



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO DEL EFECTO DE (p)ppGpp SOBRE LOS PROMOTORES DEL GEN
leuO DE *Salmonella enterica* SEROVAR TYPHI

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
DIEGO SÁNCHEZ POPOCA

DR. EDMUNDO CALVA MERCADO
Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. ELDA GUADALUPE ESPIN OCAMPO
Instituto de Biotecnología

DR. MARIO SOBERÓN CHÁVEZ
Instituto de Biotecnología

Ciudad de México. Marzo, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS.

Este trabajo y todos los demás logros los dedico a mi familia que siempre han estado apoyando mi camino en la ciencia. A mis padres Diego Sánchez Nieto y Graciela Popoca Ramos; a mis hermanas Abril y Fernanda con quienes paso siempre momentos tan agradables y siempre han sido la razón para ser cada día mejor.

AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecer a Dios por darme vida, salud y la oportunidad de haber comenzado y concluido esta etapa de mi vida en esta carrera científica.

Este logro no habría sido posible sin el apoyo de mis padres Diego y Graciela con quienes estaré agradecido toda la vida. También a mis hermanas Abril y Fernanda con quienes he compartido hermosos recuerdos.

También quiero agradecer al Dr. Edmundo Calva Mercado por el buen trabajo como tutor y gran apoyo académico y moral que me ha ofrecido durante varios años desde mi licenciatura. A Marcos Fernández Mora por hacer importantes aportaciones que contribuyeron a dar forma al proyecto. De igual manera agradezco la Dra. Guadalupe Espín Ocampo y el Dr. Mario Soberón Chávez que formaron parte de mi comité tutorial y ayudaron mucho a enriquecer este trabajo.

Además quiero agradecer a mis compañeras del laboratorio Grecia, Gloria y Nayeli por complementar este proyecto con su trabajo y darme divertidos recuerdos en el tiempo que estuve en el laboratorio.

Igualmente quiero agradecer a varios amigos del IBT como Rubiceli, Jesico, el grupo de la Dr. Liliana Pardo y el Dr. José Luis Puente, al grupo teatral del Instituto, el equipo de fútbol de los Masters y muchas personas más con quien tuve la oportunidad de convivir y compartir conocimientos.

También quiero externar el agradecimiento a varios amigos de fuera que siempre fueron un apoyo moral como Carlos P., Memo Quesney, Giovanni, Michelle y el padre Genaro. Así como Nancy, Aarón, Dilan, Alan, Luis, Lupita, Alessandro, Alejandra, Eli, Carlitos, Jorgito y muchos miembros más del grupo Alateen que siempre me han escuchado, brindado un abrazo y hasta lágrimas me han regalado.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIAS	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	vi
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1 Generalidades de <i>Salmonella</i>	1
1.2 <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi	1
1.3 Factores de patogénesis	3
1.4 Familia LysR	4
1.5 Generalidades de LeuO	5
1.6 LeuO en virulencia	7
1.7 Regulación de <i>leuO</i>	8
1.8 (p)ppGpp	12
2. ANTECEDENTES.	17

3. JUSTIFICACIÓN.	21
4. HIPÓTESIS.	21
5. OBJETIVOS.	21
6. METODOLOGÍA.	21
6.1 Preparación de células competentes.	22
6.2 Transformación de las cepas.	23
6.3 Selección de las clonas.	23
6.4 Condiciones de cultivo.	23
6.5 Actividad de β -galactosidasa.	25
6.6 RT-PCR	26
7. RESULTADOS.	26
8. DISCUSIÓN	36
9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	49
10. BIBLIOGRAFÍA	50

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Mecanismo de infección.	2
Figura 2. Estructura de un LysR	5
Figura 3. Esquema de localización del gen <i>leuO</i> .	6
Figura 4. Mecanismo de relevo de promotor.	9
Figura 5. Estructura química de las alarmonas (p)ppGpp.	13
Figura 6. Vía de síntesis de (p)ppGpp por RelA.	14
Figura 7. Región discriminadora.	16
Figura 8. Esquema de las diferentes construcciones traduccionales de la región reguladora de <i>leuO</i> .	17
Figura 9. Promotores de <i>leuO</i> .	19
Figura 10. Actividad de las diferentes fusiones de la región reguladora <i>leuO</i> .	20
Figura 11. Actividad de β -galactosidasa de construcciones traduccionales	27
Figura 12. Actividad de β -galactosidasa de la fusión transcripcional pRS/lrp	28
Figura 13. Esquema de las fusiones transcripcionales para cada uno de los promotores de <i>leuO</i>	29
Figura 14. Actividad de β -galactosidasa pRS/ <i>leuOP1</i>	30
Figura 15. Actividad de β -galactosidasa pRS/ <i>leuOP2</i>	30
Figura 16. Actividad de β -galactosidasa pRS/ <i>leuOP3</i>	31
Figura 17. Actividad de β -galactosidasa pRS/ <i>leuOP5P4</i>	31
Figura 18. Actividad de β -galactosidasa pRS/ <i>leuOP4</i>	32
Figura 19. Esquema de la enzima RelA con sus distintas formas truncadas	33
Figura 20. Cinética de crecimiento de <i>S. Typhi</i> silvestre con el sistema de inducción de RelA truncada.	34
Figura 21. Cinética de crecimiento de <i>S. Typhi hns lrp</i> con el sistema de inducción de RelA truncada.	34
Figura 22. Cinética de crecimiento de <i>S. Typhi</i> silvestre con el sistema de inducción de RelA truncada con gradiente de IPTG.	35
Figura 23. RT-PCR de <i>leuO</i>	36
Figura 24. Modelo de regulación de los promotores a través de (p)ppGpp.	42
Figura 25. Análisis de las secuencias promotoras de <i>leuO</i> .	45
Figura 26. Esquema de regulación de <i>leuO</i> por H-NS, Lrp y ppGpp.	48
Tabla 1. Plásmidos correspondientes a cada cepa.	21
Tabla 2. Características de cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.	22

RESUMEN.

Salmonella enterica serovar Typhi es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa, patógena intracelular, perteneciente a la familia enterobacteriaceae y agente etiológico de la fiebre tifoidea. Múltiples factores genéticos se han asociado a la virulencia de *S. Typhi* así como reguladores transcripcionales que favorecen este fenotipo, tal es el caso de *LeuO* un regulador transcripcional dual, que desde sus primeros reportes fue involucrado en la regulación de genes implicados en la supervivencia de la bacteria en condiciones de estrés y además en virulencia de varios patógenos. Se desconoce la señal precisa que desencadena la expresión de *leuO* ya que en un fondo silvestre se encuentra reprimido por las proteínas H-NS y Lrp. Sin embargo, se conocen condiciones que favorecen su expresión, como la entrada a fase estacionaria, el heterodímero RcsB-BglJ y la actividad de la alarmona guanina tetrafosfato conocida como ppGpp. Esta alarmona es producida por las enzimas RelA y SpoT en condiciones de estrés. El ppGpp puede actuar por interacción directa con la RNA polimerasa (RNAP) reprimiendo los genes ribosomales y la favoreciendo la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos.

La regulación de *leuO* en *S. Typhi* ha resultado ser interesantemente compleja. En nuestro laboratorio se ha estudiado dicha regulación por medio del análisis de su región reguladora a través de diversos recortes de dicha región fusionadas a *lacZ*. Además, con el estudio de mutantes a reguladores como H-NS y Lrp, y en ensayos de interacción DNA-proteína se ha observado que estas proteínas se unen a la región reguladora de *leuO* actuando como represores. También se ha confirmado la existencia de cinco promotores que participarían en su transcripción y dos promotores reversos dentro de su misma región intergénica. En este trabajo hemos observado una regulación diferencial por (p)ppGpp sobre los promotores de *leuO*. Este análisis sugiere que dicha regulación depende de un paso previo de desrepresión de H-NS y Lrp. Con estos datos se pretende establecer un modelo que explique los mecanismos que desencadenan la expresión de un gen quiescente como *leuO*.

MARCO TEÓRICO.

1.1 Generalidades de *Salmonella*.

Las enfermedades gastrointestinales infecciosas surgen por la alimentación con agua o alimentos contaminados y pueden tener un amplio número de agentes etiológicos conocidos como patógenos entéricos. El género *Salmonella* es un grupo de bacterias entéricas de gran relevancia clínica, debido a que es uno de los agentes etiológicos más comunes de enfermedades diarreicas (Fábrega and Vila, 2013). *Salmonella* sp es un bacilo Gram negativo patógeno intracelular facultativo que causa enfermedad entérica en un amplio rango de animales. Existen dos especies de *Salmonella*, *S. bongori* y *S. enterica*. Esta última se divide en seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* y *houtenae*. A su vez éstas pueden ser clasificadas en más de 2500 serovares basados en los antígenos somático (O), flagelar (H) y capsular (Vi).

Esta última clasificación incluye serovariedades tíficas y no tíficas. Las cepas no tíficas como *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* causan cuadros diarreicos con una bacteremia ocasional en humanos, ganado porcino y aves de corral; mientras que las cepas tíficas tales como *S. Typhi* y *S. Paratyphi* causan un trastorno sistémico denominado fiebre tifoidea (Figueroa and Verdugo, 2005., Jong et al. 2012., LaRock et al. 2015).

1.2 *Salmonella enterica* Serovar Typhi.

Salmonella enterica serovar Typhi (*S. Typhi*) es un patógeno exclusivamente de humanos y es capaz de causar una enfermedad sistémica denominada fiebre tifoidea (FT), proveniente del griego *typhus* y sufijo *oid* que significa “como humo” o “como niebla” (Calva et al., 1988). La FT es un problema global, con más de 27 millones de casos anuales alrededor del mundo causando aproximadamente 200 000 muertes al año siendo mayormente afectada la población infantil (Crump et al. 2010). La FT es una de las infecciones más comunes por alimentos contaminados. En México no se cuenta con estadísticas nacionales de dicha infección, aunque se estima que tiene una incidencia de 15 000 casos al año (Zaidi et al., 2006).

S. Typhi se adquiere por ingestión de agua o alimentos contaminados. Presenta un periodo de incubación de 10 a 15 días (Calva et al., 1988) y es capaz de sobrevivir a las condiciones ácidas del tracto digestivo hasta acceder al intestino, en donde puede atravesar la barrera epitelial, preferencialmente penetrando en las células M de las placas de Peyer (Fig. 1). Además, con ayuda de sus fimbrias *Salmonella* puede adherirse a enterocitos no fagocíticos, y así favorecer una endocitosis mediada por la misma bacteria la cual consiste en inducción de ondulamientos de la membrana (ruffling) para así favorecer su entrada (Calva et al., 1988., Haraga et al., 2008., LaRock et al. 2015). Una vez que *S. Typhi* atraviesa el epitelio intestinal, es capaz de causar una bacteremia, es decir, puede invadir otros órganos como el bazo, hígado, vesícula biliar, nódulos linfáticos y aunque la perforación intestinal a causa de *S. Typhi* no es frecuente, esta complicación contribuye con el 25% de los casos de muerte por FT (Finlay and Falkow, 1989., Calva, et al., 1998).

Es así que se produce el trastorno sistémico denominado fiebre tifoidea la cual se caracteriza principalmente por fiebre de 39°C por más de 72 horas, inapetencia, dolor abdominal, náuseas, fatiga, esplenomegalia, hepatomegalia, tos seca y vómito (Diagnóstico y tratamiento de la fiebre tifoidea del Gobierno Federal).

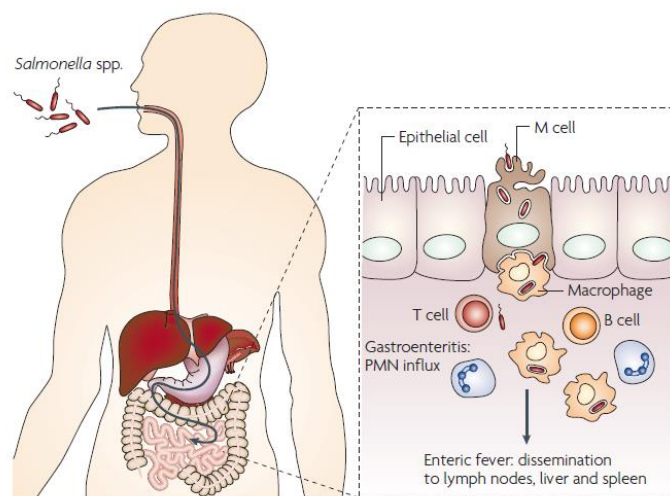


Fig. 1. Mecanismo de infección. *Salmonella* spp. Logra sobrevivir a las barreras del sistema inmune innato hasta acceder al epitelio del intestino delgado en donde entran preferentemente a través de las células M donde pueden transportarse a través de ellas hasta encontrarse con células linfoides. Así, para el caso de cepas asociadas a enfermedad sistémica, el sistema reticuloendotelial ayuda a la diseminación. Por el contrario, las cepas no tíficas inducen solo inflamación local que resulta en infiltración de polimorfonucleares y diarrea. (Tomado de Haraga et al., 2008).

1.3 Factores de patogénesis.

El entendimiento de señales que desencadenen la virulencia en patógenos como *Salmonella* es de suma relevancia para el mejoramiento de estrategias para tratar o diagnosticar enfermedades. *S. Typhi* tiene un genoma de 4.8 Mpb y aproximadamente 4800 genes en donde se han estudiado diversos factores asociados a la patogénesis estimando que el 4% de su genoma podría asociarse a su virulencia (Bowe et al., 1998). Dentro de estos genes de virulencia la gran mayoría se localizan en las llamadas islas de patogenicidad. Las islas de patogenicidad (SPIs) son elementos genéticos que están integrados en el nucleóide de la bacteria y que fueron adquiridos por transferencia horizontal durante la evolución de *Salmonella*; en las islas se encuentran codificados múltiples factores involucrados en invasión y supervivencia de la bacteria dentro del hospedero (Valdez et al. 2009., Velge et al. 2012., Hensel, 2004).

En la actualidad se han descrito 21 islas de patogenicidad diferentes en *Salmonella*, de las cuales se han caracterizado mejor la isla 1 (SPI-1) y la isla 2 (SPI-2). SPI-1 es un locus de 40 kb que alberga genes que codifican para la biosíntesis de un sistema de secreción tipo III (T3SS), proteínas efectoras con sus chaperonas y algunas proteínas regulatorias. El T3SS es un complejo proteico capaz de inyectar efectores del citoplasma bacteriano hacia el citosol de la célula hospedante con la finalidad de hacer rearrreglos en su citoesqueleto para permitir la entrada de *Salmonella* (Velge et al. 2012). SPI-2 es una isla presente en *Salmonella enterica* pero ausente en *Salmonella bongori* y su adquisición jugó un papel importante en el fenotipo invasivo durante la evolución de *Salmonella*. SPI-2 es una isla de 40 kb que también codifica para un T3SS y se ha observado que SPI-2 desempeña una función en la sobrevivencia y replicación intracelular de *Salmonella* en el macrófago, porque las proteínas efectoras secretadas son capaces de regular el tráfico de vesículas que pueden producir un estrés oxidativo en la vacuola contenedora de *Salmonella* (SCV) y así evitar la muerte intracelular por el sistema inmune adaptativo (Valdez et al. 2009).

Además de las SPIs hay otros factores que han demostrado ser determinantes para la virulencia en *Salmonella*.

El lipopolisacárido (LPS) es un componente mayoritario en la membrana externa de las bacterias Gram negativas; ha demostrado ser inmunógeno y estudios sugieren que su correcta estructuración es importante para la capacidad de *Salmonella* de infectar ratones (Khan et al., 1998). La cápsula de polisacáridos (antígeno Vi) es un factor clave para la virulencia de *S. Typhi* y notablemente ausente en otros serovares como *Typhimurium*. La cápsula puede prevenir el reconocimiento patógeno-hospedero porque evita el contacto del LPS con receptores de células del sistema inmune (Wilson et al., 2008). El flagelo es otro factor importante en la virulencia de *S. Typhi*, ya que mutantes en genes relacionados con la biosíntesis del flagelo han presentado una menor frecuencia en los niveles de invasión (Finlay and Falkow, 1989).

Las fimbrias son estructuras de la superficie de la bacteria que también desarrollan un papel importante en la adherencia de *Salmonella* hacia las células hospederas. El patógeno puede adherirse directamente al hospedero o a la matriz extracelular; además las adhesinas tienen la capacidad de activar a los linfocitos B y neutrófilos provocando proliferación celular y secreción de citocinas (Ochoa et al., 2005).

Los reguladores transcripcionales son elementos clave para conocer los mecanismos de estimulación y respuesta en la expresión de genes que se asocian a la virulencia. La familia LysR es uno de los grupos de reguladores transcripcionales mayormente diversos, asociándose a múltiples vías esenciales en la homeostasis de la bacteria.

1.4 Familia LysR.

Los reguladores transcripcionales tipo LysR (LTTR) son proteínas de una gran familia de aproximadamente 800 miembros, involucradas en diversas funciones celulares dependiendo del organismo, incluyendo transporte, respuesta a estrés oxidativo, fijación de nitrógeno, formación de biopelícula y virulencia (Madocks and Oyston, 2008). Los LTTR pueden ser activadores o represores de la transcripción, tienen una longitud entre 300 a 350 aminoácidos y poseen regiones estructurales altamente conservadas como un dominio de unión a DNA hélice-

vuelta-hélice en el extremo amino terminal y un dominio regulador (RD) en el C terminal, donde se ubican dos subdominios (RD1 y RD2) que son conectados por una región en forma de hendidura (Fig. 2) donde posiblemente se une un co-inductor (Momany and Neidle, 2012). Es así como los LTTR actúan en combinación con moléculas que funcionan como ligando para modular su unión al DNA a través de este dominio C terminal (Maddocks and Oyston, 2008).

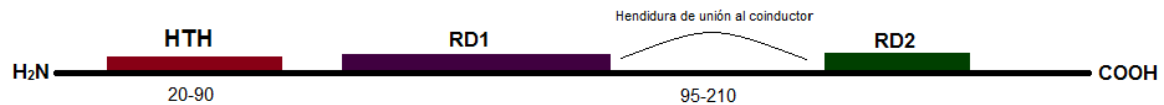


Figura 2. Estructura de un LysR. El dominio HTH se localiza 20-90 residuos del extremo N terminal, el dominio de unión al coinductor se encuentra entre los residuos 95 y 210 del extremo C terminal. RD1 y RD2 son dos dominios conservados que se unen por una región de cruce que forma una bisagra o hendidura (Modificado de Maddocks and Oyston, 2008).

Uno de los miembros de la familia LysR de especial interés es LeuO, un regulador transcripcional asociado a respuesta a estrés y virulencia de varios patógenos incluyendo *Salmonella* spp.

1.5 Generalidades de LeuO.

En un principio se denominó como *leuO* a la región adyacente al operón *leuABCD* cuya mutación en *cis* proporciona la expresión constitutiva de *leuABCD*, acuñándose así como una mutación “operador constitutiva”, asumiendo que dicha zona involucra un operador (Calvo et al., 1969, Demerec et al., 1965). Más tarde la asignación de *leuO* fue designada al gen adyacente al operón *leuABCD* que probablemente poseía función regulatoria en la biosíntesis de leucina, sin embargo no fue observada la auxotrofia para este aminoácido en una mutante en *leuO* (Ueguchi et al. 1998).

El gen *leuO* se localiza entre el operón *leuABCD* que codifica para enzimas de la síntesis de leucina y el operón *ilvIH* que es responsable de la síntesis de valina, leucina e isoleucina (Fig. 3), más precisamente entre los 135983 y 136927 pb del genoma de *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18 (Enciclopedia de Genes y Genomas Kyoto). Por su homología con otras proteínas, LeuO fue clasificado como

un miembro de la familia LysR (Henikoff *et al.* 1988). Se desconoce el coinductor o señal precisa que desencadena la expresión de *leuO* en *S. Typhi*.

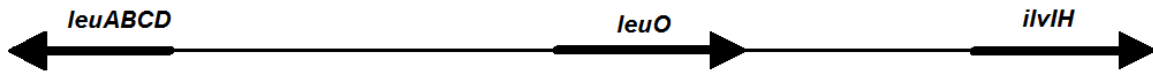


Fig. 3. Esquema de localización del gen *leuO*.

