuencia del iniciador 5´ - 3´	Producto	Función
KP1_3726 (<i>galF</i>)	F: CAAAGGCAATTCCAAAGGAG R: TCGGTCACCAGAACAATCTC	UTP - glucosa-1-fosfato uridililtransferasa	Producción de subunidades de glucosa para la cápsula
KP1_3721 (<i>wzi</i>)	F: CAGGGGTTTGGTCAGACACA R: CGTTGAAGCGTGATCCGTTG	Wzi	Ensamblaje de los polisacáridos capsulares sobre la superficie
KP1_3703 (<i>manC</i>)	F: AGCGGCATGTTTATGTTCCG R: AAATGTCATGCGGGATGCTG	Manosa-1-fosfato guanililtransferasa	Producción de subunidades de manosa para la cápsula
KP1_4561 (<i>mrkA</i>)	F: CCATGCAGCTGATACCAATG R: GCAGCCTGGCAGTTAGAGAC	Subunidad fimbrial MrkA	Pilina mayoritaria del pili tipo 3
KP1_4571 (<i>fimA</i>)	F: ACTGTTACCACCACCGAAGC R: CTGGATACCGATGCCGATAC	Subunidad principal fimbrial FimA	Pilina del pili tipo 1
KP1_1146 (<i>ecpA</i>)	F: ACCTCGCGTCTTATCACCAA R: CCGCTGATGATGGAGAAAG	Pilina mayoritaria EcpA	Pilina del pili ECP
KP1_3698 (<i>wzm</i>)	F: ACGCTGAACCTGTTTTCCG R: ATACTCGCTAGCGGATTGTAG	Wzm-Proteína transportadora ABC del antígeno O	Síntesis del antígeno “O” del lipopolisacárido

KP1_1914 (<i>msbA</i>)	F: CAAAGGCAATTCCAAAGGAG R: TGCATCACCAGAACAATCTC	Flipasa del lípido A - core ATP dependiente	Síntesis del lípido "A" del lipopolisacárido
KP1_5313 (<i>rfaD</i>)	F: CAGGGGTTTGGTCAGACACA R: CGTTGAAGCGTGATCCGTTG	Adp-L-glicero-D- mano-heptosa-6- epimerasa	Síntesis del "core" del lipopolisacárido
KP1_1929 (<i>ompK35</i>)	F: CAAAACGGACGCACTGTTTA R: TGTCCTCTTTCAGCCAGTT	OmpK35	Porina OmpF
KP1_3869 (<i>ompK36</i>)	F: CAAAGGCAATTCCAAAGGAG R: TGCATCACCAGAACAATCTC	OmpK36	Porina OmpC
KP1_1958 (<i>ompA</i>)	F: ACGGTATCGTCGCATAAAGG R: AGGTGATGTTTTCGGTCAGC	OmpA	Proteína integral de membrana externa OmpA
KP1_1002 (<i>fhuA</i>)	F: CAAAGGCAATTCCAAAGGAG R: TGCATCACCAGAACAATCTC	Transportador de membrana de ferricromo FhuA	Captación de hierro
KP1_1548 (<i>fes</i>)	F: CAGGGGTTTGGTCAGACACA R: CGTTGAAGCGTGATCCGTTG	Esterasa de enterobactina Fes	Captación de hierro
KP1_6121 (<i>rrsH</i>)	F: CAGCCACACTGGAAGTGA R: GTTAGCCGGTGCTTCTCTG	RNA ribosomal 16S	Gen normalizador

7.2.3 Extracción del DNA genómico

La extracción del DNA se realizó de acuerdo con el método descrito por González y Merchand y colaboradores en 1996. Se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos 10 mL de las cepas de *K. pneumoniae* crecidas toda la noche; 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 β-Mercaptoetanol 14.7 M). Posteriormente, la suspensión se transfirió a tubos de 2 mL y 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 500 µL de fenol: cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó suavemente en el vórtex y se centrifugó a 14000 rpm a temperatura ambiente durante 5 min.

Se recuperó la fase acuosa y se le adicionó 1 mL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se agitó en vórtex y después se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos. La fase acuosa se recuperó nuevamente y el DNA se precipitó con 2 mL de etanol absoluto a -20°C durante 24 h para favorecer la precipitación.

Terminado el tiempo de precipitación, se centrifugó nuevamente durante 15 min a 14000 rpm a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y el paquete de DNA se lavó con 500 µl de etanol al 70%. Se eliminó el exceso de etanol secando el DNA en el "DNA110 speedvac". La muestra se resuspendió en 50 µL de agua destilada estéril. Posteriormente se cuantificó el DNA por espectrofotometría en el Nano Drop-1000 (ND-1000).

7.2.4 Amplificación de los genes mediante PCR punto final

Con el fin de confirmar que los iniciadores amplificaban el producto esperado se realizaron PCR de punto final empleando las siguientes condiciones de la mezcla de reacción: 0.25 µL que corresponde a 1U de Taq polimerasa (Invitrogen), 2.5 µl de amortiguador de PCR 10X (Tris-HCl 200 mM pH = 8.4; KCl 500 mM) (Invitrogen), 1.5 µL de MgCl₂ a una concentración de 25 mM (Invitrogen), 0.5 µL de dNTPs a una concentración de 10 mM (Invitrogen), 1.0 µL de cada uno de los iniciadores a una concentración de 20 µM (Invitrogen), 1.0 µL de DNA genómico a una concentración de 0.1 µg/µL y se llevó a un volumen final de 25 µL adicionando 17.5 µL de agua estéril libre de nucleasas.

La PCR se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler® de Eppendorf y la amplificación consistió en un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 5min, y 30 ciclos con las siguientes condiciones: 95°C por 1 min, 57°C por 30 s y 72°C por 1 min y, por último, un ciclo de extensión a 72°C por 10 min. Una vez terminada la reacción se comprobó la amplificación mediante una electroforesis horizontal a 85 V por 40 min en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (0.83 µg/mL), con 5 µL de producto de PCR.

7.2.5 Extracción del RNA total

La extracción del RNA se llevó a cabo de la siguiente manera:

1.- Rompimiento celular: el cultivo de bacterias (10 mL) en fase logarítmica se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min. Se recuperó la pastilla y 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 ayuda de un 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 le añadió 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).

Después de la incubación, los tubos se centrifugaron a 14000 rpm a 4°C por 5 min y la fase superior del lisado celular se recuperó en tubos estériles. A cada tubo se les agregó 1 mL de etanol absoluto frío, y se dejó precipitar el RNA a -20°C por 24 horas aproximadamente.

2.- Precipitación del RNA: los tubos obtenidos de la fase anterior se centrifugaron a 14000 rpm 10 min a 4°C. El paquete de DNA obtenido se lavó con 1 mL de etanol al 70%, y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min a 4°C. El etanol se eliminó del paquete de DNA y se secó en "speedvac" por 10 min. Los paquetes de DNA se resuspendieron en 100 µL de agua DEPC.

3.- Purificación del RNA: a los tubos del paso anterior se les adicionó 10 µL de buffer para DNasa y 1 µL de DNasa TURBO 10X (Ambion); posteriormente, se incubó 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; se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y se centrifugó a 4000 rpm por 2 min. La fase acuosa con el RNA se transfirió a un tubo estéril.

Se analizó la calidad de RNA mediante electroforesis horizontal empleando 3 µL de cada muestra a 85 V por 40 min en gel de agarosa al 2% e hipoclorito de sodio al 1% teñido con bromuro de etídio (0.83 µg/mL)

7.2.6 Obtención de cDNA por transcripción reversa (RT) a partir de RNA total

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

Se realizó la siguiente mezcla de reacción en microtubos estériles:

- 1 µg de RNA total
- 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 dNTPs 10 mM
- 2 µL de Transcriptasa reversa M-MuIV (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 una temperatura de -70°C.

7.2.7 Amplificación de los genes por PCR en tiempo real

Después de obtener el cDNA correspondiente a cada muestra, se procedió a cuantificar el nivel de 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. Las reacciones para los ensayos de PCR en tiempo real se llevaron a cabo por triplicado en placas de plástico de 96 pozos especiales para el equipo Lightcycler® 480.

La mezcla de reacción para cada pozo consistió en:

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

El programa recomendado por el manual del usuario a utilizar es el siguiente: un ciclo a 95°C durante 5 min, 45 ciclos en las siguientes condiciones: 95°C durante 10 s, temperatura de alineamiento correspondiente a 58°C y temperatura de elongación correspondiente a 72°C durante 10 s (en este punto se realiza 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 mide la fluorescencia en forma continua para construir la curva de disociación), y un ciclo final de enfriamiento a 4°C durante 10 s.

7.2.8 Determinación de la expresión génica relativa

Se determinó la expresión de los genes mencionados en la tabla 1 en las cepas de *K. pneumoniae* (WT, Δ *phoBR* y Δ *phoPQ*), de los genes *galF*, *wzi*, *manC*, *mrkA*, *fimA*, *ecpA*, *wzm*, *msbA*, *rfaD*, *ompK35*, *ompK36*, *ompA*, *fhuA* y *fes*. El método descrito por Livack y Schmittgen (2001), se utilizó para determinar el nivel de expresión génica mediante la aplicación de la fórmula matemática $2^{-\Delta\Delta CT}$.

7.2.9 Análisis estadístico de los resultados

Con la finalidad de detectar diferencias significativas en la expresión génica de las diferentes cepas de *K. pneumoniae* estudiadas, se realizó un análisis paramétrico de varianza unifactorial (One Way ANOVA) y una comparación múltiple de Tukey empleando para ello el software estadístico GraphPad PRISM 5.0. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

8 RESULTADOS

8.1 Generación de las cepas mutantes de los genes *phoBR* y *phoPQ*

Para generar cepas mutantes en los genes *phoBR* y *phoPQ*, se empleó la técnica de recombinación homóloga descrita por Datsenko y Wanner (2000), en donde se sustituyen los genes blanco con un casete de resistencia al antibiótico kanamicina.

Como se observa en la Figura 13 A, el diseño de los iniciadores tiene una región P (P1 y P2), cuya función directa es la de amplificar el gen de resistencia a la kanamicina usando el plásmido pKD4. Unida a la región P, se encuentra la región H (H1 y H2), la cual es la encargada del reconocimiento homólogo entre el gen blanco y los extremos del casete de resistencia ya amplificado. Esto nos permite tener como resultado de amplificación, un casete con el gen de resistencia a kanamicina flanqueado por secuencias homólogas al gen blanco.

En la Figura 13 B se observa la amplificación del casete de resistencia al antibiótico kanamicina con las regiones flanqueantes para cada gen blanco (*phoBR* y *phoPQ*). Se observa que todas las amplificaciones tienen el mismo tamaño en pares de bases, correspondientes a 1600 pb, lo cual nos indica que el casete de resistencia a kanamicina se amplificó correctamente.

