



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría en Ciencias Bioquímicas

Caracterización funcional del promotor antisentido P7 del gen *leuO* de *Salmonella Typhi*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
BIOL. GLORIA ALEJANDRA ALTAMIRANO CRUZ

DR. EDMUNDO CALVA MERCADO
Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. JOSE LUIS REYES TABOADA
Instituto de Biotecnología

DR. DANIEL GENARO SEGURA
Instituto de Biotecnología

Ciudad de México. Abril, 2023.



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.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.2 REGULADORES TRANSCRIPCIONALES TIPO LYSR (LTTR)	2
1.3 CARACTERÍSTICAS DE <i>leuO</i>	3
1.4 LeuO EN VIRULENCIA	4
1.5 LeuO COMO REGULADOR	5
1.6 EXPRESIÓN DE <i>leuO</i>	6
1.7 REGULACIÓN DE <i>leuO</i>	7
1.8 LA RNAP COMO PARTE DE LA REGULACIÓN	10
1.9 MECANISMOS DE REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL MEDIADA POR LA RNAP	12
2. ANTECEDENTES	14
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVO GENERAL	17
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES	17
6. METODOLOGÍA	18
6.1 Clonación de la región intergénica de <i>leuO</i> en diferentes longitudes	18
6.2 Reacción de ligasa	18
6.3 Preparación de células electrocompetentes	18
6.3 Transformación y obtención de clonas requeridas	20
6.5 Ensayo de la β -galactosidasa de los diferentes fragmentos clonados en el vector PRS415	21
6.6 Actividad de β - galactosidasa	23
6.7. Mutación de la región -10 de los promotores P3 y P7	23
6.7.1 Diseño de oligonucleótidos con mutación en la secuencia consenso -10	23
6.7.2 Hibridación de oligonucleótidos	24
6.8 Análisis de RT-PCR para determinar la longitud de P7	24
7. Resultados	26
7.1 Actividad promotora de P3 y P7 en los fondos WT, $\Delta hns::km$, $\Delta lrp::cm$, $\Delta hns/lrp$ y $\Delta relA/spoT$	26
7.2 Efecto de la mutación promotora P7 antisentido sobre la actividad del promotor sentido P3 en dirección a <i>lacZ</i>	28
7.3 Efecto de la mutación promotora P3 antisentido sobre la actividad del promotor sentido P7 en dirección a <i>lacZ</i>	29
7.4 Análisis bioinformático del terminador de P7	31

7.5 Estructuramiento de los transcritos P7 y <i>pleuL</i>	32
7. 6 Determinación del término del transcrito de P7	35
7.7 Efecto de la leucina sobre el promotor P7	38
8.Discusión	40
8.1 Regulación mediada por H-NS	40
8.2 H-NS regula la transcripción espuria	42
8.3 Regulación mediada por ppGpp	43
8.4 Promotores antisentido	46
8.5 Efecto de la leucina sobre el promotor P7 y <i>pleuL</i>	47
9. Conclusiones	49
10. Perspectivas	49
11. BIBLIOGRAFÍA	50
12.Anexos	54

RESUMEN

Salmonella enterica serovar Typhi (*S. Typhi*) es una bacteria Gram negativa, causante de la fiebre tifoidea, una enfermedad patogénica exclusiva del humano. El regulador transcripcional tipo LysR LeuO de *S. Typhi*, se ha visto involucrado en la virulencia de este patógeno. LeuO tiene un tamaño de 314 aminoácidos (aa) y es un regulador pleiotrópico quiescente, cuya expresión es regulada por múltiples factores, entre ellos múltiples proteínas represoras de la transcripción (Fernández-Mora et al., 2021; Guadarrama et al., 2014; Jurado-Jiménez, 2010; Rodríguez-Morales et al., 2006).

Hemos demostrado que el gen *leuO* de *S. Typhi* está regulado negativamente por las proteínas H-NS y Lrp, y hemos determinado la presencia de siete promotores en su región de regulación: cinco promotores están en sentido del gen y dos promotores están en antisentido. La mayoría de estos promotores se encuentran regulados por ppGpp de manera diferencial (Fernández-Mora et al., 2021).

En este estudio nos concentramos en caracterizar la región de 99 nt que comprende al promotor P3 en sentido del gen *leuO* y el promotor antisentido P7 en dirección al operon *leuABC*. Los resultados aquí presentados, indican que la actividad silenciadora de H-NS no tiene un efecto sobre regiones cortas que abarcan a cada promotor (pRS*leuOP3* -90 +8 y pRS*leuOP7* +3 -96). Por el contrario a lo reportado en una región con longitud extensa de 286 nt (pRS*pleuOP7* +158 -127) (Fernández-Mora et al., 2021). Así mismo, las regiones cortas que incorporan al promotor P7 y P3 mantienen una respuesta transcripcional a los niveles de la alarmona ppGpp. Mientras que las regiones largas pierden la sensibilidad transcripcional a los niveles de ppGpp.

Por otro lado, se comprobó que el promotor P3 tiene una secuencia canónica en la caja -10, a diferencia del promotor P7 y que existe transcripción espuria por parte de éste último. Proponemos que esta dinámica de actividad transcripcional hace que la incorporación del regulador H-NS cobre importancia para el silenciamiento de esta región.

Además, se determinó la longitud del transcrito de P7 (463 nt) y la terminación de su transcripción, la que aparenta estar en la misma estructura tallo-asa del atenuador de la secuencia líder del mRNA proveniente del promotor *pleuL*, del operón *leuABC* encargado de la síntesis de leucina. Además, la estructura del mRNA de P7 mostró no ser favorable termodinámicamente a diferencia de la del mRNA proveniente del promotor *pleuL*, que está corriente abajo. La parte experimental demostró que P7 no responde a la presencia de leucina, lo que sugiere que P7 no regula al operón *leuABC*, al menos en las condiciones probadas.

SUMMARY

Salmonella enterica serovar Typhi (*S. Typhi*) is a Gram negative bacterium that causes typhoid fever, an exclusively human pathogenic disease. In *S. Typhi* we can find LeuO, a LysR-type transcriptional regulator with a size of 314 amino acids (aa). LeuO is a pleiotropic regulator, considered quiescent and this could be due to the fact that it is negatively regulated by multiple proteins in different organisms (Fernández-Mora et al., 2021; Guadarrama et al., 2014; Jurado-Jiménez., 2010; Rodríguez-Morales et al., 2006).

We have shown that the *S. Typhi leuO* gene is negatively regulated by the H-NS and Lrp proteins, and we have determined the presence of seven promoters present in its regulatory region: five promoters are in the sense of the gene and two promoters are in antisense direction. Almost all promoters are differentially regulated by ppGpp (Fernández-Mora et al., 2021).

In this study we focused on characterizing the 99 nt region comprising the P3 promoter in the sense of the *leuO* gene and the antisense P7 promoter in the direction of the *leuABC* operon. The results presented here indicate that the silencing activity of H-NS does not have an effect on short fusions, as in the case of the region encompassing both promoters (pRSleuOP3 -90 +8 and pRSleuOP7 +3 -96), that is, in a short region of DNA, the opposite of what was reported in a region with an extensive length of 286 nt (pRSpleuOP7 +158 -127) (Fernández-Mora et al., 2021). Likewise, the ppGpp alarmon continues to have its negative regulation effect on the P7 and P3 promoter despite having a short length, this could be due to the fact that this alarmon binds to RNA polymerase and not directly to DNA. However, this effect is not appreciable in a complete "pleuO894" fusion, possibly due to obstacles caused by DNA-binding proteins, or nucleoid-associated proteins, NAPs.

On the other hand, it was found that the P3 promoter is canonical in the -10 box, unlike the P7 promoter, and that there is spurious transcription from it, which suggests the importance of H-NS in silencing this region.

In addition, the length of the P7 transcript (463 nt) and the termination of its transcription were determined, which appears to be in the same stem-loop structure of the attenuator of the mRNA leader sequence from the pleuL promoter, of the *leuABC* operon responsible for leucine synthesis. In addition, the structure of the P7 mRNA was shown to be thermodynamically unfavorable, unlike that of the mRNA from the pleuL promoter, which is downstream. The experimental part showed that P7 does not respond to the presence of leucine, which suggests that P7 does not regulate the *leuABC* operon, at least under the tested conditions.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CARACTERÍSTICAS DE *Salmonella*

Salmonella es una bacteria perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, son bacilos Gram negativos intracelulares anaerobios facultativos. Este género está compuesto por dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*, de las cuales la *S. enterica* representa la especie de mayor patogenicidad, que se organiza por 2600 serovares basados en el antígeno H (flagelar). Existen serovares “especialistas” que presentan un espectro limitado de hospedero o incluso un hospedero específico como *S. Typhi* y *S. Gallinarum*, que infectan solo a humanos y aves, respectivamente. Por su parte, los serovares “generalistas” afectan a un amplio rango de hospederos como lo es *S. Typhimurium*. Dos de las serovariedades más comunes a nivel mundial son: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) y *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*), esta última es causante de la fiebre tifoidea, una enfermedad patógena exclusiva del humano. Su mecanismo de infección es a través de la invasión de las células epiteliales intestinales no fagocíticas, como las placas de Peyer en el colon, en donde se multiplican. Posteriormente pasan a torrente sanguíneo donde son atrapadas por fagocitos y macrófagos del sistema retículo endotelial, acumulándose en los órganos linfoides como: hígado, bazo y la médula ósea, que desencadena una rápida respuesta inmune ocasionando daño sistémico (de Jong et al., 2012; Tanner et al., 2018; Silva et al., 2014).

Una vez cruzada la barrera intestinal, es necesario que *S. Typhi* desempeñe un papel crucial para su supervivencia y replicación dentro de su hospedero, para esto necesita expresar un conjunto especializado de genes para desencadenar su virulencia.

S. Typhi cuenta con aproximadamente 4800 genes, de estos, el 4% se ha asociado a virulencia y en gran mayoría se localizan en las llamadas islas de patogenicidad (Bowe et al., 1998). Hasta ahora se han reportado más de 10 islas, de las cuales las mejores estudiadas son la SPI-1 y SPI-2, ya que son importantes para la supervivencia y replicación de la bacteria dentro de la célula infectada. Los

genes de la isla SPI-1 se expresan principalmente en el intestino durante las primeras etapas de la invasión. Posteriormente, su expresión disminuye dentro de las células epiteliales a la par de un aumento en la expresión de los genes de la isla SPI-2 (Daigle et al., 2008).

La expresión en cascada de los genes codificados en las islas de patogenicidad SPI-1 y SPI-2, en el curso de la invasión, es debido a la co-regulación mediada por proteínas reguladoras, como el caso del regulador OmpR, la cual a su vez se ve influenciada por la topología del DNA, ya que la relajación del DNA provoca acceso a la región reguladora y de esta manera reconoce secuencias promotoras específicas que pueden activar la expresión del gen *ssrA* (Cameron y Dorman, 2012).

Como hemos mencionado, algunos reguladores transcripcionales ayudan a los genes para el control de su expresión precisa dependiendo las necesidades de la bacteria. Los reguladores transcripcionales tipo LysR (LTTR) son la familia de proteínas más abundantes en el reino procariota.

1.2 REGULADORES TRANSCRIPCIONALES TIPO LYSR (LTTR)

Los reguladores transcripcionales tipo LysR (LTTR por sus siglas en inglés) están compuestos de aproximadamente 330 aminoácidos, cuentan con un dominio N-terminal que presenta un motivo hélice-giro-hélice que se une al DNA y un dominio C-terminal que tiene un dominio regulador (RD), donde se ubican dos subdominios (RD1 y RD2) que son conectados por una región en forma de hendidura donde posiblemente se une un co-inductor (Fig.1).

Los miembros de esta familia se han descrito como reguladores transcripcionales globales que actúan como activadores o como represores y su expresión a menudo está sujeta a autorregulación.

Esta familia cuenta con 800 miembros en donde se incluye a LeuO (Maddocks y Oyston, 2008).

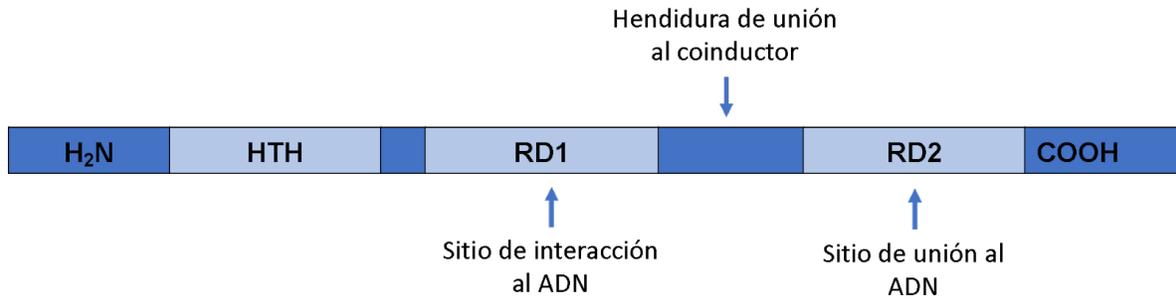


Fig.1 Estructura de un LTR. El dominio HTH se localiza 20-90 residuos del extremo N terminal, el dominio de unión al coinductor se encuentra entre los residuos 95 y 210 del extremo C terminal. RD1 y RD2 son dos dominios conservados que se unen por una región de cruce que forma una bisagra o hendidura (Modificado de Maddocks y Oyston, 2008).

1.3 CARACTERÍSTICAS DE *leuO*

LeuO tiene 314 aminoácidos y se encuentra entre 135983 y 136927 nucleótidos del genoma de *S. Typhi* CT18 (KEGG, Enciclopedia de Genes y Genomas Kyoto). El gen que codifica esta proteína se encuentra localizado entre los operones *leuABCD* (involucrado con la síntesis de leucina) e *ilvH* (involucrado en la biosíntesis de isoleucina y valina) como se observa en la Figura 2. Basado en su localización, se presumía que *LeuO* estaba implicado en la regulación del operón *leuABCD*; sin embargo, esta idea fue descartada debido a que una mutante en *leuO* no es auxótrofa para leucina (Ueguchi et al., 1998).

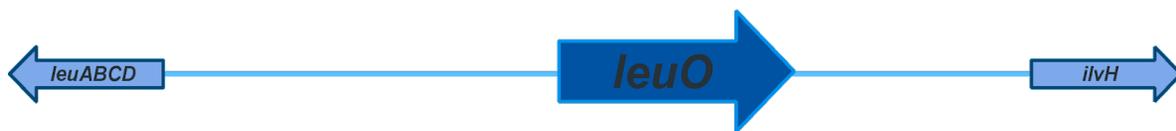


Fig. 2 Localización genómica de *leuO*. Su ubicación está entre los nucleótidos 135983 y 136927, en dirección al operón *ilvH* y divergente a *leuABC*.

El gen *leuO* tiene una expresión quiescente en condiciones de laboratorio (Fernández-Mora et al., 2021; Stratmann et al., 2012), sin embargo existe evidencia de que la expresión de *leuO* se induce durante la infección en varios microorganismos como *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Yersinia enterocolitica* y *Vibrio cholerae* (Shimada et al., 2009). Esto implica la presencia de un sistema de regulación que responde a señales poco conocidas que muy probablemente estos organismos encuentran en el proceso de infección.

1.4 LeuO EN VIRULENCIA

La infección sistémica desencadenada por *Salmonella* incluye la participación de distintos genes para una colonización exitosa, en donde LeuO juega un papel importante.

En *S. Typhimurium* LeuO se ha asociado a la virulencia, ya que mutaciones en los genes *leuO*, *ompS1* y *ompS2*, la infección en ratones se atenúa (Rodríguez-Morales et al., 2006).

También se ha observado una reducción de la trans migración de células polimorfonucleares, al infectar *C. elegans* con una cepa de *S. Typhimurium* carente de *leuO* (Tenor et al., 2004).

En un estudio de transcriptómica, se analizó el perfil transcripcional de *S. Typhimurium* al infectar ratones y se identificaron nuevos genes importantes para la infección sistémica. El análisis se hizo durante un periodo de infección 28 días y se observó que *leuO* se expresa a partir de los 7 días posteriores a la infección (Lawley et al., 2006).

Por otro lado LeuO se ha vinculado a la regulación de genes asociados a la virulencia, como los de las islas de patogenicidad SPI-1. LeuO regula de manera positiva al represor HilE que a su vez reprime al activador HilD y este, a través de una red de regulación, reprime de manera indirecta la expresión de genes de la isla SPI-1 (Espinosa y Casadesús, 2014). Estudios recientes en nuestro laboratorio han mostrado que la expresión de *leuO* se desreprime por la acción de los reguladores LrhA y SlyA (Sánchez-Popoca, D. comunicación personal).

Además, se ha determinado una vía de regulación HilD-SprB-SlyA (Banda et al., 2022), que pudiera vincular a LeuO con la regulación de los genes de las islas SPI-1 y SPI-2.

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).

Para el caso de *Vibrio cholerae* también se ha encontrado que LeuO regula la expresión del sistema *cad*, el cual se ha visto involucrado en la tolerancia a condiciones de acidez (Ante et al., 2015b). Además LeuO podría participar en la respuesta a las sales biliares, ya que ToxR activa la expresión de *leuO* en estas condiciones (Ante et al., 2015a).

En *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), la presencia de butirato promueve la activación de la expresión *leuO* a través de Lrp, que a su vez también regula positivamente a dos reguladores de virulencia : Pch y Ler (Takao et al., 2014). Cada uno de estos ejemplos muestra la relevancia que *leuO* podría tener para que la bacteria pueda sobrevivir a distintas condiciones dentro de su hospedero.

1.5 LeuO COMO REGULADOR

La respuesta de LeuO ante la virulencia puede deberse a que este regula a un conjunto de genes que podrían ser requeridos en distintas etapas de la infección, a manera de asegurar la supervivencia bacteriana.

En *E. coli* se ha descrito que LeuO se une a la región reguladora de genes cuyos productos cumplen una amplia variedad de funciones. La lista incluye reguladores transcripcionales como EnvR, proteínas de membrana como FepE implicadas en la longitud de la cadena del antígeno O del lipopolisacárido, y los productos del operón *acrEF* que conforman una bomba de salida de múltiples fármacos (Shimada et al., 2009).

En *S. Typhi*, LeuO regula de manera positiva el sistema *crispr-cas*. Estos sistemas juegan un papel de defensa adaptativa contra el DNA exógeno en *E. coli*. Sin embargo, en nuestro modelo de estudio se ha relacionado con la regulación positiva de los genes *ompS1*, *ompS2* que codifican para porinas presentes en la membrana, y el gen *assT* que codifica para una aril-sulfotransferasa involucrada en la detoxificación de compuestos fenólicos. Por otra parte, LeuO regula de manera negativa al gen *tpx* que codifica para una tiol-peroxidasa periplásmica que participa en la respuesta a estrés oxidante, al gen *ompX* que codifica para una porina transportadora de compuestos hidrofóbicos, y al gen *STY1978* que codifica para una proteína hipotética (Hernández-Lucas et al., 2008). Si bien LeuO puede

actuar como regulador de un conjunto ecléctico de genes, es necesario que este sea activado previamente.

1.6 EXPRESIÓN DE *leuO*

Se han encontrado distintas condiciones y señales en el medio que pueden favorecer la expresión de *leuO*.

Se ha propuesto que *leuO* puede expresarse en condiciones de estrés. Esto está basado en la observación de que la expresión de *leuO* aumenta durante la fase estacionaria, de manera dependiente de los niveles de la alarmona ppGpp, en el modelo de *E. coli* (Majumder et al., 2000).

Se realizó un estudio en *E. coli* reportando a *leuO* como parte de un conjunto de genes que se inducen en un medio limitado en fosfato (VanBoglen et al., 1996). Así mismo, se ha reportado en *E. coli* que la expresión de *leuO* aumenta después de una semana de incubación a 37°C en un medio rico (LB), mientras que la expresión de *hns* disminuye con el paso de los días (Shimada et al., 2011).

En *V. cholerae*, el dipéptido cíclico Phe-Pro (cFP) es capaz de inducir la expresión de *leuO* a través de una cascada de regulación controlada por ToxR (Bina et al., 2013). Las sales biliares favorecen la inducción de *leuO* y reprimen la expresión del operón *carRS*. La reducción en los niveles del sistema de dos componentes CarRS reduce la resistencia de *V. cholerae* a péptidos antimicrobianos catiónicos (CAMP) como polimixina B; (Ante et al., 2015 b).

El crecimiento de *V. cholerae* en presencia de CaCl₂ 5 mM resultó en una disminución del 25% en la expresión de *leuO*, esto indica que la expresión de *leuO* se regula en respuesta a Ca (Bina et al., 2016).