Estudios pioneros fueron relacionando a este regulador con condiciones de estrés para la bacteria, tales como la represión indirecta de la traducción del factor σ^S , debido a que LeuO reprime un RNA regulador llamado DsrA el cual puede potenciar la traducción de *rpoS* en *E. coli* (Klauck *et al.* 1997). También en *E. coli*, se detectó que la sobreexpresión de LeuO era capaz de reprimir la expresión de *cadC*, un factor involucrado en la activación del operón *cadAB* el cual se expresa en respuesta a cambios en el pH (Shi and Benett, 1995). De manera semejante, la sobreexpresión de *leuO* conduce a la activación del operón *bgl* el cual se asocia a la utilización de ciertos β -glucósidos (Ueguchi *et al.* 1998). Interesantemente en estos casos reportados, tanto *bgl*, *dsrA*, *cadC* y hasta el mismo *leuO* se encuentran regulados por H-NS (Klauck *et al.* 1997, Chen *et al.*, 2005, Guadarrama, 2004). Estudios de inmuno-precipitación de la cromatina (ChIP-chip) y SELEX genómico en *Salmonella Typhimurium* y *Escherichia coli* han fortalecido la hipótesis de que LeuO juega un papel antagonista de H-NS (Shimada *et al.*, 2011, Dillon *et al.*, 2012, Ishihama *et al.*, 2016).

Por estudios en *S. Typhi* se ha demostrado que la sobre-inducción de LeuO regula la expresión de las porinas quiescentes OmpS1 y OmpS2 (Fernández-Mora *et al.*, 2004, De la Cruz *et al.*, 2007, Hernández-Lucas *et al.*, 2008). Mutantes en estas porinas atenuaron la infección de *S. Typhimurium* en ratones (Rodríguez *et al.*, 2006). La sobre-inducción de LeuO en *S. Typhi* también activa la expresión de *assT* (una aril-sulfotransferasa) y de *casA* (nucleasa del sistema CRISPR-Cas), pero también reprime la expresión de *ompX*, (una porina transportadora de compuestos hidrofóbicos) y *tpx* (una tiol-peroxidasa periplásmica), evidenciando así a LeuO como un regulador global potencial (Hernández-Lucas *et al.*, 2008., Guadarrama *et al.*, 2014).

Se ha documentado que LeuO regula sus genes blanco en un estado oligomérico de tetrámero (Guadarrama et al., 2014). Aunque carece de una secuencia consenso de unión al DNA, es sabido que se une a regiones ricas en AT, y gran parte de estos sitios de unión en el DNA son asociados a los sitios de unión de la RNA polimerasa (RNAP) sugiriendo la capacidad de LeuO para reclutar a la RNAP (Dillon et al., 2012).

1.6 LeuO en virulencia.

La relación de LeuO con el fenotipo virulento en ciertos patógenos ha ido cobrando importancia para entender su participación en los mecanismos de supervivencia, así como la interacción del microorganismo en el hospedero. En *Vibrio cholerae* se ha observado que la activación de *leuO* vía ToxR favorece la resistencia de la bacteria a bilis. También esta activación se ha asociado a su resistencia a pH ácido y capacidad de formar biopelícula (Ante et al. 2015a., Ante et al. 2015b., Moorthy and Watnick, 2005), pero también se ha comprobado que la sobre-inducción de LeuO reprime la expresión de la toxina colérica (CT) y la pilina coregulada por la toxina (TCP) (Bina, 2013). Así mismo se ha demostrado en *Vibrio parahaemolyticus* que un homólogo a ToxR (ToxRS) regula negativamente un sistema de secreción tipo 3 (T3SS-1) de manera indirecta a través de la expresión de LeuO (Whitaker, 2012).

En *Yersinia enterocolitica* se ha determinado que LeuO es un regulador positivo del gen *rovA*, el cual codifica para un importante regulador de su virulencia. RovA a su vez regula positivamente a la invasina, el principal factor de adherencia en *Y. enterocolitica* que promueve su eficiente colonización en las placas de Peyer (Lawrenz et al. 2007).

Estudios en cepas de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) han permitido postular un modelo en el cual LeuO favorece la expresión del operón LEE1 el cual codifica para proteínas efectoras relacionadas con el esfacelamiento de los enterocitos (Takao et al. 2014). En *E. coli* K12 se ha observado deficiencias significativas en la formación de biopelícula en una cepa mutante en *leuO* (Shimada et al., 2011).

En *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) se ha determinado que la mutación de *leuO* atenúa significativamente la infección en ratón (Rodríguez *et al.*, 2006) y que LeuO es un factor expresado a los 7 días post infección (Lawley, *et al.*, 2006). Además LeuO ha demostrado tener una participación en la regulación negativa de la isla de patogenicidad 1 (SPI1) a través de favorecer la expresión de HilE, un regulador negativo de HilD. Éste último es el regulador maestro de dicha isla la cual se asocia con la invasión de *Salmonella* a las células del hospedero (Espinosa and Casadesus, 2014). Estudios de CHIP- chip también demostraron sitios blanco de LeuO en el gen *sopA*, el cual codifica para una proteína que es translocada por el sistema de secreción tipo III de SPI1, y el gen *sifA*, un efector translocado por SPI 2 (Dillon, 2012).

Además se ha evidenciado en *S. Typhimurium* que LeuO podría tener una función en la comunicación de la bacteria con el sistema inmune del hospedero, ya que una cepa mutante en *leuO* exhibe niveles de invasión semejantes a la cepa silvestre, pero reduce significativamente la migración transepitelial de células polimorfonucleares PMN (Tenor *et al.*, 2004).

1.7 Regulación de *leuO*.

No se ha determinado un inductor específico que desencadene la expresión de *leuO*, a diferencia de algunos otros miembros LysR. Sin embargo se ha observado que tiene una regulación compleja en varios modelos biológicos en donde se ha estudiado.

En un principio la regulación de *leuO* fue relacionada al operón *leuABCD* con el estudio de la cepa *leu-500* (CH582) de *S. Typhimurium* la cual posee una mutación en el promotor del operón *leuABCD* (*p_{leu-500}*) que la hace auxótrofa para leucina (Margolin, 1963). Dicha mutación es suprimida en un fondo mutante en la topoisomerasa (*topA⁻*), lo cual significaba que el súper enrollamiento del DNA era un factor importante en dicha supresión. Para explicar este fenómeno se describió un mecanismo llamado “relevo de promotor” (Fig. 4) en el cual se establece que la activación de *p_{leu-500}* es consecuencia de la activación del promotor distante del gen *ilvIH* (involucrado en la biosíntesis de isoleucina y valina) seguido de la

activación del promotor intermedio *p_{leuO}*. Es decir, la actividad transcripcional inicial de *p_{ilvIH}* produce un súper enrollamiento local que causa la interacción promotor-promotor, activando la transcripción a partir de *p_{leuO}* que normalmente se encuentra reprimida, con lo cual se activa a *p_{leu-500}* por medio de la proteína LeuO y por el superenrollamiento local ocasionado por la activación de *p_{leuO}* (Fang and Wu, 1998a).

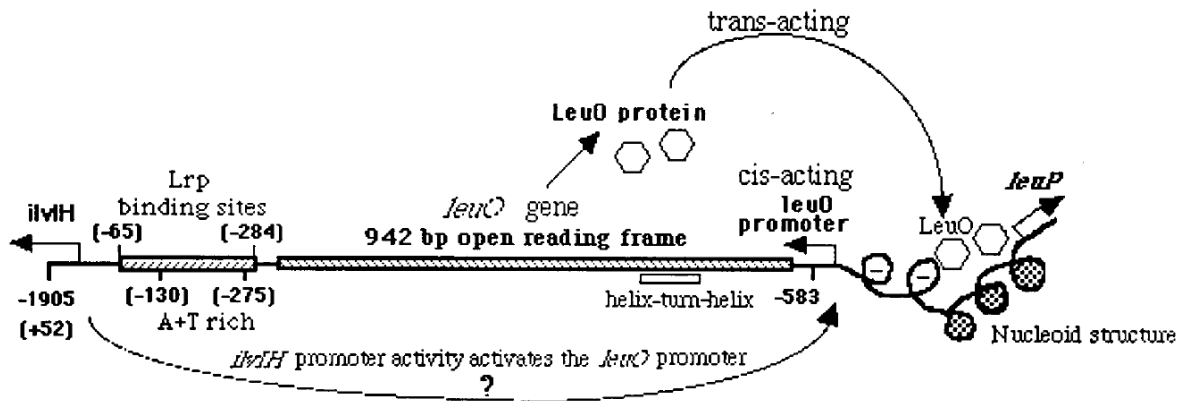


Fig. 4. Mecanismo de relevo de promotor para la activación secuencial de genes a distancia. El superenrollamiento local de la transcripción de *ilvIH* estimula la activación del promotor *leuO*, a su vez el super enrollamiento ocasionado por transcripción de *leuO*, así como su actuación en *trans* (LeuO) activan la expresión de *leu500* (Tomado de Fang and Wu, 1998a).

Posteriormente se confirmó que este mecanismo de relevo de promotor también podría ocurrir aún en un fondo *topA⁺*, y que la ausencia de leucina en una etapa tardía de crecimiento, es una señal de activación para dicho mecanismo, probablemente porque Lrp (proteína de respuesta a leucina) detectaría esta ausencia de leucina y activaría el promotor de *ilvIH* (Platko et al., 1990), demostrándose así que la activación de *ilvIH* contribuye en la expresión de *leuO* (Fang and Wu, 1998a., Fang and Wu, 1998b). Este efecto indirecto de aumento por la ausencia de leucina, también fue observado en respuesta al ayuno de aminoácidos de cadena ramificada (Majumder et al., 2001) y reiteradamente, experimentos en *E. coli* con distintos aminoácidos (aa) confirmaron que la mayor expresión en *leuO* ocurría en un medio con 19 aa (sin leucina) seguida de un medio con 17 aa (sin los aa de cadena ramificada), en comparación con un medio que contiene los 20 aa (Stratmann et al., 2012).

Posteriormente, al igual que en *S. Typhimurium*, en *E. coli* también se determinó que ocurre el mecanismo de relevo de promotor (Chen et al., 2005) y que en ambas bacterias la expresión de *leuO* se inducía a la entrada a la fase estacionaria. Sin embargo, los estudios en una mutante en el gen del factor RpoS llevaron a descartarlo como activador de *leuO* y, por el contrario, la alarmona (p)ppGpp resultó ser determinante de dicha inducción (Majumder et al., 2000).

Se estableció así un modelo en el cual la alarmona (p)ppGpp favorece la expresión de Lrp (Landgraf and Calvo, 1996). Así Lrp a su vez activa *ilvIH* (Platko et al., 1990) y consecuentemente se desencadena el mecanismo de relevo de promotor (Fang and Wu, 1998a).

(p)ppGpp es un regulador global presente en condiciones de estrés por ayuno de aminoácidos (Cashel and Gallant, 1969) mejor conocida como respuesta estricta. Una manera conocida de inducir la respuesta estricta es a través de la disminución de los niveles de aminoácidos de cadena ramificada (isoleucina, leucina y valina) causados por la suplementación con serina, metionina y glicina (SMG), observándose así que, en este fenómeno, la expresión de *leuO* resultó ser indispensable para reanudar el arresto de este crecimiento en *E. coli* (Majumder et al., 2001).

Estudios más detallados de la región reguladora de *leuO* demostraron que contiene una zona de control negativo rica en AT (elemento AT4) que abarca 72 pares de bases (Chen et al., 2001). Dicha región tiene dos partes funcionales: una de 47 pb (elemento AT8) que conserva su actividad represiva y otra de 25 pb (elemento AT7) en donde LeuO puede unirse para mediar su propia desrepresión (Chen et al., 2003). Estudios posteriores del elemento AT8 comprobaron ser un sitio de nucleación de la proteína tipo histona H-NS (Chen et al., 2005).

Más estudios en *E. coli* han documentado condiciones o reguladores que pueden inducir la expresión de *leuO*. Un estudio proteómico determinó que *leuO* forma parte de un listado de genes que se inducen en un medio con limitación en fosfato (VanBoglen et al., 1996). En *E. coli* K12 se ha establecido un modelo en el cual *leuO* es reprimido por H-NS y StpA mientras que el heterodímero RcsB-BglJ puede antagonizar la represión y regular positivamente el promotor 2 de *leuO*.

Además de que *leuO* al sobre inducirse puede autorregularse de manera negativa (Stratmann *et al.*, 2012).

Otro regulador positivo descrito para la expresión de *leuO* en *E. coli* es LrhA, miembro de la familia LysR conocido por regular genes asociados a fimbrias. La sobre inducción de LrhA fue capaz de auxiliar la expresión de *leuO* en el promotor 1, así como en otros dos inicios de transcripción (Breddermann and Schnetz, 2017). SlyA es otro factor transcripcional reportado que modula positivamente a *leuO* en *E. coli*. Este factor está involucrado en la síntesis de cápsula y formación de biopelícula, y un estudio transcriptómico reveló que *leuO* forma parte de una lista de nuevos genes controlados por este regulador (Curran *et al.*, 2017).

Por otro lado, *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), se determinó que la expresión de *leuO* se beneficiaba significativamente en un medio con butirato, el cual es un ácido graso de cadena corta producido por la microbiota y que es capaz de inducir genes de virulencia en EHEC. Esta inducción de *leuO* demostró ser vía Lrp, postulándose así un modelo complejo en el cual *leuO* es reprimido por H-NS y es inducido por Lrp, además de otros activadores como Ler y Pch. Así mismo esta inducción de *leuO* induce la expresión de los genes de la isla de patogenicidad *LEE* (Takao *et al.* 2014).

En cuanto a a regulación en *Vibrio cholerae*, la cual como ya se señaló es otra bacteria en la cual recientemente se ha comenzado a estudiar la función de LeuO, se ha observado que *Vibrio spp.* excreta el dipéptido cíclico Phe-Pro (cFP) que es capaz de inducir significativamente la expresión de *leuO*. Esto ocurre a través de a través del estímulo del factor transcripcional asociado a membrana ToxR, el cual es capaz de detectar el cFP y posteriormente unirse a la región reguladora de *leuO* para activar su transcripción. Incluso la expresión de *leuO* en este estudio fue confirmada *in vivo* al visualizarse en intestinos de ratones infectados con *V. cholerae* (Bina *et al.*, 2013). La exposición a un ambiente con sales biliares en *V. cholerae* representa otro factor que benefició la inducción de *leuO*, y al igual que con el cFP, las sales biliares pueden inducir a *leuO* por vía ToxR (Ante *et al.*, 2015a). En *S. Typhi* se conoce poco acerca de los mecanismos que favorecen la expresión de *leuO* y al parecer su regulación difiere de los patógenos antes mencionados.

Nuestro trabajo tiene un enfoque sobre la función de la guanina tetrafosfato y pentafosfato denominada colectivamente como (p)ppGpp, el cual es un segundo mensajero anteriormente mencionado que demostró favorecer la expresión de *leuO* (Majumder et al., 2000), y que ha representado ser un regulador pleiotrópico de alarma por estrés, muy importante en bacterias (Hauryliuk et al., 2015).

1.8 (p)ppGpp

Las bacterias pueden estar expuestas a diversas condiciones ambientales y detectar distintos tipos de estrés. La limitación de nutrientes es una situación ampliamente estudiada en bacterias y a los mecanismos para contender con este escenario se le conoce como control estricto o respuesta estricta. La respuesta estricta se caracteriza por el arresto del crecimiento a través de la represión de la síntesis de rRNA durante el ayuno de nutrientes como aminoácidos u otros tipos de estrés (Cashel and Gallant, 1969., Dalebroux and Swanson, 2012., Kanjee et al., 2012., Haurilyuk, et al. 2015). El estudio de la respuesta estricta permitió observar que se afectaba el metabolismo de algunos compuestos fosfatados; al observarlos en un autorradiograma se lograba ver una mancha (*magic spot*) que migraba muy cerca del GTP pero que aparecía únicamente en el extracto de cepas que se sometían a respuesta estricta (Cashel and Gallant, 1969). En la actualidad esa “mancha mágica” la conocemos como alarmona o (p)ppGpp, la molécula efectora de la respuesta estricta, la cual es un derivado de GTP o GDP que difiere únicamente por la presencia de un pirofosfato esterificado en el carbono 3´ de la ribosa (Fig. 5) (Potrykus and Cashel, 2008).

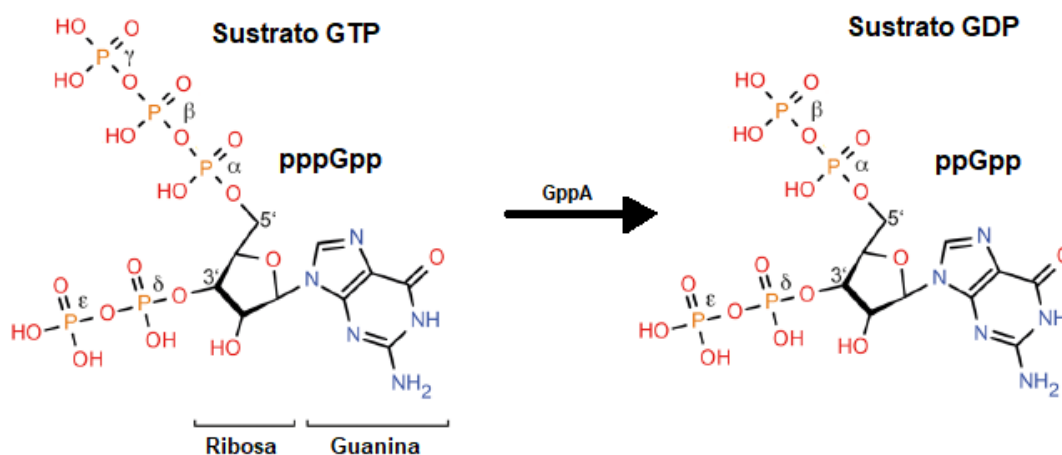


Fig 5. Estructura química de las alarmonas (p)ppGpp (Modificado de Bange and Steinchen, 2016). RelA y SpoT pueden utilizar GTP o GDP para producir la forma de penta fosfato (pppGpp) o tetra fosfato (ppGpp). La fosfatasa GppA puede convertir el pppGpp a ppGpp.

Primordialmente (p)ppGpp induce una drástica inhibición de la síntesis del RNA estable (tRNA y rRNA), proteínas y DNA (Svitil et al., 1993., Schreiber et al., 1991., Potrykus and Cashel, 2008).

Se había observado que la respuesta estricta era abatida o “relajada” en un fondo mutante *RC* (posteriormente cambiaría su nombre a *relA* por dicho fenotipo relajado) y se deducía que el producto de dicho gen se asociaba con la síntesis de (p)ppGpp (Cashel and Gallant, 1969). Sin embargo, la mancha mágica podría percibirse aún bajo ciertas condiciones estrictas en fondos *relA*⁻. No obstante, la mancha mágica podía eliminarse (fenotipo denominado *spotless*) cuando se mutaba un *locus*, el cual se nombró *spoT*: además de que el producto de este *locus* tenía la propiedad de degradar (p)ppGpp. Es así como se especuló que *spoT* participaba en otra vía de síntesis, pero también de degradación de (p)ppGpp (Laffer and Gallant, 1974). Hoy en día sabemos que (p)ppGpp es biosintetizado principalmente por estas dos enzimas, RelA y SpoT que representan a la familia RSH (enzimas homólogas a RelA y SpoT) y que están distribuidas en diversas proteobacterias (Potrykus and Cashel, 2008).

Para el caso de RelA, se ha postulado que adquiere una conformación activa al interactuar con el sitio A de la subunidad 50S del ribosoma en presencia de tRNA

deacilados y con este estímulo utiliza como sustrato al ATP para fosforilar un GTP o GDP en el carbono 3' originando (p)ppGpp y AMP (Fig. 6).