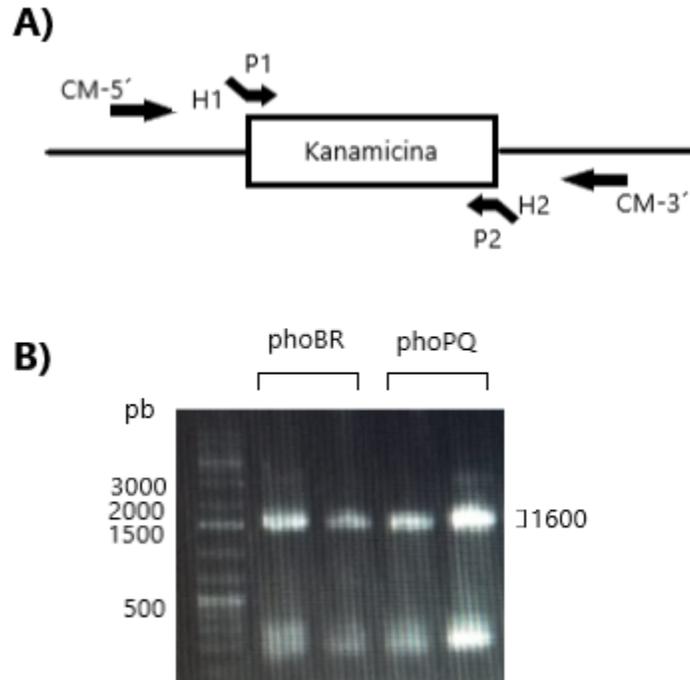


Figura 13. A) diseño global de los iniciadores empleados para amplificar el gen de resistencia a kanamicina en el plásmido pKD4 (H1P1-H2P2) y diseño global de iniciadores empleados para caracterizar la inserción del gen de resistencia a kanamicina (CM 5'- CM 3') en las mutantes. B) Electroforesis horizontal del gen de resistencia amplificado con los iniciadores específicos para la generación de cada una de las mutantes.

Para confirmar la delección de los genes blanco, se realizó una PCR utilizando iniciadores que amplifican las regiones flanqueantes no modificadas de cada gen blanco (CM 5'- CM 3') en la cepa silvestre y las cepas mutantes obtenidas.

En el caso de las cepas $\Delta phoBR$ y $\Delta phoPQ$, se amplificaron los genes correspondientes al casete de resistencia a kanamicina el cual genera un producto de 1600 pb, tal y como se esperaba (Figura 14). Este amplicón confirmó la correcta sustitución de los genes *phoBR* y *phoPQ* por el casete de resistencia a kanamicina

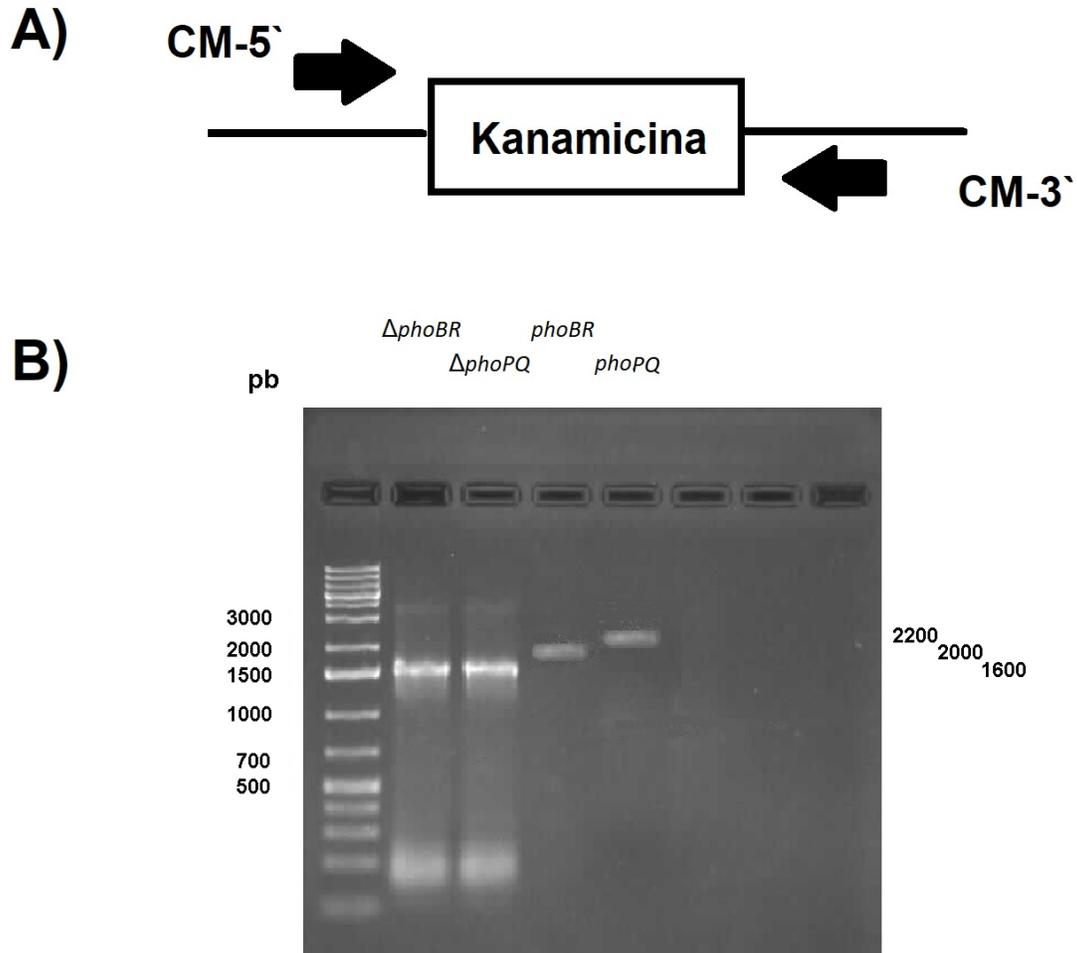


Figura 14. A) Diseño de los iniciadores empleados para caracterizar las cepas mutantes $\Delta phoBR$ y $\Delta phoPQ$ en comparación con las cepas WT. B) Electroforesis horizontal en gel de agarosa de los productos de amplificación de las regiones *phoBR* y *phoPQ* en la cepa WT, $\Delta phoBR$ y $\Delta phoPQ$ empleando los iniciadores *phoB* 5' - *phoR* H2P2 y *phoP* 5' - *phoQ* H2P2.

8.2 Integridad del RNA extraído

Para obtener el cDNA necesario para evaluar la expresión de los genes implicados en la expresión de factores de virulencia se extrajo el RNA total de las cepas WT, $\Delta phoBR$ y $\Delta phoPQ$ de *K. pneumoniae* cultivadas en medio TSB y MM-N en fase de crecimiento logarítmica. La integridad del RNA se evaluó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2% en condiciones desnaturalizantes.

En la figura 15 se observa con claridad las bandas correspondientes al RNA ribosomal de las subunidades 23S y 16S, lo cual indica que el RNA total con el que se trabajó contaba con una integridad ideal.

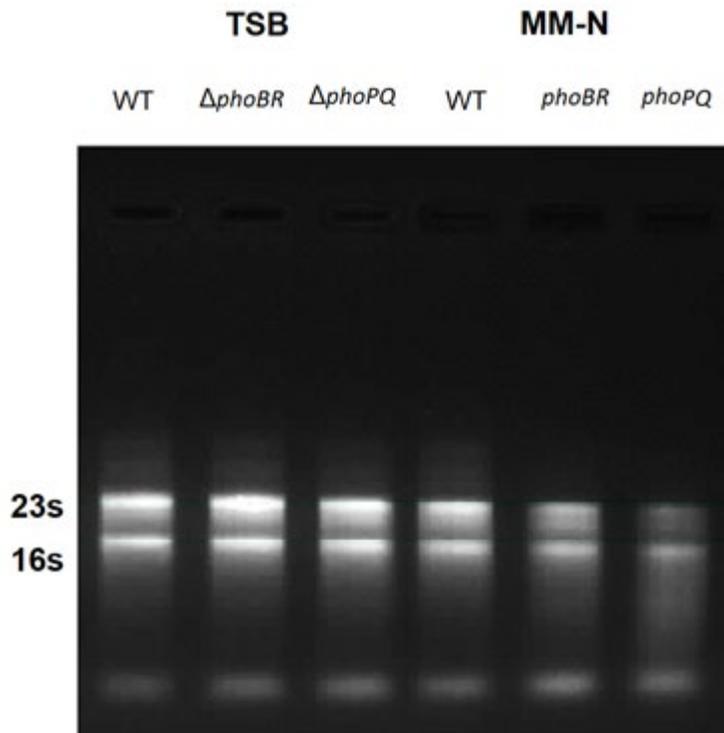


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa del RNA total de las cepas WT y mutantes $\Delta phoBR$ y $\Delta phoPQ$ de *K. pneumoniae*.

8.3 Expresión genética de factores de virulencia en diferentes medios de cultivo

Con el fin de seleccionar un medio ideal para el crecimiento y la expresión transcripcional de genes involucrados en la síntesis de los diferentes factores de virulencia a evaluar en este trabajo, se cultivó la cepa WT de *K. pneumoniae* en medio LB y TSB, y se evaluó por PCR tiempo real el nivel transcripcional de los genes implicados en la expresión de la cápsula y las fimbrias.

Los datos obtenidos con medio TSB muestran una mayor expresión de los genes evaluados en comparación al medio LB (Figura 16), por tal motivo, se optó por el uso del medio TSB, además, de que este cuenta con un alto contenido en fosfatos y otros componentes esenciales para el crecimiento de *K. pneumoniae*.

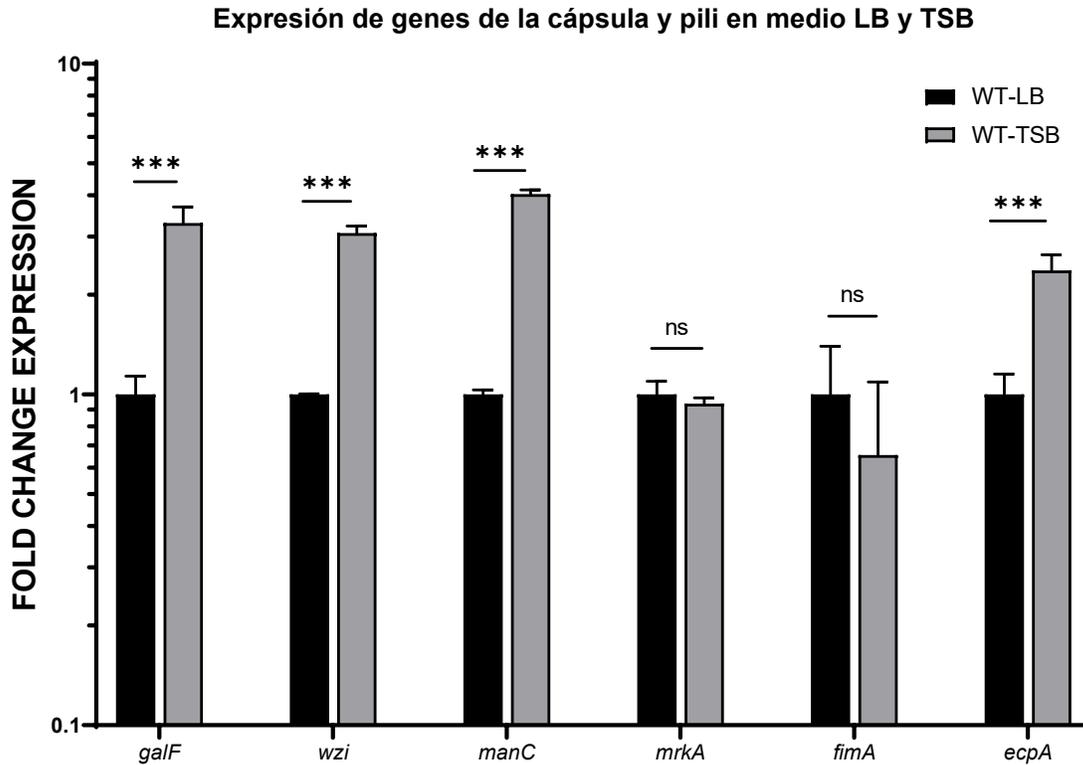


Figura 16. Expresión de diferentes genes involucrados en la virulencia de *K. pneumoniae* en medio LB y medio TSB. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes. Las barras de error indican la desviación estándar. $p < 0.05$: diferencia estadísticamente significativa con respecto a la cepa WT-LB.

