



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

“Lrp como nuevo regulador del gen *ompS2* en *Salmonella enterica* serovar Typhi”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Médico Cirujano Adrián Izquierdo Marín

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Edmundo Calva Mercado  
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva, Instituto de Biotecnología, UNAM  
Dr. Fernando Esquivel Guadarrama, Facultad de Medicina, UAEM

Ciudad de México. Junio, 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente estudio se realizó en el laboratorio No. 2 del Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en la ciudad de Cuernavaca, Estado de Morelos; bajo la asesoría del Dr. Edmundo Calva Mercado.

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dr. Edmundo Calva Mercado  
Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva  
Dr. Fernando Esquivel Guadarrama

El jurado de Tesis estuvo integrado por:

Dr. Mario Soberón Chávez  
Dra. Claudia Martínez Anaya  
Dra. Susana Brom Klanner  
Dra. Katy Juárez López  
Dr. Daniel Segura González

Durante la realización de este trabajo tuve un apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el número de cuenta 208822.

## **Agradecimientos**

Agradezco a mis padres y hermanos que han sido mi inspiración y apoyo incondicional para realizar y concluir este proyecto, que es una fuente de gran orgullo y desarrollo profesional.

Es claro ver que el camino para concluir esta meta no fue fácil, por lo cual reconozco el apoyo de mis maestros y colaboradores de laboratorio que estuvieron involucrados durante mi formación académica.

Mi agradecimiento especial al Doctor Edmundo Calva Mercado por su confianza para integrarme a su grupo de trabajo y lo mucho que aprendí de él durante el desarrollo de la maestría.

Además, agradezco al M. en C. Marcos Fernández Mora por su tiempo, colaboración y apoyo que me brindo para el desarrollo y conclusión de esta investigación.

# ÍNDICE

	Página
ÍNDICE .....	i
LISTA DE FIGURAS .....	ii
LISTA DE TABLAS .....	ii
I. RESUMEN .....	iii
II. INTRODUCCIÓN .....	1
II.1. Generalidades del género <i>Salmonella</i> .....	1
II.2. El género <i>Salmonella</i> y su importancia biológica .....	1
II.3. <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi .....	3
II.4. Membrana externa de las bacterias Gram negativas .....	3
II.5. Proteínas de membrana externa: porinas .....	4
II.6. Regulación de las porinas .....	5
II.7. OmpS2 de <i>Salmonella</i> Typhi y su región reguladora .....	7
II.8. El sistema de dos componentes EnvZ-OmpR regula el gen <i>ompS2</i> .....	8
II.9. LeuO regula el gen <i>ompS2</i> .....	9
II.10. H-NS regula el gen <i>ompS2</i> .....	10
II.11. Búsqueda de proteínas involucradas en la regulación del gen <i>ompS2</i> .....	11
III. ANTECEDENTES .....	13
III.1 Lrp es un miembro de la familia Lrp/AsnC .....	13
III.2. Lrp como regulador transcripcional .....	14
III.3 Lrp y su importancia biológica .....	15
IV. HIPÓTESIS .....	17
V. OBJETIVOS .....	17
VI. METODOLOGÍA .....	18
VI.1. Cepas y condiciones de cultivo .....	18
VI.2. Extracción y purificación de DNA total de bacteria .....	18
VI.3. Extracción y purificación de DNA de plásmido .....	18
VI.4. Preparación y transformación de células electrocompetentes .....	19
VI.5. Mutagénesis por la técnica de Datsenko y Wanner .....	19
VI.6. Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa de las fusiones <i>ompS2-lacZ</i> , en los diferentes fondos genéticos .....	20
VI.7. Determinación de la concentración de proteínas .....	20
VI.8. Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA) .....	21
VI.9. Experimento de protección a DNAsa (footprinting) con Lrp-His .....	21
VII. RESULTADOS .....	23
VII.1. Obtención de una mutante deletada para <i>lrp</i> .....	23
VII.2. Comparación de las actividades $\beta$ -galactosidasa de las fusiones traduccionales de <i>ompS2-lacZ</i> en los fondos silvestre y mutante en <i>lrp</i> .....	23
VII.3. Unión de Lrp a la región reguladora de <i>ompS2</i> .....	25

VII.4. Protección a la digestión con DNAsa por Lrp-His sobre <i>ompS2</i> .....	26
VIII. DISCUSIÓN .....	29
IX. CONCLUSIONES .....	34
X. PERSPECTIVAS .....	34
XI. APÉNDICE .....	35
XII. REFERENCIAS .....	37

## FIGURAS

Título	Página
Figura 1. La compleja regulación genética de las porinas .....	7
Figura 2. Fusiones traduccionales .....	8
Figura 3. Sitios probables de unión de Lrp a la región reguladora del gen <i>ompS2</i> .....	12
Figura 4. Localización esquemática del gen <i>lrp</i> en el genoma de <i>S. Typhi</i> CT18 .....	14
Figura 5. Representación gráfica de la actividad $\beta$ -galactosidasa de la fusión <i>-413-lacZ</i> , comparando las cepas IMSS1 e IMSS112 .....	24
Figura 6. Representación gráfica de la actividad $\beta$ -galactosidasa de la fusión <i>-97-lacZ</i> , comparando las cepas IMSS1 e IMSS112 .....	25
Figura 7. Ensayo de movilidad electroforética (EMSA) del fragmento del gen <i>ompS2</i> de <i>Salmonella Typhi</i> .....	26
Figura 8. Ensayo de protección a la digestión con DNAsa del fragmento del gen <i>ompS2</i> de <i>Salmonella Typhi</i> .....	28
Figura 9. Alineamiento de las secuencias LrpI y LrpII del gen <i>ompS2</i> .....	32
Figura 10. Modelo esquemático del mecanismo de activación y de represión de la transcripción del gen <i>omps2</i> .....	33

## TABLAS

Título	Página
Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo .....	22
Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo .....	22
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo .....	22

## I. Resumen

OmpS2 de *Salmonella enterica* serovar Typhi es una proteína de membrana externa que pertenece al grupo de las porinas, con la característica de que su expresión es baja cuando se ocupan las condiciones normales de laboratorio. Se ha demostrado que OmpS2, está relacionada con los procesos de virulencia y de citotoxicidad reportados en una infección por *Salmonella enterica* [Rodríguez-Morales *et al*, 2006], además se demostró que es un antígeno que induce respuesta inmunitaria en el huésped frente a una infección por *Salmonella enterica* [Moreno-Eutimio *et al*, 2013].

En este trabajo se describe la generación de una cepa de *Salmonella enterica* serovar Typhi a la que se le eliminó el gen *lrp*, para realizar estudios de regulación genética sobre la expresión del gen *ompS2*, utilizándose las fusiones traduccionales -97-*lacZ* (corta) y -413-*lacZ* (larga) de la región reguladora del gen *ompS2*, reportadas por Fernández-Mora en el 2004. Se encontró que la actividad  $\beta$ -galactosidasa de ambas fusiones *ompS2-lacZ* en la cepa carente del gen *lrp*, presentan un incremento de dos a tres veces en comparación a lo observado en la cepa silvestre. Posteriormente, se demostró que la proteína Lrp se une a dos sitios en la región reguladora del gen *ompS2* que va del -85 al -7, a) Primero en LRPI que va del -7 al -42 pb, secuencia que se encuentra el promotor, ya que la unión de Lrp a esta región impide la unión de la RNA polimerasa y de esta manera inhibe la transcripción del gen, b) Segundo en LRPII que va del -53 al -85 pb, se une a una secuencia río arriba del promotor, Lrp al unirse a esta región intensificará el efecto inhibitorio de Lrp sobre el promotor ya que permitirá la formación del octámero y no permitirá la unión y la subsecuente actividad de la RNA polimerasa y de este modo evita la transcripción.

Con estos resultados creemos que Lrp se une inicialmente a los sitios LRP-I y LRP-II de forma específica, unión que genera que el DNA se curve, causando el reacomodo de los arreglos estructurales de toda la región reguladora; dicha curvatura incrementaría la afinidad de Lrp a secuencias no específicas cercanas, observándose un efecto de cooperatividad, lo cual contribuiría a que el DNA envuelva a una molécula de Lrp en estado multimérico; con el cual se inhibiría la transcripción del gen *ompS2*. Para terminar de comprender los mecanismos de regulación de Lrp sobre el gen *ompS2*, es necesario realizar más experimentos complementarios.

## **II. Introducción**

### **II.1. Generalidades del género *Salmonella***

*Salmonella* es un género de bacterias, que pertenece a la clase de las  $\gamma$ -*Proteobacteria*, orden Enterobacteriales y a la familia *Enterobacteriaceae* [Garrity *et al*, 2001]. En la actualidad, este género agrupa dos especies que son; *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica* y a su vez, la especie *Salmonella enterica* se divide en seis subespecies, que son; *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (III a), *diarizonae* (III b), *houtenae* (IV) e *indica* (VI). Es importante recalcar que en la subespecie *enterica* (I) se encuentran los serotipos con importancia clínica, tanto para humanos como para animales de producción. Los serotipos del género *Salmonella* han sido clasificados de acuerdo al esquema de serotipificación generado por Kauffmann-White, en el que se consideran los antígenos: capsular (Vi), flagelar (H) y somático “O” [Brenner *et al*, 2000; Calva and Calva, 2009; Crosa *et al*, 1973; Faucher, *et al*, 2005; Reeves *et al*, 1989 y Scherer and Miller, 2001].

El género *Salmonella* puede causar diversos cuadros clínicos en el ser humano, como son: enteritis infecciosa, fiebre entérica u otras infecciones sistémicas con focos extra intestinales, por ejemplo: neumonía, meningitis, artritis, infección en vías urinarias, piel y tejido celular subcutáneo. Tal diversidad de cuadros clínicos depende del serotipo infectante. Las serovariantes del género *Salmonella* que presentan resistencia a más de un antibiótico, están asociadas con un incremento del riesgo de desarrollo de un cuadro invasivo o hasta la muerte [Braunwald *et al*, 2002; Ohl *et al*, 2001 y Wilson *et al*, 2002].

### **II.2. El género *Salmonella* y su importancia biológica**

El género *Salmonella* ha sido ampliamente estudiado y la *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, al producir en el ratón una infección parecida a la causada por Typhi (*Salmonella* Typhi) en humanos, es el serovar que con mayor frecuencia se ha utilizado como modelo para estudiar los mecanismos moleculares con los cuales *Salmonella* produce la infección. Entre las líneas de investigación más importantes están las siguientes:

- Estudios epidemiológicos; realizados por Zaidi y colaboradores en los cuales se determinó la resistencia a antimicrobianos y la prevalencia del género *Salmonella* en humanos, animales y alimentos [Zaidi *et al*, 2006, 2007 y 2008].
- Estudios genéticos; con estos estudios se determinó la secuencia completa de los genomas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 [McClelland *et al*, 2001] y *Salmonella enterica* serovar Typhi, tanto CT18 [Parkhill *et al*, 2001] como TY2 [Deng *et al*, 2003]. Hasta la fecha se han secuenciado 19 genomas de la subespecie *Salmonella enterica* y están en proceso de ser secuenciados otros.
- Estudios inmunológicos; realizados para valorar los mecanismos moleculares con los cuales el sistema inmune del huésped hace frente a la infección por *Salmonella* [Mittrücker *et al*, 2000], como los realizados por Moreno-Eutimio en el 2013, por Secundino en el 2005 y por Verdugo-Rodríguez en 1993, que los tres sirvieron para valorar la respuesta inmunológica desarrollada por el huésped contra las porinas de *Salmonella* [Moreno-Eutimio *et al*, 2013; Secundino *et al*, 2005 y Verdugo-Rodríguez *et al*, 1993].
- Estudios de regulación genética de los factores de virulencia; con estos estudios se analizó la relación de las porinas con la virulencia de *Salmonella*, como el realizado por Rodríguez-Morales en el 2006, en donde se demostró que la doble mutante en *ompS1* y *ompS2* presenta una importante atenuación de la virulencia de *Salmonella* Typhimurium en el ratón [Rodríguez-Morales *et al*, 2006], también existen otros estudios que analizaron los factores de virulencia [Atlung e Ingner, 1997; Baek *et al*, 2009; Kim *et al*, 2003; Lucchini *et al*, 2006 y Navarre *et al*, 2006].
- Estudios de regulación genética de otros sistemas, con estos estudios se han analizado la regulación de: sistemas de dos componentes [De la Cruz y Calva, 2010; Fernández-Mora *et al*, 1995 y 2004; Flores-Valdez *et al*, 2003; Martínez-Flores *et al*, 1999 y Oropeza *et al*, 1999], vías metabólicas [Kim *et al*, 2003], sistemas de respuesta contra el estrés [Fernández-Mora *et al*, 1995 y 2004; Lee *et al*, 2007 y Oropeza *et al*, 1999], islas de patogenicidad [Haraga *et al*, 2008 y Ohl *et al*, 2001].

### **II.3. *Salmonella enterica* serovar Typhi**

*Salmonella* Typhi es el agente causal de la fiebre entérica, también referida como tifoidea, que es una infección sistémica, que se encuentra mundialmente diseminada, siendo endémica en países que presentan sobrepoblación, servicios básicos de salud deficientes, servicios inadecuados de eliminación de desechos y deficiencias en el tratamiento y distribución de agua potable. Por lo que se ha estimado que su incidencia varía entre 13 y 17 millones de casos en todo el mundo y que es causa de unas 600 000 muertes anuales. La fiebre entérica puede afectar a cualquier sexo y a cualquier edad, aunque en áreas endémicas afecta principalmente a niños y adultos jóvenes [Braunwald *et al*, 2002; Crump *et al*, 2004 y Wilson *et al*, 2002].

Para producir infección por *Salmonella* Typhi, se requiere de una dosis infectiva que varía de  $1 \times 10^3$  a  $1 \times 10^6$  bacterias por inóculo y de un período de incubación que varía de 3 a 21 días posteriores al consumo de agua o alimentos contaminados con heces fecales de individuos enfermos en fase aguda o crónica de la enfermedad. Las bacterias llegan al estómago en donde, al resistir el efecto del ácido clorhídrico, pasan al intestino delgado y cruzan la capa mucosa a través de las células M de la placa de Peyer. A este nivel *Salmonella* Typhi es fagocitada por los macrófagos, lugar en donde sobreviven y se diseminan a todo el sistema reticuloendotelial. La lesión histológica clásica de la fiebre entérica es un infiltrado de células mononucleares e hipertrofia del sistema reticuloendotelial, que incluye las placas intestinales de Peyer, nódulos linfáticos mesentéricos, bazo, hígado y médula ósea. Los signos y síntomas de la fiebre entérica son: fiebre, malestar general, cefalea, mialgias, salpullido generalizado, hepatoesplenomegalia, dolor abdominal tipo cólico y diarrea no inflamatoria o estreñimiento [Braunwald *et al*, 2002; Haraga *et al*, 2008; Ohl *et al*, 2001 y Wilson *et al*, 2002].

### **II.4. Membrana externa de las bacterias Gram negativas.**

Las bacterias del género *Salmonella*, como el resto de las gram negativas, se encuentran envueltas por dos membranas lipídicas, las cuales son denominadas como membrana externa e interna que forman una barrera semipermeable con las siguientes funciones: a) proteger a la bacteria de su medio ambiente hostil; b) intercambiar material y

estímulos con su medio ambiente [Buechner *et al*, 1990; Delcour *et al*, 2009; Jap *et al*, 1996; Koebnik *et al*, 2000; Nikaido y Vara, 1985 y Nikaido, 2003].