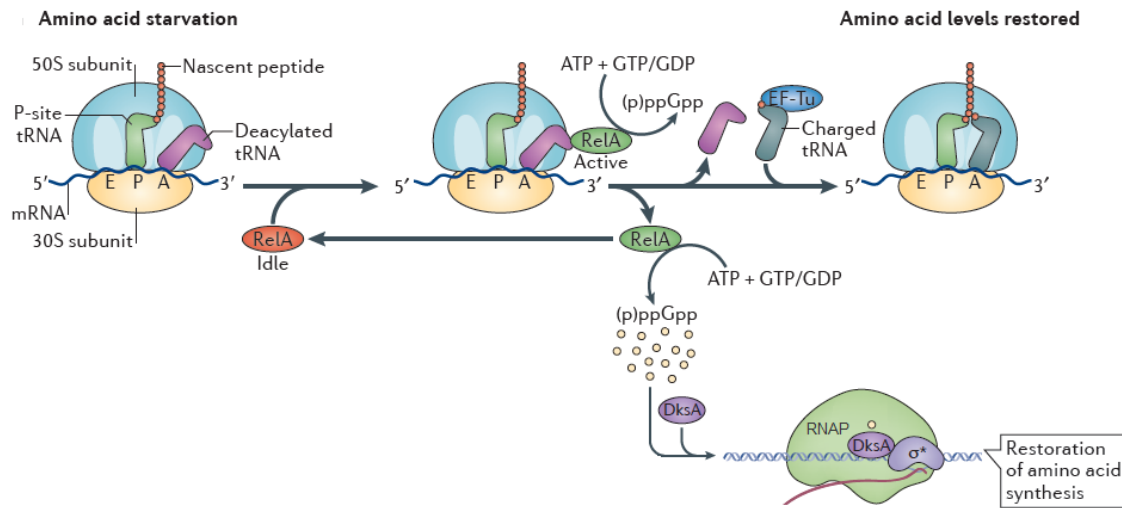


Fig. 6. Vía de síntesis de (p)ppGpp por RelA. El ayuno de aa conduce a la acumulación de tRNAs descargados en el citosol y estos se unen al sitio A del ribosoma. Este estado ribosomal es reconocido por RelA el cual se une a la subunidad 50S adquiriendo su forma activa para sintetizar (p)ppGpp. Al sintetizar (p)ppGpp se disocia del ribosoma seguido de varias rondas de síntesis de (p)ppGpp, el incremento de niveles de (p)ppGpp promueve su interacción con la RNAP en sinergia con DksA; de tal manera que se direccionan los recursos celulares a la represión de genes ribosomales y de síntesis de proteínas, así como a la activación de genes relacionados con biosíntesis de aa; lo cual restaura los niveles de aminoacil-tRNA. Estos aminoacil-tRNA son utilizados en el ribosoma por EF-Tu en la elongación e inhiben la unión de RelA y tRNAs vacíos al ribosoma. (Modificado de Haurlyliuk *et al*, 2015., Dalebroux, 2012).

Por su parte, SpoT a diferencia de RelA, posee un dominio que degrada el (p)ppGpp a GDP o GMP, manteniendo un balance en las concentraciones celulares de (p)ppGpp en la presencia de RelA, razón por la cual probablemente la mutación de *spoT* resulta letal para *E. coli* (Xiao *et al.*, 1991). Además, SpoT es capaz de sintetizar (p)ppGpp con distintos estímulos ambientales, tales como ayuno de fuentes de carbono (Xiao *et al.*, 1991), ácidos grasos (Seyfzadeh *et al.*, 1993) o Hierro (Vinella *et al.*, 2005). Una vez producido el (p)ppGpp, la alarmona en forma de pentafofosfato (pppGpp) puede ser metabolizada a tetrafofosfato por la enzima GppA (Fig. 5) (Haurlyliuk *et al.*, 2016., Kanjee *et al.*, 2012).

De acuerdo con algunas evidencias, el (p)ppGpp fisiológico en *E. coli* es preferentemente tetrafofosfato (ppGpp) más que pentafofosfato (pppGpp) ya que se ha demostrado que el ppGpp es casi 10 veces más eficiente para abatir el crecimiento,

disminuir la síntesis de RNA y regular significativamente mejor sus genes blanco (Mechold, et al. 2013). Esta regulación de los genes blanco de (p)ppGpp no se ha aclarado por completo, pero se sabe que en bacterias Gram negativas puede actuar en sinergia con una proteína llamada DksA la cual puede potenciar sus efectos, interactuando ambos con la RNA polimerasa (RNAP) y probablemente desencadenando un efecto alostérico (Hauryliuk, 2015).

Los detalles de esta interacción con la RNAP apenas se han estudiado y se ha determinado un modelo en el cual la RNAP posee dos sitios de unión que se ocupan en diferentes concentraciones de la alarmona (Ross et al., 2016). El sitio 1 se ubica en la interfaz de la subunidad β' y el factor ω (Mechold et al., 2013., Ross et al., 2013), no requiere de la participación de DksA y podría ser responsable de los efectos de (p)ppGpp cuando se encuentra en bajas concentraciones (Ross et al., 2016). El sitio 2 de (p)ppGpp está en la interfaz la subunidad β' y de DksA; este sitio se requiere en concentraciones altas de (p)ppGpp (suficientes para ocupar ambos sitios), y al parecer el sitio 2 aporta la mayor parte de efectos de la transcripción de (p)ppGpp *in vitro* e *in vivo*.

Estos dos lugares de interacción podrían afectar el complejo RNAP-promotor favoreciendo cambios conformacionales de la RNAP e incluso diversos promotores podrían ser diferencialmente sensibles a la unión de (p)ppGpp en uno u otro sitio (Ross et al., 2016). Además de su interacción con la RNAP, recientemente se ha documentado en algunos firmicutes, que (p)ppGpp puede actuar como un ligando de unión a riboswitches característicos de ciertos RNAm que tienen que ver con la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada, regulando así su eficiencia en la transcripción (Sherlock et al., 2018). En el caso de firmicutes (p)ppGpp no interacciona con la RNAP, es decir la regulación por la alarmona indirectamente disminuye la traducción a través de la síntesis de (p)ppGpp consumiendo la poza de GTP en la bacteria, además de que los firmicutes carecen de un homólogo a DksA y de una secuencia discriminadora (Wolz et al., 2010). La secuencia discriminadora o elemento discriminador (Fig. 7) es una región nucleotídica asociada a determinados promotores regulados por (p)ppGpp de bacterias Gram negativas, se ubica entre el inicio de la transcripción (+1) y la caja -10 del promotor.

La regulación de (p)ppGpp sobre ciertos genes blanco puede ser influenciada por este elemento discriminador favoreciendo una modulación positiva si dicha secuencia es rica en AT, mientras que los promotores con el discriminador rico en GC típicamente son regulados negativamente (Potrykus and Cashel, 2008., Dalebroux, 2010, Dalebroux, 2012).

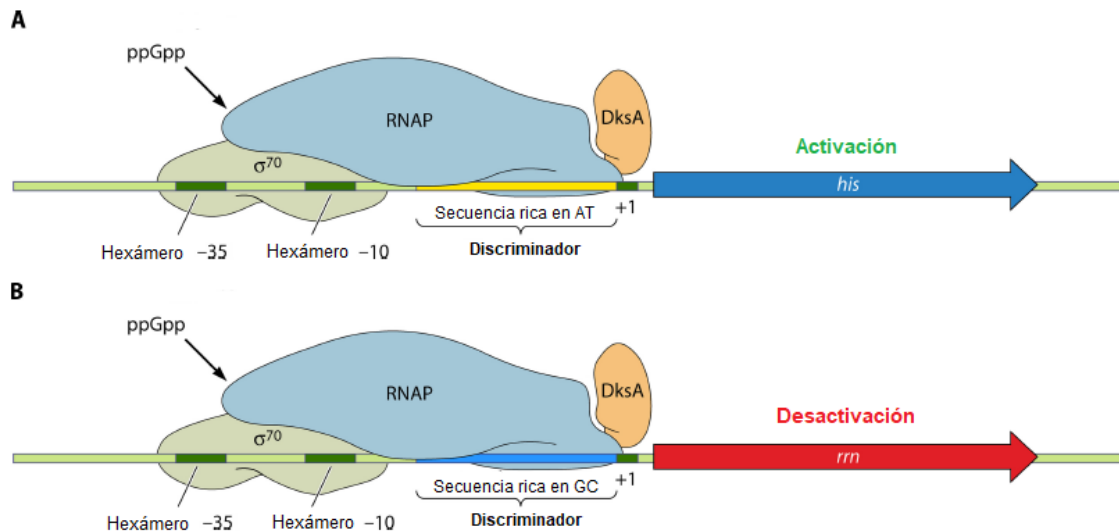


Fig 7. **Región discriminadora.** En respuesta a estrés (p)ppGpp y DksA pueden controlar la actividad de la RNAP favoreciendo o desfavoreciendo el inicio de la transcripción. **A.** Puede activar promotores blanco como el operón de histidina (*his*) en *E.coli*, el cual contiene una secuencia rica en AT entre el hexámero -10 y el inicio de transcripción (+1), conocido como elemento discriminador. **B.** En contraste, los blancos reprimidos tales como el promotor P1 del RNAr (*rrn*), típicamente tienen un discriminador rico en GC (Modificado de Dalebroux, 2010).

Además, ésta alarmona se ha asociado al control de genes de virulencia en diversos microorganismos patógenos como *E. coli* EHEC y UPEC, *Pseudomonas aeruginosa*, *V. cholerae*, *Salmonella* Typhimurium entre otros (Dalebroux, 2010). En el caso de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium se ha determinado que la expresión de la isla de patogenicidad 1 (SPI1) y el plásmido de virulencia (operón *spv*) dependen de (p)ppGpp porque controla la expresión de sus principales activadores *invF*, *hilA* y *spvR*, mostrando una atenuación en la infección con ratones (Pizarro-Cerdá and Tedin et al. 2004).

1. ANTECEDENTES

El gen *leuO* en *S. Typhi* ha mostrado ser quiescente, es decir, que se expresa muy sutilmente en las condiciones que hasta ahora hemos experimentado.

En el laboratorio se ha estudiado la regulación del gen de *leuO* en *Salmonella enterica* serovar Typhi por medio del análisis de su región reguladora a través de diversos recortes de dicha región fusionadas a *lacZ* (Fig. 8). Además, con el estudio de mutantes en reguladores como H-NS y Lrp, y en ensayos de interacción DNA-proteína se ha observado que estas proteínas se unen a la región reguladora de *leuO* actuando como represores (Guadarrama, 2004., Sánchez-Popoca, 2015).

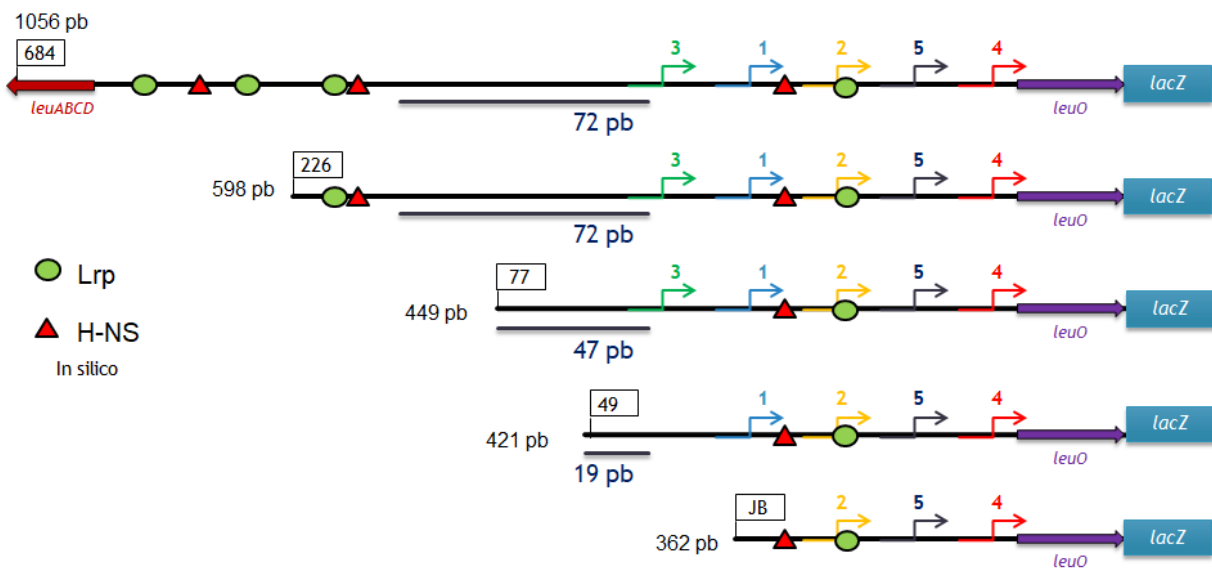


Fig 8. Esquema de las diferentes construcciones traduccionales de la región reguladora de *leuO*. Se observan los posibles sitios de unión de H-NS y Lrp de un footprinting virtual (Münch, 2005) así como la región de nucleación de H-NS de 72 pb (Chen *et al.* 2005). También se ilustran parte de la región estructural de *leuO* y *leuABCD* así como sus promotores.

Otro factor que hemos considerado en la modulación de *leuO* es su autorregulación, la cual previamente se había hipotetizado ser positiva por favorecer la desrepresión de H-NS (Chen *et al.*, 2005) o negativa al sobre expresarse *LeuO* (Stratmann *et al.*, 2012). Con nuestro modelo biológico *S. Typhi*, no se hallaron diferencias al mutar *leuO* o al sobre inducirlo (Guadarrama, 2004), pero al estudiar la mutante de *leuO* en ausencia de sus represores H-NS y Lrp (*hns lrp leuO* vs *hns lrp*) notamos una considerable autorregulación positiva, lo cual significaba que en

las condiciones determinadas, el fenómeno de autorregulación requería el paso de desrepresión por H-NS y Lrp (Sánchez- Popoca., 2015).

También se determinó la existencia de tres promotores en Typhi para *leuO*, de los cuales solo se han documentado dos, en Typhimurium y en *E. coli*. Se ha medido la actividad individual de estos tres promotores en varias condiciones de crecimiento y en distintos fondos genéticos (Téllez, 2014).

Durante una estancia sabática en el laboratorio del Dr. R. L. Gourse, uno de los expertos en la fisiología del (p)ppGpp, el Dr. E. Calva realizó ensayos de transcripción *in vitro* de la región reguladora de *leuO* donde observó dos promotores no reportados (P4 y P5) que se encuentran más próximos a la región codificante y que junto con P2 aumentan su expresión en presencia de ppGpp y DksA. A fin de corroborar estas observaciones, por extensión del iniciador en nuestro laboratorio identificamos *in vivo* la existencia de estos nuevos promotores junto con los tres ya reportados (Fig. 9).

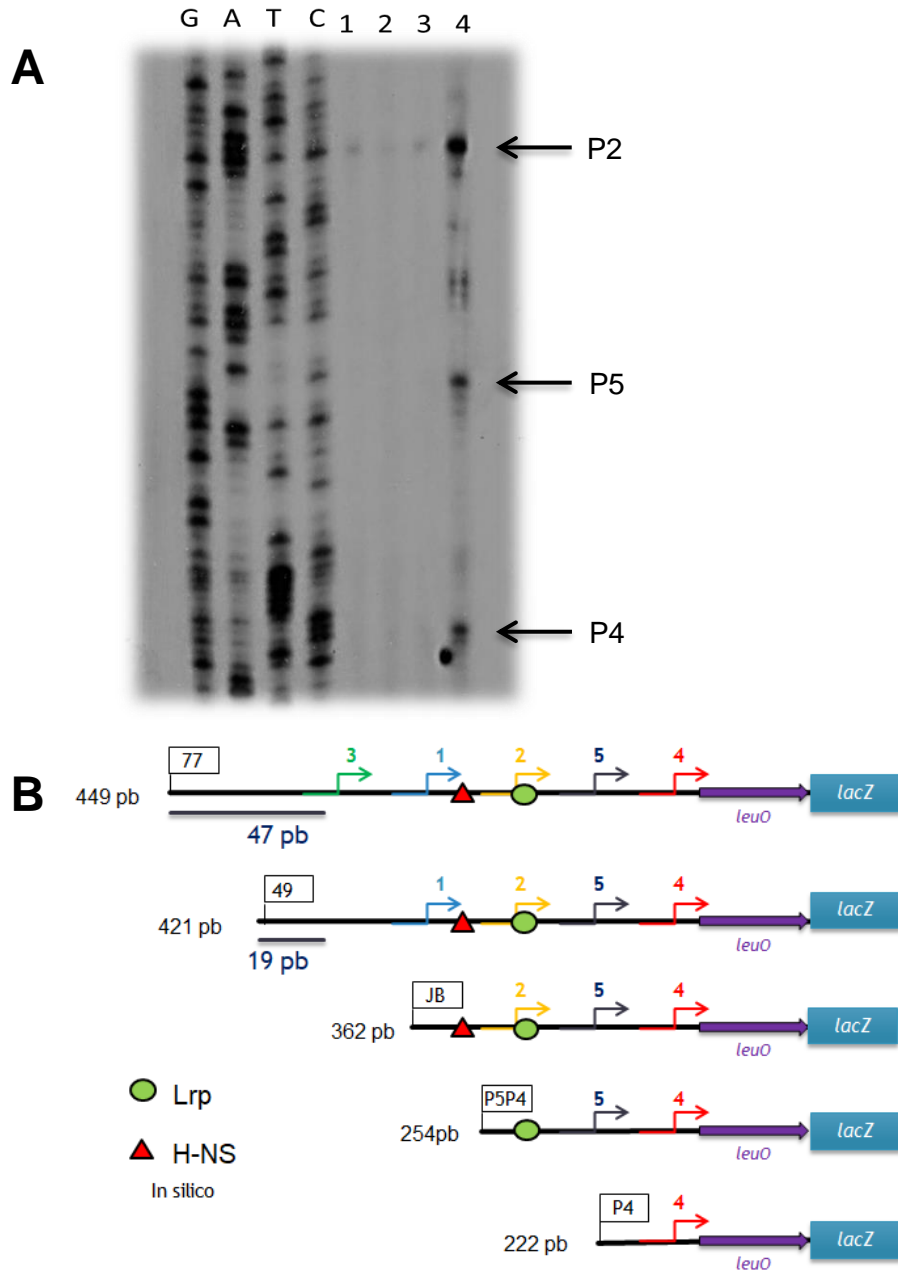


Fig. 9. Promotores de *leuO*. **A.** Extensión de iniciador de la región reguladora completa (*pleuO684*) en un fondo silvestre en medio mínimo (M9) en fase exponencial ($DO_{600}=0.6$). Se muestran los promotores P2, P4 y P5. **B.** Esquema de las fusiones a *lacZ* de la región reguladora de *leuO* que ilustra los promotores que contiene cada construcción (Datos no publicados).

Un dato interesante obtenido en nuestro grupo demostró que cuando se experimenta con la región reguladora completa fusionada a *lacZ* en un fondo silvestre, la expresión de *leuO* permanece igual en medio MN (medio rico) o medio M9 (medio mínimo). Sin embargo, al recortar dicha región se puede observar que

las fusiones más cortas muestran una expresión diferencial entre el medio rico y el medio mínimo (Fig. 10), favoreciendo la expresión de *leuO* en el medio mínimo, lo que nos condujo a creer que un factor presente en condiciones de limitación nutricional debe estar actuando directa o indirectamente en dichas construcciones y favorecer la activación de los promotores de *leuO*. Además, se ha documentado que el (p)ppGpp es mucho más abundante en un medio mínimo con glucosa, que en un medio con todos los aminoácidos (Ryals, et al. 1982). Por esto y por la evidencia obtenida en los ensayos de transcripción *in vitro*, llegamos a hipotetizar que el (p)ppGpp podría ser dicho factor que regule la expresión en uno o algunos promotores de *leuO*.

