



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

IDENTIFICACIÓN DE LA REGIÓN RESPONSABLE DE LA LAXITUD DEL FACTOR SIGMA 70 DE *Rhizobium etli*

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

ORLANDO SANTILLÁN GODÍNEZ

**TUTOR: DR. GUILLERMO DÁVILA RAMOS
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS
LABORATORIO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN SOBRE EL GENOMA HUMANO**

CUERNAVACA, MOR.

AGOSTO DEL 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIA

A mis padres, Eva Judith y Salvador, por enseñarme que el trabajo duro y la perseverancia rinden frutos más dulces si se les cultiva con paciencia.

A mis hermanos, Alejandra y René, por su cariño e incesante apoyo fraternal.

AGRADECIMIENTOS

INSTITUCIONALES

Este trabajo fue patrocinado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, número de proyecto 154833) y la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM. Al CONACYT por la beca doctoral (CVU 268929) otorgada.

PERSONALES

A mis tutores, Dr. Guillermo Dávila y Dr. Miguel Angel Ramírez por su invaluable apoyo (académico y personal) durante todo mi doctorado.

Al Dr. Víctor González, Rosa I. Santamaría, Patricia Bustos, Soledad Juárez, Dr. César Rodríguez, Walter Santana, Enrique Mora, Valeria Ramírez, Enrique Paz, Alejandro Morales y Daniela E. Ledezma por su valiosa asistencia técnica.

A los doctores Christian Sohlenkamp, Miguel Ángel Cevallos, Susana Brom, Bruno Contreras y Mario Soberón por sus invaluable recomendaciones para la discusión y revisión crítica del proyecto.

A la Mtra. Mari Carmen Armijo, Mtro. Agustín Parada, C. P. Pablo Castorena, Mari Romana, Dr. David Romero, Dra. Isabel López y Dra. María de Lourdes Girard por su constante apoyo administrativo.

Our greatest weakness lies in giving up. The most certain way to succeed is always to try just
one more time... T. A. Edison

ÍNDICE DE CONTENIDO

Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Cita	iv
Índice de contenido	v
Resumen	
Introducción	
Transcripción bacteriana	1
Etapas de la transcripción	1
RNA polimerasa	2
Promotor	2
Factor sigma	3
Modelo de estudio	
<i>Rhizobium etli</i>	4
Laxitud transcripcional en factores sigma primarios	5
Hipótesis	7
Resultados	7
Discusión	26
Conclusiones	31
Perspectivas	32
Información del artículo publicado	32
Materiales & Métodos	33
Apéndices	46
Material Suplementario	51
Figuras y Tablas Suplementarias	53
Literatura citada	65

RESUMEN

Los factores sigma primarios son proteínas esenciales para la supervivencia bacteriana pues transcriben la mayoría de genes relacionados con el mantenimiento celular (*housekeeping*). RpoD, el factor σ primario de *Escherichia coli* (γ -proteobacteria) reconoce un promotor consenso cuya secuencia es altamente similar a los consensos reportados en algunas especies de α -proteobacterias. A pesar de esta similitud, RpoD es incapaz de transcribir usando promotores pertenecientes a esta segunda clase taxonómica. Por su parte, SigA (48% de identidad, 98% de cobertura vs RpoD), el factor sigma primario de *Rhizobium etli* (α -proteobacteria), es competente para transcribir utilizando los promotores RpoD-dependientes probados hasta el momento. Hemos nombrado a este fenómeno *laxitud transcripcional*. Durante esta investigación se demostró que SigA complementa parcialmente el fenotipo termosensible del alelo RpoD285 perteneciente a la cepa UQ285 de *E. coli*. Asimismo, se identificó a la región σ_4 de SigA como la responsable por esta habilidad de complementación. Dieciséis de 74 residuos (21.6%) dentro de las regiones σ_4 son variables entre RpoD y SigA. Mutaciones en estas posiciones mejoran significativamente la capacidad de SigA para complementar el fenotipo de *E. coli* UQ285. Seis de los residuos mencionados forman parte del motivo hélice-vuelta-hélice (HTH) que interactúa con el promotor. El resto de residuos variables se localizan en posiciones inexploradas previamente, específicamente dentro de las primeras dos α -hélices de la región σ_4 . Ninguno de estos diez residuos parece interactuar directamente con el promotor, en lugar de eso, se propone que contribuyen de forma alostérica al correcto posicionamiento y/o plegamiento del motivo HTH. Posiblemente la laxitud transcripcional sea un mecanismo que asegura la transcripción a pesar del potencial efecto negativo de las mutaciones ocurridas naturalmente en los promotores endógenos y/o a partir de secuencias de DNA transferidas horizontalmente; dicha estrategia pudo ayudar a la supervivencia y adaptación de las α -proteobacterias.

INTRODUCCIÓN

Transcripción bacteriana

Uno de los procesos biológicos más importantes para los organismos vivos es la expresión de su material genético. La expresión genética, permite a las células y organismos adaptarse a las condiciones medio-ambientales, diferenciarse y/o contender con estreses (Watson et al., 2013).

Este proceso está conformado por dos mecanismos: transcripción del DNA y traducción del RNA mensajero; sin embargo, no todos los genes que se transcriben serán traducidos sino únicamente aquellos codificantes para proteína. En bacterias, la transcripción es la fase de la expresión genética con la mayor diversidad de mecanismos de regulación (Watson et al., 2013).

Dicho de otra manera, la transcripción es la síntesis de RNA a partir de una secuencia templado de DNA y se divide en tres fases: inicio, elongación y terminación (Brown, 2002; Gezvain y Landick, 2004). La enzima encargada de realizarla es conocida como RNA polimerasa DNA dependiente (RNAP) y suele encontrarse en dos conformaciones distintas: *core* (E) u holoenzima ($E\sigma$). La primera configuración representa el núcleo catalítico mientras que la segunda es la forma activada (requerida para el inicio de la transcripción) de la enzima.

Etapas de la transcripción

Inicio

Durante esta etapa, ocurre lo siguiente: 1) el promotor es reconocido por la $E\sigma$ (complejo cerrado); 2) la $E\sigma$ inicia la desnaturalización del DNA entre el extremo 3' del promotor y la posición +2, formando la burbuja de transcripción (complejo abierto); 3) la $E\sigma$ entra en síntesis abortiva (ciclos de síntesis-liberación de secuencias cortas de 2-8 nucleótidos) de RNA y, 4) una vez que la $E\sigma$ es capaz de vencer la síntesis abortiva, el E libera al factor sigma y prosigue la polimerización del RNA (Browning y Busby, 2004). Este último paso, constituye el complejo de elongación de la transcripción (TEC).

Elongación

Es la fase de síntesis progresiva de RNA. Al igual que el DNA, el RNA se polimeriza en dirección 5' – 3', es decir, los nucleótidos se van agregando al extremo 3'-OH de la cadena naciente (Korzheva y Mustaev, 2001). Típicamente, durante esta fase sólo el E sintetiza al RNA, aunque existe evidencia de que la E σ también puede hacerlo (Harden et al., 2016).

Terminación

La finalidad de esta fase es liberar al E, DNA templado y al RNA recién sintetizado. Se conocen dos mecanismos de terminación: Rho-dependiente e intrínseco. En el primero, la proteína Rho se une a sus sitios de reconocimiento (*rut*) en el RNA y separa el complejo E:DNA:RNA. El segundo se logra mediante la formación de estructuras secundarias tipo tallo-asa en el RNA transcrito (Ray-Soni et al., 2016).

RNA Polimerasa

Las subunidades que conforman la RNAP son: 2 α , β , β' , ω y factor sigma. Las primeras cinco proteínas conforman al *core* (E) (Watson et al., 2013; Lee et al., 2012). En cambio, la E σ se forma por la unión del E a un factor sigma, razón por la cual, todas las holoenzimas de una misma especie bacteriana disponen del mismo núcleo catalítico. La E σ es la única conformación de la RNAP capaz de iniciar transcripción de forma secuencia-específica (Lee et al., 2012).

Promotor

El promotor es la secuencia de DNA que contiene los sitios de unión reconocidos por el factor sigma (Haugen et al., 2008). En el caso específico de la enterobacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) encontramos que posee siete factores sigma distintos (RpoD, RpoS, RpoH, RpoF, RpoE, Fecl y RpoN) y cada uno de ellos interactúa de forma secuencia específica con su propio conjunto de promotores (Feklistov et al., 2014; Gruber y Gross, 2003).

En esta bacteria, la secuencia consenso del promotor dependiente de RpoD es: 5' – TTGACA (caja -35) – espaciador [17±2 bp] – TATAAT (caja -10) – 3'. Las cajas se numeraron con base en su posición relativa respecto al primer nucleótido transcrito (TSS o +1) (Harley y Reynolds, 1987; Hawley y McClure, 1983; Shimada et al., 2014; Shultzaberger et al., 2007).

Factor sigma

El factor sigma es la subunidad disociable de la RNAP (Watson et al., 2013); entre sus funciones importantes está la de reconocer al promotor, orquestando así los cambios en la expresión genética (Wösten, 1998).

Los factores sigma se dividen en dos grandes familias: σ^{70} y σ^{54} . Los superíndices denotan el peso molecular de las proteínas en cuestión (referencia *E. coli*). La familia σ^{70} está conformada por cuatro grupos: el Grupo 1 contiene a todos los factores sigma primarios (conocidos como RpoD, σ^{70} o housekeeping- σ). Estas proteínas son esenciales para la supervivencia bacteriana. Los grupos 2 a 4 están conformados por los factores sigma alternativos (RpoS, RpoH, RpoF, RpoE y Fecl) quienes transcriben los regulones especializados: fase estacionaria, estrés por calor, síntesis flagelar y estrés extracitoplasmático. Por su parte, la familia σ^{54} está integrada por RpoN quien transcribe genes relacionados con el metabolismo de nitrógeno (Gruber y Gross, 2003).

Los factores sigma primarios se componen de cuatro regiones conservadas (σ 1-4) y una no conservada (σ NCR) (Gruber y Gross, 2003). Para RpoD de *E. coli* se han descubierto funciones para cada región, por ejemplo: σ 1 (junto con σ 4) participan en la autoinhibición (Camarero et al., 2002) así como unión a la secuencia discriminadora del promotor (Haugen et al., 2006) y la inducción de cambios estructurales en $E\sigma$ necesarios para el escape del promotor. Esta región es dispensable para la unión al E (Baldwin y Dombroski, 2001; Bochkareva y Zenkin, 2013; Dombroski et al., 1992; Wilson y Dombroski, 1997).

En el caso de σ NCR, ayuda al escape del promotor e inhibe el pausado transcripcional dependiente de RpoD (Baldwin et al., 2002; Leibman y Hochschild, 2007); en cambio σ 2 colabora en la unión al E (Lesley y Burgess, 1989; Liao et al., 2002), desnaturalización del DNA (Panaghie et al., 2000; Schroeder et al., 2007) y reconocimiento de la caja -10 (Feklistov y Darst, 2011; Huang et al., 1997; Waldburger et al., 1990). Es, σ 3, quien interviene en el reconocimiento del elemento -10 extendido (Sanderson et al., 2003), la unión al nucleótido iniciador (Murakami, 2002), la síntesis abortiva (Hernandez et al., 1996) y el escape del promotor (Kulbachinskiy y Mustaev, 2006).

Finalmente, la región σ 4 se encarga de reconocer la caja -35 (Dove et al., 2003; Gardella et al., 1989) y de interactuar con reguladores transcripcionales como el 6S RNA (Klocko y Wassarman, 2009). Casi todas las regiones del factor sigma poseen una parte que interactúa con el E (Nagai y Shimamoto, 1997). En *E. coli*, RpoD es el factor sigma con la mayor afinidad de unión al E (Maeda et al., 2000).

MODELO DE ESTUDIO

Rhizobium etli

R. etli pertenece a la clase filogenética de las α -proteobacterias. Puede ser encontrada como una bacteria de vida libre en el suelo o como simbiote al interior de nódulos fijadores de nitrógeno en el frijol (*Phaseolus vulgaris*).

El genoma de *R. etli* cepa CFN42 (61.5% G+C) consiste de un cromosoma circular y seis mega-plásmidos (González et al., 2006).

Las α -proteobacterias presentan una amplia variedad de estilos de vida y tamaños del genoma; muchos de sus miembros poseen una estructura genómica multi-replicón (Capela et al., 2001; Galibert et al., 2001; González et al., 2006; Mackenzie et al., 2001; Strnad et al., 2010; Wood et al., 2001). Adicionalmente, *R. etli* posee un alto número de factores sigma (un sigma primario, dos copias de *rpoH*, dos copias de *rpoN* y dieciocho genes del grupo de factores sigma extracitoplasmáticos) característica compartida con otras bacterias fijadoras de

nitrógeno como *Bradyrhizobium japonicum*, *Mesorhizobium loti* y *Sinorhizobium meliloti* (Mittenhuber, 2002).

Laxitud transcripcional en factores sigma primarios

El gen del factor sigma primario de *R. etli* (*sigA*) codifica para una proteína de 685 aminoácidos con un peso molecular teórico de 77.18 kDa. La secuencia de SigA posee 48% de identidad (98% cobertura) con respecto a RpoD.

SigA es capaz de transcribir a partir de los promotores RpoD-dependientes de *E. coli* probados hasta el momento (Ramírez-Romero et al., 2006), fenómeno que hemos denominado *laxitud transcripcional*.

Este comportamiento ha sido observado también en otras α -proteobacterias, como son: *Caulobacter crescentus*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus* y *Sinorhizobium meliloti* (Cullen et al., 1997; Karls et al., 1993; MacLellan et al., 2006; Malakooti et al., 1995).

Por otro lado, los promotores dependientes de los factores sigma primarios de estas α -proteobacterias no son transcritos por RpoD de *E. coli*. Estas observaciones sugieren diferencias funcionales entre las maquinarias de transcripción de *E. coli* y las α -proteobacterias, posiblemente durante el reconocimiento del promotor por parte de los factores sigma primarios respectivos.

El estudio de las bases moleculares de la transcripción en organismos, con importancia agrícola, como *R. etli* es fundamental, porque puede proveer información para futuras aplicaciones biotecnológicas, como por ejemplo: lograr una mejor expresión heteróloga de genes que contribuyan a la fijación biológica del nitrógeno, diseñar promotores que aseguren la transcripción en otras α -proteobacterias simbióticas e ingeniería genética de factores sigma para volverlos laxos.

Nosotros elegimos a SigA de *R. etli* como modelo de estudio de la laxitud transcripcional en α -proteobacterias.

Con la finalidad de identificar las regiones de SigA, involucradas en la laxitud transcripcional, se construyó una librería de genes quiméricos usando a RpoD y SigA (Figura 1). Se obtuvieron catorce quimeras no redundantes y posteriormente, se probó su capacidad para complementar el fenotipo termosensible del alelo RpoD285 (factor sigma primario) de *E. coli* UQ285 (Harris et al., 1978; Hu y Gross, 1983, 1988).

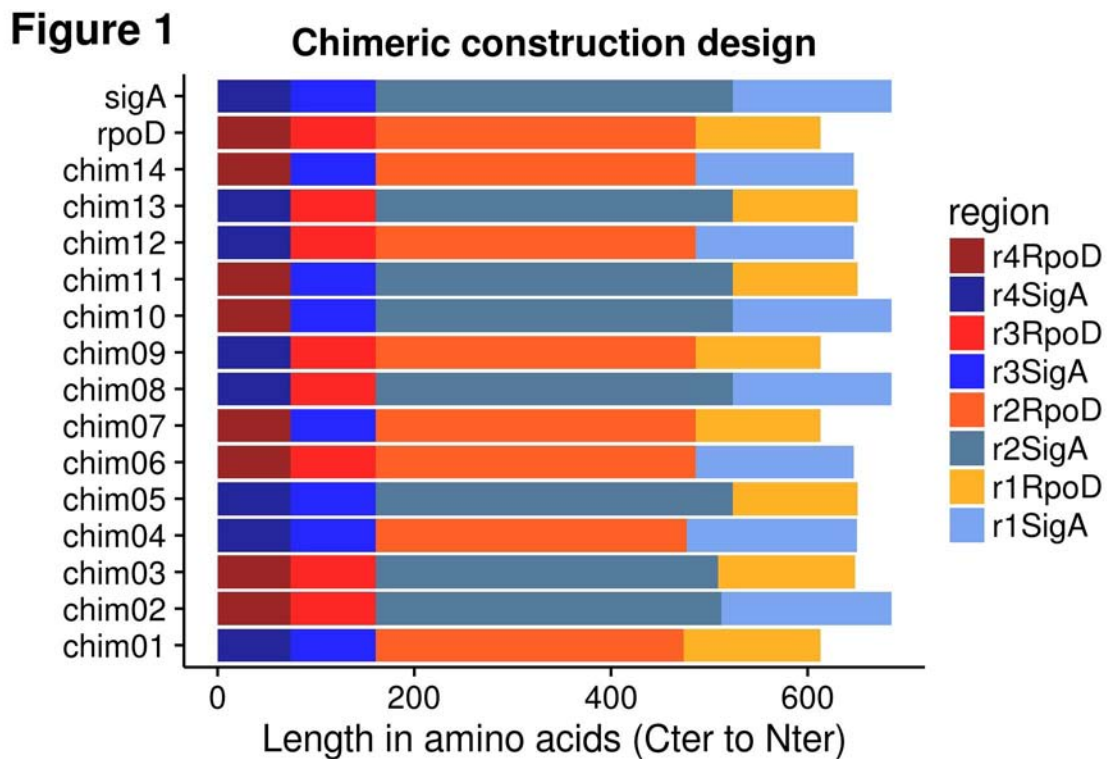


Figura 1. Los miembros de la librería pRK415sigma se orientaron en sentido C_{ter} a N_{ter} debido a que las regiones σ_3 y σ_4 poseen la misma longitud en RpoD y SigA.

Los resultados obtenidos en nuestra investigación, muestran que siempre que la region σ_4 de SigA está presente, la quimera portadora es capaz de sustentar el crecimiento de *E. coli rpoD285* a la temperatura restrictiva (42°C) así como mutar los residuos localizados en las regiones variables (contenidos en las primeras dos α -hélices) mejora significativamente la habilidad de SigA para complementar el

fenotipo de *E. coli rpoD285*. Se propone que estas α -hélices participan en el correcto plegamiento y/o posicionamiento del motivo HTH de la region $\sigma 4$ de SigA. El motivo HTH es responsable del reconocimiento de la caja -35 del promotor.

HIPÓTESIS

Dado que SigA es un factor sigma primario laxo, entonces el intercambio de sus regiones por aquellas correspondientes a RpoD (factor sigma primario estricto) permitirá identificar la región responsable debido al fenómeno transcripcional.

RESULTADOS

SigA de *R. etli* es más laxo que RpoD de *E. coli* durante el reconocimiento de promotores

La comparación funcional de SigA vs RpoD reveló que el segundo es más estricto en el reconocimiento de promotores (Ramírez-Romero et al., 2006), lo cual se refleja en un promotor consenso más robusto (Tabla 1). El caso contrario es observado entre algunas α -proteobacterias, donde factores sigma primarios laxos permiten una mayor variación en la secuencia del promotor (Cullen et al., 1997; Karls et al., 1993; MacLellan et al., 2006; Malakooti et al., 1995; Ramírez-Romero et al., 2006).

Promotores consenso de factores sigma primarios				
Especie	Caja -35	Espaciador (nt)	Caja -10	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	TTGACA	15 – 19	TATAAT	Hawley et al. 1983
<i>Rhizobium etli</i>	CTTGAC	16 – 23	TATNNT	Ramírez-Romero et al. 2006
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	CTTGAC	~ 17	CTATAT	McLellan et al. 2006
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	TTGAC		Rico en AT	Cullen et al. 1997
<i>Caulobacter crescentus</i>	TTGACGS	10 – 14	GCTANAWC	Malakooti et al. 1995

Tabla 1. Abreviatura de las bases nitrogenadas: N (A, T, C o G); S (C o G); W (A o T); A (adenina); T (timina), C (citosina) y G (guanina).

Estas observaciones sugieren que RpoD no será capaz de reconocer promotores dependientes de SigA o lo hará de forma ineficiente.

Con la finalidad de evaluar esta propuesta, se construyeron vectores reporteros (pBBR1MCS5 y pUC19) donde la proteína roja fluorescente (RFP) se puso bajo el control de tres promotores diferentes: el consenso de RpoD (P_{Eco}), el consenso de SigA (P_{Ret}) y un promotor carente de espaciador y caja -10 (P_{less}). Las construcciones pBBP $_{Eco}$ y pBBP $_{Ret}$ confirieron color rojo a sus cepas portadoras en *R. etli*, mientras que las trans-conjugantes pBBP $_{less}$ permanecieron blancas (Figura 2).

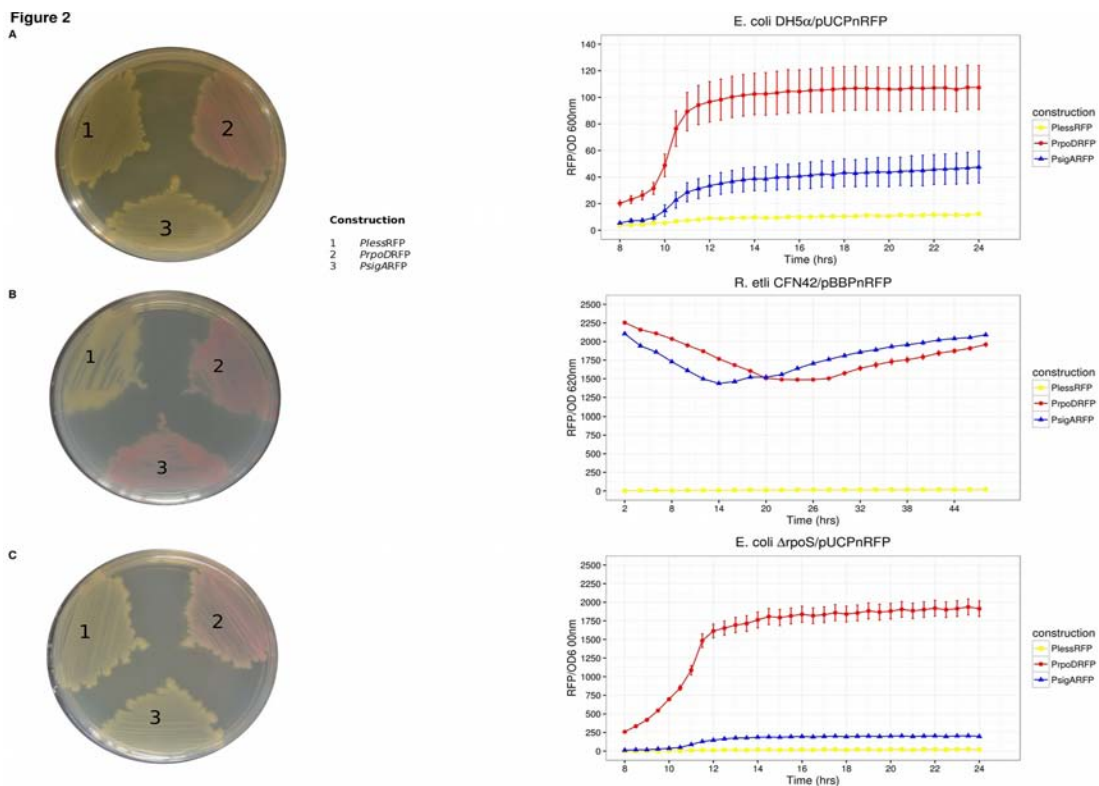


Figura 2. La actividad de la RFP estandarizada (RFP/OD) se evaluó en medios líquido y sólido. Las cepas hospederas utilizadas fueron: **A)** *Escherichia coli* DH5α, **B)** *Rhizobium etli* CFN42 y, **C)** *Escherichia coli* $\Delta rpoS$. La organización de las fusiones transcripcionales crecidas en cajas petri fue la siguiente: **1)** P_{less} RFP, **2)** P_{Eco} RFP y, **3)** P_{Ret} RFP. Los vectores reporteros usados fueron pUC19PnRFP para ambas cepas de *E. coli* y pBBR1MCS5PnRFP para *R. etli*. Los experimentos se repitieron tres veces para cada construcción. Las barras de error denotan el SEM.

