



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto de H-NS, Lrp y (p)ppGpp en los promotores P8 y P9 del gen *leuO* de *Salmonella Typhi*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA:
GUADALUPE NALLELY CORTÉS LÓPEZ

DR. EDMUNDO CALVA MERCADO
[Instituto de Biotecnología](#)

DRA. ROSA MARÍA GUTIÉRREZ RÍOS
DRA. CINTHIA ERNESTINA NÚÑEZ LÓPEZ
[Instituto de Biotecnología](#)

Cuernavaca Morelos. Septiembre, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por otorgarme la vida, y la dicha de vivir esta maravillosa etapa de aprendizaje y crecimiento profesional.

A mis padres, Federico y Aurora por su apoyo incondicional siempre; y por sus palabras de aliento cuando algo no salía bien. A mi pequeña familia: Sheena, Fili y Fany por estar siempre conmigo haciéndome reír junto con ketita.

Un enorme agradecimiento al Dr. Edmundo Calva, por siempre motivarnos y apoyarnos en todo momento con los experimentos, y por contagiarnos de su gran vitalidad y su enorme sabiduría; además de ser un excelente tutor. A Marcos, por su infinita paciencia, y por estar al pendiente de nosotros siempre, así como por sus aportes importantes a este proyecto. Asimismo, agradezco a la Dra. Cinthia Núñez y a la Dra. Rosa María Gutiérrez, que formaron parte de mi comité tutorial, y ayudaron mucho a enriquecer este trabajo. También quiero agradecer de manera especial a Lili, por apoyarme con mis experimentos, por su aportación de datos e ideas, además de ser una gran amiga, “roomie” y confidente.

Quiero agradecer a Gloria, Grecia y Diego, por enseñarme tantas cosas cuando llegué al laboratorio, por su paciencia y apoyo en todos los ámbitos, por ser mis amigos y mis hermanos en esa primera casa llamada IBT. También a Itzel, Dinora y a Sara. Gracias por hacer más amena mi estancia en el laboratorio, los quiero muchísimo a todos.

Igualmente quisiera agradecer a mi comité de tesis; a la Dra. Claudia Rodríguez, a la Dra. Katy Juárez, al Dr. David Zamorano, al Dr. Mario Soberón y al Dr. Daniel Segura, por apoyarme con sus aportes y comentarios durante la revisión de mi tesis.

Por último, y no menos importante a mis amigos, con los que siempre he pasado bellos momentos: Lupita, Martín, Yari, Cesar, Cris, Adrián y a mi novio Jorge, siempre apoyándome e impulsándome.

Un reconocimiento especial al PAPIIT/UNAM Clave: IN200517 por su aportación al proyecto “Regulación transcripcional del gen *leuO* en *Salmonella Typhi*”, sigan promoviendo la investigación de calidad de Morelos y México.

DEDICATORIAS

A mi abue...

Aunque ya no estás aquí, esto fue y va ser siempre para ti. Fue difícil no tenerte conmigo, y que te hayas ido mientras yo estaba lejos de ti. Pero ya estás en paz, gozando del descanso eterno, te amaré por siempre boita Fide.

¡Gracias a Dios por regresarme a la vida!



*“Todo lo que hagan, háganlo con amor”
1 Corintios 16:14*

*“Hay dos grandes días en la vida de una persona: el día que nace, y el día que
descubre para qué”*

Boniface Mwang

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ABS	Activation binding site (Sitio de unión del activador)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AMP	Adenosín monofosfato
Amp	Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNt	ARN de transferencia
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
cFP	Dipéptido cíclico Phe-Pro
Cm	Cloranfenicol
°C	Grados Centígrados
Cys	Cisteína
ddNTPs	Didesoxinucleótidos
DEPC	Dietilpirocarbonato
D.O	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EHEC	<i>Escherichia. coli</i> enterohemorrágica
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay (técnica de retardo en la movilidad electroforética)
FT	Fiebre tifoidea
g	Gramos
GLM	Ganglios linfáticos mesentéricos
GDP	Guanosín difosfato
GTP	Guanosín trifosfato
h	Horas
H-NS	Histone-like nucleoid structuring (Proteína tipo histona)
HTH	Helix-turn-helix (Hélice-giro-hélice)
HYD	Dominio hidrolasa
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and genomes (Enciclopedia de genes y genomas.
KCl	Cloruro de potasio
Km	Kanamicina
KV	Kilovoltios
L	Litro
LB	Medio Luria Bertani
LPS	Lipopolisacárido
Lrp	Leucine-responsive regulatory protein (Proteína de respuesta leucina)
M	Molar
M9	Medio mínimo
Mb	Megabases 1x10 ⁶ pb
mg	Miligramos
min	Minutos
mM	Milimolar
ml	Mililitros
MN	Medio rico
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Micromolar

µs	Microsegundos
NaCl	Cloruro de Sodio
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONPG	Orto-nitrofenil-β-galactósido
P³²	Fósforo 32
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
pH	Potencial de Hidrogeno
PMN	Polimorfonucleares
pmol	Picomol
(p)ppGpp	Guanin tetrafosfato, Guanin pentafosfato
RAM	Regulator of amino acid metabolism (Dominio regulador de Metabolismo de Aminoácidos)
RBS	Regulatory binding site (Sitio de unión regulador)
RNAP	ARN polimerasa
RRM	Recognition of RNA motive (Motivo de reconocimiento del ARN)
SDS	Dodecilsulfato sódico
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by exponential enrichment (Evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial)
SPI	<i>Salmonella</i> pathogenicity islands (Islas de patogenicidad de <i>Salmonella</i>)
SST3	Sistema de secreción tipo 3
SYN	Dominio sintasa
T	Tiempo
T=0	Tiempo inicial
TAE	Buffer Tris-acetato-EDTA
TBE	Buffer Tris-borato-EDTA
TC	Toxina colérica
Tc	Tetraciclina
THG	Transferencia horizontal de genes
Trp	Triptófano
UAEM	Universidad Autónoma del Estado de Morelos
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UPEC	<i>Escherichia. coli</i> uropatógena
V	Voltios
VCS	Vacuola contenedora de <i>Salmonella</i>
WT	Cepa silvestre
x g	Fuerza centrífuga relativa expresada en g
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosódico
ZFD	Zinc Fingers Domain (Dominio de dedos de Zinc)
%	Porcentaje

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1 Generalidades de <i>Salmonella</i> .	2
2.2 <i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> serovar Typhi (<i>S. Typhi</i>).	3
2.3 Factores de virulencia de <i>Salmonella</i> .	5
2.4 Reguladores transcripcionales tipo LysR.	7
2.5 LeuO es un regulador global tipo LysR.	9
2.6 LeuO y su papel en la virulencia de múltiples patógenos.	10
2.7 Regulación de LeuO.	11
3. ANTECEDENTES	19
4. JUSTIFICACIÓN	22
5. HIPÓTESIS	22
6. OBJETIVO	22
6.1 Objetivos específicos.	22
7. METODOLOGÍA	23
7.1 Preparación de células electrocompetentes.	24
7.2 Transformación de las cepas.	24
7.3 Selección de clonas.	24
7.4 Condiciones de cultivo para las fusiones transcripcionales en las cepas WT, Δhns , Δlrp , Δhns Δlrp , $\Delta relA$, $\Delta lrp \Delta relA$ y $\Delta relA \Delta spoT$.	25
7.5 Cuantificación de proteína y actividad de β -galactosidasa.	25

7.6 Síntesis de (p)ppGpp por la inducción del gen <i>relA</i> en las cepas WT con las fusiones <i>pleuOP9</i> y <i>pleuOP9P8</i> .	26
7.7 Purificación de plásmidos pMPM-T6Ω, pALS13 y pALS14.	26
7.8 Digestión de los plásmidos.	27
7.9 Reacción de ligación.	27
7.10 Transformación en células electrocompetentes.	27
7.11 Comprobación de los plásmidos recombinantes por PCR.	28
7.12 Purificación de los plásmidos pFC13 y pFC14 y secuenciación.	28
7.13 Sobre-producción de la proteína RelA en cepas de <i>E. coli</i> Top10.	28
7.14 Síntesis de (p)ppGpp por la inducción de la proteína RelA en cepas WT con las fusiones <i>pleuOP9</i> y <i>pleuOP9P8</i> .	29
7.15 Gradiente de arabinosa en la cepa mutante $\Delta relA \Delta spoT$.	29
7.16 “Primer extension”.	29
7.16.1 Obtención y purificación de ARN total.	30
7.16.2 Marcaje del oligonucleótido pRS415-3’.	31
7.16.3 Reacción de secuenciación.	31
7.16.4 Síntesis de ADNc.	31
7.16.5 Análisis estadístico.	32
8. RESULTADOS	33
8.1 “Primer extension”	33
8.2 Actividad de β -galactosidasa de las fusiones transcripcionales <i>pleuOP9</i> y <i>pleuOP9P8</i> en los fondos genéticos WT, Δhns , Δlrp , $\Delta hns \Delta lrp$, $\Delta relA$, $\Delta relA \Delta spoT$, $\Delta lrp \Delta relA$ de la cepa <i>S. Typhi</i> IMSS 1.	36
8.2.1 Efecto de H-NS y Lrp (mutantes Δhns , Δlrp y $\Delta hns \Delta lrp$).	37
8.2.2 Efecto de (p)ppGpp (mutantes $\Delta relA$, $\Delta relA \Delta spoT$ y $\Delta lrp \Delta relA$).	40
8.3 Efecto de la sobre-expresión de RelA en la expresión de las fusiones <i>pleuOP9P8</i> y <i>pleuOP9</i> .	43
9. DISCUSIÓN	52
9.1 Efecto de H-NS y Lrp en los promotores P8 y P9 del gen <i>leuO</i> .	52
9.2 Efecto del (p)ppGpp en los promotores P8 y P9 del gen <i>leuO</i> .	54
9.3 Efecto del (p)ppGpp en un pulso por la sobre-inducción de la proteína RelA.	56
9.4 Los contrastes y las sutilezas de LeuO	62