Cada membrana se encuentra conformada por una composición variada de:

- a) Lípidos.- la membrana interna y la capa interna de la membrana externa están compuestas exclusivamente por fosfolípidos (80% de fosfatidiletanolamina, 15% de fosfatidilglicerol y 5% de cardiolipina) distribuidos equitativamente entre las capas, esto difiere de lo encontrado en la capa externa de la membrana externa, que está compuesta únicamente por lipopolisacáridos [Buechner *et al*, 1990; Delcour *et al*, 2009; Jap *et al*, 1996; Koebnik *et al*, 2000 y Nikaido y Vara, 1985].
- b) Proteínas.- aproximadamente el 50% de la masa molecular de ambas membranas están compuestas de diferentes tipos de proteínas, las cuales desempeñan diversas funciones. En la membrana interna se presentan proteínas estructurales, que están conformadas por cadenas  $\alpha$ -hélice, mientras que la membrana externa presenta lipoproteínas, proteínas de membrana externa y por último están las proteínas formadoras de canal o porinas, las cuales presentan una estructura intramembrana en barril  $\beta$  [Buechner *et al*, 1990; Delcour *et al*, 2009; Koebnik *et al*, 2000; Nikaido y Vara, 1985; Nikaido, 2003 y Santiviago *et al*, 2003].

## **II.5. Proteínas de membrana externa: porinas**

Las porinas forman poros de difusión general que permiten el paso de moléculas hidrofílicas menores a 600 daltons. Algunas porinas presentan un grado bajo de selectividad a sustrato (cationes y aniones), mientras que otras presentan un alto grado de selectividad, como LamB y Tsx (maltodextrina y nucleótidos respectivamente). Las porinas están compuestas por homotrímeros y cada monómero está empotrado en la membrana con la forma de un barril  $\beta$ , el cual contiene un número de hojas que varían entre 8 y 22 y con una media de 16 por monómero [Delcour *et al*, 2009; Jap *et al*, 2006; Koebnik *et al*, 2000 y Nikaido, 2003].

La comparación de las secuencias de los miembros de las porinas, muestra que en las hojas  $\beta$  se encuentran aminoácidos conservados y que las regiones expuestas presentan una elevada variabilidad, no solo a nivel de secuencia sino también en longitud [Jap *et al*, 2006; Koebnik *et al*, 2000 y Nikaido, 2003].

## II.6. Regulación de las porinas

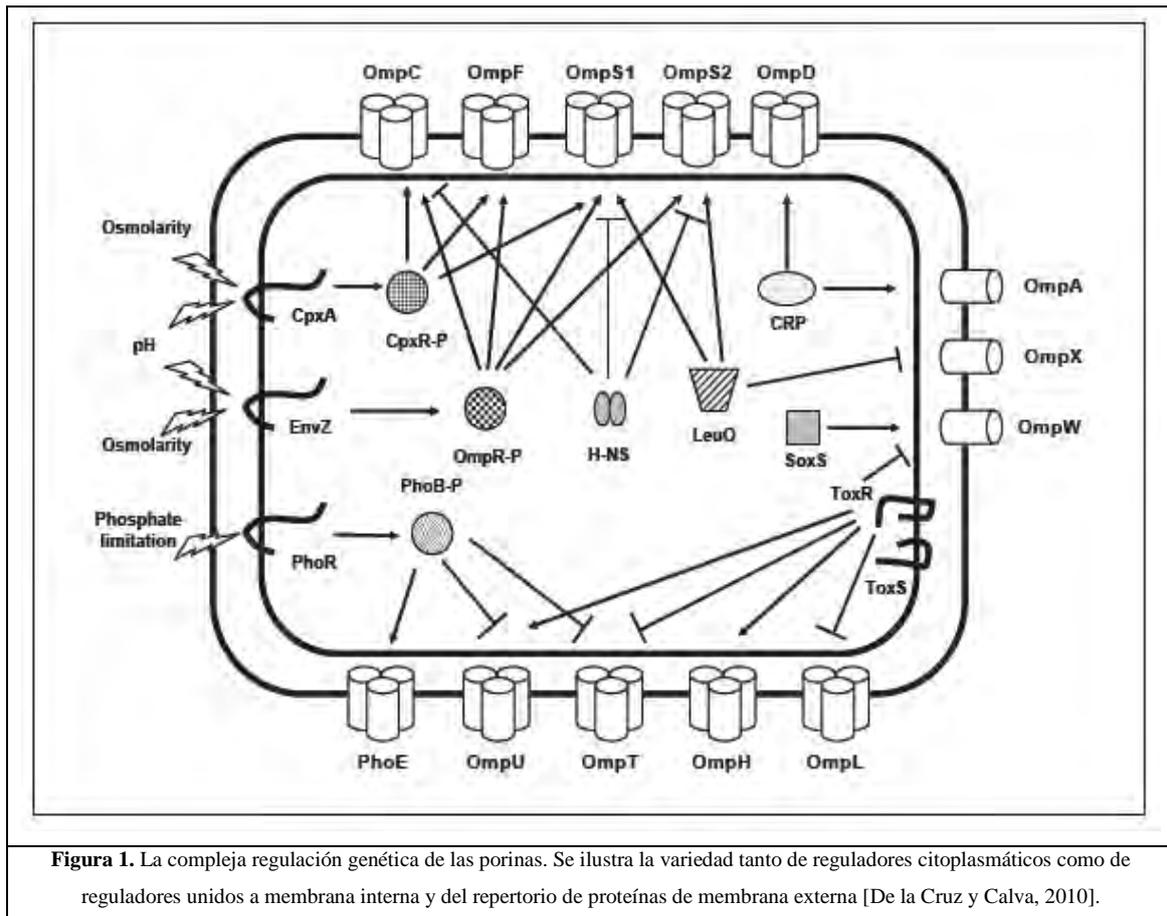
Hay una gran cantidad de estudios y que continuamente se acrecenta, analizando la regulación transcripcional de los genes que codifican para las porinas, permitiéndonos conocer los factores transcripcionales que regulan positiva o negativamente a las porinas y cuales son los estímulos que las regulan [De la Cruz y Calva, 2010].

El primer regulador en ser estudiado fue OmpR, considerado como el regulador maestro de la expresión de diferentes porinas y en la actualidad se conoce una múltiple variedad de porinas y de sus reguladores [De la Cruz y Calva, 2010].

A continuación se presentan los reguladores transcripcionales que regulan la expresión de las diferentes porinas [De la Cruz y Calva, 2010]:

- **Porina *ompC* de *Escherichia coli*.** Las proteínas que la regulan de forma directa son: OmpR (de igual forma se realizó el análisis en *Salmonella Typhi*), CpxR, Lrp, IHF, H-NS y de forma indirecta: CRP, CadC (solamente se analizó en *Salmonella Typhimurium*). Los sRNA que regulan su transcrito son; *micC*, *ipeX* y *rseX*.
- **Porina *ompF* de *Escherichia coli*.** Los reguladores que actúan de forma directa son; OmpR (de igual forma se analizó en *Salmonella Typhi*), CpxR, H-NS, IHF, NsrR y de forma indirecta CRP, CadC (solamente se analizó en *Salmonella Typhimurium*), Lrp, Rob, MarA y SoxS. Los sRNA que regulan su transcrito son; *micF* e *ipeX*.
- **Porina *ompA* de *Escherichia coli*.** Los reguladores que actúan de forma indirecta son; CRP y PhoB (solo se analizó en *Vibrio cholerae*). Y los sRNA que regulan su transcrito son; *micA* y *rseX*.

- **Porina *ompS1* de *Salmonella Typhi*.** Los reguladores que actúan de forma directa son; OmpR, H-NS, StpA y LeuO.
- **Porina *ompS2* de *Salmonella Typhi*.** Los reguladores que actúan de forma directa son; OmpR, H-NS y LeuO.
- **Porina *phoE* de *Escherichia coli*.** PhoB es la proteína que la regula de forma directa.
- **Porina *ompX* de *Salmonella Typhi*.** Los reguladores que actúan de forma directa son LeuO y OmpR (solo se analizó en *Enterobacter aerogenes*) y de forma indirecta CRP. Y *cyaR* es el sRNA que regula su transcrito.
- **Porina *ompW*.** El regulador que actúa de forma directa es SoxS (solo se analizó en *Salmonella Typhimurium*) y de forma indirecta es ToxR (solo se analizó en *Vibrio cholerae*).
- **Porina *ompD* de *Salmonella Typhimurium*.** Los reguladores que actúan de forma directa son CRP y Fnr. *invR* es el sRNA que regulan su transcrito.
- **Porinas *ompU* y *ompT* de *V. cholerae*.** El regulador que actúa de forma directa es ToxR y de forma indirecta PhoB.
- **Porinas *ompH* y *ompL* de *Photobacterium*.** El regulador que actúa de forma directa es ToxR. Ver figura 1. [De la Cruz y Calva, 2010]

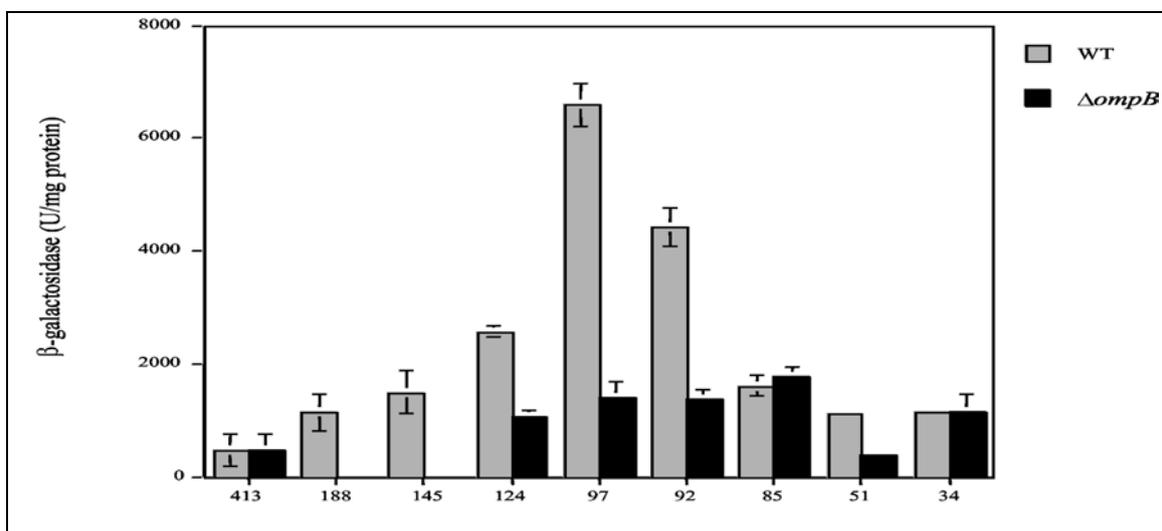


## II.7. OmpS2 de *Salmonella Typhi* y su región reguladora

La porina OmpS2 está codificada por el gen *ompS2*. El marco abierto de lectura de *ompS2* es de 1152 pares de bases, codifica para una proteína estructural de 362 aminoácidos con un peso molecular de 40,043 daltones y un péptido líder de 21 aminoácidos [Fernández-Mora *et al*, 2004].

La región reguladora del gen *ompS2*, comprende un segmento de 491 pb que va de la posición -413 a la +78 pb. Se generaron fusiones traduccionales al gen *lacZ*, limitándose la longitud de la región reguladora en el extremo 5', resultando los siguientes segmentos: -188, -145, -124, -97, -92, -85, -51 y -34 (Ver figura 2). Estas fusiones fueron evaluadas en un fondo de *Salmonella Typhi* IMSS1, obteniéndose los siguientes datos: un aumento de diez veces cuando se removían de la región reguladora los primeros 316 pb (del -413 al -97) y una disminución de cuatro veces cuando se removían los siguientes 12 pb (del -97 al -85). Estos datos sugieren que la región de

-413 al -97 pb está involucrada en la regulación negativa y una región desde el -97 al -85 pb involucrada en la regulación positiva [Fernández-Mora *et al*, 2004].



**Figura 2.** Fusiones traduccionales. La actividad del gen *ompS2* depende tanto de la longitud de la región reguladora como de la regulación directa de los productos del operón *ompB*. La actividad  $\beta$ -galactosidasa específica presentada por las fusiones transcripcionales, los cuales contienen diferentes segmentos de la región reguladora que varían en su longitud en el extremo 5' y que son constantes en su extremo 3'. En las barras grises se muestra las actividades presentadas en la cepa *Salmonella* Typhi IMSS1 (silvestre) y en las barras negras la cepa isogénica *Salmonella* Typhi IMSS81 ( $\Delta ompB::Km$ ). [Fernández-Mora *et al*, 2004]

En el laboratorio se determinó que las siguientes proteínas regulan al gen *ompS2*: a) Sistema de dos componentes EnvZ-OmpR, b) LeuO, c) H-NS [Fernández-Mora *et al*, 2004 y Datos aún no publicados].

## II.8. El sistema de dos componentes EnvZ-OmpR regula el gen *ompS2*

El sistema de dos componentes EnvZ-OmpR en Enterobacterias, se encuentra compuesto por EnvZ que es una proteína detectora de membrana interna (histidina quinasa), con la función de modificar el estado de fosforilación de OmpR (OmpR-P  $\leftrightarrow$  OmpR) que es una proteína reguladora de respuesta. OmpR presenta dos dominios; el amino-terminal exhibe un sitio de fosforilación (D55) y el carboxilo-terminal que posee un dominio de unión al DNA. El sistema regula los siguientes procesos: síntesis de porinas, quimiotaxis y procesos de virulencia. Entre las señales ambientales que activan el sistema están pH, osmolaridad, temperatura, nutrientes y toxinas. Un medio de cultivo con elevada osmolaridad incrementará la cantidad de OmpR-P, observándose el efecto contrario en un medio con baja osmolaridad [De la Cruz y Calva, 2010 y

Fernández-Mora et al, 1995 y 2004]. La porina OmpF presenta expresión baja en un medio con alta osmolaridad y un incremento de la misma en un medio con baja osmolaridad, efectos observados tanto en el género *Salmonella* como en *Escherichia coli*. La expresión de OmpC varía dependiendo de la cepa, para *Escherichia coli* se observa incremento de expresión en un medio con alta osmolaridad y decremento con baja osmolaridad, mientras el género *Salmonella* no presenta osmoregulación [De la Cruz y Calva, 2010; Fernández-Mora et al, 1995 y 2004; Martínez-Flores et al, 1999; Oropeza et al, 1999; Pratt et al, 1996 y Puente et al, 1991]. Los trabajos realizados por Fernández-Mora (1995 y 2004) y Oropeza (1999), demostraron que el sistema EnvZ/OmpR regula positivamente la expresión de los genes de las porinas *ompS1* y *ompS2* [Fernández-Mora et al, 1995 y 2004 y Oropeza et al, 1999].