Estos resultados muestran que SigA es capaz de reconocer al promotor consenso de RpoD en las condiciones probadas.

Por otro lado, en *E. coli* DH5 α observamos que únicamente pUCP_{Eco} confirió color rojo a las colonias transformantes. Tanto pUCP_{Ret} como pUCP_{less} presentaron colonias blancas (Figura 2). Con el propósito de excluir una posible participación de RpoS, el factor sigma alternativo cuyo promotor consenso muestra una similitud parcial con respecto al de RpoD (Peano et al., 2015), se repitieron los experimentos con las tres construcciones reporteras usando una cepa de *E. coli* Δ rpoS (*E. coli* BW28465) (Zhou et al., 2003). Las actividades de RFP en *E. coli* Δ rpoS revelaron buena correlación con los resultados obtenidos en DH5 α (Kendall $\tau = 0.72$, *Pvalue* = 0.0091; Figura 2).

Nuestros resultados confirman observaciones previas y sustentan lo siguiente: 1) RpoD es incapaz de promover la transcripción a partir del promotor consenso de SigA; 2) SigA es un factor sigma primario con un amplio rango de reconocimiento de promotores (laxitud transcripcional) y, 3) los factores sigma alternativos de *E. coli* son incapaces de reconocer los promotores consenso de RpoD y SigA.

SigA complementa el fenotipo termosensible de *E. coli* rpoD285

Resultados previos demostraron que la fusión transcripcional de 33 promotores SigA dependientes, no son reconocidos por RpoD de *E. coli*. Sin embargo, el promotor del operón de lactosa de *E. coli* (*P_{lac}*) es transcrito eficientemente por SigA, sugiriendo que éste es un factor sigma primario laxo (Ramírez-Romero et al., 2006).

Si esta observación es aplicable para el resto de promotores RpoD dependientes, entonces SigA debe ser capaz de sustituir a RpoD *in vivo*.

Para probar esta propuesta, usamos la cepa *E. coli* rpoD285, la cual posee un alelo termosensible de RpoD (con una delección de 42 bp dentro de la región σ NCR) (Hu

y Gross, 1983). Esta cepa es incapaz de crecer a 42°C (temperatura restrictiva) debido a la desnaturalización de su factor sigma primario. A 30°C (temperatura permisiva) *E. coli rpoD285* crece normalmente (Harris et al., 1978; Hu y Gross, 1983).

RpoD y SigA fueron clonados independientemente en el vector pRK415 donde son expresados a partir del P_{lac} . Las construcciones pRK415*rpoD* (pRK*rpoD*), pRK415*sigA* (pRK*sigA*) y el vector fueron introducidos a *E. coli rpoD285* mediante electroporación.

Todas las construcciones crecieron a la temperatura permisiva, presentando fases lag, exponencial y estacionaria. La densidad óptica (OD_{600nm}) máxima alcanzada, en fase estacionaria, fue de 0.8 – 1.0 (Figura 3. A). A la temperatura restrictiva, solamente las construcciones portadoras de los factores sigma primarios presentaron crecimiento con OD_{600nm} de 0.7 – 0.9 (Figura 3. B).

Estos experimentos fueron repetidos usando otra cepa con un RpoD termosensible, *E. coli CAG1 (E. coli rpoD800)* (Liebke et al., 1980) (Figura 3. C-D). Los resultados obtenidos, en ambas cepas termosensibles (*rpoD285* y *rpoD800*), mostraron un nivel de correlación moderado (Kendall $\tau = 0.669$, $Pvalue = 2.38 \times 10^{-7}$). Las OD_{600nm} máximas para los experimentos con *E. coli rpoD800* fueron: de 1.0–1.2 a 30°C y 0.75–1.0 a 42°C.

Ninguna de las cepas de *E. coli, rpoD285* y *rpoD800*, fue complementada por el vector a la temperatura restrictiva. Estos resultados demuestran que SigA es apto para complementar el fenotipo termosensible de las mutantes de RpoD de *E. coli*.

Figure 3

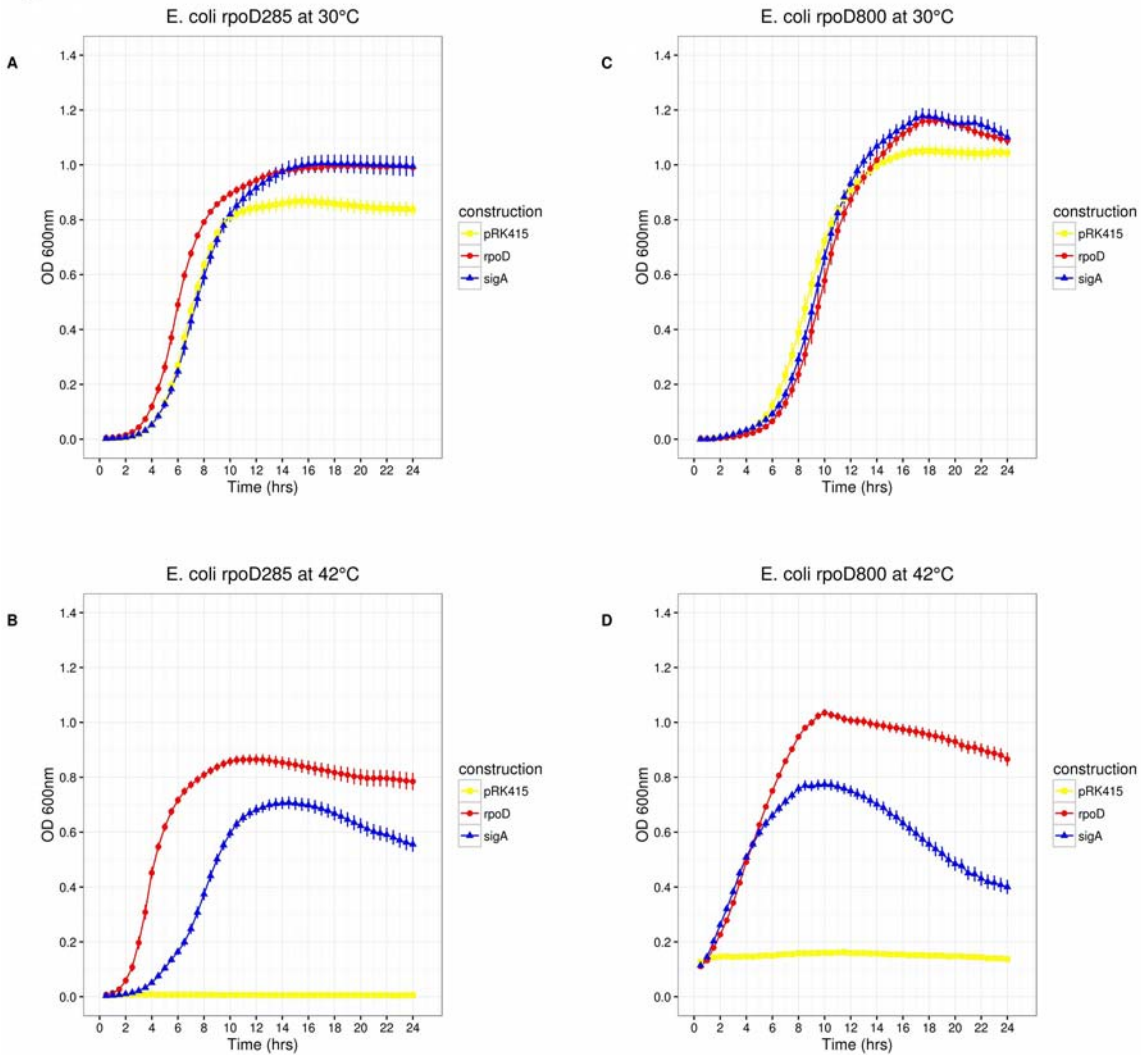


Figura 3. Experimentos de complementación en *Escherichia coli* *rpoD285* y *rpoD800*. Simbología: pRK415 (cuadros amarillos), pRK*rpoD* (círculos rojos) y pRK*sigA* (triángulos azules). **A)** *E. coli* *rpoD285* a 30°C. **B)** *E. coli* *rpoD285* a 42°C. **C)** *E. coli* *rpoD800* a 30°C. **D)** *E. coli* *rpoD800* a 42°C. Número de repeticiones: 20 para *E. coli* *rpoD285* y 10 para *E. coli* *rpoD800*. Las barras de error denotan el SEM.

Construcción de quimeras por intercambio de regiones entre RpoD y SigA

Siendo el objetivo de identificar las regiones de SigA, involucradas en la laxitud transcripcional, se construyó un banco de quimeras intercambiando las regiones de RpoD y SigA (Figura 1). Cada gen quimérico se diseñó manteniendo el marco de

lectura de los genes silvestres, se ensamblaron y clonaron en el vector de expresión pRK415. Posteriormente, se evaluó la competencia de estas quimeras para sustentar el crecimiento de *E. coli rpoD285*.

IDENTIFICACIÓN DE LAS REGIONES DE SigA QUE CONFIEREN LAXITUD TRANSCRIPCIONAL

1. Sustitución de regiones en SigA (una a la vez)

1.1. Las regiones $\sigma 1$ y σ NCR no participan en la laxitud transcripcional

Los resultados descritos anteriormente sugieren que SigA es apto para transcribir genes indispensables para el crecimiento de *E. coli*.

La comparación de los dominios encargados del reconocimiento de promotores $\sigma 2.4$ y $\sigma 4.2$ entre RpoD y SigA mostró que éstos son idénticos y diferentes en tres aminoácidos, respectivamente. Las regiones de SigA $\sigma 1$ y σ NCR, son en conjunto, 72 residuos más grandes que sus contrapartes de RpoD, lo que las vuelve candidatos potenciales para explicar la laxitud transcripcional. Las quimeras 4 y 5 (pRKq04 y pRKq05) representan este diseño (Figura 1).

Los experimentos de complementación en *E. coli rpoD285*, usando estas quimeras, mostraron lo siguiente: 1) A 30°C ambas construcciones presentaron fases claras de crecimiento, alcanzando OD_{600nm} máximas de 0.9–1.0 (Figura 4. A) y, 2) A 42°C las dos quimeras complementaron el crecimiento, presentando OD_{600nm} máximas de 0.8–0.9 (Figura 4. B). De acuerdo con estos resultados, las regiones $\sigma 1$ y σ NCR no contienen elementos ni funciones relacionadas con la laxitud transcripcional.

Figure 4

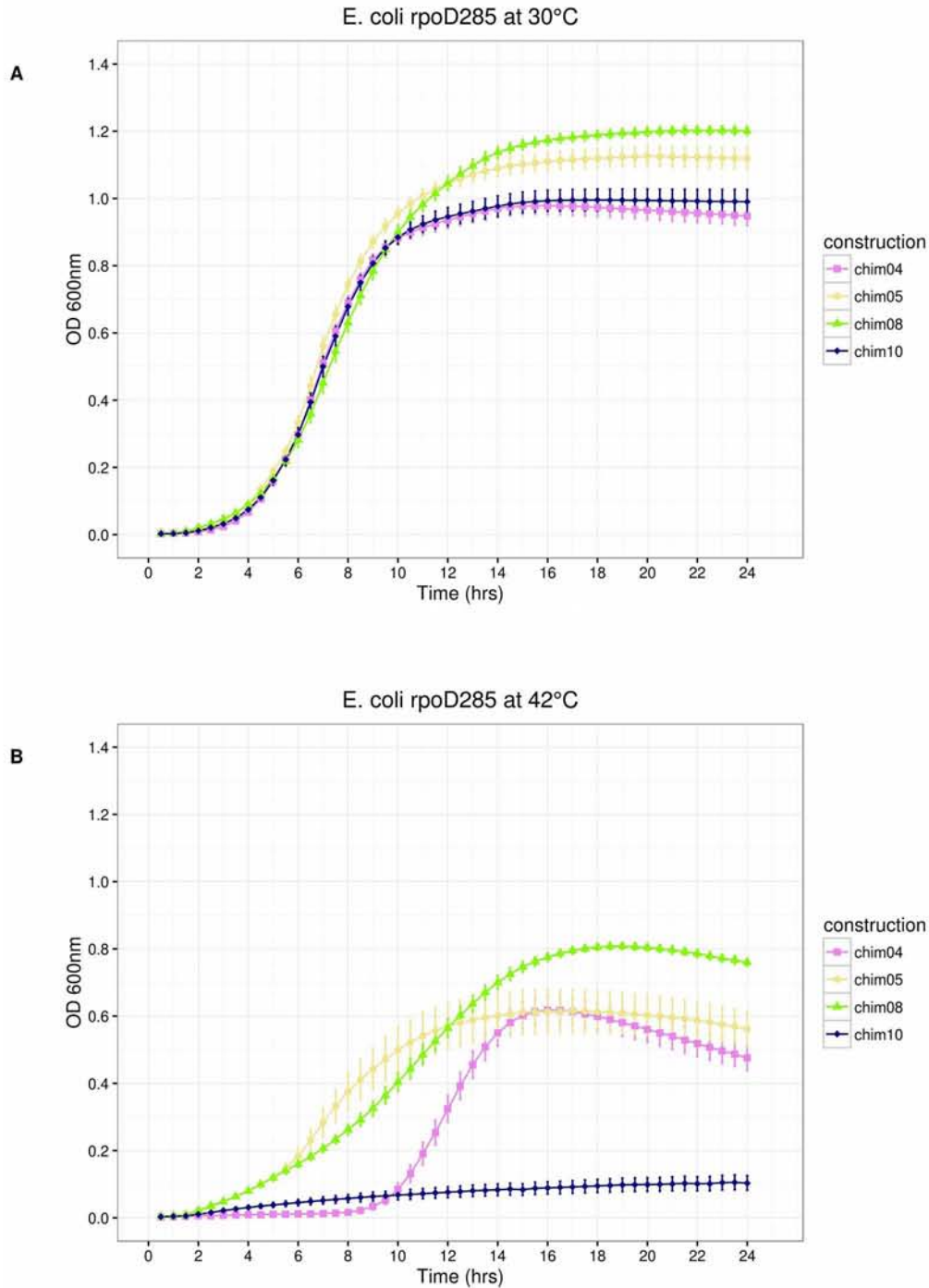


Figura 4. Experimentos de complementación en *Escherichia coli rpoD285*. Simbología: pRKq04 (cuadrados violeta), pRKq05 (círculos khaki), pRKq08 (triángulos verdes) y pRKq10 (diamantes azul marino). Temperaturas de crecimiento: **A)** 30°C y **B)** 42°C. Cada construcción fue muestreada 20 veces. Las barras de error denotan el SEM.

1.2. Las regiones $\sigma 2$ y $\sigma 3$ no intervienen en la laxitud transcripcional

Dado que la región $\sigma 2$ es 100% idéntica (100% de cobertura) entre RpoD y SigA, descartamos su participación en la laxitud transcripcional. Los resultados observados con pRKq04 soportan esta decisión (ver sección anterior). Asimismo, las regiones σNCR y $\sigma 2$ forman parte del mismo dominio en RpoD (Gruber y Gross, 2003). Por esta razón, las quimeras 5 a 14 fueron diseñadas considerando ambas regiones como una sola (denominada $\sigma 2$).

La construcción pRKq08 intercambió la región $\sigma 3$ de SigA, complementando el crecimiento de *E. coli rpoD285* para ambas temperaturas. Las OD_{600nm} máximas fueron de 1.2 a 30°C y 0.8 a 42°C (Figura 4). Debido a que pRKq08 pudo complementar el fenotipo de *E. coli rpoD285* a la temperatura restrictiva, se concluyó que la región $\sigma 3$ de SigA no contribuye a la laxitud transcripcional.

1.3. La región $\sigma 4$ de SigA puede estar involucrada en la laxitud transcripcional

La quimera pRKq10 intercambió la región $\sigma 4$ de SigA por la de RpoD. Los experimentos de complementación en *E. coli rpoD285* revelaron lo siguiente: 1) A 30°C esta construcción mostró crecimiento normal, alcanzando una OD_{600nm} máxima de 1.0 (Figura 4. A) y, 2) A 42°C pRKq10 no logró sustentar el crecimiento celular (Figura 4. B). Esta observación sugiere que la región $\sigma 4$ de SigA interviene en la laxitud transcripcional.

Con la finalidad de descartar posibles interacciones entre las regiones de SigA, que colaboren en la laxitud transcripcional, se reemplazaron simultáneamente dos y tres regiones en el resto de construcciones de la librería pRK415sigma (Figura 1).

2. Sustitución de regiones en SigA (dos a la vez)

En esta parte de la librería pRK415sigma se intercambió cada par de regiones de acuerdo al diseño *in silico* (Figura 1). Se obtuvieron seis construcciones. Los pares de regiones de SigA reemplazados fueron: $\sigma 1/\sigma 2$ (pRKq01), $\sigma 1/\sigma 3$ (pRKq013), $\sigma 1/\sigma 4$ (pRKq011), $\sigma 2/\sigma 3$ (pRKq012), $\sigma 2/\sigma 4$ (pRKq014) y $\sigma 3/\sigma 4$ (pRKq02).

Todas estas construcciones crecieron normalmente a la temperatura permisiva, mostrando fases claras de crecimiento. Las OD_{600nm} máximas fueron de 0.8–1.1 (Figura 5. A).

A la temperatura restrictiva, las construcciones pRKq02 y pRKq11 no sustentaron el crecimiento de *E. coli rpoD285*. El resto de construcciones (pRKq01, q12, q13 y q14) complementaron el fenotipo termosensible exhibiendo OD_{600nm} máximas de 0.6–0.8 (Figura 5. B).

Debido a los resultados anteriores, se esperaba que todas aquellas construcciones pareadas en las que se sustituyera la región $\sigma 4$ de SigA (pRKq02, q11 y q14) fueran incapaces de complementar el fenotipo de *E. coli rpoD285*. Sin embargo, la construcción pRKq14 sustentó el crecimiento de la mutante termosensible de *E. coli*.

Una explicación posible para ello es que la quimera 14 posee ambos dominios de RpoD encargados del reconocimiento del promotor ($\sigma 2$ y $\sigma 4$) y que su estructura terciaria es altamente parecida a RpoD, volviéndola completamente funcional en *E. coli*.

Figure 5

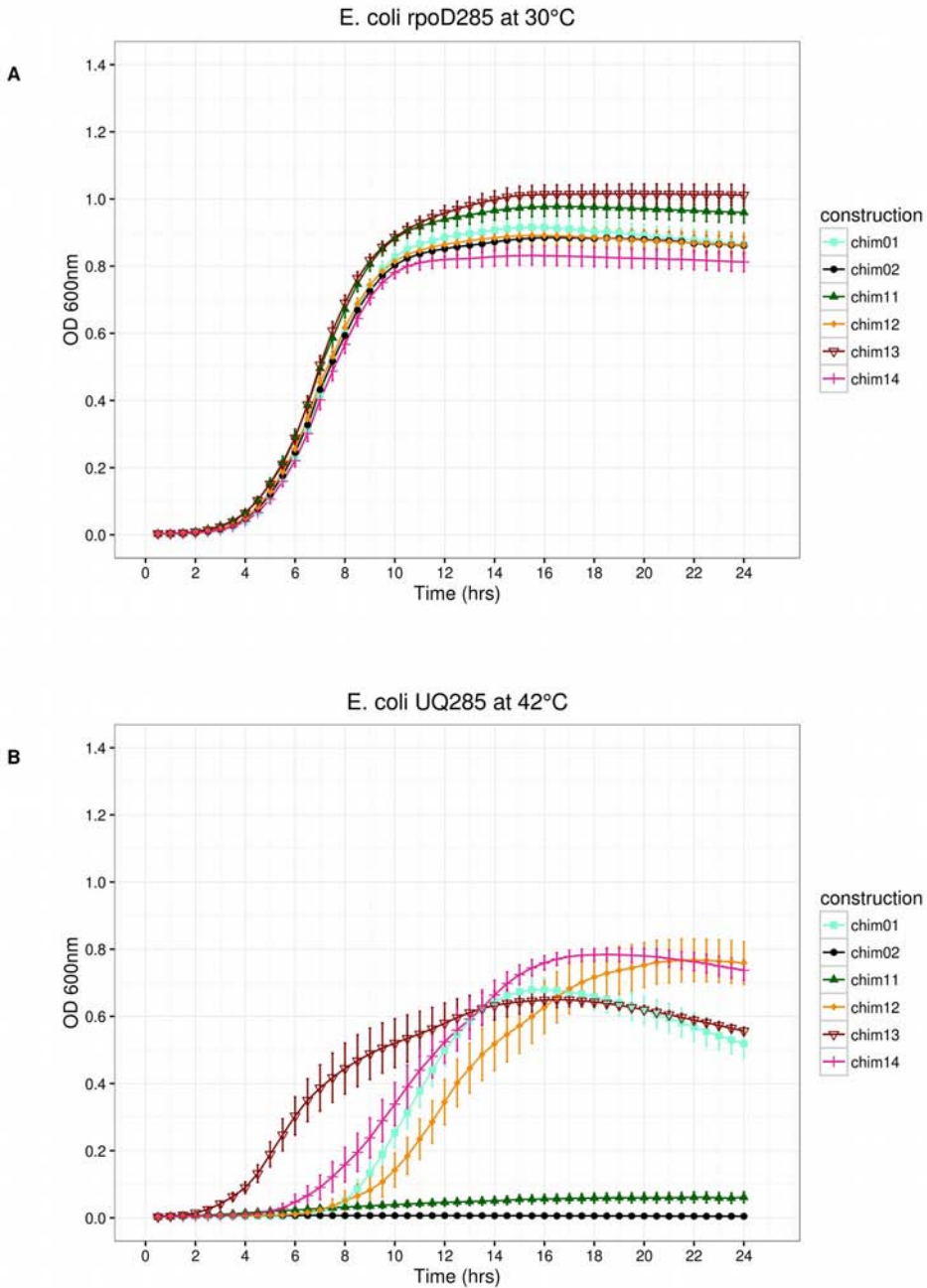


Figura 5. Experimentos de complementación en *Escherichia coli rpoD285*. Simbología: pRKq01 (cuadrados azul turquesa), pRKq02 (círculos negros), pRKq11 (triángulos verdes), pRKq12 (diamantes anaranjados), pRKq13 (triángulos invertidos abiertos rojos) y pRKq14 (cruces rosas). Temperaturas de crecimiento: **A)** 30°C y **B)** 42°C. Cada construcción fue muestreada 20 veces. Las barras de error denotan el SEM.