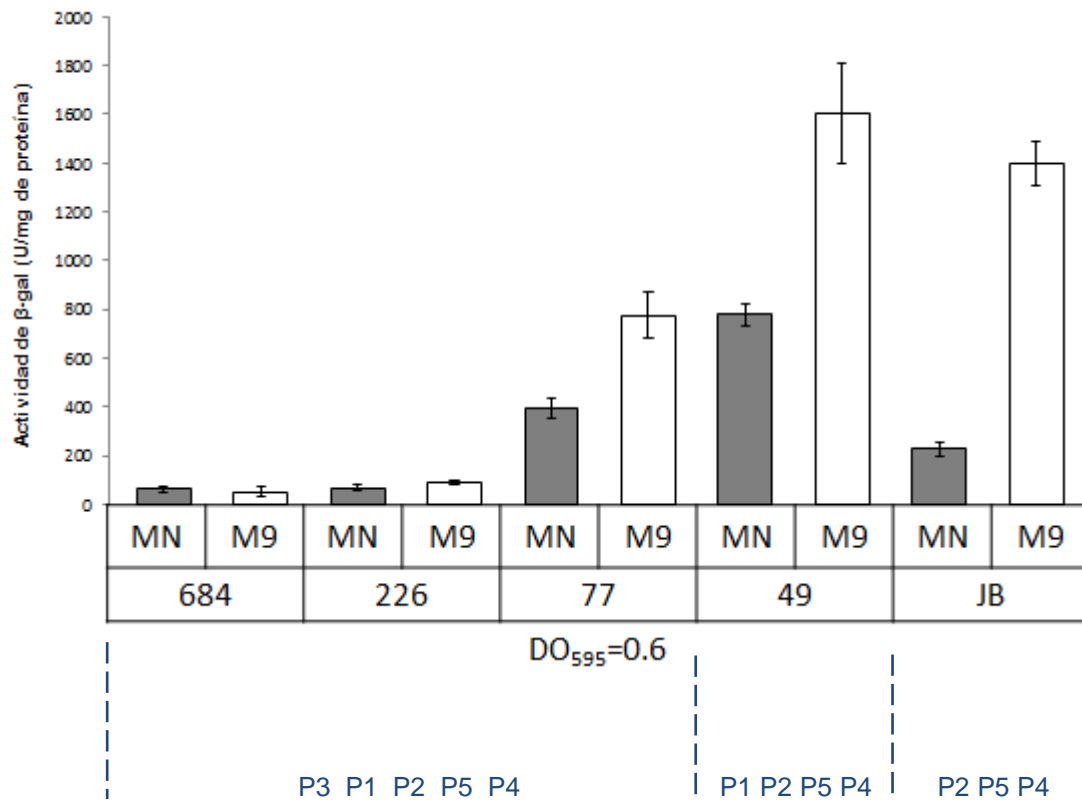


Fig 10. Actividad de las diferentes fusiones de la región reguladora de *leuO* al reportero *lacZ*. Se midieron en condiciones de medio rico (MN) y medio mínimo (M9) en fase exponencial ($DO_{595}=0.6$). Se ilustra en la parte inferior los promotores que contiene cada fusión (Datos no publicados).

3. JUSTIFICACIÓN.

Recientemente *LeuO* ha demostrado ser un regulador importante que se ha asociado a la respuesta a estrés en diversos patógenos. Existen pocos estudios de *LeuO* en *S. Typhi* y el conocimiento de su regulación nos ayudaría a esclarecer su función y la relación con otros regulones de gran relevancia en la supervivencia de *Salmonella*.

4. HIPÓTESIS.

Algunos promotores de *leuO* de *S. enterica* serovar *Typhi* son regulados por el (p)ppGpp.

5. OBJETIVO

Establecer un modelo de regulación con (p)ppGpp sobre la expresión de *leuO*.

Objetivos específicos.

- Medir el efecto de (p)ppGpp sobre la expresión de *leuO*.
- Determinar efecto de (p)ppGpp en cada uno de los promotores de *leuO*.

6. METODOLOGÍA.

Se procedió a la transformación de las cepas de *S. Typhi* con sus plásmidos correspondientes (Tabla 1). Las características de cada cepa y plásmido se describen en la tabla 2.

Cepa <i>S. Typhi</i>	Plásmido
Silvestre <i>ΔrelA</i> <i>ΔrelA ΔspoT</i>	<i>pLeuO684</i>
	<i>pLeuOJB</i>
	<i>pLeuOP5P4</i>
	<i>pLeuOP4</i>
Silvestre <i>Δlrp</i> <i>ΔrelA</i> <i>Δlrp ΔrelA</i> <i>ΔrelA ΔspoT</i>	<i>pRSLeuOP1</i>
	<i>pRSLeuOP2</i>
	<i>pRSLeuOP3</i>
	<i>pRSLeuOP5P4</i>
	<i>pRSLeuOP4</i>

Silvestre $\Delta relA$ $\Delta relA \Delta spoT$	pRS lrp
Silvestre $hns lrp$	pALS13
	pALS14

Tabla 1. Plásmidos correspondientes a cada cepa

Cepas/Plásmidos	Características
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi	
IMSS-1 (Silvestre)	<i>S. enterica</i> serovar Typhi 9.12, d, Vi+
$\Delta relA$	$\Delta relA::Km^r$
$\Delta relA \Delta spoT$	$\Delta relA::Km^r \Delta spoT::Cm^r$
Δlrp	$\Delta lrp::Cm^r$
$\Delta lrp \Delta relA$	$\Delta relA::Km^r \Delta lrp::Cm^r$
IMSS $hns lrp$	$hns^- lrp^-$
Plásmidos	
p $leuO684$	Fragmento de 1062 pb Tc ^r
p $leuOJB$	Fragmento 370 pb Tc ^r
p $leuOP5P4$	Fragmento 252 pb Tc ^r
p $leuOP4$	Fragmento 222 pbTc ^r
pALS13	Fragmento 331 codones de <i>relA E. coli</i> , Ap ^r
pALS14	Fragmento 455 codones de <i>relA E. coli</i> , Ap ^r
pRS $leuOP1$	Fragmento 100 pb con el promotor 1 de <i>leuO</i> , Ap ^r
pRS $leuOP2$	Fragmento 100 pb con el promotor 2 de <i>leuO</i> , Ap ^r
pRS $leuOP3$	Fragmento 100 pb con el promotor 3 de <i>leuO</i> , Ap ^r
pRS $leuOP5P4$	Fragmento 100 pb con los promotores 5 y 4 de <i>leuO</i> , Ap ^r
pRS $leuOP4$	Fragmento 75 pb con el promotor 4 de <i>leuO</i> , Ap ^r

Tabla 2. Características de cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

6.1 Preparación de células electrocompetentes.

Se estriaron las bacterias en agar TSGB (las mutantes ya mencionadas contando la silvestre) e incubaron a 37 °C toda la noche. Posteriormente se tomó una asada y se inocularon en 100 ml de medio SOB y se incubaron a 37°C en agitación hasta alcanzar una DO₆₀₀ = 0.6. Después se concentraron las bacterias

por centrifugación a 6000 rpm por 10 min. La pastilla se lavó tres veces con agua estéril fría. Al final la pastilla se resuspendió en 600 µl de glicerol al 10% y se hicieron alícuotas en tubos eppendorf de 0.6 ml. Posteriormente se guardaron a -70°C hasta su uso.

6.2 Transformación de las cepas.

Las bacterias electrocompetentes se dejaron descongelar en hielo y las celdas de electroporación (BIORAD) se enfriaron en el mismo. Posteriormente se agregó el plásmido (50-200ng) con las fusiones en 50 µl de células electrocompetentes. Enseguida se les dio un pulso de 2.5 KV por 4.6 µs (micropulser BIORAD). Después se recuperaron en 1 ml de medio SOC e incubaron a 37 °C por 1 hora y platearon 100µl de las clonas en agar TSBG con X-gal y sus antibióticos correspondientes, con la finalidad de seleccionar las clonas recombinantes.

6.3 Selección de clonas.

Las clonas se seleccionaron por su resistencia a tetraciclina (para los plásmidos *p/euO*) y ampicilina (para los plásmidos *pALS* y *pFM) y el fenotipo azul. Estas clonas se inocularon en tubos de ensayo con 5 ml de TSBG con sus correspondientes antibióticos e incubaron a 37°C con agitación durante 12-16 horas. Después se extrajo el DNA plasmídico por lisis alcalina y se corrió en un gel de agarosa al 0.8% a 120V con la finalidad de comprobar su adecuada transformación. Posteriormente por PCR se amplificó el inserto de cada vector para corroborar que sean los plásmidos correctos.*

6.4 Condiciones de cultivo.

Las bacterias se incubaron a 37°C con sus respectivos antibióticos. Primero se estriaron en agar TSBG con X-gal e incubaron por 24 horas. Después se inocularon en tubos con 5 ml de MN y se incubaron por 8 horas, posteriormente se pasaron a matraces con 50 ml de MN, se dejaron incubar con agitación. De este preinóculo se tomó ≈1 ml (lo suficiente como para iniciar con una $DO_{595}=0.6$) para inocular otro matraz de 50 ml del cultivo MN. Teniendo este inóculo se procedió de la siguiente manera:

a) Para las fusiones traduccionales en las cepas $\Delta relA$ y $\Delta relA \Delta spoT$.

Para determinar si existe efecto por (p)ppGpp en la expresión de *leuO* se analizaron las construcciones traduccionales p*leuO* 684, JB, P5P4 y P4 de la región reguladora de *leuO* (Fig. 8) en la mutante sencilla $\Delta relA$ y la doble mutante $\Delta relA \Delta spoT$.

Del matraz de 50 ml de cultivo en MN se dejaron crecer en agitación a 37°C y se tomó 1.5 ml de muestra a $DO_{595} = 0.6$. Estas muestras se centrifugaron a 12000 rpm 1 min, la pastilla se lavó con amortiguador Z 1X, se centrifugó nuevamente y la pastilla se guardó a -70°C hasta su uso para el ensayo de β -galactosidasa.

b) Para las fusiones transcripcionales en las cepas WT, Δlrp , $\Delta relA$, $\Delta lrp \Delta relA$ y $\Delta relA \Delta spoT$.

Todas estas cepas se crecieron de la misma manera antes mencionada, y del matraz de 50 ml de cultivo en MN se dejaron crecer en agitación a 37°C y se tomaron 1.5 ml de muestra a $DO_{595} = 0.6$. Estas muestras se centrifugaron a 12000 rpm 1 min, la pastilla se lavó con amortiguador Z 1X, se centrifugó nuevamente y la pastilla se guardó a -70°C hasta su uso para el ensayo de β -galactosidasa.

c) En las cepas WT y *hns lrp* con los plásmidos inducibles pALS.

Como estrategia experimental se observó el efecto de la inducción del gen *relA* y por tanto el de un pulso breve de (p)ppGpp (Shreiber, 1991), ya que se considera que esto refleja la situación de estrés que enfrenta una bacteria silvestre en el ambiente (Calva E., comunicación personal). De esta manera, se evaluó la expresión de *leuO* cromosomal bajo la inducción de la actividad de la enzima RelA' en la cepa silvestre y la doble mutante *hns lrp*. Esto se realizó transformando a *S. Typhi* con un plásmido (pALS13) que contiene al gen *relA* bajo un promotor inducible con IPTG (Fig. 19). Una vez teniendo el inóculo en 100ml de medio LB se dejaron crecer a 37°C en agitación y al llegar a una $DO_{595} = 0.4$ (fase exponencial) se indujo la expresión de *relA* con 200 μ M de IPTG (Shreiber, 1991). Después de 20 min de la inducción, se centrifugaron las bacterias a 8000 rpm 10 min, la pastilla se lavó con amortiguador PBS, se hicieron alícuotas (correspondientes a un volumen de 10 ml del cultivo) se centrifugó nuevamente y

las pastillas se guardaron a -70°C hasta su uso para la extracción de RNA y realización del RT-PCR.

6.5 Actividad de β - galactosidasa.

Las pastillas se resuspendieron en amortiguador Z 1X, de manera que la concentración de proteína total quedara en un rango de 0.15-0.3 mg/ml. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry, y para esto se colocaron por duplicado 20 μl de la muestra y de control (BSA 0.2 mg/ml) en una placa de 96 pozos. Posteriormente se agregaron 100 μl de solución de Lowry (ver anexo de reactivos) y se mezcló e incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Enseguida se adicionó 100 μl de reactivo folin-ciocalteu al 16.9%, se mezcló e incubó a temperatura ambiente por 30 minutos.

Posteriormente se procedió a la cuantificación de proteína con un lector de placas tipo Ceres (Bio-Tek). El protocolo compara la absorbancia de las muestras con una curva estándar de concentraciones de BSA previamente establecida. Una vez ajustada la concentración en el rango antes mencionado, se analizó la actividad de β -galactosidasa.

Para determinar la actividad de β -galactosidasa se utilizó una placa de 96 pozos en la cual se agregaron por duplicado 20 μl de muestra. Después de esto se agregó una solución de lisis (agua destilada, amortiguador Z 1X, lisozima 0.22 mg/ml, tritón 0.22%, β -mercaptoetanol 16.2 mM) y se incubó por 10 min a 37°C .

Para la reacción de la β -galactosidasa se agregó a la placa 100 μl de ONPG (o-nitrofenil β -D-galacto piranósido, 1 mg/ml en agua) el cual vira a color amarillo por la actividad enzimática de la β -galactosidasa. La absorbancia medida se realizó en un lector tipo Ceres a 415 nm, por 5 min. Las lecturas se comparan con una curva estándar de actividad de β -galactosidasa previamente establecida. Para obtener la concentración de enzima, se dividió el valor obtenido de la actividad enzimática y la concentración de proteína de la muestra; expresando el valor en U/mg.

6.6 RT-PCR

Se utilizaron las pastillas guardadas a -70°C (ver condiciones de cultivo para las cepas con el vector pALS) y se procedió purificación del RNA, la cual se realizó

con el método de fenol ácido (Sambrook, 2012). Se resuspendió la pastilla de bacterias en 500 µl de solución A (SDS 0.5%, 20 mM de acetato de sodio pH 4.8 y 10 mM de EDTA pH 8). En seguida se adicionó 500 µl de fenol ácido precalentado (65°C) y posteriormente se incubó 10 min a 60° (agitando cada 50 seg con vortex). Después se centrifugó 2.5 min a temperatura ambiente a 12 krpm. Se recuperó el sobrenadante y se le hicieron 2 lavados, primero con 1 ml de etanol absoluto, se agitó vigorosamente y centrifugó 5 min a 13 krpm y el segundo lavado fue igual pero con etanol al 70%. Se decantó y se volvió a resuspender la pastilla con 400 µl de solución A repitiendo los pasos previos desde que se había agregado esta solución. Se secó la pastilla en Savant 5 min para después resuspender las muestras en 60 µl de agua libre de RNAsa.

Una vez obtenido el RNA total se determinó su concentración en un nanodrop oneC de Thermo scientific. Posteriormente se cargaron 10 µg de RNA en un gel de agarosa al 1.5 % con guanidina (0.1M) para poder visualizar su integridad. Para eliminar completamente el DNA genómico se procesaron 10 µg de RNA con 2U de DNAsa incubando por 1 hora a 37 °C.

Para la síntesis del cDNA se usaron los 10 µg de RNA con un oligo estructural de *leuO*, siguiendo el protocolo establecido en el kit RevertAid H Minus First de Thermo Scientific. Finalmente, para la reacción de PCR se utilizó 1µl de cDNA como molde y los productos fueron analizados en un gel de agarosa 1.5%.

7. RESULTADOS.

Efecto en la expresión de *leuO* de las mutantes $\Delta relA$ y $\Delta spoT$ en las construcciones traduccionales de la región regulaora de *leuO* en *S. Typhi*.

Debido al dato que proporcionó la transcripción *in vitro* (ver Antecedentes), en donde posiblemente (p)ppGpp regularía a P2, P5 y P4, se analizó la expresión de las construcciones traduccionales de *p_{leuO}684*, JB, P5P4 y P4, que abarcan dichos promotores (Fig. 9). Para determinar si hay o no hay efectos en *leuO*, se midieron las construcciones en los fondos $\Delta relA$ y $\Delta relA \Delta spoT$ en el medio MN DO₅₉₅=0.6 (Fig.11).

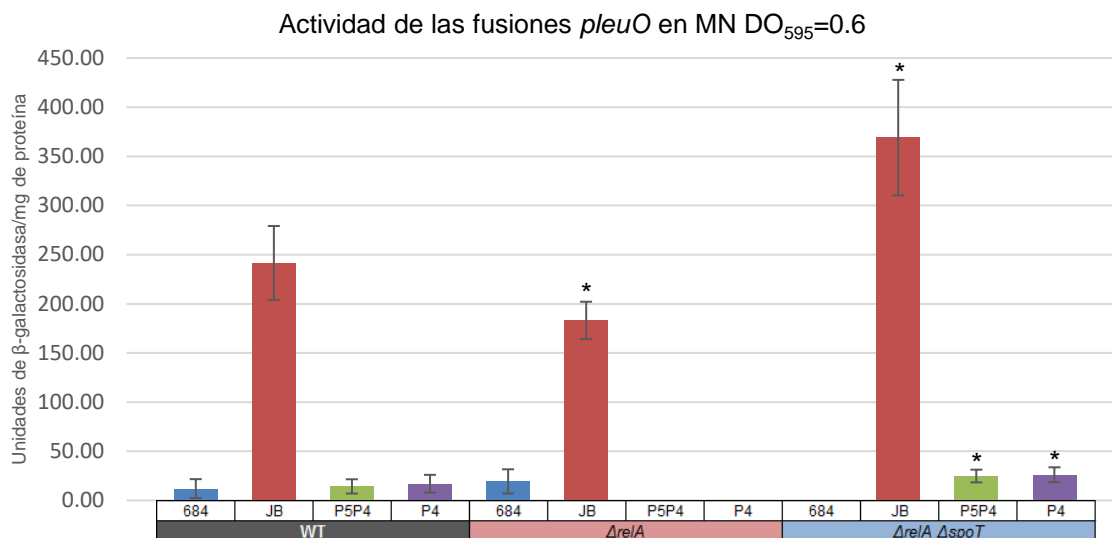


Fig. 11. Actividad de β-galactosidasa de construcciones traducionales: *pleuO*684, *pleuO*JB, *pleuO*P5P4 y *pleuO*P4 a una DO₅₉₅=0.6 en medio rico MN en la cepa silvestre (WT), *ΔrelA* y *ΔrelA ΔspoT*. *Dato significativamente diferente de la misma construcción comparada con un fondo WT.

Apenas hubo expresión en las construcciones *pleuO* 684, P5P4 y P4, mientras que en la *pleuO*JB presentó una actividad mayor que las demás en los tres fondos genéticos. La fusión *pleuO*684, la cual representa la región reguladora completa, tuvo una expresión relativamente baja, posiblemente por ser muy reprimida, y fue igual en la WT y en la *ΔrelA*, pero en el fondo *ΔrelA ΔspoT* no mostró expresión. La construcción *pleuO*JB mostró una expresión mucho mayor, posiblemente porque esa zona de DNA contiene menos elementos de control negativo. Esta construcción *pleuO*JB expresó niveles ligeramente inferiores en el fondo *ΔrelA* y niveles mayores en el fondo *ΔrelA ΔspoT*.

Para el caso de las cepas *pleuO*P5P4 y *pleuO*P4 tuvieron una expresión semejante a la *pleuO*684 en el fondo WT, pero no exhibieron actividad en el fondo *ΔrelA*, y en la *ΔrelA ΔspoT* mostraron una expresión ligeramente mayor a la WT.

Modulación de la expresión de *lrp* en los fondos WT, *ΔrelA* y *ΔrelA ΔspoT*.

Es posible que el efecto de (p)ppGpp pueda ser ocasionado de manera indirecta a través del control de otro factor. Debido a que Lrp es un regulador negativo de *leuO* (Sánchez-Popoca, 2015) y (p)ppGpp también puede estar modulando la expresión de *lrp* (Landgraf *et al.* 1996), se consideró determinar si

esto ocurre en *S. Typhi* para monitorear si en *S. Typhi* el fondo genético $\Delta relA$ y $\Delta relA \Delta spoT$ conllevaba la ausencia total o parcial del represor Lrp. Para esto se realizó una construcción transcripcional de la región reguladora del gen *lrp* fusionada a *lacZ*, y se midió en los fondos silvestre (WT) $\Delta relA$ y $\Delta relA \Delta spoT$ en las mismas condiciones que se han estudiado las fusiones de *leuO*. (Fig. 19).