10. CONCLUSIONES	66
11. PERSPECTIVAS	66
12. REFERENCIAS	67
13. ANEXOS	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Características de las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.	23
Tabla 2	Análisis de las secuencias consenso de los genes regulados por (p)ppGpp y de los promotores P8 y P9 del gen <i>leuO</i> .	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	La infección por <i>Salmonella</i> requiere la invasión de las células huésped.	5
Figura 2	Ilustración esquemática de los genes de SPI-1 y SPI-2 donde se indican sus categorías funcionales.	7
Figura 3	Estructura de un LTTR.	8
Figura 4	Regulación por LTTRs a sus genes blancos.	8
Figura 5	Esquema de localización del gen <i>leuO</i> en <i>S. Typhi</i> .	9
Figura 6	Mecanismo del relevo de promotor.	12
Figura 7	Esquema de síntesis de (p)ppGpp por RelA.	17
Figura 8	Metabolismo del (p)ppGpp.	18
Figura 9	Esquema de las diferentes construcciones de la región reguladora del gen <i>leuO</i> unidas a <i>lacZ</i> : <i>pleuO684</i> (-894 a +162), <i>pleuO226</i> (-436 a +162), <i>pleuO77</i> (-287 a +162), <i>pleuO49</i> (-260 a +162) y <i>pleuOJB</i> (-200 a +162); en <i>S. Typhi</i> .	19
Figura 10	Expresión de la región reguladora completa <i>pleuO684</i> (-894 a +162) de <i>leuO</i> en la fusión traduccional a <i>lacZ</i> en medio rico MN D.O. ₅₉₅ =0.6.	20
Figura 11	Promotores del gen <i>leuO</i> .	21
Figura 12	Modelo de regulación de los promotores a través de (p)ppGpp.	21
Figura 13	Secuencias de las fusiones <i>lacZ</i> transcripcionales <i>pleuOP9</i> (P9) y <i>pleuOP9P8</i> (P9P8).	34
Figura 14	Ensayo de “primer extension” de las fusiones <i>lacZ</i> transcripcionales <i>pleuOP9</i> y <i>pleuOP9P8</i> en medio M9 D.O. ₅₉₅ =0.6.	35
Figura 15	Fusiones <i>lacZ</i> transcripcionales <i>pleuOP9</i> (P9) y <i>pleuOP9P8</i> (P9P8).	36
Figura 16	Actividad de β-galactosidasa de la fusión transcripcional <i>pleuOP9P8-lacZ</i> en <i>Salmonella Typhi</i> IMSS1 en diferentes fondos genéticos.	37
Figura 17	Actividad de β-galactosidasa de la fusión transcripcional <i>pleuOP9P8-lacZ</i> en <i>Salmonella Typhi</i> IMSS 1 en diferentes fondos genéticos.	38
Figura 18	Actividad de β-galactosidasa de la fusión transcripcional <i>pleuOP9-lacZ</i> en <i>Salmonella Typhi</i> IMSS 1 en diferentes fondos genéticos.	39
Figura 19	Actividad de β-galactosidasa de la fusión transcripcional <i>pleuOP9-lacZ</i> en <i>Salmonella Typhi</i> IMSS 1 en diferentes fondos genéticos.	40
Figura 20	Actividad de β-galactosidasa de la fusión transcripcional <i>pleuOP9P8-lacZ</i> en <i>Salmonella Typhi</i> IMSS 1 en diferentes fondos genéticos.	41
Figura 21	Actividad de β-galactosidasa de la fusión transcripcional <i>pleuOP9P8 lacZ</i> en <i>Salmonella Typhi</i> IMSS 1 en diferentes fondos genéticos.	42
Figura 22	Actividad de β-galactosidasa de la fusión transcripcional <i>pleuOP9-lacZ</i> en <i>Salmonella Typhi</i> IMSS 1 en diferentes fondos genéticos.	42
Figura 23	Actividad de β-galactosidasa de la fusión transcripcional <i>pleuOP9-lacZ</i> en <i>Salmonella Typhi</i> IMSS 1 en diferentes fondos genéticos.	43

Figura 24	Distintas formas truncadas de la enzima RelA codificadas en los plásmidos pALS.	44
Figura 25	Caracterización del sistema RelA'.	46
Figura 26	Actividad de β -galactosidasa de las fusiones <i>pleuOP9P8-lacZ</i> y <i>pleuOP9-lacZ</i> en <i>Salmonella</i> Typhi IMSS 1 WT con los plásmidos pFC13 y pFC14 en el ensayo de inducción de la respuesta estricta (sistema RelA').	50
Figura 27	Curva de crecimiento de <i>S. Typhi</i> $\Delta relA \Delta spoT$ con el sistema RelA'.	51
Figura 28	Dos modelos de regulación de los promotores P8 y P9 a través de (p)ppGpp.	56
Figura 29	Modelo de regulación de los promotores P8 y P9 por H-NS, Lrp y (p)ppGpp.	61
Figura 30	Modelo alternativo de regulación de (p)ppGpp sobre P9.	61

RESUMEN

Salmonella enterica serovar Typhi (*S. Typhi*) es una bacteria Gram negativa, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, y agente etiológico de la fiebre tifoidea.

Para potenciar su patogenicidad, *S. Typhi* utiliza diferentes factores de virulencia, importantes durante el proceso infeccioso y desarrollo de la enfermedad, dentro de los que destacan los reguladores transcripcionales. Tal es el caso de *LeuO*, un regulador transcripcional dual, que desde sus primeros reportes fue involucrado en la regulación de genes implicados en la supervivencia bacteriana, condiciones de estrés y en la virulencia de varios patógenos.

Hasta el momento, se desconoce la señal precisa que desencadena la expresión de *leuO* en *S. Typhi*, ya que en un fondo silvestre se encuentra reprimido por las proteínas H-NS y Lrp. Por otro lado, se ha encontrado que la alarmona (p)ppGpp, presente durante la respuesta a estrés bacteriana, favorece su expresión en organismos como *E. coli*.

Dentro del grupo de trabajo del Dr. Calva, en el laboratorio de microbiología molecular del Instituto de Biotecnología UNAM, se ha estudiado la regulación del gen *leuO*, por medio del análisis de su región reguladora a través de diversos recortes de dicha región, fusionadas al gen reportero *lacZ*. Además, con el estudio de mutantes a reguladores como H-NS, Lrp y (p)ppGpp, se ha observado que estos intervienen en la modulación de su expresión.

En este trabajo, con el objetivo comprender mejor la regulación del gen *leuO*, mapeamos por la técnica de “primer extension” a los promotores P8 y P9, dos de los nueve promotores encontrados por nuestro grupo de trabajo en *S. Typhi*. Asimismo, encontramos que estos promotores son regulados negativamente por H-NS, Lrp, y de manera diferencial por (p)ppGpp, en donde proponemos que este último, sólo ejerce su efecto en un estado estable sin estrés y no en un pulso, en donde los dos sitios de interacción del (p)ppGpp con la ARN polimerasa, así como la concentración de la alarmona, juegan un papel esencial para favorecer o no su regulación sobre estos dos promotores del gen *leuO*.

1. INTRODUCCIÓN

En México, las enfermedades gastrointestinales infecciosas son consideradas un problema de salud pública, afectando a cualquier sector de la sociedad. Una de las infecciones gastrointestinales más comunes es la fiebre tifoidea (FT) cuyo agente etiológico es *Salmonella enterica* (Calva *et al.*, 1988).

Anualmente se han reportado hasta 21 millones de casos de FT en el mundo, de los cuales 600,000 mueren (OMS, 2019); y en México se han reportado anualmente 15,000 casos (IMSS, 2019). Es por ello que el estudio de *Salmonella* desde el punto de vista epidemiológico, inmunológico y molecular es de gran relevancia.

Diversos estudios, han estado encaminados a entender los factores de virulencia que favorecen la supervivencia bacteriana. *LeuO* es un regulador transcripcional tipo LysR que regula procesos involucrados en respuesta a estrés y virulencia (Takao *et al.*, 2014; Ante *et al.*, 2015; Rodríguez *et al.*, 2006; Lawley *et al.*, 2006; Tenor *et al.*, 2004), por lo que su estudio es importante para establecer un modelo que explique los mecanismos que desencadenan la expresión de un gen quiescente como *leuO*.

La regulación de *leuO* en *S. Typhi* ha resultado ser interesantemente compleja. Se ha confirmado por la técnica de “primer extension”, la existencia de siete promotores que participarían en su transcripción y dos promotores reversos dentro de su misma región intergénica. En nuestro laboratorio, se ha estudiado su regulación por medio del análisis de su región reguladora, a través de diversos recortes de dicha región fusionadas al gen reportero *lacZ* (Sánchez Popoca, 2015). Además, estudios de mutantes a reguladores como H-NS y Lrp y (p)ppGpp, así como ensayos de interacción DNA-proteína, han permitido entender mejor parte de su regulación.

Recientemente, se han encontrado dos nuevos inicios de transcripción, P8 y P9 los cuales podrían ser importantes para entender la complejidad de la regulación de este gen.

En el presente trabajo, se mapearon los inicios de transcripción de P8 y P9, además de evaluar el efecto de los reguladores H-NS, Lrp y (p)ppGpp al comparar

los fondos mutantes en estas proteínas, con la cepa silvestre en dos fusiones transcripcionales que contienen a ambos promotores. Adicionalmente, se evaluó el efecto de la sobre-producción de la alarmona (p)ppGpp en las fusiones transcripcionales, para observar si el efecto observado en las mutantes podía potenciarse en esta condición.

El presente estudio sugiere que estos dos promotores son regulados de manera negativa por H-NS y Lrp, y que (p)ppGpp sólo ejerce sus efectos durante el estado estable y no durante la respuesta estricta. Futuros estudios en mutantes en los sitios de unión de (p)ppGpp a la RNAP, ayudarían a detallar el mecanismo de regulación de (p)ppGpp para cada promotor de *leuO*, así como para observar si el efecto sobre estos promotores es directo, o se lleva a cabo a través de otro factor.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades de *Salmonella*.

Las infecciones agudas del tracto gastrointestinal figuran entre las enfermedades infecciosas más frecuentes, siendo la segunda causa de enfermedad en México con 5 375 702 casos hasta 2018 (Secretaría de Salud, 2019). Datos proporcionados por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2019), señalan que el agente etiológico *Salmonella* es una de las cuatro causas principales de enfermedades diarreicas a nivel mundial.

Salmonella es una bacteria patógena intracelular gramnegativa de la familia Enterobacteriaceae, que es móvil por flagelos peritricos (Borman *et al.*, 1944). Taxonómicamente, el género *Salmonella* se compone de dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica* (Langridge *et al.*, 2008). Esta última puede subdividirse en 6 subespecies diferentes: subespecie *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (V) (Langridge *et al.*, 2008). Además, basándose en diversas características bioquímicas; como los antígenos de superficie, la composición de sus estructuras de carbohidratos, flagelar y lipopolisacárido (LPS), *Salmonella* se diferencia en más de 2500 serovares (Hurley *et al.*, 2014; Pradha & Devi., 2019).

Existen dos cuadros clínicos principales de infección por *Salmonella*: gastroenteritis, que es la forma más común de salmonelosis producida por un gran número de serotipos de *Salmonella enterica* subespecie *enterica*, principalmente *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, con una amplia gama de huéspedes que contribuyen al resultado de la infección; y fiebre tifoidea producida por *S. Typhi*, y paratifoidea, que es una forma leve de la enfermedad producida por *S. Paratyphi*, las cuales solo afectan al humano el cual es el único reservorio conocido (Sánchez & Cardona., 2003; Pradha & Devi., 2019). Aunque la exposición a *Salmonella* es frecuente, se requiere de un inóculo de aproximadamente 10^6 - 10^8 bacterias para el desarrollo de la enfermedad sintomática; otros factores como el tipo de cepa y el estado fisiológico del hospedero, también favorecen o no su evolución (Sánchez & Cardona., 2003).