## II.9. LeuO regula el gen *ompS2*

LeuO es un regulador global tipo LysR que se encuentra presente en todos los miembros de la familia *Enterobacteracea*. LeuO es una proteína con un dominio amino-terminal con la función de unirse a DNA. Esta proteína participa en la respuesta bacteriana al estrés, en virulencia, en formación de biopelícula y regula a los operones *bgl* (regula el ingreso y el metabolismo de los  $\beta$ -glucósidos), *c adAB* (Sistema de resistencia a los ácidos dependiente de lisina), *dsrA* (Activador de RpoS) y *rovA* (Aminopeptidasa) [De la cruz y Calva, 2010; Fernández-Mora et al, 2004 y Hernández-Lucas et al, 2008]. Shimada y colaboradores (2009), demostraron a través de la técnica de western blot, que la expresión de LeuO en *E. coli*, se incrementó en medio mínimo y en la fase estacionaria de crecimiento; además, a través de la técnica de northern blot, se determinó que los niveles de expresión de LeuO presentados por la cepa silvestre no son suficientes para incrementar la presencia de mRNA de los genes *yjjQ*, *bglJ*, *yjjP*, *acrE*, *acrF*, *yjcR*, *yjcP*, *ygcL*, *ygbF*, *r hsD*, *vid*, *fepE* y *gltF* y solamente al sobre-expresar LeuO, se observó el incremento de dichos mRNA [Shimada et al, 2009]. Fernández-Mora (2004) y De la Cruz (2007), observaron un importante incremento en la expresión de *ompS1* y de *ompS2* cuando se sobre-expresaba LeuO en un fondo silvestre. Además, determinaron que al sobre-expresar LeuO en un fondo mutante en OmpR no se encontró tal efecto [Fernández-Mora et al, 2004 y De la cruz et al, 2007]. Estos datos sugieren lo siguiente: 1) la inducción de la expresión de OmpS1 y OmpS2 requiere la presencia de

LeuO, 2) para que LeuO regule de forma positiva la expresión tanto de *ompS2* como de *ompS1* se requiere la presencia de OmpR-P, 3) concentraciones altas de LeuO activan *ompS2* y reprimen a *ompS1* y solamente para concentraciones muy altas de LeuO, *ompS1* se activa y *ompS2* se reprime. Hernández-Lucas (2008), a través de un análisis proteómico, encontraron que LeuO en *Salmonella* Typhi, también regula varios genes, encontrando un incremento en: OmpS1, OmpS2, AssT y el operón CRISPR, mientras que causa un decremento en: OmpX, Tpx y STY1978 [Calva y Calva, 2009; De la Cruz *et al*, 2007; De la Cruz y Calva, 2010; Fernández-Mora *et al*, 2004 y Hernández-Lucas *et al*, 2008].

## **II.10. H-NS regula el gen *ompS2***

H-NS es un regulador global en bacterias gram negativas, caracterizándose por su unión a secuencias ricas en residuos AT y/o regiones que presentan segmentos curvos [Atlung and Ingner, 1997; Flores-Valdez *et al*, 2003; Lucchini *et al*, 2006 y Navarre *et al*, 2006]. Lucchini y colaboradores (2006), encontraron que H-NS de *Salmonella* Typhimurium se une a 422 regiones del DNA cromosomal, que representa un total de 746 genes, además encontraron que la RNA polimerasa no se unía a los promotores de los genes que interactuaban con H-NS, demostrando que H-NS inhibe la transcripción de los genes estudiados [Lucchini *et al*, 2006]. Navarre y colaboradores (2006), a través de la técnica de microarreglos de cDNA, analizaron la expresión del genoma de *Salmonella* Typhimurium, tanto en cepa silvestre y mutante en *hns*, encontrando que 176 genes (4%) y 409 (9%) presentaron disminución y aumento en su expresión en la mutante en *hns*, respectivamente. Cuarenta de 409 genes se encuentran presentes en todas las enterobacterias, esto contrasta con los 265 de 409 genes que se encuentran presentes solamente en el género *Salmonella* [Navarre *et al*, 2006].

Flores-Valdez y colaboradores en el año 2003, a través de la técnica de mutagénesis al azar con el transposón *mariner*, encontraron que una cepa mutante en *hns* incrementa diez veces la expresión de la fusión *ompS1-lacZ* respecto a la cepa silvestre. Además, al complementar esta cepa con el gen *hns*, observaron la recuperación del fenotipo silvestre y determinaron además que H-NS se une en los nucleótidos -310 a -88 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción [Flores-Valdez *et al*, 2003]. Posteriormente,

en nuestro laboratorio se determinó el aumento de tres veces en la expresión de la fusión *ompS2-lacZ* en el fondo mutante deficiente en H-NS [Fernández-Mora, datos no publicados y Flores-Valdez *et al*, 2003].

Los estudios de regulación realizados en la región reguladora del gen *ompS2* (fusión traduccional *-413-lacZ*) con los activadores OmpR, LeuO y con el inhibidor H-NS, no mostraron el máximo efecto de actividad para el gen, como lo demostró Fernández-Mora en el 2004 y en estudios posteriores, para la fusión *-97-lacZ* [Fernández-Mora *et al*, 2004 y datos no publicados]. Por lo que se requiere realizar la búsqueda de otros reguladores transcripcionales del gen *ompS2*.

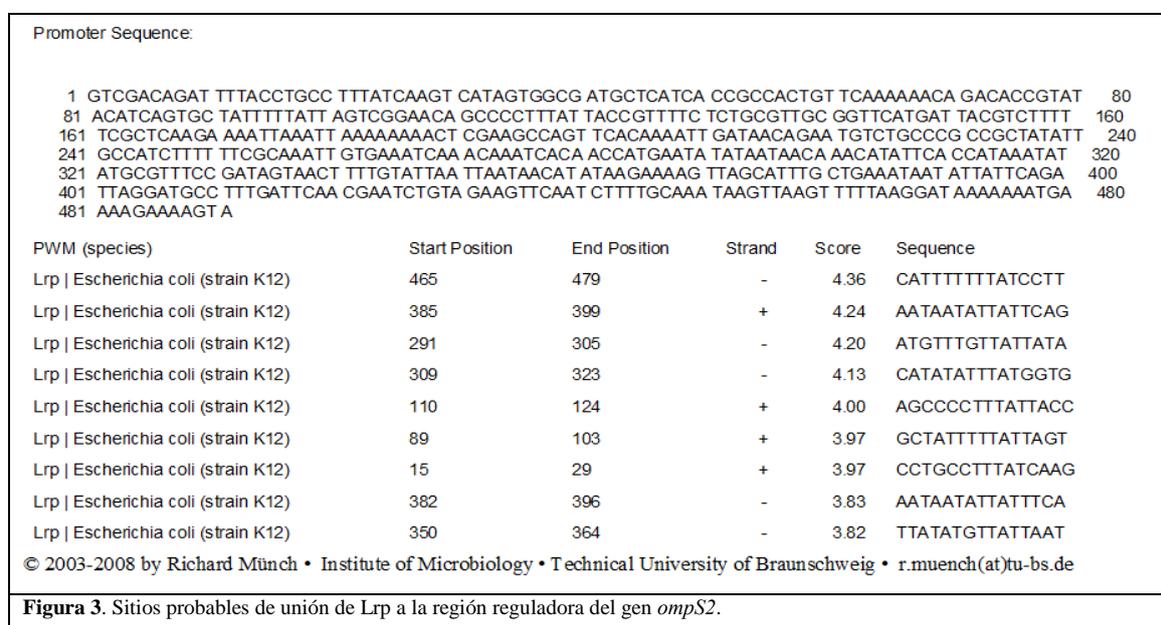
El efecto generado por las proteínas OmpR, LeuO (activación) y H-NS (represión) sobre la región reguladora *ompS2*, es de un efecto parcial, por lo que se requiere realizar la búsqueda de los otros reguladores o de sus estímulos, tanto en la activación como en la inhibición de su expresión.

## **II.11. Búsqueda de proteínas involucradas en la regulación del gen *ompS2*.**

Con el objetivo de determinar sitios de unión a proteínas reguladoras para el gen *ompS2*, en el laboratorio, se realizó un análisis de la región reguladora del gen. El análisis se realizó con el método bioinformático reportado por Münch y colaboradores en el 2005 [Münch *et al*, 2005]. Se identificaron probables sitios de unión para: ArcA, CRP, H-NS, IclR, IHF, Lrp, Nac y OmpR, lo que sugiere que la región regulatoria de *ompS2* de *Salmonella Typhi* presenta varias secuencias consenso para una amplia variedad de reguladores, entre los que sobresalen los siguientes grupos de proteínas: a) las que se ha demostrado de manera experimental su interacción con el gen, como son H-NS, OmpR y ArcA, b) las que ya fueron valoradas y bajo las condiciones establecidas en nuestro laboratorio no se demostró su interacción, como son IHF y CRP, c) las que no se han valorado y que no hay evidencia experimental que regulen porinas, como son IclR, Nac; d) y la proteína que falta por valorar es Lrp; la cual regula directamente a las porinas OmpC y OmpF de *Escherichia coli* [Ferrario *et al*, 1995]. Además, Lrp activa la expresión del gen *ilvIH* de *Salmonella Typhi* y este a su vez por el mecanismo de relevo de promotor activa la expresión de la transcripción del gen *leuO*, resaltando que LeuO

es la proteína que activa la expresión de *ompS2* [Fang *et al*, 1998; Lilley and Higgins, 1991; Wang and Calvo, 1993 y Wang *et al*, 1993].

Posteriormente, se analizaron las secuencias de unión de Lrp para el gen *ompS2*, encontrando 9 probables sitios de unión, las cuales se incluyen en tres regiones importantes de la región reguladora del gen *ompS2*: a) secuencias río abajo del inicio de la transcripción que va del +52 al +66 pb, b) secuencias que comprenden al promotor, se encontraron dos secuencias que comparten a la misma región, la cual va del -15 al -32 pb y c) secuencias río arriba del promotor, se encontraron seis probables sitios de unión que van del -50 al -64 pb; del -91 al -105 pb, del -109 al -123 pb, del -290 al -304 pb, del -311 al -325 pb y del -385 al -399 pb (Figura 3). Lo que estos datos sugieren es que la interacción de Lrp con estas secuencias bloquean la unión de la RNA polimerasa al promotor, impidiendo la transcripción del gen. Es importante establecer que Lrp requiere varios sitios de unión a sus genes blancos como se puede observar en los casos de *ompC-micF* de *Escherichia coli* [Ferrario *et al*, 1995], *fimZ*, *pefB* y *spvA* de *S. Typhimurium* [Baek *et al*, 2009]. Derivado de estos datos creemos que el regulador Lrp es un regulador transcripcional del gen *ompS2*.



### III. Antecedentes

El género *Salmonella* como el resto de los procariontes, dentro de su genoma contienen información, que codifica para una vasta complejidad de proteínas que tienen la función de regular la transcripción de una amplia variedad de genes de forma tanto local como global, la expresión de dichos genes les permite a las bacterias coordinar las respuestas celulares a una extensa diversidad de estímulos tanto endógenos como exógenos [Unoarumhi *et al*, 2016; Wang and Calvo, 1993 y Wang *et al*, 1993].

#### III.1. Lrp es un miembro de la familia Lrp/AsnC

Proteína reguladora de respuesta a Leucina (Lrp), es un importante regulador global de la transcripción, además de que es el arquetipo de la familia de Lrp/AsnC, familia que está compuesta por los homólogos, ortólogos y parálogos de los reguladores AsnC, YbaO y Lrp. Esta familia se encuentra distribuida y conservada en una amplia variedad de arqueas y bacterias [Baek *et al*, 2009; Brinkman *et al*, 2003; Calvo *et al*, 1994; Cho *et al*, 2008; Mc Farland and Dorman, 2008; Tani *et al*, 2002; Unoarumhi *et al*, 2016; Wang and Calvo, 1993 y Yokoyama *et al*, 2005].

Los integrantes de esta familia son proteínas con un tamaño aproximado de 163 aminoácidos. AsnC y sus homólogos son considerados reguladores locales; ya que en ausencia de asparagina en el medio, AsnC regula positivamente a *asnA*, que está relacionado con la biosíntesis de asparagina [de Wind *et al*, 1985 y Yokoyama *et al*, 2005]; Grp es un ortólogo de YbaO, que tiene la función de regular el ingreso de la glutamina al interior de *Zymomonas mobilis* [Peekhaus *et al*, 1995 y Yokohama *et al*, 2005]. Mientras, que Lrp de *Escherichia coli* y sus homólogos del resto de las enterobacterias presentan un efecto de regulación global, ya que activan o inhiben la transcripción de un mayor número de genes, en la mayoría de los casos la regulación depende de la disponibilidad extracelular de leucina [Brinkman *et al*, 2003, Calvo *et al*, 1994; Cho *et al*, 2008; Mc Farland *et al*, 2008; Unoarumhi *et al*, 2016; Wang and Calvo, 1993 y Wang *et al*, 1993].

La característica estructural que presenta esta familia de reguladores es que tiene tres segmentos; el primero es el amino-terminal, que es un dominio hélice-vuelta-hélice (HTH) con la función de unirse al DNA, el segundo es el segmento medio, con la función de estimular la actividad transcripcional y el tercero es el carboxi-terminal que es el sensor al aminoácido [Brinkman *et al*, 2003, Hart *et al*, 2011; Platko and Calvo, 1993; Wang and Calvo, 1993 y Wang *et al*, 1993]. El estado multimérico de los miembros de esta familia es variable, se pueden encontrar en dímero, tetrámero, octámero o hexadecámero [Brinkman *et al*, 2003; Chen *et al*, 2001 y Unoarumhi *et al*, 2016].

### III.2. Lrp como regulador transcripcional

El gen *lrp* (STY0957 en *Salmonella* Typhi CT18) se localiza entre los genes *ftsK* (proteína de división celular) y *trxB* (proteína tioredoxin reductasa). El gen *lrp* tiene una longitud de 495 pb y codifica para un péptido de 164 aminoácidos [Brinkman, *et al*, 2003; Friedberg *et al*, 1995 y Parkhill, *et al*, 2001]. Ver figura 4.

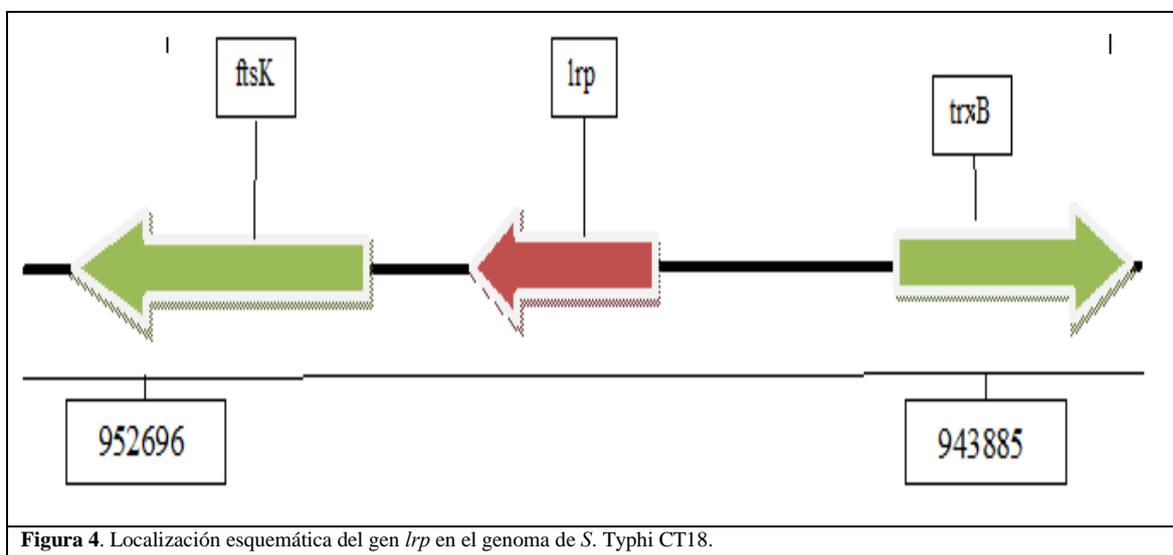


Figura 4. Localización esquemática del gen *lrp* en el genoma de *S. Typhi* CT18.

