

Variación de fase y el arte de la plasticidad fenotípica como secreto del éxito en la pato-adaptación bacteriana

CELIA GIL-CAMPILLO^{1,2,3}, MARÍA ANTONIA SÁNCHEZ-ROMERO^{3,4} Y JUNKAL GARMENDIA^{1,2,3}

¹Instituto de Agrobiotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IDAB-CSIC)-Gobierno de Navarra, Mutilva, Navarra (España)

²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Madrid (España)

³Conexión Antimicrobial Resistance (AMR), Consejo Superior de Investigaciones Científicas-CSIC (España)

⁴Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla (España)

✉ juncal.garmendia@csic.es

La **variación de fase** es un cambio reversible de la expresión génica que regula la actividad de múltiples fenotipos bacterianos. Este fenómeno es característico de los denominados genes de contingencia, que presentan una tasa de mutación más elevada que otras regiones del genoma bacteriano. Este mecanismo, que genera diversidad en la superficie bacteriana, contribuye a la evasión del sistema inmune durante la infección por bacterias patógenas.

El término variación de fase engloba un amplio conjunto de mecanismos moleculares que generan cambios reversibles en la expresión génica (Sánchez-Romero *et al.*, 2020a; Bayliss *et al.*, 2025):

➤ **Variaciones en el número de repeticiones de secuencias simples/cortas de ADN (SSRs, simple/short sequence repeats)** dispuestas en tandem en el genoma bacteriano. En patógenos con genomas reducidos y bajo contenido en G+C, como *Haemophilus* spp., son frecuentes las SSRs cortas (1-4 pb). Cuando el tamaño de la unidad repetida no es múltiplo de 3, variaciones en el número de SSRs en regiones codificantes desplazan el marco de lectura generando variantes funcionales nuevas o truncadas. En regiones no codificantes, el número variable de SSRs actúa como un elemento regulador de la expresión génica aguas abajo.

➤ **Reordenamientos del ADN mediante la recombinación conservativa de sitios específicos (CSSR, conservative site-specific recombination)**, que generan inversiones o transposiciones reversibles. El fragmento de ADN a invertir o transponer contiene secuencias codificantes o no codificantes, flanqueadas por dos secuencias de ADN específicas que recombinan por acción de recombinasas. La naturaleza de

estas secuencias determina el resultado: si son repeticiones invertidas, producen una inversión; si son repeticiones directas, se genera la transposición de la secuencia.

➤ **Modificaciones epigenéticas mediante metilación del ADN bacteriano en regiones promotoras o reguladoras**, que alteran su interacción con la ARN polimerasa, con factores de transcripción, o con otras proteínas de unión al ADN involucradas en procesos de replicación y/o reparación. Las metiltransferasas de ADN pueden ser solitarias, como Dam, o formar parte de sistemas de restricción-modificación. En algunos casos, la expresión de algunas metiltransferasas está a su vez regulada por variación de fase a través de un número variable de SSR en su propia región codificante. Este mecanismo genera patrones diferenciales de metilación del ADN y, por tanto, expresión variable de múltiples genes que constituyen regulones de fase variable (*phasevarion*) (Phillips ZN *et al.*, 2019).

Nuestro Grupo de Investigación en el Instituto de Agrobiotecnología (IDAB-CSIC), en Navarra, trabaja desde 2010 en el estudio de las bases moleculares de la infección respiratoria por *Haemophilus influenzae*, un patobionte Gram-negativo con un papel destacado en la disbiosis pulmonar asociada a enfermedades respiratorias crónicas, como la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). La EPOC se caracteriza por un cuadro clínico de síntomas crónicos y deterioro pulmonar estructural y funcional. En este contexto, el estrés nitrosativo y la hipoxia alveolar generan microambientes con bajo contenido de O₂ y altos niveles de especies reactivas de nitrógeno que modulan las interacciones huésped-patógeno en el tejido pulmonar (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2025). Como bacteria con rango de

hospedador restringido al ser humano, *H. influenzae* ha desarrollado múltiples estrategias de pato-adaptación pulmonar, siendo la variación de fase un mecanismo clave.