En *S. Typhimurium*, se ha propuesto que la activación de *leuO* se da a través de un mecanismo que involucra el superenrollamiento local, descrito como “relevo de promotor”. La actividad distal del promotor *pilVH* produce un súper enrollamiento local que causa la interacción promotor-promotor, activando la transcripción de *leuO* P1 que normalmente se encuentra reprimido (Fang y Wu, 1998).

Los ejemplos anteriores sugieren que diferentes patógenos utilizan estrategias complejas para controlar la expresión de *leuO*. Las diferencias en dichas estrategias regulatorias probablemente dependen de las señales que son

relevantes en el proceso de infección de estos patógenos o el repertorio de reguladores preexistentes en los respectivos genomas.

1.7 REGULACIÓN DE *leuO*

Anteriormente se expusieron algunas de las condiciones que favorecen a la expresión de *leuO*; ahora discutiremos la contribución de proteínas con función reguladora.

La proteína LrhA es un regulador transcripcional de tipo LysR asociado a la motilidad y quimiotaxis, esta proteína puede activar la expresión de los promotores de *leuO* en *E. coli* (Breddermann y Schnetz, 2017). Asimismo, SlyA un regulador transcripcional miembro de la familia MarR, implicado en la formación de biopelícula, regula de manera positiva a *leuO* en *S. Typhimurium* (Curran et al., 2017).

En *E. coli*, las proteínas RscB-BglJ, que detectan perturbaciones de la membrana externa y la capa de peptidoglicano, activan al promotor P2 de *leuO* el cual es reprimido por la proteína del nucleóide tipo histona H-NS y el regulador StpA (Stratmann et al., 2012).

Estudios más detallados de la región reguladora de *leuO* en *S. Typhimurium* demostraron que contiene una zona de control negativo rica en AT (elemento AT4) que abarca 72 pares de bases, comprobaron ser un sitio de nucleación de la proteína tipo histona H-NS (Chen et al., 2001, Chen et al., 2005).

En diversas investigaciones se ha involucrado a H-NS como un represor transcripcional de genes adquiridos por transferencia horizontal, siendo crucial para el control de los procesos biológicos de la bacteria, como en el caso del control de las islas de patogenicidad. Esta proteína se une al DNA en secuencias ricas en A y T, forma complejos proteicos y reprime la transcripción.

Presumiblemente, parte del mecanismo de represión de la transcripción involucra la formación de un bucle que impide la actividad de la RNAP. Lo anterior sugiere que H-NS tiene requerimientos laxos para la regulación de genes, esto podría explicar la diversidad de blancos de regulación implicados en múltiples procesos celulares (Dillon y Dorman 2011).

El mecanismo de relevo de promotor fue propuesto debido a que la activación de *leuABC* a través de promotores distales en la cepa *Typhimurium* CH582, ya que se veía favorecida por una señal en un medio en ausencia de leucina en etapa tardía de crecimiento, en donde ppGpp aumenta y a su vez favorece la expresión de Lrp que es necesario para activar a *ilvIH* (Fang and Wu 1998a, 1998b).

La proteína Lrp (proteína de respuesta a leucina); que al igual que H-NS es un regulador global de unión a DNA, afecta la expresión de muchos genes y operones involucrados en el metabolismo de aminoácidos. Los aminoácidos que se han designado como efectores de Lrp son alanina, valina, isoleucina, asparagina, lisina, prolina y leucina (Brinkman et al., 2003; Cho et al., 2008). Se ha demostrado que Lrp se oligomeriza en complejos de alto nivel como hexadécámeros y octámeros (a concentraciones μM) habiendo preferencias por los primeros, sin la necesidad de estar unido al DNA. Sin embargo, la leucina provoca su disociación a octámeros unidos a leucina, reduciendo de esta manera la afinidad específica al DNA, pero permitiendo interacciones que impiden o aminoran la activación de *ilvIH* (Chen y Calvo, 2001). Los niveles de Lrp varían significativamente dependiendo la fase de crecimiento y la expresión de su promotor es estimulada por ppGpp en respuesta a la tasa de crecimiento y la limitación de fuentes de carbono y aminoácidos (Landgraf et al., 1996).

El tetra/penta fosfato de guanina (p)ppGpp, es una alarmona en respuesta a ayuno. Parte de la respuesta involucra la inhibición de la síntesis de RNA cuando hay escasez de aminoácidos. Esta alarmona ha sido mayormente estudiada en *E. coli*, y su síntesis y degradación están bajo el control de las proteínas RelA y SpoT. La enzima sintetasa monofuncional RelA utiliza el GTP o GDP más ATP para generar (p)ppGpp. Su actividad se estimula cuando no hay tRNAs cargados debido a escasez de aminoácidos. Por otra parte, la enzima bifuncional SpoT es capaz de sintetizar e hidrolizar el (p)ppGpp. SpoT es esencial cuando existe gran cantidad de ppGpp, ya que la alarmona causa el paro de la replicación del DNA (Fig.3) La síntesis de ppGpp también puede estimularse por falta de nutrientes como fosfatos, carbono, hierro y ácidos grasos. Una de sus funciones es el

silenciamiento de genes, redirigiendo la RNAP a la inhibición o activación de estos dependiendo el estrés bacteriano (Dalebroux, 2012).

Sistema RelA´

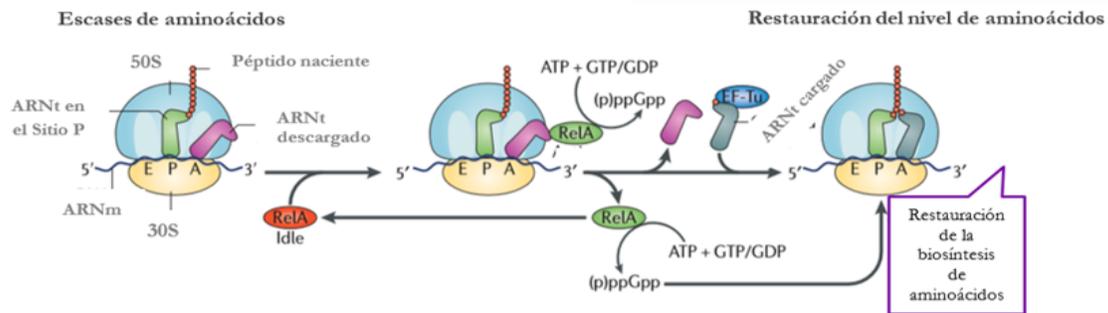


Fig. 3 Vía de síntesis de (p)ppGpp por RelA. La escasez de aa conduce a la acumulación de tRNAs descargados y estos se unen al sitio A del ribosoma. El ribosoma es reconocido por RelA el cual se une a la subunidad 50S adquiriendo su forma activa para sintetizar (p)ppGpp. Al sintetizar (p)ppGpp se disocia 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 conjunto 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 (Modificado de Hauryliuk *et al*, 2015).

El mecanismo de interacción de ppGpp con la RNAP depende de dos sitios de unión que son ocupados por la alarmona de manera diferencial dependiendo su concentración. A bajas concentraciones el ppGpp puede unirse al sitio, el cual se ubica en la interfaz de la subunidad β' y el factor ω . A altas concentraciones de ppGpp, este puede unirse al sitio 2, el cual se ubica en la interfaz de la subunidad β' y de la proteína DksA (Ross *et al.*, 2016).

Para el caso de *S. Typhi*, *leuO* muestra tener una regulación fina ya que al ser estudiada la región reguladora de este gen la cual se encuentra reprimida principalmente por HN-S y Lrp, así como la presencia de siete promotores, los cuales han sido analizados en una región mínima (100 pb), se pudo mostrar que el promotor P1 es el único que es activado por ppGpp, mientras que los promotores P3, P5, P4, P7 y P7 son regulados de manera negativa (Fernández-Mora *et al.* 2021). Por otra parte, se ha encontrado que la sobreexpresión de SlyA y LrhA mediante un vector de expresión provocan la activación de *leuO* (tesis de doctorado, Sánchez-Popoca, 2022), siendo los primeros activadores encontrados

para este modelo, lo que indica que *leuO* está sujeto a una red de regulación controlada.

Los mecanismos han evolucionado de una manera precisa y cooperativa para regular distintos genes, controlando la transcripción a distintos niveles, para así ser expresados específicamente en el momento requerido por la bacteria dependiendo las condiciones.

1.8 LA RNAP COMO PARTE DE LA REGULACIÓN

Los múltiples mecanismos de regulación implican la participación de la RNA polimerasa (RNAP) durante la transcripción. Como se mencionó anteriormente, el paso de la RNAP puede ser interrumpido, parcial o completamente, por proteínas de unión a DNA y esto resulta en una inhibición en su capacidad de sintetizar transcritos. El estructuramiento topológico del DNA también puede ocultar elementos necesarios para el inicio de la transcripción, lo que conlleva al impedimento del reconocimiento de secuencias específicas también llamadas secuencias promotoras (Browning y Busby, 2016).

Las secuencias promotoras se han definido como estructuras de DNA moduladoras que contienen una matriz compleja de elementos necesarios para el inicio preciso y eficiente de la transcripción. En general, los genes cuentan con secuencias flanqueadas por un promotor y un terminador intrínseco o Rho-dependiente, en donde el plegamiento del RNA juega un papel importante. Los elementos promotores constan de una secuencia -10, una región extendida -10 inmediatamente corriente arriba del inicio de la transcripción, el cual puede aumentar la actividad del promotor; y una región -35, estos son los elementos de reconocimiento de la RNAP (Fig. 4). Existen regiones entre estos elementos consideradas generalmente sin importancia, como son la secuencia espaciadora de aproximadamente 17 pb. Más aún, algunas de estas secuencias también tienen una participación en el control sobre la expresión de ciertos genes, ya que al ser elementos ricos en A-T “tramos de A-T”, la RNAP puede unirse a ellos formando promotores crípticos o iniciar la transcripción de manera promiscua (Singh, et al, 2011, 2013).

Por lo que cada característica de los elementos mencionados anteriormente es importante para la dinámica de expresión de un gen.

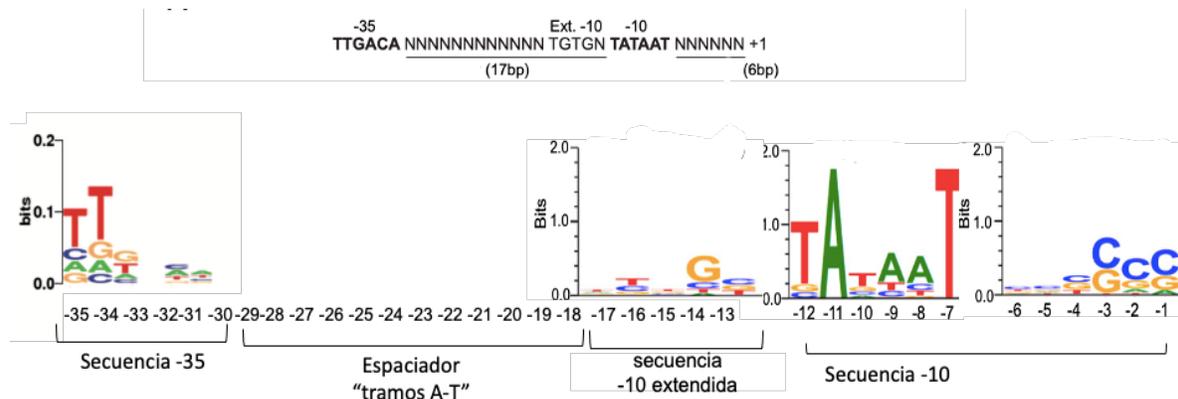


Fig. 4 Características que conforman una secuencia promotora presentando una secuencia -10, una secuencia -10 extendida, un espaciador de (17 nc) la cual dependiendo de la cantidad de A-T puede ser nombrado como "tramos de A-T" y la secuencia -35 (Modificado de Sing, et al, 2011).

Las secuencias promotoras tienen una participación puntual para el reconocimiento de la RNAP, a menudo estos elementos son asimétricos y resultan en la existencia de dos o más promotores, los cuales dependiendo la ubicación son denominados de distintas maneras (Fig. 5), algunos de los ejemplos son:

- **Promotores convergentes:** Los promotores se localizan en hebras diferentes del DNA en una orientación que teóricamente propicia la colisión de horquillas de transcripción (Fig. 5 a).
- **Promotores en tándem:** Los promotores se ubican uno río arriba del otro, transcribiendo en la misma dirección y no necesariamente superpuestos (Fig.5 b).
- **Promotores divergentes:** Los promotores se encuentran posicionados en hebras diferentes del DNA. A diferencia de los promotores convergentes en este arreglo divergente las horquillas de transcripción no colisionan o se sobrelapan (Fig. 5 c).

El control de la expresión transcripcional a nivel de reconocimiento de promotores es importante, ya que a través de la especificidad se eficientiza la transcripción en regiones con información genética necesaria para el funcionamiento celular. Esta

evolución de especificidad en la transcripción ha seleccionado mecanismos de regulación basados en el reconocimiento de regiones conservadas por proteínas reguladoras y en cambios topológicos del DNA que ocuyen o exponen regiones de regulación en *cis*.

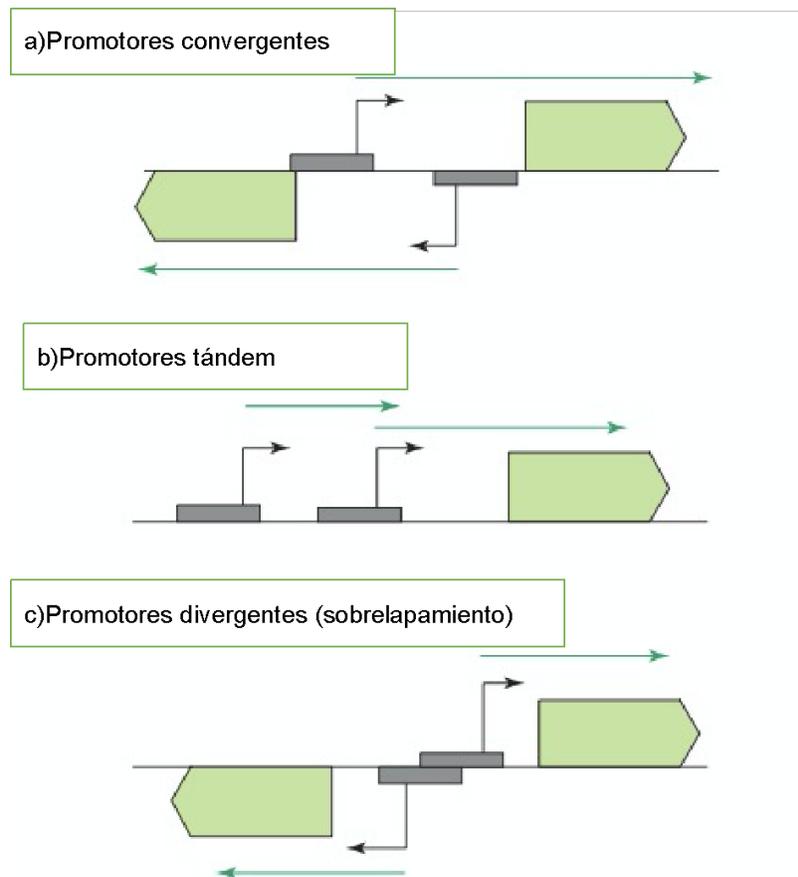


Fig. 5 Esquema de ubicación de los promotores que pueden conducir a interferencia transcripcional (TI). (a) promotores convergentes (b) promotores en tándem, (c) promotores superpuestos. Los sitios de unión a RNAP se indican mediante cuadros grises, los sitios de inicio de la transcripción (+1) se muestran en flechas negras y las transcripciones como flechas verdes (Modificado de Shearwin, et al,2010).

1.9 MECANISMOS DE REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL MEDIADA POR LA RNAP

El posicionamiento de promotores convergentes, promotores en tándem y promotores divergentes en una región intergénica pueden interpretarse como mecanismos que alteran la dinámica de expresión de genes de manera

dependiente de la capacidad de reconocimiento e inicio de la transcripción por la RNAP. Algunos de los mecanismos de control por la RNAP se detallan a continuación:

- Mecanismo de competición: Se restringe la unión de la RNAP en promotores contiguos. Si la unión a un promotor es más fuerte, la RNAP es “secuestrada” por dichas secuencias y hay menos disponibilidad para la unión a otros promotores de la región intergénica.
- Mecanismo oclusión: La RNAP al transcribir a uno de los promotores bloquea la transcripción del otro. En el caso de promotores en tándem, el inicio de la transcripción del promotor río arriba y la elongación del transcrito pueden interferir con el inicio de la transcripción del segundo promotor.
- Mecanismo de colisión: En el caso de promotores convergentes la elongación de los transcritos puede llevar a la colisión de la maquinaria de transcripción y generar eventos abortivos.

La posición del promotor no es el único determinante del efecto transcripcional sobre promotores contiguos, conocer la fuerza del promotor es también importante para poder predecir su efecto sobre estos.

Como mencionamos la regulación transcripcional sucede desde el inicio de la transcripción y está dada por el reconocimiento de la RNAP hacia los promotores, una vez iniciada la transcripción el plegamiento co-transcripcional de los mensajeros ocurre secuencialmente desde el extremo 5' hasta el extremo 3' del RNA.

En la actualidad existe evidencia experimental y teórica de que la formación de estructuras comienza durante la transcripción y que este plegamiento cotranscripcional determina las características estructurales del RNA funcional que se están formando.

En el centro de la regulación transcripcional se encuentran las estructuras de RNA nacientes, que se ha descubierto que controlan activamente la expresión génica ya sea mediante el reclutamiento de cofactores clave o mediante la modulación de la tasa de elongación (Duss et al, 2019).

Este estructuramiento secundario del RNA generado, permite en algunos casos generar una pausa en la transcripción por parte de la RNAP para que se unan los factores proteicos e inducir la elongación del transcrito, el cual a lo largo puede generar más de una única estructura de RNA funcionalmente relevante que le puede permitir tener estabilidad y estas se vean favorecidas para su traducción, así mismo este plegamiento de RNA es importante para el término adecuado de la transcripción (Lai,2013).

La terminación de la transcripción juega un papel importante en la regulación de la expresión génica, evitando la transcripción de los genes vecinos y las colisiones con otros complejos transcripcionales. Existen dos modos diferentes para el proceso de terminación. El primero se basa únicamente en la interacción entre RNAP y la secuencia de la plantilla de DNA la cual forma un estructura tallo-asa “terminación intrínseca o independiente de Rho”, mientras que el segundo implica la cooperación con factores específicos, como la proteína Rho “llamada terminación Rho-dependiente”. Todas estas son características que pueden presentarse dentro de la región intergénica de un gen así como en su región estructural para regular su expresión genética (Calva y Burgess 1980; Ciampi, 2006).

2. ANTECEDENTES

En *S. Typhi*, *leuO* presenta siete promotores con una secuencia consenso para sigma 70(σ 70), de los cuales, cinco promotores en tándem están en sentido del gen y dos promotores en tándem divergentes al gen *leuO*. La regulación que presenta el gen *leuO* es compleja y evidencia que es regulado de manera distinta para cada uno de sus promotores por distintas moléculas como ppGpp y algunas proteínas como H-NS y Lrp como se representa en la Figura 6. Esto pudiera mostrar una red de regulación distinta a lo que anteriormente se ha ya descrito (Fernández-Mora et al., 2021).

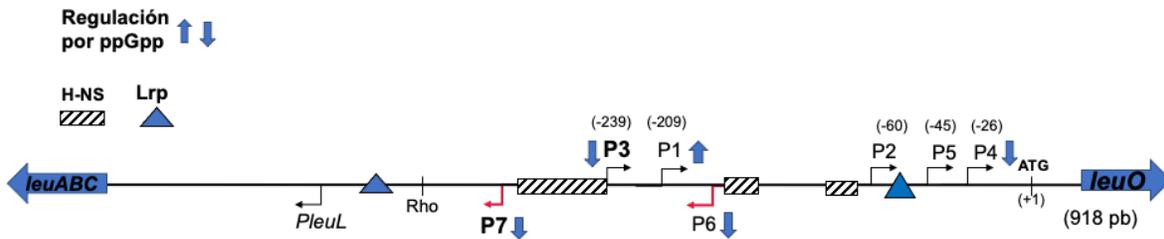


Fig. 6. Esquema de la región reguladora de *leuO*. Las flechas negras y rojas representan los inicios de la transcripción. Las flechas azules muestran la regulación de ppGpp sobre cada promotor: positivas (arriba), negativas (abajo). Los cuadros representan los posibles sitios de unión para H-NS, los triángulos representan los sitios de pegado para Lrp.