2.2 *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*).

La fiebre tifoidea o fiebre entérica es una enfermedad endémica en Asia, África y América del Sur, con una incidencia estimada de 17 a 21 millones de casos en todo el mundo cada año, y es la manifestación clínica de una infección generalizada sistémica, cuyo agente causal es *Salmonella enterica* serovar Typhi (Sasakawa, 2009).

S. Typhi pertenece al serotipo 9,12,d,Vi; el cual se define por las unidades de repetición de azúcar (9,12) del antígeno O, ubicado en el lipopolisacárido de membrana externa (LPS); el antígeno H (d) constituido por la proteína flagelar (flagelina); y el antígeno de polisacárido K capsular (Vi) (Calva *et al.*, 1988).

El ser humano es el principal reservorio de *S. Typhi*, la cual ingresa al cuerpo a través del tracto gastrointestinal, generalmente a través de la ingestión de agua o alimentos o contaminados de origen animal (principalmente huevos, carne, aves de corral y leche) (Datos OMS, 2019). El período de incubación de la FT es generalmente alrededor de 10 a 14 días y es caracterizada por fiebre, dolor de cabeza intenso, debilidad general y diarrea, así como náuseas, vómitos, pérdida de apetito, dolor abdominal, escalofríos, tos y dolor muscular; perforación intestinal y hemorragia, agrandamiento de los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM), bazo e hígado (Calva *et al.*, 1988; Sasakawa, 2009).

Después de la ingestión, la bacteria resiste el ambiente ácido del estómago y coloniza el intestino delgado, penetra las células epiteliales y ahí se adhiere a las células M del intestino, donde comenzará la invasión (Sasakawa, 2009).

Hay dos formas principales de entrada de *Salmonella* a la célula huésped; una es a través de las células M por transcitosis, un proceso pasivo por el cual las bacterias son absorbidas por estas células desde el lumen hacia el lado basolateral (Broz *et al.*, 2012). La segunda forma es la absorción inducida por la bacteria, mediante la secreción de proteínas efectoras que causan el “ruffling” de membrana, por el reordenamiento citoesquelético de las células epiteliales (Broz *et al.*, 2012). La entrada es seguida por la inflamación que conduce a la infiltración de células inmunes como neutrófilos, células T, células B, células dendríticas y macrófagos (Andino *et al.*, 2014). Además, las células inmunes de la lámina propia engloban a las bacterias y alcanzan el GLM (ganglio linfático mesentérico) a través de la sangre y el sistema linfático, desde donde viajan a tejidos más profundos como el bazo, el hígado e incluso a la médula ósea (Sasakawa, 2009).

En todos estos tejidos, las bacterias residen dentro de los macrófagos, en compartimentos endosómicos especializados llamados “vacuola que contiene *Salmonella*” (VCS) (**Figura 1**) donde proliferan, ya que se sabe, carecen de mecanismos de defensa antimicrobiana del huésped (Sasakawa, 2009). Al llegar a este punto, *Salmonella* evita la fusión de VCS con el lisosoma y por lo tanto, proporciona un mejor nicho para su supervivencia y propagación (Andino *et al.*, 2014). Finalmente, la apoptosis de los macrófagos libera a la bacteria, que luego reinvierte las células epiteliales cercanas u otras células fagocíticas del sistema inmunitario del huésped (Andino *et al.*, 2014; Pradha & Devi., 2019).

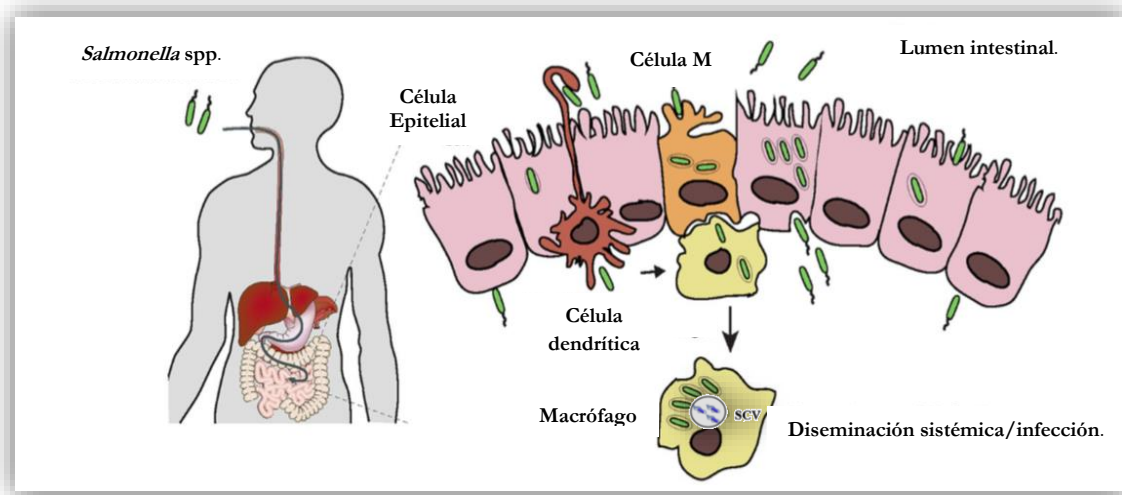


Figura 1. La infección por *Salmonella* requiere la invasión de las células huésped. Después de la ingestión y el paso por el estómago, *Salmonella* ingresa preferentemente a las células M por transcitosis y pasa a los macrófagos subyacentes. Aquí, *Salmonella* puede evadir la muerte al causar apoptosis que conduce a su liberación, o sobrevivir y replicarse el tiempo suficiente para permitir la propagación sistémica a los GLM, bazo e hígado a través de la sangre y el sistema linfático. (GLM- ganglio linfático mesentérico, VCS- vacuola contenedora de *Salmonella* (Tomado y modificado Hume *et al.*, 2017).

2.3 Factores de virulencia de *Salmonella*.

Para la mayoría de los patógenos bacterianos como *Salmonella*, la virulencia requiere múltiples factores. Se cree que la necesidad de tantos determinantes de virulencia, refleja las complejas interacciones de la bacteria con el huésped infectado (Sánchez & Cardona., 2003). Además, la supervivencia bacteriana en el hospedero, se origina como resultado de un delicado equilibrio de muchos productos genéticos, que actúan en el momento correcto y en la ubicación correcta (Sánchez & Cardona., 2003; Groisman & Ochman., 1997).

Se pueden distinguir dos tipos de factores de virulencia: por un lado las estructuras superficiales de la bacteria, que son además blancos del sistema inmune del hospedero, como el LPS y los flagelos, que dirigen a la bacteria al epitelio intestinal por quimiotaxis; la cápsula, directamente relacionada con la capacidad invasiva de *S. Typhi*; y las fimbrias (Betancor *et al.*, 2012; Hurley *et al.*, 2014). Por otro lado, se encuentran los factores de virulencia como toxinas, endotoxinas, invasinas, sistemas de secreción de proteínas y sistemas de absorción de hierro, los cuales modifican la fisiología celular del hospedero, y son los principales factores de patogenicidad codificados en islas de patogenicidad (SPIs),

adquiridas por transferencia horizontal de genes (THG) durante la evolución bacteriana (Betancor *et al.*, 2012; Hurley *et al.*, 2014; Sánchez & Cardona, 2003; Martínez, 2007).

Las islas de patogenicidad suelen acomodar grandes grupos de genes que contribuyen a un fenotipo de virulencia particular, el cual generalmente se manifiesta en un momento específico durante el curso de la infección (Betancor *et al.*, 2012; Marcus *et al.*, 2000).

Durante su invasión, *S. Typhi* interactúa con las células hospederas mediante dos sistemas de secreción tipo tres (SST3), codificados en dos islas de patogenicidad SPI-1 y SPI-2 de las cinco conocidas hasta el momento (**Figura 2**) (Betancor *et al.*, 2012; Hurley *et al.*, 2014; Marcus *et al.*, 2000). El SST3, media la transferencia de proteínas efectoras de virulencia bacteriana desde la bacteria hacia las células del hospedero (Hurley *et al.*, 2014). Una vez dentro del citoplasma de la célula eucariota, estos efectores pueden alterar diversas funciones celulares, para promover la supervivencia y replicación bacterianas. Este sistema de efectores está compuesto por más de veinte proteínas estructurales, que conforman una estructura conocida como “complejo en aguja”, que atraviesa la pared bacteriana desde la membrana interna a la externa; y otra estructura denominada “translocón”, responsable de formar un poro en la membrana de la célula eucariota para el ingreso de los efectores translocados (Figuroa-Ochoa & Verdugo, 2005).

El SST3 codificado en SPI-1, funciona durante el contacto de la bacteria con la célula hospedadora, y transloca efectores a través de la membrana plasmática de la misma, mientras que el SST3 codificado en SPI-2, es expresado dentro del fagosoma, y transloca proteínas a través de la membrana de la vacuola (Betancor *et al.*, 2012). Ha sido demostrado, que la expresión del SST3 codificado en SPI-1 es esencial para inducir la internalización bacteriana por células no fagocíticas (Figuroa-Ochoa & Verdugo, 2005). En cambio, el codificado en SPI-2, es fundamental para la persistencia intracelular en macrófagos, y para el establecimiento de la infección sistémica en el modelo murino. Sin embargo, se sabe que ambos SST3 no actúan en forma independiente sino que colaboran entre sí (Figuroa-Ochoa & Verdugo, 2005).

Diversos factores de virulencia se encuentran bajo el control de reguladores transcripcionales. La familia de reguladores transcripcionales LysR, representa el tipo de regulador transcripcional más abundante en el reino procarionta, sin duda elemento importante para regular genes involucrados durante la invasión de *Salmonella* (Maddocks & Oyston, 2008).