Hace unos años, la **XII Reunión de nuestro Grupo Especializado de Microbiología Molecular** celebrada en Zaragoza fue clave para expandir nuestro interés pato-adaptativo a la variación de fase por metilación del ADN en *H. influenzae*. En aquel marco de discusión científica incomparable, María Antonia Sánchez-Romero evidenció el valor del análisis del metiloma como herramienta para explorar, a escala genómica, los elementos epigenéticos que regulan la expresión génica (Sánchez-Romero *et al.*, 2020b). Las sesiones de " póster con cervezas" y la tenacidad (o cabezonería) de las interesadas aquí firmantes, sentaron las bases de una colaboración orientada a desentrañar la regulación epigenómica de la expresión génica en *H. influenzae* durante la infección respiratoria, mediante integración de aproximaciones multi-ómicas en cepas de referencia y aislados clínicos.

En este trabajo (Gil-Campillo *et al.*, 2025), un escrutinio basado en mutagénesis por transposición y secuenciación masiva (Tn-seq) realizado en un modelo de infección pulmonar murina, reveló que *H. influenzae* requiere el gen *dam* para sobrevivir *in vivo*. Para analizar este control epigenético de la infección, empleamos dos estrategias complementarias:

➤ **Análisis de metilación de adenina en motivos GATC por la metiltransferasa Dam, a escala genómica, mediante secuenciación a tiempo real de una única molécula de ADN (SMRT-seq)**. Este enfoque permitió identificar hipo-metilación en la región reguladora-promotora de la chaperona