Dentro del laboratorio se han realizado estudios para el análisis de la región reguladora de *leuO*, utilizando fusiones transcripcionales de distintos tamaño de la región intergénica de *leuABCD* y *leuO* con el gen reportero *lacZ* (Fernández-Mora et al., 2021; Sánchez-Popoca et al., 2022). Esto nos ha permitido definir el nivel de actividad de algunos de estos promotores.

Al estudiar la región de 99 nt en las fusiones transcripcionales que contiene el promotor P3 “pRS*leuOP3* -90+8” (Fig. 7C) y la región de 250 nt que abarca el promotor P7 “ pRS*leuOP7* +154-92” (Fig. 7B) en un fondo genético carente de ppGpp (Δ *relA/spoT*), se pudo observar un aumento en su actividad transcripcional en comparación con los niveles observados en el fondo genético silvestre. Esto nos sugiere que los promotores P3 y P7 están regulados negativamente por ppGpp. Por otro lado, la fusión que describe la actividad del promotor P3 en una región mínima de 55 nt “pRS*leuOP3*-43+8 “(Fig. 7 D), la cual carece del promotor P7, tiene mayor actividad que la fusión pRS*leuOP3* -90+8 en el fondo silvestre. Esto sugiere que el promotor divergente o alguna secuencia recortada con respecto a la fusión pRS*leuOP3* -90+8 limitan la expresión del promotor P3. Interesantemente, a diferencia de la actividad de la fusión pRS*leuOP3* -90+8, que incluye el promotor divergente P7, la actividad de la fusión pRS*leuOP3*-43+8 no se induce a niveles bajos de ppGpp sino que parece disminuir en un 50% (Fernández-Mora et al., 2021).

Los resultados anteriores muestran que la regulación mediada por ppGpp podría depender de la presencia de secuencias flanqueadas por los promotores P7 y P3.

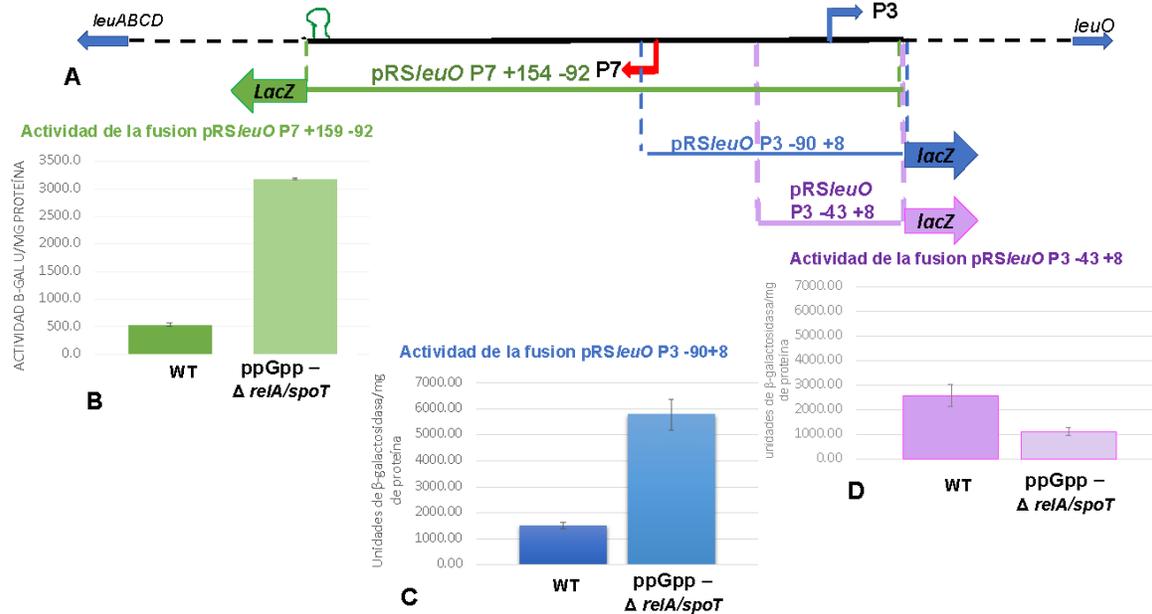


Fig. 7 A) Región intergénica de *leuO*, las líneas muestran las coordenadas de las fusiones. B) Actividad β-galactosidasa del promotor P7 en el fondo WT y ppGpp-. C) Actividad β-galactosidasa del promotor P3 en el fondo WT y ppGpp-. D) Actividad β-galactosidasa del promotor P3 “fusión recortada” en el fondo WT y ppGpp-.

Lo anterior podría explicar cómo es que los promotores de *leuO* se encuentran regulados finamente, para tener una expresión controlada y específica dependiendo de la condición (Sánchez-Popoca et al., 2022).

Finalmente, se ha postulado que la RNAP no sólo ejerce un efecto positivo sobre la expresión de los genes, sino que podría formar complejos con otras proteínas nucleoides como H-NS para favorecer la oclusión de la transcripción; esto es, ejercer tanto un efecto positivo como negativo en la transcripción (Sánchez-Popoca et al., 2022).

3. JUSTIFICACIÓN

leuO es un gen regulado negativamente por H-NS, Lrp y la alarmona ppGpp. En la región intergénica de *leuO* se encuentran siete promotores, tanto en la cadena sentido como en la anti-sentido, el promotor P3 que se encuentra en sentido de *leuO* y el promotor P7 que se encuentra divergente a este. La importancia de este estudio radica en conocer las implicaciones regulatorias de la presencia del promotor P7 sobre sus promotores y/o genes estructurales vecinos, P3/*leuO*, P/*leuABCD* y *leuABCD*. Dada la importancia de LeuO en el control de genes asociados a la virulencia, nos interesa saber si la actividad transcripcional del promotor P7 tiene un efecto en la actividad de el promotor P3/*leuO*, interfiriendo con algún mecanismo de reconocimiento por parte de la RNAP y la cooperación de las principales proteínas represoras hacia uno de estos, cambiando el fenotipo.

4. HIPÓTESIS

- El promotor antisentido P7 del gen *leuO* de *S. Typhi* IMSS 1 WT colabora en la regulación del promotor P3 en ausencia de ppGpp
- El promotor P7 divergente a *leuO* no forma parte de la regulación del operón de leucina

5. OBJETIVO GENERAL

- Establecer si la actividad del promotor antisentido P7 regula la respuesta a ppGpp del promotor P3 en sentido del gen *leuO* y determinar si los reguladores globales H-NS y Lrp siguen implicados en su represión
- Caracterizar la función y actividad del promotor divergente P7

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la actividad de los promotores P3 y P7 en un fondo genético WT
- Identificar si H-NS, Lrp y ppGpp regulan a los promotor P3 y P7
- Identificar si la actividad del promotor P3 y P7 se altera al mutagenizar el promotor divergente correspondiente
- Identificar si el promotor P7 participa en la regulación del operón *leuA*

6. METODOLOGÍA

6.1 Clonación de la región 99 pb de P7 fusionado a *lacZ*

Debido a que ya contábamos con la fusión pRSleuOP3-90 +8 de 99 nt, la primera fusión en realizar es la clonación del promotor P7 la cual debíamos de fusionar al reportero *lacZ* en el vector pRS415 (Fig. 8) abarcando 99 nt; para esto se llevó a cabo la siguiente estrategia.

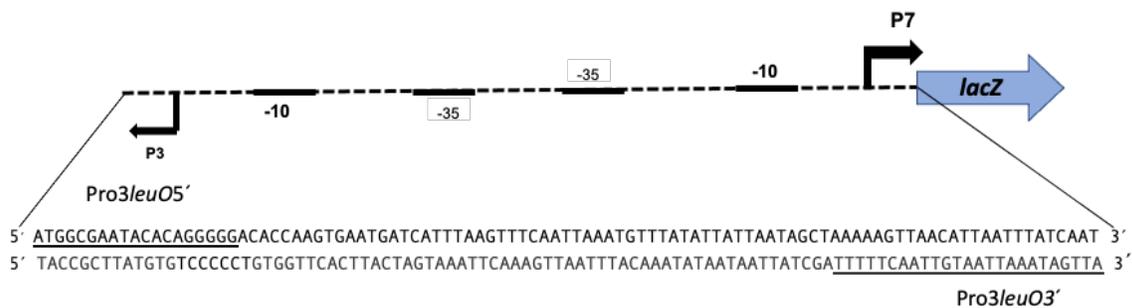


Fig. 8 . Secuencia de nucleótidos de la región de clonación del promotor P7. Las líneas que subrayan las secuencias muestran los oligonucleótidos utilizados para la amplificación.

Se amplificó el fragmento por medio de la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por lo que se utilizaron oligonucleótidos específicos “Pro3leuO5” y Pro3leuO3” que amplificaron la región de 99 nt (Tabla 1), utilizando la enzima *Taq* DNA polimerasa (Phusion #EP0402), llevando a cabo la reacción de acuerdo con el protocolo de la compañía, generando un fragmento con extremos romos.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la obtención de fusiones transcripcionales del promotor P3 y P7

Construcción	Oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido 5'----- 3'	Descripción
pRSleuOP7+3-96	Pro3leuO5 Pro3leuO3' (Fernández-Mora,M.2016)	5'-ATT GAT AAA TTA ATG TTA ACT TTT TA-3' Tm :58°C 5'-TAT GGC GAA TAC ACA ATC ATA -3 Tm :60°C	El par de oligonucleótidos amplifica un inserto de 99nc sin sitio de corte por enzimas de restricción. El inserto se clonó en ambas direcciones para obtener el promotor P3- <i>lacZ</i> y la inserción al revés para expresar el promotor P7- <i>lacZ</i> .
pRSleuOP7MUT	P7mutleuOp3-5' P7mutleuOp3-3'	5'-ATT GAT AAG GGG GGG TTA ACT TTT TAG CTA TTA ATA ATA TAA ACA TTT AAT TGA AAC TTA AAT GAT CAT TCA CTT GGT GTA TGA TTG TGT ATT CGC CAT-3' Tm: 63°C 5'-ATG GCG AAT ACA CAA TCA TAC ACC AAG TGA ATG ATC ATT TAA GTT TCA ATT AAA TGT TTA TAT TAT TAA TAG CTA AAA AGT TAA CCC CCC TTA TCA AT-3' Tm:61°C	El par de oligonucleótidos amplificaron la región de 99 nc, el inserto contiene una sustitución de la secuencia consenso -10 (letras rojas) del promotor P7 .y Eel inserto se clonó de manera que el promotor P7 controle la expresión de en dirección a <i>lacZ</i> (P7- <i>lacZ</i>).
pRSleuOP3MUT	P3mutleuOp7-5' P3mutleuOp7-3'	5'-ATG GCG AAT ACA CAG GGG GAC ACC AAG TGA ATG ATC ATT TAA GTT TCA ATT AAA TGT TTA TAT TAT TAA TAG CTA AAA AGT TAA CAT TAA TTT ATC AAT-3 5'-ATT GAT AAA TTA ATG TTA ACT TTT TAG CTA TTA ATA ATA TAA ACA TTT AAT TGA AAC TTA AAT GAT CAT TCA CTT GGT GTG GGG GTG TGT ATT CGC CAT-3'	El par de oligonucleótido amplificaron la región de 99 nc, el inserto contiene una sustitución de la secuencia consenso -10 (letras rojas) del promotor P3 y el inserto se clonó en dirección a <i>lacZ</i> (P3- <i>lacZ</i>).
pRSleuOP7 +3-96/P3MUT	P7mutleuOp3-5' P7mutleuOp3-3'	5'-ATT GAT AAG GGG GGG TTA ACT TTT TAG CTA TTA ATA ATA TAA ACA TTT AAT TGA AAC TTA AAT GAT CAT TCA CTT GGT GTA TGA TTG TGT ATT CGC CAT-3' Tm: 63°C 5'-ATG GCG AAT ACA CAA TCA TAC ACC AAG TGA ATG ATC ATT TAA GTT TCA ATT AAA TGT TTA	El par de oligonucleótido amplificaron la región de 99 nc, el inserto contiene una sustitución de la secuencia consenso -10 (letras rojas) del promotor P3, este insertos se clonó en la forma sentido y la inversa de tal manera que P7 quedará fusionado a <i>lacZ</i> .

		TAT TAT TAA TAG CTA AAA AGT TAA CCC CCC TTA TCA AT-3' Tm:61°C	
pRSleuOP3-90+8/P7MUT	P3mutleuOp7-5' P3mutleuOp7-3'	5'-ATG GCG AAT ACA CAG GGG GAC ACC AAG TGA ATG ATC ATT TAA GTT TCA ATT AAA TGT TTA TAT TAT TAA TAG CTA AAA AGT TAA CAT TAA TTT ATC AAT-3' 5'-ATT GAT AAA TTA ATG TTA ACT TTT TAG CTA TTA ATA ATA TAA ACA TTT AAT TGA AAC TTA AAT GAT CAT TCA CTT GGT GTG GGG GTG TGT ATT CGC CAT-3'	El par de oligonucleótido amplificaron la región de 99 nc, el inserto contiene una sustitución de la secuencia consenso -10 (letras rojas) del promotor P7, este inserto se clonó de forma inversa de tal manera que P3 quedará fusionado a <i>lacZ</i>

6.2 Reacción de ligasa

Se utilizó como vector pRS415 purificado previamente con el kit de plásmidos ZymoPURE (#D4209) posteriormente fue cortado con la enzima de restricción *SmaI* (#IVGN0226) de Thermo Fisher Science .

El vector receptor pRS415 (digerido con *SmaI*) y los insertos amplificados, se ligados con ayuda de la enzima T4 DNA ligasa (#EL0011 Thermo Fisher), incubando 1 hora a 22°C . Las muestras se guardaron a 4°C hasta su posterior utilización.

6.3 Preparación de células electrocompetentes

Se estriaron las cepas silvestre (IMSS1) y mutantes (Tabla 2) en medio TSGB(anexo) con su antibiótico correspondiente (anexo) incubando a 37° por 24 hrs. Se inocularon las células en 100 ml de medio SOB (anexo) y se dejaron a 37°C hasta alcanzar una $DO_{600} = 0.6$, posteriormente se centrifugaron las células a 6000 rpm a 4°C y enseguida se lavaron las pastillas con agua Milli Q estéril (fría). Subsecuentemente se resuspendieron en 1 ml de glicerol al 10 % y se almacenaron en alícuotas de 50 μ l, guardándose a -70°C hasta su uso.

Tabla 2. Cepas bacterianas y plásmidos

Cepa	Genotipo	Referencia
------	----------	------------

<i>E. coli</i> TOP10	– <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen.
<i>S. Typhi</i> IMSS 1	Aislado clínico Mexicano <i>S. Typhi</i> 9,12,d,Vi	Puente et al., 1986
<i>S. Typhi</i> IMSS 200	Δ <i>hns::km</i> mutante derivada de la cepa IMSS1	Fernández-Mora, M. 2010.
<i>S. Typhi</i> IMSS 300	Δ <i>lrp::cm</i> mutante derivada de la cepa IMSS1	Fernández-Mora, M. 2010.
<i>S. Typhi</i> IMSS 202	Δ <i>hns::km</i> , Δ <i>lrp::cm</i> mutante derivada de la cepa IMSS1	Fernández-Mora, M. 2010.
<i>relA/spoT</i>	Δ <i>relA::km</i> , Δ <i>spoT::cm</i> mutante derivada de la cepa IMSS1	Sánchez-Popoca, D. 2016.
Plásmido	Características	Referencia
PRS415	Vector transcripcional a <i>lacZ</i> Amp ^r	Simons et al., 1987
<i>pleuO894/lacZ</i>	Derivado del plásmido pMC18(Tc r) contiene la región intergénica completa y 54 aa después del ATG de <i>leuO</i> y 64 nc del gen estructural <i>leuA</i>	Fernández-Mora, M. 2010.

6.3 Transformación y obtención de clonas requeridas

Utilizando las bacterias electrocompetentes IMSS1 WT y sus derivadas Δ *hns::km*, Δ *lrp::cm*, Δ *hns/lrp* y Δ *relA/spoT* y manteniendo en hielo, se agregó el plásmido (PRS415) que contiene nuestro fragmento de interés (pRSP7+3-96), usando el electroporador (Bio-Rad) dando un pulso de 2.5 kV; y en seguida se agregó 800 μ l de SOB (anexo) para su recuperación, incubando 1 hora a 37°C. Posteriormente se platearon 100 μ l de las transformantes en medio TSGB (anexo) que contiene X-Gal (anexo), así como antibióticos específicos para cada cepa.

6.4 Selección de clonas y verificación de las construcciones

Las clonas positivas se seleccionaron por su resistencia a ampicilina (vector) , así como por la resistencia de cada mutante utilizada y por el fenotipo azul (expresión de *lacZ*). Se inocularon 10 ml de TSGB (anexo) con el antibiótico correspondiente, y se dejaron crecer toda la noche a 37°C. Posteriormente se extrajo DNA plasmídico con ayuda del kit Miniprep Plus Kit, siguiendo el protocolo establecido 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 para corroborar que el fragmento estuviera clonado en la dirección correcta utilizando oligos específicos del inserto (5´) y del vector (3´) (Tabla 1), de la misma manera se verificaron las mutación de los distintos fondos genéticos transformados con los oligonucleótidos específicos (Tabla 3).Una vez obtenido el plásmido se mandó a secuenciar (unidad de secuenciación de Ibt UNAM), con el fin de confirmar que los segmentos transformados se habían clonado correctamente, para lo cual se requería de 15 µl de plásmido previamente purificado.

Tabla 3. Secuencia correspondiente a los oligonucleótidos utilizados para la verificación de las cepas mutantes

Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5´->3´)	Características	Referencia
hns5´II	5´- CTT ACA TTC CTG GCT ATT GCA C- 3´	Amplificación para verificar la mutación de <i>hns</i>	Fernández-Mora, M. (2006)
galu3´-II	5´-TTC AGT TGA CCG ATG CTA TCG ATA- 3´	Amplificación para verificar la mutación de <i>hns</i>	Fernández-Mora, M. (2006)
relA- R/BamH1	5´- ACC GGA TCC GAA ATG TAC GTC AAA AAC ATA C-3´	Amplificación para verificar la mutación de <i>relA/spoT</i>	Sánchez-Popoca, D. (2016)
spoT-F/XhoI	5´- ATC CTC GAG GTC CGC GAG CGC CAG G-3´	Amplificación para verificar la mutación de <i>relA/spoT</i>	Sánchez-Popoca, D. (2016)

slrpl-5'	5'-CTT ACT GTG TTT GGT CGT GCC CCC- 3'	Amplificación para verificar la mutación de <i>lrp</i>	Fernández-Mora, M. (2006)
slrplI-3'	5'- TTG CCC CCG GCA CTG TTG CTG- 3'	Amplificación para verificar la mutación de <i>lrp</i>	Fernández-Mora, M. (2006)

6.5 Ensayo de la β -galactosidasa de los diferentes fragmentos clonados en el vector PRS415

Condiciones de crecimiento

Las cepas se estriaron en agar TSGB (anexo) con X- gal (anexo) y el antibiótico correspondiente, y se incubaron por 24 horas a 37°. Una de las colonias fue tomada de la caja, y se inoculó en 5 ml de medio MN incubando por 8 horas hasta su crecimiento. En seguida los 5 ml de cultivo se añadieron como preinóculo en 50 ml de medio MN fresco con antibiótico y se colocaron en agitación a 37°C toda la noche para su crecimiento.

Posteriormente se procedió a poner una fracción del preinoculo en matraces de 50 ml de medio MN iniciando con una lectura de DO=0.05, las bacterias se dejaron crecer en agitación a 37°C; hasta llegar a una DO₅₉₅= 0.6 se tomó una muestra de 1.5 ml en un tubo Eppendorf de 2 ml por duplicado. Estas muestras se centrifugaron a 12,000 rpm 1 min, la pastilla se lavó con 1 ml de amortiguador Z 1x (Ver anexo) y se centrifugó nuevamente, finalmente la pastilla se guardó a -70°C hasta su uso para la cuantificación de proteína y el ensayo de β -galactosidasa.