8.4 Expresión diferencial del regulador de respuesta *phoB* y *phoP* en medio TSB y MM-N

Para analizar si los sistemas de dos componentes PhoBR y PhoPQ se ven diferencialmente regulados en las condiciones aportadas por los medios utilizados: uno rico en fosfatos (medio TSB) y otro deficiente en fosfatos y magnesio (MM-N), se evaluó la expresión diferencial del primer gen de cada operón bicistrónico correspondiente a cada TCS en estas condiciones (Figura 17). En la cepa silvestre de *K. pneumoniae*, la expresión de *phoB* y *phoP* fue incrementada 19 y 21 veces en MM-N, respectivamente, en comparación con el crecimiento en medio TSB. Estos datos mostraron que el MM-N favorece la expresión de PhoBR y PhoPQ.

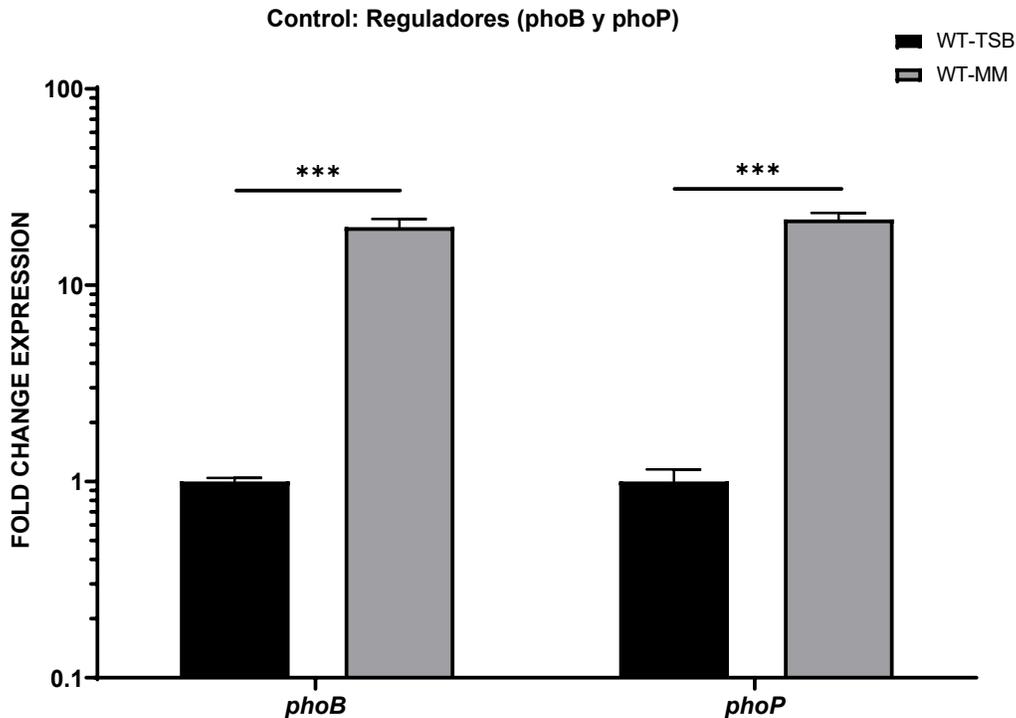


Figura 17. Control positivo de la activación de los reguladores de respuesta de los sistemas PhoBR y PhoPQ. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes. Las barras de error indican la desviación estándar. $p < 0.05$: diferencia estadísticamente significativa con respecto a la cepa WT-TSB

8.5 Efecto de los sistemas PhoBR y PhoPQ en la expresión genética de la cápsula en *K. pneumoniae*

Para analizar la participación de los sistemas de dos componentes PhoBR y PhoPQ sobre la transcripción de diferentes genes esenciales en la biosíntesis de la cápsula, se cuantificó la expresión de los genes *galF*, *wzi* y *manC* en medio rico TSB y MM-N por medio de una RT-PCR en tiempo real. En la Figura 18 se mostró que en medio TSB no hubo diferencias significativas en la expresión de los genes *galF*, *wzi* y *manC* en la cepa mutante $\Delta phoBR$ y $\Delta phoPQ$ en comparación con la cepa WT. Interesantemente, se observó que los genes capsulares fueron reprimidos en MM-N en la cepa silvestre. La expresión de los genes capsulares *galF*, *wzi* y *manC* se desreprimió tres, siete y cuatro veces, respectivamente, en la mutante $\Delta phoBR$ en MM-N con respecto a la cepa silvestre. El sistema PhoPQ no tuvo un efecto

significativo observando, mientras que el sistema de dos componentes PhoBR actúa como regulador negativo de la cápsula en MM-N.

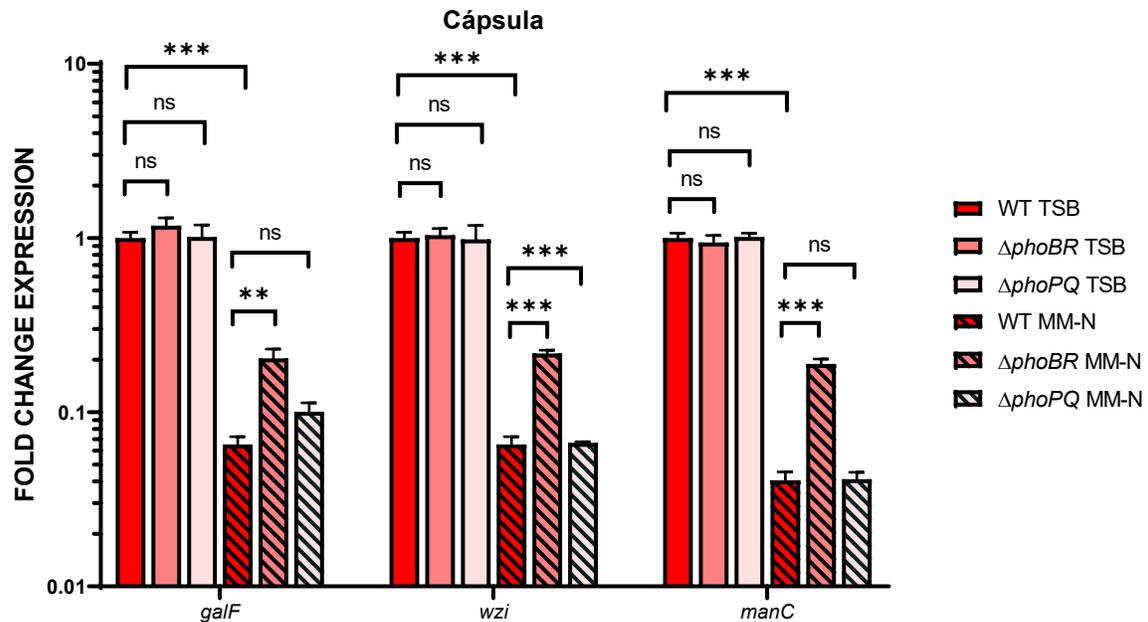


Figura 18. Comparación de la regulación transcripcional de genes involucrados en la síntesis de la cápsula de *K. pneumoniae*, en medio TSB y MM-N. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes. Las barras de error indican la desviación estándar. $p < 0.05$: diferencia estadísticamente significativa con respecto a la cepa WT-TSB

8.6 Expresión genética de la fimbrias en *K. pneumoniae* en ausencia de PhoBR y PhoPQ

Para analizar el efecto que tienen los sistemas de dos componentes PhoBR y PhoPQ sobre la transcripción de los genes fimbriales, se realizó una RT-PCR en tiempo real de los genes que codifican para las pilinas *mrkA*, *fimA* y *ecpA* en medio TSB y MM-N. En la Figura 19 se comparó la expresión de los genes evaluados con la expresión de la cepa WT cultivada en medio TSB, en donde se observó que en este medio de cultivo no hubo diferencias significativas en la expresión de los genes.

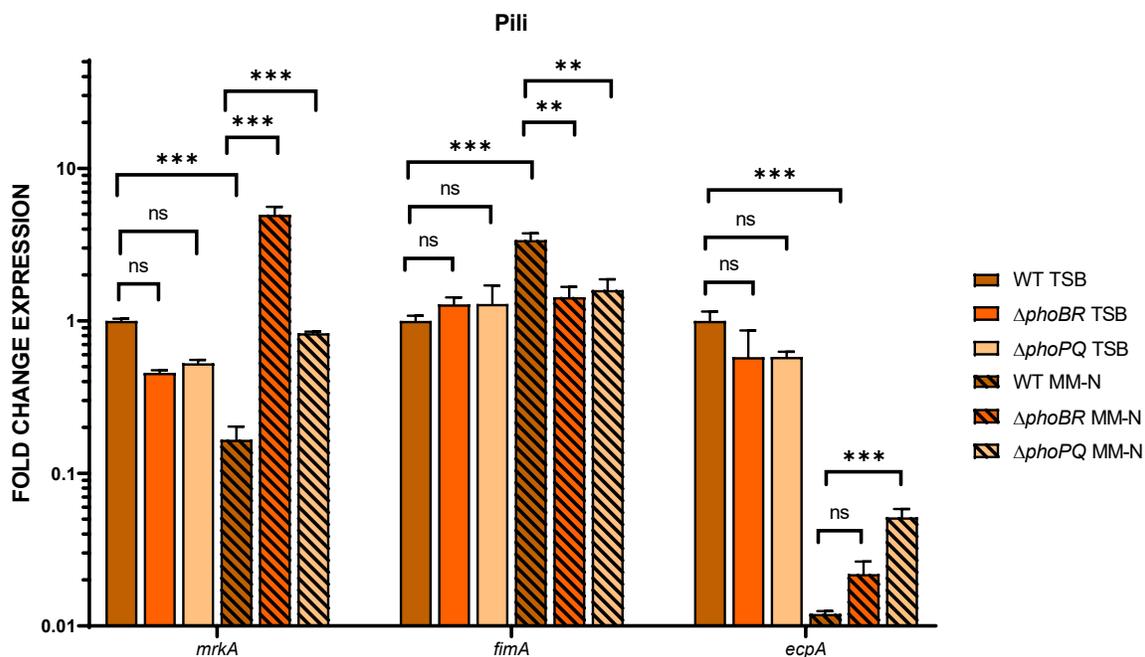


Figura 19. Comparación de la regulación transcripcional de genes involucrados en la síntesis de las fimbrias de *K. pneumoniae*, en medio TSB y MM-N. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes. Las barras de error indican la desviación estándar. $p < 0.05$: diferencia estadísticamente significativa con respecto a la cepa WT-TSB

En la Figura 19 se mostró que la expresión de los genes *mrkA* y *ecpA* tuvo una disminución significativa cuando la bacteria fue crecida en MM-N. Sin embargo, la expresión de *mrkA* se restableció cuando los sistemas de dos componentes PhoBR y PhoPQ estuvieron ausentes, desreprimiéndose 29 y cinco veces con respecto a la cepa silvestre, respectivamente. En cuanto al nivel transcripcional de *fimA*, el análisis realizado no mostró diferencias significativas entre las mutantes $\Delta phoBR$ y $\Delta phoPQ$ con respecto a la cepa silvestre WT, en cualquiera de los medios utilizados. Sin embargo, en MM-N la expresión del gen *ecpA* tuvo un significativo aumento en las cepas $\Delta phoBR$ y $\Delta phoPQ$ en comparación con la cepa WT. Nuestros datos mostraron que contrario al gen *mrkA*, en el gen *ecpA* existen otros mecanismos que reprimen la expresión de esta fimbria en MM-N, independientemente de los sistemas de dos componentes PhoBR y PhoPQ.