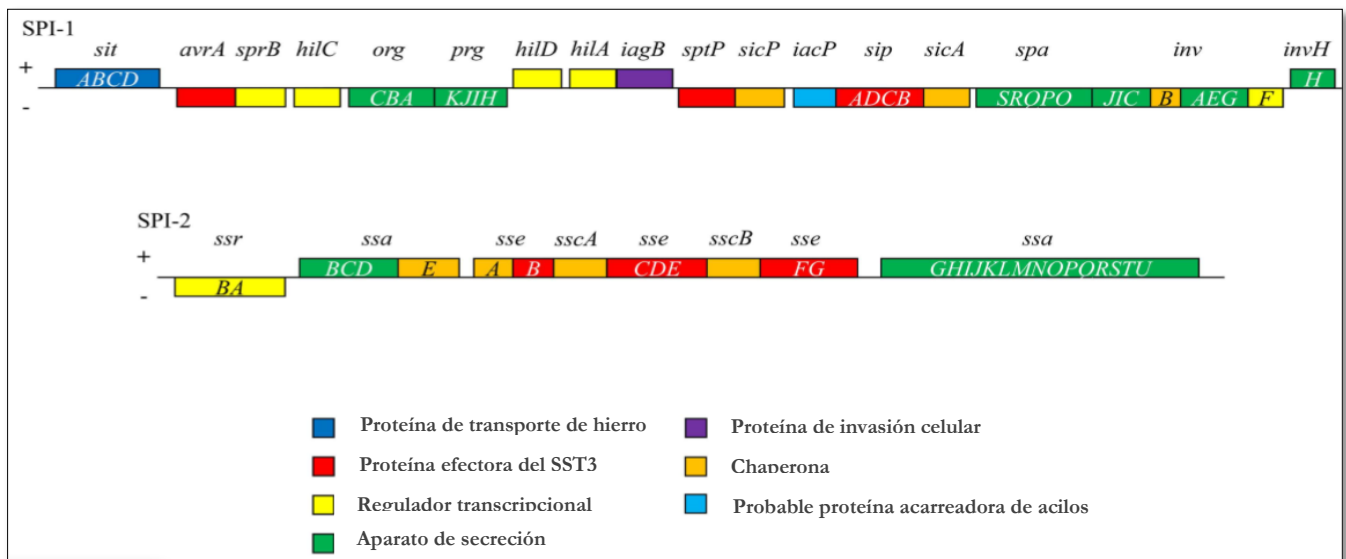


Figura 2. Ilustración esquemática de los genes de SPI-1 y SPI-2 donde se indican sus categorías funcionales. En *Salmonella*, SPI-1 y SPI-2 codifican una gama de proteínas efectoras, aparatos de secreción y reguladores transcripcionales además de SST3-1 y SST3-2. La expresión del SST3 codificado en SPI-1 es esencial para inducir la internalización bacteriana por células no fagocíticas. En cambio, el codificado en SPI-2, es fundamental para la persistencia intracelular en macrófagos. En códigos de colores se clasifican a los genes codificados dentro de estas dos islas de patogenicidad (Tomado y modificado de Hurley et al., 2014).

2.4 Reguladores transcripcionales tipo LysR.

El genoma de *Salmonella* Typhi CT18 comprende 4.8 Mb, con aproximadamente 4800 genes, de los cuales se ha calculado que el 4% son genes de virulencia bajo el control de reguladores transcripcionales (Sasakawa, 2009). Las proteínas de la familia LysR (LTTRs) son reguladores transcripcionales globales, ampliamente distribuidos en procariontas (Maddocks & Oyston, 2008). Estas proteínas regulan genes cuyos productos están involucrados en el metabolismo, división celular, virulencia, motilidad, respuestas a estrés oxidativo, producción de toxinas, fijación y secreción, por nombrar algunos (Maddocks & Oyston, 2008). Los miembros de esta familia tienen una estructura conservada con un motivo de hélice-giro-hélice de

unión al ADN N-terminal y un dominio de unión a co-inductor C-terminal, y activan o reprimen la transcripción de un gen divergente y reprimen su propia transcripción (**Figura 3**) (Schell, 1993).



Figura 3. Estructura de un LTRR. Los miembros de esta familia tienen una estructura conservada con un motivo de hélice-giro-hélice de unión al ADN N-terminal y un dominio de unión a co-inductor C-terminal, y activan o reprimen la transcripción de un gen divergente y reprimen su propia transcripción (Modificado de Maddocks & Oyston, 2008).

La regulación de los LysR, comienza en dos sitios de unión al ADN: RBS (sitio de unión regulador) y ABS (sitio de unión del activador) (**Figura 4**) (Maddocks & Oyston, 2008). En dichos sitios, pueden unirse de manera dimérica y posteriormente puede unirse un co-inductor. La interacción entre los dímeros dobla el ADN, formando una oligomerización tetramérica (la unión del coinductor relaja el doblado del ADN), y favoreciendo el reclutamiento de la ARN polimerasa (RNAP) hacia el promotor, lo cual permite la transcripción del gen (Maddocks & Oyston, 2008).

A este grupo de reguladores transcripcionales pertenece LeuO, un regulador muy importante implicado en virulencia y en la respuesta a estrés de *Salmonella*.

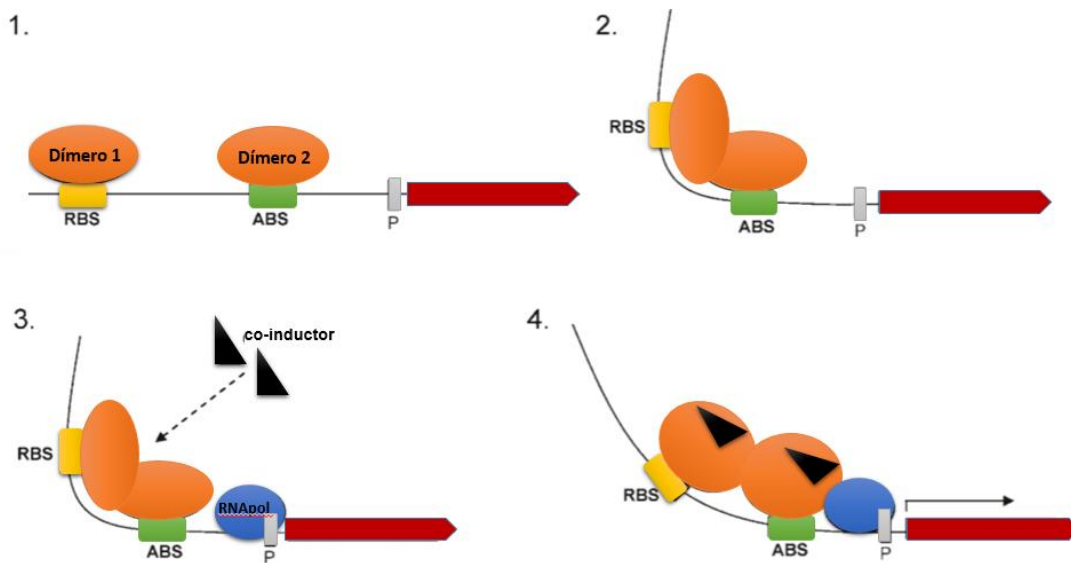


Figura 4. Regulación por LTRRs a sus genes blanco. (1) Se muestran los dímeros de LTRR unidos a las regiones RBS (sitio de unión regulatorio) y ABS (sitio de unión activador) respectivamente. (2) El doblaje del ADN, se da por la interacción entre los dímeros que forma una oligomerización tetramérica. (3) La ARN polimerasa se une al promotor aunque el doblaje del ADN no favorece la transcripción, pues no está el contacto con el coinductor. (4) La unión del coinductor al tetrámero hace que el doblaje del ADN se relaje y haya un mejor contacto con la ARN polimerasa, activando la transcripción del gen blanco (Modificado de Maddocks & Oyston, 2008).

2.5 LeuO es un regulador global tipo LysR.

LeuO pertenece a la familia LysR de reguladores transcripcionales presentes en *Enterobacteriaceae* como *Yersinia*, *Shigella*, *Escherichia coli* y *Salmonella* (Schell, 1993). La proteína LeuO de 314 aminoácidos, se encuentra localizada entre la posición 135983 y 136927 del genoma de *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18, entre los operones *leuABCD* e *ilvIH*, implicados en la biosíntesis de leucina y, de isoleucina y valina, respectivamente (KEGG, Enciclopedia de Genes y Genomas Kyoto) (**Figura 5**). 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).

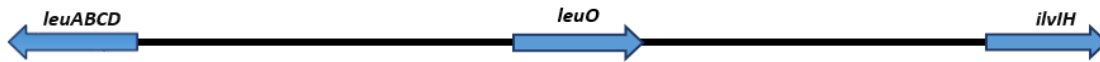


Figura 5. Esquema de localización del gen *leuO* en *S. Typhi*. El gen *leuO* se localiza entre los operones *leuABCD* e *ilvIH* implicados en la biosíntesis de leucina y, de isoleucina y valina, respectivamente.

En 1995 Shi y Bennett demostraron que en una mutante en la proteína H-NS, la sobreexpresión de *leuO* reprimía la expresión de *cadC*, un regulador importante del operón *cadAB*, involucrado en la respuesta a cambios de pH. Más tarde, se determinó que LeuO reduce la traducción de *rpoS* (que codifica para el factor σ^S), mediante la represión del regulador DsrA, que regula positivamente la traducción de *rpoS* principalmente a baja temperatura (Klauck *et al.*, 1997). Curiosamente, en ambos casos, LeuO reprime indirectamente la expresión del operón *cadAB* y la traducción de *rpoS*.

Del mismo modo, la sobre-expresión de *leuO* favorece la activación del operón *bgl*, el cual está involucrado en la utilización de algunos β -glucósidos (salicina y arbutirina) (Ueguchi *et al.*, 1998). En estos estudios se puso en evidencia la relación entre LeuO y la proteína H-NS; ya que tanto *bgl*, *dsrA*, *cadC* y el propio *leuO* se encuentran regulados directamente por H-NS (Chen *et al.*, 2005; Guadarrama 2004;

Klauck *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 1993; Yamashino *et al.*, 1995). Además, estudios de inmuno-precipitación de cromatina (ChIP-chip) y SELEX genómico en *Salmonella* Typhimurium y *Escherichia coli*, han fortalecido la hipótesis de que LeuO juega un papel como antagonista de H-NS, dado su capacidad para unirse a los mismos blancos (Shimada *et al.*, 2011; Dillon *et al.*, 2012; Shimada *et al.*, 2016).

Estudios proteómicos en *S. Typhi*, han evidenciado la capacidad de LeuO para ser un regulador global, ya que su sobreexpresión induce la expresión de dos genes inactivos que codifican para las porinas OmpS1 y OmpS2, capaces de inducir una fuerte respuesta inmune en modelos de ratón (Rodríguez-Morales *et al.*, 2006). LeuO también regula positivamente a *assT* (una arilsulfato sulfotransferasa putativa) y *casA* (nucleasa del sistema CRISPR-Cas); y negativamente *ompX* (porina transportadora de compuestos hidrofóbicos) y *tpx* (tiol peroxidasa, una enzima antioxidante periplásmica) (Guadarrama *et al.*, 2014; Hernández-Lucas *et al.*, 2008). Con todo y lo anterior, por primera vez en un estudio detallado de la expresión *ompS1*, se demostró que LeuO ejerce un papel antagonista hacia H-NS (De la Cruz *et al.*, 2007; Fernández-Mora *et al.*, 2004; Hernández-Lucas *et al.*, 2008; Rodríguez-Morales *et al.*, 2006).