6.6 Actividad de β -galactosidasa

Para realizar la cuantificación de la β -galactosidasa primero se resuspendió el sedimento en buffer Z 1X, de manera que la concentración de proteína total quedara en un rango de 0.15-0.3 mg/ml y posterior a estos se cuantificó por el método de Lowry en una placa de 96 pozos, se agregaron 20 μ l de muestra, un duplicado y un control de BSA 0.2 mg/ml. Después se añadió 100 μ l de reactivo de Lowry mezclando, se incubó 15 min a temperatura ambiente, y se adicionó 100 μ l de reactivo Folin-Ciocalteu al 16.9%: se mezcló e incubó a temperatura ambiente por 20 minutos. La proteína se cuantificó en un lector de placas tipo "Ceres" (Bio-

Tek), el cual compara la absorbancia obtenida de cada muestra con una curva estándar de BSA (0.2 mg/ml).

Para determinar la actividad de β -galactosidasa, de igual forma se utilizó una placa de 96 pozos a la que se le agregó 20 μ l de muestra incluyendo el duplicado.

Después de esto se agregó una solución de lisis y se incubó por 20 min a 37°C, y se añadió 100 μ l de ONPG para cuantificar la actividad enzimática de la β -galactosidasa.

La lectura de la absorbancia se realizó en un lector de placas "Ceres" a 405 nm por 5 min, la lectura obtenida se comparó con una curva previamente establecida.

Para obtener la actividad específica, se dividió el resultado obtenido de la actividad enzimática y la concentración de proteína en unidades β -Gal U/mg proteína.

6.7. Mutación de la región -10 de los promotores P3 y P7

Para poder medir la actividad de los promotores sin tener el obstáculo de la transcripción del promotor inverso, se realizó la siguiente metodología para mutar su caja -10.

6.7.1 Diseño de oligonucleótidos con mutación en la secuencia consenso -10

Se sintetizó la secuencia intergénica de estudio (99 pb) en la unidad de síntesis de oligonucleótidos del IBT, cada secuencia se diseñó con una sustitución de bases en la secuencia de la caja -10 de los promotores P3 y P7 en ambas cadenas, mostrado en letras color rojo la secuencia de cambio (Tabla 4).

6.7.2 Hibridación de oligonucleótidos

Para la obtención del fragmento que contiene la región que incluye el promotor P3 en extremo 3' y el promotor P7 en el extremo 5' con y sin las mutaciones requeridas, se realizó una hibridación de oligonucleótidos

Posteriormente al tener los oligonucleótidos se prosiguió a la hibridación de estos. Se utilizaron fragmentos de DNA sintetizados artificialmente con las características que se presentan en la tabla 3.

La hibridación se lleva a cabo en un volumen de 20 μ l, colocando una relación equimolar de 3 μ g para ambos oligonucleótidos. Para llevar a cabo la reacción se realizó usando un amortiguador específico "buffer O" Thermo Scientific. Posterior

a esto la reacción se calentó a 87°C durante 3 minutos y enseguida se incubó a la T_m calculada para cada oligonucleótido durante 15 minutos. Posteriormente los oligonucleótidos se incubaron a 55°C por 15 minutos y enseguida se colocaron en hielo para su posterior utilización.

Una vez obtenida la hibridación de los juegos de oligonucleótidos, se prosiguió a realizar la clonación en el vector pRS415 siguiendo el protocolo de la sección de metodología 1.3 y 1.4

6.8 Análisis de RT-PCR para determinar la longitud de P7

Las cepas se estriaron en agar TSGB (anexo) con X-gal (anexo) y el antibiótico correspondiente, y se incubaron por 24 horas a 37°. Una de las colonias fue tomada de la caja, y se inoculó en 5 ml de medio MN incubando por 8 horas hasta su crecimiento. Posteriormente los 5 ml de cultivo se añadieron como pre inóculo en 50 ml de medio MN fresco con antibiótico y se colocaron en agitación a 37°C. Se tomó 1 mL de cada pre inóculo y se creció en un medio líquido MN hasta alcanzar una DO=0.6, posteriormente se colectaron 20 ml de medio en tubos Falcon y se centrifugó a 6000 rpm por 20 min a 4°C; pasado el tiempo se desechó el sobrenadante y las células se lavaron con agua/DEPC centrifugando nuevamente 6000 rpm por 20 min a 4°C y posterior a esto se guardaron a -70°C. A partir de pastillas celulares se procedió a la purificación del RNA total. En primer lugar, la pastilla se resuspendió en 400 µl de solución A (anexo) y 400 µl de fenol ácido y posteriormente se incubó 60 min a 65° (se vortexeo ocasionalmente). Después, se incubó 5 min en hielo y se centrifugó 5 min a 4°C (la extracción con fenol ácido se repitió dos veces). La parte acuosa se pasó a un tubo de 2 ml y se agregó 400 µl de cloroformo, se resuspendió vigorosamente, y en seguida se centrifugó 5 min a 4°C y el sobrenadante se pasó a tubos limpios. Se agregó 100 µl de NaOAC 3M y 2 volúmenes de etanol al 100%, se incubó 1 h en hielo y después se centrifugó 15 min; se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol frío al 70% y el sedimento se resuspendió en 50 µl de agua libre de RNAsa.

Una vez obtenido el RNA total se determinó la concentración en el equipo “nanodrop”, para verificar la integridad de la muestra se analizó 1 µg de cada extracción en un gel de agarosa al 1.5 %.

Una vez obtenido el RNA (purificado por el método de fenol ácido), se trataron 10 µg con 2 U de DNasa I (Thermo Scientific), para eliminar el DNA genómico. Finalmente, la DNase I se inactivó por calor.

Tabla. 4 Oligonucleótidos utilizados para el análisis de RT-PCR

Nombre del oligonucleótido	Características	Tm
leuABCIIter 5´	Oligonucleótido para sintetizar cDNA, excluyendo secuencia del terminador	62°C
leuABC5´	Oligonucleótido para sintetizar cDNA contiene secuencia del terminador	60°C
leuABC3´	Oligonucleótido para sintetizar cDNA incluye secuencia del gen estructural de <i>leuA</i>	60 °C
leuOf4-3´	Oligonucleótido utilizado para amplificar corriente arriba del +1 de P7	58°C

Se usó un 1 µg de RNA para la síntesis del cDNA con oligonucleótidos reversos específicos (Tabla. 4) siguiendo el protocolo establecido en el kit RevertAid H Minus Firrt (Thermo Scientific).

Finalmente, para la reacción de PCR se utilizó 1µl de cDNA como molde, así como oligonucleótidos específicos y los productos fueron analizados en un gel de agarosa desde 1.5% al 2%.

7. Resultados

7.1 Actividad promotora de P3 y P7 en los fondos WT, $\Delta hns::km$, $\Delta lrp::cm$, $\Delta hns/lrp$ y $\Delta relA/spoT$.

Para poder determinar la actividad promotora de P3 y P7, individualmente, e identificar si éstos se encuentran bajo el control de reguladores globales antes reportados para este gen, se realizaron fusiones transcripcionales direccionadas al

reportero *lacZ*, y se midió su actividad β -galactosidasa en los fondos WT, $\Delta hns::km$, $\Delta lrp::cm$, $\Delta hns/lrp$ y $\Delta relA/spoT$ (Fig. 9 y 10).

Los resultados que se obtuvieron a partir de la fusión “pRSleuOP3 -90 +8” P3” la cual contiene el promotor P3 fusionado a *lacZ* se muestran en la Figura 9. No se observó cambio significativo en la actividad transcripcional de esta fusión cuando comparamos los fondos genéticos mutantes $\Delta hns::km$, $\Delta lrp::cm$, y $\Delta hns/lrp$, y el fondo genético silvestre. Esto sugiere que la región regulatoria analizada no es sujeta a regulación negativa por H-NS y Lrp. Por otro lado se observó que la ausencia de RelA y SpoT ($\Delta relA/spoT$) resulta en un incremento en la actividad al doble, de esta fusión transcripcional, comparado con la cepa silvestre “WT”. Esto sugiere que la actividad transcripcional de esta región está regulada negativamente por los niveles de ppGpp, confirmando el resultado de nuestro antecedente (Fig. 9).

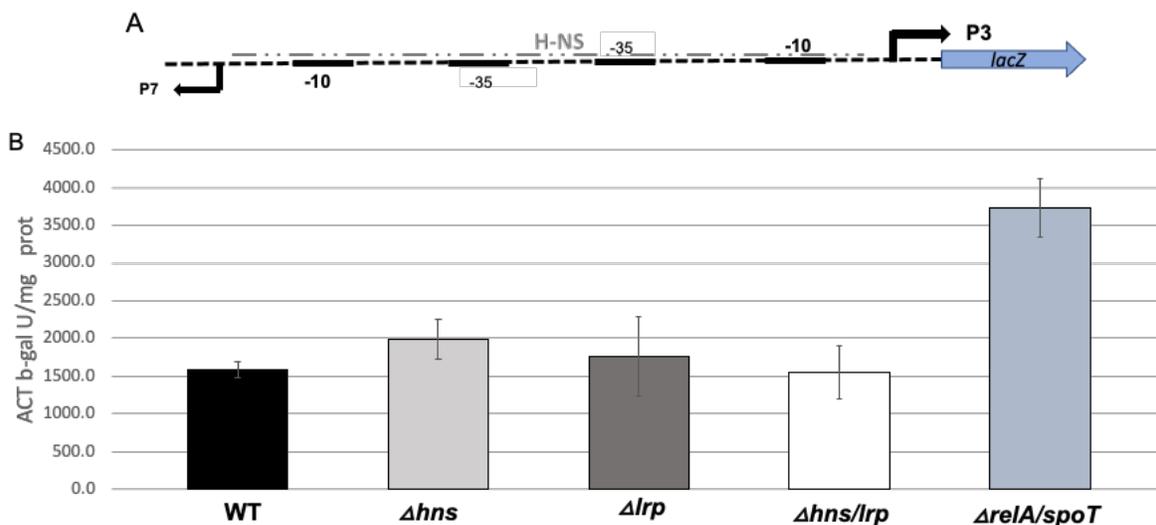


Fig. 9 A) Esquema de la región de estudio (99 pb) que contiene el promotor P3 fusionado a *lacZ* y el promotor antisentido P7 “pRSleuOP3 -90 +8”. B) Actividad β -galactosidasa de la fusión pRSleuOP3 -90 +8 (P3-*lacZ*) en los fondos genéticos mutantes $\Delta hns::km$, $\Delta lrp::cm$, $\Delta hns/lrp$ y $\Delta relA/spoT$ en medio MN a DO=0.6.

De la misma manera, al medir la fusión que contiene el promotor P7 fusionado a *lacZ* “pRSleuOP7+3 -96” (Fig. 10 panel A) no se obtuvo un efecto significativo sobre su actividad en los fondos mutantes $\Delta hns::km$, $\Delta lrp::cm$ y doble $\Delta hns/lrp$ (Fig. 10). En otras palabras, H-NS y Lrp no reprimen la actividad transcripcional de esta región. Por otro lado, la actividad que presenta la fusión “pRSleuOP7+3 -96”

en el fondo $\Delta relA/spoT$ aumenta al doble al compararla con el fondo WT. Es decir, ppGpp tiene un efecto negativo sobre la actividad del P7.

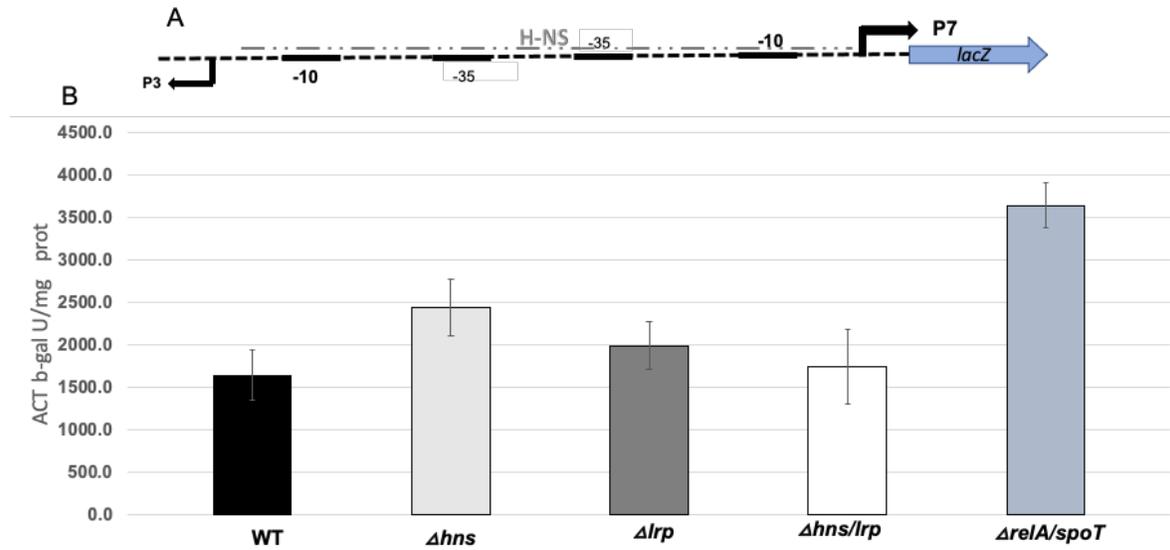


Fig. 10 A) Esquema de la región de estudio (99 pb) que contiene el promotor P7 fusionado a *lacZ* y el promotor antisentido P3 “pRSleuOP7+3 -96”. B) Actividad β -galactosidasa de la fusión “pRSleuOP7+3 -96” (P7-*lacZ*) en los fondos genéticos mutantes $\Delta hns::km$, $\Delta lrp::cm$, $\Delta hns/lrp$ y $\Delta relA/spoT$ en medio MN a DO=0.6.

7.2 Efecto de la mutación promotora P7 antisentido sobre la actividad del promotor sentido P3 en dirección a *lacZ*

Para saber si la actividad promotora de P3 se veía influenciada por la actividad transcripcional de el promotor antisentido P7, se realizó una fusión transcripcional la cual contiene mutaciones en la secuencia consenso de la caja -10 del promotor P7 “pRSleuOP7 +3 -96 MUT” (Fig. 11 panel A). Para determinar si estas mutaciones en la caja -10 eliminan la actividad del promotor P7, se generó una fusión transcripcional de esta variante del P7 (P7mut) con el gen reportero *lacZ* y se midió la actividad β -galactosidasa. La actividad del P7mut fue 0.7 veces la del promotor P7, lo cual indica que las mutaciones introducidas no afectan severamente la actividad del promotor (Fig .11). Es posible que el promotor P7 cuente con secuencias promotoras críticas que permitan el reconocimiento por la RNAP.

A continuación se analizó si las mutaciones introducidas en P7 tenían un efecto sobre la actividad del promotor P3. Para ello se generó la fusión transcripcional “pRSleuOP3 -90 +8/P7Mut” con el gen reporter *lacZ* (Fig 12 panel A).

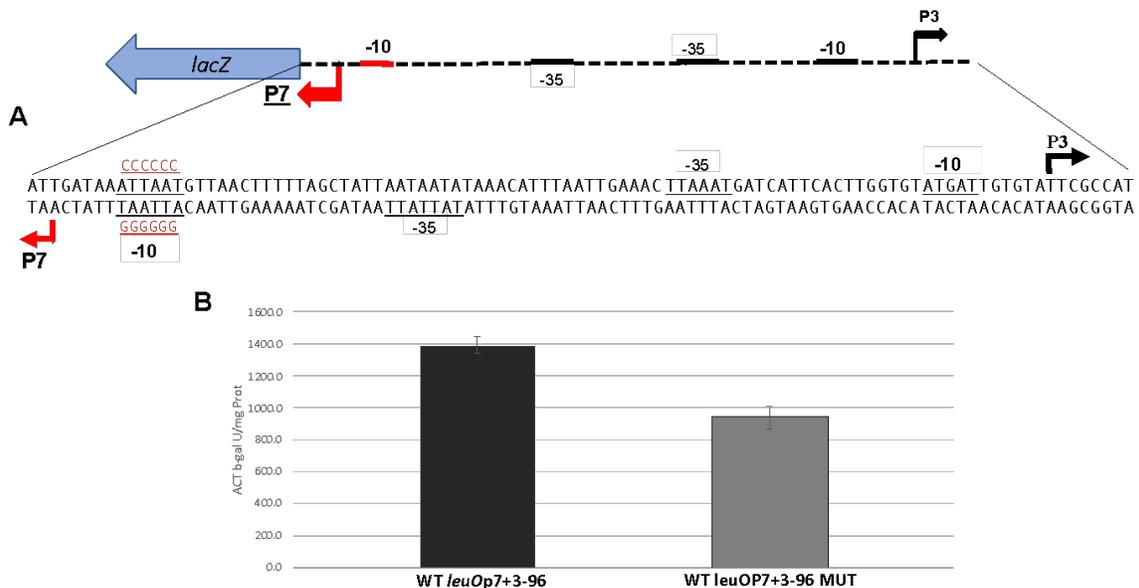


Fig.11 A) Esquema de la región de estudio (99 pb) que contiene una sustitución de bases por guaninas representada en color rojo en la secuencia -10 del promotor P7 fusionado a *lacZ* “pRSleuOP7+3 -96 MUT”. B) Actividad β-galactosidasa de la fusión “pRSleuOP7+3 -96 MUT” (P7MUT-*lacZ*) en un fondo WT.

Los resultados no mostraron diferencias significativas en la actividad transcripcional de las fusiones “pRSleuOP3 -90 +8” y “pRSleuOP3 -90 +8/P7Mut” en el fondo genético WT. Además, la actividad de ambas fusiones se indujo a los mismos niveles en ausencia de RelA y SpoT (Fig. 12).

Dado que la actividad del promotor P7mut se afectó de manera muy modesta en comparación con la actividad del promotor P7, no podemos hacer conclusiones contundentes sobre el papel de la actividad de este promotor sobre la actividad del promotor P3 y su respuesta a la alarmona ppGpp.

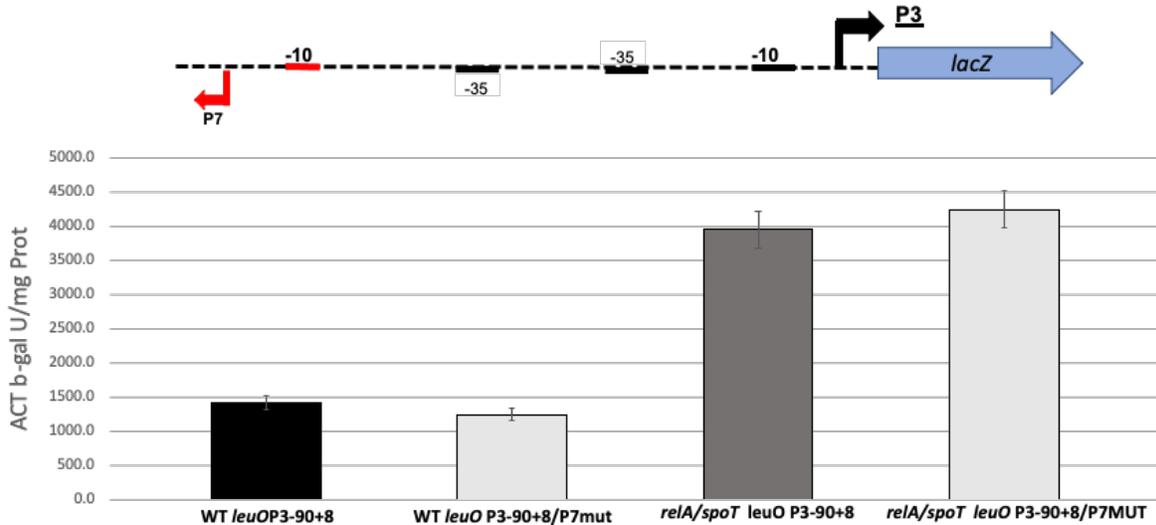


Fig. 12 Actividad β -galactosidasa del promotor P3-fusionado a *lacZ* “pRS*leuOP3-90+8*” y la fusión “pRS*leuOP3-90+8/P7Mut*” que contiene el promotor P3 fusionado a *lacZ* y la mutación de la secuencia -10 del promotor divergente P7 las cuales fueron medidas en el fondo WT y Δ *relA/spoT* en medio MN a DO=0.6.

7.3 Efecto de la mutación promotora P3 antisentido sobre la actividad del promotor sentido P7 en dirección a *lacZ*

Usando la misma estrategia, también se probó si el promotor P3 interfiere con la expresión del promotor P7, por lo que se realizó una sustitución en la secuencia consenso -10 del promotor P3 “pRS*leuOP3-90+8 Mut*” y se fusionó a *lacZ*. La actividad β -galactosidasa se abatió por completo (Fig.13), mostrando que la sustitución de la región -10 abate por completo la actividad del promotor P3.