8.7 Expresión genética del lipopolisacárido en *K. pneumoniae* en las mutantes $\Delta phoBR$ y $\Delta phoPQ$

Para comprobar el efecto regulador que tienen los sistemas de dos componentes PhoBR y PhoPQ sobre la transcripción de genes involucrados en la síntesis del lipopolisacárido, se realizó una RT-PCR en tiempo real de los genes *wzm*, *msbA* y *rfaD* en medio TSB y MM-N. Similar a lo observado para los genes capsulares y fimbriales, la expresión de los genes del LPS no se afectó en las mutantes $\Delta phoBR$ y $\Delta phoPQ$ cuando la bacteria se creció en medio TSB (Figura 20). A excepción de *wzm*, los genes *msbA* y *rfaD* se reprimieron en MM-N. Interessantemente, la ausencia del sistema de dos componentes PhoBR en esta condición de crecimiento, incrementó cuatro y tres veces la expresión de *msbA* y *rfaD*, respectivamente. En el caso de PhoPQ, su ausencia incrementó dos veces la expresión de *rfaD*. Estas observaciones sugieren que PhoBR reprime principalmente el core y el lípido A del LPS, donde el antígeno O no sería requerido debido a que su función depende de la presencia de los primeros dos componentes.

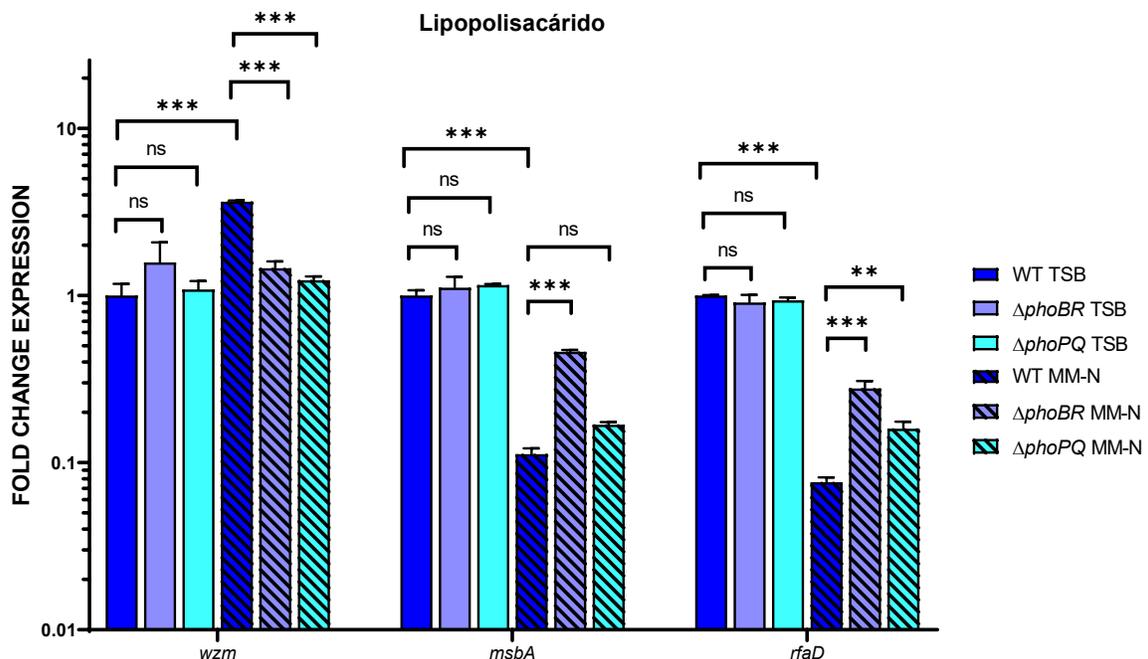


Figura 20. Comparación de la regulación transcripcional de genes involucrados en la síntesis del lipopolisacárido de *K. pneumoniae*, en medio TSB y MM-N. Los datos representan el promedio de

tres experimentos independientes. Las barras de error indican la desviación estándar. $p < 0.05$: diferencia estadísticamente significativa con respecto a la cepa WT-TSB

8.8 Efecto de PhoBR y PhoPQ en la expresión genética de proteínas de membrana externa en *K. pneumoniae*

Se evaluó a nivel transcripcional los genes que codifican para las proteínas de la membrana externa OmpK35, OmpK36 y OmpA en la ausencia de los sistemas de dos componentes PhoBR y PhoPQ tanto en medio TSB como en MM-N. En medio rico TSB, no se observaron diferencias en los niveles de expresión en las mutantes $\Delta phoBR$ y $\Delta phoPQ$ comparadas a la cepa silvestre (Figura 21). En MM-N, la expresión de *ompK35*, *ompK36* y *ompA* también se reprimió en esta condición de crecimiento. En la mutante $\Delta phoBR$, la transcripción de *ompK35*, *ompK36* y *ompA* se desreprimió dos, cuatro y diez veces con respecto a la cepa silvestre, respectivamente. En la mutante $\Delta phoPQ$, solamente la expresión de *ompK36* y *ompA* se incrementó tres y dos veces con respecto a la cepa silvestre, respectivamente. Nuestros datos muestran que tanto PhoBR como PhoPQ tiene un papel represor en la expresión de los genes que codifican para las proteínas de membrana externa cuando *K. pneumoniae* crece en MM-N.

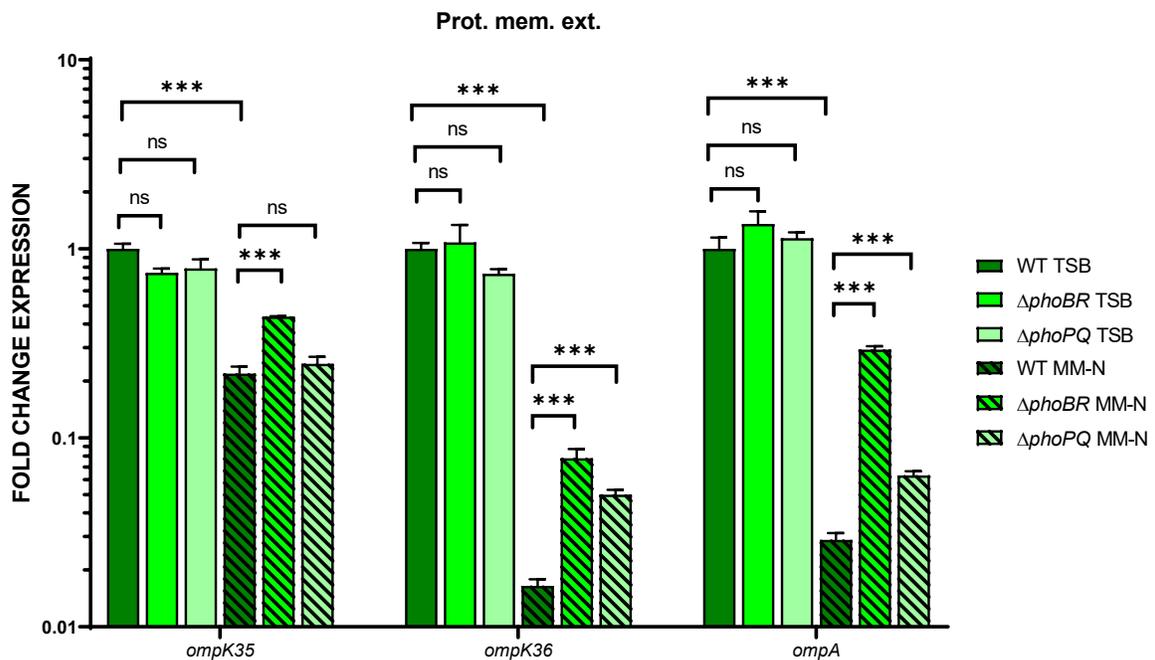


Figura 21. Comparación de la regulación transcripcional de genes involucrados en la síntesis de proteínas de membrana externa de *K. pneumoniae*, en medio TSB y MM-N. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes. Las barras de error indican la desviación estándar. $p < 0.05$: diferencia estadísticamente significativa con respecto a la cepa WT-TSB

8.9 Expresión genética de los sideróforos de *K. pneumoniae* en las mutantes $\Delta phoBR$ y $\Delta phoPQ$

El último grupo de genes evaluados por RT-PCR en tiempo real fueron los genes *fhuA* y *fes*, los cuales codifican para componentes del sistema de captación de hierro ferricromo y enterobactina, respectivamente.

El último grupo de genes evaluados por RT-PCR en tiempo real fueron los genes *fhuA* y *fes*, los cuales codifican para componentes del sistema de captación de hierro ferricromo y enterobactina, respectivamente. Los resultados no muestran cambios significativos en la expresión de *fhuA* y *fes* cuando se cultivó en medio TSB, sin embargo, la expresión de *fes* se incrementó 27 veces en la cepa WT cuando se cultivó en MM-N. Por su parte la expresión de *fhuA* en las mutantes $\Delta phoBR$ y $\Delta phoPQ$ se incrementó 7 y 2 veces en comparación a la cepa silvestre WT (Figura 22). A diferencia de *fhuA*, la expresión de *fes* cuando se cultivó en MM-N disminuyó significativamente 0.7 veces en la mutante $\Delta phoBR$, y 0.5 veces en la cepa $\Delta phoPQ$ en comparación a los datos obtenidos en la cepa WT. Es claro que en la expresión de los sideróforos enterobactina y ferricromo, PhoBR y PhoPQ presentan un papel dual, actuando como activadores y represores, respectivamente.