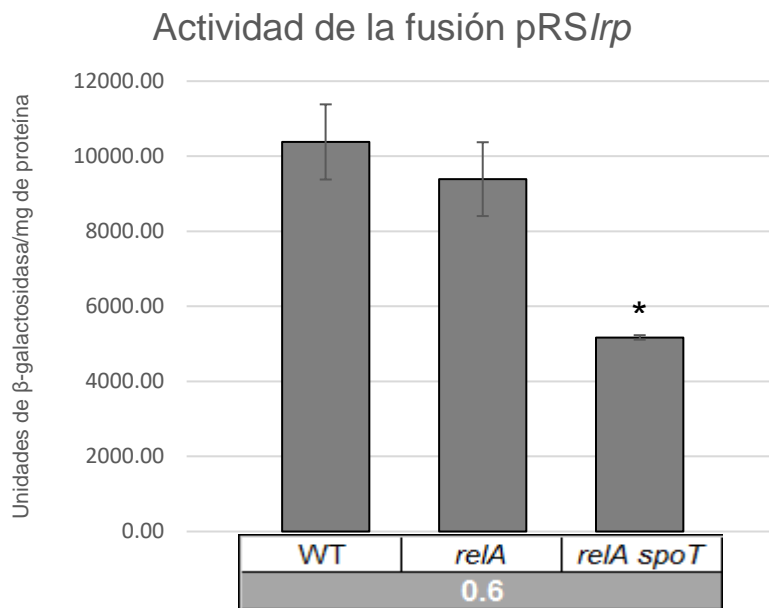


Fig. 12. Actividad de β -galactosidasa de la fusión transcripcional pRS lrp . Se midió a una $DO_{595}=0.6$ en medio rico MN en la cepa silvestre (WT), $\Delta relA$, Δlrp , $\Delta lrp \Delta relA$ y $\Delta relA \Delta spoT$. *Dato significativamente diferente a la WT.

La fusión pRS lrp mostró que en el fondo $\Delta relA$ no parece afectar la expresión de Lrp, pero en la doble mutante $\Delta relA \Delta spoT$ disminuye la expresión de Lrp a la mitad comparada con la silvestre. Esto sugiere que al igual que en *E. coli*, (p)ppGpp regula positivamente la expresión de *lrp* (Landgraf *et al.* 1996) y que con la presencia o ausencia de RelA, los niveles de Lrp no se afectan en la bacteria, porque el (p)ppGpp producido por SpoT es suficiente para mantener la expresión de Lrp. Por lo tanto podría considerarse que en las construcciones estudiadas en el fondo $\Delta relA \Delta spoT$, existe una menor abundancia de Lrp y que esto podría influir en la regulación de nuestras construcciones.

Efecto de (p)ppGpp sobre cada promotor de *leuO* mediante estudios de construcciones transcripcionales en las cepas silvestre (WT), Δlrp , $\Delta relA$, $\Delta lrp \Delta relA$ y $\Delta relA \Delta spoT$.

Con la finalidad de esclarecer el efecto de (p)ppGpp en *leuO*, se procedió a medir cada uno de sus promotores (aproximadamente 100 pb) clonados en el vector

pRS415 para obtener una fusión transcripcional a *lacZ* (Fig. 12), en los fondos genéticos ya mencionados (WT, $\Delta relA$ y $\Delta relA \Delta spoT$) y además los fondos Δlrp y $\Delta lrp \Delta relA$ que nos ayudarían a conocer si el efecto de (p)ppGpp es directo o por vía Lrp (Landgraf et al., 1996).

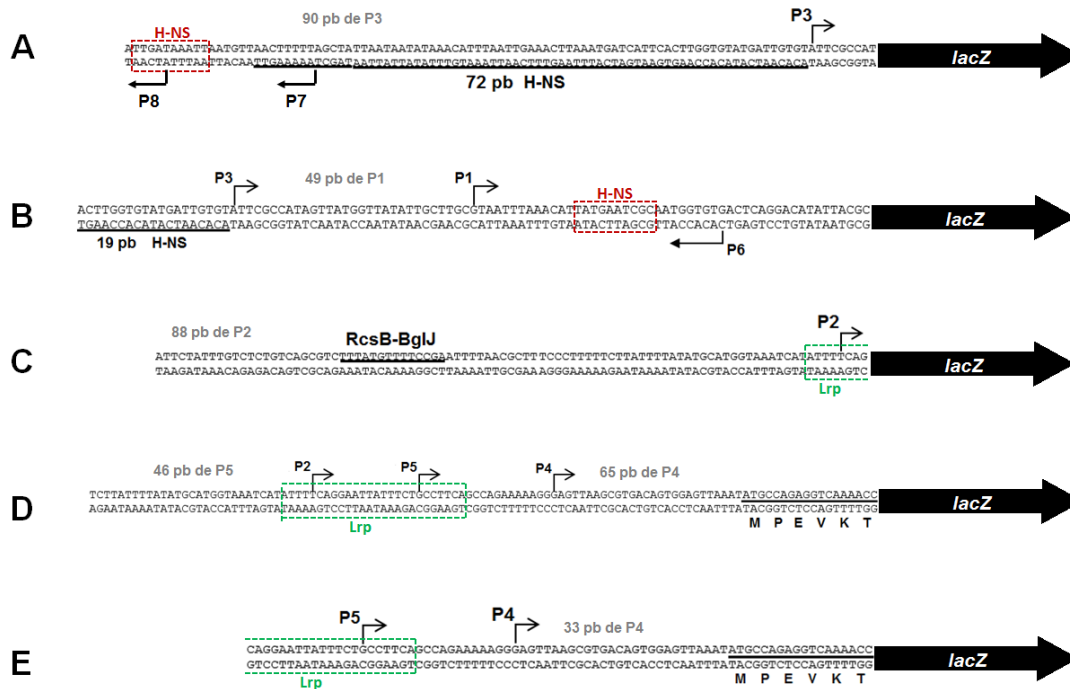


Fig 13. Esquema de las fusiones transcripcionales para cada uno de los promotores de *leuO*. Se ilustran las fusiones a *lacZ* para el estudio de cada promotor en las construcciones transcripcionales. Se representan los inicios de transcripción de cada promotor (flechas), con líneas punteadas los sitios de unión de H-NS y Lrp obtenidos por footprinting virtual (Münch, 2005). En gris se indica la distancia en pares de bases (pb) que se determinó río abajo de cada inicio de transcripción. A: pRS*leuOP3* (promotor 3) el cual contiene un sitio de nucleación de H-NS (Chen et al., 2005). B: pRS*leuOP1* (promotor 1). C: pRS*leuOP2* (promotor 2) el cual posee un consenso de unión para RcsB- BglJ (Stratmann et al., 2012). D: pRS*leuOP5P4* (promotor 4

En la fase exponencial ($DO_{595}=0.6$) del medio MN se observó un patrón semejante en las fusiones pRS*leuO* P3, P5P4 y P4 (Fig. 16, 17, 18), en donde la doble mutante $\Delta relA \Delta spoT$ presenta una actividad notablemente alta respecto a los demás fondos genéticos. Para el caso de las construcciones pRS*leuO* P1 y P2 presentaron una tendencia opuesta, en donde la mutante $\Delta relA \Delta spoT$ exhibió menor expresión (Fig. 14 y 15).

Actividad de la fusión pRS*leuOP1*

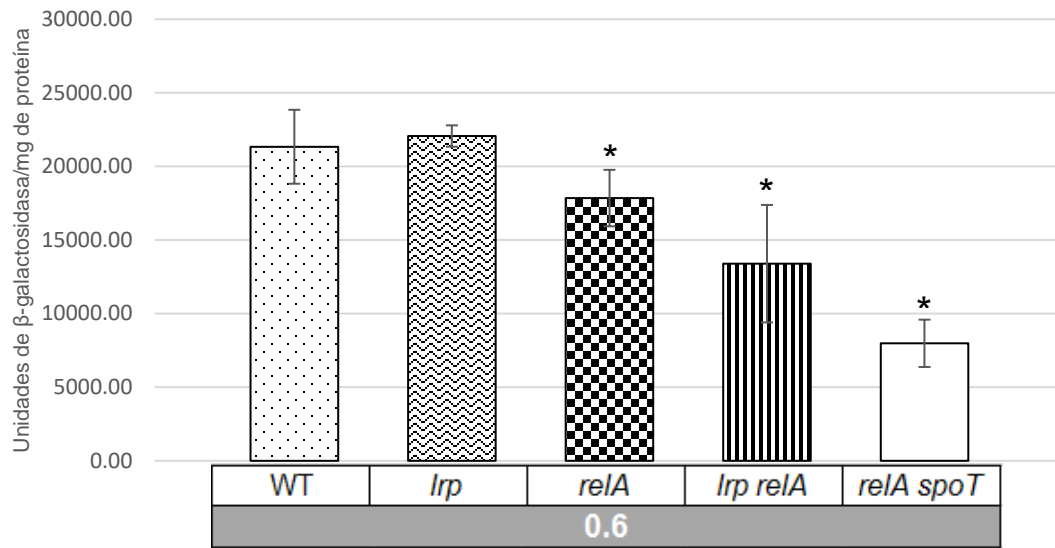


Fig. 14. Actividad de β -galactosidasa pRS*leuOP1* (transcripcional) a una $DO_{595}=0.6$ en medio rico MN en la cepa silvestre (WT), $\Delta relA$, Δlrp , $\Delta lrp \Delta relA$ y $\Delta relA \Delta spoT$. *Dato significativamente diferente a la WT.

Actividad de la fusión pRS*leuOP2*

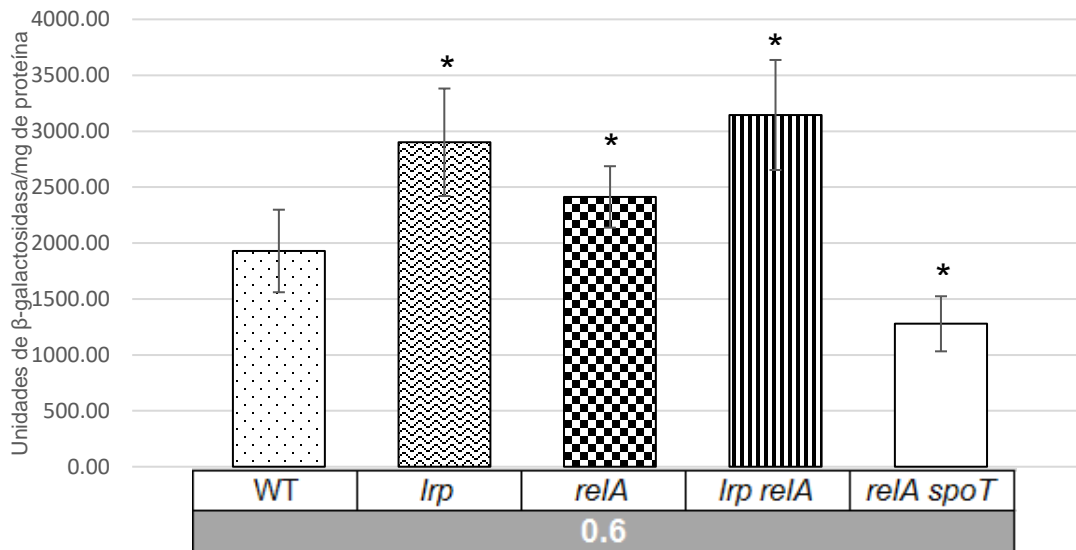


Fig. 15. Actividad de β -galactosidasa pRS*leuOP2* (transcripcional) a una $DO_{595}=0.6$ en medio rico MN en la cepa silvestre (WT), $\Delta relA$, Δlrp , $\Delta lrp \Delta relA$ y $\Delta relA \Delta spoT$. *Dato significativamente diferente a la WT.

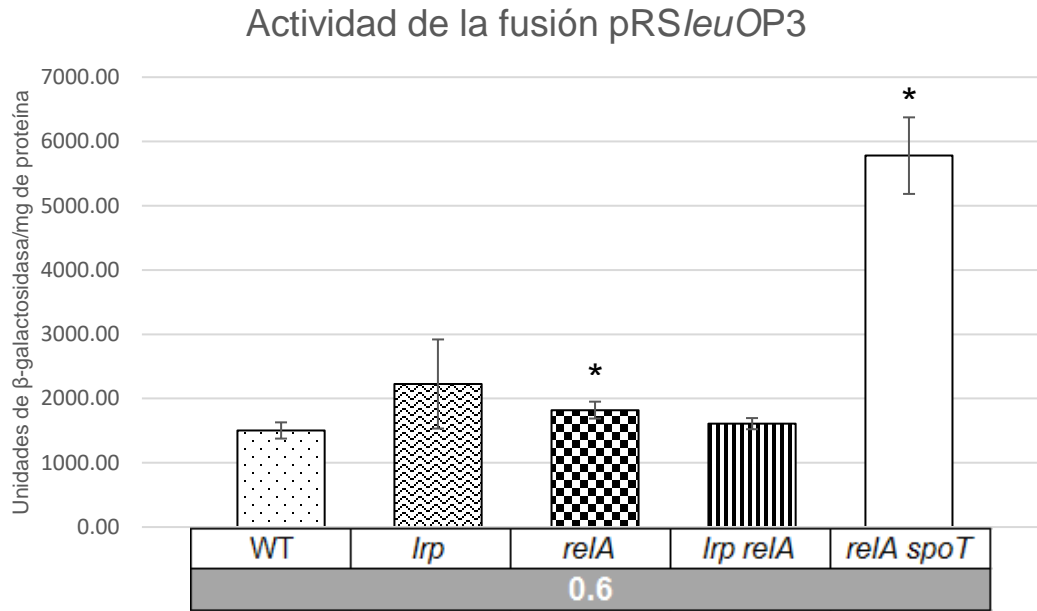


Fig. 16. Actividad de β-galactosidasa pRS*leuOP3* (transcripcional) a una $DO_{595}=0.6$ en medio rico MN en la cepa silvestre (WT), $\Delta relA$, Δlrp , $\Delta lrp \Delta relA$ y $\Delta relA \Delta spoT$. *Dato significativamente diferente a la WT.

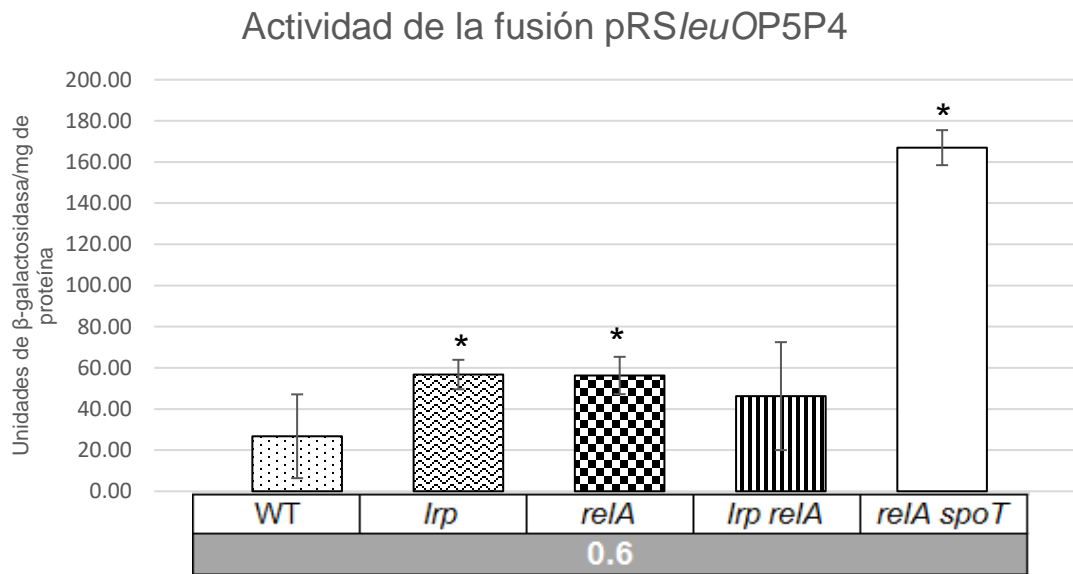


Fig. 17. Actividad de β-galactosidasa pRS*leuOP5P4* (transcripcional) a una $DO_{595}=0.6$ en medio rico MN en la cepa silvestre (WT), $\Delta relA$, Δlrp , $\Delta lrp \Delta relA$ y $\Delta relA \Delta spoT$. *Dato significativamente diferente a la WT.

Actividad de la fusión pRS/leuOP4

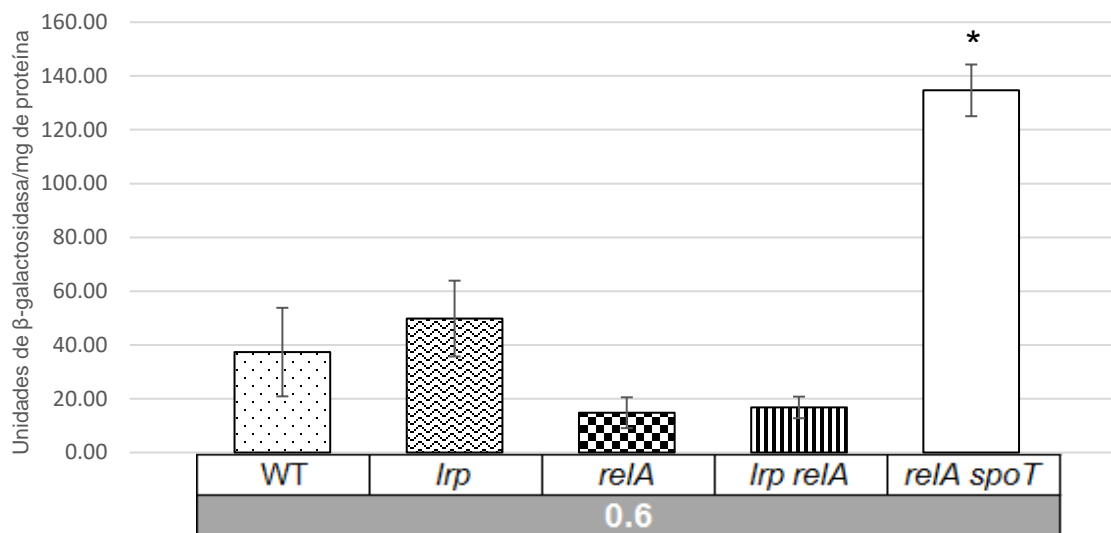


Fig. 18. Actividad de β-galactosidasa pRS/leuOP4 (transcripcional) a una $DO_{595}=0.6$ en medio rico MN en la cepa silvestre (WT), $\Delta relA$, Δlrp , $\Delta lrp \Delta relA$ y $\Delta relA \Delta spoT$. *Dato significativamente diferente a la WT.

Efecto en *leuO* con la sobreexpresión de RelA.

Para la sobre expresión de RelA se utilizó un sistema ya reportado (Schreiber *et al.* 1990) en *E. coli* JM109 en el cual diseñaron plásmidos inducibles que expresan versiones de RelA silvestre y truncadas (Fig.19), de tal modo que se indujera la forma *silvestre* (pALS10 de 744 aa), una forma truncada *activa* (pALS13 de 455 aa) y como control una forma *inactiva* (pALS14 de 331aa). De acuerdo con este estudio, la inducción de la proteína RelA *silvestre* (de 744 aminoácidos o pALS10) es capaz de aportar niveles elevados de (p)ppGpp sin embargo es dependiente de la interacción con el ribosoma para desencadenar su activación. En contraste la enzima truncada funcional (de 455 aminoácidos o pALS13) se comporta como si estuviera activada para catalizar tasas rápidas de síntesis de ppGpp sin el requisito habitual de los ribosomas, RNAm o RNAt descargado. Es por ello que pALS13 puede ser utilizada para estudios de niveles altos de (p)ppGpp ya que carece de posibles artefactos debidos a la alta acumulación de RelA.

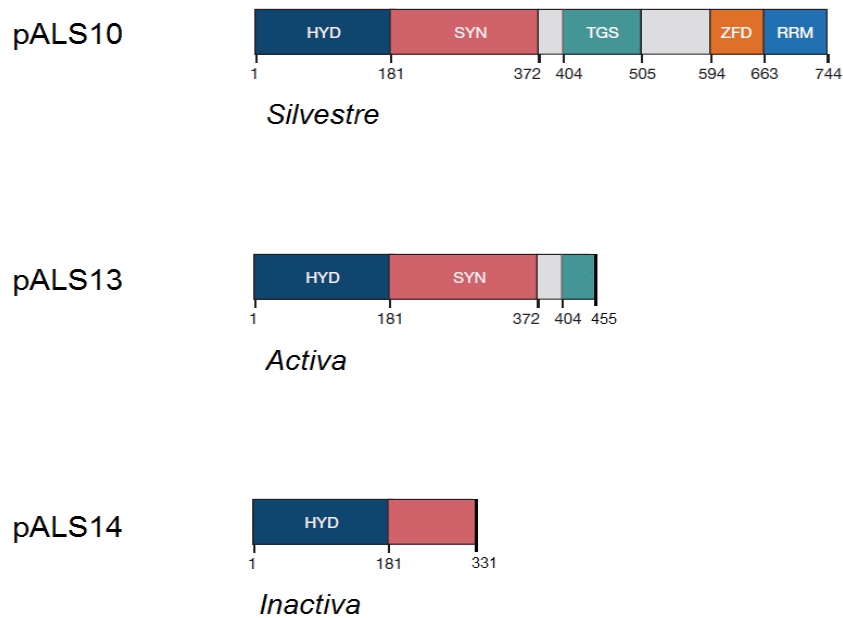


Fig. 19. Esquema de la enzima RelA con sus distintas formas truncadas. Se ilustran los dominios que contienen: HYD (hidrolasa), SYN (sintetasa), TGS (ThrRS, GTPasa, SpoT), ZFD (dedos de Zinc), RRM (Motivo de reconocimiento de RNA). La construcción de pALS10 expresan RelA *silvestre* (de 744 aa), la construcción pALS13 expresan la enzima con 455 aa pero aún *activa*, mientras que la construcción pALS14 expresa una enzima con solo 331 aa la cual es *inactiva*. (Modificado de Brown *et al.*, 2016., Svitil *et al.*, 1993).