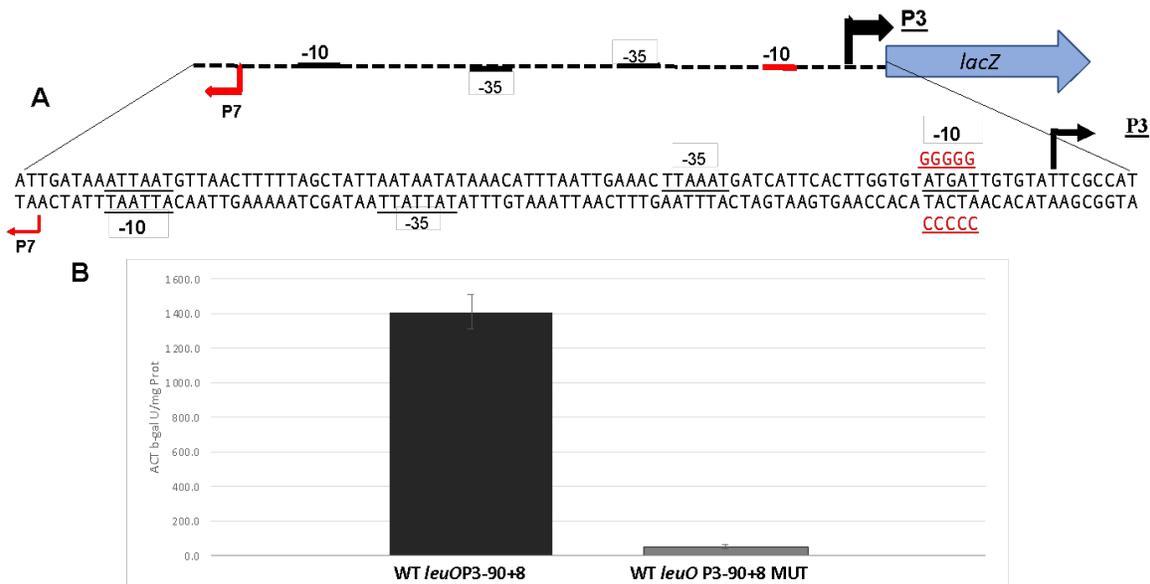


Fig.13 A) Esquema de la región de estudio (99 pb) que contiene una sustitución de bases por guaninas representada en color rojo en la secuencia -10 del promotor P3 fusionado a *lacZ* “pRSleuOP3 -90 +8 MUT”. B) Actividad β-galactosidasa de la fusión “pRSleuOP3 -9 +8” y “pRSleuOP3 -90 +8 MUT”. (P3 MUT-*lacZ*) en un fondo WT.

Para analizar el efecto de la inactivación del promotor P3 sobre la actividad del promotor P7, se introdujo la secuencia mutada P3mut en la fusión transcripcional “pRSleuOP7 +3 -96/P3Mut” (Fig. 14 panel A).

La actividad de la fusión “pRSleuOP7 +3 -96/P3Mut” aumentó 1.3 veces en comparación con la actividad de la fusión “pRSleuOP7 +3 -96” (proporción de actividad de P7-P3mut/P7-P3) (Fig. 14 panel B). Esto podría sugerir que la RNAP puede transcribir de una manera más eficiente cuando se elimina el promotor divergente. Por otro lado, la actividad de ambas fusiones transcripcionales se indujo con la misma magnitud en ausencia de RelA y SpoT. Esto sugiere que el liger aumento en la actividad transcripcional de la fusión “pRSleuOP7 +3 -96/P3Mut” no afecta la sensibilidad a los niveles de ppGpp (Fig.14 panel B). Una vez obtenidos los resultados de la actividad de P7 y sabiendo que se encuentra divergente a *leuO*, nos preguntamos si P7 estaba implicado en la regulación del operón *leuABC*.

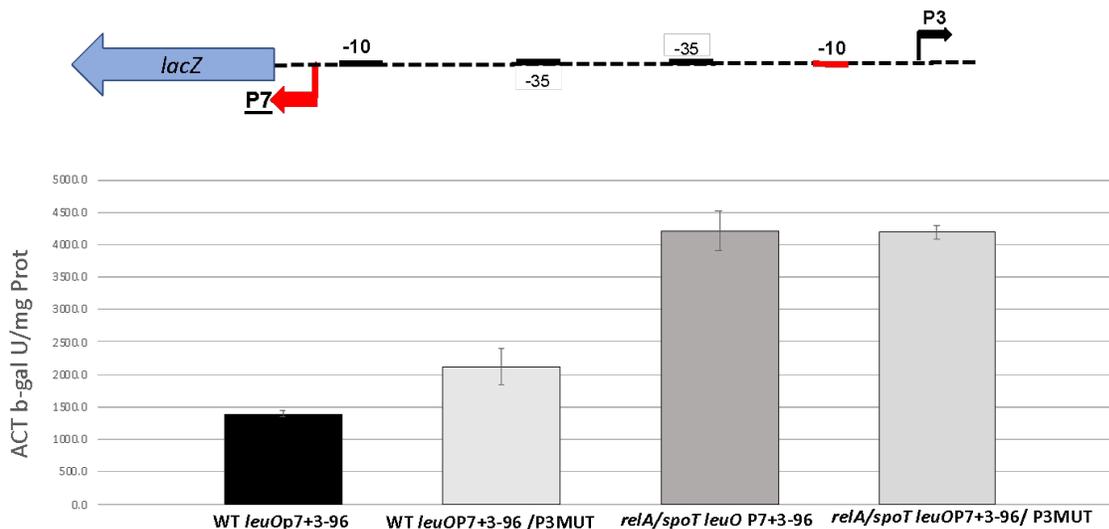


Fig.14 Actividad β-galactosidasa del promotor P7-fusionado a *lacZ* “pRSleuOP7 +3 -96” y la fusión “pRSleuOP7 +3 -96/P3Mut” que contiene el promotor P7 fusionado a *lacZ* y la mutación del promotor divergente P3(mostrado en la gráfica anterior), las cuales fueron medidas en el fondo WT y Δ*relA/spoT* en medio MN a DO=0.6.

7.4 Análisis bioinformático del terminador de P7

Para poder determinar in-silico la longitud del transcrito generado por el promotor P7, del cual se conoce el inicio de la transcripción (Fernández-Mora, et al, 2021), se realizó un análisis informático para determinar el terminador de la transcripción. Para ello sometimos la secuencia de nucleótidos al programa WEB SERVER I2BC RNA Sequence Structure and Function, y como resultado dio un posible terminador intrínseco (Fig. 15 panel A), prediciendo su estructura secundaria, la cual forma un posible terminador tallo-asa (Fig. 15 panel B).

Una vez obtenida la posible región de término para el transcrito de P7, se analizó la secuencia, la cual comienza del +1 de P7 y abarca el terminador predicho dando una longitud de 427 nt (Fig 15 panel C). ~~En esta región se encuentran la secuencia antes reportada para *p_{leuL}* (Gemmill, et al, 1979) la cual forma un péptido líder que tiene función como un atenuador para *leuABC* ya que la tasa de síntesis de mRNA de *leuL* fue mayor para las células cultivadas con leucina limitada en comparación con el exceso de leucina sitio.~~ El transcrito predicho proveniente de P7 se sobrelapa con la región correspondiente al atenuador de la transcripción de *leuABC*. Estos datos mostraron que ambos transcritos comparten una región de término, sin embargo las estructuras que se generaban a partir de sus inicios podrían ayudarnos a saber si eran termodinámicamente estables con base al apareamiento de sus nucleótidos.



Fig. 15 A) Predicción del terminador intrínseco representado en letras color azul del transcrito de P7 en el programa RNA Sequence Structure and Function con una ΔG° -13.5. B) Estructura secundaria formando un terminador tipo tallo-asa. C) Secuencia completa del transcrito de P7 la flecha color rojo representa el inicio de la transcripción abarcando el terminador (secuencia azul) .La flecha color negro representa el inicio de *pleuL*.

7.5 Estructuramiento de los transcritos P7 y *pleuL*

Las estructuras secundarias que se forman a partir de P7 y *pleuL* fueron predichas por el programa RNAfold WebServer (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>), el cual toma en cuenta elementos sobre la termodinámica de la molécula, tales como la probabilidad de apareamiento entre sus nucleótidos. Para esto el programa asigna un valor a la dinámica de la molécula en una escala de 0 a 1 de color azul a rojo respectivamente, siendo rojo el más alto obtenido para la probabilidad de apareamiento siendo opuesta la probabilidad para el color azul (Rodríguez-Mejía, et al.2017).

Para saber el estructuramiento P7, tomamos la secuencia que contiene desde -50, que incluye la región promotora -35 y -10 hasta el terminador abarcando -513 pb. El estructuramiento mostró una ΔG° -109.12 kcal/mol el cual termodinámicamente es favorable, sin embargo el apareamiento de bases mostró tener valores cercanos al 0 es decir, la mayoría del estructuramiento presentó una

tendencia a los colores azules, es decir es una estructura probablemente menos estable. A pesar de los valores que mostraba el estructuramiento, se observa una serie de estructuras tallo-asa desde la región -10 abarcando hasta -255, antes de la región promotora de *pleuL*, las cuales podrían estar interfiriendo con el paso o beneficiar el pausado por la RNAP . Por otra parte la estructura del terminador predicho muestra una tendencia con valor a 1 mostrando un color rojo, lo que indica que este apareamiento es estable favoreciendo el paro de la transcripción de P7 (Fig 16).

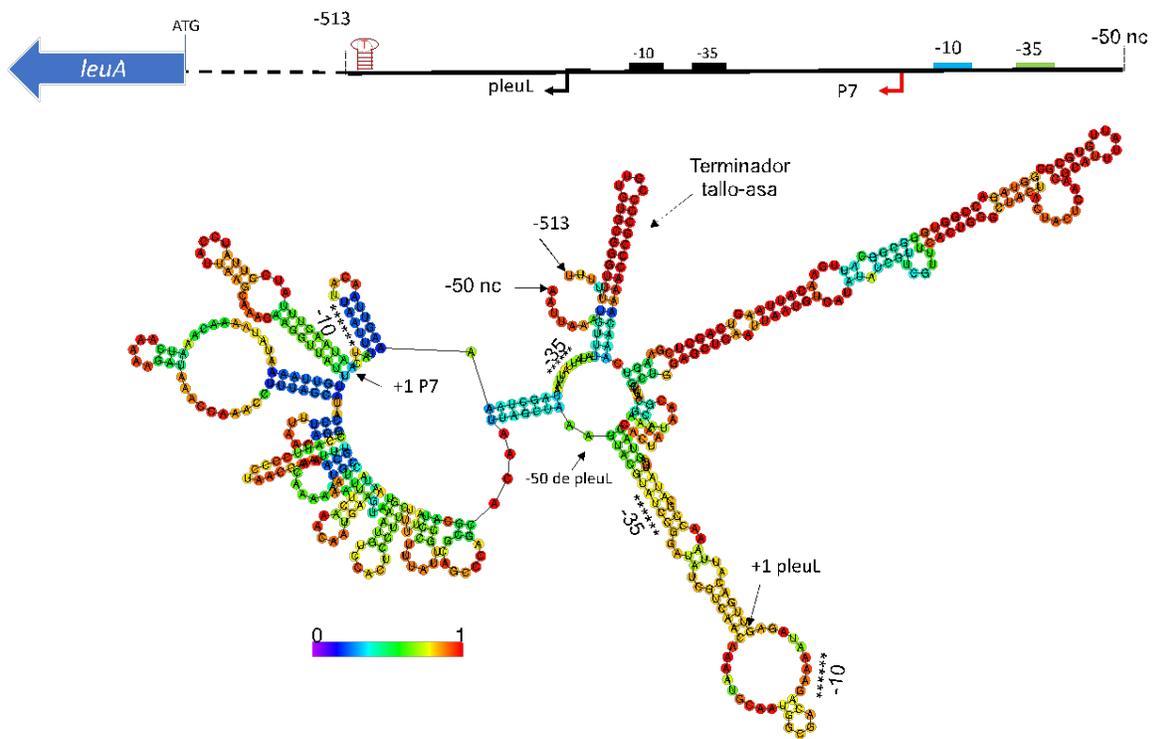


Fig.16 Estructura secundaria del transcrito de P7 (463 nt) presentando una energía libre del conjunto termodinámico ΔG° -109.12 kcal/mol, mostrando con líneas punteadas la región -10 y -35, con flechas el inicio de la transcripción (+1 P7) así como el terminador tallo-asa abarcando -513 nt.

La estructura secundaria que se generó de *pleuL* a partir de la secuencia -50 que incluye la región promotora -35 y -10 así como su secuencia de término abarcando -208 nt presentó un valor de ΔG° -64.64, indicando que este estructuramiento es termodinámicamente favorecido, mostrando que el apareamiento de bases es

benéfico con valores cercanos a 1 (rojo). El estructuramiento del transcrito muestra tener flexibilidad ya que da paso al terminador rho-independiente sin generar más horquillas internas que pudieran interferir con su transcripción por parte de la RNAP lo que podría asumirse que se genera un mRNA que da paso a la traducción (Fig. 17).

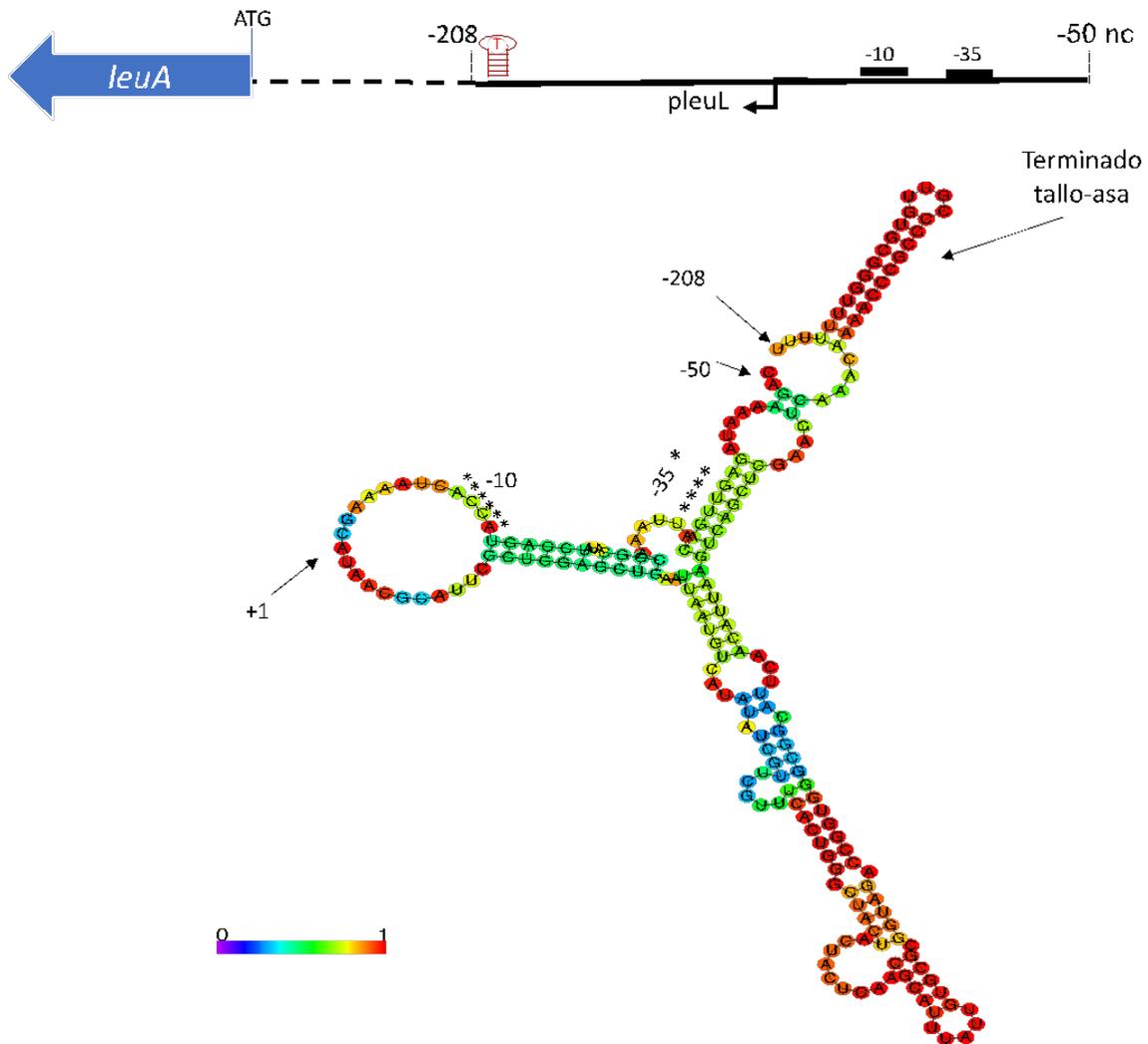


Fig.17 Estructura secundaria del transcrito de *pleuL* (165 nt), la región abarca después del nt -50 presentando una energía libre del conjunto termodinámico de **-64.64 kcal/mol**, mostrando con flechas el inicio de la transcripción (+1 *pleuL*) así como el terminador tallo-asa abarcando 208 nt.

7. 6 Determinación del término del transcrito de P7

Para poder comprobar los datos bioinformáticos, se llevaron a cabo experimentos de RT-PCR, utilizando la fusión pRS*leuO894* que es una fusión completa de la

región intergénica de *leuO* (Fig.18 panel A). Dado que la expresión de *leuO* se induce en ausencia de H-NS, Lrp y la alarmona ppGpp, el RNA se obtuvo, además del cepa WT, de cepas con mutaciones nulas en *hns*, *lrp*, *relA* y *spoT* (WT, $\Delta hns::km$, $\Delta lrp::cm$, $\Delta hns/lrp$ y $\Delta relA/spoT$) durante la fase exponencial de crecimiento (DO595 =0.6). El DNA copia (cDNA) se obtuvo con oligos específicos localizados río arriba o río debajo de la región terminadora predicha con métodos bioinformáticos (Tabla. 4). Para determinar cuales de estos oligos habían sido capaces de generar cDNA correspondiente al transcrito proveniente de P7, hizimos una PCR con el oligo directo *leuOf4-3'* que hibrida por debajo del inicio de la transcripción del P7. El único cDNA que pudo ser amplificado con *leuOf4-3'* fue el generado por el oligo *leuABCIIter* (Fig. 19, 20, 21). Este oligo hibrida río arriba del terminador predicho, mientras que el resto de los oligos (*leuABC5'* y *leuABC3'*) hibridan río abajo del terminador. Estos resultados proporcionan soporte experimental a la predicción de la secuencia del transcrito proveniente del promotor P7.

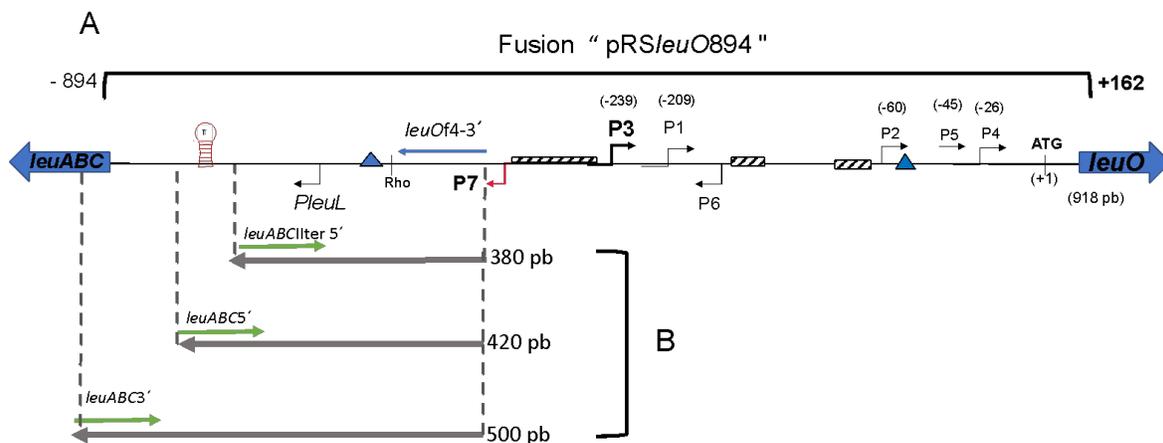


Fig. 18 Estrategia experimental para el análisis de RT-PCR A) Fusión pRS/*leuO894*, incluye la región reguladora de *leuO* completa. B). Esquema de la localización de oligonucleótidos utilizados para visualizar el transcrito de P7. Las flechas verdes representan los oligonucleótidos ubicados en la región 3' usados para sintetizar el cDNA. La flecha azul representa el oligonucleótido ubicado en el 5' corriente arriba del +1 de P7 con el que se amplifican las regiones presentadas en el panel B.