3. Sustitución de regiones en SigA (tres a la vez)

Para el resto de la librería, pRK415sigma, se intercambiaron simultáneamente tres regiones de SigA por cada construcción. Las regiones reemplazadas fueron: $\sigma 1/\sigma 2/\sigma 3$ (pRKq09), $\sigma 1/\sigma 2/\sigma 4$ (pRKq07), $\sigma 1/\sigma 3/\sigma 4$ (pRKq03) y $\sigma 2/\sigma 3/\sigma 4$ (pRKq06). A la temperatura permisiva todas las construcciones presentaron crecimiento normal, logrando OD_{600nm} máximas de 1.0–1.1 (Figura 6. A). A la temperatura restrictiva, únicamente las construcciones pRKq06 y q09 sustentaron el crecimiento de *E. coli rpoD285* (Figura 6. B).

Todos aquellos miembros de la librería pRK415sigma, que complementaron el crecimiento de *E. coli rpoD25* a 42°C, presentaron tendencia al decaimiento en la OD_{600nm} después de alcanzar el crecimiento celular máximo (Figuras 3–7, sección B). Este fenómeno puede ocurrir debido a la acumulación de productos secundarios derivados del metabolismo celular bajo estrés calórico prolongado (24 hrs a 42°C). La situación descrita puede provocar arresto y/o muerte celular en las condiciones de crecimiento usadas.

Las construcciones pRKq06, q07 y q14 poseen ambos dominios de RpoD responsables del reconocimiento del promotor ($\sigma 2$ y $\sigma 4$). Únicamente pRKq07 fue incompetente para complementar el fenotipo de *E. coli rpoD285* a la temperatura restrictiva, a pesar de ser 96% idéntica a RpoD (100% de cobertura). Esta incapacidad sugiere que la combinación particular de regiones, presentes en la quimera 7, le impiden funcionar de manera adecuada, posiblemente volviéndola deficiente en la unión al *core* de la RNAP, en la transición de la síntesis abortiva de RNA hacia la fase de elongación o debido al plegamiento incorrecto de toda la proteína.

Por los resultados anteriormente expuestos, la presencia de quimeras incapaces de complementar el fenotipo termosensible de *E. coli rpoD285* sugiere que puede existir incompatibilidad entre algunas regiones de RpoD y SigA, quizás debido a

interacciones alostéricas entre dichas regiones.

Figure 6

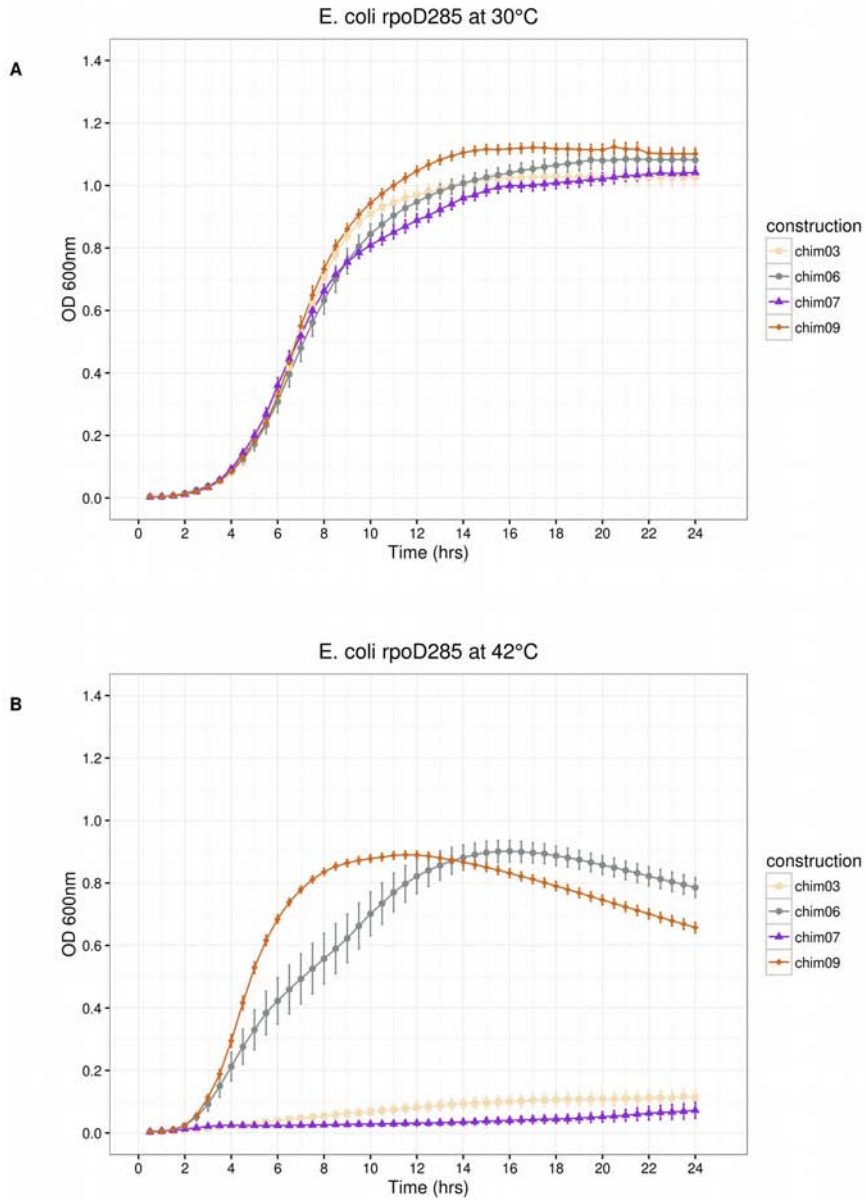


Figura 6. Experimentos de complementación en *Escherichia coli rpoD285*. Simbología: pRKq03 (cuadrados trigo), pRKq06 (círculos grises), pRKq07 (triángulos violeta) y pRKq09 (diamantes chocolate). Temperaturas de crecimiento: **A)** 30°C y, **B)** 42°C. Cada construcción fue muestreada 20 veces. Las barras de error denotan el SEM.

Los factores sigma silvestres y las quimeras son traducidos en *E. coli rpoD285*

Para determinar si los miembros de la librería pRK415sigma son traducidos en *E. coli rpoD285*, se extrajo proteína total de catorce construcciones crecidas a la temperatura restrictiva.

Las construcciones pRKq02, q03, q07, q10 y q11, al igual que el vector, fueron descartadas de este ensayo debido a su incapacidad para complementar el fenotipo termosensible.

Las muestras se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, se electro-transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron en el anticuerpo primario anti-RpoD (2G10, Creative Biomart Cat# CABT-36751ME, RRID:AB_11443551).

El anticuerpo primario fue producido contra los residuos 470 a 486 (subregión 3.1) de RpoD de *E. coli*; no obstante es capaz de reconocer otros factores sigma primarios pertenecientes a distintas especies bacterianas (Batut et al., 1991; Bowman y Kranz, 1998; Breyer et al., 1997; Cullen et al., 1997; Severinova et al., 1996).

Los ensayos de Western Blot mostraron bandas correspondientes al peso molecular de RpoD (carril 2, *E. coli* E σ^D) en los carriles pertenecientes a los miembros de la librería pRK415sigma que complementaron el fenotipo termosensible (Figura Suplementaria 1). Estos resultados sugieren que las construcciones son transcritas y traducidas en *E. coli rpoD285*.

Los ensayos de unidades formadoras de colonia (CFU) corroboran las curvas de crecimiento

Para confirmar los datos obtenidos con las curvas de crecimiento, se determinaron las CFUs de los miembros de la librería pRK415sigma. Los resultados de CFU fueron concordantes con aquellos de la OD_{600nm}, esto es, únicamente las construcciones que presentaron crecimiento en medio líquido lo hicieron también en medio sólido (Figura Suplementaria 2).

Para mayor información favor de dirigirse a la sección Material Suplementario.

La región $\sigma 4$ de SigA participa en la laxitud transcripcional

Las curvas y parámetros de crecimiento revelaron que cada vez que la región $\sigma 4$ de SigA se encuentra presente, la quimera portadora es competente para sustentar el crecimiento de *E. coli rpoD285* a la temperatura restrictiva (Tabla 2). Este fenómeno no fue observado con ninguna otra región de SigA, es decir, las regiones $\sigma 1$, $\sigma 2$ y $\sigma 3$ se encuentran tanto en quimeras que complementan como en aquellas que no lo hacen.

Análisis de complementación de <i>Escherichia coli rpoD285</i>		
Factor Sigma/Región	Supervivencia a 42°C	
	Si	No
SigA $\sigma 1$	Quim04, 06, 08, 12, 14	Quim02, 10
SigA $\sigma 2$	Quim05,08,13	Quim02,03,10,11
SigA $\sigma 3$	Quim01,04,05,14	Quim07,10,11
SigA $\sigma 4$	Quim01,04,05,08,09,12,13	0
RpoD $\sigma 1$	Quim01,05,09,13	Quim03,07,11
RpoD $\sigma 2$	Quim01,04,06,09,12,14	Quim07
RpoD $\sigma 3$	Quim06,08,09,12,13	Quim02, 03
RpoD $\sigma 4$	Quim06, 14	Quim02,03,07,10,11
SigA $\sigma 1, \sigma 2$	Quim08	Quim02, 10
SigA $\sigma 1, \sigma 3$	Quim04, 14	Quim10
SigA $\sigma 1, \sigma 4$	Quim04, 08, 12	0
SigA $\sigma 2, \sigma 3$	Quim05	Quim10, 11
SigA $\sigma 2, \sigma 4$	Quim05, 08, 13	0
SigA $\sigma 3, \sigma 4$	Quim01, 04, 05	0
RpoD $\sigma 1, \sigma 2$	Quim01, 09	Quim07
RpoD $\sigma 1, \sigma 3$	Quim09, 13	Quim03
RpoD $\sigma 1, \sigma 4$	0	Quim03, 07, 11
RpoD $\sigma 2, \sigma 3$	Quim06, 09, 12	0
RpoD $\sigma 2, \sigma 4$	Quim06, 14	Quim07
RpoD $\sigma 3, \sigma 4$	Quim06	Quim02, 03

Análisis de complementación de <i>Escherichia coli rpoD285</i>		
SigA σ_1 , σ_2 , σ_3	0	Quim10
SigA σ_1 , σ_2 , σ_4	Quim08	0
SigA σ_1 , σ_3 , σ_4	Quim04	0
SigA σ_2 , σ_3 , σ_4	Quim05	0
RpoD σ_1 , σ_2 , σ_3	Quim09	0
RpoD σ_1 , σ_2 , σ_4	0	Quim07
RpoD σ_1 , σ_3 , σ_4	0	Quim03
RpoD σ_2 , σ_3 , σ_4	Quim06	0

Tabla 2. Se separan las construcciones de la librería pRK415sigma quienes contienen la región especificada (primer columna) de acuerdo a su habilidad (segunda columna) o incapacidad (tercer columna) para complementar el fenotipo de *Escherichia coli rpoD285* a 42°C.

Con el objetivo de determinar la conservación de la región σ_4 entre los factores sigma primarios de α -proteobacterias, que han mostrado laxitud transcripcional, se alinearon las secuencias de aminoácidos de los factores sigma primarios de *R. etli*, *S. meliloti*, *R. capsulatus*, *R. sphaeroides*, *C. crescentus* y *E. coli* usando MUSCLE (Figura Suplementaria 3). El alineamiento evidenció dieciséis cambios de los 74 residuos (21.6%) que conforman la región σ_4 entre los factores sigma primarios analizados. Se seleccionaron estos dieciséis sitios variables para un análisis mutacional en SigA.

Mutantes en la región σ_4 de SigA

Se mutaron los dieciséis residuos variables dentro de la región σ_4 de SigA cambiándolos por los correspondientes en RpoD. Estos cambios, en la secuencia, deben mejorar la capacidad de complementación de SigA en *E. coli*. La predicción de estructura secundaria (Psipred) ubicó estas mutaciones dentro de cuatro α -hélices y algunas de sus regiones *coil-loop* asociadas. La primer mutante (*sigAm01*) contiene cinco cambios dentro de la primer α -hélice de la región σ_4 ; la

segunda mutante (*sigAm02*) introdujo cuatro sustituciones en la segunda α -hélice y finalmente, la tercer mutante (*sigAm03*) posee siete mutaciones a lo largo del motivo HTH.

El motivo HTH de la región $\sigma 4$ es responsable del reconocimiento de la caja -35 del promotor. Los codones de SigA localizados en las posiciones variables fueron cambiados por sus correspondientes de RpoD, generando así las mutantes *in silico*.

Las secuencias mutantes y el DNA plasmídico del vector pRK415 fueron enviados a GenScript (New Jersey, USA) para ser sintetizadas químicamente y clonadas en el vector de expresión. Las construcciones pRK*sigAm01–03* fueron los últimos miembros de la librería pRK415sigma en ser construidos.

Las curvas de crecimiento y los ensayos de CFU fueron repetidos usando las construcciones mutantes de SigA (en el fondo genético *E. coli rpoD285*). En ambas temperaturas, las mutantes de SigA mostraron fases de crecimiento normales (Figura 7). Las OD_{600nm} máximas fueron de 1.1–1.3 para la temperatura permisiva y 0.81–0.86 para la temperatura restrictiva. Todas las mutantes de SigA fueron competentes para complementar el fenotipo de *E. coli rpoD285* y presentaron decaimiento de la OD_{600nm} durante la fase estacionaria (al igual que otros miembros de la librería pRK415sigma) (Figura 7).

Figure 7

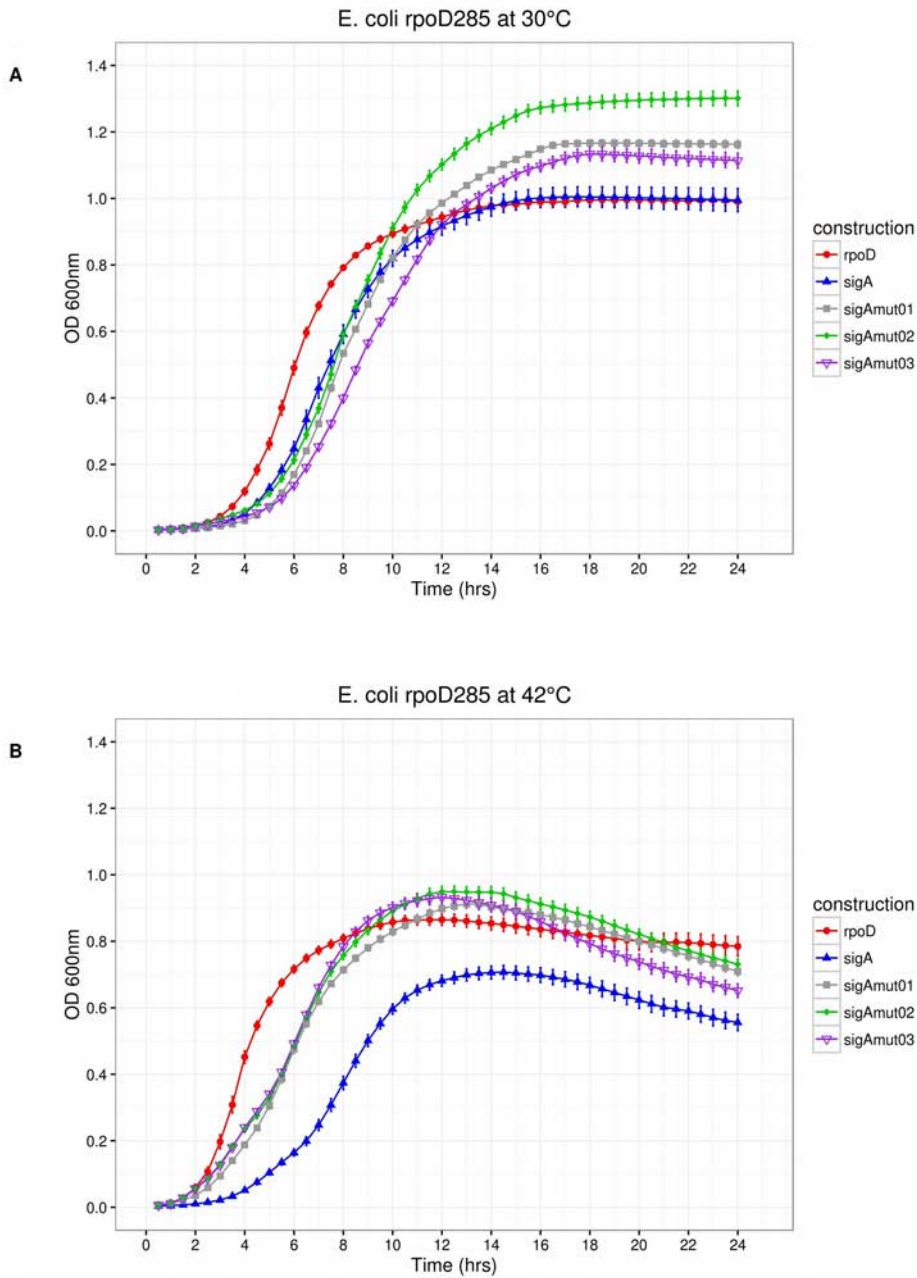


Figura 7. Experimentos de complementación en *Escherichia coli rpoD285*. Simbología: pRK*rpoD* (círculos rojos), pRK*sigA* (triángulos azules), pRK*sigAm01* (cuadrados grises), pRK*sigAm02* (diamantes verdes) y pRK*sigAm03* (triángulos invertidos abiertos morado). Temperaturas de crecimiento: **A)** 30°C y **B)** 42°C. Cada construcción fue muestreada 20 veces. Las barras de error denotan el SEM.

El cálculo de parámetros descriptivos y las pruebas estadísticas aplicadas a las mutantes de SigA se realizaron como se describió en secciones previas. Las tres construcciones pRKsigAm01-03 se localizaron dentro del grupo de crecimiento-alto junto a RpoD (Tabla 3 y Figura Suplementaria 4).

Agrupación de los miembros de la librería pRK415sigma									
No.	Nombre	Descripción	Supervivencia 42°C	Integral Promedio			BLASTP		Gpo Crec
				30°C	42°C	42°/30° C	% Iden	% Cob	
1	RpoD	σ 1RpoD- σ 2RpoD- σ 3RpoD- σ 4RpoD	Si	17.38	16.46	0.947	100	100	Alto
2	SigAm03	σ 1SigA- σ 2SigA- σ 3SigA- σ 4SigAm3	Si	16.54	15.40	0.931	49	98	Alto
3	SigAm01	σ 1SigA- σ 2SigA- σ 3SigA- σ 4SigAm1	Si	17.67	15.32	0.867	48	98	Alto
4	Quim06	σ 1SigA- σ 2RpoD- σ 3RpoD- σ 4RpoD	Si	17.31	14.94	0.863	88	98	Alto
5	Quim09	σ 1RpoD- σ 2RpoD- σ 3RpoD- σ 4SigA	Si	18.53	15.73	0.849	98	99	Alto
6	SigAm02	σ 1SigA- σ 2SigA- σ 3SigA- σ 4SigAm2	Si	19.78	16.08	0.813	48	98	Alto
7	Quim14	σ 1SigA- σ 2RpoD- σ 3SigA- σ 4RpoD	Si	13.95	10.36	0.743	84	98	Alto
8	SigA	σ 1SigA- σ 2SigA- σ 3SigA- σ 4SigA	Si	16.24	10.87	0.669	48	98	Medio
9	Quim13	σ 1RpoD- σ 2SigA- σ 3RpoD- σ 4SigA	Si	16.93	10.68	0.631	63	99	Medio
10	Quim08	σ 1SigA- σ 2SigA- σ 3RpoD- σ 4SigA	Si	18.93	11.51	0.608	51	98	Medio
11	Quim12	σ 1SigA- σ 2RpoD- σ 3RpoD- σ 4SigA	Si	14.90	8.6	0.577	85	98	Medio
12	Quim05	σ 1RpoD- σ 2SigA- σ 3SigA- σ 4SigA	Si	18.62	10.55	0.567	59	99	Medio
13	Quim01	σ 1RpoD- σ 2RpoD- σ 3SigA- σ 4SigA	Si	15.02	8.43	0.561	94	99	Medio
14	Quim04	σ 1SigA- σ 2RpoD- σ 3SigA- σ 4SigA	Si	16.41	7.02	0.428	73	98	Medio

Agrupación de los miembros de la librería pRK415sigma									
15	Quim10	$\sigma 1$ SigA- $\sigma 2$ SigA- $\sigma 3$ SigA- $\sigma 4$ RpoD	No	16.68	1.79	0.108	50	98	Nulo
16	Quim03	$\sigma 1$ RpoD- $\sigma 2$ SigA- $\sigma 3$ RpoD- $\sigma 4$ RpoD	No	17.26	1.79	0.104	72	100	Nulo
17	Quim11	$\sigma 1$ RpoD- $\sigma 2$ SigA- $\sigma 3$ SigA- $\sigma 4$ RpoD	No	16.40	1.00	0.061	61	100	Nulo
18	Quim07	$\sigma 1$ RpoD- $\sigma 2$ RpoD- $\sigma 3$ SigA- $\sigma 4$ RpoD	No	16.74	0.87	0.052	96	100	Nulo
19	Quim02	$\sigma 1$ SigA- $\sigma 2$ SigA- $\sigma 3$ RpoD- $\sigma 4$ RpoD	No	14.75	0.20	0.014	54	98	Nulo
20	pRK415	vector	No	14.63	0.19	0.013	NA	NA	Nulo

Tabla 3. Los valores del parámetro integral representan el área bajo la curva de cada miembro de la librería pRK415sigma. Para determinar los porcentajes de identidad y cobertura de las construcciones, se usó RpoD como *query* durante la instrumentación de BLASTP. Los grupos de crecimiento se designaron de acuerdo a los resultados del *clustering* jerárquico. Abreviaturas: NA (no aplica), %Iden (porcentaje de identidad), %Cob (porcentaje de cobertura) y, Gpo Crec (grupo de crecimiento).