Un modo característico de observar el efecto de la sobre-expresión de RelA en *E. coli* es la disminución del crecimiento al aumentar su concentración intracelular de (p)ppGpp al adicionar 200 μM de IPTG a una $\text{DO}_{600} = 0.4$. Por este motivo se procedió a transformar nuestro modelo de estudio *S. Typhi* con estos plásmidos y realizar las cinéticas de crecimiento con IPTG para verificar que este mismo arresto del crecimiento ocurría en *S. Typhi* y poder usar este sistema de inducción de respuesta estricta.

Así se puso a prueba la cepa silvestre y la *hns lrp* con los plásmidos pALS13 y pALS14 (Figs. 20 y 21). Tal como se había documentado con *E. coli*, *S. Typhi* presentó dificultad para dividirse al inducir con IPTG la expresión de la enzima RelA *activa* (pALS13), y como control la cepa que contiene la RelA *activa* sin inducir, creció sin ningún problema al igual que las cepas que contienen la RelA *inactiva* (pALS14), lo cual nos confirmaba que se estaba induciendo adecuadamente la respuesta estricta en la pALS13 y que la pALS14 validaba ser inactiva (Figs. 20 y 21). Incluso esta respuesta estricta podía ser modulada con distinta fuerza al

adicionarse un gradiente de IPTG en un rango de 0 a 200 μM (Fig. 22), lo cual nos hace suponer que se favorecen distintas concentraciones de (p)ppGpp en la célula.

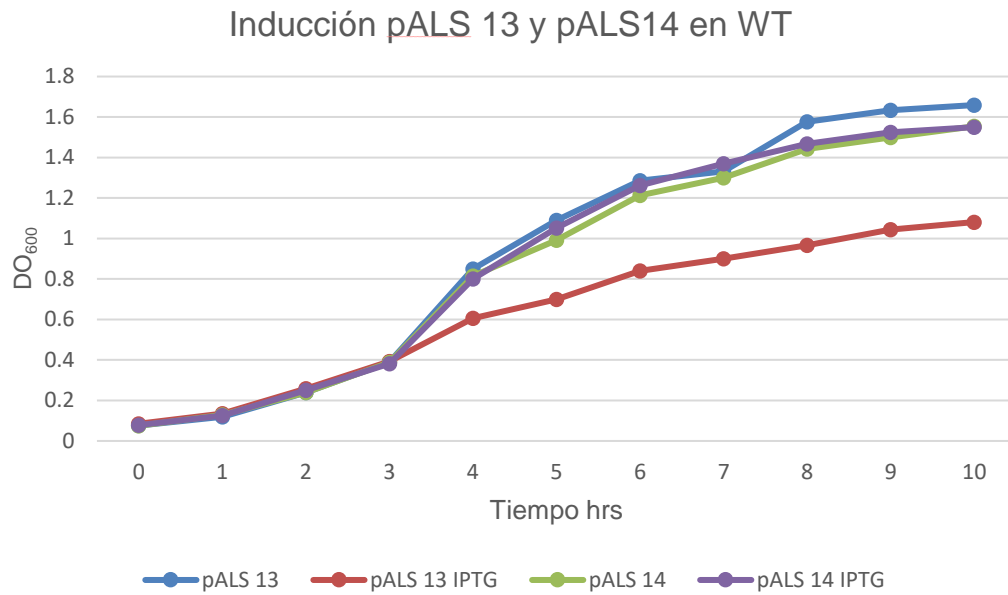


Fig 20. Cinética de crecimiento de *S. Typhi silvestre* con el sistema de inducción de RelA truncada: pALS13 (RelA' activa) y pALS14 (RelA' inactiva). Se adicionó 200 μM de IPTG al llegar a una $\text{DO}_{600} = 0.4$.

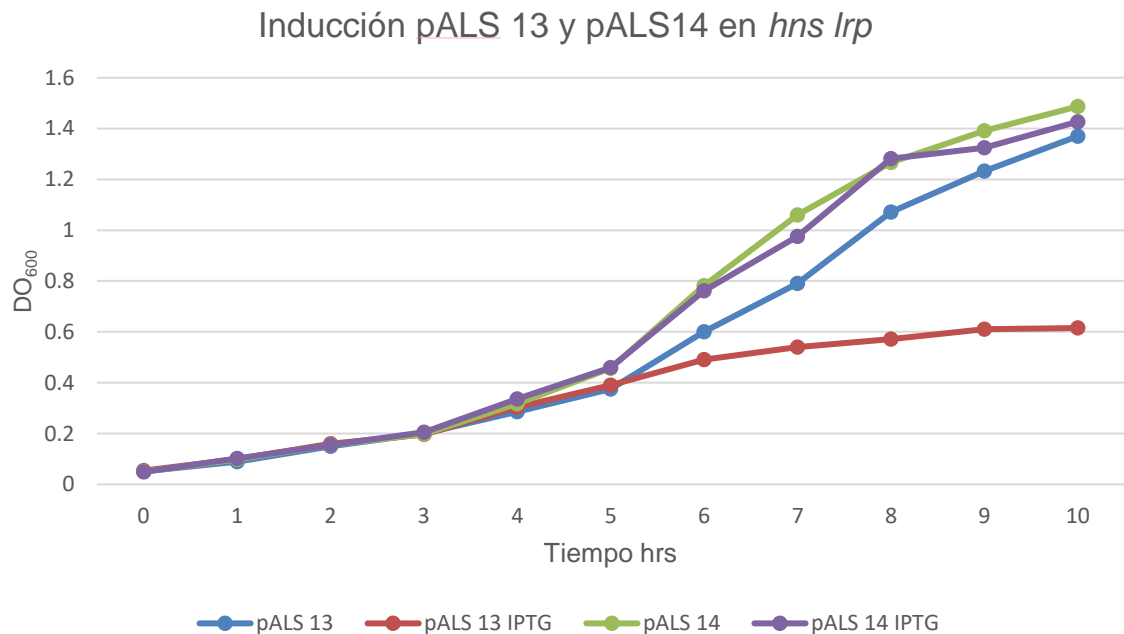


Fig. 21. Cinética de crecimiento de *S. Typhi hns lrp* con el sistema de inducción de RelA truncada. pALS13 (RelA' activa) y pALS14 (RelA' inactiva). Se adicionó 200 μM de IPTG al llegar a una $\text{DO}_{600} = 0.4$.

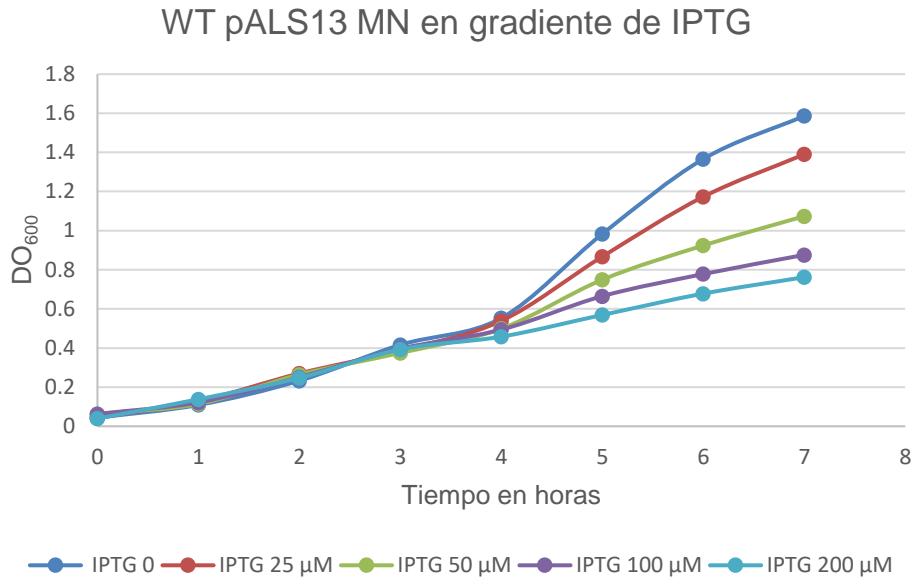


Fig. 22. Cinética de crecimiento de *S. Typhi silvestre* con el sistema de inducción de RelA truncada con gradiente de IPTG. pALS13 (RelA' *activa*) con distintas concentraciones de IPTG (0, 25, 50, 100 y 200 μM). Se adicionó el IPTG al llegar a una $\text{DO}_{600} = 0.4$.

Una vez que observamos que este sistema estaba funcionando correctamente, pudimos analizar la expresión de *leuO* bajo este pulso de (p)ppGpp. Nos interesaba saber si dicho pulso podría promover la desrepresión de *leuO*. Para esto se cultivaron e indujeron con IPTG las cepas WT y *hns lrp* con el vector pALS13, en las condiciones anteriormente mencionadas (Figs. 20 y 21) y se colectaron las bacterias a los 20 minutos después de haber inducido. La razón para esta estrategia es que se ha postulado que cuanto más próxima sea la medición de algún efecto causado por la inducción de (p)ppGpp, menos posibilidades hay de estar midiendo un efecto secundario (mutación o cambio en el metabolismo) que influya en la maquinaria transcripcional, dificultando la interpretación del efecto del estímulo inicial (Gourse et al., 2018). A las bacterias colectadas se les extrajo RNA para poder realizar el RT-PCR que nos permitiera visualizar en un solo paso todos los posibles RNAm de *leuO* cromosomal (Fig. 23A). Al obtener los resultados (Fig. 23B) se observó que en un fondo silvestre no se logró detectar expresión de *leuO* con o sin la inducción de (p)ppGpp. Sin embargo, en el fondo *hns lrp* se logró detectar expresión de *leuO*, aparentemente de igual magnitud con inducción o sin

inducción del (p)ppGpp. Esto nos indica que (p)ppGpp, aún a niveles altos no promueve la desrepresión.

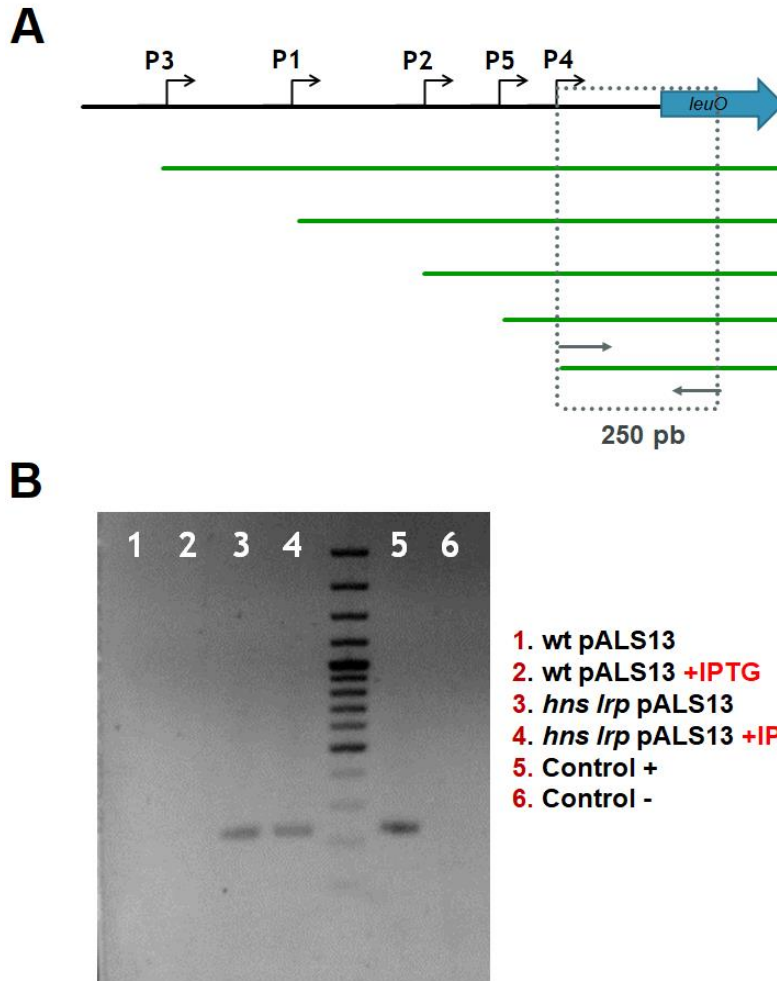


Fig 23. RT-PCR de *leuO*. Resultado de la sobre inducción de RelA' en medio rico MN a 20 min después de inducir con IPTG 200 μ M en $DO_{600} = 0.4$. **A.** Esquema de la región reguladora de *leuO* representando los distintos transcritos posibles (en verde) de acuerdo con su promotor. En línea punteada se representa la zona amplificada de la reacción ≈ 250 pb. **B.** RT-PCR de la cepa silvestre y *hns lrp* con inducción y sin inducción de RelA'.

8. DISCUSIÓN

Efecto de (p)ppGpp por medio del estudio de las mutantes $\Delta relA$ y $\Delta spoT$ en las construcciones traducionales a *lacZ*.

Estas construcciones traducionales presentaron menor actividad que las construcciones transcripcionales lo cual indica que existe mayor regulación negativa, ya sea transcripcional y/o post transcripcional.

La construcción *p_{leuO684}* presentó la misma expresión en el fondo silvestre y en $\Delta relA$, pero en $\Delta relA \Delta spoT$ la expresión fue nula, posiblemente por una menor transcripción de algunos promotores, por algún efecto post transcripcional o por la

activación de unos promotores ubicados en la cadena complementaria (reversos) de la región reguladora de *leuO* que recientemente se estudian en nuestro laboratorio y que sabemos, son mejor expresados en el fondo $\Delta relA \Delta spoT$ (datos no publicados). Interesantemente esta doble mutante con el *pleuO684* tuvo un crecimiento demasiado lento comparado con las demás cepas del mismo fondo genético que poseen las otras construcciones más cortas, las cuales no poseerían estos promotores reversos (datos no mostrados).

La construcción *pleuOJB* presentó una actividad mayor que la *pleuO684* porque posiblemente al ser más corta posee menos región de control negativo. En el fondo $\Delta relA \Delta spoT$ mostró mayor aumento que en los otros fondos, probablemente porque la ausencia de (p)ppGpp favorece la expresión conjunta de estos promotores (P2, P5 y P4), o bien, de manera indirecta en este fondo *relA spoT* habría menos Lrp (Fig. 18) que estuviera reprimiendo a estos promotores (Fig. 11 *relA spoT*), o ambas.

Para el caso de las construcciones traduccionales *pleuOP5P4* y *pleuOP4* se observó una menor expresión comparada con la *pleuOJB*, seguramente porque estas construcciones carecen del promotor 2 el cual es más activo que P4 y P5 (Fig. 14, 16 y 17). Ambas construcciones *pleuOP5P4* y *pleuOP4* mostraron actividad semejante, lo cual excluiría la participación del promotor 5 y podría significar que sólo está activo el promotor 4. Los niveles bajos que aportaron estas construcciones fueron semejantes a la *pleuO684* en el fondo silvestre, y en la $\Delta relA \Delta spoT$ fueron ligeramente mayores, pero en el fondo $\Delta relA$ no mostró expresión alguna. En cambio sus equivalentes, las construcciones *pRS/leuOP5P4* y *pRS/leuOP4* (transcripcionales) si mostraban una actividad en el fondo $\Delta relA$, el cual fue semejante a la silvestre. Estas diferencias entre construcciones traduccionales y transcripcionales podrían deberse a un proceso de regulación post transcripcional desconocido.

En principio esperábamos que estas construcciones traduccionales nos permitieran determinar efectos notables de la expresión, en ausencia de (p)ppGpp. Las fusiones sugieren que en estas condiciones, la ausencia de (p)ppGpp podría tener efectos en la expresión de *leuO*. La *pleuO684* que reflejaría un resultado más

cercano a la realidad por tener la región reguladora completa, nos indicó que (p)ppGpp tendría un efecto ligeramente activador en esas condiciones ($DO_{595} = 0.6$ en MN). Sin embargo, las construcciones p*leuO* JB, P5P4 y P4, mostraron un efecto ligeramente represor por (p)ppGpp. Este contraste entre la región reguladora completa y los recortes de esta, nos hicieron hipotetizar que cada uno de los promotores podría tener una expresión diferencial con (p)ppGpp. Sin embargo, cabe la posibilidad de que la regulación de (p)ppGpp podría ser influenciada por la presencia de reguladores negativos unidos al DNA, y que la regulación traduccional podría nublar los verdaderos efectos que podría estar haciendo (p)ppGpp a nivel transcripcional.

Efecto de (p)ppGpp sobre cada promotor de *leuO* en fusiones transcripcionales a *lacZ*.

Estas construcciones (pRSP1, P2, P3, P5P4 y P4) generalmente dieron expresión mayor que las traduccionales, lo cual indica que *leuO* tiene promotores que le dan un potencial de ser fuertemente activado, sin embargo se encuentra muy reprimido. Al estar diseñadas como construcciones cortas (≈ 100 pb) se esperaría que la transcripción resultante tenga menos influencias de otros reguladores unidos al DNA y que solo sea posible observar efectos por la actividad de la RNAP en presencia o ausencia de (p)ppGpp. Además, al ser fusiones transcripcionales, la expresión obtenida descartaría artefactos ocasionados por la regulación traduccional que pudieran estar presentes en los diferentes fondos genéticos estudiados.

P1 presentó mayor actividad que los demás, en todos los fondos, tanto en el fondo Δ *lrp* como en el silvestre presentaron una actividad semejante (Fig. 13), lo cual significaría que la región estudiada para dicho promotor no presenta una regulación por Lrp. En la mutante Δ *relA* y la doble mutante Δ *lrp* Δ *relA* presentaron una actividad semejante y ligeramente menor que la silvestre, probablemente porque al mutar Δ *relA* se reduce la cantidad de (p)ppGpp, de tal modo que este promotor es menos estimulado para expresarse por dicha alarmona y esta hipótesis es demostrada a través de la doble mutante Δ *relA* Δ *spoT* en donde no habría

(p)ppGpp y por lo tanto la expresión de este promotor se reduce aún más, incluso más de dos veces que la silvestre. Esto nos sugiere que P1 es activado por (p)ppGpp pero no por vía Lrp.

La fusión pRS/leuOP2 presentó ligeros aumentos en la expresión al mutar *relA* o *lrp*, o ambos, tal vez porque la expresión de esa construcción pudiera ser sutilmente influenciada por la unión de Lrp. En cambio, en el fondo $\Delta relA \Delta spoT$ presentó una ligera disminución de la expresión comparada con la silvestre, lo cual indicaría que el promotor 2 es activado por (p)ppGpp.

En las construcciones pRS/leuO P3, P4 y P5P4 se observó un aumento de aproximadamente tres veces en la expresión en la doble mutante $\Delta relA \Delta spoT$ comparada con la silvestre. Esto sugiere que el (p)ppGpp reprime parcialmente a los promotores, contrario a lo que se observó *in vitro* (Calva, datos no publicados) en donde el (p)ppGpp estimulaba la transcripción de los promotores 4 y 5 pero no tenía efecto en el promotor 3. Una posible explicación a estas discrepancias podría ser que la concentración de (p)ppGpp direcciona la regulación, porque se ha especulado que los dos sitios de interacción con la RNAP podrían ser ocupados en distintas concentraciones de (p)ppGpp favoreciendo ligeros cambios conformacionales a los cuales podrían afectar la transcripción (Ross et al., 2016).