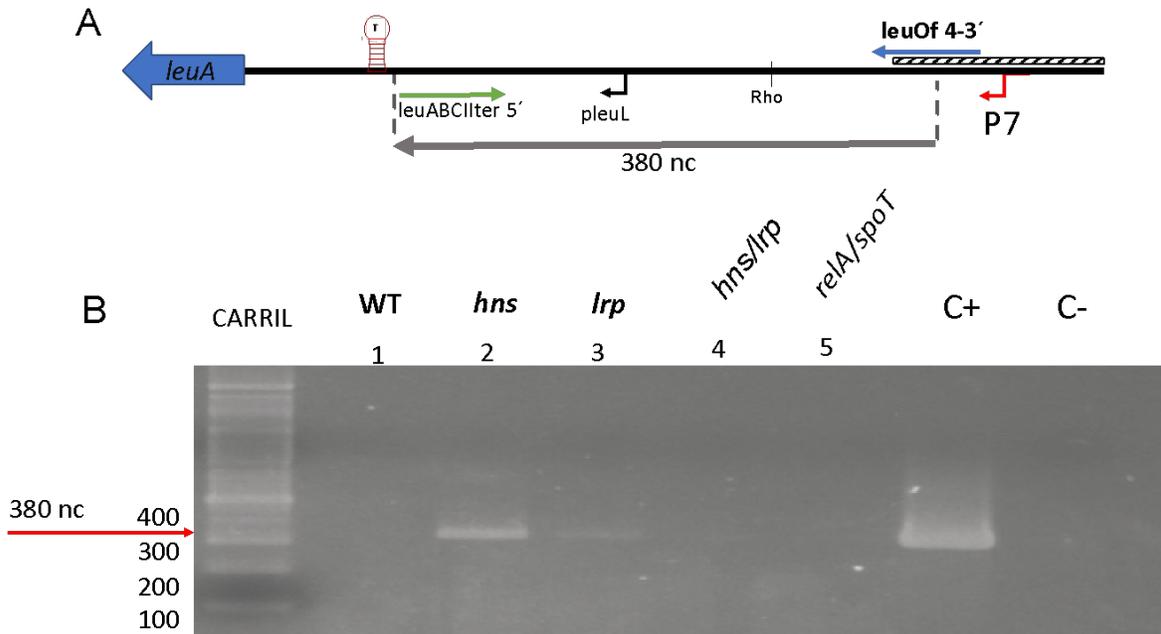


Fig. 19 RT-PCR para amplificar el transcrito de P7. A) La plantilla de RNA fue obtenido de la fusión pRS*leuO894* en un medio rico a DO=.6 y usando los oligonucleótido *leuABC*ter5' para sintetizar el cDNA (flecha verde) y el oligo *leuOf 4-3'* (flecha azul) utilizado para amplificar la región de 380 nc que incluye el +1 de P7 y secuencia corriente arriba del terminador (excluyendo). B) Amplificación del fragmento generado antes del posible terminador intrínseco, en el carril 1 se observa en un fondo WT, carril 2 la mutante $\Delta hns::km$, carril 3 $\Delta lrp::cm$, carril 4 $\Delta hns/lrp$ y carril 5 $\Delta relA/spoT$, como control positivo se usó como templado DNA genómico de la fusión pRS*leuO894* y como control negativo se utilizó la reacción de cDNA sin templado.

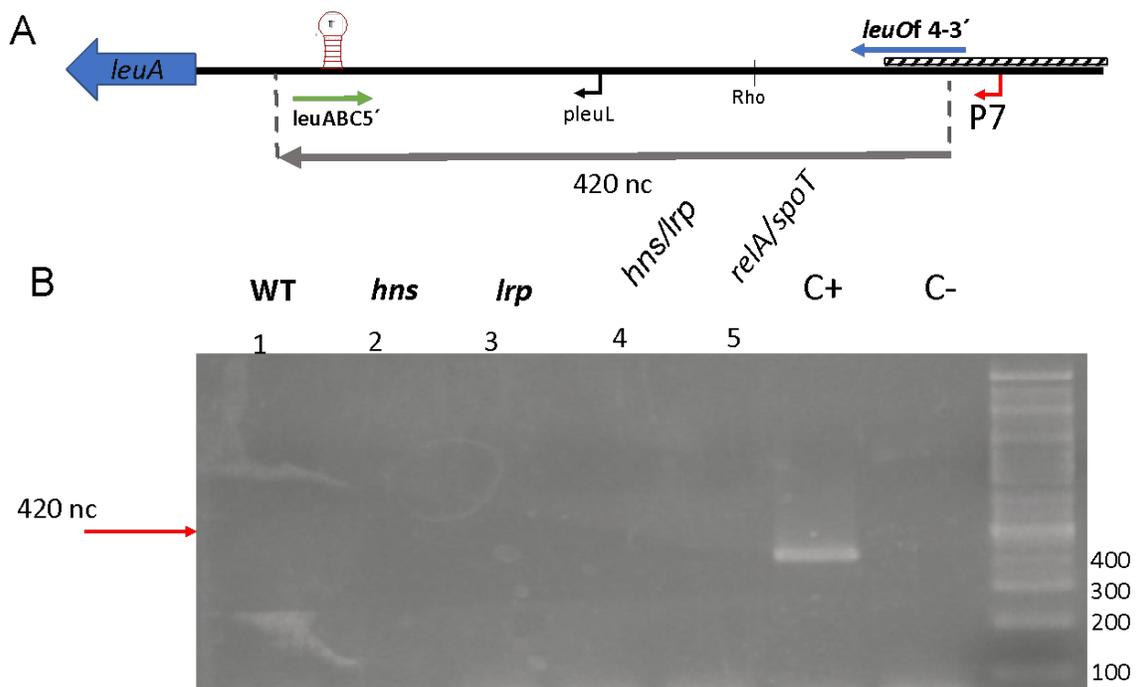


Fig. 20 RT-PCR para amplificar el transcrito de P7. A) La plantilla de RNA fue obtenido de la fusión pRSleuO894 en un medio rico a DO=.6 y usando los oligonucleótido leuABC5' para sintetizar el cDNA (flecha verde) y el oligo leuOf 4-3 (flecha azul) utilizado para amplificar la región de 420 nc que incluye el +1 de P7 y secuencia corriente abajo del terminador. B) Amplificación del fragmento generado después del posible terminador intrínseco, en el carril 1 se observa en un fondo WT, carril 2 la mutante $\Delta hns::km$, carril 3 $\Delta lrp::cm$, carril 4 $\Delta hns/lrp$ y carril 5 $\Delta relA/spoT$, como control positivo se usó como templado DNA genómico de la fusión pRSleuO894 y como control negativo se utilizó la reacción de cDNA sin templado.

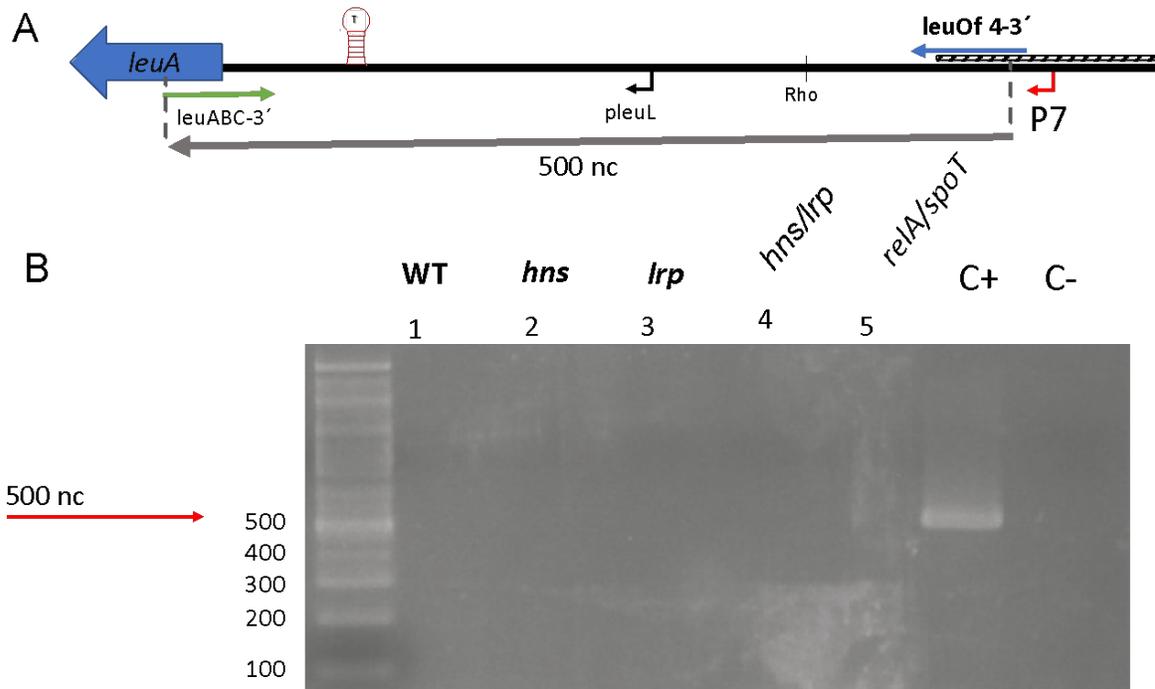


Fig. 21 RT-PCR para amplificar el transcrito de P7. A) La plantilla de RNA fue obtenida de la fusión pRSleuO894 en un medio rico a DO=.6, usando el oligonucleótido leuABC3' para sintetizar el cDNA (flecha verde) y el oligo leuOf 4-3 (flecha azul) utilizado para amplificar la región de 420 nc que incluye el +1 de P7 y secuencia que incluye la región codificante de *leuA*. B) Amplificación del fragmento generado después del posible terminador intrínseco, en el carril 1 se observa en un fondo WT, carril 2 la mutante $\Delta hns::km$, carril 3 $\Delta lrp::cm$, carril 4 $\Delta hns/lrp$ y carril 5 $\Delta relA/spoT$, como control positivo se usó como templado DNA genómico de la fusión pRSleuO894 y como control negativo se utilizó la reacción de cDNA sin templado.

7.7 Efecto de la leucina sobre el promotor P7

Con los datos del RT-PCR y en el análisis de su secuencia encontramos que el transcrito de P7 abarca el promotor "*pleuL*". Para conocer si el promotor P7 pudiera estar implicado en la regulación del operón *leuABC* encargado de la biosíntesis de leucina, se utilizaron fusiones transcripcionales con el gen reportero *lacZ* y se realizaron experimentos de medición de la actividad de la β -

galactosidasa. La expresión de este operón se analizó en ausencia y presencia de leucina, ya que se ha reportado que el promotor *pleuL* se inhibe en presencia de este aminoácido (Gemmill, et al., 1979).

Una fusión transcripcional que incluye al promotor *pleuL* pero carece del promotor P7 mostró una actividad transcripcional mayor en ausencia de leucina que en presencia de leucina (Fig 22 panel A).

Por otro lado dos fusiones transcripcionales de distinto tamaño que abarcan al promotor P7 pero no al promotor *pleuL*, no cambiaron su actividad transcripcional en respuesta a la presencia de leucina (Figura 23). Esto sugiere que la actividad de este promotor no es regulada por leucina.

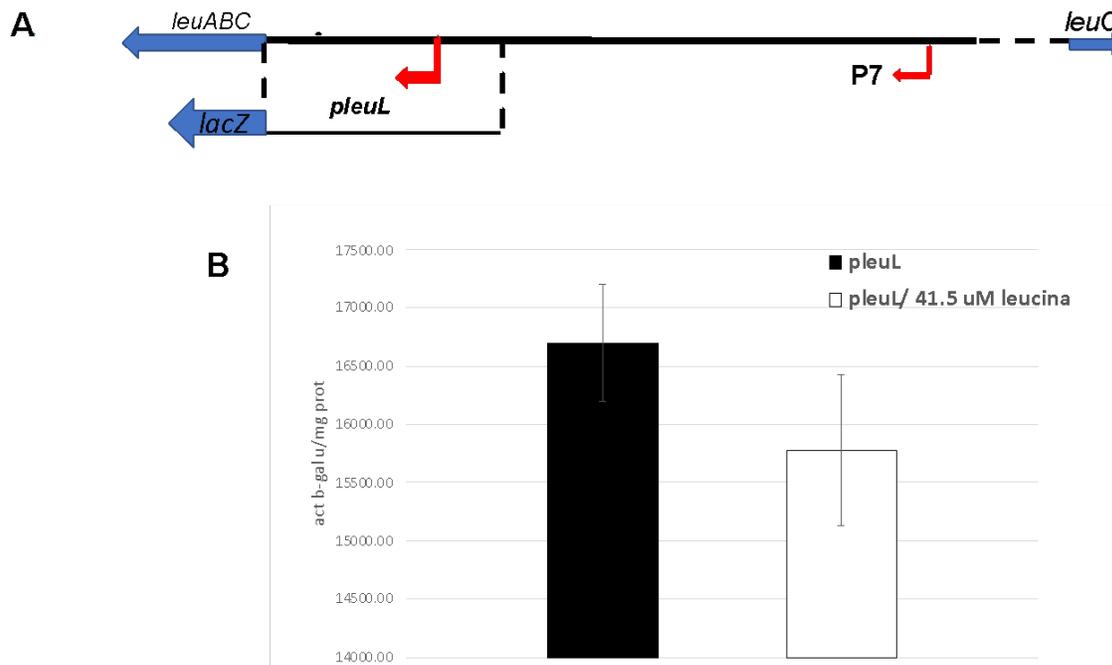


Fig.22 Actividad de *pleuL* en *S. Typhi* en presencia y ausencia de leucina. A) Fusión transcripcional de 230 pb que abarca -40 pb a +190 pb de la secuencia de *pleuL* fusionada a *lacZ*. B) Actividad b-galactosidasa de la fusión *pleuL* en medio M9 sin leucina (barra negra) y con 41.5 μ M de leucina en el medio (barra blanca) a $DO_{595}=0.6$.

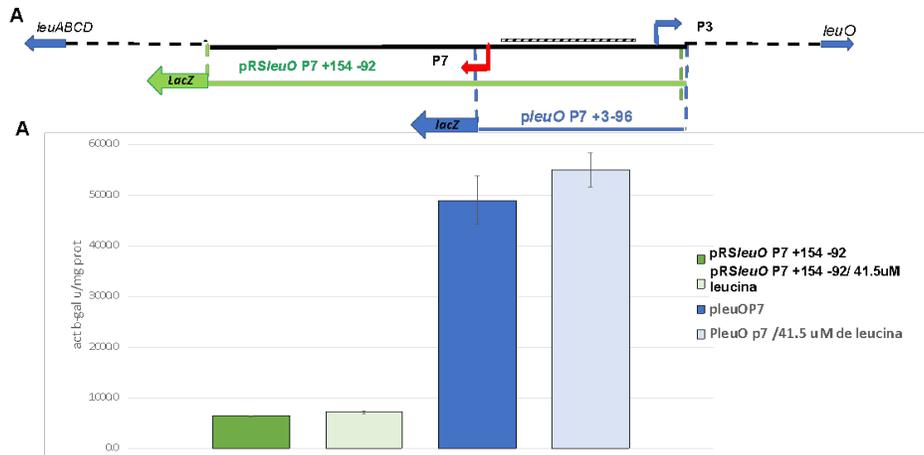


Fig. 23 Actividad de P7 en *S. Typhi* en presencia y ausencia de leucina A) Fusión transcripcional de P7 larga (250 pb) “pRSleuO P7 +154-92” fusionada a *lacZ* (líneas color verde) y la fusión transcripcional de P7 corta analizada en este estudio (99 pb) “pRSleuO p7+3-96” fusionada a *lacZ* B) Actividad b-galactosidasa de la fusión “pRSleuO P7 +154-92” en medio M9 sin leucina (barra verde oscuro) y con 41.5 uM de leucina en el medio (barra verde claro) y la fusión “pRSleuO p7+3-96” en medio M9 sin leucina (barra azul oscuro) y con 41.5 uM de leucina en el medio (barra azul claro) a $DO_{595}=0.6$.

De igual manera se midió la actividad de las fusiones “pRSleuO P7 +154-92” y “pRSleuO p7+3-96” que contienen el promotor P7 (Fig 23 panel A) y de esta forma saber si la expresión de este promotor sigue la tendencia de actividad que la de *pleuL*. Los resultados indican que P7 no parece tener un afecto al agregar leucina al medio (Fig.23 panel B) en ninguna de las dos fusiones. Esto nos sugiere que el promotor P7 podría no estar implicado de manera directa con la regulación de la biosíntesis de leucina, en estas condiciones y con esta región.

8.Discusión

Los datos obtenidos en el presente trabajo muestran que las fusiones de P3 y P7 son de gran importancia, ya que en esta región se pudieron observar algunos mecanismos por los cuales pudiera darse la regulación transcripcional de *leuO*, desde el funcionamiento que puede ejercer H-NS y ppGpp para su correcta expresión, hasta los posibles obstáculos que puede atravesar la RNAP para expresar a este gen en la condición precisa. Debido a lo anterior, estos resultados generan un entendimiento puntual sobre la complejidad de la regulación de *leuO* de *S. Typhi*.

8.1 Regulación mediada por H-NS

Las construcciones que contienen al promotor P7 y P3 en un región corta de DNA mostraron que no podían ser reprimidos por la proteína H-NS (Fig. 9 y 10), por el contrario a los resultados de RT-PCR en donde se puede apreciar que al utilizar como templado una fusión completa de la región reguladora, la expresión de P7 es visible en ausencia de H-NS, es decir, H-NS reprime a este promotor (Fig. 19 carril 2). Lo anterior podría deberse al hecho de que se han eliminado secuencias de reconocimiento para la unión de HNS, lo que implica la eliminación de secuencias promotoras que ya no son necesarias silenciar, por lo que en regiones cortas del DNA la participación de esta proteína no es requerida ya para el control de la expresión de *leuO*.

La evidencia de estudios previos sustenta esta idea, ya que este efecto se ha observado en el operón *ehxCABD* en *E. coli*, en donde H-NS forma complejos con el DNA ocupando regiones largas, debido a que silencia la expresión de sus múltiples promotores, de esta forma no afecta la transcripción del promotor canónico del operón, por el contrario este efecto ya no es visible en regiones cortas de DNA (Singh, et al,2014).

Un dato importante a mencionar es que la región analizada en este estudio (99 pb) cuenta con una secuencia de 72 pb homóloga a la de *Salmonella* Typhimurium, la cual es rica en A-T que es capaz de silenciar al gen *leuO*, ya que funciona como sitio de nucleación para reclutar a la proteína H-NS y formar un filamento de nucleoproteína-DNA (Chen et al,2005). En nuestros resultados no observamos este efecto represor: esto podría deberse a que a pesar de contener una secuencia de reconocimiento para la unión al DNA por parte de H-NS, ésta ya no puede unirse debido a la eliminación de nucleótidos que tiene como resultado el cambio estructural del DNA: es decir no tiene la misma topología que en una región larga de DNA y por tanto tampoco tiene la misma afinidad de unión. Se ha propuesto que las regiones ricas en A-T pueden generar una curvatura en el DNA y H-NS puede reprimir preferencialmente genes que contienen estas curvaturas y si la remodelación en la topología cambia, H-NS ya no puede unirse correctamente y por tanto se anula su papel represor (Dorman, 2007). A pesar de tener una

secuencia de reconocimiento para la unión de H-NS ya reportada por Chen en 2005, ésta no puede ejercer su actividad silenciadora sobre esta región de DNA, debido a que no tiene la geometría y la longitud necesaria para que ésta se pueda unir de manera correcta, como se muestra en el modelo de la figura 23. Lo dicho hasta aquí concuerda con el concepto propuesto por Dorman y Dorman sobre el mecanismo de lectura indirecta “indirect readout”, refiriéndose a los mecanismos reguladores generados por algunas proteínas que reconocen la estructura del DNA en lugar de depender del reconocimiento de la secuencia como principal fuente de información (Dorman y Dorman, 2017). Lo anterior puede sugerir que la topología del DNA es importante que para que *leuO* se transcriba de una manera correcta ya que de este modo algunas NAPs pudieran regularlo no solo a nivel de secuencia sino a través del estructuramiento que se genera y de esta manera la bacteria tendría distintos niveles de regulación para el control transcripcional.