Todas las mutaciones mejoraron la habilidad de complementación de SigA con respecto a la proteína silvestre, demostrando que los cambios en la secuencia de la región $\sigma 4$ confieren adaptación funcional de este factor sigma primario a las necesidades transcripcionales del hospedero, en este caso *E. coli*.

Por otro lado, esta especialización podría comprometer la capacidad de SigA para transcribir los promotores SigA dependientes en *R. etli*.

Para probar esta posibilidad, cada uno de los miembros de la librería pRK415sigma y pUCP_{Ret} fueron co-transformados en *E. coli* DH5 α . Ninguna de las colonias transformantes mostró coloración roja en ninguna de las ocasiones (este experimento se repitió tres veces de forma independiente) incluso, el control positivo (DH5 α /pRKsigA/pUCP_{Ret}) presentó colonias blancas únicamente.

Estos resultados explican que las interacciones entre el *core* de la RNAP de *E. coli*, el factor sigma primario de *R. etli* y el promotor consenso de SigA no son suficientemente adecuadas para sustentar la transcripción del gen reportero en *E.*

coli.

Análisis de las curvas de crecimiento (librería pRK415sigma)

Este análisis fue realizado mediante modelado matemático usando la función gcFitModel del paquete grofit (Kahm et al., 2010) del lenguaje R. De esta manera, se obtuvieron parámetros descriptivos de las curvas de crecimiento como son: la longitud de la fase lag (λ), tasa de crecimiento (μ), crecimiento celular máximo (A) y área bajo la curva (integral).

Para revisar la bondad del ajuste y las pruebas estadísticas aplicadas a estos parámetros, favor de remitirse a la sección Apéndices, Material Suplementario (Figura Suplementaria 5, Tablas Suplementarias 1 y 2).

La integral fue elegida como el parámetro de comparación debido a que éste contiene a todos los demás. Una prueba de *clustering* con las integrales estandarizadas (Materiales & Métodos) permitió ordenar a los miembros de la librería pRK415sigma en tres grupos de comportamientos: crecimiento-nulo (pRKq02, q03, q07, q10, q11 y el vector); crecimiento-medio (pRKsigA, pRKq01, q04, q05, q08, q12 y q13) y, crecimiento-alto (pRKrpoD, pRKq06, q07 y q14) (Tabla 3).

Para una descripción más detallada favor de dirigirse a la sección Apéndices, (Material Suplementario y Figura Suplementaria 4).

DISCUSIÓN

El factor sigma primario de *R. etli*, SigA, es capaz de transcribir la mayoría de los promotores RpoD dependientes (*E. coli*) probados previamente (Ramírez-Romero et al., 2006), a pesar de que estas dos proteínas se localizan en clados filogenéticos claramente separados (Figura Suplementaria 6). Este comportamiento se ha observado entre otras α -proteobacterias (Cullen et al., 1997; Karls et al.,

1993; MacLellan et al., 2006; Malakooti et al., 1995). Dicha habilidad puede ser explicada, al menos en parte, por las demandas adaptativas derivadas de la amplia variedad de condiciones ambientales que habitan las α -proteobacterias.

En el transcurso de esta investigación se demostró que SigA complementa el fenotipo termosensible de *E. coli rpoD285* a la temperatura restrictiva de crecimiento (42°C); dicho fenómeno ha sido llamado *laxitud transcripcional*. Además, se observó que la maquinaria de transcripción de *R. etli* puede reconocer al promotor consenso de RpoD. Los resultados determinan que las condiciones se cumplen en *E. coli rpoD285*: 1) SigA se transcribe y traduce, 2) SigA se pliega correctamente, adquiriendo una estructura funcional, 3) SigA es capaz de interactuar con el core de la RNAP de *E. coli* y formar la holoenzima ($E_{Eco}\sigma^A$), 4) La holoenzima $E_{Eco}\sigma^A$ es competente para transcribir genes indispensables para la supervivencia de *E. coli* a 42°C y, 5) la holoenzima silvestre de *R. etli*, $E_{Ret}\sigma^A$ puede reconocer el promotor consenso de RpoD de *E. coli*.

Con el propósito de identificar las regiones de SigA, responsables de la laxitud transcripcional, se construyeron genes quiméricos intercambiando regiones entre SigA y RpoD. Se ensamblaron catorce quimeras distintas y se evaluó su habilidad para complementar el fenotipo termosensible de *E. coli rpoD285* (42°C). Los datos de las curvas de crecimiento se modelaron matemáticamente para obtener parámetros descriptivos de las cinéticas.

Se encontró que la región $\sigma 4$ de SigA confirió laxitud transcripcional a todas las quimeras portadoras. El alineamiento de secuencias entre RpoD de *E. coli* y factores sigma primarios de α -proteobacterias con reporte de laxitud transcripcional (Cullen et al., 1997; Karls et al., 1993; MacLellan et al., 2006; Malakooti et al., 1995; Ramírez-Romero et al., 2006) manifestó dieciséis posiciones variables dentro de la región $\sigma 4$.

La identidad de los residuos en dichas posiciones es conservada únicamente entre

las proteínas perteneciente a la clase de las α -proteobacterias (Figura Suplementaria 3).

Con base en este alineamiento y la predicción de estructura secundaria se diseñaron y construyeron tres secuencias mutantes (en la región $\sigma 4$) de SigA. A pesar de que SigA y sus mutantes presentaron los porcentajes más bajos de identidad con respecto a RpoD (de entre todos los miembros de la librería pRK415sigma), los cambios introducidos en la secuencia mejoraron significativamente la capacidad de complementación fenotípica de las mutantes de SigA (prueba U de Wilcoxon, *Pvalues*: 1.02×10^{-10} , 1.06×10^{-7} y 2.9×10^{-11}) en *E. coli rpoD285*.

Estos resultados muestran que el porcentaje de identidad a nivel de secuencia no es suficiente para predecir si un factor sigma primario presentará laxitud transcripcional.

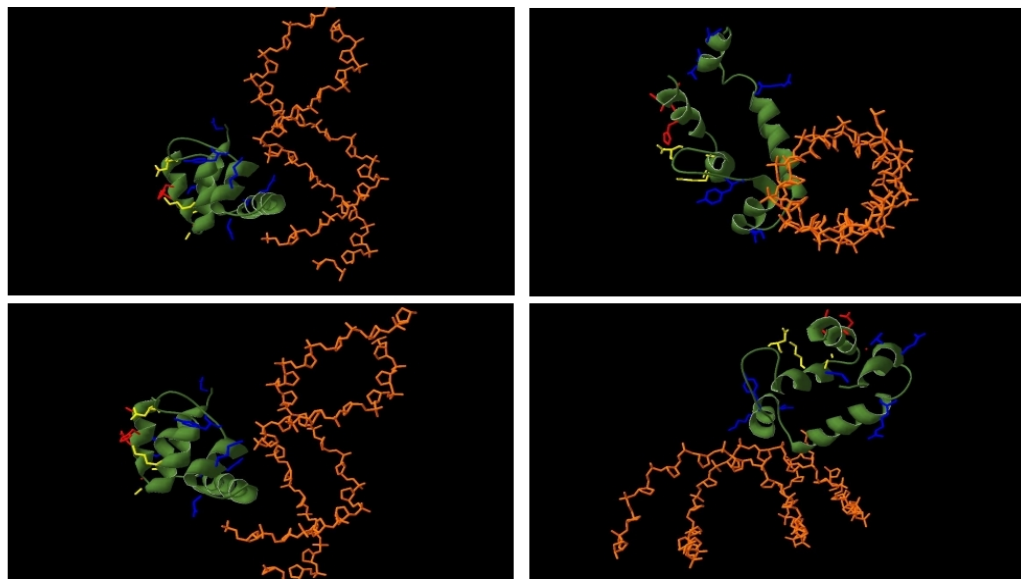
No obstante, se conocen los roles que desempeñan varios residuos de la región $\sigma 4$ de RpoD durante el inicio de la transcripción, como por ejemplo: interacción con la caja -35 del promotor (R554, R562, D570, Y571, L573, E574, E575, G577, T583, R584, E585, R586, R588, Q589, K593 y R596) (Campbell et al., 2002; Caslake et al., 1997; Dombroski et al., 1992; Dove et al., 2003; Kim et al., 1995; Hu y Gross, 1988; Siegele et al., 1988); unión al *core* de la RNAP (E555, R562, F563, I565, G577 y L598) (Sharp et al., 1999) y, plegamiento del motivo HTH (residuos 575–581 y 585–608) (Gruber y Gross, 2003).

De las dieciséis posiciones variables mutadas en SigA únicamente seis se localizan en alguna posición crítica descrita arriba (RpoD/SigA: Y571/H643, K578/Q650, D581/S653, R599/K671, E605/R677 y V606/K678). La posición Y571/H643 participa en el reconocimiento de la caja -35 del promotor (Caslake et al., 1997) mientras que las restantes cinco posiciones críticas forman parte del motivo HTH siendo K578/Q650 y D581/S653 localizadas en la primera α -hélice mientras R599/K671, E605/R677 y V606/K678 se sitúan en la segunda α -hélice.

Las posiciones variables restantes se ubican en sitios dentro de la región σ_4 que no habían sido descritos previamente. La estructura cristalográfica del complejo de inicio de la transcripción de *E. coli*, archivo PDB 4YLN (Zuo y Steitz, 2015), reveló que estas posiciones no se encuentran cerca de la caja -35 del promotor, sugiriendo que no interactúan con el DNA (Figura 8). Los cinco primeros residuos variables (A542/E614, A543/T615, H545/T617, D546/R618 y G550/S622) se hallan en la primer α -hélice de la región σ_4 (SigAm01). Los siguientes cuatro residuos se encuentran en posiciones (A553/P625, A556/E628, K557/R629 y D566/G638) ubicadas dentro de la segunda α -hélice de la región (SigAm02). Finalmente los restantes siete aminoácidos localizados en sitios variables (Y571/H643, K578/Q650, D581/S653, R599/K671, E605/R677, V606/K678 y D613/S685) forman parte del motivo HTH (SigAm03).

Figure 8

Crystal model of *E. coli* RpoD region σ_4 showing mutated positions on *R. etli* SigA homologous region



Color code

Red: SigAmut01, yellow: SigAmut02, blue: SigAmut03, orange: promoter DNA.

Figura 8. Modelo de la estructura de la región σ_4 de RpoD de *Escherichia coli*. Los aminoácidos mostrados corresponden a las posiciones 540 a 613 (verde). Asimismo, se muestra la estructura del DNA promotor, caja -35 (anaranjado). Los datos cristalográficos usados para el modelado fueron obtenidos del archivo PDB 4YLN. Las dieciséis posiciones variables encontradas a lo largo de la región σ_4 se muestran en los siguientes colores: rojo (A542, A543, H545, D546 y G550), amarillo (A553, A556, K557 y D566) y azul (Y571, K578, D581, R599, E605, V606 y D613).

Conforme a lo esperado, la mutante SigAm03 fue la mejor complementando el fenotipo de *E. coli rpoD285* a la temperatura restrictiva. SigAm01 y SigAm02 también incrementaron significativamente la capacidad de complementación con respecto a SigA (Tabla 3).

Estos resultados implican que las primeras dos α -hélices son necesarias para el funcionamiento de la región σ_4 , probablemente cooperan al plegamiento correcto de este dominio y son tan esenciales como el motivo HTH.

En esta investigación se demostró que la región σ_4 de SigA está involucrada en la laxitud transcripcional, al menos entre los factores sigma primarios de α -proteobacterias. Además, los cambios en la secuencia, dentro de esta región, mejoran la capacidad transcripcional de las mutantes de SigA, adaptándolas al organismo hospedero. Esta mejoría puede lograrse mutando residuos clave localizados dentro de las primeras dos α -hélices de la región σ_4 a pesar de que ninguna de estas estructuras secundarias parezca interactuar directamente con el DNA promotor.

La comparación entre los promotores consenso de *E. coli* y las α -proteobacterias (con factores sigma primarios laxos) revelaron que las secuencias correspondientes a la caja -35 están fuertemente conservadas mientras que las pertenecientes a la caja -10 muestran un alto grado de variación para esta clase filogenética (Tabla 1). Tales observaciones respaldan la relevancia de la región σ_4 en el fenómeno de laxitud transcripcional reportado en α -proteobacterias.

Se propone que los factores sigma primarios, pertenecientes a especies bacterianas de la clase de las α -proteobacterias, dependen principalmente de la región σ_4 para iniciar la transcripción. Esta región, puede ser mutada con la finalidad de mejorar la adaptación funcional del factor sigma primario a su organismo hospedero. Las primeras dos α -hélices de la región σ_4 , pueden ayudar a plegar y posicionar correctamente al motivo HTH de manera que el

reconocimiento de la caja -35 ocurra eficientemente.

También se propone que los factores sigma primarios de α -proteobacterias dependen predominantemente de localizar e interactuar con la caja -35 del promotor durante la formación del complejo cerrado (inicio de la transcripción). La interacción entre la caja -35 y la región $\sigma 4$ ancla a la $E\sigma$ en el promotor, el tiempo suficiente para lograr formar la burbuja de transcripción (cuando el DNA se desnaturaliza), disminuyendo así la necesidad de una caja -10 más conservada. Mediante esta estrategia, las α -proteobacterias logran iniciar la transcripción a partir de amplia variedad de secuencias promotoras incluso de aquellas pertenecientes a otras clases filogenéticas dentro de su *Phyllum*.

La laxitud transcripcional pudo haberse originado durante la historia evolutiva de las α -proteobacterias como un mecanismo para: 1) asegurar la expresión de genes esenciales en una vasta variedad de condiciones ambientales, 2) aprovechar secuencias potencialmente benéficas adquiridas horizontalmente, 3) adaptarse y colonizar los nichos que hoy habitan y, 4) contender con el efecto de las mutaciones ocurridas naturalmente en los promotores endógenos.

CONCLUSIONES

El factor sigma primario de *Rhizobium etli* (SigA) es capaz de reconocer promotores RpoD dependientes de *Escherichia coli* (laxitud transcripcional), siendo la región $\sigma 4$ de SigA crucial para esta capacidad. Mutaciones en las primeras dos α -hélices de esta región (localizadas en sitios inexplorados previamente) mejoran significativamente la habilidad de SigA para complementar el fenotipo termosensible de *E. coli rpoD285*. Ninguna de estas dos α -hélices parece interactuar directamente con el promotor pues los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que participan en el correcto plegamiento del dominio y/o posicionamiento del motivo HTH (encargado de reconocer al promotor).

PERSPECTIVAS

Obtener el perfil transcriptómico de algunos miembros de la librería pRK415sigma en *E. coli rpoD285*, por ejemplo: pRK*rpoD*, pRK*sigA*, pRK*sigAm01*, pRK*sigAm02* y pRK*q09* (RNAseq).

Investigar a profundidad las interacciones entre regiones de SigA y el impacto que podrían tener sobre la laxitud transcripcional.

Ampliar el muestreo de hospederos en los que SigA de *Rhizobium etli* muestra laxitud transcripcional.

Evaluar la capacidad de complementación del fenotipo termosensible de *E. coli rpoD285* usando los factores sigma primarios del resto de α -proteobacterias con reporte de laxitud transcripcional (*Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhodobacter capsulatus* y *Rhodobacter sphaeroides*).

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO PUBLICADO

Título: Region 4 of *Rhizobium etli* primary sigma factor (SigA) confers transcriptional laxity in *Escherichia coli*

Autores: Orlando Santillán, Miguel Angel Ramírez-Romero, Luis Lozano, Alberto Checa, Sergio Encarnación y Guillermo Dávila

Revista: Frontiers in Microbiology. Sección: Microbial Symbioses

DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01078>

Fecha de envío: 24 de mayo del 2016

Fecha de aceptación: 27 de junio del 2016

Fecha de publicación: 13 de julio del 2016

MATERIALES & MÉTODOS

Cepas bacterianas y plásmidos

La información relevante sobre las cepas bacterianas y plásmidos utilizados en esta investigación se muestra en la Tabla 4 (sección Apéndices).

Condiciones de crecimiento y transformación bacterianos

Todas las cepas de *E. coli* fueron crecidas en condiciones aeróbicas en medio Luria-Bertani (LB) suplementado con los antibióticos recomendados. *E. coli* DH5 α y S17 (usadas para propagación y donación de plásmidos) se crecieron a 37°C. *E. coli rpoD285* se creció a 30°C (temperatura permisiva) o a 42°C (temperatura restrictiva). *R. etli* CFN42 se cultivó a 30°C en medio Peptone-Yeast (PY) suplementado con 7mM de CaCl₂. Las concentraciones finales ($\mu\text{g ml}^{-1}$) de antibióticos fueron las siguientes: ampicilina (Amp) 100, gentamicina (Gen) 20, ácido nalidíxico (Nal) 20 y tetraciclina (Tet) 10. Cuando fue necesario, se agregó isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.5 mM. Las transformaciones bacterianas se hicieron mediante electroporación a 1.8 V, 200 Ω y 25 μF en cubetas estériles de 0.1 cm (BioRad).

Obtención y clonación de los genes codificantes para los factores sigma primarios

DNA total fue purificado de cultivos de *E. coli* DH5 α y *R. etli* CFN42, respectivamente (Sambrook y W Russell, 2001). Los oligonucleótidos *forward* incluyen sitios *Xba*I y un sitio de unión a ribosoma óptimo (RBS, 5' – AGGAGA – 3') seis pares de bases curso arriba del codón de inicio. Los oligonucleótidos *reverse* incluyen un sitio *Kpn*I. Estos oligonucleótidos fueron diseñados para amplificar únicamente la región codificante de RpoD o SigA. Después de haber sido amplificados y purificados, estos DNAs fueron clonados en el vector de expresión pRK415 entre los sitios *Kpn*I-*Xba*I. Los fragmentos clonados en pRK415 se encuentran bajo el control del promotor del operon de lactosa de *E. coli* (P_{lac}). Las

transformantes portadoras de las construcciones respectivas fueron seleccionadas en medio sólido LB/Tet crecidas a 37°C. Los oligonucleótidos, descritos previamente, fueron utilizados en la reacción final de amplificación durante la construcción de la librería de quimeras. De este modo, todos los factores sigma primarios (silvestres y quiméricos) clonados en pRK415 poseen el mismo RBS y sitios de clonación. Las primeras construcciones obtenidas fueron pRK415*rpoD* (pRK*rpoD*) y pRK415*sigA* (pRK*sigA*). Los genes silvestres fueron amplificados utilizando la DNA polimerasa Platinum *Taq* High Fidelity (Invitrogen). Las enzimas de restricción fueron obtenidas de New England Biolabs (NEB). Todas las secuencias de los oligonucleótidos se encuentran en la Tabla 5 (sección Apéndices).

Diseño *in silico* y ensamble de genes quiméricos

Las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos correspondientes a *rpoD* de *E. coli* y *sigA* de *R. etli* fueron obtenidas usando el software Artemis Genome Browser (versión 15.0.0, RRID:SCR_004267) (Rutherford et al., 2000) a partir de secuencias genómicas de *E. coli* K12 MG1655 (GenBank: NC_000913) y *R. etli* CFN42 (NC_007761) respectivamente. Las regiones de SigA fueron determinadas de acuerdo con la delimitación reportada para RpoD (Gruber y Gross, 2003) y el diseño de oligonucleótidos obedece a esta demarcación. De esta forma, catorce quimeras no redundantes fueron ensambladas intercambiando las regiones de ambos genes silvestres (Figura 1). Respetando la conformación de todo factor sigma primario, todas las quimeras poseen cuatro regiones/dominios (σ_1 - σ_2 - σ_3 - σ_4). Las regiones σ_{NCR} y σ_2 forman parte del dominio 2 en RpoD (Gruber y Gross, 2003) por esta razón, ambas regiones se consideraron como una sola (denominada como σ_2). Los alineamientos de secuencia se obtuvieron usando MUSCLE (versión 3.8.31, RRID:SCR_011812) (Edgar, 2004). El ensamble *in silico* de las quimeras se obtuvo usando *scripts ad hoc* escritos en lenguaje de programación R (version 2.15.1, R Development Core Team 2011, RRID:SCR_001905) e inspeccionados manualmente. Todos los programas

computacionales mencionados con anterioridad se instrumentaron de forma local.

Construcción de genes quiméricos

Las quimeras fueron ensambladas por tres métodos distintos: PCR de fragmentos traslapantes, recuperación plasmídica (modificado a partir de Vos y Kampinga 2008) y síntesis química. Se obtuvieron catorce quimeras. Todas las quimeras, genes silvestres y mutantes de *sigA* fueron clonados en pRK415 (Hülter y Wackernagel, 2008; Keen et al., 1988) usando las enzimas de restricción *KpnI-XbaI* (librería pRK415sigma). Todas las reacciones de PCR fueron realizadas con DNA polimerasa Platinum *Taq* High Fidelity. Las enzimas de restricción empleadas fueron obtenidas de NEB.

Ensamble de quimeras mediante recuperación plasmídica

Los dos genes silvestres, *rpoD* y *sigA*, fueron clonados independientemente en el plásmido pUC19 (pUC) (Norrander et al., 1983) entre los sitios *XbaI* y *KpnI*. Las construcciones pUC*rpoD* y pUC*sigA* fueron usadas como templado para generar los fragmentos de ensamble de quimeras. Los oligonucleótidos fueron diseñados para obtener dos fragmentos complementarios de cada construcción, separando en dos partes el gen de resistencia a ampicilina (presente en pUC) y el factor sigma clonado (dentro de la región deseada) (Vos y Kampinga, 2008). Después de la primera ronda de PCR, los fragmentos obtenidos fueron digeridos con la enzima *DpnI* (para eliminar el DNA templado) y purificados a partir de gel de agarosa (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche). De esta forma, se produjeron cuatro fragmentos: pUC*rpoD* σ 1- σ 2, pUC*rpoD* σ 3- σ 4, pUC*sigA* σ 1- σ 2 y pUC*sigA* σ 3- σ 4. Cada uno de ellos fue digerido con las enzimas *AflIII* y *SpeI* para posteriormente ligar los fragmentos complementarios (por ejemplo, para la quimera 01: pUC*rpoD* σ 1- σ 2 con pUC*sigA* σ 3- σ 4). Las reacciones de ligación se realizaron a 16°C y fueron usadas para transformar células de *E. coli* DH5 α . Las transformantes fueron seleccionadas en medio sólido LB/Amp crecidas a 37°C. Después de verificar las construcciones mediante PCR y re-digestión con *KpnI-XbaI*, las

candidatas se usaron como templado para una ronda final de amplificación. Finalmente, estos genes quiméricos fueron clonados en pRK415 entre los sitios *KpnI-XbaI*, produciendo las construcciones pRK415*quimera01* (pRKq01) y pRK415*quimera02* (pRKq02). Las transformantes fueron seleccionadas en medio sólido LB/Tet a 37°C. Todos los fragmentos de DNA se amplificaron con la DNA polimerasa Phusion High Fidelity (la cual genera productos romos de DNA). Todas las enzimas utilizadas, en esta etapa, se obtuvieron de NEB.