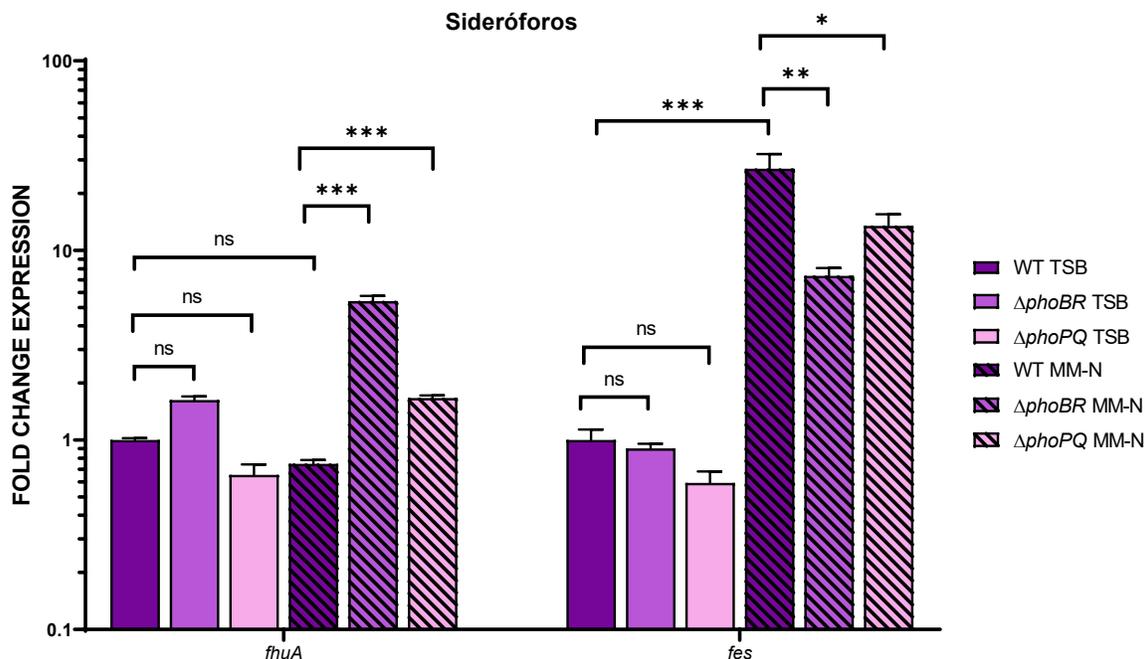


Figura 22. Comparación de la regulación transcripcional de genes involucrados en la síntesis de sideróforos de *K. pneumoniae*, en medio TSB y MM-N. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes. Las barras de error indican la desviación estándar. $p < 0.05$: diferencia estadísticamente significativa con respecto a la cepa WT-TSB

9 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las bacterias y ciertos organismos eucariotas utilizan sistemas de dos componentes para detectar y responder a los cambios en el ambiente. Los sistemas de dos componentes suelen ser modulares, y la gama de respuestas a estímulos externos es amplia. Se ha reportado que la activación de sistemas de dos componentes genera un estímulo respuesta durante la invasión al huésped de bacterias patógenas, durante la resistencia a medicamentos, motilidad, absorción de fosfato, osmoregulación, esporulación y fijación de nitrógeno, entre otros (Stock et al., 2000).

En *E. coli* y la mayoría de las enterobacterias, el de fosfato está controlada por un sistema de componentes que consiste en PhoR, un sensor cinasa transmembrana quinasa, y PhoB, el regulador de respuesta (Kim et al., 2000). El regulador de respuesta PhoB regula la expresión de al menos 39 genes en siete operones y 3 genes independientes, los cuales en conjunto forman al operon Pho (Blanco et al.,

2002). Se ha demostrado que el regulador de respuesta una vez fosforilado, es capaz de unirse a secuencias específicas en el DNA y activar o reprimir la transcripción de genes. Estas secuencias específicas conocidas como cajas Pho, se caracterizaron por primera vez en *E. coli* (Santos, 2015). Las cajas Pho se definen como la suma de dos unidades de repetición directa de 11 nucleótidos compuestos por 7 nucleótidos conservados y 4 menos conservados en cada una (Blanco et al., 2002).

9.1 Autorregulación de los genes del sistemas PhoBR y PhoPQ

En el caso específico del sistema PhoBR, este tiene la capacidad de autorregularse de forma positiva cuando la limitante en el medio es el Pi, sin embargo, algunos trabajos han encontrado una retroalimentación entre otros sistemas de dos componentes que activan y regulan de forma cruzada al regulador PhoB, tal es el caso del sistema ArcAB (encargado de mediar la adaptación cuando existen condiciones anaerobias), KdpDE (encargado de mediar la adaptación cuando K⁺ es limitado), QseCB (encargado de mediar la adaptación mediada por quorum), BaeSR (encargado de mediar la adaptación cuando existe estrés osmótico), EnvZ-OmpR (encargado de la osmorregulación), VanSR (encargado de mediar la adaptación en presencia de Vancomicina), CreCB (implicado en la regulación de genes involucrados en el catabolismo del carbono), incluso el sistema PhoPQ es capaz de activar al sistema PhoBR (Lamarche et al., 2008; Chekabab et al., 2014 ; Choi et al., 2019). Por esta razón la elección del medio de crecimiento y las condiciones del cultivo tuvieron que ser las ideales para la activación específica del sistema de dos componentes PhoBR y PhoPQ.

El medio empleado en este estudio fue el caldo triptocaseína de soja o TSB, el cual es ideal para bacterias patógenas con altos requisitos nutricionales, por lo que fue ideal para estos fines, emulando las condiciones óptimas en las que *K. pneumoniae* podría crecer. Este medio contiene triptona o digerido de caseína (proporciona aminoácidos), digerido enzimático de soja (proporciona carbohidratos, grasas, proteínas, vitaminas y minerales como fosfato y magnesio), cloruro de sodio, fosfato

dipotásico, glucosa y agua, los cuales son nutrientes necesarios para el crecimiento de *K. pneumoniae*.

Como contraparte del medio ideal TSB, se utilizó el MM-N, el cual cuenta con una concentración μM de fosfato y magnesio. Sin embargo, este medio tiene una buena concentración de otros nutrientes como el potasio y el azufre, con el fin de no limitar completamente el crecimiento de *K. pneumoniae* y no causar el efecto de activación cruzada a través de otros sistemas de dos componentes.

Los resultados obtenidos en este trabajo (Figura 17) confirman la participación de los sistemas de dos componentes en la autorregulación y por consecuencia, en el aumento de la expresión de los genes de los reguladores de respuesta PhoB y PhoP tal y como se reporta en la literatura relacionada a los sistemas de dos componentes en otros modelos tales como *E. coli* y *V. cholerae* (Santos, 2015).

Teniendo en cuenta que existe una activación de los sistemas de dos componentes al cambiar de un medio rico en nutrientes, fosfatos y magnesio como lo es el medio TSB, a un medio reducido en nutrientes como lo es el medio MM, se planteó la hipótesis de que los sistemas PhoBR y PhoPQ regulan la expresión de los factores de virulencia evaluados de forma diferencial entre los dos medios empleados.

9.2 Regulación de los genes de la cápsula

La expresión de la cápsula está organizada transcripcionalmente en tres operones policistrónicos, donde *galF*, *wzi* y *manC*, son los primeros genes de cada unidad transcripcional. Los resultados obtenidos en medio TSB muestran un fenómeno muy interesante en la regulación de la biosíntesis de la cápsula a través de los sistemas de dos componentes evaluados. Cuando *K. pneumoniae* crece en condiciones con abundantes nutrientes, los genes *galF*, *wzi* y *manC* no son regulados a través de los sistemas PhoBR y PhoPQ. En contraste, los resultados obtenidos en MM-N, muestran que principalmente PhoBR, ejerce un efecto represor de los genes *galF*, *wzi* y *manC* en esta condición de crecimiento. Dicha condición podría mimetizar el ambiente intracelular que experimenta *K. pneumoniae* cuando es fagocitada por los macrófagos, donde en este microambiente, la cápsula ya no es necesaria, por lo

que su expresión disminuye (Ares et al., 2019). Mecanísticamente, nuestra hipótesis apuntaría a que, en condiciones de bajo fosfato, PhoR se autofosforilaría y transferiría su grupo fosfato a PhoB produciendo PhoB-P. PhoB-P se uniría a las regiones promotoras de cada unidad transcripcional, bloqueando la unión de la RNA polimerasa y evitando la síntesis de los RNA mensajeros policistrónicos de cada operón. Actualmente se está analizando si las regiones promotoras de los genes *galF*, *wzi* y *manC* contienen la secuencia consenso denominada caja Pho, en donde el regulador PhoB-P se une. Sin embargo, no se puede descartar que PhoB-P se una directamente al promotor de *rcaA*, el activador de los genes capsulares, y, por lo tanto, bloquee su expresión y consecuentemente la transcripción de los tres operones policistrónicos involucrados en la biosíntesis de la cápsula.

9.3 Regulación de los genes de las fimbrias

A diferencia de ECP (*E. coli* common pilus), la regulación genética de las fimbrias tipo 3 y 1 de *K. pneumoniae* está controlada por un operón contiguo a los operones *mrk* y *fim*. En este operon contiguo se sintetiza los reguladores MrkH y FimB, los cuales regulan directamente al operón *mrk* y *fim*, respectivamente.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una regulación negativa de los genes *mrkA* y *ecpA* a través del sistema PhoBR en MM-N. Se ha demostrado en *E. coli* que el gen *mrkA* posee su propio promotor, la expresión de *ecpA* depende del promotor de *ecpR* ya que este último es el primer gen del operón *ecpRABCDE* (Martínez-Santos et al., 2012). No se ha analizado si los promotores de *mrkA* o *ecpR* contienen la caja Pho. Para el caso de *mrkA*, no se puede descartar que PhoB-R tenga un efecto indirecto, pudiéndose unir a las regiones promotoras de los genes *mrkH* y *mrkJ*, los cuales codifican para la proteína activadora MrkH y la proteína represora MrkJ, respectivamente.

En el caso de la regulación negativa de los genes *mrkA* y *ecpA* por el sistema PhoPQ, no hay evidencia bibliográfica de que el regulador PhoP influya sobre este gen por lo que sería novedoso inferir que dicho sistema de dos componentes está regulando negativamente estos operones fimbriales.

Nuestras observaciones sugieren que *K. pneumoniae* en condiciones de baja concentración de fosfato y magnesio (por ejemplo durante el fagosoma), el sistema PhoBR reprime los operones *mrk* y *ecp*, lo que se podría traducir hipotéticamente en una menor expresión de fimbrias tipo 3 y tipo ECP, lo cual es concordante con lo ya reportado, ya que aquellas bacterias que son fagocitadas expresarían un menor número de fimbrias, las cuales son esenciales solamente para la invasión pero no para la sobrevivencia intracelular.