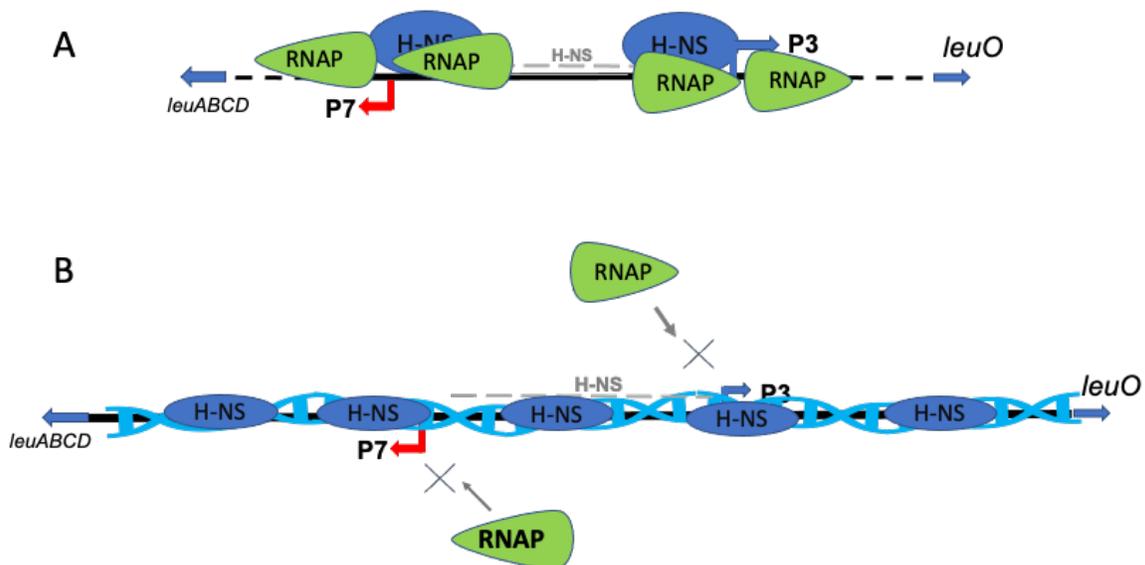


Fig.24 Modelo de represión mediada por H-NS A) Regulación de H-NS en una región corta de DNA, en donde se han eliminado nucleótidos y por tanto el estructuramiento cambia, evitando el reconocimiento por parte de esta proteína, permitiendo el acceso a la RNAP y con esto la expresión de los promotores. B) Regulación que ejerce H-NS en una región larga de DNA: donde H-NS puede unirse al DNA por que el estructuramiento es el adecuado, así mismo puede reconocer secuencias encriptadas para reprimirlas evitando la transcripción espuria.

Esto podría indicar que en un contexto natural H-NS silencia a los promotores de *leuO* de manera precisa para evitar la activación de promotores que no son requeridos, dando prioridad al promotor canónico de *leuO*.

8.2 H-NS regula la transcripción espuria

Nuestros resultados muestran que al mutar la secuencia consenso -10 de P7, la actividad no se anula por completo, pero sí disminuye (Fig.11). Lo anterior podría ser debido a que la secuencia de esta región muestra tener un espaciador rico en A-T entre la caja -10 y -35 que genera una región -10 extendida (Fig. 25) la cual puede asemejar a un elemento -10, y por tanto estar predispuestos a la transcripción espuria. Es decir, P7 cuenta con un elemento -10 encriptado, que hace que la RNAP pueda tener un promotor alterno que reconocer. Lo anterior sugiere que H-NS y la RNAP desempeñan un papel activo sinérgico en la regulación, al reconocer tales secuencias y mantenerlas silenciadas.

Esto es consistente con un estudio realizado en *E.coli*, en donde secuencias promotoras con mutación en la caja consenso -10 que no incluyen tramos de A-T no produjeron transcripción a partir de éstas, sin embargo, la adición de un tramo A-T condujo a niveles más bajos de transcripción (Warman, et al, 2020), y por consiguiente los tramos de A-T colocados apropiadamente estimulan la transcripción promiscua.

En este mismo modelo, también se ha reportado para el operón *ehxCABD* que H-NS bloquea elementos -10 encriptados, evitando que la RNAP compita consigo misma por estos sitios y facilitando el correcto reconocimiento de promotor canónico (Singh y Grainger 2013).

De esta manera, el papel de H-NS como silenciador es de gran importancia para evitar la transcripción de RNAs espurios, por tanto podríamos decir que las regiones promotoras espurias que pudieran perjudicar la expresión del gen *leuO* se ve beneficiada por el silenciamiento H-NS.

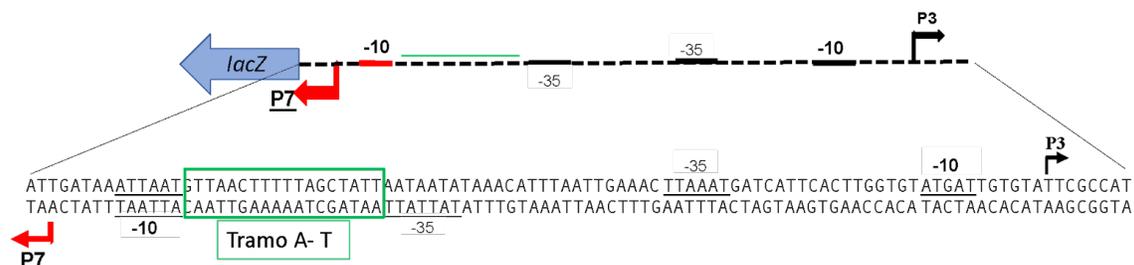


Fig 25. Secuencia de estudio de los promotores P3 y P7 de 99 pb. El recuadro verde representa los tramos A-T que se encuentran entre la secuencia -10 y -35 del promotor antisentido P7.

8.3 Regulación mediada por ppGpp

Los resultados obtenidos para los promotores P7 y P3 sugieren que son reprimidos por la alarmona ppGpp, sin importar que la región sea corta (Fig.9 y 10), a diferencia del modelo propuesto para H-NS (Fig. 24).

Lo anterior puede explicarse ya que ppGpp se une directamente a la RNAP y no a las regiones de DNA; de esta manera puede regular a sus genes blanco, dependiendo de las condiciones requeridas por la bacteria (Sánchez-Vázquez, et al, 2019). Lo anterior reafirma nuestra idea de que ppGpp sigue ejerciendo su función como regulador negativo para los promotores P3 y P7 ya que la región de estudio tiene la cantidad de nucleótidos necesarios para que pueda anclarse la RNAP, por lo que en ausencia de la alarmona favorece el paso de la RNAP y con esto la expresión de los promotores apropiados (Fig. 26). Además, el hecho de que la mutación en un promotor no afecta la función de ppGpp sobre el promotor divergente (Figs. 12 y 14), indica que efectivamente el pegado de ppGpp a la RNAP lo que causa el fenotipo, y no la unión de un represor corriente arriba de la RNAP, donde está el otro promotor; un represor que sería potencialmente activado por ppGpp. Más aún, la actividad de un promotor no parece afectar el pegado de la RNAP al otro promotor y por ende su susceptibilidad de unirse al ppGpp. Estos resultados ilustran que la expresión de estos promotores se puede ver favorecida por la ausencia de proteínas represoras, ya que como hemos discutido con anterioridad, en regiones cortas de DNA las proteínas reguladoras no pueden unirse a estas secuencias, es decir, no presentan ningún obstáculo para que la RNAP transcriba libremente.

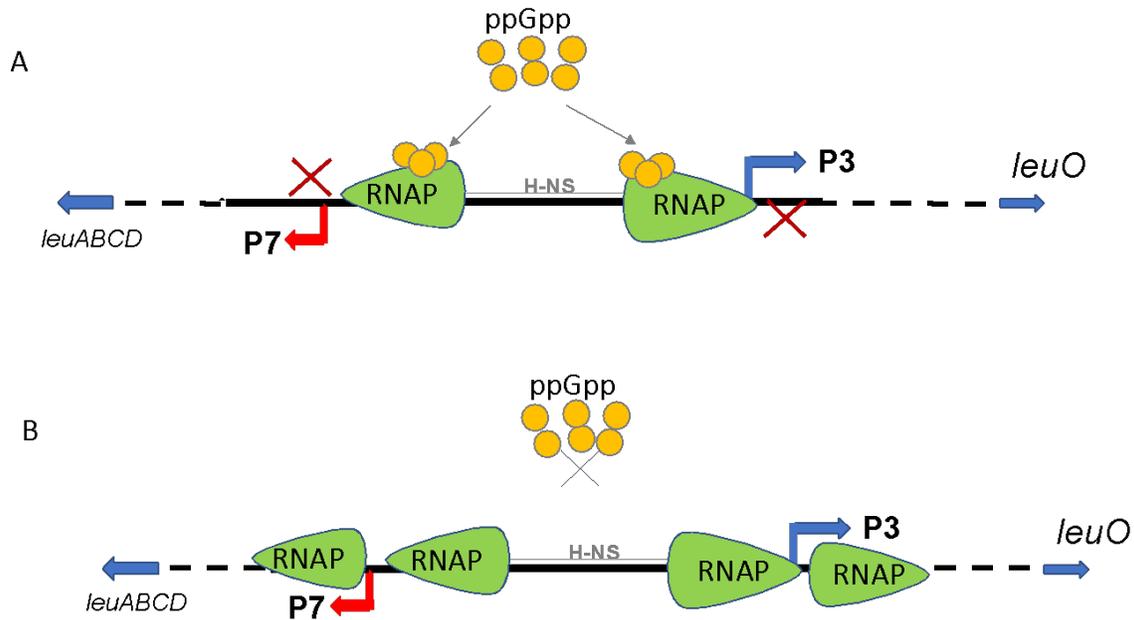


Fig.26 Modelo de regulación por ppGpp para los promotores P3 y P7. A) Presencia de ppGpp uniéndose a la RNAP para reprimir a los promotores P3 y P7. B) La ausencia de ppGpp permite que la RNA polimerasa esté libre y pueda activar a los promotores P3 y P7.

Lo anterior mencionado es sustentado con los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que la expresión del transcrito a partir del promotor P7 no se pudo observar por RT-PCR en ausencia de la alarmona ppGpp (Fig. 19 carril 5), tomando en cuenta que se utilizó como templete la fusión “pRS/*leuO894*”, la cual abarca la región intergénica completa y las mismas condiciones utilizadas para medir la actividad β -galactosidasa. Esto implicaría la intervención de otras proteínas reguladoras sobre esta región y por tanto la oclusión de la acción de la RNAP, impidiendo su unión a los promotores para transcribir.

Esto también se muestra en el modelo observado en *E. coli*, mediante un estudio de transcripción in vitro, en donde la presencia de la proteína Gly-11 de unión al DNA puede bloquear la elongación por la RNAP, a lo que se le denominó “roadblock”; mientras que los templados que no tienen proteínas unidas permitan el paso de la RNAP (Pavco, y Steege, 1990).

Este efecto también se ha observado en estudios anteriores por análisis de RT-PCR del gen *leuO* presente en el cromosoma, detectando los mensajeros de los promotores P3, P1, P2, P5 y P4, en donde la sobre expresión de la proteína RelA

no mostró tener efecto en la expresión de *leuO*, sin embargo en la doble mutante *hns/lrp* sí se pudo detectar expresión. Esto mostraba que H-NS y Lrp son los principales represores para los promotores en sentido de *leuO*, lo cual también se corroboró por medio de EMSA ya que estas proteínas pueden permanecer estrechamente unidas a lo largo de toda la región (Fernández-Mora et al, 2021, datos no publicados Sánchez-Popoca, D, 2019).

Así mismo, las actividades de la β -galactosidasa en un fusión “pRS*leuO894*” revelan una desrepresión de 15 veces en su actividad (Fernández-Mora et al, 2021) lo que sugiere que H-NS y Lrp funcionan como obstáculos físicos para evitar el avance de la RNAP (Fig. 27, panel A), por lo que en alguna condición específica en donde es necesario que la bacteria tenga un paso previo de desrepresión de sus principales proteína represoras, y en donde ppGpp participa como una segunda alternativa para mantener a los promotores P3 y P7 silenciados y sólo activar al promotor que se necesite para esa condición o bien si no existe la presencia de ppGpp ambos promotores tuvieran una expresión (Fig. 27 panel B)

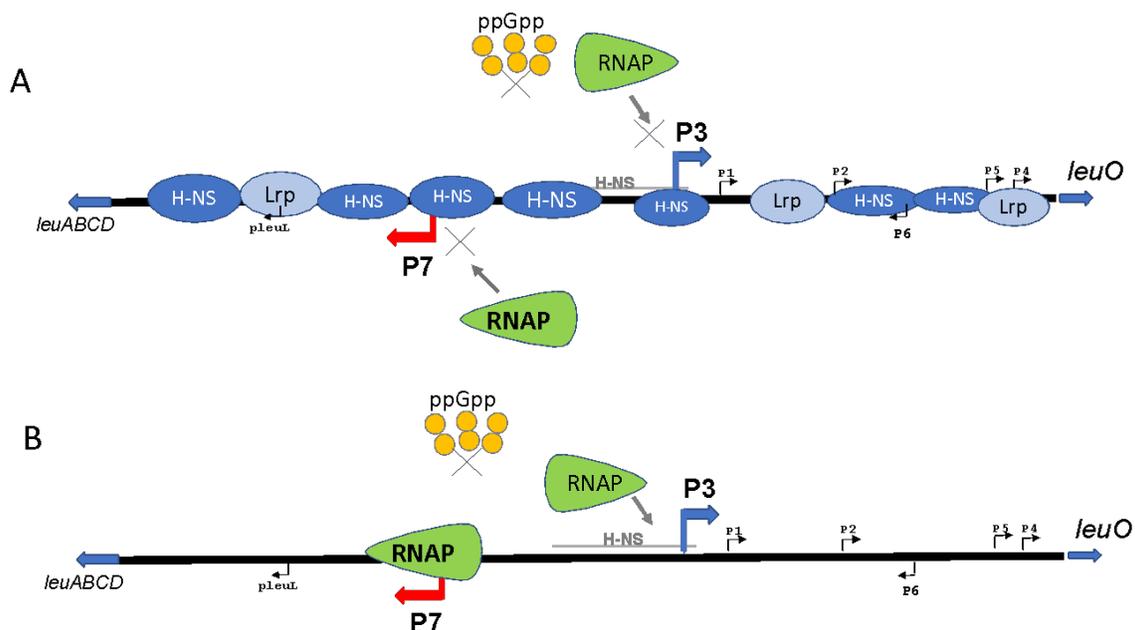


Fig. 27 Modelo de regulación de ppGpp “roadblocks”. A) Región reguladora completa de *leuO* en donde la RNAP no puede transcribir P3 y P7 debido a los obstáculos en ausencia

de ppGpp (repressor). B) Región reguladora en ausencia de ppGpp (repressor) donde la RNAP puede activar los promotores P3 y P7.

8.4 Promotores antisentido

El promotor divergente P7 mejoró su actividad al mutar la secuencia -10 del promotor P3, lo cual sugiere que la posición de los promotores está influenciando para que la RNAP tenga preferencia hacia uno de ellos, en este caso hacia P3, ya que el silenciamiento de éste favorece la expresión del promotor P7, proponiendo que el promotor P3 es más fuerte que el promotor P7. Esto es consistente con nuestros resultados, ya que cuando la secuencia -10 se muta, la actividad del promotor P3 se anula por completo (Fig.13). Además P3 es el único en *Salmonella enterica* y no está presente en *E. coli* (Sánchez -Popoca D. 2022). Esto es, el promotor P3 podría representar un elemento clave y característico para la regulación de *leuO*.

Por el contrario, en un fondo doble mutante $\Delta relA/spoT$ ya no se observa un aumento en su expresión (Fig. 14) explicando que ésta sea la mayor actividad a alcanzar para P7.

Los promotores divergentes muestran que la regulación puede estar dada por interferencia transcripcional, como el caso del promotor PR del bacteriófago lambda que puede reprimir el inicio de la transcripción del promotor PRM divergente, ya que una mutación en las regiones -10 de PR dan como resultado un aumento significativo promotor PRM (Hershberger y de Haseth, 1991).

Sin embargo, el promotor P3 no mostró un efecto cuando se muta el promotor divergente P7, aunque esto no puede ser completamente afirmado debido a que la fusión *leuOP3 -90 +8/P7Mut* no tiene una anulación completa de la actividad de P7 divergente (Fig. 11), por lo que no se descarta la posibilidad de una posible interferencia por parte de P7 hacia P3.

En este mismo contexto se ha reportado que el gen *aroP*, el cual cuenta con tres promotores, siendo P1 el promotor más fuerte, y que anula la expresión de P3 divergente. Sin embargo, la presencia de la proteína TyrR ayuda a la RNAP a unirse favoreciendo la expresión del promotor P3, por lo que la represión

transcripcional del promotor P3 es importante para que la actividad de P1 pueda expresarse (Wang et al.,1998).

Se ha probado que los promotores tiene un efecto diferencial en la regulación por medio de la RNAP, ya que la tasa de actividad aumenta para el promotor fuerte mientras que disminuye para el promotor débil, en donde la RNAP puede pasar más tiempo y por tanto silenciar este promotor; es decir, la fuerza del promotor y la interferencia se pueden regular por separado, lo que brinda una regulación controlada en distintos niveles (Bendtsen KM et al , 2011). Con base en estos reportes, podríamos especular que P3 y P7 podrían presentar interferencia transcripcional o simplemente que ambos promotores se expresen sin que haya una competencia; sin embargo, pudiera ser que la RNAP tenga preferencia sobre uno de éstos, como una ventaja evolutiva que le permite al gen tener flexibilidad de expresión bajo distintas circunstancias. (Sánchez-Popoca, et al.,2022).

8.5 Efecto de la leucina sobre el promotor P7 y *pleuL*

El transcrito generado a partir de P7 (450 nt) mostró que albergaba el péptido líder *pleuL* de 165 nc (Fig. 15 panel C), el cual genera una estructura secundaria talloasa que coincide con el terminador de P7 .

En el mismo contexto, PleuL, el RNA líder, mostró ser un atenuador de la transcripción para el operón *leuABC* en *E. coli* y *S. Typhimurium* siendo un mecanismo por el cual la leucina regula su expresión, (Gall y Calvo , 1977; Hertzberg,et al,1980, Searles,et al, 1983 Wessler y Calvo ,1981). Nuestros resultados muestran que en *S. Typhi* presentan diferencias en las secuencias promotoras y sin embargo la función del RNA líder (*leuL*) como atenuador de *leuABC* sigue siendo la misma (Fig. 22), siendo este el primer reporte para este serovar (*Typhi*). Por otra parte, al obtener la actividad de P7 en un medio en presencia y en ausencia de leucina, no presentó efecto en ninguno de los casos (Fig.23), lo anterior sugiere que P7 no está implicado en la regulación del operón *leuABC*, al menos en esta condiciones.

Con base a los datos que presentaban estos dos promotores, también nos interesamos para saber si su estructuración podría darnos información sobre su posible regulación.

El estructuramiento del RNA líder, transcrito a partir del promotor P7 (Fig. 16), presentó un apareamiento de sus bases con menor probabilidad y por tanto podría tener menos posibilidades de generar un mRNA maduro, para promover su traducción. De manera interesante, la estructura secundaria que se forma desde -50 nt a -255 nt genera una serie de tallos-asa en tándem, lo cual podría favorecer para que la RNAP pueda realizar un paro de la transcripción (terminador-rho independiente) o una pausa transcripcional.

La formación de una horquilla de RNA en el transcrito naciente favorece a que la RNAP detenga la elongación del transcrito dependiendo de las características de los distintos genes (Reynolds et al, 1992). A este respecto, se ha mostrado que en gran medida que las horquillas del RNA favorecen la pausa: los análisis de las horquillas del sitio de pausa líder del gen *his* de *E. coli* así como también su región corriente arriba, y en algunos casos puede inducir la liberación de los factores de elongación (Chan y Landick ;1997).

Lo anterior podría ser debido a que las estructuras de horquilla de RNA son importantes para la vida media de la pausa y con esto el favorecimiento de la traducción (Kang et al,2018) lo que es consistente con el estudio de Jeanneau y colaboradores, en donde sugieren que el alargamiento de la transcripción dentro de *leuL* produce una horquilla de RNA naciente que se estabiliza cuando se unen otros factores como NusA que ayuda a la pausa y que finalmente conduce a una mayor pausa transcripcional favoreciendo su traducción (Jeanneau et. al, 2022). Lo anterior podría sugerir que el promotor P7 genera un transcrito inmaduro que pudiera parar en estas horquillas en alguna condición específica. Sin embargo, los resultados de RT-PCR de P7 mostraron compartir el terminador Rho independiente con el transcrito proveniente de *pleuL*, lo cual también podríamos sugerir que el estructuramiento del transcrito de P7 podría favorecer a la pausa por la RNAP, ya que las horquillas en tándem podrían aportar a la unión de otros factores adicionales como NusA y con esto dar paso a la transcripción desde el

promotor *pleuL* dependiendo de las concentraciones de leucina, ya que el estructuramiento que presenta el transcrito desde *pleuL* (Fig. 17) mostró ser termodinámicamente estable, debido a que el apareamiento de sus bases aseguraría el plegamiento del RNA, lo que podría favorecer la traducción del líder del operón *leuABC*.