La expresión de Lrp tanto en *E. coli* [Landgraf *et al*, 1996] como en *Salmonella* [Baek *et al*, 2009 y MacFarland and Dorman, 2008] se incrementa en medio mínimo y se inhibe en medio rico. El mecanismo de regulación transcripcional mediado por Lrp, está relacionado al principio de adaptación a “la abundancia o la carencia de nutrientes en el medio”; *E. coli* censa su medio ambiente, determinando la concentración de leucina,

que es el aminoácido más abundante dentro de las bacterias [Brinkman *et al*, 2003 y Yokoyama *et al*, 2005]. Esto genera dos estados metabólicos que son completamente diferentes entre sí. Primero está el estado de carencia metabólica, que es cuando *E. coli* [Brinkman *et al*, 2003 y Yokoyama *et al*, 2005], censa que en el medio ambiente, hay una baja concentración de leucina y por lo tanto del resto de los nutrientes, se genera un incremento en la concentración intracelular de Lrp que a su vez estimula la activación de las vías metabólicas anabólicas, reprimiendo a las vías tanto de transporte de nutrientes como a las vías catabólicas. El segundo, en el estado de abundancia metabólica, que es cuando *E. coli* [Brinkman *et al*, 2003 y Yokoyama *et al*, 2005], censa una alta concentración de leucina y por lo tanto del resto de los nutrientes; se genera un decremento en la concentración de Lrp; que a su vez estimula la activación tanto de las vías de transporte de nutrientes como de las vías catabólicas y reprime a las vías anabólicas [Brinkman *et al*, 2003 y Yokoyama *et al*, 2005].

### **III.3. Lrp y su importancia biológica**

Lrp en *E. coli* regula por lo menos al 10% de su genoma y de éste, el 75% de los genes se encuentran reprimidos durante la fase estacionaria [Cho *et al*, 2008 y Tani *et al*, 2002]. Los genes están involucrados en la biosíntesis y catabolismo de aminoácidos, transportes de nutrientes, síntesis de pili y otras funciones [Brinkman *et al*, 2003; Calvo and Matthews, 1994 y Ernsting *et al*, 1992].

Con los estudios realizados por Wang y Calvo (1993) en el operón *ilvIH* de *E. coli*, encontraron que el promotor del operón presenta 6 sitios de unión a Lrp y que esta interacción Lrp-DNA forma un gran complejo nucleoproteico, el cual tiene la función de activar la transcripción del operón [Wang and Calvo, 1993].

Con los estudios realizados por Ferrario y colaboradores (1995) en *ompF* y la región intergénica de *ompC-micF* de *Escherichia coli*, demostraron que solo la región intergénica *ompC-micF* presentaba 9 sitios de unión a Lrp y que la interacción Lrp-DNA inhibe la transcripción de *ompC* y *micF* y de forma indirecta a través de la inhibición de *micF* activa la transcripción de *ompF* [Ferrario *et al*, 1995].

Los otros genes de *E. coli* regulados por Lrp son los siguientes: a) positivamente son *fanABC* [Calvo and Matthews, 1994], *gcv* [Stauffer and Stauffer, 1994], *glnA* [Ernsting *et al*, 1992], *gltBDF* [Ernsting *et al*, 1992 y 1993], *leuABCD* [Calvo and Matthews, 1994 y Lin *et al*, 1992], *pntAB* [Calvo and Matthews, 1994], *papBA* [Braaten *et al*, 1992], *serA* [Tuan *et al*, 1990 y Rex *et al*, 1991] y b) negativamente son *livjk* [Calvo and Matthews, 1994], *lysU* [Gazeau *et al*, 1992 y Lin *et al*, 1992], *oppABCDF* [Austin *et al*, 1989], *sdaAC* [Tuan *et al*, 1990] y *tdh* [Tuan *et al*, 1990; Ravnkar *et al*, 1987 y Rex *et al*, 1991].

*Salmonella* Typhimurium tiene un homólogo de Lrp que tiene un 99% de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos con Lrp de *E. coli*, proteína que está relacionada con la regulación de genes que están involucrados en la biosíntesis y catabolismo de aminoácidos, transportes de nutrientes, síntesis de pili, virulencia y otras funciones [Brinkman *et al*, 2003 y Friedberg *et al*, 1995].

Estudios realizados por Baek y colaboradores (2009) demostraron que los genes *hilA*, *invF* y *ssrA* de *Salmonella* Typhimurium son regulados negativamente por Lrp, además realizaron ensayos de adherencia, invasión y citotoxicidad, con los cuales se encontró que una cepa mutante en  $\Delta$ *lrp* disminuye su adherencia mientras que incrementa su invasividad y citotoxicidad a las células blanco [Baek *et al*, 2009].

Con los estudios realizados por McFarland y Dorman (2008) en *lrp* de *Salmonella* Typhimurium, encontraron que Lrp se autorregula negativamente, además demostraron que el promotor del gen Lrp presenta 5 sitios de unión a Lrp [McFarland and Dorman, 2008].

Otros genes de *Salmonella* Typhimurium que son regulados por Lrp son los siguientes: *fimZ* [McFarland and Dorman, 2008], *hisJ* [Hecht *et al*, 1996], *ilvIH* [Wang *et al*, 1993], *pef* [Nicholson *et al*, 2000], *spvABCD* [Marshall *et al*, 1999] y *traJ* [Camacho *et al*, 2002].

Con los antecedentes antes expuestos, se constituye la base para plantear hipótesis y objetivos del presente trabajo: Analizar el papel del regulador global de la transcripción Lrp en la regulación transcripcional del gen *ompS2* de *Salmonella* Typhi y determinar su importancia biológica.

#### **IV. HIPÓTESIS**

La porina OmpS2 de *Salmonella* Typhi puede ser expresada de manera abundante en condiciones de laboratorio; por lo que una cepa *Salmonella* Typhi carente del gen *lrp* deberá de activar la expresión de la porina.

#### **V. OBJETIVO GENERAL**

Identificar el efecto que ejerce Lrp sobre la expresión del gen *ompS2* de *Salmonella enterica* serovar Typhi.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar el efecto de una mutación en el gen *lrp* en la expresión de las fusiones transcripcionales del gen *ompS2*.
2. Determinar la interacción de unión de Lrp a la región promotora de *ompS2*.
3. Determinar las secuencias de unión de Lrp, por medio del ensayo de protección a la digestión por DNAsa (Footprinting) en la región reguladora de *ompS2*.
4. Comparar las secuencias de unión con las de consenso de Lrp.
5. Proponer un modelo de regulación de Lrp sobre la región de *ompS2*.

## **VI. Materiales y Métodos**

### **VI.1. Cepas y condiciones de cultivo**

Las cepas utilizadas en este trabajo se enlistan en la Tabla No. 1. Para su crecimiento las bacterias fueron incubadas aeróbicamente a 37°C, con agitación a 200 rpm, utilizándose matraces de 250 ml con 100 ml de medio MN, LB, LB-Agar, SOB o SOC (Anexo). Además, según la cepa y experimento, a los medios se les agregó lo siguiente:

1. Antibióticos, utilizando ampicilina (400 µg/ml), cloranfenicol (30 µg/ml), kanamicina (30 µg/ml) y tetraciclina (20 µg/ml).
2. Inductor, utilizando L-arabinosa (10 mM/ml).

### **VI.2. Extracción y purificación de DNA total de bacteria.**

La purificación fue realizada con la técnica de Miller, modificada por Fernández-Mora [Fernández-Mora *et al*, 2004]. Se recolectaron 0.5 ml de cultivo de la cepa de interés. La pastilla se resuspendió en 570 µl de buffer SET (Anexo), más 30 µl de SDS 20%, se incubó a 80°C por cinco minutos. Se le adicionó RNasa 0.02 mg/ml y se incubó a 37°C por 30 minutos. Se le agregó y mezcló 200 µl de NaCl 5 M, incubándose en hielo por cinco minutos. La mezcla se centrifugó por diez minutos a 12,000 rpm. El sobrenadante se pasó a un tubo limpio, adicionándose 800 µl de isopropanol al 100%, se centrifugó por cinco minutos a 12,000 rpm. La pastilla se lavó tres veces con etanol al 70% y por último se resuspendió en 300 µl de 10 mM de Tris-HCl pH 8.5 [Miller *et al*, 1988].

### **VI.3. Extracción y purificación de DNA de plásmido.**

La purificación fue realizada con el protocolo modificado de lisis alcalina. Se recolectaron 5 ml de cultivo de la cepa de interés. La pastilla se resuspendió en 200 µl de buffer SET más 0.05 mg/ml de RNasa, se incubó por cinco minutos a temperatura ambiente. Se le agregó y mezcló 400 µl de solución de lisis (0.2N de NaOH, 1% de SDS), se incubó en hielo por cinco minutos. Se agregó y mezcló 300 µl de acetato de amonio 7.5 M, se incubó en hielo por diez minutos. Después se centrifugó por tres

minutos a 10,000 rpm. El sobrenadante se pasó a un tubo limpio, se agregó 500 µl de isopropanol al 100% y se centrifugó por 30 minutos a 12,000 rpm. La pastilla se lavó por tres veces con etanol al 70%; enseguida se resuspendió en 100 µl 10 mM Tris-HCl (pH8) [Sambrook *et al*, 2001].

#### **VI.4. Preparación y transformación de células electrocompetentes**

Se inocularon 100 ml de medio SOB con la cepa de interés, incubándose a 37°C con agitación hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> igual a 0.8. El cultivo fue centrifugado por diez minutos a 6,000 rpm, la pastilla fue resuspendida y lavada por dos ocasiones con glicerol al 10%. La pastilla se resuspendió en 700 µl de glicerol al 10%. De la suspensión se tomaron 100 µl de células competentes y se les agregó de 50 pg. a 100 ng. de plásmido seleccionado. Se les dio un pulso de 2.5 kV en el electroporador (Micropulse, BIORAD). Las células se inocularon en un ml de medio SOC a 37°C por una hora. Después se cultivaron en medio LB agar, con los antibióticos correspondientes, para seleccionar a las clonas que tuvieran los plásmidos recombinantes [Sambrook *et al*, 2001].

#### **VI.5. Mutagénesis por la técnica de Datsenko y Wanner**

Con el objeto de realizar mutagénesis no polar del gen *lrp* y poder valorar su efecto sobre la expresión de *ompS2-lacZ*, se realizó una mutagénesis específica a través de la técnica de Datsenko y Wanner. Se inoculó el medio SOB con 400 µg/ml de ampicilina y 10 mM/ml de L-arabinosa con la cepa *Salmonella* Typhi IMSS1 que está transformada con el plásmido pKD46 (Tabla 2); se incubó a 30°C hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.6, acto seguido se prepararon para electroporación. Posteriormente, por reacción en cadena de polimerasa (PCR) se generó un producto, empleando como templado el plásmido pKD3 (ver Tabla 2) y los oligonucleótidos específicos SlrpH1P15' y SlrpH2P23' (ver Tabla 3), ya que sus extremos H1 y H2 son para recombinar con el gen *lrp*. El producto de PCR fue electroporado en células electrocompetentes de la cepa IMSS1, posteriormente las células fueron recuperadas en medio SOC, se incubaron a 37°C por una hora y por último se plaquearon en LB agar con 30 µg/ml de cloranfenicol, incubándose a 37°C por 12 a 24 horas [Datsenko *et al*, 2000].

## **VI.6. Determinación de la actividad de $\beta$ -galactosidasa de las fusiones *ompS2-lacZ*, en los diferentes fondos genéticos**

La expresión de las fusiones de *ompS2-lacZ*, se determinó a través de medir la actividad enzimática específica de  $\beta$ -galactosidasa, ya que la reacción de esta enzima hidroliza al orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactósido en galactosa y en el colorante orto-nitrofenol. Primero se cuantifica la actividad de  $\beta$ -galactosidasa y posteriormente se cuantifican las proteínas totales de la muestra (ver apartado más adelante). La actividad específica se obtiene al dividir el valor de  $\beta$ -galactosidasa (unidades de enzima/ml) entre la concentración de proteínas (mg/ml), reportándose en valores de unidades de enzima por miligramo de proteína [Fernández-Mora *et al*, 2004 y Oropeza *et al*, 1999]. Se colocó por duplicado 20  $\mu$ l de cada una de las muestras y del control en la placa, posteriormente se le agregaron 100  $\mu$ l de solución de lisis [0.22 mg/ml de lisozima, 0.22% de triton X-100, 1.6X de buffer Z (Anexo) y 0.016M de  $\beta$ -mercaptoetanol], incubándose por 10 minutos a 37 °C, inmediatamente se le agregó 100  $\mu$ l de solución sustrato ONPG [1 mg/ml de orto-nitrofenil-  $\beta$ -D-galactósido]. La tasa de cada reacción fue obtenida al medir los cambios colorimétricos en la absorbancia del orto-nitrofenol a 415 nm cada 5 segundos por 5 minutos con un Scanning Autoreade and Microplate Workstation, Ceres 900 C y el KC Jr software en el modo “kinetics” [Fernández-Mora *et al*, 2004 y Oropeza *et al*, 1999].

## **VI.7. Determinación de la concentración de proteínas**

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry, modificado para placas de microtitulación de 96 pozos. Se colocaron 20  $\mu$ l de muestra por duplicado. Se agregó y mezcló 100  $\mu$ l de solución A [98% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3.4% -NaOH 0.17 N, 1% de  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  al 1.7 % y 1% de  $\text{CuSO}_4$  al 0.85 %], se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Se agregó y mezcló con 100  $\mu$ l de solución B [Folin-Ciocalteu al 16%], se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 620 nm, los valores obtenidos fueron reportados en mg/ml, requiriéndose lecturas entre 0.16 y 0.30 mg/ml [Fernández-Mora *et al*, 2004 y Oropeza *et al*, 1999].

## **VI.8. Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA)**

Con el objeto de determinar, si Lrp es capaz de unirse o no a la región reguladora de *ompS2*, se utilizó la técnica EMSA. Se amplificó la región reguladora de *ompS2*, utilizando el plásmido pFM413 como templado y los oligonucleótidos F2a/S2reg3' (Tabla 3), obteniendo un fragmento de 500 pb. Para el ensayo se requirió que estuviera presente un control negativo, utilizando un fragmento de 400 pb del gen que codifica para la proteína de ensamble de la capsida del fago Lambda. Se incubaron ambos fragmentos, más la proteína (incrementando la concentración de Lrp-His, de 0 a hasta 0.5  $\mu$ M), en una solución amortiguadora 10X, para permitir el complejo proteína/DNA. Incubándola por treinta minutos a 37°C. Las muestras se analizaron en gel de acrilamida al 6%, se corrió el gel a 20 amperes por 5 horas [Oropeza *et al*, 1999 y De la Cruz *et al*, 2007].