9.4 Regulación de los genes del lipopolisacárido

Las enzimas responsables de la síntesis del lípido A se encuentran conservadas en las bacterias Gram negativas. Las 9 enzimas constitutivas implicadas en la síntesis del lípido A por lo general no están sujetas a regulación (Figura 35 A) (Raetz & Whitfield, 2002). En cambio, la mayoría de las enzimas responsables de la modificación del lípido A varía y su expresión es regulada por condiciones externas (Dalebroux et al., 2014). El sistema PhoPQ en *Salmonella* regula la sustitución de aminoarabinosa, etanolamina y fosfato en el lípido A y core mediante la activación de genes que codifican a los reguladores PmrAB. En *K. pneumoniae* la adición de arabinosa y palmitato participa en la supervivencia de la bacteria durante el proceso de fagocitosis (Mils et al., 2017).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que principalmente el sistema PhoBR está involucrado en la expresión genética del lipopolisacárido cuando *K. pneumoniae* crece en un medio donde hay una gran limitación de fosfato y magnesio. Actualmente no existen reportes acerca de la regulación directa de los genes involucrados en la biosíntesis del lipopolisacárido a través de PhoBR, sin embargo, los resultados obtenidos en MM-N podrían estar mostrando una novedosa interacción entre el sistema PhoBR y los genes evaluados.

Se ha descrito que el lípido A y el oligosacárido central se forma en un proceso continuo y es independiente de la síntesis del antígeno O (Reyes et al., 2012). Por lo tanto, hace sentido que los genes *msbA* y *rfaD* se regulen de manera similar en MM-N, donde ambas unidades transcripcionales se repriman en esta condición de crecimiento y esta represión sea mediada principalmente por el sistema PhoBR.

Similar a lo observado para la cápsula y las fimbrias, la síntesis del LPS no es requerida en un ambiente intracelular, por lo que reguladores maestros como el sistema PhoBR, son activados para reprimir esta molécula glucolípida.

9.5 Regulación de los genes de las proteínas de membrana externa

Las porinas OmpK35 y OmpK36 son homólogas a las proteínas OmpF y OmpC de *E. coli*, respectivamente. En términos de la regulación de PhoBR y PhoPQ sobre los genes que codifican para las proteínas de membrana externa, solo existe un reporte en *Vibrio cholerae* que relacionan al regulador PhoB como responsable de la regulación negativa de *ompA* (Shimizu et al., 2013). Los niveles transcripcionales de *ompK35* y *ompK36* muestran que en MM-N, la expresión de *ompK36* se reprimió mucho más que *ompK35*, corroborando lo reportado que *ompF/ompK35* se expresa preferentemente en medios de baja osmolaridad, mientras que la expresión de *ompC/ompK36* se favorece en alta osmolaridad (Martínez, 2008). Además, los datos generados en este trabajo sugieren que principalmente el sistema PhoBR participa en la represión de los genes relacionados con la síntesis de proteínas de membrana externa cuando *K. pneumoniae* crece en un medio con baja concentración de fosfato y magnesio. Similar a los genes anteriores, no se ha evaluado la presencia de la caja Pho en las regiones promotoras de los genes *ompK35*, *ompK36* y *ompA*. Desde el punto de vista biológico, estos resultados mostrarían una interacción entre el sistema de dos componentes PhoBR y los genes *ompK35*, *ompK36* y *ompA* en *K. pneumoniae* en una condición intracelular, por ejemplo, durante la sobrevivencia dentro del fagosoma del macrófago, donde estas proteínas ya no serían requeridas.

9.6 Regulación de los genes del sistema de captación de hierro a través de sideróforos

El hierro es un cofactor valioso ya que puede conducir a la formación de especies reactivas de oxígeno muy tóxicas y altamente reactivas, por lo que existen mecanismos para adquirir hierro y mantenerlo bajo control. Las bacterias y otros microorganismos de vida libre hacen uso de sideróforos para capturar moléculas de hierro con una alta afinidad para mantenerlo en un estado soluble para ser introducido a la célula (Troxell & Hassan, 2013). Los resultados obtenidos dejan en

evidencia que, en condiciones con alto contenido nutricional en el medio, PhoBR y PhoPQ no están involucrados en la regulación de los genes *fhuA* y *fes*. En MM-N, la expresión del gen *fes* se incrementó en la cepa silvestre y este efecto positivo fue mediado parcialmente por el sistema PhoBR. En contraste, PhoBR reprimió la expresión de *fhuA* en MM-N. El efecto de PhoPQ fue mucho más discreto que el de PhoBR. La regulación diferencial del ferricromo y la enterobactina por el sistema PhoBR podría evidenciar que ambos sideróforos son mutuamente excluyentes y podrían ser requeridos en diferentes etapas de la infección.

10 CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Nuestros datos muestran la siguiente conclusión:

Los sistemas de dos componentes PhoBR y PhoPQ están implicados en la regulación de genes involucrados en la biosíntesis y regulación de factores de virulencia, tales como capsula, fimbrias, lipopolisacárido, proteínas de membrana externa y sideróforos, cuando *K. pneumoniae* crece en un medio bajo en nutrientes y concentraciones micromolares de fósforo y magnesio, como el MM-N. Es claro el papel predominante de PhoBR en dicha condición de crecimiento, por lo que probablemente el sistema PhoPQ podría estar involucrado en un soporte o ayuda molecular para el sistema PhoBR.

A manera de resumen se propone el siguiente mapa molecular de la regulación de los genes involucrados en la expresión de factores de virulencia en *K. pneumoniae*:

MM-N [$<Pi$ & Mg]

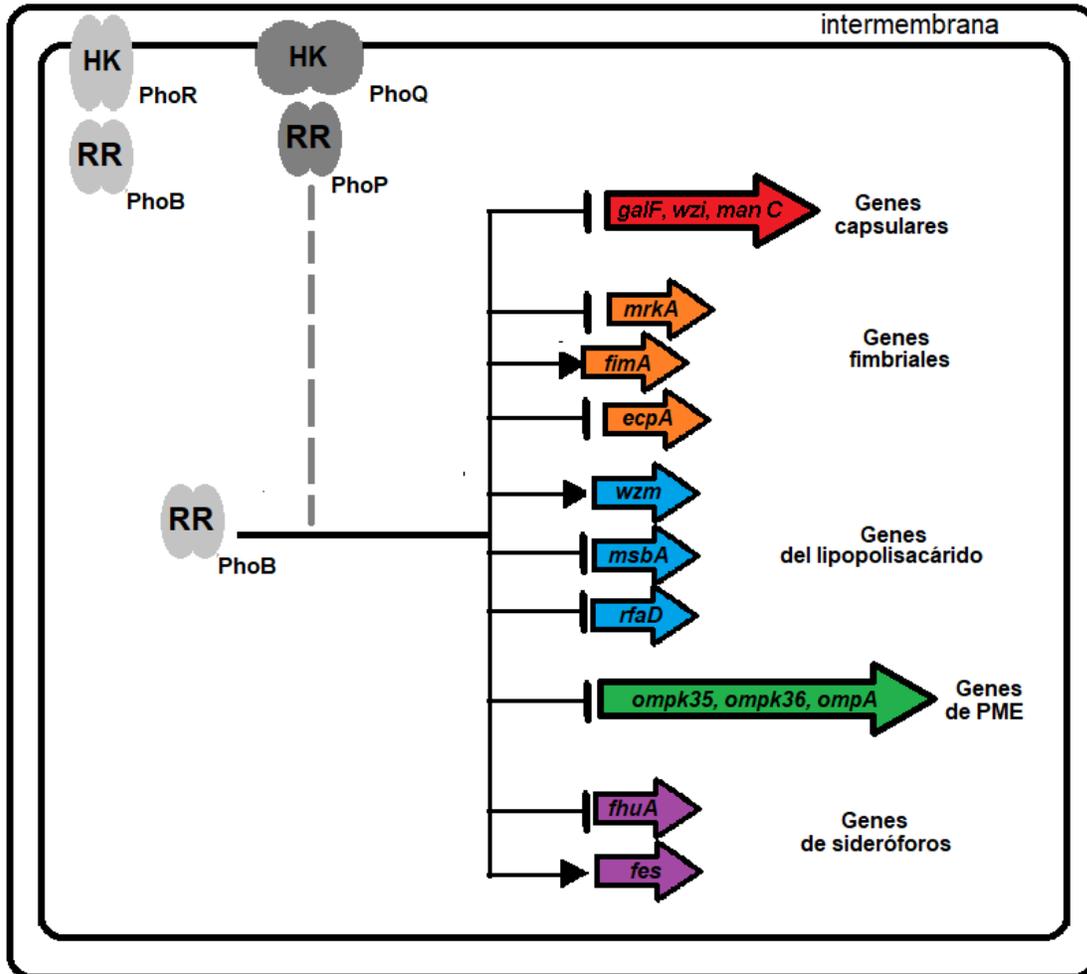


Figura 23. Mapa de regulación propuesto de la regulación de los genes involucrados en la expresión de factores de virulencia en *K. pneumoniae* a través de los sistemas de dos componentes PhoBR y PhoPQ en MM-N.

Aun no queda claro como interviene PhoBR y PhoPQ en la regulación de genes implicados en la expresión de factores de virulencia por lo que se tendría las siguientes perspectivas:

- Corroborar los resultados transcripcionales obtenidos complementando las cepas mutantes y evaluando la expresión fenotípica de los factores de virulencia a través del análisis de la formación de biopelícula, adherencia a células epiteliales y resistencia a la fagocitosis mediada por macrófagos.

- Analizar si existe una secuencia Pho que sea reconocida por el regulador PhoB a las regiones promotoras de los genes evaluados y corroborar la interacción DNA-proteína por medio de ensayos de cambio en la movilidad electroforética.

11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, P., Fowler, R., Kinsella, N., Howell, G., Farris, M., Coote, P., and O'Conner, C.D. (2001) Proteomic detection of PhoPQ- and acid-mediated repression of *Salmonella* motility. *Proteomics* 1: 597– 607.
- Aguado-Santacruz, G. A., Moreno-Gómez, B., Jiménez-Francisco, B., García-Moya, E., & Preciado-Ortiz, R. E. (2012). Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista fitotecnia mexicana*, 35(1), 9-21.
- Alexander, C., & Rietschel, E.T. (2001). Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J. Endotoxin Res.*, 7, pp. 167-202. *Annu. Rev. Biochem.* 2000; 69: 183-215
- Ares, M. A., Sansabas, A., Rodríguez-Valverde, D., Siqueiros-Cendón, T., Rascón-Cruz, Q., Rosales-Reyes, R., ... & De la Cruz, M. A. (2019). The interaction of *Klebsiella pneumoniae* with lipid rafts-associated cholesterol increases macrophage-mediated phagocytosis due to down regulation of the capsule polysaccharide. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 255.
- Bader, M. W., Navarre, W. W., Shiau, W., Nikaido, H., Frye, J. G., McClelland, M., ... & Miller, S. I. (2003). Regulation of *Salmonella typhimurium* virulence gene expression by cationic antimicrobial peptides. *Molecular microbiology*, 50(1), 219-230.
- Bader, M. W., Sanowar, S., Daley, M. E., Schneider, A. R., Cho, U., Xu, W., ... & Miller, S. I. (2005). Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell*, 122(3), 461-472.
- Bagley, S. T. (1985). Habitat association of *Klebsiella* species. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 6(2), 52-58.
- Batra, S., Cai, S., Balamayooran, G., & Jeyaseelan, S. (2012). Intrapulmonary administration of leukotriene B4 augments neutrophil accumulation and responses in the lung to *Klebsiella* infection in CXCL1 knockout mice. *The Journal of Immunology*, 188(7), 3458-3468.
- Beis, K. (2015). Structural basis for the mechanism of ABC transporters. *Biochemical Society Transactions*, 43(5), 889-893. <https://doi.org/10.1042/BST20150047>.
- Bengoechea, J. A., & Sa Pessoa, J. (2019). *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS microbiology reviews*, 43(2), 123-144. doi:10.1093/femsre/fuy043
- Bertrand, J. J., West, J. T., & Engel, J. N. (2010). Genetic analysis of the regulation of type IV pilus function by the Chp chemosensory system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 192(4), 994-1010.
- Bhate, M. P., Molnar, K. S., Goulian, M., & DeGrado, W. F. (2015). Signal transduction in histidine kinases: insights from new structures. *Structure*, 23(6), 981-994. doi:10.1016/j.str.2015.04.002.
- Blanco, A. G., Sola, M., Gomis-Rüth, F. X., & Coll, M. (2002). Tandem DNA recognition by PhoB, a two-component signal transduction transcriptional activator. *Structure*, 10(5), 701-713. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(02\)00761-X](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(02)00761-X)
- Bustamante, V. H., Martínez, L. C., Santana, F. J., Knodler, L. A., Steele-Mortimer, O., & Puente, J. L. (2008). HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(38), 14591-14596.