Ensamble de quimeras mediante síntesis química

Las secuencias de DNA correspondientes a las quimeras 03 y 04 se ensamblaron *in silico* de acuerdo a la delimitación de las regiones de RpoD (Gruber y Gross, 2003) y a las predicciones de estructura secundaria obtenidas con el programa Psipred (Buchan et al., 2013) (RRID:SCR_010246). Estas quimeras fueron sintetizadas por GenArt™ Gene Synthesis (ThermoFisher Scientific). Las secuencias de los genes quiméricos fueron re-amplificadas usando DNA polimerasa Platinum *Taq* High Fidelity, digeridas con *KpnI-XbaI* y clonadas en pRK415. Las transformantes se seleccionaron en medio sólido LB/Tet a 37°C. De esta forma, se obtuvieron las construcciones pRK45*quimera03* (pRKq03) y pRK415*quimera04* (pRKq04).

Ensamble de quimeras mediante PCR de fragmentos traslapantes

Los oligonucleótidos empleados en esta técnica poseen dos características importantes: sitio blanco de amplificación y extremo traslapante. Cada sección es de al menos 20 pares de bases (bp). El diseño de estos oligonucleótidos considera el nucleótido adicional 3'-A que la DNA polimerasa Platinum *Taq* High Fidelity puede llegar a incorporar en algunos de sus productos (Tabla 5). El proceso de ensamble consistió en: 1) amplificar cada fragmento de forma independiente, 2) purificar cada fragmento a partir de gel de agarosa (Kit purificación Roche), 3) mezclar los fragmentos purificados y realizar el PCR de ensamble en ausencia de oligonucleótidos, 4) hacer un PCR de enriquecimiento usando los oligonucleótidos

externos y, 5) purificar los genes ensamblados a partir de gel de agarosa. Posteriormente, los genes fueron digeridos con *KpnI-XbaI*, clonados en pRK415 y transformados en *E. coli* DH5 α . Las transformantes fueron seleccionadas en medio sólido LB/Tet a 37°C. Con este método se obtuvieron las quimeras 05 a 14, produciendo las construcciones pRK415*quimera05* – *quimera14* (pRK*q05* – *q14*).

Mutantes de sigA

El alineamiento de RpoD vs SigA mostró que en la region σ_4 , estas proteínas difieren únicamente en dieciséis de 74 residuos (21.6%). Los residuos variables en SigA fueron sustituidos por los correspondientes de RpoD (modificando los codones pertinentes). Se obtuvieron tres mutantes de *sigA* con un promedio de cinco sustituciones cada una. Después de la mutagénesis *in silico*, las secuencias mutadas y el DNA plasmídico de pRK415 se enviaron a GenScript (NJ, USA). GenScript sintetizó, secuenció y clonó las mutantes de *sigA* en pRK415 (pRK*sigAm01*, pRK*sigAm02* y pRK*sigAm03*).

Construcción de vectores con el gen reportero de la proteína roja fluorescente (RFP)

Las secuencias de tres promotores (consensos de RpoD y SigA más un control sin promotor) fue fusionada con el gen de la RFP (*PnRFP*). Las construcciones *PnRFP* se clonaron en dos vectores distintos, pBBR1MCS5 (Kovach et al., 1995) y pUC19 (Norrande et al., 1983). Las secuencias de los promotores consenso de RpoD (P_{Eco}) (Harley y Reynolds, 1987; Hawley y McClure, 1983; Shimada et al., 2014; Shultzaberger et al., 2007) y SigA (P_{Ret}) fueron introducidas en los oligonucleótidos *reverse*. Una secuencia intergénica, carente de promotor (del gen *pD00022*) encontrada en el genoma de *R. etli*, fue usada como templado para las reacciones de amplificación de los promotores descritos (quedando curso arriba de las secuencias promotoras). De forma independiente, la región codificante del gen de la RFP fue amplificada, agregando a su extremo 5' el RBS optimizado (5'–AGGAGA–3') y al 3' un terminador transcripcional intrínseco fuerte. El DNA

templado para la amplificación del gen de la RFP fue el plásmido pJ61002 (repositorio iGem). Los fragmentos que contienen al promotor y la RFP fueron digeridos con la enzima *EcoRI* y ligados con la ligasa de DNA T4 (NEB). Después de la ligación, una reacción extra de PCR fue requerida usando los oligonucleótidos externos. Los fragmentos ensamblados fueron clonados en pBBR1MCS5 entre los sitios *SmaI* y *Apal*. Las transformantes fueron seleccionadas en medio sólido LB/Gen a 37°C. La construcción pBBR1MCS5 P_{Eco} RFP (pBB P_{Eco}) fue digerida con *NheI* para remover el espaciador y la caja -10 del promotor consenso de RpoD, purificada y re-ligada. De esta forma se obtuvo el vector control carente de promotor (pBB P_{less}). Tras secuenciar las construcciones pBBR1MCS5 Pn RFP (pBB Pn) y corroborar su integridad, se amplificaron los fragmentos Pn RFP con la finalidad de clonarlos en pUC19. Estos DNAs re-amplificados se clonaron en pUC19 usando las enzimas *BamHI* y *SphI* (pUC Pn RFP). Las transformantes fueron seleccionadas en medio sólido LB/Amp a 37°C. Todas las reacciones de PCR se realizaron con DNA polimerasa Platinum *Taq* High Fidelity. Empleamos el mismo espaciador (secuencia localizada entre las cajas -35 y -10) para ambos promotores consenso (correspondiente al promotor Bba_J23119 del repositorio de iGem).

Curvas de crecimiento bacteriano

E. coli rpoD285 fue transformada con la librería pRK415sigma y las curvas de crecimiento fueron realizadas usando el lector automatizado de placas Synergy 2 (Biotek). El lector fue programado para medir la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm (OD_{600nm}) cada 30 minutos durante 24 hrs de crecimiento continuo de cultivos bacterianos en medio líquido. Estos experimentos se hicieron con cinco colonias independientes seleccionadas al azar para cada construcción de la librería pRK415sigma; además, se hicieron cuatro réplicas técnicas para cada colonia muestreada, produciendo un total de 20 mediciones por cada miembro de la librería. Para cada experimento, se picaron colonias bacterianas de medio sólido y se depositaron en los pozos correspondientes de la placa. Esta primer placa (pre-

cultivo) se creció por 24 horas a 30°C, posteriormente fue replicada a una nueva placa con LB fresco (experimento 30°C) y por último, un nuevo paso de replicación fue requerido (experimento 42°C). Todos los experimentos en placa se hicieron en agitación rápida por 24 hrs de crecimiento continuo dentro del lector Synergy 2. Para los experimentos con *E. coli rpoD800* se eligieron al azar cinco colonias independientes y se realizaron dos réplicas técnicas (generando un total de diez réplicas). Los pozos de las placas de cultivo (Nunclon, Thermo Scientific, modelo 167008) fueron llenados con 200 µl de LB/Tet/IPTG. Todos los pasos de replicación se hicieron utilizando un replicador de placa de 96-postes (Boekel, mod. 140500).

Determinación de unidades formadoras de colonia (CFU)

El crecimiento celular bacteriano fue determinado también mediante el cálculo de las CFU. Dos colonias (de las cinco réplicas biológicas originales) se eligieron al azar para cada miembro de la librería pRK415sigma. Se muestrearon dos tiempos de la cinética de crecimiento, 0 y 24 horas, respectivamente. Las placas fueron crecidas en las mismas condiciones descritas en la sección de curvas de crecimiento bacteriano. Las muestras fueron obtenidas de la placa crecida a 42°C de la siguiente forma: 10 µl de cada cultivo se depositaron en tubos eppendorf independientes (los cuales contenían 90 µl de disolución 10 mM Sulfato de magnesio/0.01% Tween40). Estas muestras fueron mezcladas a uniformidad usando vortex, diluidas de forma serial y goteadas en dos cajas petri independientes con medio sólido LB/Tet/IPTG. Una caja fue crecida a la temperatura permisiva y la otra a temperatura restrictiva, de esta forma, cada réplica biológica fue dividida en dos cajas petri distintas. Tras completar 24 hrs de crecimiento a las temperaturas correspondientes, se contó el número de colonias bacterianas visibles presentes en los goteos. El valor de CFU fue calculado con la siguiente fórmula: el número de colonias bacterianas presentes se dividió entre el producto del volumen de la gota depositada (ml) por la dilución del tubo que provenía. El replicador de placas de 96-postes fue utilizado para los pasos de replicación.

Medición de fluorescencia

Para medir la actividad de la RFP, tres colonias diferentes para cada construcción *PnRFP* fueron elegidas al azar. El lector automatizado Synergy 2 fue programado para medir la fluorescencia de los cultivos con los siguientes parámetros: excitación 530/25 nm, emisión 590/35 nm y gain 40. Para *E. coli rpoD285* se midió el crecimiento celular como en los experimentos de las curvas de crecimiento. Para *R. etli* el crecimiento celular se monitoreó de la siguiente manera: OD_{620nm}, mediciones cada dos horas durante 48 horas de crecimiento continuo a 30°C y agitación rápida en PY/Gm/Nal. Las placas de 96 pozos empleadas en las mediciones de fluorescencia poseen paredes oscuras, fondo y tapa transparentes (Corning Inc., mod. 3904).

Purificación y manipulación de DNA

El DNA genómico de *E. coli* DH5α y *R. etli* CFN42 fue purificado (Sambrook y W Russell, 2001) y usado como templado para las reacciones de amplificación de los genes silvestres correspondientes a los factores sigma primarios respectivos. El DNA plasmídico se purificó a partir de pre-cultivos con 12 hrs de crecimiento (High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche). Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis (100 V, 60-75 min, 1X Tris/ácido acético/EDTA buffer) en gel de agarosa al 1.2% (w/v) y aislados mediante el corte de banda y su subsecuente purificación (Kit de purificación Roche). Las digestiones de DNA con enzimas de restricción fueron realizadas a dos temperaturas: 25°C (*Apal* y *SmaI*) y 37°C (*AflII*, *BamHI*, *KpnI*, *NheI*, *SpeI*, *SphI* y *XbaI*). Las reacciones de ligación de DNA se efectuaron a 16°C con ligasa T4. Todas las secuencias de DNA fueron amplificadas con alguna de las siguientes polimerasas: Platinum *Taq* High Fidelity (produce una mezcla de fragmentos con extremos romos y cohesivos 3'-A) o Phusion High Fidelity (produce únicamente fragmentos con extremos romos).

Secuenciación de DNA

La librería pRK415sigma fue secuenciada por Macrogen Inc. Las mutantes de *sigA* fueron secuenciadas por GenScript. Las construcciones *PnRFP* se secuenciaron en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM. El método de Sanger fue utilizado para todas las reacciones de secuenciación. Cada construcción fue secuenciada en ambas direcciones (*forward* y *reverse*).

Manejo de datos y análisis estadístico

Con la finalidad de estandarizar los datos, se obtuvo la razón entre las mediciones a 42°C vs 30°C para cada construcción genética, tipo de dato y tiempo. Los archivos de salida generados por el lector Synergy 2 fueron formateados usando *scripts ad hoc* escritos en perl. Las secuencias se alinearon usando MUSCLE (Edgar, 2004). Los archivos post-script de los alineamientos fueron generados con SeaView (Galtier et al., 1996) u OpenOffice. Las curvas de crecimiento, gráficas de barras y análisis estadísticos se hicieron con paquetes de lenguaje R (ggplot2, statmod, stats) (R Development Core Team, 2011, RRID:SCR_001905). Con el paquete de R grofit (Kahm et al., 2010) se modelaron matemáticamente las curvas de crecimiento. Las pruebas de permutación se instrumentaron usando el paquete de R compareGrowthCurves (Baldwin et al., 2007; Elso et al., 2004). El *clustering* jerárquico se obtuvo mediante distancias Minkowski para agrupar comportamientos según la mediana y la desviación absoluta de la mediana para los valores estandarizados de la integral. Las pruebas de normalidad empleadas fueron Shapiro-Wilk, Anderson-Darling y Jarque-Bera. También se determinaron grupos de comportamientos (entre valores estandarizados de integral 42°C/30°C en *E. coli rpoD285*) mediante la prueba U de Wilcoxon (Tabla Suplementaria 3). Se usaron pruebas de rangos de Kendall para encontrar correlaciones entre: 1) datos estandarizados de OD y CFU, 2) valores de integral obtenidos de medidas de RFP estandarizadas (RFP/OD) y, 3) valores de integral para *E. coli rpoD800* y DH5 α . Debido a la presencia de valores extremos, durante las primeras 15 mediciones de

actividad RFP, los análisis estadísticos excluyeron estos puntos. Estos valores extremos pueden ser resultado de la fase de crecimiento en que se encuentran las bacterias analizadas, puesto que los pre-cultivos de los que provienen alcanzaron siempre la fase estacionaria. Las células en esta fase sobre-expresan la proteína reportera RFP. Al estandarizar los valores de RFP (RFP/OD) durante los primeros puntos de la curva se observaban valores elevados de RFP y bajos de OD (cerca de cero). Todas las lecturas, resultado de la secuenciación Sanger, fueron manipuladas usando trace tuner (Paracel/Celera, 2006) para el llamado de bases; Lucy (Chou y Holmes, 2001) para el recorte de calidad y MIRA (Chevreux, 2005; RRID:SCR_010731) para el ensamble de contigs. Los porcentajes de identidad fueron calculados usando BLASTP (Altschul et al., 1990, RRID:SCR_004870). El servidor Psipred (Buchan et al., 2013) predijo las estructuras secundarias.

Purificación de proteína

Para estos experimentos se usó *E. coli rpoD285*. Se crecieron tres colonias independientes para cada construcción de la librería pRK415sigma (pre-cultivo, 30°C), excepto las mutantes de *sigA*. Matraces con 100 ml de LB/Tet/IPTG fresco fueron inoculados con los pre-cultivos (ajustando la $OD_{600nm} = 0.03$) y se crecieron a 42°C en agitación (200 rpm). Se monitoreó periódicamente la OD y la extracción proteica inició cuando los cultivos alcanzaron $OD_{600nm} = 0.6 - 0.8$. Se ajustaron las OD para obtener cultivos cuyo volumen final era de 40 ml a una $OD_{600nm} = 0.6$. A partir de este punto, las muestras se mantuvieron en hielo durante todo el proceso de extracción. El vector y las construcciones pRKq02, q03, q07, q10 y q11 alcanzaron OD_{600nm} entre 0.04 y 0.06 después de 72 hrs de crecimiento a 42°C, razón por la cual fueron descartadas de este experimento.

El resto de cultivos fue lavado con 1X PBS, resuspendido en H₂O miliQ suplementada con un coctail inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich) y sonificado tres veces (25 seg, 13 Micrones). Posteriormente, 5 ml de acetona absoluta fueron adicionados y las muestras se congelaron a -80°C por 12 hrs. Después de la centrifugación, el pellet fue re-suspendido en 5 ml de buffer de extracción (0.7M

Sucrosa/0.5M Tris/0.1M KCl/30mM HCl/50mM EDTA/2%β-mercaptoetanol/PVPP) mezclado con 6 ml de fenol y centrifugado. Se recuperó la fase acuosa, se le agregaron 15 ml de acetato de amonio, se congelaron las muestras a -80°C y se centrifugaron nuevamente. Los pellets fueron lavados dos veces en 5 ml de acetona al 80%. Las muestras se re-suspendieron en buffer de solubilización (7M urea/2M tiourea/4% CHAPS/2mM TBP/2% anfolinas/600mM DTT). La proteína total fue cuantificada mediante el método de Bradford usando albúmina de suero bovino como estandar. Todos los cultivos de *E. coli rpoD285* se crecieron de forma aeróbica (220 rpm) en LB/Tet/IPTG. Todos los pasos de centrifugación se hicieron a 4°C y 7000 rpm por 20 min.

Western blot

Las muestras (15 µl, 0.2 mg ml⁻¹) se cargaron en un gel del 4-20% de gradiente de poliacrilamida (BioRad, catálogo 456-1095) y las proteínas se separaron mediante electroforesis en buffer 1X Tris/Glicina/SDS (110 V, 2 hrs). Posteriormente, las proteínas se electro-transfirieron a membranas de nitrocelulosa (BioRad, cat. 162-0097) usando una cámara semi-seca (400 mA, 1hr). Las membranas fueron bloqueadas en 5% de leche sin grasa liofilizada suspendida en buffer TBST (10mM Tris-HCl, pH 8.0/150mM NaCl/0.1% Tween2) por 12 hrs a 4°C. Después de ello, se lavaron tres veces antes de ser incubadas en el anticuerpo primario (2 hrs); en seguida, se lavaron cinco veces previo a su incubación en el anticuerpo secundario (1 hr). Finalmente, las membranas se lavaron cuatro veces antes de incubarse en solución de carbazol (27.2% carbazol/72.6% buffer de acetatos/0.2% H₂O₂).

El anticuerpo primario (ratón anti-*E.coli* RpoD IgG2b monoclonal, código 2G10, Santa Cruz Biotechnology sc-56768, Creative Biomart Cat# CABT-36751, RRID:AB_11443551) reconoce factores sigma primarios de varias especies bacterianas (Batut et al., 1991; Bowman y Kranz, 1998; Breyer et al., 1997; Severinova et al., 1996).

El anticuerpo secundario (cabra anti-ratón IgG-HRP, Santa Cruz Biotech. Cat# sc-2005, RRID:AB_631736) reconoce al anticuerpo primario y tiene conjugada la

actividad de peroxidasa. Los anticuerpos primario y secundario fueron diluidos 1:10,000 y 1:20,000, respectivamente.

Todas las incubaciones, con anticuerpos, se efectuaron a temperatura ambiente con agitación (BenchRocker 2D, CORE Life Sciences). Todos los lavados se hicieron en buffer TBST a temperatura ambiente por 10 min de agitación cada uno. Todas las membranas poseen las muestras en el siguiente orden: primer carril marcador de peso molecular, segundo carril E σ^D comercial de *E.coli* (Epicentre), tercer carril proteína total extraída de *R. etli* CFN42 y en carriles subsecuentes las muestras en orden alfabético. Marcador de peso molecular (PAGE-Ruler pre-stained protein ladder, 10-180 kDa, Fermentas). Buffer de carga (1.5mM Tris/10% SDS/ β -mercaptoetanol/glicerol/bromofenol azul/H₂O). Para la electro-transferencia: buffer del ánodo-I (0.3M Tris-HCl pH 10.4/10% metanol), buffer del ánodo-II (25mM Tris-HCl pH 10.4/10% metanol) y buffer del cátodo (25mM Tris-HCl pH 9.4/40mM glicina/10% metanol). Ulteriormente las membranas se fotografiaron con una cámara digital Sony.

Análisis filogenéticos

Se seleccionaron 74 secuencias de proteínas pertenecientes a factores sigma primarios de 54 α -proteobacterias y 20 enterobacterias para el análisis filogenético. Las secuencias se alinearon con ClustalW2 (Thompson et al., 2002; RRID:SCR_002909) y el modelo evolutivo que mejor describió los datos (WAG) fue determinado con ProtTest (versión 2.4) (Abascal et al., 2005). La reconstrucción filogenética se hizo con PhyML (versión 3.0) (Guindon y Gascuel, 2003).

Modelo de la región σ_4 de RpoD

Se obtuvo el archivo 4YLN que contiene los datos cristalográficos de la burbuja de transcripción de *E. coli* (Zuo y Steitz, 2015) de la base de datos PDB (RRID:SCR_012820). Se visualizó la cadena F (correspondiente a RpoD) y se seleccionó la región σ_4 (residuos 540 al 613). La estructura de la región σ_4 de RpoD y la caja -35 del promotor se visualizaron usando Swiss-Pdb Viewer (versión

4.1) (Guex y Peitsch, 1997).

APÉNDICES

Tabla 4. Cepas bacterianas y plásmidos		
Nombre	Temperatura (°C)	Características
<i>Escherichia coli</i> BW28465	37	Delección del gen <i>rpoS</i> . Sin resistencia natural a antibióticos. Obtenida de Coli Genetic Stock Center (CGSC), Yale University, New Haven, USA
<i>Escherichia coli</i> CAG1	30 – 42	Alelo termosensible de RpoD (<i>rpoD800</i>). Resistente a estreptomicina. Obtenida de CGSC, Yale University
<i>Escherichia coli</i> DH5α	30 – 37	Propagación de plásmidos y purificación de DNA. Cepa hospedera en los experimentos con pUC19PnRFP. Resistente a ácido nalidíxico
<i>Escherichia coli</i> S17	30 – 37	Cepa donadora usada en conjugaciones con <i>Rhizobium etli</i> CFN42. Resistente a espectinomicina. Sensible a ácido nalidíxico
<i>Escherichia coli</i> UQ285	30 – 42	Alelo termosensible de RpoD (<i>rpoD285</i>). Sin resistencia natural a antibióticos. Obtenida de CGSC, Yale University
<i>Rhizobium etli</i> CFN42	30	Cepa hospedera en los experimentos con pBBR1MCS5PnRFP. Resistente a ácido nalidíxico
pBBR1MCS5	NA	GenBank GI: 833825. Longitud: 4,768 bp. Resistente a gentamicina
pBBR1MCS5PrpoDRFP	NA	Construcción que contiene al gen RFP bajo el control del promotor consenso de RpoD de <i>E. coli</i> . Resistente a gentamicina
pBBR1MCS5PsigARFP	NA	Construcción que contiene al gen RFP bajo el control del promotor consenso de SigA de <i>R. etli</i> . Resistente a gentamicina
pBBR1MCS5PlessRFP	NA	Construcción que contiene al gen RFP bajo el control de una secuencia carente de promotor. Resistente a gentamicina
pUC19	NA	GenBank GI: 6691170. Longitud: 2,686 bp. Resistente a ampicilina
pUC19PrpoDRFP	NA	Construcción que contiene al gen RFP bajo el control del promotor consenso de RpoD de <i>E. coli</i> . Resistente a ampicilina
pUC19PsigARFP	NA	Construcción que contiene al gen RFP bajo el control del promotor consenso de SigA de <i>R. etli</i> . Resistente a ampicilina
pUC19PlessRFP	NA	Construcción que contiene al gen RFP bajo el control de una secuencia carente de promotor. Resistente a ampicilina
pUC19rpoD	NA	Vector intermediario usado en el ensamble de las quimeras 1 y 2. Resistente a ampicilina
pUC19sigA	NA	Vector intermediario usado en el ensamble de las quimeras 1 y 2. Resistente a ampicilina
pRK415	NA	GenBank GI: 130693907. Longitud: 10,690 bp. Resistente a tetraciclina

pRK415rpoD	NA	Vector que contiene el factor sigma primario silvestre de <i>E. coli</i> . Resistente a tetraciclina.
pRK415sigA	NA	Vector que contiene el factor sigma primario silvestre de <i>R. etli</i> . Resistente a tetraciclina.
pRK415q01-14	NA	Librería de quimeras. Resistente a tetraciclina
pRK415sigAm01-02	NA	Librería de mutantes en la región $\sigma 4$ de SigA. Resistente a tetraciclina

Tabla 4. Se muestran todas las cepas bacterianas y vectores usados en esta investigación. NA: no aplica.