## **VI.9. Experimento de protección a DNAsa (footprinting) con Lrp-His**

Con el objeto de determinar la secuencia específica de la región reguladora de *ompS2* que se une Lrp, se realizó el ensayo de protección de Lrp-His a la digestión parcial a DNAsa. Primero se marcó el oligonucleótido S2reg3', con  $^{32}$ P gama ATP, (con la enzima T4 Kinasa, incubando la reacción a 37°C por 30 minutos y se paró la reacción incubando a 65°C por 10 minutos). Posteriormente se realizó un PCR para amplificar la región reguladora de *ompS2*, utilizando el plásmido pFM413 como templado y los oligonucleótidos S2reg3' ( $^{32}$ P) marcado/F2a. Posteriormente se limpia el producto de PCR, a través de la precipitación por isopropanol o por el PCR cleanup Kit. Posteriormente se determinan las unidades de cpm con el contador de centelleo y se utilizan 100,000 cpm por reacción. Se mezclan varias concentraciones de la proteína con el fragmento marcado, se incuban 30 min a temperatura ambiente se les adiciona la enzima DNAsa, diluida 1/25 y se deja actuar por un minuto. La reacción se para con EDTA a 10 mM final. Los segmentos de DNA fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida 8%-urea 8 M [Fernández-Mora *et al*, 2004 y De la Cruz *et al*, 2007].

## CEPAS

Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo.

<b>S. Typhi</b>		
<b>IMSS1</b>	Cepa mexicana de referencia. Aislado clínico del Instituto Mexicano del Seguro Social de la ciudad de México D.F.	<b>Fernández-Mora, 2004</b>
<b>IMSS112</b>	$\Delta lrp::cm$ derivada de la IMSS1	<b>Este trabajo</b>

## PLÁSMIDOS

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	
<b>pFM413-lacZ</b> <b>pFM97-lacZ</b>	Plásmidos derivados del pMC1871 que contienen fusiones traduccionales de la región reguladora <i>ompS2-5'</i> , 413pb y 97pb insertados río arriba del punto de inicio del gen reportero <i>lacZ</i> .	<b>Fernández-Mora, 2004</b>
<b>pKD46</b>	<i>oriR101ts</i> , Plásmido de expresión de recombinasa $\lambda$ Red, bajo el control del promotor <i>paraB</i> , ( $Ap^r$ ).	<b>Datsenko, 2000</b>
<b>pKD3</b>	pANTSy con un FRT flanqueado por gen $Cm^r$ , para inactivar genes (pSC140)	

## OLIGONUCLEÓTIDOS

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia	Amplifica
kan1773	ATTAGAAAACATCGAGCATCAA	Cassette de kanamicina
kan1775	ATGAGCCATATCAACGGGAAAC	
C1	TTATACGCAAGGCGACAAGG	Cassette de cloranfenicol del pKD3 hacia fuera
C2	GATCTTCCGTCACAGGTAGG	
SlrpH1P15'	ATGGTAGATAGCAAGAAGCGCCCTGGCAAAG ATCTCGACCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	pKD3 con extremos para <i>lrp</i>
SlrpH2P23'	ACGGCGGCATTAACACTGTTCAAACACATCCGG CGCGCCGCATATGAATATCCTCCTTAG	
Lrp-SacI-3	CCCGGAGCTCTTGCTGTATGG	<i>lrp</i>
slip-I5	CCTTACTGTGTTTGGTCGTGCC	
S2reg3'	ATATATGCGTTTCCGATAGTAAC	<i>ompS2</i>
F2a	TCTGTGCCAGGGATCCGTGCGTTCTGTTT	

## **VII. Resultados**

### **VII.1. Obtención de una mutante deletada para *lrp***

Con el objetivo de determinar el papel de Lrp sobre la expresión del gen *ompS2*, se realizó la inactivación del gen *lrp*, por la técnica de Datsenko y Wanner, en la cepa *Salmonella* Typhi IMSS1, como se explicó en Material y Métodos. Para generar la mutante se utilizó como templete el plásmido pKD3, que contiene el gen de resistencia a cloranfenicol y los oligonucleótidos SlrpH1P15' y SlrpH2P23', que en sus extremos H1 y H2 son complementarios al gen *lrp*. En la mutante obtenida se demostró que el gen hubiera sido eliminado y en su lugar estuviera el gen de resistencia, para realizar esto se amplificó por PCR la región de interés, utilizando los pares de oligonucleótidos Lrp-SacI-3/slrp-I5, Lrp-SacI-3/k2 y slrp-I5/k1 y como templete se utilizaron las cepas silvestre y mutante en *lrp*. Posteriormente, los fragmentos amplificados se secuenciaron y por ambas técnicas se demostró que el gen se encontraba eficazmente reemplazado y en su lugar se encontraba el gen de resistencia. A la cepa obtenida se le denominó IMSS112 ( $\Delta lrp::cm^r$ ) y se utilizó para los experimentos genéticos subsecuentes en comparación con la cepa silvestre IMSS1.

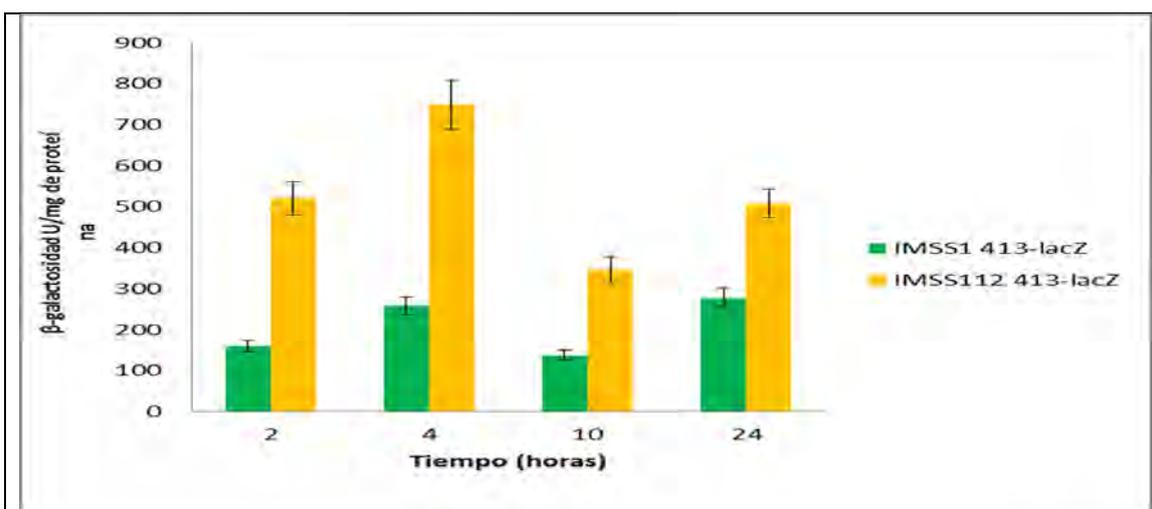
### **VII.2. Comparación de las actividades de $\beta$ -galactosidasa de las fusiones traduccionales de *ompS2-lacZ* en los fondos silvestre y mutante en *lrp***

Para determinar el papel de Lrp en la expresión del gen *ompS2*, se comparó los fondos silvestre (IMSS1) y mutante en  $\Delta lrp::cm^r$  (IMSS112), a través de la determinación de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de las fusiones traduccionales *ompS2-lacZ* reportadas por Fernández-Mora en el 2004: a) fusión que se observa la actividad más baja (-413-*lacZ*, fusión que presenta la región de control completa) y b) fusión que se observa la actividad más alta (-97-*lacZ*, fusión carente de la región reguladora negativa) [Fernández-Mora *et al*, 2004]. Ambas cepas fueron crecidas en medio MN (Anexos), el experimento se realizó por triplicado y se tomaron muestras a las 2, a las 4, a las 10 y a las 24 horas de crecimiento a 37 °C.

En la figura 5 se observa la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de la fusión -413-*lacZ* en la cepa silvestre (IMSS1), en donde claramente se aprecia que hubo una importante

variabilidad de las actividades durante el experimento. La máxima expresión de la fusión se dió en la fase logarítmica (4 horas) y la mínima se dió en la fase estacionaria (10 horas), siendo la relación entre la logarítmica y la estacionaria de 1.9 veces superior la fase logarítmica que la estacionaria.

En referencia a la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de la fusión *-413-lacZ* en la cepa IMSS112 ( $\Delta lrp::cm'$ ), se puede observar que la eliminación del gen *lrp* en la cepa resultó en un incremento de las actividades de 2 a 3 veces con respecto a la cepa silvestre (IMSS1). De igual forma, se pudo observar un comportamiento similar al que presentó la cepa silvestre a lo largo de la curva de crecimiento, siendo la actividad más alta en la fase logarítmica (4 horas) y la más baja en la estacionaria (10 horas) y por último la relación entre la fase logarítmica y la estacionaria fue de 2 veces superior la fase logarítmica que la estacionaria.



**Figura 5.** Representación gráfica de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión *-413-lacZ*, comparando las cepas IMSS1 e IMSS112.

En la figura 6 se observa la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de la fusión *-97-lacZ* en la cepa silvestre (IMSS1). En donde claramente se observa un incremento de diez veces la actividad en comparación a la fusión *-413-lacZ*, este efecto es debido a la eliminación de la región de regulación negativa en la fusión *-97-lacZ* como fue reportado por Fernández-Mora en el 2004 [Fernández-Mora *et al*, 2004]. Además, se observa que las actividades son similares entre sí para las primeras horas de crecimiento, mientras para las 10 y 24 horas de crecimiento, se presentó una importante disminución de la actividad de 2.6 veces (10 horas) y de 1.6 veces (24 horas).

En cuanto a la actividad de  $\beta$ -galactosidasa para la fusión *-97-lacZ* en la cepa IMSS112 ( $\Delta lrp::cm^r$ ), se puede observar que la eliminación del gen *lrp* en la cepa resultó en un importante incremento de las actividades de 2 a 3 veces con respecto a la cepa silvestre (IMSS1), en la fase estacionaria a 10 y 24 horas de crecimiento.

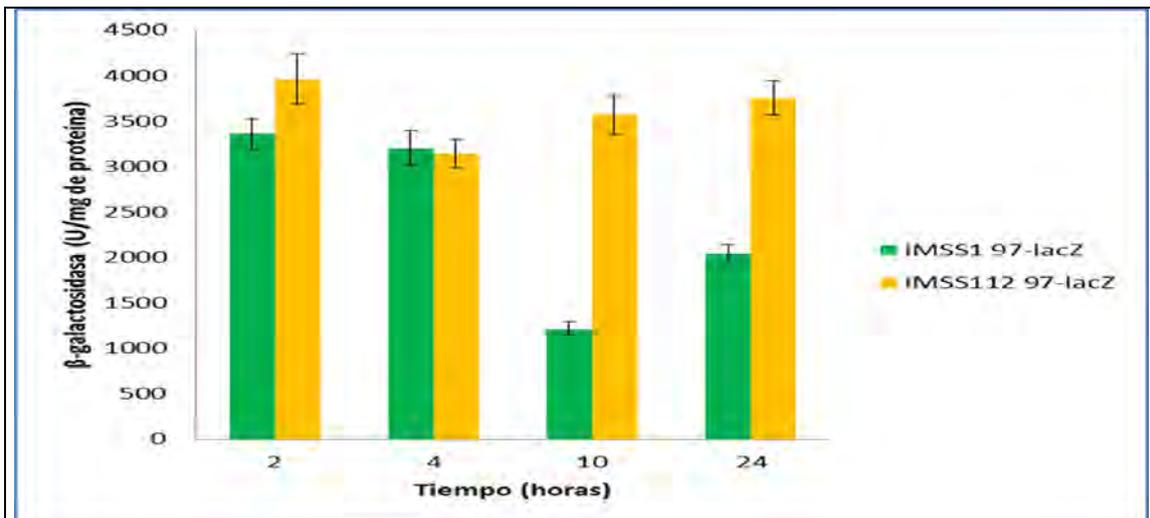


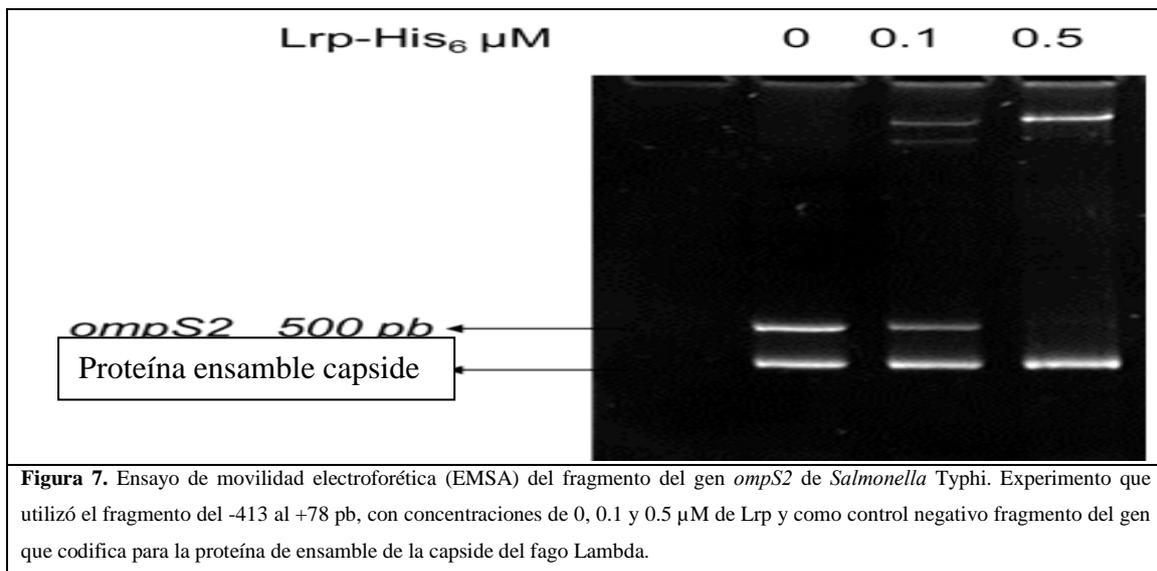
Figura 6. Representación gráfica de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión *97-lacZ*, comparando las cepas IMSS1 e IMSS112.

Lo que estos datos sugieren es que *Lrp* regula negativamente la transcripción del gen *ompS2*, por lo que se requiere determinar si el mecanismo de regulación observado, es debido a la interacción de la proteína *Lrp* con el DNA del gen *ompS2*, por esta razón se realizaron ensayos de cambio de movilidad electroforética y de protección de la digestión por DNAsa.

### VII.3. Unión de *Lrp* a la región reguladora de *ompS2*

Para determinar si *Lrp* se une a la región reguladora de *ompS2*, se realizó el ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA). Para este experimento se utilizó el fragmento de 500 pb que va de las posiciones -413 a +78 pb de la región reguladora de *ompS2*, y como control negativo un fragmento de 400 pb del genoma del fago Lambda, que codifica para una proteína de ensamble de la capsida; que fue incubado con concentraciones crecientes de *Lrp*-His (0, 0.1 y 0.5  $\mu$ M). Lo que se observó en este experimento fue lo siguiente.

La proteína Lrp formó complejos de unión DNA-proteína, lo cual ocurrió desde la concentración de 0.1µM de Lrp; aunque a tal concentración la forma de DNA predominante sigue siendo la fracción libre. Sin embargo, se pudieron observar dos formas de complejos DNA-Lrp y de éstas, la fracción que predomina es la que migra más lentamente. Al incrementar la concentración de Lrp a 0.5µM, la fracción predominante es el complejo de más lenta migración, ya que a esta concentración ya no se pueden observar las otras dos fracciones en el gel. (Figura 7).