- Canals, A., Blanco, A. G., & Coll, M. (2012). σ 70 and PhoB activator: getting a better grip. *Transcription*, 3(4), 160-164.
- Carmany, D. O., Hollingsworth, K., & McCleary, W. R. (2003). Genetic and biochemical studies of phosphatase activity of PhoR. *Journal of bacteriology*, 185(3), 1112-1115. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.185.3.1112-1115.2003>.
- Castelli, M. E., Vescovi, E. G., & Soncini, F. C. (2000). The phosphatase activity is the target for Mg²⁺ regulation of the sensor protein PhoQ in *Salmonella*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(30), 22948-22954.
- Chamnongpol, S., & Groisman, E. A. (2000). Acetyl phosphate-dependent activation of a mutant PhoP response regulator that functions independently of its cognate sensor kinase. *Journal of molecular biology*, 300(2), 291-305.
- Chekabab, S. M., Jubelin, G., Dozois, C. M., & Harel, J. (2014). PhoB activates *Escherichia coli* O157: H7 virulence factors in response to inorganic phosphate limitation. *PloS one*, 9(4), e94285.
- Choi, S., Choi, E., Cho, Y. J., Nam, D., Lee, J., & Lee, E. J. (2019). The *Salmonella* virulence protein MgtC promotes phosphate uptake inside macrophages. *Nature communications*, 10(1), 1-14. DOI: 10.1038/s41467-019-11318-2.
- Christensen, K. A., Myers, J. T., & Swanson, J. A. (2002). pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages. *Journal of cell science*, 115(3), 599-607.
- Clark, B. L. (2004). Characterization of a Catechol-Type Siderophore and the Detection of a Possible Outer Membrane Receptor Protein from *Rhizobium leguminosarum* strain IARI 312.
- Conlan, S., Kong, H. H., & Segre, J. A. (2012). Species-level analysis of DNA sequence data from the NIH Human Microbiome Project. *PloS one*, 7(10), e47075.
- Cortés, G., Borrell, N., de Astorza, B., Gómez, C., Sauleda, J., & Albertí, S. (2002). Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. *Infection and immunity*, 70(5), 2583-2590. doi:10.1128/iai.70.5.2583-2590.2002
- Crosa, J. H., & Walsh, C. T. (2002). Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66(2), 223-249.
- Cross, A. S. (2008). What is a virulence factor? *Critical Care*, 12(6), 1-2. doi:10.1186/cc7127
- Cruz-Córdova, A., Esteban-Kenel, V., Espinosa-Mazariego, K., Ochoa, S. A., Moreno Espinosa, S., de la Garza Elhain, A., ... & Xicohtencatl-Cortes, J. (2014). Pathogenic determinants of clinical *Klebsiella pneumoniae* strains associated with their persistence in the hospital environment. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 71(1), 15-24.
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6640-6645.
- Davidson, A. L., Dassa, E., Orelle, C., & Chen, J. (2008). Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiology and molecular biology reviews*, 72(2), 317-364. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00031-07>.

- De Nisco, N. J., Rivera-Cancel, G., & Orth, K. (2018). The biochemistry of sensing: enteric pathogens regulate type III secretion in response to environmental and host cues. *MBio*, 9(1).
- Derzelle, S., Turlin, E., Duchaud, E., Pages, S., Kunst, F., Givaudan, A., & Danchin, A. (2004). The PhoP-PhoQ two-component regulatory system of *Photobacterium luminescens* is essential for virulence in insects. *Journal of bacteriology*, 186(5), 1270-1279. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.186.5.1270-1279.2004>
- DeVinney, R., Puente, J. L., Gauthier, A., Goosney, D., & Finlay, B. B. (2001). Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use a different Tir-based mechanism for pedestal formation. *Molecular microbiology*, 41(6), 1445-1458.
- Epstein, E. A., Reizian, M. A., & Chapman, M. R. (2009). Spatial clustering of the curlin secretion lipoprotein requires curli fiber assembly. *Journal of bacteriology*, 191(2), 608-615., doi:10.1128/JB.01244-08.
- Etzkorn, M., Kneuper, H., Dünwald, P., Vijayan, V., Krämer, J., Griesinger, C., ... & Baldus, M. (2008). Plasticity of the PAS domain and a potential role for signal transduction in the histidine kinase DcuS. *Nature structural & molecular biology*, 15(10), 1031. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.1493>.
- Finn, R. D., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J., Mitchell, A. L., ... & Bateman, A. (2016). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic acids research*, 44(D1), D279-D285. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkv1344>.
- Galperin, M. Y. (2010). Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Current opinion in microbiology*, 13(2), 150-159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.005>.
- Gao, R., & Stock, A. M. (2009). Biological insights from structures of two-component proteins. *Annual review of microbiology*, 63. doi:10.1146/annurev.micro.091208.073214.
- Gao, R., & Stock, A. M. (2017). Quantitative kinetic analyses of shutting off a two-component system. *MBio*, 8(3).. doi:10.1128/mBio.00412-17
- Gardner, S. G., & McCleary, W. R. (2019). Control of the phoBR Regulon in *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*, 8(2). doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2019
- Groisman, E. A. (2001). The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *Journal of bacteriology*, 183(6), 1835-1842. doi: 10.1128 / JB.183.6.1835-1842.2001.
- Hsieh, Y. J., & Wanner, B. L. (2010). Global regulation by the seven-component Pi signaling system. *Current opinion in microbiology*, 13(2), 198-203. doi:10.1016/j.mib.2010.01.014
- Jacobsen, S. M., Lane, M. C., Harro, J. M., Shirliff, M. E., & Mobley, H. L. (2008). The high-affinity phosphate transporter Pst is a virulence factor for *Proteus mirabilis* during complicated urinary tract infection. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 52(2), 180-193.
- Jiang, J., Yu, K., Qi, L., Liu, Y., Cheng, S., Wu, M., ... & Liu, X. (2018). A proteomic view of *Salmonella Typhimurium* in response to phosphate limitation. *Proteomes*, 6(2), 19. <http://dx.doi.org/10.3390/proteomes6020019>.

- Jondle, C. N., Gupta, K., Mishra, B. B., & Sharma, J. (2018). *Klebsiella pneumoniae* infection of murine neutrophils impairs their efferocytic clearance by modulating cell death machinery. *PLoS pathogens*, 14(10), e1007338.
- Kline, K. A., Fälker, S., Dahlberg, S., Normark, S., & Henriques-Normark, B. (2009). Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell host & microbe*, 5(6), 580-592.
- Kim, S. K., Kimura, S., Shinagawa, H., Nakata, A., Lee, K. S., Wanner, B. L., & Makino, K. (2000). Dual Transcriptional Regulation of the *Escherichia coli* Phosphate-Starvation-Inducible *psiE* Gene of the Phosphate Regulon by PhoB and the Cyclic AMP (cAMP)-cAMP Receptor Protein Complex. *Journal of bacteriology*, 182(19), 5596-5599.
- Krewulak, K. D., & Vogel, H. J. (2008). Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1778(9), 1781-1804.
- Krishnan, S., & Prasadarao, N. V. (2012). Outer membrane protein A and OprF: versatile roles in Gram - negative bacterial infections. *The FEBS journal*, 279(6), 919-931. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08482.x.
- Kuehn, B. M. (2013). "Nightmare" bacteria on the rise in US hospitals, long-term care facilities. *Jama*, 309(15), 1573-1574. doi:10.1001/jama.2013.2922
- Lamarche, M. G., Wanner, B. L., Crépin, S., & Harel, J. (2008). The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS microbiology reviews*, 32(3), 461-473. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00101.x. Epub 2008 Jan 29. PMID: 18248418.
- Lejona, S., Aguirre, A., Cabeza, M. L., Véscovi, E. G., & Soncini, F. C. (2003). Molecular characterization of the Mg²⁺-responsive PhoP-PhoQ regulon in *Salmonella enterica*. *Journal of bacteriology*, 185(21), 6287-6294. doi:10.1128/jb.185.21.6287-6294.2003
- Li, B., Zhao, Y., Liu, C., Chen, Z., & Zhou, D. (2014). Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future microbiology*, 9(9), 1071-1081. doi: 10.2217/fmb.14.48...
- Luecke, H., & Quioco, F. A. (1990). High specificity of a phosphate transport protein determined by hydrogen bonds. *Nature*, 347(6291), 402-406.
- Magill, S. S., O'Leary, E., Janelle, S. J., Thompson, D. L., Dumyati, G., Nadle, J., ... & Edwards, J. R. (2018). Changes in prevalence of health care-associated infections in US hospitals. *New England Journal of Medicine*, 379(18), 1732-1744.
- Martínez-Martínez, L. (2008). Extended - spectrum β - lactamases and the permeability barrier. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 82-89. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01860.x. PMID: 18154531
- Martínez-Santos, V. I., Medrano-López, A., Saldaña, Z., Girón, J. A., & Puente, J. L. (2012). Transcriptional regulation of the *ecp* operon by EcpR, IHF, and H-NS in attaching and effacing *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 194(18), 5020-5033.
- Masi, M., & Pagès, J. M. (2013). Structure, function and regulation of outer membrane proteins involved in drug transport in *Enterobacteriaceae* [sic]: the *OmpF/C-TolC* case. *Open Microbiol. J.* 7: 22–33. doi: 10.2174/1874285801307010022
- McCleary, W. R., & Stock, J. B. (1994). Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *Journal of Biological Chemistry*, 269(50), 31567-31572.