En general P3 y P2 presentaron más de mil unidades de β -gal/mg y el P1 una actividad aún mayor. Esto sugiere que dichos promotores pueden poseer UN alta afinidad por la RNAP pero se encuentran muy reprimidos. Por el contrario, la construcción que contiene a P5 y P4 (Fig. 17) y la construcción que contiene a P4 (Fig. 18) tiene niveles considerablemente bajos de expresión, de aproximadamente 20 unidades de β -gal/mg. En la transcripción *in vitro* ya se había observado que P4 y P5 son débiles en comparación con los promotores 1, 2 y 3 (Calva, comunicación personal), probablemente porque la región promotora del P5 y P4 se aleja del consenso de sigma 70 en comparación con P1, P2 y P3. También se observa que la expresión de la construcción que contiene el P4 es semejante a la construcción que contiene a P5 y P4 lo cual sugiere que la actividad observada sería sólo de P4 y en estas condiciones no es activo P5, tal como se explicó en en referencia a los resultados obtenidos con sus equivalentes construcciones traduccionales

(*pleuOP5P4* y *pleuOP4*). Esto se podría esclarecer con un experimento de extensión del iniciador.

A pesar de estos niveles bajos de expresión en ambas construcciones (*pleuOP5P4* y *pleuOP4*), se observó la misma tendencia con P3 en los cuales la doble mutación $\Delta reIA \Delta spoT$ liberó su expresión; mientras que la mutación sencilla en $\Delta reIA$ parece no afectar suficiente la expresión de los promotores porque posiblemente el (p)ppGpp proporcionado por SpoT podría ser suficiente para reprimir a los promotores a niveles semejantes a la silvestre. De manera análoga, estudios previos han demostrado que una cepa $\Delta reIA$ puede comportarse como una WT, pero no igual que una $\Delta reIA \Delta spoT$, destacando así que el nivel basal de (p)ppGpp producido por SpoT determina el mecanismo de invasión, proliferación intracelular y secreción de proteínas efectoras de SPI-1 (Pizarro-Cerdá and Tedin, 2004).

Aunque sabemos que Lrp reprime al gen *leuO*, generalmente la mutante en Δlrp no mostró efectos muy contrastantes a la silvestre en todos los promotores analizados y la doble mutante $\Delta lrp \Delta reIA$ nos mostró que a pesar de la ausencia del represor Lrp, la actividad de RelA no parece ser relevante en la regulación de estos promotores. Reiteradamente esto sugiere que el papel de (p)ppGpp proporcionado por SpoT afecta de tal manera que conserva la expresión a niveles cercanos al silvestre para el caso de P3 y P4, mientras que para el caso de P1 y P2 el (p)ppGpp mantiene parte de su activación.

Estos niveles de (p)ppGpp suministrados por SpoT bien podrían actuar directamente con la RNAP para desestabilizar la transcripción de P3 y P4, y estabiliza la transcripción a partir de P1 y P2 (Fig. 24A). Un escenario indirecto de regulación del (p)ppGpp para P3 y P4 podría ser que reprime un activador o activa la expresión de un represor de los mismos (Fig. 24B). Para el caso de P1 y P2 (p)ppGpp podría modular positivamente la expresión de un activador o reprimir a un represor de estos promotores (Fig. 24C). Si pensamos en un escenario indirecto en el cual (p)ppGpp controla un regulador, éste no podría ser Lrp porque a pesar de que el gen *lrp* se expresa en presencia de (p)ppGpp (Landgraf, 1996), una mutante sencilla en *lrp* no proporciona los niveles de expresión como una $\Delta reIA \Delta spoT$, y

probablemente tampoco sea vía H-NS porque hasta ahora no se ha documentado que la expresión de H-NS dependa de (p)ppGpp. Sin embargo, desconocemos si este comportamiento observado de manera individual en los promotores sea igual o muy distinto cuando se encuentran conviviendo juntos, tal como ocurre en la naturaleza. Para saber esto, futuros estudios de extensión del iniciador en la región reguladora completa, en ausencia de represores ($\Delta hns \Delta lrp$), ayudarían a validar el comportamiento de los promotores en presencia o ausencia de (p)ppGpp.

Asimismo, la mutagénesis de los promotores podría ser una herramienta para saber si la actividad de un promotor determinado pudiera ser influenciada por la actividad de los otros promotores, de manera semejante a la activación de *leuO* por relevo de promotor anteriormente mencionada (Fig. 4). La cantidad de promotores que posee *leuO* nos da una idea de la complejidad que debe tener su regulación, y que tal vez esté involucrada más de una señal para comenzar su transcripción.

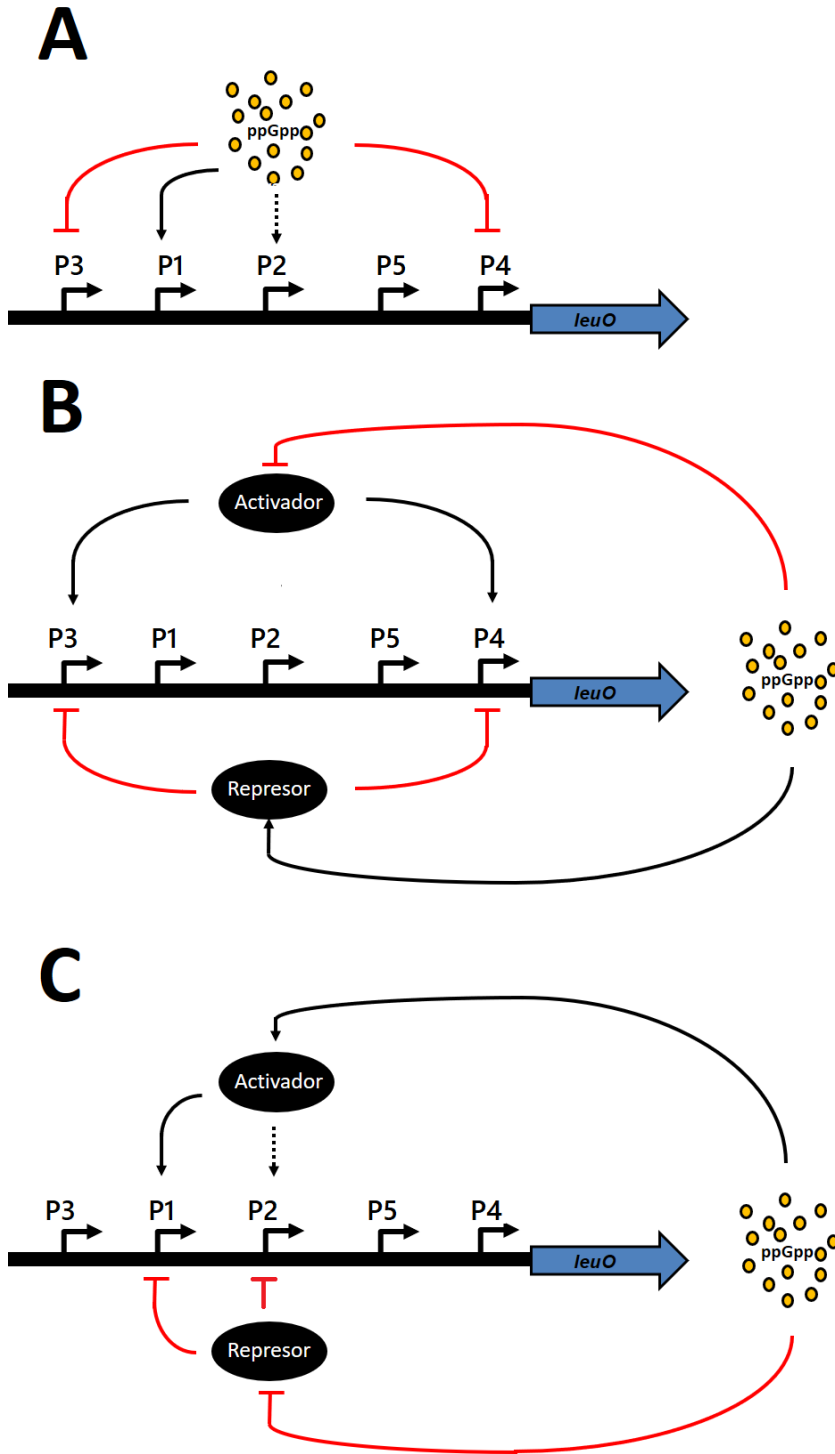


Fig. 24. Modelo de regulación de los promotores a través de (p)ppGpp. A. (p)ppGpp podría tener un efecto directo en la transcripción, donde interacciona con la polimerasa y favorece o desfavorece la expresión en estos promotores. B. De manera indirecta (p)ppGpp podría estar reprimiendo a un activador de los promotores 3 y 4 o podría activar la expresión de un represor de los mismos. C. Para el caso del promotor 1 y 2, (p)ppGpp podría estar modulando positivamente a un regulador positivo de dichos promotores o controlando negativamente la expresión de un represor de estos.

Efecto por inducción de RelA.

Esta estrategia nos permitió simular un pulso de (p)ppGpp semejante al ocasionado en respuesta estricta (Schreiber *et al.* 1990), y en ese momento lograr detectar el RNAm cromosomal de *leuO*. La carencia de RNAm en el fondo silvestre nos hace suponer que sin importar la presencia o ausencia de (p)ppGpp, en *leuO* gobierna una fuerte represión, en gran parte mediada por H-NS y Lrp. En contraste, la cepa *hns lrp* nos permitió detectar la presencia del RNAm de *leuO*, aunque es difícil discernir la modulación de *leuO* por la inducción de (p)ppGpp (Fig. 23 B) ya que esta técnica no es cuantitativa, pero en un futuro un análisis cuantitativo (qRT-PCR) podría esclarecernos si hay diferencia en la expresión de *leuO* entre estas cepas inducidas con (p)ppGpp.

Estos datos sugieren que en el cromosoma al igual que en las fusiones al reportero *lacZ* H-NS y Lrp reprimen fuertemente a *leuO* y que muy probablemente para conseguir su activación, es necesario un primer paso de desrepresión en donde un factor sea capaz de reacomodar o desplazar los represores de tal manera que la RNAP tenga acceso a la transcripción y potencialmente su actividad sea modulada con (p)ppGpp (Fig. 25). Un dato que puede sustentar este modelo es la autoregulación de *leuO*, que hemos estudiado en nuestro grupo (ver antecedentes), en donde es llevada a cabo de manera positiva, solo cuando están ausentes sus represores H-NS y Lrp, es decir cuando hubiese este paso de desrepresión. Este análisis de inducción de RelA podría fortalecerse posteriormente adicionando controles que sean regulados por (p)ppGpp o midiendo directamente la concentración de esta alarmona. Incluso, otra manera de ver que *leuO* se haya expresado y sea funcional, es a través de monitorear los niveles de expresión de los genes que regula, tales como *assT*, el sistema CRISPR- Cas, *ompS1* y *ompS2* (Hernández-Lucas et al., 2018).

Otro factor que pudiera acompañar este mecanismo de regulación es la proteína DksA la cual se ha documentado que es capaz de actuar en sinergia con (p)ppGpp potenciando sus efectos a través de la interacción con la RNAP, conformando así un sitio alternativo de unión para (p)ppGpp (el sitio 2) con posibles efectos en el complejo RNAP-promotor, favoreciendo cambios conformacionales de

la RNAP (Ross et al., 2016). Sin embargo, DksA y (p)ppGpp, incluso pueden regular genes de manera diferencial (Aberg et al., 2009). Futuros estudios en mutantes en DksA, así como mutantes en los sitios de unión de (p)ppGpp a la RNAP ayudarían a detallar el mecanismo de regulación para cada promotor de *leuO*.

Se ha propuesto que ppGpp y DksA se unen a todos los complejos promotores del mismo modo, pero las secuencias de ADN del promotor determinan los pasos sensibles a ppGpp / DksA desempeñan un papel para el resultado de la transcripción (Gourse et al., 2018). Se han realizado diversos análisis para asociar la regulación de (p)ppGpp con la secuencia de sus promotores blanco, determinándose una secuencia o elemento discriminador (Fig. 7). Análisis de todo el genoma de los promotores de *E. coli* que respondieron a (p)ppGpp sugieren que no hay una sola secuencia consenso, ya sea positiva o negativa, que correlacione con la regulación ppGpp/DksA (Gourse et al., 2018). En el caso de *leuO* hemos intentado comparar las secuencias promotoras, con las secuencias propuestas que se asocian a la regulación positiva o negativa de (p)ppGpp en *E. coli* (Sánchez-Vázquez, 2019) pero los consensos de la región discriminadora son poco consistentes con las secuencias promotoras de *leuO* (Fig. 25).

Estos consensos analizados (Fig. 25 A y B) provienen de un estudio transcriptómico en *E. coli* que descubrió 1200 genes que respondieron a (p)ppGpp después de 10 min de haber sobre-expresado ppGpp, y dentro de estos genes se detectó que *leuO* aumentó 2.5 veces su expresión (Sánchez-Vázquez, 2019). En contraste, previos análisis transcriptómicos en *S. Typhimurium*, silvestre y $\Delta relA \Delta spoT$ en fase estacionaria temprana (Ramachandran et al., 2012) y fase estacionaria tardía (Ramachandran et al., 2014) no identificaron cambios significativos en la expresión de *leuO*. Sin embargo, se ha discutido los inconvenientes de analizar la expresión en cepas (p)ppGpp⁰ ($\Delta relA \Delta spoT$), porque no es posible distinguir entre los efectos que resultan de la pérdida de (p)ppGpp que se une a la RNAP, contra los efectos de la pérdida de (p)ppGpp que se une a otras proteínas. Así mismo las cepas (p)ppGpp⁰ pueden acumular mutaciones compensatorias en genes que codifican para las subunidades de la RNAP (Murphy and Cashel, 2003), cambiando el metabolismo celular y complicando la interpretación de los resultados.

Además de esto, en aquellos protocolos donde se somete la cepa a ayuno de nutrientes para favorecer su respuesta estricta, es difícil determinar si los patrones de transcripción resultantes del cambio en el metabolismo fueron dependientes o independientes de la inducción de (p)ppGpp. Incluso en algunos estudios, el tiempo prolongado entre el estímulo inductor y la respuesta transcripcional, dejan una gran probabilidad de que los efectos secundarios oscurezcan los efectos resultantes del estímulo inicial (Sánchez- Vázquez, 2019., Gourse et al., 2018).

En este trabajo, las condiciones de crecimiento analizadas en las cepas con fusiones de *leuO-lacZ* fueron realizadas en “estado estable”, es decir, sin condiciones de estrés, o sin cambios nutricionales en donde teóricamente no habría niveles altos o inducidos de (p)ppGpp (Sánchez-Vázquez, 2019). En el estado estable los niveles de (p)ppGpp son inversamente correlacionados con la velocidad de crecimiento en el cultivo, siendo más bajos en medio rico y más altos en medio mínimo (Ryals et al., 1982). En el estado estable de *S. Typhi*, la presencia o ausencia del (p)ppGpp basal (WT vs $\Delta relA \Delta spoT$) provocó efectos en la mayoría de promotores de *leuO*. Sin embargo el RT-PCR no nos aportó información clara de

que al inducir niveles mayores de (p)ppGpp haya cambios en la expresión de *leuO*, aunque este último análisis puede afinarse cuantitativamente, aún podemos cuestionarnos si la expresión de *leuO* en *S. Typhi* es dependiente de un pulso de (p)ppGpp como en *E. coli*, o pertenece al tipo de genes que son regulados por el *estado estable* de la bacteria (Sánchez- Vázquez, 2019).

Aunque hemos intentado comprender mejor el mecanismo de regulación de *leuO* en *S. Typhi*, la señal que desencadena su expresión aún es desconocida. Algunas evidencias en otras bacterias como *S. Typhimurium* y *V. cholerae* han demostrado que la expresión de *leuO* se requiere *in vivo* para favorecer el desarrollo de la enfermedad en ratones (Rodríguez et al., 2006., Lawley, et al., 2006), indicando que es probable que las señales de desrepresión de *leuO* pudieran hallarse en condiciones del intestino (Bina et al., 2013) o del mismo sistema inmune del hospedero (Tenor et al., 2004). Por otra parte, el conjunto ecléctico de genes que regula LeuO en *S. Typhi* (Hernández-Lucas et al., 2018) podría darnos pistas de las condiciones en las cuales estos genes requieren a LeuO y así experimentar si ocurren estos pasos de desrepresión.

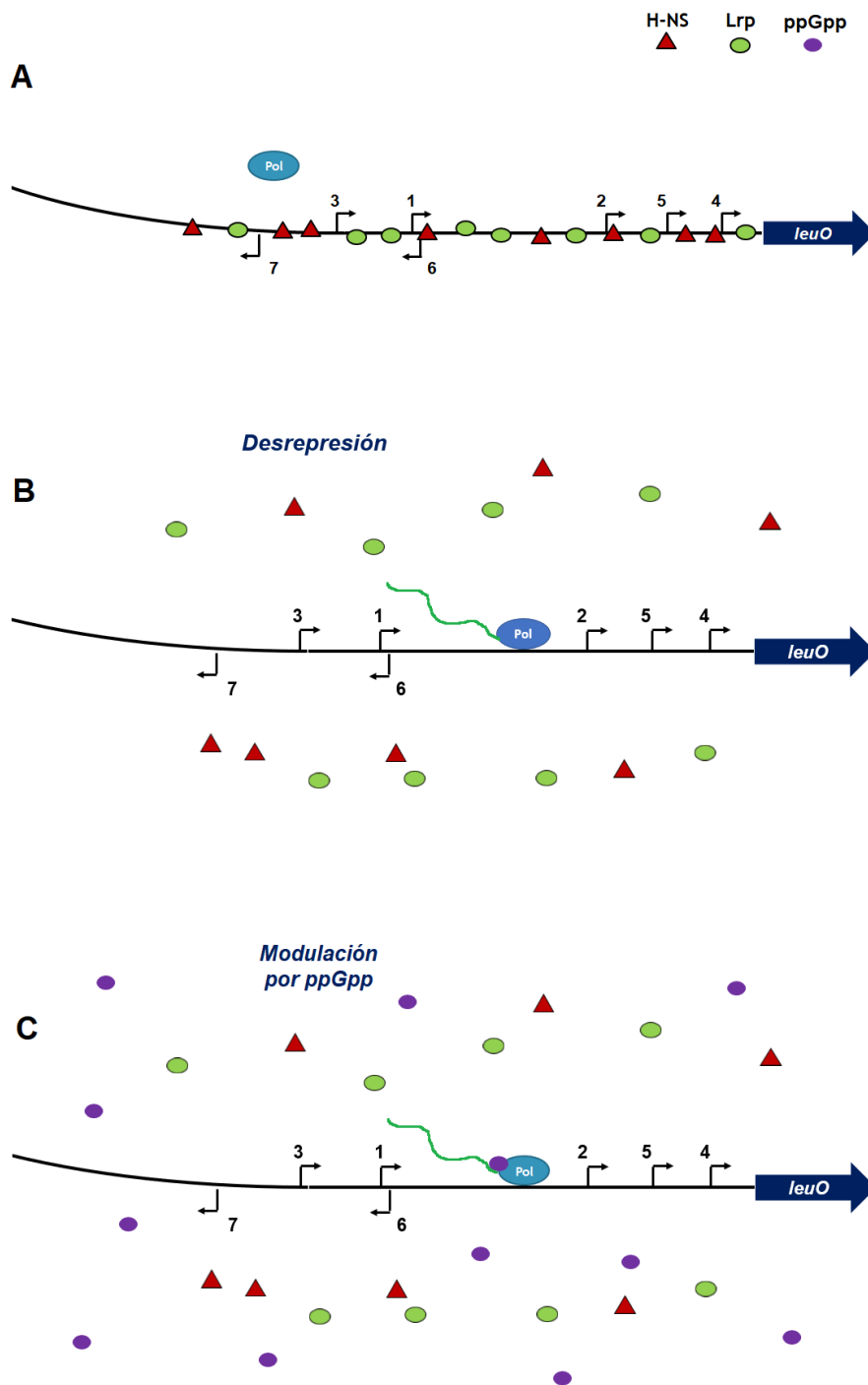


Fig. 26. Esquema de regulación de *leuO* por H-NS, Lrp y ppGpp. **A.** En condiciones estándar de laboratorio *leuO* se encuentra reprimido por H-NS y Lrp. **B.** Bajo condiciones desconocidas podría existir un paso de desrepresión en donde H-NS y Lrp sean despojados de su actividad represora y así pueda haber transcripción. **C.** Cuando se lleva a cabo la desrepresión y hay niveles elevados de (p)ppGpp, esta alarmona podría modular la transcripción diferencialmente para cada promotor, ya sea de manera directa o indirecta como lo explica la figura 24.