Tabla 5. Secuencia de oligonucleótidos			
Nombre	Secuencia	Longitud (nt)	Características
$\sigma 1$ Eco-FWD	GCTCTAGAGAAGGAGATA TCATATGGAGCAAACCC GCAGTCA	43	Sitio <i>Xba</i> I. Usado para amplificar el gen silvestre RpoD y clonarlo en pRK415
$\sigma 4$ Eco-REV	GGGGTACCTTAATCGTCC AGGAAGCTACG	29	Sitio <i>Kpn</i> I. Usado para amplificar el gen silvestre RpoD y clonarlo en pRK415
$\sigma 1$ Ret-FWD	GCTCTAGAGAAGGAGATA TCATATGGCAACCAAGGT CAAAGAG	43	Sitio <i>Xba</i> I. Usado para amplificar el gen silvestre SigA y clonarlo en pRK415
$\sigma 4$ Ret-REV	GGGGTACCTTAGCTGTCC AGAAAGCTTCT	29	Sitio <i>Kpn</i> I. Usado para amplificar el gen silvestre SigA y clonarlo en pRK415
Amp-FWD	ACACTAGTGAAAGTAAAA GAT	21	Sitio <i>Spe</i> I insertado (mutación sinónima). Construcción de quimeras 1 y 2
Amp-REV	TCACTAGTGTTTCTGGGT GAG	21	Sitio <i>Spe</i> I insertado (mutación sinónima). Construcción de quimeras 1 y 2
$\sigma 2$ VosEco-FWD	AACTTAAGGCTGGTTATTT CTATCGCT	27	Sitio <i>Afl</i> II insertado (mutación sinónima). Construcción de quimeras 1 y 2
$\sigma 2$ VosEco-REV	GCCTTAAGTTCGCTTCAA CCATCTCTT	27	Sitio <i>Afl</i> II insertado (mutación sinónima).

Tabla 5. Secuencia de oligonucleótidos			
			Construcción de quimeras 1 y 2
$\sigma 2_{VosRet}$ -FWD	A <u>ACTTA</u> AGGCTCGTCATTT CAATCGCC	27	Sitio A/II insertado (mutación sinónima). Construcción de quimeras 1 y 2
$\sigma 2_{VosRet}$ -REV	GCCTTAAGTTCGCTTCGA CCATTTCT	27	Sitio A/II insertado (mutación sinónima). Construcción de quimeras 1 y 2
$\sigma 1_{Eco}/\sigma 2_{Ret}$ -FWD	CGCTAAGCGTATTGAAGA CGGGATCGAGACGATGAT CGCCGGCC	44	Oligo interno usado para el ensamble de las quimeras 5 – 14
$\sigma 1_{Eco}/\sigma 2_{Ret}$ -REV	CACAGAGGCCGGCGATC ATCGTCTCGATCCCGTCT TCAATACGC	44	Oligo interno usado para el ensamble de las quimeras 5 – 14
$\sigma 2_{Eco}/\sigma 3_{Ret}$ -FWD	CAGGCGCGCACCATCCG TATTCCGGTGCACATGAT CGAGACG	42	Oligo interno usado para el ensamble de las quimeras 5 – 14
$\sigma 2_{Eco}/\sigma 3_{Ret}$ -REV	CGTCTCGATCATGTGCAC CGGAATACGGATGGTGCG CGCCTG	42	Oligo interno usado para el ensamble de las quimeras 5 – 14
$\sigma 3_{Eco}/\sigma 4_{Ret}$ -FWD	GGATTCTGCGACCACCGA AAGCCTGCGCGAGACGA CGACCCGCG	44	Oligo interno usado para el ensamble de las quimeras 5 – 14
$\sigma 3_{Eco}/\sigma 4_{Ret}$ -REV	AAAACGCGGGTCGTCGT CTCGCGCAGGCTTTCGGT GGTCGCAGAATC	47	Oligo interno usado para el ensamble de las quimeras 5 – 14
$\sigma 1_{Ret}/\sigma 2_{Eco}$ -FWD	AAGCGCATCGAAGCCGG CCGCAACCAGGTTCAATG CTCCGTTG	43	Oligo interno usado para el ensamble de las quimeras 5 – 14
$\sigma 1_{Ret}/\sigma 2_{Eco}$ -REV	GCAACGGAGCATTGAACC TGTTGCGGCCGGCTTC GATGCGCTTAG	46	Oligo interno usado para el ensamble de las quimeras 5 – 14
$\sigma 2_{Ret}/\sigma 3_{Eco}$ -FWD	CGCCGACCAGGCCCGCA CGATCCGCATTCCGGTGC ATATGATTGAGACC	49	Oligo interno usado para el ensamble de las quimeras 5 – 14
$\sigma 2_{Ret}/\sigma 3_{Eco}$ -REV	GATGGTCTCAATCATATGC ACCGGAATGCGGATCGTG CGGGCCTGG	46	Oligo interno usado para el ensamble de las quimeras 5 – 14
$\sigma 3_{Ret}/\sigma 4_{Eco}$ -FWD	CGACGCCGCCATCCAGG CGAACCTGCGTGCGGCA ACGCACGAC	43	Oligo interno usado para el ensamble de las quimeras 5 – 14
$\sigma 3_{Ret}/\sigma 4_{Eco}$ -REV	CGTGCGTTGCCGCACGC AGGTTCCGCTGGATGGC	40	Oligo interno usado para el ensamble de

Tabla 5. Secuencia de oligonucleótidos			
	GGCGTC		las quimeras 5 – 14
UNIpBBR-FWD	<u>ACCCGGG</u> GATCCCGATCGT AATCCTCTCGCCGACGC	35	Sitio <i>Sma</i> I. Amplificación de <i>PnRFP</i> y clonación en pBBR1MCS5
RFPpBBR-REV	<u>AGGGCCC</u> ATCGATGTATAT AAACGC	25	Sitio <i>Apa</i> I. Amplificación de <i>PnRFP</i> y clonación en pBBR1MCS5
UNIpUC-FWD	<u>AAAGGATCC</u> GATCGTAA TCCTCTCGCC	28	Sitio <i>Bam</i> HI. Amplificación de <i>PnRFP</i> y clonación en pUC19
RFPpUC-REV	<u>AAAGCATGC</u> GTATATAAAC GCAGAAAGG	28	Sitio <i>Sph</i> I. Amplificación de <i>PnRFP</i> y clonación en pUC19
RFP-FWD	<u>GATCTGAATTC</u> GAAAGAG GAGAA ACTAGATGGC	35	Sitio <i>Eco</i> RI. Amplificación de RFP y ensamble de <i>PnRFP</i>
PrpoD-REV	GATTTGAATTCgctagc ATTA TACCT AGGACTGAgctagc T GTCAA GGCTGCTGGTCG AGAGCTTC	66	Sitios <i>Eco</i> RI y <i>Nhe</i> I. Amplificación del promotor consenso de RpoD. Ensamble de <i>PnRFP</i>
PsigA-REV	GATTTGAATTC CATATAGCC TAGGACTGAgctagc GTCAA GGGCT GCTGGTCGAGAG CTTC	60	Sitio <i>Eco</i> RI. Amplificación del promotor consenso de RpoD. Ensamble de <i>PnRFP</i>

Tabla 5. Los sitios de reconocimiento para enzimas de restricción aparecen subrayados, excepto por la secuencia de *Nhe*I, la cual aparece en minúsculas. Los sitios de unión a ribosomas (RBS) están en negritas. Abreviaturas en oligonucleótidos: Eco (RpoD), Ret (SigA), FWD (forward), REV (reverse), Vos (ensamble de quimeras por recuperación del plásmido), Amp (gen de resistencia a ampicilina), UNI (oligo universal), pBBR (vector pBBR1MCS5), pUC (vector pUC19) y RFP (proteína roja fluorescente). La secuencia de las cajas -10 y -35 se muestran en negritas subrayadas.

Material Suplementario

Ensayos de CFU confirman los datos de las curvas de crecimiento

Para realizar las pruebas estadísticas de correlación, se usaron datos estandarizados de OD y CFU (Materiales & Métodos). Para el primer punto muestreado, 0 hrs, no se encontró correlación entre los valores de OD y CFU (Kendall $\tau = -0.1$, *Pvalue* = 0.55). Esto puede explicarse por el bajo número de bacterias presentes al inicio de la cinética. A las 24 hrs, las variables OD y CFU mostraron una moderada correlación (Kendall $\tau = 0.48$, *Pvalue* = 0.0037). Dado que todos los miembros de la librería pRK415sigma presentaron colonias bacterianas, en las cajas de cultivo, crecidas a la temperatura permisiva para ambos puntos muestreados (0 y 24 hrs); se concluye que las construcciones pRKq02, q03, q07, q10, q11 y el vector, entran en arresto de la división celular a 42°C, en otras palabras, las células portadoras de estas construcciones no se replican pero permanecen viables al menos durante las primeras 24 hrs a la temperatura restrictiva.

Análisis estadístico de las curvas de crecimiento de la librería pRK415sigma

El modelado matemático de las curvas de crecimiento (gcFitModel) (Kahm et al., 2010) generó parámetros descriptivos de las cinéticas (longitud de la fase exponencial, tasa de crecimiento, crecimiento celular máximo e integral).

Para determinar la bondad del ajuste, es decir, que tan bien describen los modelos a los datos observados, se calculó la suma de cuadrados residual (RSS) de las observaciones ajustadas (Tabla Suplementaria 1). La RSS media fue de 0.0081 (error estandar de la media, SEM = 0.00068) para las curvas a 30°C y de 0.073 (SEM = 0.01826) para los datos a 42°C. Los resultados de RSS demuestran que los datos observados fueron modelados exitosamente, lo que vuelve a los parámetros obtenidos descriptores confiables de las cinéticas de crecimiento. Se graficaron los datos observados vs los modelados (ecuaciones de Gompertz y Logística) para representar gráficamente la bondad del ajuste (Figura

Suplementaria 5).

Se aplicaron pruebas de normalidad a los parámetros obtenidos de las curvas crecidas a 30 y 42°C, respectivamente. Los *Pvalues* fueron calculados usando las pruebas de Shapiro-Wilk, Anderson-Darling y Jarque-Bera (paquetes de R: stats, nortest y tseries). A un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$, todas las pruebas de normalidad indicaron que ninguno de los parámetros presentan distribución Gaussiana, excepto por el parámetro de longitud de la fase lag a 30°C (Shapiro-Wilk *Pvalue* = 0.617) (Tabla Suplementaria 2). Debido a lo anterior, se utilizaron pruebas estadísticas no-paramétricas para comparar las curvas de crecimiento mediante sus parámetros descriptivos.

La integral fue elegida como el parámetro más adecuado para comparar las cinéticas de crecimiento dado que éste incluye a todos los demás. Los valores se estandarizaron dividiendo las integrales a 42°C entre sus correspondientes a 30°C. Por lo tanto, un valor integral estandarizado de 1.0 implica que las dos curvas de crecimiento (30 y 42°C) para una misma construcción, presentaron el mismo valor de integral. Asimismo, se realizaron pruebas de Wilcoxon y *clustering* jerárquico (distancias Minkowski, Figura Suplementaria 4) con los valores de integral estandarizados para determinar grupos de comportamiento encontrándose tres grupos: crecimiento-nulo (integrado por el vector, pRKq02, q03, q07, q10 y q11), crecimiento-medio (pRKsigA, pRKq01, q04, q05, q08, q12 y q13) y crecimiento-alto (pRKrpoD, pRKq06, q09 y q14). La única discrepancia encontrada, entre ambos métodos usados, para agrupar fue que en el *clustering* jerárquico la quimera 14 fue localizada en el grupo de crecimiento-alto, mientras que la prueba de Wilcoxon la ubicó dentro de los grupos de crecimiento-medio y alto. También se aplicaron pruebas de permutación a las curvas de crecimiento (usando la función de R compareGrowthCurves) y sus resultados fueron concordantes con los producidos con la prueba de Wilcoxon (datos no mostrados).

FIGURAS Y TABLAS SUPLEMENTARIAS

Supplementary Figure 1

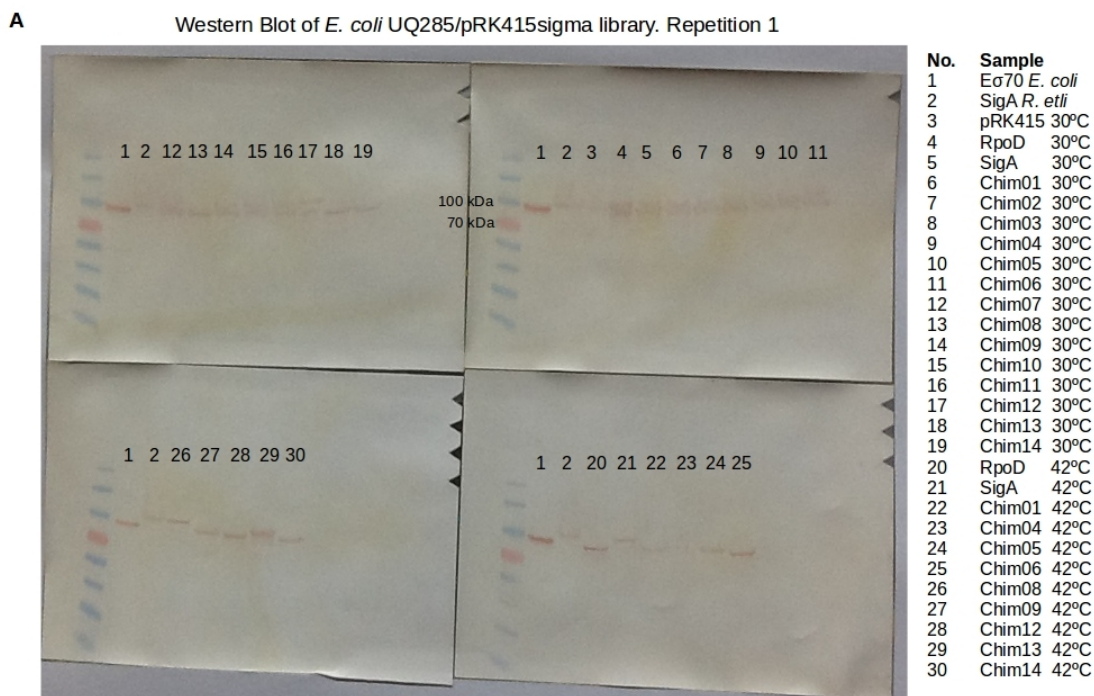


Figura Suplementaria 1. Western blot de la librería pRK415sigma en *Escherichia coli* rpoD285. Acotaciones: línea 1 (E σ ⁷⁰ comercial de *E. coli*); línea 2 (proteína total de *Rhizobium etli* CFN42); línea 3 (pRK415); línea 4 (pRKrpoD); línea 5 (pRKsigA); línea 6 (pRKq01); línea 7 (pRKq02); línea 8 (pRKq03); línea 9 (pRKq04); línea 10 (pRKq05); línea 11 (pRKq06); línea 12 (pRKq07); línea 13 (pRKq08); línea 14 (pRKq09); línea 15 (pRKq10); línea 16 (pRKq11); línea 17 (pRKq12); línea 18 (pRKq13); línea 19 (pRKq14); línea 20 (pRKrpoD); línea 21 (pRKsigA); línea 22 (pRKq01); línea 23 (pRKq04); línea 24 (pRKq05); línea 25 (pRKq06); línea 26 (pRKq08); línea 27 (pRKq09); línea 28 (pRKq12); línea 29 (pRKq13) y línea 30 (pRKq14). Temperaturas de crecimiento: 30°C (muestras 3–19) y 42°C (muestras 20–30). Se depositaron 15 μ l de cada muestra a una concentración de 0.2 mg ml⁻¹. En el caso de la E σ ⁷⁰, se tomó 1 μ l de holoenzima comercial ajustándose a un volumen final de 15 μ l con buffer de solubilización.

Supplementary Figure 2

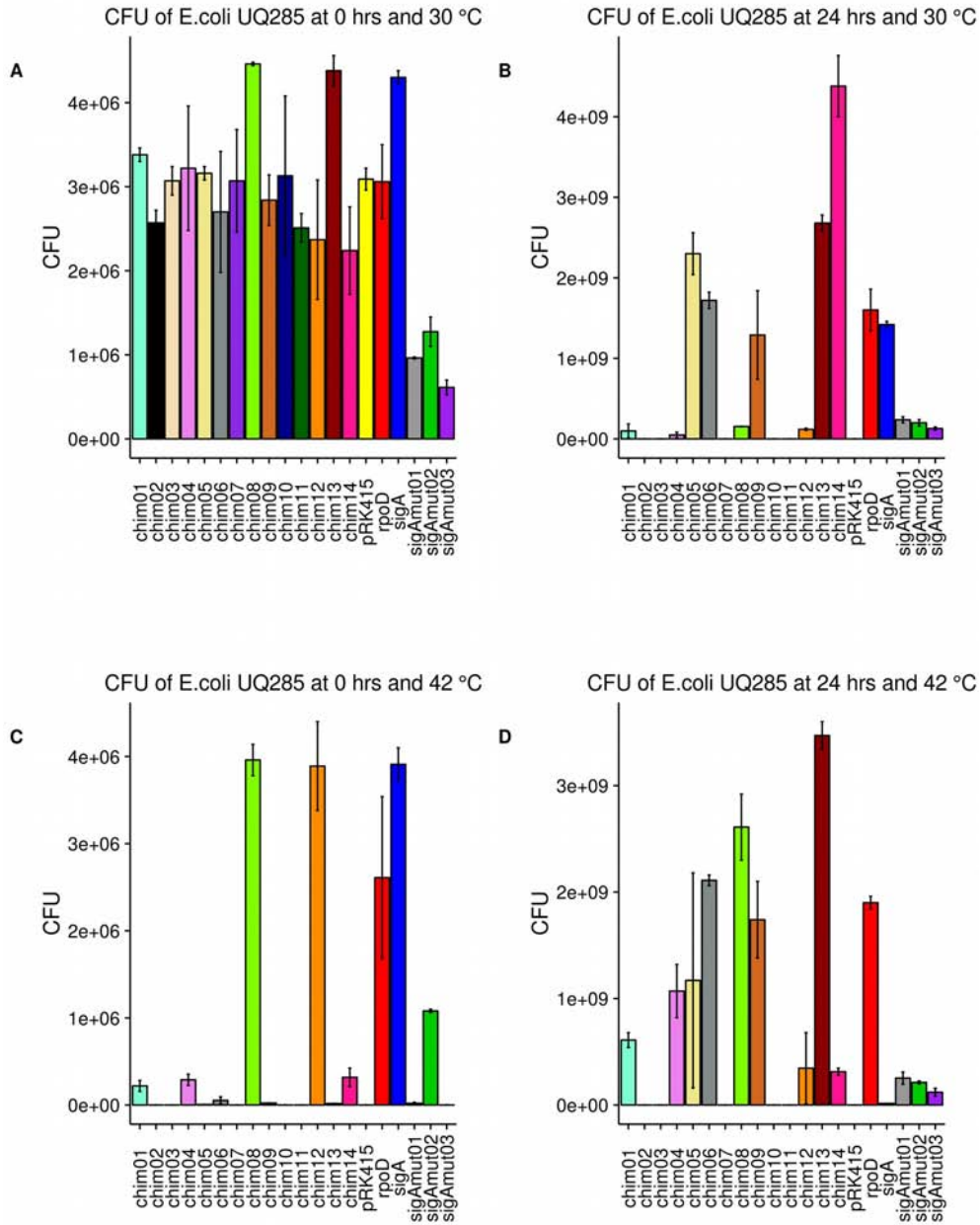


Figura Suplementaria 2. Para cada miembro de la librería pRK415sigma, se seleccionaron dos réplicas biológicas para los experimentos de CFU; muestreándose dos puntos temporales (0 y 24 horas) para cada temperatura de crecimiento (30 y 42°C). Las barras de error denotan el SEM.