2.6 LeuO y su papel en la virulencia de múltiples patógenos.

LeuO se expresa a un nivel muy bajo en condiciones estándar de laboratorio, sin embargo, *in vivo* tiene un papel importante en la supervivencia bacteriana. En *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, la mutación de *leuO* atenúa significativamente la infección en ratón (Rodríguez-Morales *et al.*, 2006), además se ha reportado que LeuO es un factor expresado a los siete días post infección (Lawley, *et al.*, 2006). Asimismo, las cepas de *S. Typhimurium* que carecen de las porinas OmpS1 y OmpS2, cuya producción es controlada por LeuO, están atenuadas en virulencia. En conjunto, esto sugiere que LeuO controla la virulencia por vías que incluyen la regulación de las porinas OmpS1 y OmpS2 (Rodríguez-Morales *et al.*, 2006). En *S. Typhimurium*, también se ha reportado que LeuO induce la expresión de *sdiA*, un regulador transcripcional que responde a moléculas de quorum, producidas por otras especies bacterianas durante la infección de

Salmonella (Turnbull *et al.*, 2012). Por otra parte, se ha demostrado que LeuO en *S. Typhimurium* reprime la expresión de la isla de patogenicidad 1 (SPI1), e inhibe la invasión de las células epiteliales (Espinosa & Casadesus, 2014). Además, LeuO favorece la expresión de *hilE*; un regulador negativo de HilD, el regulador maestro de los genes de la SPI1. Ahora bien, mediante estudios de ChIP-chip, también demostraron sitios blanco de LeuO en el gen *sopA*, el cual codifica para una proteína que es translocada por el sistema de secreción tipo III de la SPI1; y el gen *sifA*, un efector translocado por el sistema de secreción tipo III de la SPI2 (Dillon *et al.*, 2012). Finalmente, se ha evidenciado en este modelo de estudio, que LeuO podría tener una función en la comunicación de la bacteria con el sistema inmune del hospedero, ya que una cepa con una mutación nula en *leuO* exhibe niveles de invasión semejantes a la cepa silvestre, pero reduce significativamente la migración transepitelial de células polimorfonucleares (PMN) (Tenor *et al.*, 2004).

LeuO juega un papel importante como regulador de la virulencia en múltiples patógenos además de *Salmonella enterica*. En *Yersinia enterocolitica*, se encontró que LeuO regula positivamente a *rovA*, un regulador tipo MarR/SlyA que media la transcripción de una invasina, la cual es el principal factor de adherencia en esta bacteria (Lawrenz *et al.*, 2007). En *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), LeuO favorece la expresión del operón *LEE1*, el cual codifica para proteínas efectoras relacionadas con el esfacelamiento de los enterocitos (Takao *et al.*, 2014). Por otra parte, en *Vibrio cholerae* la activación de LeuO está asociada a la formación de biopelícula, la resistencia al pH ácido y a la bilis, esta última favorecida por la activación del regulador *toxR* (Ante *et al.*, 2015a; Ante *et al.*, 2015b; Moorthy & Watnick, 2005). No obstante, se ha demostrado que la sobre-inducción de LeuO reprime la expresión de la toxina colérica (TC) y la pilina corregulada por la toxina (Bina *et al.*, 2013).

2.7 Regulación de LeuO.

Hasta el momento se desconoce la señal que promueve la expresión de LeuO. En 1998, en un intento por entender la regulación de este gen, Fang y Wu propusieron un modelo llamado “mecanismo de relevo de promotor” (**Figura 6**) para la cepa *S.*

Typhimurium CH582, que explica la expresión coordinada del grupo de genes *ilvIH-leuO-leuABCD*. En este estudio se utilizó la cepa *leu-500*, la cual posee una mutación que la hace auxótrofa para leucina (mutación en el promotor del operón *leuABC*). Dicha mutación, era suprimida en un fondo mutante en la topoisomerasa (*topA-*), lo cual significaba que el superenrollamiento del ADN era un factor importante en dicha supresión. Este fenómeno fue explicado por dicho mecanismo, el cual establece que la activación de *pleu-500*, es consecuencia de la actividad transcripcional del promotor distante *pilvIH*, lo cual produce un superenrollamiento local, causando una interacción promotor-promotor y activando de esta manera el promotor *p_{leuO}*, normalmente reprimido. Esta activación a su vez promueve la actividad del promotor *p_{leu-500}*, por medio de la proteína LeuO y por el cambio en el superenrollamiento, causado por la interacción entre todos los promotores. En resumen, la actividad del promotor *pilvIH* desencadena la expresión de *leuO*, que a su vez desencadena la expresión de *leuABCD* (Fang & Wu, 1998a).

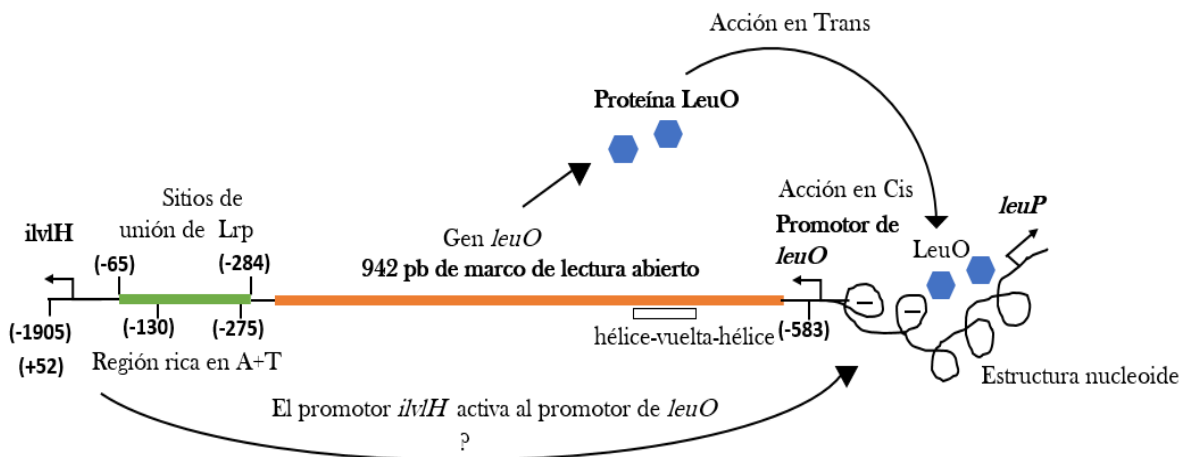


Figura 6. Mecanismo del relevo de promotor. El superenrollamiento local de la transcripción de *ilvIH* estimula la activación del promotor *leuO*. El superenrollamiento ocasionado por transcripción de *leuO*, así como su actuación en trans (LeuO) activan la expresión de *leu500* (Modificado de Fang & Wu, 1998).

Este mecanismo involucra al regulador Lrp (proteína de respuesta a leucina), el cual activa el promotor de *ilvIH*, probablemente debido a la escasez de leucina, señal que sería detectada por este regulador (Platko *et al.*, 1990); demostrándose así que

la activación de *ilvIH* contribuye en la expresión de *leuO* (Fang & Wu, 1998a, Fang & Wu, 1998b).

Inicialmente, se reportó que la ausencia de leucina era el principal inductor de este mecanismo regulatorio, con base en las observaciones derivadas de la respuesta al ayuno de aminoácidos (aa) de cadena ramificada (Majumder *et al.*, 2000). Posteriormente, se demostró que en *E. coli* que la mayor expresión de *leuO* ocurría en un medio con 19 aa (sin leucina), seguida de un medio con 17 aa (sin los aa de cadena ramificada) (Stratmann *et al.*, 2012). Con esta información, también se pudo deducir que la expresión de *leuO* se ve afectada en condiciones de estrés (Fang & Wu, 1998b).

Más adelante se encontró que en *E. coli* también ocurre el mecanismo de relevo de promotor (Chen *et al.*, 2005), y que en ambas bacterias, la expresión de *leuO* se induce en la entrada a la fase estacionaria bajo limitación de nutrientes. Sin embargo, *leuO* no está bajo el control del factor RpoS; y su expresión requiere la presencia de la alarmona (p)ppGpp la cual se produce en condiciones de limitación de aminoácidos (Klauck *et al.*, 1997; Fang *et al.*, 2000; Majumder *et al.*, 2000). Fue así como se propuso un modelo en el cual la alarmona (p)ppGpp favorece la expresión de Lrp (Landgraf & Calvo, 1996), y este a su vez activa la expresión de *ilvIH* (Platko *et al.*, 1990) y consecuentemente desencadena el mecanismo de relevo de promotor (Fang & Wu, 1998a). Estudios posteriores, demostraron la relación entre (p)ppGpp y LeuO, siendo este último indispensable para reanudar el arresto de crecimiento en *E. coli*, debido al ayuno de aminoácidos de cadena ramificada (isoleucina, leucina y valina). Ese arresto en el crecimiento es causado por la respuesta estricta, donde se sabe que (p)ppGpp es un regulador global que controla la expresión de genes asociados a la respuesta a estrés (Cashel & Gallant, 1969; Majumder *et al.*, 2001).

Estudios más detallados de la región reguladora de *leuO*, demostraron que tiene una región rica en AT (elemento AT4 de 72 pares de bases) que es importante para la regulación negativa de este gen (Chen *et al.*, 2001). Dicha región tiene dos partes funcionales: una de 47 pb (elemento AT8) que conserva su actividad represiva; y otra de 25 pb (elemento AT7) en donde LeuO puede unirse para mediar

su propia desrepresión (Chen *et al.*, 2003). Estudios posteriores del elemento AT8 comprobaron que es un sitio de nucleación de la proteína tipo histona H-NS (Chen *et al.*, 2005).

De igual forma, un estudio proteómico en *E. coli* determinó que *leuO* forma parte de un listado de genes que se inducen en un medio limitante en fosfato (VanBoglen *et al.*, 1996). Esto sugiere que LeuO podría ser importante para la respuesta adaptativa a condiciones de estrés para la bacteria. Por otra parte, Stratmann y colaboradores (2012) reportaron que el heterodímero RscB-BglJ (regulador de síntesis de cápsula) activa la expresión de *leuO* en *E. coli*. Esta regulación ocurre a nivel de promotor 2 (*pleuO* 2) descrito en ese trabajo. Además del efecto positivo de RscB-BglJ, se reportó represión de *leuO* por H-NS y StpA y autorregulación negativa durante la sobre-inducción.

Del mismo modo en *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), la expresión de *leuO* se potencia significativamente en un medio con butirato, un ácido graso de cadena corta producido por la microbiota, el cual induce genes de virulencia en EHEC (Takao *et al.* 2014). Asimismo, esta inducción de *leuO* promueve la expresión de los genes de la isla de patogenicidad LEE (Takao *et al.* 2014).

Por otra parte, se observó que sobre-inducción de LrhA miembro de la familia LysR y conocido por regular genes asociados a fimbrias, activa la expresión de *leuO* en *E. coli* (Breddermann & Schnetz, 2017).