- Meatherall, B. L., Gregson, D., Ross, T., Pitout, J. D., & Laupland, K. B. (2009). Incidence, risk factors, and outcomes of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *The American journal of medicine*, 122(9), 866-873.
- Merighi, M., Ellermeier, C. D., Slauch, J. M., & Gunn, J. S. (2005). Resolvase-in vivo expression technology analysis of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium PhoP and PmrA regulons in BALB/c mice. *Journal of bacteriology*, 187(21), 7407-7416.
- Mills, G., Dumigan, A., Kidd, T., Hobley, L., & Bengoechea, J. A. (2017). Identification and characterization of two *Klebsiella pneumoniae* lpxL lipid A late acyltransferases and their role in virulence. *Infection and immunity*, 85(9), e00068-17.
- Monsieurs, P., De Keersmaecker, S., Navarre, W. W., Bader, M. W., De Smet, F., McClelland, M., ... & Marchal, K. (2005). Comparison of the PhoPQ regulon in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Molecular Evolution*, 60(4), 462-474.
- Morrissey, J. A., Cockayne, A., Hill, P. J., & Williams, P. (2000). Molecular cloning and analysis of a putative siderophore ABC transporter from *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity*, 68(11), 6281-6288.
- Moskowitz, S. M., Ernst, R. K., & Miller, S. I. (2004). PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *Journal of bacteriology*, 186(2), 575-579.
- Moss, J. E., Fisher, P. E., Vick, B., Groisman, E. A., & Zychlinsky, A. (2000). The regulatory protein PhoP controls susceptibility to the host inflammatory response in *Shigella flexneri*. *Cellular microbiology*, 2(6), 443-452.
- Orozco, N., Touret, N., Zaharik, M. L., Park, E., Kopelman, R., Miller, S., ... & Grinstein, S. (2006). Visualization of vacuolar acidification-induced transcription of genes of pathogens inside macrophages. *Molecular biology of the cell*, 17(1), 498-510.
- Oyston, P. C., Dorrell, N., Williams, K., Li, S. R., Green, M., Titball, R. W., & Wren, B. W. (2000). The response regulator PhoP is important for survival under conditions of macrophage-induced stress and virulence in *Yersinia pestis*. *Infection and immunity*, 68(6), 3419-3425.
- Paczosa, M. K., & Meccas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 629-661. doi:10.1128/MMBR.00078-15
- Pan, Y. J., Lin, T. L., Chen, C. T., Chen, Y. Y., Hsieh, P. F., Hsu, C. R., ... & Wang, J. T. (2015). Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp. *Scientific reports*, 5(1), 1-10. doi:10.1038/srep15573
- Peterson, C. N., Mandel, M. J., & Silhavy, T. J. (2005). *Escherichia coli* starvation diets: essential nutrients weigh in distinctly. *Journal of bacteriology*, 187(22), 7549-7553. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.187.22.7549-7553.2005>.
- Phan, K., & Ferenci, T. (2013). A design-constraint trade-off underpins the diversity in ecologically important traits in species *Escherichia coli*. *The ISME journal*, 7(10), 2034-2043. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.82>
- Podschun, R., Pietsch, S., Höller, C., & Ullmann, U. (2001). Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. *Applied and environmental microbiology*, 67(7), 3325-3327. doi:10.1128/AEM.67.7.3325-3327.2001

- Pratt, J. T., Ismail, A. M., & Camilli, A. (2010). PhoB regulates both environmental and virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Molecular microbiology*, 77(6), 1595-1605. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07310.x
- Proft, T., & Baker, E. N. (2009). Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria—structure, assembly and their role in disease. *Cellular and molecular life sciences*, 66(4), 613-635.
- Prost, L. R., & Miller, S. I. (2008). The *Salmonellae* PhoQ sensor: mechanisms of detection of phagosome signals. *Cellular microbiology*, 10(3), 576-582.
- Prost, L. R., Daley, M. E., Le Sage, V., Bader, M. W., Le Moual, H., Klevit, R. E., & Miller, S. I. (2007). Activation of the bacterial sensor kinase PhoQ by acidic pH. *Molecular cell*, 26(2), 165-174.
- Quioco, F. A., & Ledvina, P. S. (1996). Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. *Molecular microbiology*, 20(1), 17-25. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02484.x>.
- Raetz, C. R., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual review of biochemistry*, 71(1), 635-700. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414
- Rasko, D. A., & Sperandio, V. (2010). Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nature reviews Drug discovery*, 9(2), 117-128. doi: 10.1038/nrd3013.
- Rice, C. D., Pollard, J. E., Lewis, Z. T., & McCleary, W. R. (2009). Employment of a promoter-swapping technique shows that PhoU modulates the activity of the PstSCAB2 ABC transporter in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 75(3), 573-582. DOI: DOI: 10.1128/AEM.01046-08
- 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. *Journal of medical microbiology*, 57(11), 1329-1334.
- Ristuccia, P. A., & Cunha, B. A. (1984). *Klebsiella*. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 5(7), 343-347.
- Rock, C., Thom, K. A., Masnick, M., Johnson, J. K., Harris, A. D., & Morgan, D. J. (2014). Frequency of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) and non-KPC-producing *Klebsiella* contamination of Healthcare workers and the environment. *Infection control and hospital epidemiology: the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*, 35(4), 426. doi:10.1086/675598
- Romero Hurtado, S., & Iregui, C. A. (2010). Lipopolysaccharide. *Revista de Medicina Veterinaria*, (19), 37-45.
- Reyes, R. E., González, C. R., Jiménez, R. C., Herrera, M. O., Andrade, A. A., & Karunaratne, D. N. (2012). Mechanisms of O-antigen structural variation of bacterial lipopolysaccharide (LPS). *The complex world of polysaccharides*, 71-98. DOI: 10.5772/48147
- Rosenfeld, Y., & Shai, Y. (2006). Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: role in bacterial resistance and prevention of sepsis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(9), 1513-1522. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.05.017>
- Santos-Beneit, F. (2015). The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria. *Frontiers in microbiology*, 6, 402. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00402>

- Schembri, M. A., Dalsgaard, D., & Klemm, P. (2004). Capsule shields the function of short bacterial adhesins. *Journal of bacteriology*, 186(5), 1249-1257. doi:10.1128/jb.186.5.1249-1257.2004
- Sebghati, T. A. S., Korhonen, T. K., Hornick, D. B., & Clegg, S. (1998). Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. *Infection and immunity*, 66(6), 2887-2894.
- Shimizu, K. (2013). Metabolic regulation of a bacterial cell system with emphasis on *Escherichia coli* metabolism. *International Scholarly Research Notices*, 2013.. <https://doi.org/10.1155/2013/645983>
- Solà, M., Gomis-Rüth, F. X., Serrano, L., González, A., & Coll, M. (1999). Three-dimensional crystal structure of the transcription factor PhoB receiver domain. *Journal of molecular biology*, 285(2), 675-687. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1998.2326>.
- Spira, B., Agüena, M., de Castro Oliveira, J. V., & Yagil, E. (2010). Alternative promoters in the *pst* operon of *Escherichia coli*. *Molecular Genetics and Genomics*, 284(6), 489-498. <http://dx.doi.org/10.1007/s00438-010-0584-x>.
- Srinivasan, V. B., Venkataramaiah, M., Mondal, A., Vaidyanathan, V., Govil, T., & Rajamohan, G. (2012). Functional characterization of a novel outer membrane porin KpnO, regulated by PhoBR two-component system in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044. *PLoS One*, 7(7), e41505.. doi: 10.1371/journal.pone.0041505
- Stahlhut, S. G., Tchesnokova, V., Struve, C., Weissman, S. J., Chattopadhyay, S., Yakovenko, O., ... & Krogfelt, K. A. (2009). Comparative structure-function analysis of mannose-specific FimH adhesins from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 191(21), 6592-6601.
- Steed, P. M., & Wanner, B. L. (1993). Use of the *rep* technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the *pstSCAB-phoU* operon: evidence of a new role for the PhoU protein in the phosphate regulon. *Journal of bacteriology*, 175(21), 6797-6809. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.175.21.6797-6809.1993>.
- Stock, A. M., Robinson, V. L., & Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annual review of biochemistry*, 69(1), 183-215. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.183>.
- Struve, C., Bojer, M., & Krogfelt, K. 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. *Infection and immunity*, 77(11), 5016-5024.
- Struve, C., & Krogfelt, K. A. (2003). Role of capsule in *Klebsiella pneumoniae* virulence: lack of correlation between *in vitro* and *in vivo* studies. *FEMS microbiology letters*, 218(1), 149-154. doi: 10.1111/j.1574-6968.2003.tb11511.x.
- Sugawara, E., Kojima, S., & Nikaido, H. (2016). *Klebsiella pneumoniae* major porins OmpK35 and OmpK36 allow more efficient diffusion of β -lactams than their *Escherichia coli* homologs OmpF and OmpC. *Journal of bacteriology*, 198(23), 3200-3208. doi:10.1128/JB.00590-16
- Sultan, S. Z., Silva, A. J., & Benitez, J. A. (2010). The PhoB regulatory system modulates biofilm formation and stress response in El Tor biotype *Vibrio cholerae*. *FEMS microbiology letters*, 302(1), 22-31. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01837.x

- Troxell, B., & Hassan, H. M. (2013). Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3, 59. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00059>
- Vécovi, E. G., Soncini, F. C., & Groisman, E. A. (1996). Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell*, 84(1), 165-174.
- Wanner, B. L. (1996). Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC, 41, 1357-1381.
- Wanner, B. L. (1996). Signal transduction in the control of phosphate-regulated genes of *Escherichia coli*. *Kidney international*, 49(4), 964-967.
- Waterman, S. R., & Holden, D. W. (2003). Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cellular microbiology*, 5(8), 501-511..
- Willis, L. M., & Whitfield, C. (2013). Structure, biosynthesis, and function of bacterial capsular polysaccharides synthesized by ABC transporter-dependent pathways. *Carbohydrate research*, 378, 35-44. doi: 10.1016/j.carres.2013.05.007
- Yang, C., Huang, T. W., Wen, S. Y., Chang, C. Y., Tsai, S. F., Wu, W. F., & Chang, C. H. (2012). Genome-wide PhoB binding and gene expression profiles reveal the hierarchical gene regulatory network of phosphate starvation in *Escherichia coli*. *PLoS one*, 7(10), e47314. doi:10.1371/journal.pone.0047314
- Yoshida, T., Qin, L., Egger, L. A., & Inouye, M. (2006). Transcription regulation of *ompF* and *ompC* by a single transcription factor, *OmpR*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(25), 17114-17123. doi: 10.1074 / jbc.M602112200.
- Dalebroux, Z. D., Matamouros, S., Whittington, D., Bishop, R. E., & Miller, S. I. (2014). PhoPQ regulates acidic glycerophospholipid content of the *Salmonella* Typhimurium outer membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(5), 1963-1968.
- Zachary, J. F., & McGavin, M. D. (Eds.). (2012). *Pathologic Basis of Veterinary Disease5: Pathologic Basis of Veterinary Disease*. Elsevier Health Sciences. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35775-3.00004-7>.
- Zhang, P., Summer, W. R., Bagby, G. J., & Nelson, S. (2000). Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunological reviews*, 173, 39-51. doi:10.1034/j.1600-065X.2000.917306.x.

Páginas de internet consultadas

- Ashurst JV, Dawson A. *Klebsiella Pneumonia*. (consultado el 25 de marzo de 2020). In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls. De: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519004/?report=classic>
- OMS (consultado el 22 de enero de 2020). In *Antimicrobial resistance* [Internet]. De: www.who.int/glass/en/