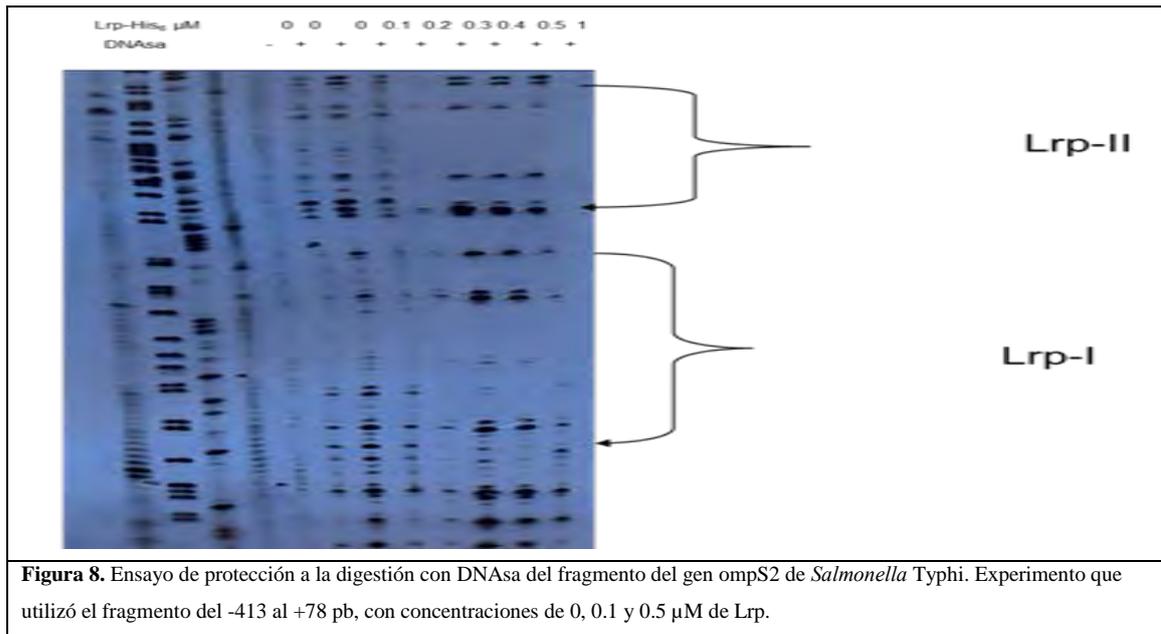
Lo que estos datos nos indican es que Lrp se une directamente al fragmento de -413 a +78 pb de la región reguladora del gen *ompS2*, por lo que fue importante determinar cuáles son los sitios donde Lrp se une específicamente al DNA: esto se comprobó a través del ensayo de protección a la digestión por DNAsa.

#### VII.4. Protección a la digestión con DNAsa por Lrp-His sobre *ompS2*

Para determinar la secuencia de la región reguladora del gen *ompS2*, a la cual Lrp se une de forma específica, se realizó la técnica de protección a la digestión con DNAsa empleando Lrp-His. Para este experimento se valoró el segmento 5´-3´ de la región regulatoria de -413 a +78, más Lrp-His a concentraciones crecientes que van de 0 a 0.5µM. Se observó que la región reguladora de *ompS2* presenta dos regiones de

unión a Lrp. La primera región va del -7 al -42 y la secuencia protegida es la siguiente 5'-tagcatttgctgaaataatattattcagattaggat-3'; la segunda región va del -53 al -85 y la secuencia es la siguiente; 5'-ccgatagtaactttgtattaattaataacata-3'. Estos datos indican que Lrp se une específicamente a la región reguladora de *ompS2*. (Figura 8).

Llama la atención que la región reguladora de *ompS2* presenta dos regiones de unión a Lrp (LRP-I y LRP-II). Secuencias similares se han reportado para la región intergénica *ompC-micF* [Ferrario *et al*, 1995]; para el gen *rrnB* [Pul *et al*, 2005] y para el gen *ilvIH* [Wang and Calvo, 1993 y Wang *et al*, 1993]. La secuencia LRP-II que va del -53 al -85 pb, tiene la característica de ser una secuencia en la cual se puede unir de forma específica tanto Lrp como OmpR-P [Fernández-Mora *et al*, 2004]. Esto sugiere que esta secuencia es de gran importancia para la regulación de *ompS2*, ya que ambas proteínas reguladoras no pueden estar al mismo tiempo ocupando el mismo espacio, además de que presentan efectos antagónicos sobre la regulación del gen. La secuencia LRP-I que va del -10 al -35 pb, corresponde a la secuencia donde se encuentran las cajas -10 y -35 del promotor, lo cual indica que Lrp se podría unir a esta región con la finalidad de bloquear la unión de la RNA polimerasa, efecto que fue reportado por Pul (2007) y Marasco (1994). Con estos datos podemos proponer como regula Lrp a este gen. Es probable que la unión específica inicial de Lrp a estos sitios genere que el DNA se curve, causando el reacomodo de los arreglos estructurales de toda la región reguladora, como lo propusieron Pul (2007 y 2008), Cui (1996) y Wang (1993). Dicha curvatura incrementaría la afinidad de Lrp a secuencias no específicas cercanas, observándose un efecto de cooperatividad, lo cual contribuiría a que el DNA envuelva al oligómero de Lrp, generando una nucleoproteína; causando la inhibición de la transcripción del gen, tal como lo propusieron Pul (2005), Cui (1996), Wang (1993) y Chen (2001, 2002 y 2005).



## VIII. Discusión

### Proteína de respuesta a leucina, Lrp

Para determinar el efecto que ejerce la proteína Lrp en la región reguladora del gen *ompS2*, fue necesaria la realización de la mutación específica del gen *lrp* en la cepa *Salmonella* Typhi IMSS1. Primero se caracterizó su curva de crecimiento, comparándola con la curva de la cepa silvestre; demostrándose que ambas cepas presentaban curvas de crecimiento idénticas, corroborando que la cepa mutante no presenta un fenotipo restrictivo para su crecimiento, lo cual concuerda con lo observado por Baek (2009), Landgraf (1996) y MacFarland (2008) [Baek *et al*, 2009; Landgraf *et al*, 1996 y MacFarlandt and Dorman, 2008].

En seguida se valoró el efecto generado por la proteína Lrp sobre la región reguladora del gen *ompS2*: esto fue realizado al comparar la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de las fusiones -413-*lacZ* y -97-*lacZ* en los fondos tanto silvestre como mutante en el gen *lrp*. Primero se valoró la actividad de  $\beta$ -galactosidasa en la fusión -413-*lacZ*, en donde se observó un importante incremento de 2 a 3 veces en el fondo mutante en *lrp* en comparación al fondo silvestre. Posteriormente, fue necesario valorar cómo la mutación del gen *lrp* afecta el segmento comprendido del -97 al +78 pb de la región reguladora del gen *ompS2*, observándose un comportamiento similar a lo demostrado en la fusión -413-*lacZ*; el cual fue un importante incremento de su actividad de 2 a 3 veces en la cepa mutante en *lrp* en comparación a la cepa silvestre, sólo en las muestras tomadas a las 10 y 24 horas, ya que en las muestras tomadas a las 2 y 4 horas, sus actividades fueron similares entre sí y a los de la cepa silvestre.

Estos datos son similares a lo observado: a) en la cepa *E. coli* mutante en *lrp*, en la que se presentó un incremento de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de hasta 1.7 veces más para el gen *ompC* [Ferrario *et al*, 1995] y de 2 veces más para el gen *micF* [Ferrario *et al*, 1995], b) en la cepa *Salmonella* Typhimurium mutante en *lrp*, en la que se presentó un incremento de la actividad  $\beta$ -galactosidasa que fue menor a dos veces para los gen *hilA* [Baek *et al*, 2009], *invF* [Baek *et al*, 2009], *ssrA* [Baek *et al*, 2009] y de 2 veces más para el gen *lrp* [McFarlandt and Dorman, 2008]. Estos datos nos sugieren que el efecto presentado por Lrp sobre el gen *ompS2*, es el mismo efecto inhibitorio que presenta Lrp

cuando regula a los genes *ompC*, *micF* [Ferrario *et al*, 1995], *hilA*, *invF*, *ssrA* [Baek *et al*, 2009] y *lrp* [McFarlandt and Dorman, 2008].

De estos datos es importante recalcar que, la secuencia regulatoria comprendida entre el -413 al -98 pb, presenta probables sitios de unión a Lrp, así como a otras proteínas inhibidoras de la transcripción como H-NS [Fernández-Mora *et al*, datos no publicados], además, se ha visto que al eliminar el gen *hns* la actividad de *ompS2* se incrementa sustancialmente [Fernández-Mora *et al*, datos no publicados]. Este efecto de H-NS también se ha observado en otros genes como *ompS1* [Flores-Valdez *et al*, 2003]; *hilA* [Schechter *et al*, 2003]; *ilvIH* [Calvo and Matthews, 1994]; *ompC* [Suzuki *et al*, 1996]; *micF* [Suzuki *et al*, 1996] y *ompF* [Suzuki *et al*, 1996].

De hecho, al eliminar la secuencia -413 a -98 pb, se observó un incremento sustantivo en la actividad de la secuencia restante, la cual comprende del -97 a +78 pb. Sin embargo, en las primeras horas de crecimiento tanto a las 2 como a las 4 horas, la fusión corta presenta la misma actividad tanto en la silvestre como en la mutante en *lrp* y sólo se pudo observar un efecto cuando la cepa silvestre entra en la fase estacionaria de crecimiento, con una disminución importante de su actividad, mientras que en la cepa mutante en *lrp* se observa que la actividad mantiene sus altos niveles. Esto nos indica que es necesaria la región de -413 al -98 para la regulación negativa del gen, y que la región -97 a +78 ejerce un efecto inhibitorio por Lrp únicamente en la fase estacionaria de crecimiento.

Posteriormente, se determinó la unión de la proteína Lrp a la secuencia -413 a +78 de la región reguladora del gen *ompS2*. Lo que se encontró fue que Lrp sí se une específicamente a esta región. Lo que es importante resaltar de este experimento es que se puede observar la formación de dos complejos intermediarios de DNA-Lrp que pudieran reflejar diversos sitios de unión con diferentes grados de afinidad, datos que concuerdan con lo observado por Stauffer (1994) y por Pul (2005), en donde observaron la formación de múltiples complejos de unión DNA-Lrp en los genes blanco que valoraron [Stauffer *et al*, 1994 y Pul *et al*, 2005]. También se determinó que la concentración de Lrp necesaria para formar complejos Lrp-DNA, con el consiguiente resultado de depletar la concentración de la fracción libre de DNA, es de 0.5 $\mu$ M de proteína. La concentración de Lrp que se ha determinado en otros estudios para su

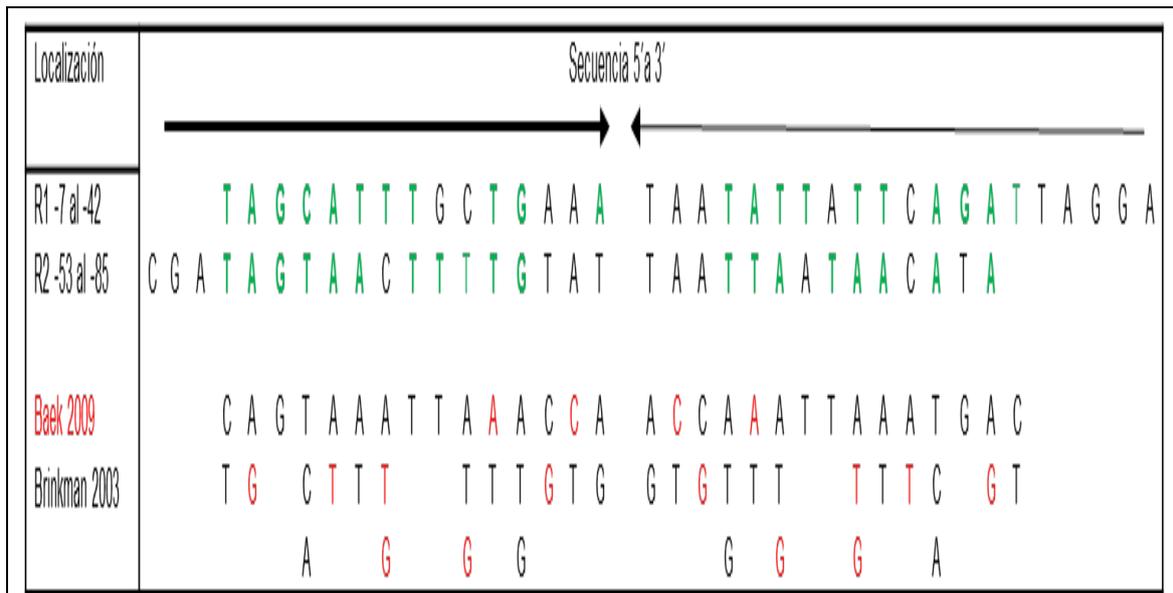
pegado eficiente al gen correspondiente son: de 0.27 a 69 nM para el gen *gcv* [Stauffer *et al*, 1994]; 11.6 a 93.1 nM para el gen *ivlIH* [Wang *et al*, 2003]; de 10 a 125 nM para la región intergenica *ompC-micF* [Ferrario *et al*, 1995]; de 10 a 150 nM para los genes *ssrA*, *hilA* e *invF* [Baek *et al*, 2009] y de 2 a 10  $\mu$ g para el gen *rrnB* [Pul *et al*, 2005]. La diferencia entre las concentraciones de Lrp utilizadas entre este estudio y los estudios reportados en la literatura, es debida a que se utilizó un modelo inicial para determinar las concentraciones idóneas de unión al gen, con el objetivo de servir de base para realizar los experimentos posteriores.

Finalmente, se determinaron las secuencias específicas de unión de Lrp al gen *ompS2*. Con el ensayo de protección a DNAsa se confirmó que la región reguladora del gen *ompS2* que va del -85 al -7, tiene dos secuencias de unión a Lrp: a) LRPI que va del -7 al -42 pb, secuencia que coincide con la secuencia 2; y b) LRPII que va del -53 al -85 pb, secuencia que coincide con la secuencia 3; de acuerdo a un reporte previo [Münch *et al*, 2005].

En cuanto a la función de estos sitios de unión se propone lo siguiente:

- LRP-I parece permitir que un dímero de Lrp se una a esta región con la finalidad de bloquear la actividad transcripcional de la RNA polimerasa, efecto regulatorio que es similar al observado en los genes *rrnB* [Pul *et al*, 2007]; *ompC* [Ferrario *et al*, 1995]; *micF* [Ferrario *et al*, 1995] y *ivlIH* [Marasco *et al*, 1994 y Wang *et al*, 1993].
- LRP-II es una secuencia que puede unirse específicamente a las proteínas reguladoras Lrp y OmpR-P [Fernández-Mora *et al*, 2004], por lo que la unión de un dímero de Lrp a esta secuencia bloquearía la unión del activador Omp-R, efecto regulatorio similar al observado en los genes *ompC* y *micF* [Ferrario *et al*, 1995]. La secuencia que va del -85 al -92 pb es una secuencia a la cual se une OmpR-P [Fernández-Mora *et al*, 2004] y que es importante para la activación de la fusión, esto debido a que al eliminar dicha secuencia, se puede observar una importante disminución de la actividad de hasta 4 veces en comparación a la fusión *-97-lacZ* [Fernández-Mora *et al*, 2004].