SlyA es otro factor transcripcional reportado, que modula positivamente a *leuO* en *E. coli* (Buchmeier *et al.*, 1997). Este factor está involucrado en la síntesis de cápsula y formación de biopelícula; y un estudio transcriptómico reveló que *leuO* forma parte del regulón de SlyA (Curran *et al.*, 2017).

Estudios posteriores han demostrado que el dipéptido cíclico Phe-Pro (cFP), el cual es excretado por *Vibrio. spp*, induce significativamente la expresión de *leuO* a través de ToxR, el cual es capaz de sensar el cFP, y posteriormente unirse a la región reguladora de *leuO* para activar su transcripción. La expresión de *leuO* en este estudio fue confirmada *in vivo* al visualizarse en intestinos de ratones infectados con *V. cholerae* (Bina *et al.*, 2013). También se ha observado en *V. cholerae* que las sales biliares favorecen la inducción de *leuO* (Ante *et al.*, 2015a).

En *S. Typhi*, se desconoce la señal que desencadena la expresión de *leuO*. Dado que H-NS, Lrp y (p)ppGpp son reguladores globales capaces de regular la expresión de *leuO* (Fang *et al.*, 2000; De la Cruz *et al.*, 2007; Shimada *et al.*, 2011; Dillon *et al.*, 2012; Landgraf *et al.*, 1996; Majumder *et al.*, 2001; Platko *et al.*, 1990; Sánchez-Popoca, 2015; Sánchez-Popoca, 2019), este trabajo está enfocado en estudiar el papel de estos reguladores en el control transcripcional, a nivel de dos de los múltiples promotores de *leuO*.

La proteína de unión al ADN asociada a nucleóide H-NS, es un importante represor global de la transcripción en bacterias gram negativas, y reprime la transcripción de genes adquiridos por transferencia horizontal (Stoebel *et al.*, 2008). Esta proteína es afín a regiones con un alto contenido en A-T, formando dímeros en solución, los cuales crean puentes ADN-proteína-ADN mediante su unión a centros de alta afinidad llamados sitios de nucleación, evitando así la transcripción (Dorman, 2007; Dorman *et al.*, 2017).

LeuO se ha identificado como una proteína que puede impedir la polimerización de H-NS a lo largo del ADN (De la Cruz *et al.*, 2007). Una de las funciones de LeuO es contrarrestar la actividad represiva de la proteína H-NS en su propio promotor, esto lo hace mediante la unión a un sitio entre el promotor y un sitio de nucleación para H-NS, esta acción bloquea la propagación del filamento H-NS-ADN, preservando el promotor *leuO* en un estado transcripcionalmente activo. (Chen & Wu, 2005; Chen *et al.*, 2005; Stoebel *et al.*, 2008). Se ha demostrado que LeuO desplaza a H-NS en el promotor de *ompS1* en *S. Typhi* (De la Cruz *et al.*, 2007), lo que demuestra que su mecanismo de acción, no se limita sólo a impedir la polimerización de H-NS a lo largo del ADN.

Por otro lado, se ha reportado que H-NS es asistida por la proteína Lrp para formar una estructura represora, involucrada en la regulación de la transcripción del ARN ribosomal *rrnB* (Pul Ü *et al.*, 2007). Lrp es un regulador maestro del metabolismo bacteriano y se encuentra altamente distribuido en arquea y eubacteria (Brinkman *et al.*, 2003). Afecta la expresión de muchos genes, algunos de forma negativa y otros de manera positiva. Entre los operones regulados por Lrp, los que funcionan en rutas biosintéticas son estimulados, mientras que los que participan

en rutas catabólicas son reprimidos. Su estructura consta de un dominio de unión al ADN (HTH) en el extremo N-terminal, y un dominio de unión a ligando conocido como RAM (Regulador de Metabolismo de Aminoácidos) en el extremo C-terminal (Brinkman *et al.*, 2003).

La presencia de leucina puede afectar el rol regulador de Lrp, ya que en algunos casos, la leucina potencia el efecto de Lrp y en otros casos lo disminuye (Hart *et al.*, 2011). *In vivo*, se cree que existe en un equilibrio entre estados octaméricos y hexadecaméricos de Lrp, y que la unión de la leucina favorece la formación de octámeros sobre hexadecámeros (Brinkman *et al.*, 2003). Estudios recientes, también indican que la Lrp puede responder a otros aminoácidos como la alanina, metionina, isoleucina, histidina y treonina (Brinkman *et al.*, 2003; Shimada *et al.*, 2009; Shimada *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2001; Hart *et al.*, 2011). Por otro lado, un análisis footprinting *in vivo* mostró que Lrp se une a la región promotora de *ilvIH*, y que la expresión del promotor de Lrp *in vivo* es estimulado por (p)ppGpp (Marasco *et al.*, 1994; Landgraf *et al.*, 1996).

(p)ppGpp es una alarmona que tiene diversos efectos moleculares en la respuesta estricta bacteriana, debido a la limitación de nutrientes (Cashel & Gallant, 1969). Las características distintivas de la respuesta estricta, son la acumulación de (p)ppGpp y el arresto del crecimiento, a través de la represión de la síntesis de ARN ribosomal, durante el ayuno de nutrientes como aminoácidos u otros tipos de estrés (Cashel & Gallant, 1969; Dalebroux & Swanson, 2012).

Cuando los aminoácidos se vuelven limitantes, los ARNt no cargados se unen al sitio A de la subunidad 50s del ribosoma, indicando a la enzima sintetasa monofuncional RelA asociada al ribosoma, que sintetice pppGpp y ppGpp (colectivamente llamado (p)ppGpp), a partir de GTP o GDP y ATP respectivamente (**Figura 7**) (Cashel *et al.*, 1996). Además de RelA, (p)ppGpp también es producido por la enzima bifuncional SpoT, aparentemente en respuesta a diversas señales, como la fuente carbono, los niveles de hierro y la inanición de ácidos grasos (Metzger *et al.*, 1989; Xiao *et al.*, 1991; Seyfzadeh *et al.*, 1993; Vinella *et al.*, 2005). Sin embargo, se ha demostrado que RelA también puede responder a la disponibilidad de carbono en el medio (Murray *et al.*, 2003; Schneider & Gourse,

2003). La actividad sintasa de SpoT no es tan robusta como la de RelA, ya que también tiene actividad de hidrolasa de (p)ppGpp y por lo tanto, es determinante para modular la concentración intracelular de esta alarmona (**Figura 8**) (Gourse *et al.*, 2018; Dalebroux *et al.*, 2010; Laffer & Gallant, 1974).

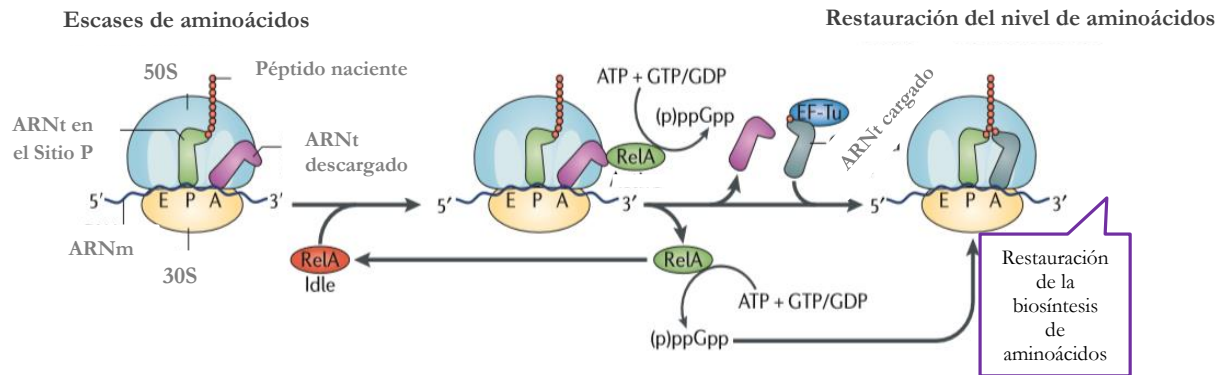


Figura 7. Esquema de síntesis de (p)ppGpp por RelA. El ayuno de aminoácidos conduce a la acumulación de ARNts descargados en el citosol y estos se unen al sitio A del ribosoma. Este estado ribosomal es reconocido por RelA, el cual se une a la subunidad 50s adquiriendo su forma activa para sintetizar (p)ppGpp. Al sintetizar (p)ppGpp, RelA se disocia del ribosoma seguido de varias rondas de síntesis de (p)ppGpp, y el incremento de niveles de (p)ppGpp promueve su interacción con la RNAP en sinergia con DksA; de tal manera que se direccionan los recursos celulares a la represión de genes ribosomales y de síntesis de proteínas, así como a la activación de genes relacionados con biosíntesis de aminoácidos (Modificado de Hauriliuk *et al.*, 2016).

Una vez producido el (p)ppGpp, la alarmona en forma de pentafofato (pppGpp) puede ser metabolizada a tetrafofato por la enzima GppA (**Figura 8**) (Haurilyuk *et al.*, 2016; Kanjee *et al.*, 2012). De acuerdo con algunas evidencias, el guanin tetrafofato (ppGpp) es más abundante que el guanin pentafofato (pppGpp) (Haurilyuk *et al.*, 2016). Se ha demostrado, que el ppGpp es casi diez veces más eficiente que el pppGpp para abatir el crecimiento, disminuir la síntesis de ARN y regular a sus genes blanco (Mechold *et al.*, 2013).

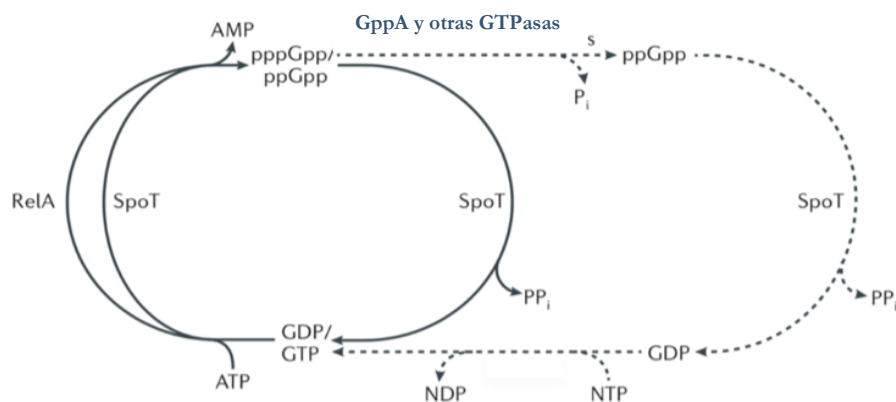


Figura 8. Metabolismo del (p)ppGpp. RelA y SpoT pueden utilizar GTP o GDP y ATP, para producir la forma de pentafofosfato (pppGpp) o tetrafofosfato (ppGpp) además de AMP. A su vez, SpoT puede hidrolizar pppGpp y ppGpp para generar GTP y GDP respectivamente. La fosfatasa GppA puede remover un fosfato del pppGpp para generar ppGpp (Tomado de Sanchez-Vazquez, 2019).