9. CONCLUSIONES.

- El gen *leuO* cromosomal es reprimido por H-NS y Lrp.
- El efecto de ppGpp requiere un paso previo de desrepresión.
- La fuerza de expresión de los promotores es: P1 > P3 > P2 >> P4 > P5.
- En estas condiciones (p)ppGpp regula negativamente a los promotores 3 y 4, regula positivamente al promotor 1 y 2 mientras que el promotor 5 no presenta efecto por esta alarmona.

PERSPECTIVAS.

- Medir la actividad de las construcciones traduccionales *pleuO684* y *pleuOJB* en el fondo $\Delta hns \Delta lrp$ sobre expresando RelA.
- Validar por extensión del iniciador las contribuciones de cada promotor en la estrategia anterior.
- Determinar los niveles de (p)ppGpp en *S. Typhi* en los fondos silvestre, $\Delta relA$, $\Delta relA \Delta spoT$, en el fondo silvestre en presencia de RelA sobre expresada, así como en los fondos Δhns , Δlrp y $\Delta hns \Delta lrp$.
- Definir si el efecto de (p)ppGpp requiere o no de reguladores de unión al DNA (promotor mínimo).
- Dilucidar el papel de DksA y ω en el mecanismo de regulación de (p)ppGpp.
- Estudiar la interacción funcional de los promotores a través de su mutagénesis.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aberg, A., Fernandez-Vázquez, J., Cabrer-Panes, J. D., Sánchez, A. and Balsalobre, C. (2009). *Similar and Divergent Effects of ppGpp and DksA Deficiencies on Transcription in Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 191(10): 3226- 3236.
- Ante, V. M., Bina, X. R., Howard, M. F., Sayeed, S., Taylor, D. L. and Bina, J. E. (2015a). *Vibrio cholerae leuO Transcription Is Positively Regulated by ToxR and Contributes to Bile Resistance*. *Journal of Bacteriology*. 197: 3499-3510.
- Ante, V. M., Bina, X. R. and Bina, J. E. (2015b). *The LysR-type regulator LeuO regulates the acid tolerance response in Vibrio cholerae*. *Microbiology*. 161: 2434-2443.
- Bina, X. R., Taylor, D. L., Vikram, A., Ante, V. M. and Bina, J. E. (2013). *Vibrio cholerae ToxR Downregulates Virulence Factor Production in Response to Cyclo(Phe-Pro)*. *MBio*. 4:1-9.
- Bowe, F., Lipps, C. J., Tsohis, R. M., Groisman, E., Heffron, F. and Kusters J. G. (1998). *At least Four Percent of the Salmonella typhimurium Genome is Required for Fatal Infection of Mice*. *Infection and Immunity*. 66: 3372-3377.
- Breddermann, H. and Schnetz, K. (2017). *Activation of leuO by LrhA in Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 104(4):664-676.
- Calva, E., Puente, J. L. and Calva J. J. (1988). *Research Opportunities in Typhoid Fever: Epidemiology and Molecular Biology*. *BioEssays*. 9: 173-177.
- Calvo, J. M., Freundlich, M. and Umbarger, H. E. (1969). *Regulation of Branched-Chain Amino Acid Biosynthesis in Salmonella typhimurium: Isolation of Regulatory Mutants*. *Journal of Bacteriology*. 97(3): 1272- 1282.
- Cashel, M. and Gallant, J. (1969). *Two Compounds implicated in the Function of the RC Gene of Escherichia coli*. *Nature* 221: 838-841.
- Chen, C. C., Chou, M. Y., Huang, C. H., Mjumder, A. and Wu, H. Y. (2005). *A Cis-spreading Nucleoprotein Filament Is Responsible for the Gene Silencing Activity Found in the Promoter Relay Mechanism*. *The Journal of Biological Chemistry*. 280: 5101-5112.

- Chen, C.C., Fang, M., Majunder, A. and Wu, H. Y. (2001). *A 72 Pair AT-rich DNA Sequence Element Functions as a Bacterial Gene Silencer*. The Journal of Biological Chemistry. 276: 9478-9485.
- Chen, C.C., Ghole, M., Majunder, A., Wang, Z., Chandana, S. and Wu, H. Y. (2003). *LeuO-mediated Transcriptional Derepression*. The Journal of Biological Chemistry. 278: 38094-38103.
- Crump, J. A. and Mintz, E. D. (2010). *Global trends in typhoid and paratyphoid fever*. Clinical Infectious Diseases. 50(2): 241-246.
- Curran, T. D., Abacha, F., Hibberd, S. P., Rolfe, M. D., Lacey, M. M. and Green, J. (2017). *Identification of new members of the Escherichia coli K-12 MG1655 SlyA regulon*. Microbiology. 163: 400- 409.
- Dalebroux, Z. D. and Michele, S. S. (2012). *ppGpp magic beyond RNA polymerase*. Nature Rev Microbiology. 10: 203- 2012.
- Dalebroux, Z. D., Svensson, S. L., Gaynor, E. C. and Swanson, M. S. (2010). *ppGpp Conjures Bacterial Virulence*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 74: 171-199.
- De la Cruz, M. A., Fernández- Mora, M., Guadarrama, C., Flores-Valdez, M. A., Bustamante, V. H., Vazquez, A. and Calva, E. (2007). *LeuO antagonizes H-NS and Stpa- dependent repression in Salmonella enterica ompS1*. Molecular Microbiology. 66 (3): 727- 743.
- Demerec, M. Adelberg, E. A. Clark, A. J. and Hartman, P. E. (1965). *A PROPOSAL FOR A UNIFORM NOMENCLATURE IN BACTERIAL GENETICS*. Genetics. 54: 61- 76.
- Dillon, C. S., Espinosa, E., Okamp, K., Ussery, W. D., Casadesús, J. and Dorman, C. J. (2012). *LeuO is a global regulator of gene expression in Salmonella enterica serovar Typhimurium*. Molecular Microbiology. 85(6): 1072- 1089.
- Fabrega, A. and Vila, J. (2013). *Salmonella enterica Serovar Typhimurium Skill To Succeed in the Host: Virulence and Regulation*. Clinical Microbiology Reviews. 26: 308-341.

- Fang, M. and Wu, H. Y. (1998a). *A Promoter Relay Mechanism for Sequential Gene Activation*. *Journal of Bacteriology*. 180: 626-633.
- Fang, M. and Wu, H. Y. (1998b). *Suppression of leu-500 Mutation in topa⁺ Salmonella Typhimurium Strains*. *The Journal of Biological Chemistry*. 273: 29929-29934.
- Fernandez-Mora, Marcos., Puente, J. L. and Calva, E. (2004). *OmpR and LeuO Positively Regulate the Salmonella enterica Serovar Typhi ompS2 Porin Gene*. *Journal of Bacteriology*. 186: 2909- 2920.
- Figueroa-Ochoa, I. M. and Verdugo Rodriguez. (2005). *Mecanismos moleculares de patogenicidad de Salmonella sp.* *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 47: 25-38.
- Finlay, B. B., Falkow, S. (1989). *Salmonella as an intracellular parasite*. *Molecular Microbiology*. 12: 1833-1841.
- Gourse, R. L., Chen, A. Y., Gopalkrishnan, S., Sánchez- Vázquez, P. Meyers, A. and Ross, W. (2018). *Transcriptional Responses to ppGpp and DksA*. *Annual Reviews of Microbiology*. 72: 163-84.
- Guadarrama, C., Medrano-López, A., Oropeza, R., Hernández-Lucas, I. and Calva, E. (2014). *The Salmonella enterica Serovar Typhi LeuO Global Regulator Forms Tetramers: Residues Involved in Oligomerization, DNA Binding, and Transcriptional Regulation*. *Journal of Bacteriology*. 196: 2143-2154.
- Guadarrama Román, M. del C. (2004). *Estudio de la Regulación de la Expresión del gen leuO de Salmonella typhi*. (Tesis de licenciatura inédita). Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Facultad de Ciencias Biológicas. Cuernavaca, Mor.
- Guía de Referencia Rápida Diagnóstico y Tratamiento para la Fiebre Tifoidea. (s. f.) Recuperado el 17 de octubre de 2013, de <http://www.cvsp.cucs.udg.mx/guias/TODAS/IMSS_259_10_FIEBRE_TIFOIDEA/IMSS_259_10_GRR.pdf>.

- Haurlyuk, V., Atkinson, G. C., Murakami, K. S., Tenson, T. and Gerdes, K. (2015). *Recent functional insight into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. Nature Rev Microbiology. 13: 298-309.*
- Haraga, A., Ohlson, M. B. and Miller, S. I. (2008). *Salmonellae interplay with host cells. Nature Rev Microbiology. 6: 53-56.*
- Henikoff, S., Haughn, G. W., Calvo, J. M. and Wallace, J. C. (1988). *A large family of bacterial activator proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 6602-6606.*
- Hensel, M. (2004). *Evolution of pathogenicity islands of Salmonella enterica. International Journal of Medical Microbiology. 294: 95-102.*
- Hernández-Lucas I., Gallego-Hernandez A.L., Encarnación S., Fernandez-Mora M., Martinez-Batallar A. G., Salgado H. (2008). *The LysR-Type Transcriptional Regulator LeuO Controls expression of Several Genes in Salmonella enterica Serovar Typhi. Journal of Bacteriology. 190: 1658-1670.*
- Ishihama, A., Shimada, T. and Yamazaki. (2016). *Transcription profile of Escherichia coli: genomic SELEX search for regulatory targets of transcription factors. Nucleic Acids Research. 44: 2058- 2074.*
- Jong, H. K., Parry, C. M., van der Poll, T. and Wiersinga, W. J. (2012). *Host-Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis. PLOS Pathogens. 8: 1-9.*
- Kanjee, U., Ogata, K. and Houry, W. A. (2012). *Direct binding targets of the stringent response alarmone (p)ppGpp. Molecular Microbiology. 85 (6): 1029-1043.*
- Khan, S. A., Everest, P., Servos, S., Foxwell, N., Zähringer, U., Brade, H. et al. (1998). *A lethal role for lipid A in Salmonella infections. Molecular Microbiology. 29: 571-579.*
- Klauck, E., Böhlinger, J. and Hengge- Aronis. (1997). *The LysR-like regulator LeuO in Escherichia coli is involved in the translational regulation of rpoS by affecting the expression of the small regulatory DsrA- RNA. 25 (3): 559- 569.*
- Landgraf, J. R., Wu, J. and Calvo, J. M. (1996). *Effects of Nutrition and Growth Rate on Lrp Levels in Escherichia coli. Journal of Bacteriology. 178: 6930-6936.*

- Laffler, T. and Gallant, J. (1974). *spoT a new genetic locus involved in the stringent response in E. coli*. Cell. 1(1): 27-30.
- LaRock, D. L., Chaudhary, A. y Miller, S. I. (2015). *Salmonellae interactions with host processes*. Nature Rev Microbiology. 13: 191-205.
- Lawrenz, M. B. and Miller, V. L. (2007). *Comparative Analysis of the Regulation of rovA from the Pathogenic Yersiniae*. Journal of Bacteriology. 189: 5963-5975.
- Maddocks, S. E. and Oyston, P. C. (2008). *Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins*. Microbiology. 154: 3609-3623.
- Majumder, A., Fang, M., Tasai, K. J., Ueguchi, C. Mizuno, T. and Wu, H. Y. (2001). *LeuO Expression in Response to Starvation for Branched-chain Amino Acids*. The Journal of Biological Chemistry. 276: 19046-19051.
- Majumder, A., Fang, M., Tsai, K. J. and Wu, H. Y. (2000). *ppGpp-dependent leuO expression in bacteria under stress*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 276: 64-70.
- Margolin, P. (1963). *GENETIC FINE STRUCTURE OF THE LEUCINE OPERON IN SALMONELLA*. Genetics. 48: 441- 457.
- Mechold, U., Potrykus, K., Murphy, H., Murakami, K. S. and Cashel, M. (2013). *Differential regulation by ppGpp versus pppGpp in Escherichia coli*. Nucleic Acids Research. 41 (12): 6175-6189.
- Momany, C. and Neidle, E. L. (2012). *Defying stereotypes: the elusive search for a universal model of LysR-type regulation*. Molecular Microbiology. 83(3): 453-456.
- Moorthy, S. and Watnick, P. I. (2005). *Identification of novel stage-specific genetic requirements through whole genome transcription profiling of Vibrio cholerae biofilm development*. Molecular Microbiology. 57: 1623-1635.
- Murphy, H. and Cashel, M. (2003). *Isolation of RNA polymerase suppressors of a (p)ppGpp deficiency*. Methods in Enzymology. 371, 596–601.

- Pizarro-Cerdá, J. and Tedin, K. (2004). *The bacterial signal molecule, ppGpp, regulates Salmonella virulence gene expression.* (2004). *Molecular Microbiology.* 52 (6): 1827- 1844.
- Platko, J. V., Willins, D. A. and Calvo, J. M. (1990). *The IlvIH Operon of Escherichia coli Is Positively Regulated.* *Journal of Bacteriology.* 172(8): 463-4670.
- Potrykus, K. and Cashel, M. (2007). *(p)ppGpp: Still Magical?.* *Annu. Rev. Microbiol.* 62: 35-51.
- Ramachandran, V. K., Shearer, N. and Thompson, A. (2014). *The primary Transcriptome Of Salmonella enterica Serovar Typhimurium and Its Dependence on ppGpp during Late Stationary Phase.* *PLOS ONE.* 9(3): e92690. doi:10.1371/journal.pone.0092690
- Ramachandran, V. K., Shearer, N., Jacob, J. J., Sharma, C. M. and Thompson, A. (2012). *The architecture and ppGpp-dependent expresión of the primary transcriptome of Salmonella Typhimurium during invasion gene expression.* *BMC Genomics.* 13:25.
- Rodríguez-Morales, Olivia., Fernández-Mora, Marcos., 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.* *Infection and Immunity.* 74: 1398-1402.
- Ross, W., Sánchez-Vázquez, P., Chen, A. Y., Lee, J. H., Burgos, H. L. and Gouse L. R. (2016). *ppGpp Binding to a Site at the RNAP-DksA interface Accounts for Its Dramatic Effects on Transcription Initiation during the Stringent Response.* *Molecular Cell.* 62: 811-823.
- Ross, W., Vrentas, C. E., Sánchez-Vázquez, P., Tamas, G. and Gouse L. R. (2013). *The Magic SpoT: A ppGpp Binding Site on E. coli RNA Polymerase Responsible for Regulation of Transcription Initiation.* *Molecular Cell.* 50: 420-429.

- Ryals, J., Little, R. and Bremer, H. (1982). Control of rRNA and tRNA Syntheses in *Escherichia coli* by Guanocine Tetraphosphate. *Journal of bacteriology*. 151(3): 1261-1268.
- Sambrook, J. and Green, M. R. (2012). *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Edición 4. Cap. 6. Pp. 362.
- Sánchez-Popoca, D. (2015). *H-NS y Lrp como reguladores del gen leuO en Salmonella enterica serovar Typhi*. Tesis de licenciatura, Univ. Autónoma del Estado de Morelos.
- Seyfzadeh, M., Keener, J. and Nomura. (1993). *spoT-dependent accumulation of guanosine tetraphosphate in response to fatty acid starvation in Escherichia coli*. *Biochemistry*. 90: 11004- 11008.
- Schreiber, G., Metzguer, S., Aizenman, E., Roza, S., Cashel, M. and Glaser, G. (1991). *Over expression of the relA Gene in Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*. 266: 3760-3767.
- Sherlock, M. E., Sudarsan, N. and Breaker, R. R. (2018). *Riboswitches for the alarmone ppGpp expand the collection of RNA-based signaling systems*. *PNAS*. 23(1156): 6052-6057.
- Shi, X. and Bennett, G.N. (1995). *Effects of Multicopy LeuO on the Expression of the Acid- Inducible Lysine Decarboxylase Gene in Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 177: 810-814.
- Shimada, T., Bridier, A., Briandet, R. and Ishihama, A. (2011). *Novel roles of LeuO in transcription regulation of E. coli genome: antagonistic interplay with the universal silencer H-NS*. *Molecular Microbiology*. 82: 378-397.
- Steinchen, W. and Bange, G. (2016). *The magic dance of the alarmones (p)ppGpp*. *Molecular Microbiology*. 101 (4): 531- 544.
- Stratmann, T., Pul, U. Wurm, R., Wagner, R. and Schnetz, K. (2012). *RcsB-BglJ activates the Escherichia coli leuO gene, encoding an H-NS antagonist and pleiotropic regulator of virulence determinants*. *Molecular Microbiology*. 83: 1109-1123.

- Svitil, A. L., Cashel, M. and Zyskind, J. W. (1993). *Guanosine Tetraphosphate Inhibits Proteins Synthesis in Vivo*. The Journal of Biological Chemistry. 268: 2307-2311.
- Takao, M., Yen, H. and Tobe, T. (2014). *LeuO enhances butyrate-induced virulence expression through a positive regulatory loop in enterohaemorrhagic Escherichia coli*. Molecular Microbiology.
- Tellez Galicia, Ing. (2014). *Analisis comparativo de los promotores del gen leuO de Salmonella enterica serovar Typhi*. (Tesis inédita). Universidad Politécnica del Estado de Morelos. Ingenieria en Biotecnología. Jiutepec, Mor.
- Ueguchi, C., Ohta, T., Seto, C., Suzuki, T. and Mizuno, T. (1998). *The leuO Gene Product Has a Latent Ability To Relieve bgl Silencing in Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. 180: 190-193.
- Valdez, Y., Ferreira R. B. R. and Finlay B. B. (2009). *Molecular Mechanisms of Salmonella Virulence and Host Resistance*. Sasakawa, C. (Ed.). Molecular Mechanisms of Bacterial Infection via the Gut (93-127). Tokyo, Japan: Springer.
- VanBogelen, R. A., Olson, E. R., Wanner, B. L. and Neidhardt, F. C. (1996). *Global Analisis of Proteins Synthesized during Phosphorus Restriction in Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. 178 (15): 4344- 4366.
- Velge, P., Wiedemann., Rosselin, M., Abed, N., Boumart, Z., Chausse A. M., Grepinet, O., Namdari, F., Roche S. M., Rossignol, A. and Virlogeux-Payant, I. (2012). *Multiplicity of Salmonella entry mechanisms, a new paradigm for Salmonella pathogenesis*. MicrobiologyOpen. 1(3): 243-258.
- Vinella, D., Albrecht, C., Cashel, M. and D´Ari Richard. (2005). *Iron limitation induces SpoT- dependent accumulation of ppGpp in Escherichia coli*. Molecular Microbiology. 56 (4): 958-970.
- Whitaker, W. B., Parent, M. A., Boyd, A., Richards, G. P. and Boyd E. F. (2012). *The Vibrio parahaemolyticus ToxRS regulator Is Required for Stress*

Tolerance and Colonization in a Novel Orgastric Streptomycin-Induced Adult Murine Model. Infection and Immunity. 80: 1834-1845.

- Wilson, R. P., Raffatellu, M., Chessa, D., Winter, S. E., Tükel, C., and Bäumler, A. J. (2008). *The Vi-Capsule prevents Toll-like receptor 4 recognition of Salmonella.* Cellular Microbiology. 10(4): 876-890.
- Wolz, C. Geiger, T. and Goerke C. (2010). The synthesis and function of the alarmone (p)ppGpp in firmicutes. Int. Journal of Medical Microbiology. 300: 142-147.
- Xiao, H., Kalman, M., Ikehara, K., Zemel, S., Glaser, G. and Cashel, M. (1991). *Residual 3', 5'-Bispyrofosfate Synthetic Activity of relA Null Mutants Can Be Eliminated by spoT Null Mutations.* The Journal of Biological Chemistry. 266 (9): 5980- 5990.
- Zaidi, M., Lopez, C. y Calva, E. (2006). *Estudios mexicanos sobre Salmonella: epidemiología, vacunas y biología molecular.* ALAM. 48: 121-125.