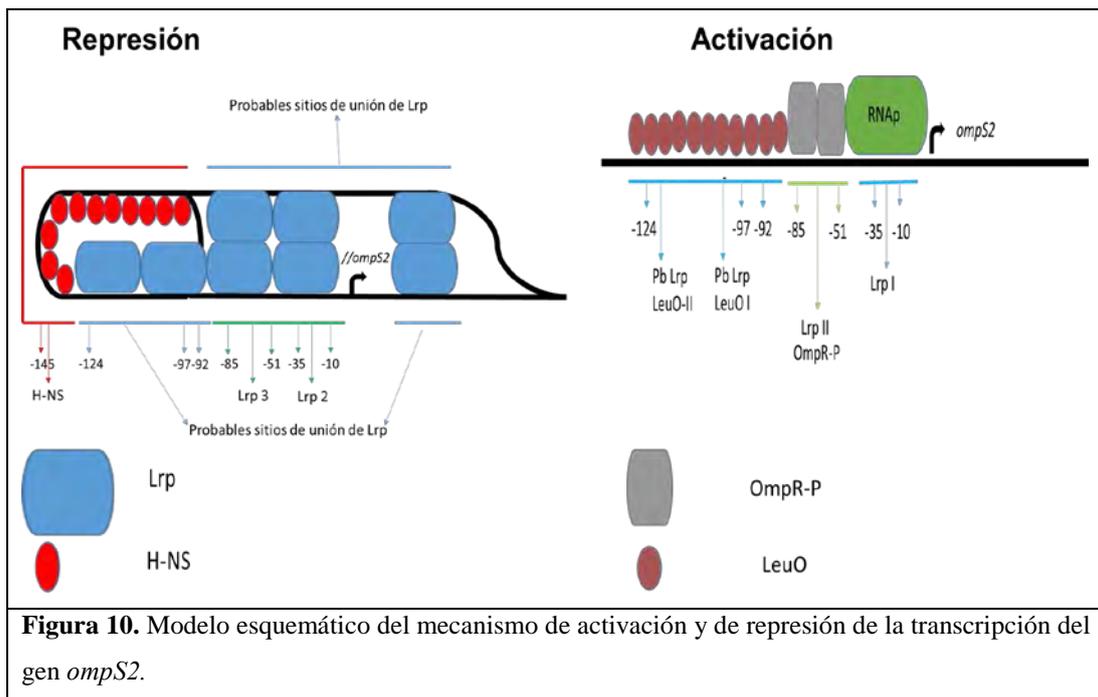
Posteriormente, las secuencias LRP-I Y LRP-II fueron comparadas con la secuencia consenso de unión de Lrp para las cepas tanto *E. coli* como de *Salmonella Typhimurium*, determinada por Baek y colaboradores en 2009, la cual está representada por la siguiente secuencia: 5'-YRGHWW(G)DTTDWDSYR-3' (Y=C o T; H= no G; W=A o T; D= no C; R= A o G, S=C o G y (G)= G o ninguna) [Baek *et al*, 2009]. En la región LRP-I cuya secuencia es la siguiente 5'-tagcatttgctgaaataattattcagattagga-3' son evidentes dos regiones de unión a Lrp que están invertidas una con respecto a la otra, su similitud a la secuencia consenso es de 11/15 y 10/14. Para la región LRP-II con la siguiente secuencia; 5'-cgatagtaactttgtattaattaataacata-3' se encontraron dos regiones de unión a Lrp que también están invertidas una con respecto a la otra y con identidad a la secuencia consenso de 11/15 y 8/14. Ver figura 9. Estos datos concuerdan con las secuencias de unión a Lrp propuestas por McFarland (2008) y Brinkman (2003) [Brinkman *et al*, 2003 y McFarland *et al*, 2008].



**Figura 9.** Alineamiento de las dos secuencias Lrp I y Lrp II del gen *ompS2*. Alineamientos en los que se pueden observar arriba los sitios donde se une Lrp y abajo se observa la secuencia consenso propuesta por Baek en 2009 y Brinkman en 2003. En rojo se muestran las bases reportadas por Baek, que no son reportadas por Brinkman y en verde se observan las bases de la secuencia de *ompS2* que concuerdan con la secuencia consenso.

En base a lo mencionado anteriormente se propone el siguiente modelo de regulación: Lrp se une inicialmente a los sitios LRP-I y LRP-II de forma específica, unión que genera que el DNA se curve, causando el reacomodo de los arreglos estructurales de

toda la región reguladora, como lo propusieron, Cui en 1996, Wang en 1993 y Pul en 2007 y 2009. Dicha curvatura incrementaría la afinidad de Lrp a secuencias no específicas cercanas, observándose un efecto de cooperatividad, lo cual contribuiría a que el DNA envuelva a una molécula de Lrp en estado multimérico; con lo cual se inhibiría la transcripción del gen, efecto similar al propuesto por Pul en 2005, Cui en 1996, Wang en 1993 y Chen en 2001, 2002 y 2005. Ver figura 10.



Para poder validar este modelo de regulación, se propone la generación de una doble mutante  $\Delta lrp-\Delta hns$  con el objetivo de poder determinar cuál es el efecto que presentan ambas proteínas sobre la regulación del gen *ompS2*. En nuestro modelo propuesto predecimos que al eliminar ambos genes se observará un aumento importante de la actividad específica de esta fusión, superior al observado en las mutantes sencillas.

## IX. Conclusiones

Con los datos generados en los experimentos podemos concluir que:

- La proteína Lrp es un inhibidor directo de la expresión de *ompS2*.
- La secuencia nucleotídica -7 al -42 pb (LRP-I), correspondiente a las cajas -10 y -35 del promotor, es un sitio específico de unión a Lrp.
- La secuencia nucleotídica -53 al -85 pb (LRP-II), sitio de unión para Omp-R, es también sitio de unión para Lrp.
- La proteína Lrp no es el único inhibidor directo o indirecto de la expresión del gen *ompS2*, ya que la mutante *lrp* no permitió observar la máxima actividad del gen.

## X. Perspectivas

- Realizar un ensayo de complementación de Lrp, en las cepas tanto silvestre como en la mutante en *lrp*, con el objeto de valorar como afecta a la expresión del gen *ompS2*, al sobre expresar la proteína Lrp.

## XI. Anexo

### Medios de Cultivo

<b>a y b) Medio Luria-Bertani (LB) ^</b>	Cantidad requeridos en gramos o mililitros	
	En solución	En sólido
Triptona	10 gr	10 gr
Extracto de levadura	5 gr	5 gr
NaCl	10 gr	10 gr
Agua destilada	1000 ml	1000 ml
Ajustar pH a 7.5	Ajustar a 7.5	Ajustar a 7.5
Agar	-----	15 gr

<b>c) Medio Nutritivo (MN)</b>	Cantidad requerida en gramos o mililitros
Bacto caldo nutritivo	7 gr
Extracto de levadura	1 gr
Glicerol	2 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.7 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.3 gr
Agua destilada	1000 ml

	<b>d) Medio SOB pH 7</b>	<b>e) Medio SOC</b>
	Cantidad requerida en gramos o mililitros	
Agua destilada	1000 ml	1000 ml
Bacto triptona	20 gr	20 gr
Extracto de levadura	5 gr	5 gr.
NaCl 5M	2 ml	2 ml
KCl 1M	2.5 ml	2.5 ml
MgSO <sub>4</sub> 1M	---	10 ml
MgCl <sub>2</sub> 1M	---	10 ml
Glucosa	---	3.2 gr

## Soluciones amortiguadoras

<b>f) Buffer SET pH 8</b>	Cantidad requerida en gramos o mililitros
Sacarosa	200 gr
Tris HCL 2M. pH 8	12.5 ml
EDTA	100 ml
Agua destilada	1000 ml

<b>g) Buffer Z 5 X pH 7</b>	Solución
	Cantidad requerida en gramos o mililitros
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	40.21 gr
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13.8 gr
KCl	1.9 gr
MgSO <sub>4</sub>	0.61 gr
Agua destilada	1000 ml

## XII. REFERENCIAS.

1. Atlung, T. and Ingmer, H. (1997). "H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression." *Mol Microbiol.* 24(1): 7-17.
2. Austin, E. A.; Andrews, J. C. and Short, S. A. (1989). "Selection, characterization, and cloning of oppI, a regulator of the E. coli oligopeptide permease operon, p. 153. In Abstracts of Mol. Genet. Bacteriophage". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
3. Baek, C. H.; Wang, S.; Roland, K. L. and Curtis III, R. (2009). "Leucine-responsive regulatory protein (Lrp) acts as a virulence repressor in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*." *J Bacteriol.* 191(4): 1278-92.
4. Braaten, B. A.; Platko, J. V.; Woude, M. W.; Simons, B. H.; Graaf, F. K.; Calvo, J. M. and Low, D. A. (1992). "Leucine-responsive regulatory protein controls the expression of both the *pap* and *fan* pili operons in *Escherichia coli*". *Proc Natl Acad Sci USA.* 89(10): 4250-4.
5. Braunwald, E., Fauci, A. S., Kasper, D. L., Hauser, S. L., Longo, D. L. et al. "Principios de Medicina Interna." Décima quinta edición. Volumen IV. 2002. D. F. México.
6. Brenner, F. W.; Villar, R. G. and Angulo, F. J. (2000). "*Salmonella* nomenclature." *J. Clin Microbiol.* 38(7): 2465-7.
7. Brinkman, A. B.; Ettema, T. J.; de Vos, W. M. and van der Oost, J. (2003). "The Lrp family of transcriptional regulators." *Mol Microbiol.* 48(2): 287-94.
8. Buechner, M.; Delcour, A. H.; Martinac, B.; Adler, J. and Kung, C. (1990). "Ion channel activities in the *Escherichia coli* outer membrane." *Biochim Biophys Acta.* 1024(1): 111-21.
9. Calva, J. J. and Calva, E. "MOLECULAR BIOLOGY AND MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF *SALMONELLA* INFECTIONS." Primera edición. Research Signpost. Kerala India. 2009. 1-45 y 263-285.
10. Calvo, J. M. and Matthews, R. G. (1994). "The Leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*." *Microbiol Rev.* 58(3): 466-90.
11. Camacho, E. M. and Casadesús, J. (2002). "Conjugal transfer of the virulence plasmid of *Salmonella enterica* is regulated by the leucine-responsive regulatory protein and DNA adenine methylation". *Mol Microbiol.* 44(6): 1589-98.

12. Chen, S. and Calvo, J. M. (2002). "Leucine-induced dissociation of *Escherichia coli* Lrp hexadecamers to octamers". J Mol Biol. 318(4): 1031-42.
13. Chen, S.; Iannolo, M. and Calvo J. M. (2005). "Cooperative binding of the leucine-responsive regulatory protein (Lrp) to DNA". J. Mol. Biol. 345(2): 251-64.
14. Chen, S.; Rosner, M. H. and Calvo, J. M. (2001). "Leucine-regulated self-association of leucine-responsive regulatory protein (Lrp) from *Escherichia coli*". J Mol Biol. 312(4): 625-35.
15. Cho, B. K.; Barrett, C. L.; Knight, E. M.; Park, Y. S. and Palsson, B. O. (2008). "Genome-scale reconstruction of the Lrp regulatory network in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci USA. 105(49): 19462-7.
16. Crosa, J. H.; Brenner, D. J.; Ewing, W. H. and Falkow, S. (1973). "Molecular relationships among the *Salmonelleae*." J Bacteriol. 115(1): 307-15.
17. Crump, J. A.; Luby, S. P. and Mintz, E. D. (2004). "The global burden of typhoid fever." Bull World Health Organ. 82(5): 346-53.
18. Cui, Y.; Midkiff, M. A.; Wang, Q. and Calvo, J. M. (1996). "The leucine-responsive regulatory protein (Lrp) from *Escherichia coli*. Stoichiometry and minimal requirements for binding to DNA". J Biol Chem. 271(12): 6611-7.
19. Datsenko, K. A. and Wanner, B. L. (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products." Proc Natl Acad Sci USA. 97(12): 6640-5.
20. De la Cruz, M. A. and Calva, E. (2010). "The complexities of porin genetic regulation." J Mol Microbiol Biotechnol. 18(1): 24-36.
21. De la Cruz, M. A.; Fernández-Mora, M.; Guadarrama, C.; Flores-Valdez, M. A.; Bustamante, V. H.; Vázquez, A. and Calva, E. (2007). "LeuO antagonizes H-NS and StpA-dependent repression in *Salmonella enterica ompSI*". Mol Microbiol. 66(3): 727-43.
22. de Wind, N.; de Jong, M.; Meijer, M. and Stuitje, A. R. (1985). "Site-directed mutagenesis of the *Escherichia coli* chromosome near *oriC*: identification and characterization of *asnC*, a regulatory element in *E. coli* asparagine metabolism". Nucleic Acids Res. 13(24): 8797-811.
23. Delcour, A. H. (2009). "Outer membrane permeability and antibiotic resistance." Biochim Biophys Acta. 1794(5): 808-16.

24. Deng, W.; Liou, S. R.; Plunkett, G.; Mayhew, G. F.; Rose, D. J.; Burland, V.; Kodoyianni, V; Schwartz, D. C.; and Blattner, F. R. (2003). "Comparative Genomics of *Salmonella enterica* Serovar Typhi Strains Ty2 and CT18." *J Bacteriol.* 185(7): 2330-7.
25. Ernsting, B. R.; Atkinson, M. R.; Ninfa, A. J. and Matthews, R. G. (1992). "Characterization of the regulon controlled by the leucine-responsive regulatory protein in *Escherichia coli*". *J Bacteriol.* 174(4): 1109–18.
26. Ernsting, B. R.; Denninger, J. W.; Blumenthal, R. M. and Matthews, R. G. (1993). "Regulation of the *gltBDF* operon of *Escherichia coli*: how is a leucine-insensitive operon regulated by the leucine-responsive regulatory protein? *J Bacteriol.* 175(22): 7160-9.
27. Fang, M. and Wu, H. Y. (1998). "A promoter relay mechanism for sequential gene activation." *J Bacteriol.* 180(3): 626-33.
28. Faucher, S. P.; Curtiss, R. and Daigle, F. (2005). "Selective capture of *Salmonella enterica* serovar typhi genes expressed in macrophages that are absent from the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genome." *Infect Immun.* 73(8): 5217-21.
29. Fernández-Mora, M.; Oropeza, R.; Puente, J. L. and Calva, E. (1995). "Isolation and characterization of *ompS1*, a novel *Salmonella typhi* outer membrane protein-encoding gene." *Gene.* 158(1): 67-72.
30. Fernández-Mora, M.; Puente, J. L. and Calva, E. (2004). "OmpR and LeuO positively regulate the *Salmonella enterica* serovar Typhi *ompS2* porin gene." *J Bacteriol.* 186(10): 2909-20.
31. Ferrario, M.; Ernsting, B. R.; Borst, D. W.; Wiese, D. E.; Blumenthal, R. M. and Matthews, R. G. (1995). "The leucine-responsive regulatory protein of *Escherichia coli* negatively regulates transcription of *ompC* and *m icF* and positively regulates translation of *ompF*." *J Bacteriol.* 177(1): 103-13.
32. Flores-Valdez, M. A.; Puente, J. L. and Calva, E. (2003). "Negative osmoregulation of the *Salmonella ompS1* porin gene independently of OmpR in an *hns* background." *J Bacteriol.* 185(22): 6497-506.
33. Friedberg, D.; Platko, J. V.; Tyler, B. and Calvo, J. M. (1995). "The amino acid sequence of Lrp is highly conserved in four enteric microorganisms." *J Bacteriol.* 117(6): 1624-6.