El (p)ppGpp, junto con el factor DksA regula la expresión génica en *E. coli*, uniéndose a la RNAP (Perederina *et al.*, 2004). DksA también actúa junto con (p)ppGpp en muchas otras especies bacterianas (Paul *et al.*, 2004; Perederina *et al.*, 2004).

El (p)ppGpp es capaz de inducir la respuesta estricta, uniéndose a dos sitios distintos de la RNAP de *E. coli*; el sitio 1 se encuentra en la interface de la subunidad β' y el factor ω (Mechold *et al.*, 2013; Ross *et al.*, 2013). Este sitio no requiere de la participación de DksA y podría ser el responsable de los efectos de (p)ppGpp cuando se encuentra en bajas concentraciones (Ross *et al.*, 2016). El sitio 2 de unión de (p)ppGpp está en la interfaz de la subunidad β' y del factor DksA. Este sitio se requiere en concentraciones altas de (p)ppGpp (suficientes para ocupar ambos sitios), y al parecer aporta la mayor parte de efectos de la transcripción de (p)ppGpp *in vitro* e *in vivo* (Sanchez-Vazquez *et al.*, 2019; Ross *et al.*, 2016).

Además, esta alarmona se ha asociado al control de genes de virulencia en diversos microorganismos patógenos, como *E. coli* EHEC y UPEC, *Pseudomonas aeruginosa*, *V. cholerae* y *S. Typhimurium*, donde controla la expresión de *invF*, *hilA* y *spvR*; y en donde una mutante en las enzimas que biosintetizan el (p)ppGpp, muestra atenuación en el modelo de ratón (Dalebroux *et al.*, 2010; Pizarro-Cerdá & Tedin *et al.*, 2004).

3. ANTECEDENTES

En el laboratorio de microbiología molecular, se ha intentado caracterizar la regulación del gen *leuO* de *Salmonella Typhi*. En 2015, Sánchez Popoca analizó el papel de H-NS y Lrp sobre la región 5' reguladora del gen *leuO* de Typhi (de alrededor 600 pb), utilizando fusiones traduccionales *leuO-lacZ* de diferentes longitudes y midiendo la actividad del reportero *lacZ* (**Figura 9**). Comparando la expresión de estas fusiones traduccionales en la cepa silvestre (WT), con la expresión en la doble mutante $\Delta hns \Delta lrp$, se encontró que las proteínas reguladoras H-NS y Lrp, actúan en conjunto para reprimir la expresión de *leuO* (**Figura 10**). Esto se ha sido confirmado mediante análisis de interacción ADN-proteína usando la técnica de retardo en la movilidad electroforética (EMSA por sus siglas en inglés) (Guadarrama, 2004; Sánchez Popoca, 2015).

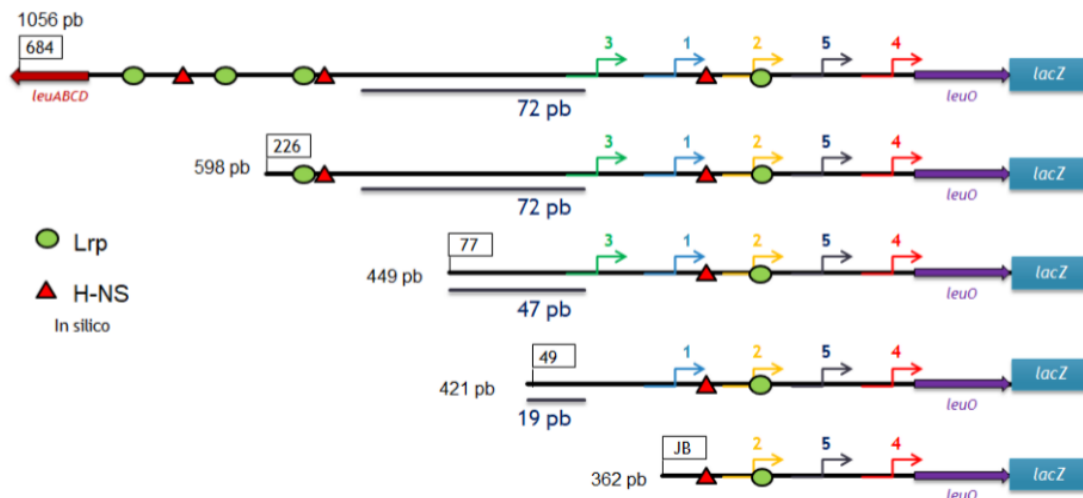


Figura 9. Esquema de las diferentes construcciones de la región reguladora del gen *leuO* unidas a *lacZ*: *pleuO684* (-894 a +162), *pleuO226* (-436 a +162), *pleuO77* (-287 a +162), *pleuO49* (-260 a +162) y *pleuOJB* (-200 a +162); en *S. Typhi*. Se observan los posibles sitios de unión de H-NS y Lrp de un footprinting virtual (Münch, 2005) así como la región de nucleación de H-NS de 72 pb (Chen *et al.*, 2005). También se ilustran parte de la región estructural de *leuO* y *leuABCD* así como sus promotores. (Tomado de Sanchez-Popoca, 2015).

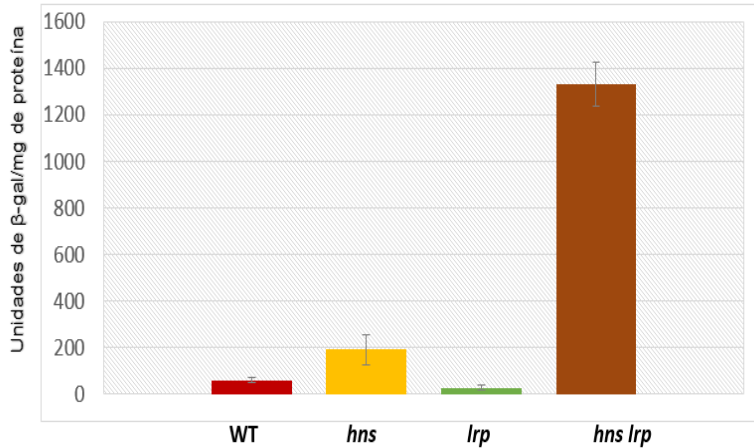


Figura 10. Expresión de la región reguladora completa *p $leuO684$* (-894 a +162) de *leuO* en la fusión traduccional a *lacZ* en medio rico MN D.O₅₉₅=0.6. Se observan los fondos silvestre (WT), Δhns , Δlrp y $\Delta hns \Delta lrp$ (Modificado de Sánchez-Popoca, 2015).

Adicionalmente, se han encontrado tres promotores en Typhi para *leuO*: P1 (Fang & Wu, 1998b); P2 (Stratman *et al.*, 2012); y P3 (Guadarrama, 2004), este último sólo presente en *S. Typhi*. Estos sitios fueron mapeados mediante las técnicas de “primer extension” y por fusiones transcripcionales.

A continuación, durante una estancia sabática en el Laboratorio del Dr. R. L. Gourse, pionero en el estudio la fisiología del (p)ppGpp, el Dr. E. Calva realizó ensayos de transcripción *in vitro* de la región reguladora de *leuO*, donde observó dos promotores no reportados (P4 y P5). En nuestro laboratorio identificamos mediante extensión del iniciador, la existencia de los promotores P4 y P5, los previamente reportados P1-P3 (**Figura 11**), y dos promotores reversos en la cadena complementaria (P6, P7). Encontramos que todos ellos responden a un mecanismo de regulación positiva y negativa que implica a la alarmona (p)ppGpp (**Figura 12**) (Sánchez -Popoca, 2019).

De manera más reciente, se ha detectado la actividad de dos promotores nuevos (P8 y P9) en el sentido del gen corriente arriba de P3 (**Figura 11**), los cuales no fueron mapeados correctamente debido a la secuencia, surgiendo la necesidad de entender el papel que desempeñan en el mecanismo de regulación del gen *leuO*.

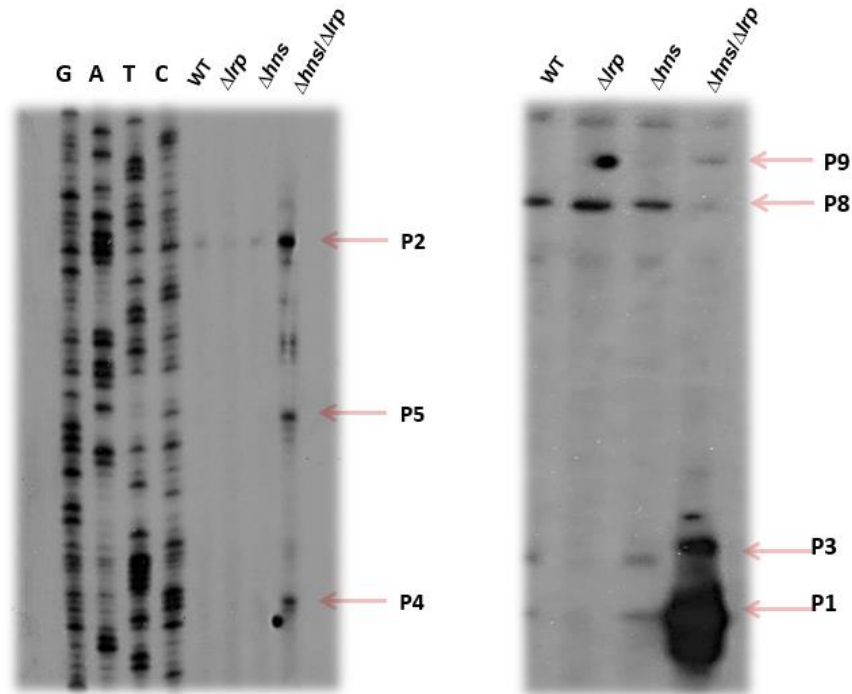


Figura 11. Promotores del gen *leuO*. Ensayo de “primer extension” de la región reguladora completa (*pleuO684*) en los fondos silvestre y mutantes Δlrp , Δhns y $\Delta hns \Delta lrp$, en medio mínimo (M9) en fase exponencial ($D.O_{600}=0.6$). Se muestran los promotores P2, P4 y P5 a la izquierda (Realizado por Marcos Fernández Mora, datos no publicados 2016). A la derecha se muestran los promotores P1 y P3 y corriente arriba los nuevos inicios hallados, P8 y P9 (la secuencia no se muestra).