Los resultados aquí mostrados contribuyen a las ideas sobre el control transcripcional que requiere la *Salmonella* para poder sobrevivir a distintas condiciones dentro de su hospedero, en donde debe asegurar la correcta activación de genes controlando su expresión por distintos mecanismos. En el caso de *leuO*, participan H-NS, ppGpp, así como el estructuramiento del RNA o el DNA, en donde contribuyen a tener un control del silenciamiento de sus múltiples promotores y de esta forma pueda activarse sólo en el momento preciso y generar la respuesta que la bacteria requiera.

9. Conclusiones

- La actividad transcripcional de P3 afecta negativamente la actividad de P7
- H-NS requiere de regiones largas de DNA para poder ejercer su función represora sobre los promotores P3 y P7 *leuO*.
- La regulación por ppGpp puede ser una alternativa para silenciar a los promotores P7 y P3 cuando ocurre un paso de desrepresión para regular al gen *leuO*.
- Se conserva la función del transcrito a partir del promotor *pleuL* como atenuador del operón *leuABC* en *S. Typhi*, como se ha observado para *S. Typhimurium* y *E. coli*.
- P7 genera un transcrito de 463 nt que no es regulado por leucina.
- P7 tiene regiones promotoras encriptadas que pueden generar transcripción espuria.
- El estructuramiento de P7 podría favorecer que la RNAP pueda transcribir a partir de *pleuL*.

10. Perspectivas

- Realizar RT-PCR del promotor P7 en condiciones de crecimiento en un medio mínimo.
- Mutar la región -10 de *pleuL* y hacer RT-PCR desde P7.
- Realizar una mutación en el atenuador y hacer RT-PCR para ver su efecto sobre el transcrito de P7 y el de *pleuL*
- Probar las fusiones de P7 con la mutación del promotor divergente en los fondos $\Delta hns::km$, $\Delta lrp::cm$, $\Delta hns/lrp$ y $\Delta relA/spoT$.
- Realizar una mutación de la caja -10 de P7, así como en los tramos de A-T hasta obtener una actividad nula.
- Sobre inducir la actividad promotora de P7 en una fusión 894.
- Mutagenizar sitios para eliminar las horquillas de P7 y por medio de RT-PCR ver si esto podría afectar la transcripción a partir de *pleuL*.

11. Bibliografía

- Ante, V. M., Bina, X. R., Howard, M. F., Sayeed, S., Taylor, D. L. Y Bina, J. E. 2015. *Vibrio cholerae leuO* transcription is positively regulated by ToxR and contributes to bile resistance. *Journal of Bacteriology*. 197 (22): 3499-3510.
- Ante, V. M., Bina, X. R. Y Bina, J. E. 2015b. The LysR-type regulator LeuO regulates the acid tolerance response in *Vibrio cholerae*. *Microbiology*. 161: 2434-2443.
- Bendtsen, K. M., Erdóssy, J., Csiszovszki, Z., Svenningsen, S. L., Sneppen, K., Krishna, S., Y Semsey, S. (2011). Direct and indirect effects in the regulation of overlapping promoters. *Nucleic acids research*, 39(16), 6879-6885
- Bina, X. R., Taylor, D. L., Vikram, A., Ante, V. M. Y Bina, J. E. 2013. *Vibrio cholerae* ToxR downregulates virulence factor production in response to cyclo (Phe-Pro). *MBio*. 4:1-9.
- Bina, X. R., Howard, M. F., Ante, V. M., Y Bina, J. E. (2016). *Vibrio cholerae* LeuO links the ToxR regulon to expression of lipid A remodeling genes. *Infection and immunity*, 84(11), 3161-3171.
- Breddermann, H. Y Schnetz, K. 2017. Activation of *leuO* by LrhA in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 104 (4):664-676.
- Brinkman, A.B., Ettema, T. J., De Vos, W. M. Y Oost, J. (2003). The Lrp family of transcriptional regulators. *Molecular Microbiology*. 48: 287-294.

- Brophy, J. A., Y Voigt, C. A. (2016). Antisense transcription as a tool to tune gene expression. *Molecular systems biology*, 12(1), 854.
- Browning, D. F., Y Busby, S. J. (2016). Local and global regulation of transcription initiation in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14(10), 638-650.
- Bowe, F., Lipps, C. J., Tsohis, R. M., Groisman, E., Heffron, F. Y 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.
- Calva, E., Y Burgess, R. R. (1980). Characterization of a rho-dependent termination site within the cro gene of bacteriophage lambda. *Journal of Biological Chemistry*, 255(22), 11017-11022.
- Cameron, A. D., Y Dorman, C. J. (2012). A fundamental regulatory mechanism operating through OmpR and DNA topology controls expression of Salmonella pathogenicity islands SPI-1 and SPI-2. *PLoS genetics*, 8(3), e1002615.
- Cases, I., Y De Lorenzo, V. (2005). Promoters in the environment: transcriptional regulation in its natural context. *Nature Reviews Microbiology*, 3(2), 105-118.
- Casamassimi, A., Y Ciccodicola, A. (2019). Transcriptional regulation: Molecules, involved mechanisms, and misregulation. *International journal of molecular sciences*, 20(6), 128.
- Chan, C. L., Wang, D., Y Landick, R. (1997). Multiple interactions stabilize a single paused transcription intermediate in which hairpin to 3' end spacing distinguishes pause and termination pathways. *Journal of molecular biology*, 268(1), 54-68.
- Chełkowska-Pauszek, A., Kosiński, J. G., Marciniak, K., Wysocka, M., Bąkowska-Żywicka, K., Y Żywicki, M. (2021). The role of RNA secondary structure in regulation of gene expression in bacteria. *International journal of molecular sciences*, 22(15), 7845.
- Chen, S., Hao, Z., Bieniek, E. Y Calvo, J.M. (2001). Modulation of Lrp action in Escherichia coli by leucine: Effects on non-specific binding of Lrp to DNA. *J. Mol.BIOL.* 314:1067-1075.
- Chen, C. C., Chou, M. Y., Huang, C. H., Majumder, A., Y Wu, H. Y. (2005). A cis-spreading nucleoprotein filament is responsible for the gene silencing activity found in the promoter relay mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 280(6), 5101-5112.
- Ciampi, M. S. (2006). Rho-dependent terminators and transcription termination. *Microbiology*, 152(9), 2515-2528
- Cho, B-K., Barrett, C. L., Knight, E. M., Park, Y. S. Y Palsson B. (2008). Genome-scale reconstruction of the Lrp regulatory network in *Escherichia coli*. *PNAS*. 105(49): 19462-19467.

- Curran, T. D., Abacha, F., Hibberd, S. P., Rolfe, M. D., Lacey, M. M. Y Green, J. 2017. Identification of new members of the *Escherichia coli* K-12 MG1655 SlyA regulon. *Microbiology*. 163 (3): 400-409.
- De Jong, H. K., Parry, C. M., van der Poll, T., & Wiersinga, W. J. (2012). Host-pathogen interaction in invasive salmonellosis.
- Daigle, F. (2008). Typhi genes expressed during infection or involved in patogénesis. *J infection developing countries*. 2:431-437
- Duss, O., Stepanyuk, G. A., Puglisi, J. D., Y Williamson, J. R. (2019). Transient protein-RNA interactions guide nascent ribosomal RNA folding. *Cell*, 179(6), 1357-1369.
- Dillon, S. C., Y Dorman, C. J. (2010). Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), 185-195.
- Dorman, C. J. (2007). H-NS, the genome sentinel. *Nature Microbiology*. 5: 157161
- Dorman, C. J., Y Dorman, M. J. (2017). Control of virulence gene transcription by indirect readout in *Vibrio cholerae* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Environmental microbiology*, 19(10), 3834-3845.
- Espinosa, E. Y Casadesús, J. 2014. Regulation of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 (SPI-1) by the LysR-type regulator LeuO. *Molecular Microbiology*. 91 (6): 1057-1069.
- Fernández-Mora, M., Puente, J.L. Y Calva, E. 2004. OmpR and LeuO positively regulate the *Salmonella enterica* serovar Typhi *ompS2* porin gene. 186 (10): 2909-2920.
- Fernández-Mora, M., Sánchez-Popoca, D., Altamirano-Cruz, G., López-Méndez, G., Téllez-Galicia, A.T., Guadarrama, C., and Calva, E. (2021) The *S. Typhi leuO* gene contains multiple functional promoters. *Journal of Medical Microbiology* 70 (9) DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001418>
- Fang, M., Majumder, A., Tsai, K-J. Y Wu, H-Y. (2000). ppGpp-Dependent *leuO* expression in Bacteria under stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 276:64-70.
- Frohlich, S.K. Y Vogel, J. (2009). Activation of genes expression by small RNA. *El selvier*. 12:674–682.
- Gemmill, R. M., Wessler, S. R., Keller, E. B., Y Calvo, J. M. (1979). *leu* operon of *Salmonella typhimurium* is controlled by an attenuation mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10), 4941-4945
- Gonzalo-Asensio, J., Ortega, A.D., Rico-Perez, G., Purcciarelli, M.G. Y Garcia-del Portillo, F. (2013). A Novel Antisense RNA from the *Salmonella* Virulence Plasmid pSLT Expressed by Non-Growing Bacteria inside Eukaryotic Cells. *PLOS one*. 8.

- Guadarrama, C., Villaseñor, T. Y Calva, E. (2014). The subtleties and contrasts of the LeuO regulator in *Salmonella* Typhi: implications in the immune response. *Frontiers in IMMUNOLOGY*. 5 (581).
- Hernández-Lucas, I., Gallego-Hernández, A.L., Encarnación, S., Fernández-Mora, M., Martínez-Batallar, A. G. Y Salgado, H. 2008. The LysR-type transcriptional regulator LeuO controls expression of several genes in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Journal of Bacteriology*. 190 (5): 1658-1670.
- Hertzberg, K. M., Gemmill, R., Jones, J., Y Calvo, J. M. (1980). Cloning of an EcoRI-generated fragment of the leucine operon of *Salmonella typhimurium*. *Gene*, 8(2), 135-152.
- Hershberger, P. A., Y deHaseth, P. L. (1991). RNA polymerase bound to the PR promoter of bacteriophage λ inhibits open complex formation at the divergently transcribed PRM promoter: implications for an indirect mechanism of transcriptional activation by λ repressor. *Journal of molecular biology*, 222(3), 479-494.
- Jeanneau, S., Jacques, P. É., Y Lafontaine, D. A. (2022). Investigating the role of RNA structures in transcriptional pausing using in vitro assays and in silico analyses. *RNA biology*, 19(1), 916-927.
- Jurado-Jiménez, R., Arenas, C., Delgado, A., Rivero A. Y Torre-Cisneros J. (2010). Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas. *Medicine*. 10(52):3497-3501.
- Kang, J. Y., Mishanina, T. V., Bellecourt, M. J., Mooney, R. A., Darst, S. A., Y Landick, R. (2018). RNA polymerase accommodates a pause RNA hairpin by global conformational rearrangements that prolong pausing. *Molecular cell*, 69(5), 802-815.
- Lai, D., Proctor, J. R., Y Meyer, I. M. (2013). On the importance of cotranscriptional RNA structure formation. *Rna*, 19(11), 1461-1473
- Lawley, T. D., Chan, K., Thompson, L. J., Kim, C. C., Govoni, G. R., Y Monack, D. M. (2006). Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS pathogens*, 2(2), e11.
- Lawrenz, M. B., Y Miller, V. L. (2007). Comparative analysis of the regulation of rovA from the pathogenic yersiniae. *Journal of bacteriology*, 189(16), 5963-5975.
- Landgraf, J. R., Wu, J., Y Calvo, J. M. (1996). Effects of nutrition and growth rate on Lrp levels in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 178(23), 6930-6936.
- Majumder, A., Fang, M., Tsai, K. J. Y Wu, H. Y. 2000. ppGpp-dependent *leuO* expression in bacteria under stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 276 (1): 64-70.

- Mizuno, T. Chou, M. E Inouye, M. (1984). A unique mechanism regulating gene expression: Translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Biochemistry*. 81: 1966-1970.
- Pavco, P. A., Y Steege, D. A. (1990). Elongation by Escherichia coli RNA polymerase is blocked in vitro by a site-specific DNA binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 265(17), 9960-9969.
- Reynolds, R., Bermúdez-Cruz, R. M., Y Chamberlin, M. J. (1992). Parameters affecting transcription termination by Escherichia coli RNA polymerase: I. Analysis of 13 rho-independent terminators. *Journal of molecular biology*, 224(1), 31-51.
- Rodríguez-Mejía, J. L., Roldán-Salgado, A., Osuna, J., Merino, E., Y Gaytán, P. (2017). A codon deletion at the beginning of green fluorescent protein genes enhances protein expression. *Microbial Physiology*, 27(1), 1-10.
- Rodríguez-Morales, O., Fernández-Mora, M., Hernández-Lucas, I., Vázquez, A., Puente, J. L. Y Calva, E. 2006. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *ompS1* and *ompS2* mutants are attenuated for virulence in mice. *Infection and Immunity*. 74 (2): 1398-1402.
- Sánchez-Popoca, D., Serrano-Fujarte, I., Fernández-Mora, M., Y Calva, E. (2022). The LeuO regulator and quiescence: about transcriptional roadblocks, multiple promoters and crispr-cas. *Molecular Microbiology* **118**: 503-509; DOI: <https://doi.org/10.1111/mmi.14990>
- Searles, L. L., Wessler, S. R., Y Calvo, J. M. (1983). Transcription attenuation is the major mechanism by which the leu operon of *Salmonella* Typhimurium is controlled. *Journal of molecular biology*, 163(3), 377-394.
- Shearwin, K. E., Callen, B. P., Y Egan, J. B. (2005). Transcriptional interference—a crash course. *TRENDS in Genetics*, 21(6), 339-345.
- Stratmann, T., Pul, U., Wurm, R., Wagner, R. Y 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 (6): 1109-1123.
- Shimada, T., Yamamoto, K., Y Ishihama, A. (2009). Involvement of the leucine response transcription factor LeuO in regulation of the genes for sulfa drug efflux. *Journal of bacteriology*, 191(14), 4562-4571.
- Shimada, T., Bridier, A., Briandet, R., Y 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(2), 378-397.
- Singh, S. S., Typas, A., Hengge, R., Y Grainger, D. C. (2011). Escherichia coli σ 70 senses sequence and conformation of the promoter spacer region. *Nucleic acids research*, 39(12), 5109-5118.

- Singh, S. S., Y Grainger, D. C. (2013). H-NS can facilitate specific DNA-binding by RNA polymerase in AT-rich gene regulatory regions. *PLoS genetics*, 9(6), e1003589.
 - Singh, S. S., Singh, N., Bonocora, R. P., Fitzgerald, D. M., Wade, J. T., Y Grainger, D. C. (2014). Widespread suppression of intragenic transcription initiation by H-NS. *Genes & development*, 28(3), 214-219.
 - Sneppen, K., Dodd, I. B., Shearwin, K. E., Palmer, A. C., Schubert, R. A., Callen, B. P., Y Egan, J. B. (2005). A mathematical model for transcriptional interference by RNA polymerase traffic in *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology*, 346(2), 399-409.
 - Ross, W., Sánchez-Vázquez, P., Chen, A. Y., Lee, J. H., Burgos, H. L. Y Gourse, R. L. 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.
 - Takao, M., Yen, H. Y Tobe, T. 2014. LeuO enhances butyrate-induced virulence expression through a positive regulatory loop in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 93 (6): 1302-1313.
 - Tanner, J. R., Y Kingsley, R. A. (2018). Evolution of *Salmonella* within hosts. *Trends in microbiology*, 26(12), 986-998.
 - Tenor, J. L., McCormick, B. A., Ausubel, F. M. Y Aballay, A. 2004. *Caenorhabditis elegans*-based screen identifies *Salmonella* virulence factors required for conserved host-pathogens interactions. *Current Biology*. 14 (11): 1018-1024
 - Ueguchi, C., Ohta, T., Seto, C., Suzuki, T., Y Mizuno, T. (1998). The leuO gene product has a latent ability to relieve *bgl* silencing in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 180(1), 190-193.
 - Van Bogelen, R. A., Olson, E. R., Wanner, B. L. Y Neidhardt, F. C. 1996. Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 178 (15): 4344- 4366.
 - Wang, P., Yang, J., Ishihama, A., Y Pittard, A. J. (1998). Demonstration that the TyrR protein and RNA polymerase complex formed at the divergent P3 promoter inhibits binding of RNA polymerase to the major promoter, P1, of the *aroP* gene of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 180(20), 5466-5472.
 - Warman, E. A., Singh, S. S., Gubieda, A. G., Y Grainger, D. C. (2020). A non-canonical promoter element drives spurious transcription of horizontally acquired bacterial genes. *Nucleic acids research*, 48(9), 4891-4901.
 - Wessler, S. R., Y Calvo, J. M. (1981). Control of leu operon expression in *Escherichia coli* by a transcription attenuation mechanism. *Journal of molecular biology*, 149(4), 579-597.
1. RNAfold web server: <http://rna.tbi.univie.ac.at//cgibin/RNAWebSuite/RNAfold.cg>

12. Anexos

12.1 Medios de cultivo

MN (Medio nutritivo) para 1L de medio.	
Bacto caldo nutritivo (NB)	7g
Extracto de levadura (YE)	1g
Glicerol	2 ml
K_2HPO_4	3.75 g
KH_2PO_4	1.3 g

M9 (Medio mínimo) Stock 10X para 1L de medio.	
Na_2HPO_4	60 g
KH_2PO_4	30 g
NaCl	5 g
NH_4Cl	10 g
Ajustar pH a 7.4	

Componentes del medio M9 (100ml)	
$MgSO_4$ (1M)	100 μ l
$CaCl_2$ (1M)	10 μ l
Trp (0.3mM)	500 μ l
Cys (0.3mM)	500 μ l

Glucosa (0.4%)	2 ml
----------------	------

Medio LB (Luria Bertani) Para 1L de medio.	
Triptona	10g
NaCl	10g
Extracto de levadura	5 g

Medio SOB Para 1L de medio.	
Bacto triptona	7g
Extracto de levadura (YE)	1g
NaCl (5M)	2 ml
KCl (1M)	3.7 g
MgSO ₄ (1M)	1.3 g
MgCl ₂ (1M)	1ml
Glucosa	0.36 g

TSGB Para 1L de medio.

Bacto soyton	17 g
Bacto triptona	3 g
NaCl	5 g
Fosfato de potasio dibasico	2.5 g
Glucosa	2.5 g
Bacto agar	3.7 5(250ml)

12.2 Amortiguadores

Tris Boratos (TBE) 10X	
Trisma base (89 mM)	108 g
Ácido bórico (24.98 mM)	55 g
EDTA (0.5 mM)	40 ml
Tris Acetatos (TAE) 10X	
Trisma base (89 mM)	242 g
Ácido bórico (24.98 mM)	136.1 g
Ácido acético (24.98)	73 ml
EDTA (0.5 mM)	40 ml

Buffer Z 5X	
Fosfato de sodio dibásico(0.06 M)	40.21 g
Fosfato de sodio monobásico (0.04 M)	13.8 g
Cloruro de potasio (0.01M)	1.9 gr
Sulfato de magnesio (0.001 M)	0.61 g

12.3 Antibióticos

Antibiótico	Concentración
Ampicilina (Amp)	200 mg/ml
Cloranfenicol (Cm)	34 mg/ml
Kanamicina (Km)	30 mg/ml
Tetraciclina (Tc)	12 mg/ml

12.4 Otros reactivos

X-gal (rna (50 mg/ml)
Reactivo de Lowry Na_2CO_3 15.4g y NaOH 3.38 g para 500ml
ONPG (orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosodico) (1 mg/ml)

SOLUCIÓN A

Agua DEPC	36.9 ml	
SDS 10%	2 ml	(5%)
Acetato de sodio 3M pH 4.2	267 ul	(20mM)
EDTA 0.5M pH 8	800 ul	(10 mM)
Total	40.067 ml	