34. Garrity, F. J.; Frías, N.; de Frutos, C.; Martín, B.; and López, C. (2001). “Análisis de los serotipos de *Salmonella* spp aislados en el año 2000 por los laboratorios de Sanidad Animal en España.” *B. E. S.* 9: 287-8.
35. Gazeau, M.; Delort, F.; Dessen, P.; Blanquet, S. and Plateau, P. (1992). “*Escherichia coli* leucine-responsive regulatory protein (Lrp) controls lysyl-tRNA synthetase expression. *FEBS Lett.* 300(3): 254-8.
36. Haraga, A.; Ohlson, M. B. and Miller, S. I. (2008). “*Salmonellae* interplay with host cells.” *Nat Rev Microbiol.* 6(1): 53-66.
37. Hart, B. R. and Blumenthal, R. M. (2011). “Unexpected coregulator range for the global regulator Lrp of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*”. *J Bacteriol.* 193(5): 1054–64.
38. Hecht, K.; Zhang, S.; Klopotoski, T. and Ames, G. F. (1996). “D-histidine utilization in *Salmonella typhimurium* is controlled by the leucine-responsive regulatory protein (Lrp)”. *J Bacteriol.* 178 (2): 327-31.
39. Hernández-Lucas, I.; Gallego-Hernández, A. L.; Encarnación, S.; Fernández-Mora, M.; Martínez-Batallar, A. G.; Salgado, H.; Oropeza, R. and Calva, E. (2008). “The LysR-type transcriptional regulator LeuO controls expression of several genes in *Salmonella enterica* serovar Typhi.” *J Bacteriol.* 190(5): 1658-70.
40. Jap, B. K. and Walian, P. J. (1996). “Structure and functional mechanism of porins.” *Physiol Rev.* 76(4): 1073-88.
41. Kim, C. C.; Monack, D. and Falkow, S. (2003). “Modulation of virulence by two acidified nitrite-responsive loci of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.” *Infect Immun.* 71(6): 3196-205.
42. Koebnik, R.; Locher, K. P. and Van Gelder, P. (2000). “Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell.” *Mol Microbiol.* 37(2): 239-53.
43. Landgraf, J. R.; Wu, J. and Calvo, J. M. (1996). “Effects of nutrition and growth rate on Lrp levels in *Escherichia coli*.” *J Bacteriol.* 178(23): 6930-6.
44. Lee, Y. H.; Kim, B. H.; Kim, J. H.; Yoon, W. S.; Bang, S. H. and Park, Y. K. (2007). “CadC has a global translational effect during acid adaptation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.” *J Bacteriol.* 189(6): 2417-25.
45. Lilley, D. M. and Higgins, C. F. (1991). “Local DNA topology and gene expression: the case of the *leu-500* promoter.” *Mol Microbiol.* 5(4): 779-83.

46. Lin, R.; Ernsting, B.; Hirshfield, I. N.; Matthews, R. G.; Neidhardt, F. C.; Clark, R. L. and Newman, E. B. (1992). "The *lrp* gene product regulates expression of *lysU* in *Escherichia coli* K-12". *J Bacteriol.* 174(9): 2779–84.
47. Lucchini, S.; Rowley, G.; Golberg, M. D.; Hurd, D.; Harrison, M. and Hinton, J. C. (2006). "H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria." *PloS Pathog.* 2(8): e81.
48. Marasco, R.; Varcamonti, M.; La Cara, F.; Ricca, E.; De Felice, M. and Sacco, M. (1994). "In vivo footprinting analysis of Lrp binding to the *ilvIH* promoter region of *Escherichia coli*". *J Bacteriol.* 176(17): 5197-201.
49. Marshall, D. G.; Sheehan, B. J. And Dorman, C. J. (1999). "A role for the leucine-responsive regulatory protein and integration host factor in the regulation of the *Salmonella* plasmid virulence (*spv*) locus in *Salmonella typhimurium*". *Mol Microbiol.* 34(1): 134-45.
50. Martínez-Flores, I.; Cano, R.; Bustamante, V. H.; Calva, E. and Puente, J. L. (1999). "The *ompB* operón partially determines differential expression of OmpC in *Salmonella Typhi* and *Escherichia coli*." *J Bacteriol.* 181(2): 556-62.
51. McClelland, M.; Sanderson, K. E.; Spieth, J.; Clifton, S. W.; Latreille, P.; Courtney, L.; Porwollik, S.; Ali, J.; Dante, M.; Du, F.; Hou, S.; Layman, D.; Leonard, S.; Nguyen, C.; Scott, K.; Holmes, A.; Grewal, N.; Mulvaney, E.; Ryan, E.; Sun, H.; Florea, L.; Miller, W.; Stoneking, T.; Nhan, M.; Waterston, R. and Wilson, R. K. (2001). "Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2." *Nature.* 413(6858): 852-6
52. McFarland, K. A. and Dorman, C. J. (2008). "Autoregulated expression of the gene coding for the leucine-responsive protein, Lrp, a global regulator in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." *Microbiology.* 154(Pt 7): 2008-16.
53. Miller, V. L. and Mekalanos, J. J. (1988). "A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*." *J Bacteriol.* 170(6): 2575-83.
54. Mittrücker, H. W. and Kaufmann, S. H. (2000). "Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice." *J Leukoc Biol.* 67(4): 457-63.
55. Moreno-Eutimio, M. A.; Tenorio-Calvo, A.; Pastelin-Palacios, R.; Perez-Shibayama, C.; Gil-Cruz, C.; López-Santiago, R.; Baeza, I.; Fernández-Mora, M.; Bonifaz, L.; Isibasi, A.; Calva, E. and López-Macías, C. (2013).

- “*Salmonella* Typhi OmpS1 and OmpS2 porins are potent protective immunogens with adjuvant properties.” *Immunology*. 139(4): 459-71.
56. Münch, R.; Hiller, K.; Grote, A.; Scheer, M.; Klein, J.; Schobert, M. and Jahn, D. (2005). “Virtual Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes.” *Bioinformatics*. 21(22): 4187-9.
57. Navarre, W. W.; Porwollik, S.; Wang, Y.; McClelland, M.; Rosen, H.; Libby, S. J. and Fang, F. C. (2006). “Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*.” *Science*. 313(5784): 236-8.
58. Nicholson, B. And Low, D. (2000). “DNA methylation-dependent regulation of *pef* expression in *Salmonella typhimurium*”. *Mol Microbiol*. 35(4): 728-42.
59. Nikaido, H. (2003). “Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited.” *Microbiol Mol Biol Rev*. 67(4): 593-656.
60. Nikaido, H. and Vaara, M. (1985). “Molecular basis of bacterial outer membrane permeability.” *Microbiol Rev*. 49(1): 1-32.
61. Ohl, M. E. and Miller, S. I. (2001). “*Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis.” *Annu Rev Med*. 52: 259-74.
62. Oropeza, R.; Sampieri, C. L.; Puente, J. L. and Calva, E. (1999). “Negative and positive regulation of the non-osmoregulated *ompSI* porin gene in *Salmonella* Typhi: a novel regulatory mechanism that involves OmpR.” *Mol Microbiol*. 32(2): 243-52.
63. Parkhill, J.; Dougan, G.; James, K. D.; Thomson, N. R.; Pickard, D.; Wain, J.; Churcher, C.; Mungall, K. L.; Bentley, S. D.; Holden, M. T.; Sebaihia, M.; Baker, S.; Basham, D.; Brooks, K.; Chillingworth, T.; Connerton, P.; Cronin, A.; Davis, P.; Davies, R. M.; Dowd, L.; White, N.; Farrar, J.; Feltwell, T.; Hamlin N.; Haque, A.; Hien T. T.; Holroyd, S.; Jagels, K.; Krogh, A.; Larsen, T. S.; Leather, S.; Moule, S.; Ó'Gaora, P.; Parry, C.; Quail, M.; Rutherford, K.; Simmonds, M.; Skelton, J.; Stevens, K.; Whitehead S. and Barrell, B. G.. (2001). “Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18.” *Nature*. 413(6858): 848-52.
64. Peekhaus, N.; Tolner, B.; Poolman, B. and Krämer, R. (1995). “The glutamate uptake regulatory protein (Grp) of *Zymomonas mobilis* and its relation to the global regulator Lrp of *Escherichia coli*.” *J Bacteriol*. 177(17): 5140–7.

65. Platko, J. V. and Calvo, J. M. (1993). "Mutations affecting the ability of *Escherichia coli* Lrp to bind DNA, activate transcription, or respond to leucine". J Bacteriol. 175(4): 1110-7.
66. Pratt, L. A.; Hsing, W.; Gibson, K. E. and Silhavy, T. J. (1996). "From acids to *osmZ*: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*". Mol Microbiol. 20(5): 911-7.
67. Puente, J. L.; Verdugo-Rodríguez, A. and Calva, E. (1991). "Expression of *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* OmpC is influenced differently by medium osmolarity; dependence on *Escherichia coli* OmpR." Mol Microbiol. 5(5): 1205-10.
68. Pul, U.; Lux, B.; Wurm, R. And Wagner, R. (2008). "Effect of upstream curvature and transcription factors H-NS and LRP on the efficiency of *Escherichia coli* RNA promoters P1 and P2- a phasing analysis". Microbiology. 154(Pt 9): 2546-58.
69. Pul, U.; Wurm, R. And Wagner, R. (2007). "The role of LRP and H-NS in transcription regulation: involvement of synergism, allostery and macromolecular crowding". J Mol Biol. 366(3): 900-15.
70. Pul, U.; Wurm, R.; Lux, B.; Meltzer, M. and Wagner, R. (2005). "LRP and H-NS –cooperative partners for transcription regulation at *Escherichia coli* *rRNA* promoters". Mol Microbiol. 58(3): 864-76.
71. Ravnkar, P. D. and Somerville, R. L. (1987). "Genetic characterization of a highly efficient alternate pathway of serine biosynthesis in *Escherichia coli*". J Bacteriol. 169(6): 2611-7.
72. Reeves, M. W.; Evins, G. M.; Heiba, A. A.; Plikaytis, B. D. and Farmer, J. J. (1989). "Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other *Salmonellae* as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov." J Clin Microbiol. 27(2): 313-20.
73. Rex, J. H.; Aronson, B. D. and Somerville, R. L. (1991). "The *tdh* and *serA* operons of *Escherichia coli*: mutational analysis of the regulatory elements of leucine-responsive genes". J Bacteriol. 173(19): 5944-53.
74. Rodríguez-Morales, O.; Fernández-Mora, M.; Hernández-Lucas, I.; Vázquez, A.; Puente, J. L. and Calva, E. (2006). "*Salmonella enterica* Serovar Typhimurium *ompS1* and *ompS2* mutants are attenuated for virulence in mice." Infect Immun. 74(2): 1398-402.

75. Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
76. Santiviago, C. A.; Toro, C. S.; Hidalgo, A. A.; Youderian, P. and Mora, G. C. (2003). "Global regulation of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium major porin, OmpD." *J Bacteriol.* 185(19): 5901-5.
77. Schechter, L. M.; Jain, S.; Akbar, S. and Lee, C. A. (2003). "The small nucleoid-binding proteins H-NS, HU and Fis affect *hilA* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium". *Infect Immun.* 71(9): 5432-5.
78. Scherer, C. and Miller, S. (2001). "Molecular Pathogenesis of Salmonella in Principles of Bacterial Pathogenesis." Academic Press. 265-317.
79. Secundino, I.; López-Macías, C.; Cervantes-Barragan, L.; Gil-Cruz, C.; Ríos-Sarabia, N.; Pastelin-Palacios, R.; Villasis-Keever, M. A.; Becker, I.; Puente, J. L.; Calva, E. and Isibasi, A. (2005). "*Salmonella* porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response." *Immunology.* 117(1): 59-70.
80. Shimada, T.; Yamamoto, K. and Ishihama, A. (2009). "Involvement of the leucine response transcription factor LeuO in regulation of the genes for sulfa drug efflux." *J Bacteriol.* 191(14): 4562-71.
81. Stauffer, L. T. And Stauffer, G. V. (1994). "Characterization of the *gcv* control region from *Escherichia coli*". *J Bacteriol.* 176(20): 6159-64.
82. Suzuki, T., Ueguchi, C. and Mizuno, T. (1996). "H-NS regulates OmpF expression through *micF* antisense RNA in *Escherichia coli*". *J Bacteriol.* 178(12): 3650-3.
83. Tani, T. H.; Khodursky, A.; Blumenthal, R. M.; Brown, P. O. and Matthews, R. G. (2002). "Adaptation to famine: a family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(21): 13471-6.
84. Tuan, L. R.; D'Ari, R. and Newman, E. B. (1990). "The leucine regulon of *Escherichia coli* K-12: a mutation in *rbIA* alters expression of L-leucine-dependent metabolic operons". *J Bacteriol.* 172(8): 4529-35.
85. Unoarumhi, Y.; Blumenthal, R. M. and Matson J. S. (2016). "Evolution of a global regulator: Lrp in four orders of  $\gamma$ -Proteobacteria." *BMC Evol Biol.* 16(1): 111
86. Verdugo-Rodríguez, A.; López-Vidal, Y.; Puente, J. L.; Ruíz-Pacios, G. M. and Calva, E. (1993). "Early diagnosis of typhoid fever by an enzyme immunoassay

- using *Salmonella typhi* outer membrane protein preparations.” Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 12(4): 248-54.
87. Wang, Q. and Calvo, J. M. (1993). “Lrp, a major regulatory protein in *Escherichia coli*, bends DNA and can organize the assembly of a higher-order nucleoprotein structure.” EMBO J. 12(6): 2495-501.
88. Wang, Q.; Sacco, M.; Ricca, E.; Lago, C. T.; De Felice, M. and Calvo, J. M. (1993). “Organization of Lrp-binding sites upstream of *ilvH* in *Salmonella typhimurium*.” Mol microbiol. 7(6): 883-91.
89. Wilson, W.; Drew, L.; Henry, N. K. et al. “Diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas.” Primera ed. Manual moderno. D. F. México. 2002.
90. Yokoyama, K.; Ishijima, S. A.; Clowney, L.; Koike, H.; Aramaki, H.; Tanaka, C.; Makino, K. and Susuki, M. (2006). “Feast/famine regulatory proteins (FFRPs): *Escherichia coli* Lrp, AsnC and related archeal transcription factors”. FEMS Microbiol Rev. 30 (1): 89–108.
91. Zaidi, M. B.; Calva, J. J.; Estrada-Garcia, M. T.; Leon, V.; Vazquez, G.; Figueroa, G.; Lopez, E.; Contreras, J.; Abbott, J.; Zhao, S.; McDermott, P. and Tollefson, L. (2008). “Integrated food chain surveillance system for *Salmonella* spp. in Mexico.” Emerg Infect Dis. 14(3): 429-35.
92. Zaidi, M. B.; Leon, V.; Canche, C.; Perez, C.; Zhao, S.; Hubert, S. K.; Abbott, J.; Blickenstaff, K. and McDermott, P. F. (2007). “Rapid and widespread dissemination of multidrug-resistant *bla*<sub>CMY-2</sub> *Salmonella* Typhimurium in Mexico.” J Antimicrob Chemother. 60(2): 398-401.
93. Zaidi, M. B.; McDermott, P. F.; Fedorka-Cray, P.; Leon, V.; Canche, C.; Hubert, S. K.; Abbott, J.; Leon, M.; Zhao, S.; Headrick, M. and Tollefson, L. (2006). “Nontyphoidal *Salmonella* from human clinical cases, asymptomatic children, and raw retail meats in Yucatan, Mexico.” Clin Infect Dis. 42(1): 21-8.