Supplementary Figure 3

Alignment of *lax* primary-sigma factors vs *E. coli* RpoD

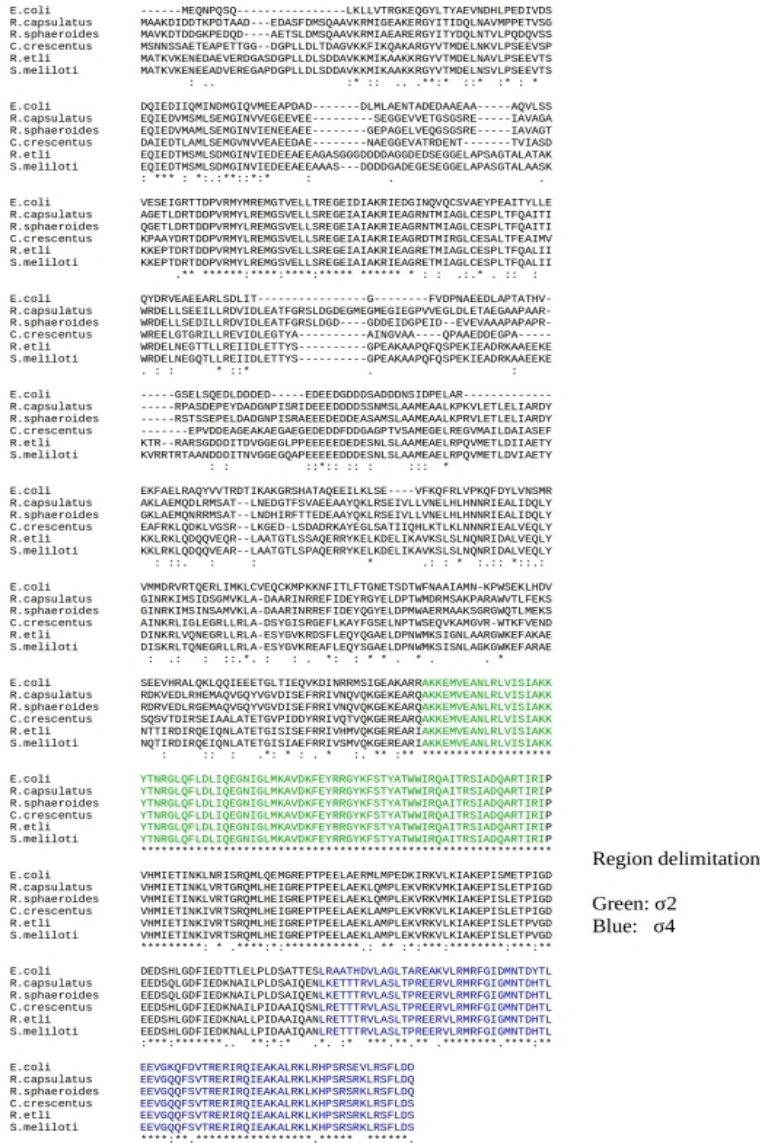


Figura Suplementaria 3. Se alinearon las secuencias de aminoácidos de los factores sigma primarios de *Caulobacter crescentus*, *Escherichia coli*, *Rhizobium etli*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides* y *Sinorhizobium melliloti* usando MUSCLE.

Supplementary Figure 4

Clustering of pRK415sigma library members

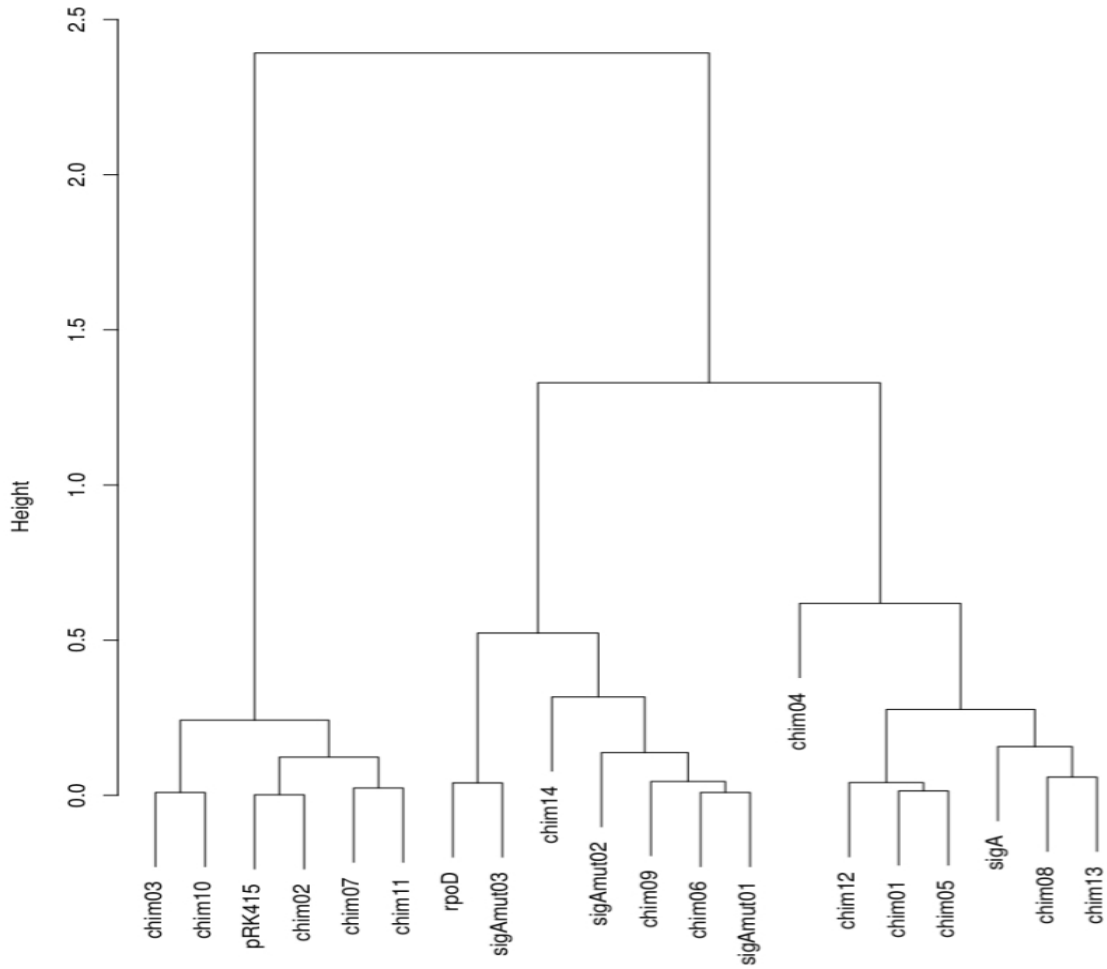
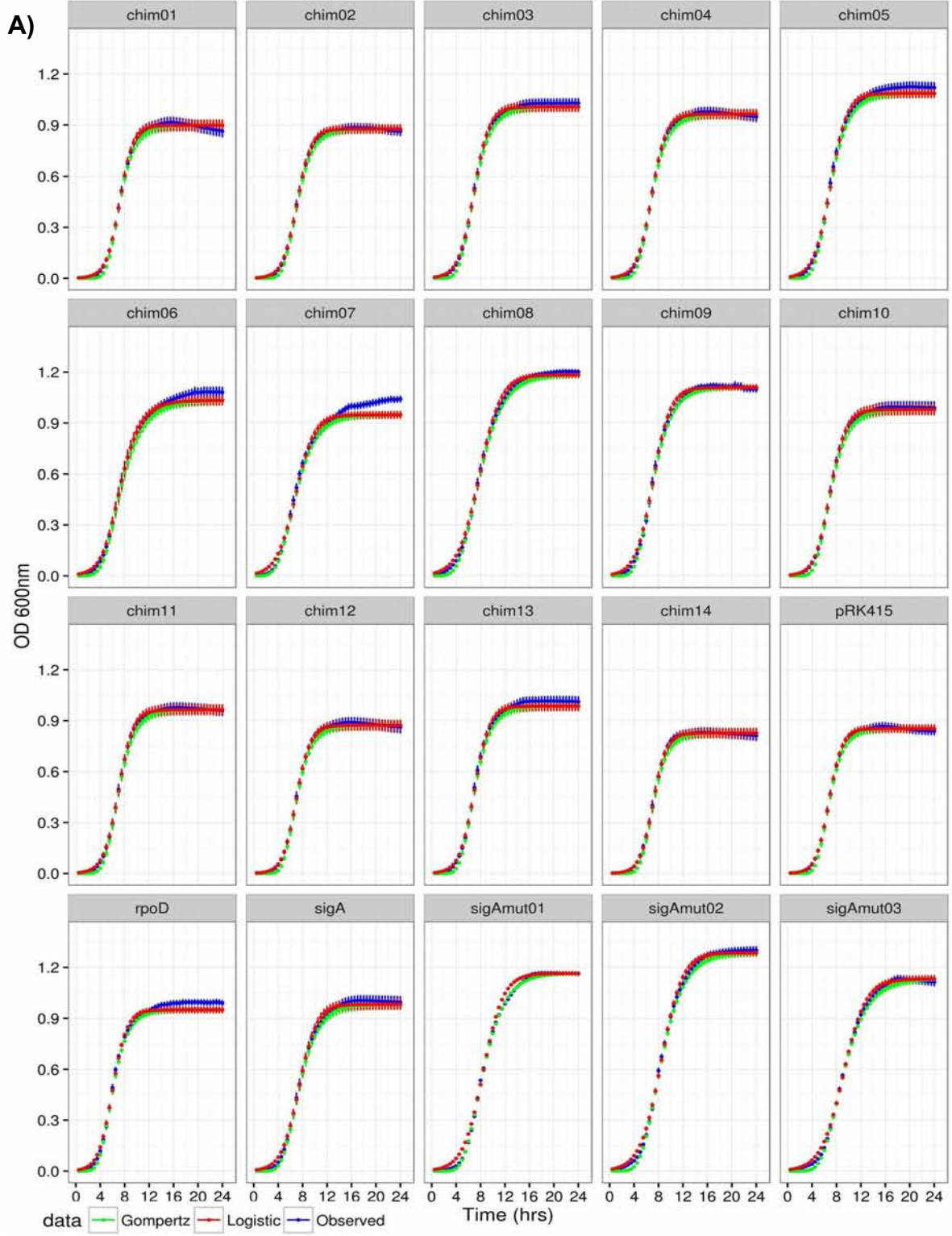


Figura Suplementaria 4. *Clustering* jerárquico construido utilizando distancias Minkowski para la determinación de grupos de crecimiento entre los miembros de la librería pRK415sigma. La mediana y desviación absoluta de la mediana se calcularon a partir de valores estandarizados de la integral (42°/30°C).

Supplementary Figure 5

Modelled vs observed data at 30 °C



Supplementary Figure 5

Modelled vs observed data at 42 °C

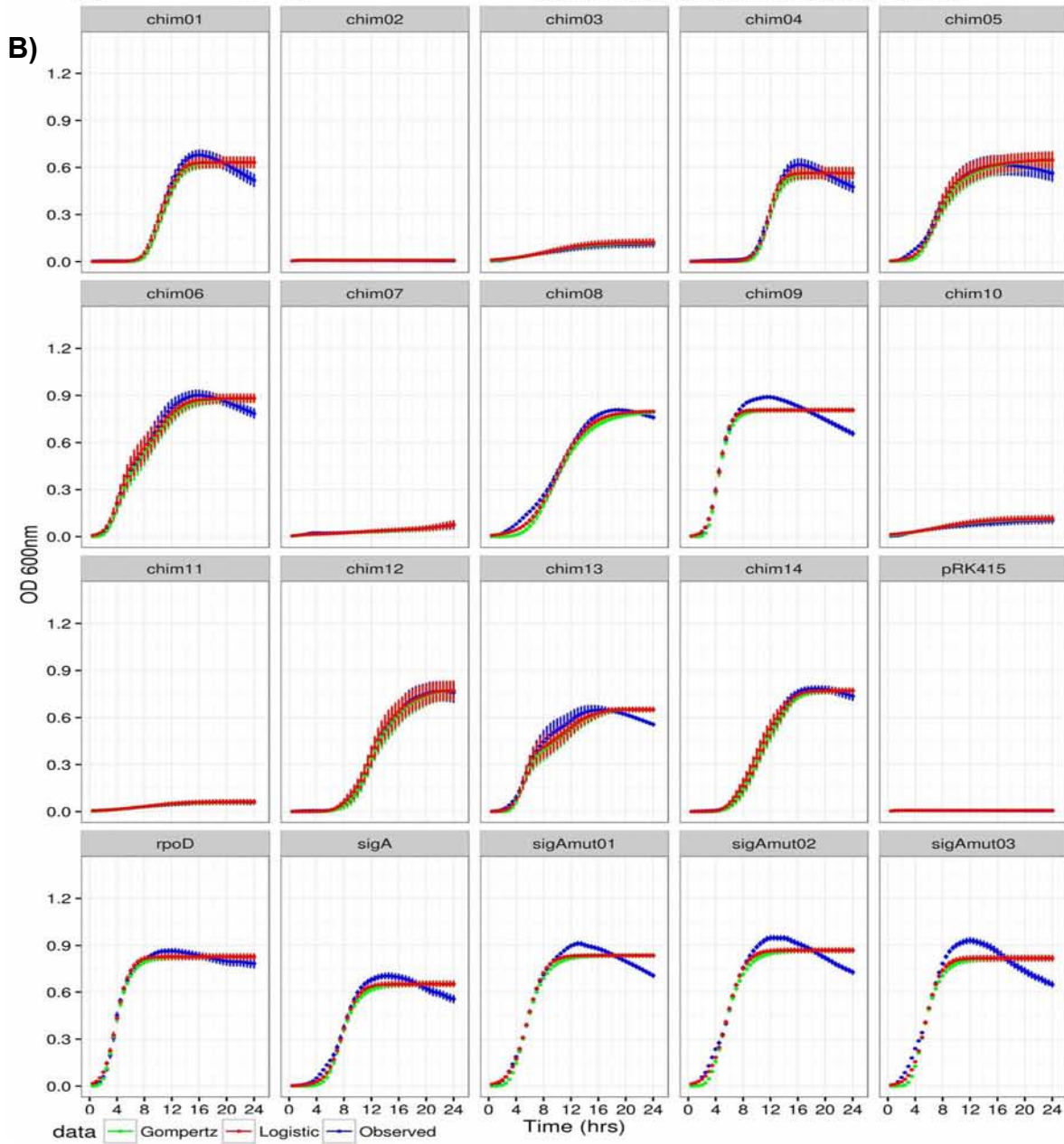


Figura Suplementaria 5. Representación visual de la bondad del ajuste correspondiente al modelado de los datos observados (azul) vs ecuaciones de Gompertz (verde) y Logística (rojo). **A)** Curvas a 30°C. **B)** Curvas a 42°C.

Supplementary Figure 6

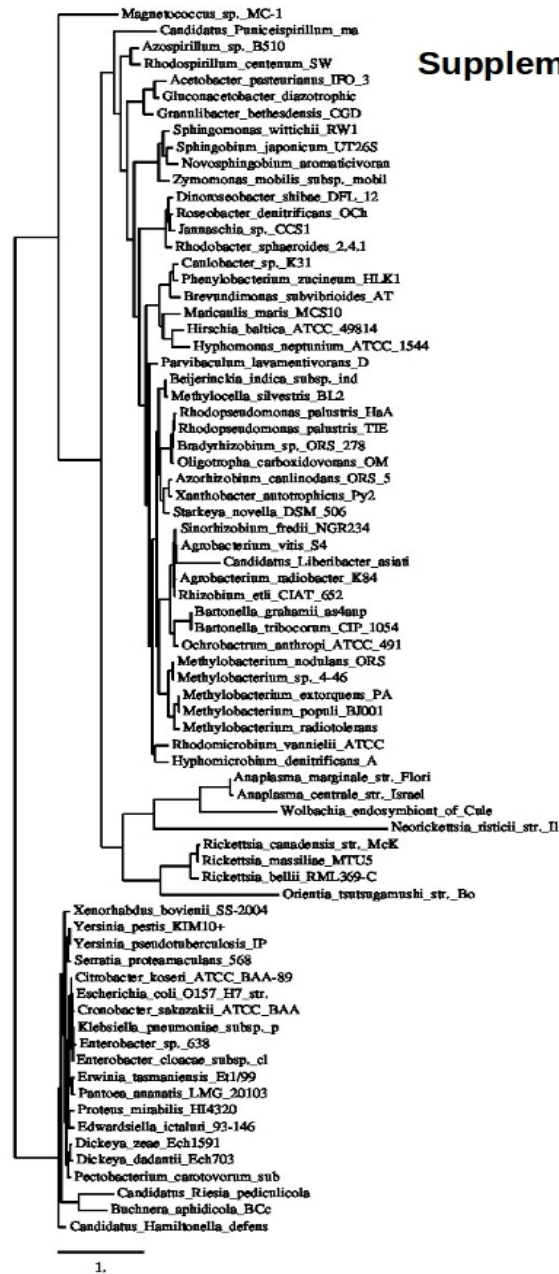


Figura Suplementaria 6. Reconstrucción filogenética correspondiente a factores sigma primarios pertenecientes a Enterobacterias y α -proteobacterias.

Tabla Suplementaria 1. Bondad del ajuste librería pRK415sigma								
Nombre	30°C				42°C			
	N	RSS			N	RSS		
		Media	SD	SEM		Media	SD	SEM
pRK415	20	0.006	0.004	0.001	13	0.0001	0.00004	0.00001
<i>rpoD</i>	20	0.01	0.005	0.001	20	0.08	0.118	0.02
<i>sigA</i>	20	0.009	0.008	0.002	20	0.103	0.09	0.02
<i>quim01</i>	20	0.011	0.009	0.002	20	0.104	0.074	0.02
<i>quim02</i>	20	0.007	0.005	0.001	9	0.0002	0.0005	0.0002
<i>quim03</i>	20	0.007	0.003	0.0007	19	0.0005	0.0007	0.0002
<i>quim04</i>	20	0.009	0.005	0.001	20	0.06	0.04	0.008
<i>quim05</i>	20	0.008	0.003	0.001	19	0.05	0.06	0.01
<i>quim06</i>	20	0.009	0.008	0.002	20	0.09	0.08	0.02
<i>quim07</i>	20	0.02	0.008	0.002	18	0.002	0.004	0.0009
<i>quim08</i>	20	0.005	0.002	0.0004	20	0.02	0.006	0.001
<i>quim09</i>	20	0.014	0.014	0.003	20	0.192	0.06	0.01
<i>quim10</i>	20	0.007	0.004	0.0009	18	0.001	0.001	0.0003
<i>quim11</i>	20	0.005	0.003	0.0006	19	0.0005	0.0006	0.0001
<i>quim12</i>	20	0.009	0.007	0.002	20	0.014	0.015	0.003
<i>quim13</i>	20	0.009	0.004	0.0009	20	0.091	0.073	0.02
<i>quim14</i>	20	0.007	0.006	0.001	20	0.04	0.06	0.01
<i>sigAm01</i>	20	0.005	0.001	0.0003	20	0.13	0.07	0.016
<i>sigAm02</i>	20	0.005	0.002	0.0004	20	0.167	0.04	0.008
<i>sigAm03</i>	20	0.005	0.002	0.0005	20	0.314	0.128	0.029

Tabla Suplementaria 1. Abreviaturas: N (número de curvas modeladas correctamente); RSS (Suma de cuadrados residual); Media (promedio); SD (desviación estándar); SEM (error estándar de la media).

Tabla Suplementaria 2. Pruebas de Normalidad						
Parámetro	Pvalue 30°C			Pvalue 42°C		
	SW	AD	JB	SW	AD	JB
BW28465 RFP integral	0.002	0.001	0.47			
CAG1 integral				0.0002	2.7x10 ⁻⁵	0.2
DH5α RFP integral	0.08	0.13	0.6			
UQ285 tasa crecimiento	5.7x10 ⁻¹³	2.2x10 ⁻¹⁶	3.8x10 ⁻¹²	2.2x10 ⁻¹⁶	2.2x10 ⁻¹⁶	1.8x10 ⁻⁸
UQ285 integral	0.0004	0.0002	0.01	4.7x10 ⁻¹⁴	2.2x10 ⁻¹⁶	1.6x10 ⁻⁷
UQ285 longitud fase lag	0.62	0.48	0.91	1.4x10 ⁻⁹	6.7x10 ⁻¹⁵	1.9x10 ⁻⁹
UQ285 crecimiento celular máximo	1.5x10 ⁻¹⁶	2.3x10 ⁻⁸	0.0004	2.2x10 ⁻¹⁶	2.2x10 ⁻¹⁶	1.3x10 ⁻¹¹
UQ285 OD _{600nm} 0 hrs	0.02	0.02	0.25			
UQ285 CFU 0 hrs	7.2x10 ⁻⁶	9.6x10 ⁻⁹	0.006			
UQ285 OD _{600nm} 24 hrs	0.01	0.004	0.44			
UQ285 CFU 24 hrs	5.1x10 ⁻⁷	1.1x10 ⁻¹⁰	7.2x10 ⁻¹⁰			
UQ285 integral 42°/30°C	4.7x10 ⁻¹⁵	2.2x10 ⁻¹⁶	4.4x10 ⁻⁸			

Tabla Suplementaria 2. Abreviaturas: SW (prueba estadística Shapiro-Wilk); AD (prueba estadística Anderson-Darling); JB (prueba estadística Jarque-Bera); BW28465 (*Escherichia coli* BW28465, *ΔrpoS*); CAG1 (*Escherichia coli* CAG1, *rpoD800*); UQ285 (*Escherichia coli* UQ285, *rpoD285*); RFP (actividad de la proteína roja fluorescente); OD_{600nm} (densidad óptica medida a una longitud de onda de 600 nm) y, CFU (número de unidades formadoras de colonias). Los datos de RFP se estandarizaron dividiendo el valor de RFP entre su OD correspondiente.

Tabla Suplementaria 3. Prueba de Wilcoxon para integrales estandarizadas

Grupo 1	Grupo 2	Pvalue
pRK415	Quim02	0.0956
	Quim03	0.0542
	Quim07	0.0197
	Quim10	0.0197
	Quim11	0.4484
RpoD	Quim06	0.0911
	Quim09	0.0018
	SigAm01	0.0014
	SigAm03	0.4135
SigA	Quim01	0.0051
	Quim05	0.1661
	Quim08	0.0181
	Quim12	0.3408
	Quim13	0.6588
	Quim14	0.2110
Quim01	Quim04	0.0020
	Quim05	0.5687
	Quim08	0.1207
	Quim12	0.3834
	Quim13	0.1022
	Quim14	0.0005
Quim02	Quim03	0.0186
	Quim07	0.0075
	Quim10	0.0019
	Quim11	0.0607
Quim03	Quim07	0.2844
	Quim10	0.4252
	Quim11	0.1378
Quim04	Quim05	0.0069
	Quim12	0.0051
Quim05	Quim08	0.8567
	Quim12	0.8134
	Quim13	0.3088
Quim05	Quim14	0.0128

Tabla Suplementaria 3. Prueba de Wilcoxon para integrales estandarizadas		
Quim06	Quim09	0.2012
	Quim14	0.0181
	SigAm01	0.4612
	SigAm02	0.0263
	SigAm03	0.2315
Quim07	Quim10	0.1610
	Quim11	0.6415
Quim08	Quim12	0.7584
	Quim13	0.1572
	Quim14	0.0020
Quim09	Quim14	0.0167
	SigAm01	0.1738
	SigAm02	0.0559
	SigAm03	0.0006
Quim10	Quim11	0.0120
Quim12	Quim13	0.6783
	Quim14	0.0460
Quim13	Quim14	0.1207
Quim14	SigAm01	0.0095
	SigAm02	0.1081
SigAm01	SigAm02	0.0004
	SigAm03	0.0073

Tabla Suplementaria 3. Se muestran únicamente aquellos pares de construcciones que fallaron al rechazar la hipótesis nula H_0 ($Pvalue < 0.05/190$). H_0 : las dos construcciones evaluadas provienen de la misma población. Los valores de integral se estandarizaron dividiendo los datos $42^\circ/30^\circ\text{C}$.