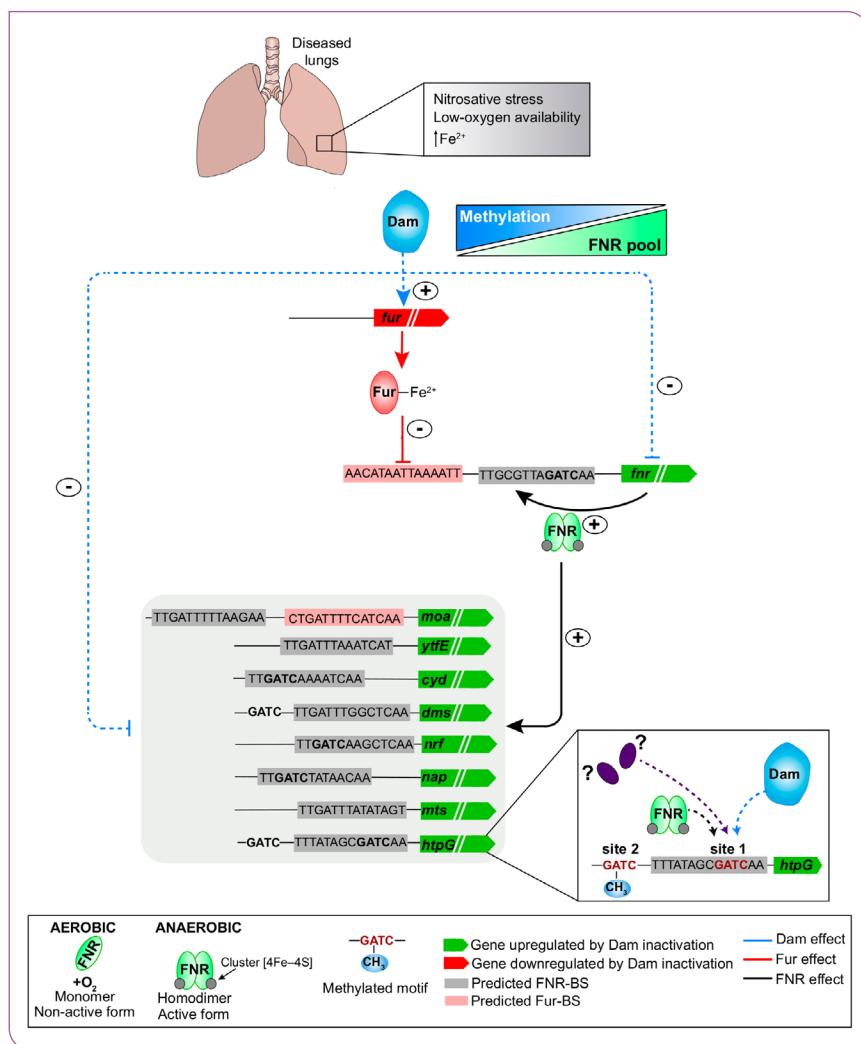


Figura 1. El control epigenético de Fur y FNR contribuye a la supervivencia de *H. influenzae* en nichos con bajo contenido de oxígeno durante la infección pulmonar. La metilación por Dam activa la expresión de fur, que a su vez reprime la expresión de fnr, existiendo una correlación inversa entre metilación Dam y la expresión de fnr y su regulón. La mayor disponibilidad de Fe²⁺ intracelular en nichos hipóxicos favorece la formación de Fe²⁺-Fur, la unión de Fur a ADN, y la represión de genes diana como fnr. Por su parte, FNR requiere condiciones de baja disponibilidad de oxígeno para adoptar su conformación activa, y así activar su propia expresión y la de un regulón implicado en la defensa anaerobia de *H. influenzae* frente a estrés nitrosativo.

Este trabajo también describe el primer caso de variación fenotípica en una población de células isogénicas de *H. influenzae* controlada por metilación, ejemplificada por hipo-metilación en la región promotora-reguladora de *htpG*, un gen asociado a la respuesta bacteriana a estrés térmico. La regulación de esta chaperona resulta de una interacción multifactorial que combina metilación, bloqueo de la metilación por factor(es) aún desconocido(s) y la acción de FNR.

Código de colores. Regulón FNR, cuadro gris claro; motivos GATC (negrita); posibles motivos de unión de FNR (cuadro gris); posibles motivos de unión de Fur (cuadro rojo); regulación epigenética propuesta, flechas discontinuas azules; regulación por factores de transcripción propuesta, flechas rojas (Fur) y negras (FNR).

HtpG, constituyendo el primer caso descrito de heterogeneidad fenotípica controlada por metilación variable de motivos GATC en *H. influenzae*.

➤ Análisis de expresión génica diferencial mediante secuenciación de ARN (ARN-seq). La comparación entre cepas silvestre y *dam* carente de la proteína Dam,

reveló una nueva red regulatoria donde la metilación Dam activa la expresión de Fur, el regulador principal de la homeostasis de hierro. A su vez, Fur reprime la expresión de FNR, el regulador de la fumarato nitroso reducida y, por consiguiente, del regulón FNR, encargado de la defensa bacteriana frente al estrés nitrosativo en ecosistemas anaerobios.

Esta red multifactorial, donde la interacción entre Fur y FNR está modulada epigenéticamente por la metiltransferasa Dam, regula la supervivencia de *H. influenzae* en nichos pato-fisiológicos caracterizados por estrés nitrosativo y baja disponibilidad de oxígeno, como los pulmones de pacientes con EPOC (**Figura 1**). En resumen, este trabajo ilustra un ejemplo paradigmático de pato-adaptación bacteriana en el que la variación de fase mediada por metilación confiere plasticidad fenotípica y favorece la supervivencia de un patógeno bacteriano clínicamente relevante en un entorno hostil.

Referencias

Bayliss CD, Clark JL, van der Woude MW. 100+ years of phase variation: the premier bacterial bet-hedging phenomenon. *Microbiology* (Reading). 2025 Feb;171(2):001537.

Gil-Campillo C, Euba B, Rodríguez-Arce I, et al. Epigenetic control of the ferric uptake regulator (Fur) and fumarate nitrate reductase (FNR) master regulatory proteins contributes to *Haemophilus influenzae* survival during lung infection. *mBio*. 2025;16(8):e0135525.

Phillips ZN, Husna AU, Jennings MP, Seib KL, Attack JM. Phasevarions of bacterial pathogens - phase-variable epigenetic regulators evolving from restriction-modification systems. *Microbiology* (Reading). 2019 Sep;165(9):917-928.

Rodríguez-Pérez J, Andreu-Martínez R, Daza R, et al. Oxidative stress and inflammation in hypoxic respiratory diseases and their comorbidities: molecular insights and diagnostic advances in COPD and sleep apnea. *Antioxidants* (Basel). 2025 Jul 8;14(7):839.

Sánchez-Romero MA, Casadesús J. The bacterial epigenome. *Nat Rev Microbiol*. 2020; Jan;18(1):7-20.

Sánchez-Romero MA, Olivenza DR, Gutiérrez G, Casadesús J. Contribution of DNA adenine methylation to gene expression heterogeneity in *Salmonella enterica*. *Nucleic Acids Res*. 2020 Dec 2;48(21):11857-11867.