LITERATURA CITADA

- Abascal, F., Zardoya, R., y Posada, D. (2005). ProtTest : Selection of best-fit models of protein evolution What can I use ProtTest for ? – Introduction The program : using ProtTest. *Bioinformatics* 21, 1–17. doi:10.1093/bioinformatics/bti263.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., y Lipman, D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2231712>.
- Baldwin, N. E., y Dombroski, A. J. (2001). Isolation and characterization of mutations in region 1.2 of *Escherichia coli* σ 70. *Mol. Microbiol.* 42, 427–437. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02642.x.
- Baldwin, N. E., McCracken, A., y Dombroski, A. J. (2002). Two “wild-type” variants of *Escherichia coli* σ 70: Context-dependent effects of the identity of amino acid 149. *J. Bacteriol.* 184, 1192–1195. doi:10.1128/jb.184.4.1192-1195.2002.
- Baldwin, T., Sakthianandeswaren, A., Curtis, J. M., Kumar, B., Smyth, G. K., Foote, S. J., y Handman, E. (2007). Wound healing response is a major contributor to the severity of cutaneous leishmaniasis in the ear model of infection. *Parasite Immunol.* 29, 501–513. doi:10.1111/j.1365-3024.2007.00969.x.
- Batut, J., Santero, E., y Kustu, S. (1991). *In vitro* activity of the nitrogen fixation regulatory protein FIXJ from *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 173, 5914–5917.
- Bochkareva, A., y Zenkin, N. (2013). The σ 70 region 1.2 regulates promoter escape by unwinding DNA downstream of the transcription start site. *Nucleic Acids Res.* 41, 4565–72. doi:10.1093/nar/gkt116.
- Bowman, W. C., y Kranz, R. G. (1998). A bacterial ATP-dependent, enhancer binding protein that activates the housekeeping RNA polymerase. *Genes Dev.* 12, 1884–1893. doi:10.1101/gad.12.12.1884.
- Breyer, M. J., Thompson, N. E., y Burgess, R. R. (1997). Identification of the epitope for a highly cross-reactive monoclonal antibody on the major sigma factor of bacterial RNA polymerase. *J. Bacteriol.* 179, 1404–1408.
- Brown, T. A. (2002). *Genomes. 2nd.* doi:NBK21128.
- Browning, D., y Busby, S. (2004). The regulation of bacterial transcription initiation.

Nat. Rev. Microbiol. 2, 57–65. doi:10.1038/nrmicro787.

- Buchan, D. W. A., Minneci, F., Nugent, T. C. O., Bryson, K., y Jones, D. T. (2013). Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Res.* 41, 349–357. doi:10.1093/nar/gkt381.
- Camarero, J. A., Shekhtman, A., Campbell, E. A., Chlenov, M., Gruber, T. M., Bryant, D. A., Darst S. A., Cowburn D., y Muir T. W. (2002). Autoregulation of a bacterial sigma factor explored by using segmental isotopic labeling and NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 8536–8541. doi:10.1073/pnas.132033899.
- Campbell, E. A., Muzzin, O., Chlenov, M., Sun, J. L., Olson, C. A., Weinman, O., Trester-Zedlitz M. L., y Darst S. A. (2002). Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. *Mol. Cell* 9, 527–39. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11931761>.
- Capela, D., Barloy-Hubler, F., Gouzy, J., Bothe, G., Ampe, F., Batut, J., Boistard P., Becker A., Boutry M., Cadieu E., Dréano S., Gloux S., Godrie T., Goffeau A., Kahn D., Kiss E., Lelaure V., Masuy D., Pohl T., Portetelle D., Pühler A., Purnelle B., Ramsperger U., Renard C., Thébault P., Vandebol M., Weidner S., y Galibert F. (2001). Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 9877–9882. doi:10.1073/pnas.161294398.
- Caslake, L. F., Ashraf, S. I., y Summers, A. O. (1997). Mutations in the Alpha and Sigma-70 Subunits of RNA Polymerase Affect Expression of the mer Operon. *J. Bacteriol.* 179, 1787–1795.
- Chevreux, B. (2005). MIRA: an automated genome and EST assembler. *Duisbg. Heidelb.*, 1–161. Available at: http://genepool.bio.ed.ac.uk/nextgenbug/_media/meeting/20080603/chevreux_tesis_mira.pdf.
- Chou, H. H., y Holmes, M. H. (2001). DNA sequence quality trimming and vector removal. *Bioinformatics* 17, 1093–104. doi:10.1093/bioinformatics/17.12.1093.
- Cullen, P. J., Kaufman, C. K., Bowman, W. C., y Kranz, R. G. (1997). Characterization of the *Rhodobacter capsulatus* housekeeping RNA polymerase. In vitro transcription of photosynthesis and other genes. *J. Biol. Chem.* 272, 27266–27273. doi:10.1074/jbc.272.43.27266.
- Dombroski, A. J., Walter, W. A., Record, M. T., Slegele, D. A., y Gross, C. A. (1992). Polypeptides containing highly conserved regions of transcription initiation

- factor $\sigma 70$ exhibit specificity of binding to promoter DNA. *Cell* 70, 501–512. doi:10.1016/0092-8674(92)90174-B.
- Dove, S. L., Darst, S. a, y Hochschild, A. (2003). Region 4 of sigma as a target for transcription regulation. *Mol. Microbiol.* 48, 863–874. doi:3467.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797. doi:10.1093/nar/gkh340.
- Elso, C. M., Roberts, L. J., Smyth, G. K., Thomson, R. J., Baldwin, T. M., Foote, S. J., y Handman, E. (2004). Leishmaniasis host response loci (Imr1-3) modify disease severity through a Th1/Th2-independent pathway. *Genes Immun.* 5, 93–100. doi:10.1038/sj.gene.6364042.
- Feklistov, A., y Darst, S. A. (2011). Structural basis for promoter -10 element recognition by the bacterial RNA polymerase σ subunit. *Cell* 147, 1257–1269. doi:10.1016/j.cell.2011.10.041.
- Feklistov, A., Sharon, B. D., Darst, S. A., y Gross, C. A. (2014). Bacterial Sigma Factors: A Historical, Structural, and Genomic Perspective. *Annu. Rev. Microbiol.*, 357–376. doi:10.1146/annurev-micro-092412-155737.
- Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M. J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R. W., Dreano, S., Federspiel, N. A., Fisher, R. F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., Hernández-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R. W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M. L., Kalman, S., Keating, D. H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M. C., Pohl, T. M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thebault, P., Vandenberg, M., Vorholter, F. J., Weidner, S., Wells, D. H., Wong, K., Yeh, K. C., y Batut, J. (2001). The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* (80). 293, 668–672. doi:10.1126/science.1060966.
- Galtier, N., Gouy, M., y Gautier, C. (1996). SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Appl. Biosci.* 12, 543–548. doi:Research Support, Non-U.S. Gov't.
- Gardella, T., Moyle, H., y Susskind, M. M. (1989). A mutant *Escherichia coli* sigma 70 subunit of RNA polymerase with altered promoter specificity. *J. Mol. Biol.* 206, 579–590.

- Gezvain, K. ., y Landick, R. (2004). The structure of bacterial RNA polymerase. *Bact. Chromosom.*, 283–296. doi:10.1038/embor.2009.155.
- González, V., Santamaría, R. I., Bustos, P., Hernández-González, I., Medrano-Soto, A., Moreno-Hagelsieb, G., Chandra Janga, S., Ramirez, M. A., Jimenez-Jacinto, V., Collado-Vides, J. and Davila, G. (2006). The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 3834–3839. doi:10.1073/pnas.0508502103.
- Gruber, T. M., y Gross, C. A. (2003). Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 441–466. doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.090913.
- Guex, N., y Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714–2723. doi:10.1002/elps.1150181505.
- Guindon, S., y Gascuel, O. (2003). A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696–704. doi:10.1080/10635150390235520.
- Harden, T. T., Wells, C. D., Friedman, L. J., Landick, R., Hochschild, A., Kondev, J., y Gelles, J. (2016). Bacterial RNA polymerase can retain $\sigma 70$ throughout transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 201513899. doi:10.1073/pnas.1513899113.
- Harley, C. B., y Reynolds, R. P. (1987). Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 15, 2343–2361.
- Harris, J. D., Heilig, J. S., Martinez, I. I., Calendar, R., y Isaksson, L. A. (1978). Temperature-sensitive *Escherichia coli* mutant producing a temperature-sensitive sigma subunit of DNA-dependent RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 6177–6181. doi:10.1073/pnas.75.12.6177.
- Haugen, S. P., Berkmen, M. B., Ross, W., Gaal, T., Ward, C., y Gourse, R. L. (2006). rRNA Promoter Regulation by Nonoptimal Binding of σ Region 1.2: An Additional Recognition Element for RNA Polymerase. *Cell* 125, 1069–1082. doi:10.1016/j.cell.2006.04.034.
- Haugen, S. P., Ross, W., y Gourse, R. L. (2008). Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 507–19. doi:10.1038/nrmicro1912.

- Hawley, D. K., y McClure, W. R. (1983). Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 11, 2237–55. doi:10.1093/nar/11.8.2237.
- Hernandez, V. J., Hsu, L. M., y Cashel, M. (1996). Conserved region 3 of *Escherichia coli* is implicated in the process of abortive transcription. *J. Biol. Chem.* 271, 18775–18779. doi:10.1074/jbc.271.31.18775.
- Hu, J. C., y Gross, C. A. (1983). Marker rescue with plasmids bearing deletions in *rpoD* identifies a dispensable part of *E. coli* sigma factor. *MGG Mol. Gen. Genet.* 191, 492–498. doi:10.1007/BF00425768.
- Hu, J. C., y Gross, C. A. (1988). Mutations in *rpoD* that increase expression of genes in the *mal* regulon of *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* 203, 15–27. doi:10.1016/0022-2836(88)90087-3.
- Huang, X., Lopez De Saro, F. J., y Helmann, J. D. (1997). σ factor mutations affecting the sequence-selective interaction of RNA polymerase with -10 region single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res.* 25, 2603–2609. doi:10.1093/nar/25.13.2603.
- Hülter, N., y Wackernagel, W. (2008). Double illegitimate recombination events integrate DNA segments through two different mechanisms during natural transformation of *Acinetobacter baylyi*. *Mol. Microbiol.* 67, 984–995. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.06096.x.
- Kahm, M., Hasenbrink, G., Lichtenberg-frate, H., Ludwig, J., y Kschischo, M. (2010). Grofit: Fitting biological growth curves. *J. Stat. Softw.* 33, 1–21. doi:10.1038/npre.2010.4508.1.
- Karls, R. K., Ding Jun Jin, y Donohue, T. J. (1993). Transcription properties of RNA polymerase holoenzymes isolated from the purple nonsulfur bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 175, 7629–7638.
- Keen, N. T., Tamaki, S., Kobayashi, D., y Trollinger, D. (1988). Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene* 70, 191–197. doi:10.1016/0378-1119(88)90117-5.
- Kim, S. K., Makino, K., Amemura, M., Nakata, A., y Shinagawa, H. (1995). Mutational analysis of the role of the first helix of region 4.2 of the sigma 70 subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase in transcriptional activation by activator protein PhoB. *Mol. Gen. Genet. MGG.* 248, 1–8.

- Klocko, A. D., y Wassarman, K. M. (2009). 6S RNA binding to E σ 70 requires a positively charged surface of σ 70 region 4.2. *Mol. Microbiol.* 73, 152–164. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06758.x.
- Korzheva, N., y Mustaev, a (2001). Transcription elongation complex: structure and function. *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 119–125.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Steven Hill, D., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M. 2nd., y Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166, 175–176. doi:10.1016/0378-1119(95)00584-1.
- Kulbachinskiy, A., y Mustaev, A. (2006). Region 3.2 of the σ subunit contributes to the binding of the 3'-initiating nucleotide in the RNA polymerase active center and facilitates promoter clearance during initiation. *J. Biol. Chem.* 281, 18273–18276. doi:10.1074/jbc.C600060200.
- Lee, D. J., Minchin, S. D., y Busby, S. J. W. (2012). Activating transcription in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 66, 125–152. doi:10.1146/annurev-micro-092611-150012.
- Leibman, M., y Hochschild, A. (2007). A sigma-core interaction of the RNA polymerase holoenzyme that enhances promoter escape. *EMBO J.* 26, 1579–1590. doi:10.1038/sj.emboj.7601612.
- Lesley, S. a, y Burgess, R. R. (1989). Characterization of the *Escherichia coli* transcription factor sigma 70: localization of a region involved in the interaction with core RNA polymerase. *Biochemistry* 28, 7728–7734.
- Liao, C., Liao, H., Huang, W., Wang, W., y Chang, B. (2002). The Importance of Region 2 . 1 in Sustaining the Functional Structure of the *Bacillius subtilis* σ A Factor 1. *J. Biochem.* 132, 29–36.
- Liebke, H., Gross, C., Walter, W., y Burgess, R. (1980). A new mutation *rpoD800*, affecting the sigma subunit of *E. coli* RNA polymerase is allelic to two other sigma mutants. *MGG Mol. Gen. Genet.* 177, 277–282. doi:10.1007/BF00267439.
- Mackenzie, C., Choudhary, M., Larimer, F. W., Predki, P. F., Stilwagen, S., Armitage, J. P., Barber, R. D., Donohue, T. J., Hosler, J. P., Newman, J. E., Shapleigh, J. P., Sockett, R. E., Zeilstra-Ryalls, J., y Kaplan, S. (2001). The home stretch, a first analysis of the nearly completed genome of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Photosynth. Res.* 70, 19–41. doi:10.1023/A:1013831823701.

- MacLellan, S. R., MacLean, A. M., y Finan, T. M. (2006). Promoter prediction in the rhizobia. *Microbiology* 152, 1751–63. doi:10.1099/mic.0.28743-0.
- Maeda, H., Fujita, N., e Ishihama, A. (2000). Competition among seven *Escherichia coli* sigma subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 28, 3497–3503. doi:10.1093/nar/28.18.3497.
- Malakooti, J., Shui Ping Wang, y Ely, B. (1995). A consensus promoter sequence for *Caulobacter crescentus* genes involved in biosynthetic and housekeeping functions. *J. Bacteriol.* 177, 4372–4376.
- Mittenhuber, G. (2002). An inventory of genes encoding RNA polymerase sigma factors in 31 completely sequenced eubacterial genomes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4, 77–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11763973>.
- Murakami, K. S. (2002). Structural Basis of Transcription Initiation: An RNA Polymerase Holoenzyme-DNA Complex. *Science (80-)*. 296, 1285–1290. doi:10.1126/science.1069595.
- Nagai, H., y Shimamoto, N. (1997). Regions of the *Escherichia coli* primary sigma factor $\sigma 70$ that are involved in interaction with RNA polymerase core enzyme. *Genes to Cells* 2, 725–734.
- Norlander, J., Kempe, T., y Messing, J. (1983). Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* 26, 101–106. doi:10.1016/0378-1119(83)90040-9.
- Panaghie, G., Aiyar, S. E., Bobb, K. L., Hayward, R. S., y de Haseth, P. L. (2000). Aromatic amino acids in region 2.3 of *Escherichia coli* sigma 70 participate collectively in the formation of an RNA polymerase-promoter open complex. *J. Mol. Biol.* 299, 1217–1230. doi:10.1006/jmbi.2000.3808.
- Paracel/Celera (2006). Trace Tuner . DNA sequencing quality values , base calling and trace processing. 1. Available at: <https://sourceforge.net/projects/tracetuner/?source=navbar>.
- Peano, C., Wolf, J., Demol, J., Rossi, E., Petiti, L., De Bellis, G., Geiselmann, J., Egli, T., Lacour, S., y Landini, P. (2015). Characterization of the *Escherichia coli* $\sigma(S)$ core regulon by Chromatin Immunoprecipitation-sequencing (ChIP-seq) analysis. *Sci. Rep.* 5, 10469. doi:10.1038/srep10469.
- R Development Core Team, R. (2011). *R: A Language and Environment for*

Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>. doi:10.1007/978-3-540-74686-7.

- Ramírez-Romero, M. A., Masulis, I., Cevallos, M. A., González, V., y Dávila, G. (2006). The *Rhizobium etli* $\sigma 70$ (SigA) factor recognizes a lax consensus promoter. *Nucleic Acids Res.* 34, 1470–1480. doi:10.1093/nar/gkl023.
- Ray-Soni, A., Bellecourt, M. J., y Landick, R. (2016). Mechanisms of Bacterial Transcription Termination: All Good Things Must End. *Annu. Rev. Biochem.* 85, annurev-biochem-060815-014844. doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014844.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M. A., y Barrel, B. (2000). Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16, 944–945. doi:10.1093/bioinformatics/16.10.944.
- Sambrook, J., y W Russell, D. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harb. Lab. Press. Cold Spring Harb. NY*, 999. Available at: <http://books.google.com/books?id=YTxKwWUiBeUC&printsec=frontcover&papers2://publication/uuid/BBBF5563-6091-40C6-8B14-06ACC3392EBB>.
- Sanderson, A., Mitchell, J. E., Minchin, S. D., y Busby, S. J. W. (2003). Substitutions in the *Escherichia coli* RNA polymerase $\sigma 70$ factor that affect recognition of extended -10 elements at promoters. *FEBS Lett.* 544, 199–205. doi:10.1016/S0014-5793(03)00500-3.
- Schroeder, L. A., Choi, A. J., y DeHaseh, P. L. (2007). The -11A of promoter DNA and two conserved amino acids in the melting region of $\sigma 70$ both directly affect the rate limiting step in formation of the stable RNA polymerase-promoter complex, but they do not necessarily interact. *Nucleic Acids Res.* 35, 4141–4153. doi:10.1093/nar/gkm431.
- Severinova, E., Severinov, K., Fenyö, D., Marr, M., Brody, E. N., Roberts, J. W., Chait, B. T., y Darst, S. A. (1996). Domain organization of the *Escherichia coli* RNA polymerase sigma 70 subunit. *J. Mol. Biol.* 263, 637–647. doi:10.1006/jmbi.1996.0604.
- Sharp, M., Chan, C., Lu, C., Marr, M., Nechaev, S., Merritt, E. W., Severinov, K., Roberts, J. W., y Gross, C. A. (1999). The interface of sigma with core RNA polymerase is extensive, conserved, and functionally specialized. *Genes Dev.*

13, 3015–3026. doi:10.1101/gad.13.22.3015.

- Shimada, T., Yamazaki, Y., Tanaka, K., e Ishihama, A. (2014). The whole set of constitutive promoters recognized by RNA polymerase RpoD holoenzyme of *Escherichia coli*. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0090447.
- Shultzaberger, R. K., Chen, Z., Lewis, K. A., y Schneider, T. D. (2007). Anatomy of *Escherichia coli* σ 70 promoters. *Nucleic Acids Res.* 35, 771–788. doi:10.1093/nar/gkl956.
- Siegele, D. a, Hu, J. C., y Gross, C. a (1988). Mutations in *rpoD*, the gene encoding the sigma 70 subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, that increase expression of the *lac* operon in the absence of CAP-cAMP. *J. Mol. Biol.* 203, 29–37.
- Strnad, H., Lapidus, A., Paces, J., Ulbrich, P., Vlcek, C., Paces, V., y Haselkorn, R. (2010). Complete genome sequence of the photosynthetic purple nonsulfur bacterium *Rhodobacter capsulatus* SB 1003. *J. Bacteriol.* 192, 3545–3546. doi:10.1128/JB.00366-10.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., y Higgins, D. G. (2002). Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr. Protoc. Bioinformatics* Chapter 2, Unit 2.3. doi:10.1002/0471250953.bi0203s00.
- Vos, M. J., y Kampinga, H. H. (2008). A PCR amplification strategy for unrestricted generation of chimeric genes. *Anal. Biochem.* 380, 338–340. doi:10.1016/j.ab.2008.05.031.
- Waldburger, C., Gardella, T., Wong, R., y Susskind, M. M. (1990). Changes in conserved region 2 of *Escherichia coli* sigma 70 affecting promoter recognition. *J. Mol. Biol.* 215, 267–276. doi:10.1016/S0022-2836(05)80345-6.
- Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. B., Gann, A., Levine, M., Losick, R., y Harrison, S. C. (2013). *Molecular Biology of the Gene*. Seventh. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Wilson, C., y Dombroski, A. J. (1997). Region 1 of σ 70 is required for efficient isomerization and initiation of transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 267, 60–74. doi:10.1006/jmbi.1997.0875.
- Wood, D. W., Setubal, J. C., Kau, R., Monks, D. E., Kitajima, J. P., Okura, V. K., Zhou, Y., Chen, L., Wood, G. E., Almeida, N. F. Jr., Woo, L., Chen, Y., Paulsen, I. T., Eisen, J. A., Karp, P. D., Bovee, D. Sr., Chapman, P., Clendenning, J.,

Deatherage, G., Gillet, W., Grant, C., Kutayavin, T., Levy, R., Li, M. J., McClelland, E., Palmieri, A., Raymond, C., Rouse, G., Saenphimmachak, C., Wu, Z., Romero, P., Gordon, D., Zhang, S., Yoo, H., Tao, Y., Biddle, P., Jung, M., Krespan, W., Perry, M., Gordon-Kamm, B., Liao, L., Kim, S., Hendrick, C., Zhao, Z. Y., Dolan, M., Chumley, F., Tingey, S. V., Tomb, J. F., Gordon, M. P., Olson, M. V., y Nester, E. W. (2001). The Genome of the Natural Genetic Engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* (80-). 294, 2317–2323. doi:10.1126/science.1066804.

Wösten, M. (1998). Eubacterial sigma factors. *FEMS Microbiol. Rev.* 22, 127–150. doi:10.1016/S0168-6445(98)00011-4.

Zhou, L., Lei, X. H., Bochner, B. R., y Wanner, B. L. (2003). Phenotype microarray analysis of *Escherichia coli* K-12 mutants with deletions of all two-component systems. *J Bacteriol* 185, 4956–4972. doi:10.1128/JB.185.16.4956.

Zuo, Y., y Steitz, T. A. (2015). Crystal Structures of the *E. coli* Transcription Initiation Complexes with a Complete Bubble. *Mol. Cell* 58, 534–540. doi:10.1016/j.molcel.2015.03.010.

Dogmatism and skepticism are both, in a sense, absolute philosophies; one is certain of knowing, the other of not knowing. What philosophy should dissipate is certainty, whether of knowledge or ignorance... B. Russell