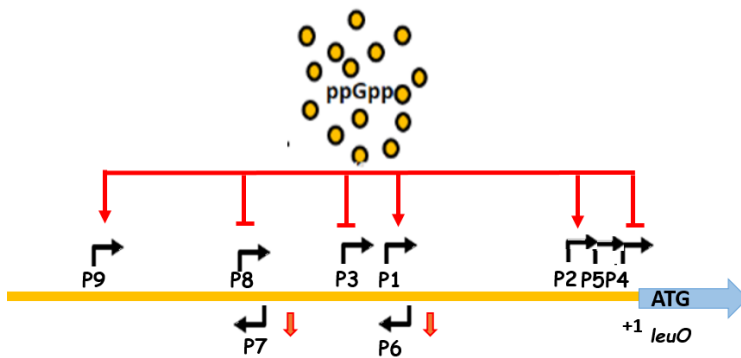


Figura 12. Modelo de regulación de los promotores a través de (p)ppGpp. (p)ppGpp podría tener un efecto directo en la transcripción, donde interacciona con la polimerasa y favorece o desfavorece la expresión en estos promotores. (Modificado de Sánchez-Popoca, 2019).

4. JUSTIFICACIÓN

LeuO es una proteína reguladora implicada en virulencia y respuesta a estrés en diversos patógenos. El estudio de LeuO es importante dado que existen pocos estudios de este regulador en *S. Typhi*. Asimismo, la regulación de este gen presenta una gran complejidad, ya que existe evidencia de que los reguladores globales H-NS, Lrp y (p)ppGpp pueden modular su expresión. Sin embargo, no se ha identificado la señal específica que desencadene la expresión de *leuO* en *Typhi*. Por otro lado, se ha identificado la existencia de al menos siete promotores dentro de su región intergénica, así como dos promotores en la cadena complementaria.

En este trabajo, surge la necesidad de centrar nuestro estudio en la regulación de dos promotores recientemente identificados. Esto nos ayudará en parte a entender mejor regulación de sus múltiples inicios de transcripción, así como las bases moleculares que regulan la expresión quiescente de *leuO*, lo cual es importante para esclarecer los factores que favorecen o limitan la virulencia mediada por este gen.

5. HIPÓTESIS

Los promotores P8 y P9 del gen *leuO* es posible que estén regulados por H-NS, Lrp y (p)ppGpp en *Salmonella enterica* serovar *Typhi* IMSS 1.

6. OBJETIVO

Caracterizar la regulación de los promotores P8 y P9 del gen *leuO*.

6.1 Objetivos específicos

- Determinar la expresión de P8 y P9 en la cepa *S. Typhi* IMSS 1 a través de fusiones transcripcionales de la cepa y análisis de expresión en los fondos genéticos WT, $\Delta hns::km$, $\Delta lrp::cm$, y $\Delta hns \Delta lrp$ en medio MN y M9.
- Estudiar el efecto de (p)ppGpp sobre la expresión de P8 y P9 en la cepa *S. Typhi* IMSS 1 a través de fusiones transcripcionales de la cepa, y análisis de expresión en los fondos genéticos WT, $\Delta relA::km$, $\Delta relA::km \Delta spoT::cm$,

$\Delta lrp::cm$ y $\Delta relA::km\Delta lrp::cm$, así como en un fondo donde se sobre-produzca la sintasa de (p)ppGpp, RelA.

- Mapear los inicios de la transcripción de P8 y P9.

7. METODOLOGÍA

Las fusiones transcripcionales de la región reguladora de *leuO* con el gen reportero *lacZ*, contenidas en los plásmidos *pleuOP9* y *pleuOP9P8* se transfirieron horizontalmente a las cepas IMSS-1 (Silvestre) y sus derivadas Δhns , $\Delta hns \Delta lrp$, $\Delta relA$, $\Delta relA \Delta spoT$, Δlrp y $\Delta lrp \Delta relA$ por electroporación. Las características y procedencia de cada cepa y plásmido se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Características de las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

Cepa/ plásmido	Genotipo	Referencia
IMSS-1 (Silvestre)	<i>S. enterica</i> serovar Typhi 9.12, d, Vi+	Isibasi <i>et al.</i> , 1998.
Δhns	$\Delta hns::Km^r$	Fernández-Mora, 2010
$\Delta hns \Delta lrp$	$hns- lrp-$	Fernández-Mora, 2010
$\Delta relA$	$\Delta relA::Km^r$	Sanchez-Popoca, D. 2016.
$\Delta relA \Delta spoT$	$\Delta relA::Km^r \Delta spoT::Cm^r$	Sanchez-Popoca, D. 2016.
Δlrp	$\Delta lrp::Cm^r$	Fernández-Mora, 2010
$\Delta lrp \Delta relA$	$\Delta relA::Km^r \Delta lrp::Cm^r$	Sanchez-Popoca, D. 2016.
<i>E. coli</i> TOP10	-mcrA $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi 80 lacZ \Delta M15 \Delta lacX74 recA1$ araD139 $\Delta(ara leu) 7697 galU galK$ <i>rpsL</i> (StrR) endA1 <i>nupG</i>	Invitrogen.
<i>pleuOP9</i>	Fragmento de 503 pb con los promotores 8 y 9 de <i>leuO</i> , <i>Ap^r</i>	Fernández-Mora, 2018
<i>pleuOP9P8</i>	Fragmento de 213 pb con el promotor 8 de <i>leuO</i> , <i>Ap^r</i>	Fernández-Mora, 2018
pALS13 y pFC13	Fragmento de 455 codones de <i>relA</i> <i>E. coli</i> , <i>Ap^r</i>	Svitil <i>et al.</i> , 1993
pALS14 y pFC14	Fragmento de 331 codones de <i>relA</i> <i>E. coli</i> , <i>Ap^r</i>	Svitil <i>et al.</i> , 1993

7.1 Preparación de células electrocompetentes.

Las bacterias se estriaron en agar TSGB (**Anexo**) (mutantes y silvestre) y se incubaron a 37°C toda la noche. Posteriormente, se tomó una asada y se inoculó cada cepa en 100 ml de medio SOB (**Anexo**) incubando a 37°C en agitación hasta alcanzar una $D_{600} = 0.8$. Se concentraron las bacterias por centrifugación a 4,000 x g por 10 min, y enseguida la pastilla resultante se lavó tres veces con agua Milli Q estéril fría. Al final, la pastilla se resuspendió en 500 μ l de glicerol al 10%, y se repartió en tubos eppendorf con un volumen final de 50 μ l, guardándose a -70°C hasta su uso.

7.2 Transformación de las cepas.

Las bacterias electrocompetentes se dejaron descongelar en hielo, las celdas de electroporación (BIORAD) se mantuvieron en hielo previo a ser utilizadas. Posteriormente, se agregaron 50 ng de plásmido con las fusiones en 50 μ l de células electrocompetentes, añadiendo 30 μ l más de agua estéril. Enseguida se les dio un pulso de 2.5 KV por 4.6 μ s (micropulser BIORAD), e inmediatamente se recuperaron en 1 ml de medio SOB. Las células se recuperaron a 37°C por una hora para su posterior plaqueo en agar TSBG con X-gal. Se utilizaron los antibióticos correspondientes, con la finalidad de seleccionar las clonas recombinantes.

7.3 Selección de clonas.

Las clonas positivas se seleccionaron por su resistencia a ampicilina (**Anexo**) (para los plásmidos *p/leuOP9* y *p/leuOP9P8*), cloranfenicol y kanamicina (**Anexo**) (para los fondos mutantes) y el fenotipo azul (expresión de *lacZ*). Posteriormente, se inocularon en 10 ml de medio TSGB con sus antibióticos correspondientes, y se dejaron crecer toda la noche a 37°C para la posterior extracción de plásmido por lisis alcalina. El ADN plasmídico se corrió en un gel de agarosa al 0.8% a 120 V, con la finalidad de comprobar su adecuada transformación. Posteriormente, por PCR se amplificó el inserto de cada vector para corroborar que fueran los plásmidos correctos.

7.4 Condiciones de cultivo para las fusiones transcripcionales en las cepas WT, Δhns , Δlrp , $\Delta hns \Delta lrp$, $\Delta relA$, $\Delta lrp \Delta relA$ y $\Delta relA \Delta spoT$.

Las cepas se estriaron en agar TSGB con X-gal y los antibióticos correspondientes, y se incubaron por un día a 37°C. Después, una colonia fue tomada de la caja y se hicieron inóculos en 5 ml de medio MN, los cuales se dejaron crecer por ocho horas. Posteriormente, se transfirieron los 5 ml de cultivo a 50 ml de medio MN (**Anexo**) fresco con antibiótico y se colocaron en agitación a 37°C toda la noche. El cultivo de toda la noche se utilizó para inocular matraces de 50 ml con medio MN o M9 (**Anexo**) a una $D_{595}=0.1$. Las cepas se dejaron crecer en agitación a 37°C, y se tomaron muestras de 1.5 ml en un tubo de microcentrífuga (eppendorf) de 2 ml por duplicado a una $D_{595}=0.6$, muestras de 1 ml a una $D_{595}=1.0$ y muestras de 250 μ l a una $D_{595}\approx 1.8$ (24 horas). Las muestras se centrifugaron a 16,000 x g por 1 min, y la pastilla se lavó con buffer Z 1X (**Anexo**) y se guardó a 70°C hasta su uso, para la cuantificación de proteína y el ensayo de β -galactosidasa.

7.5 Cuantificación de proteína y actividad de β -galactosidasa.

Para medir la cantidad de proteína, las pastillas celulares se resuspendieron en buffer Z 1X, de manera que la concentración de proteína total quedara en un rango de 0.15-0.3 mg/ml. Se cuantificó la proteína por el método de Lowry, con ayuda de una placa de 96 pozos, colocando 20 μ l de muestra, un duplicado y un control de BSA 0.2 mg/ml. Después se añadieron 100 μ l de reactivo de Lowry (**Anexo**) (preparado en el laboratorio) mezclando suavemente. Se incubó 10 min a temperatura ambiente y se adicionaron 100 μ l de reactivo Folin-Ciocalteu al 16.9%, se mezcló e incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. La proteína se cuantificó en un lector de placas tipo "Ceres" (Bio-Tek), el cual compara la absorbancia de las muestras con una curva estándar de concentraciones de BSA previamente establecida (0.2 mg/ml). Una vez ajustada la concentración en el rango antes mencionado, se cuantificó la actividad de β -galactosidasa.

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

de esto, se agregó la solución de lisis (agua destilada, buffer Z 1X, lisozima 0.22 mg/ml, tritón 0.22%, β -mercaptoetanol 16.2 mM), se incubó por 20 min a 37°C, y se añadieron 100 μ l de ONPG (o-nitrofenil β -D-galacto piranósido 1 mg/ml en agua) el cual vira a color amarillo por la actividad enzimática de la β -galactosidasa.

La absorbancia se midió en un lector de placas "Ceres" a 405 nm por 5 min, la lectura obtenida se comparó con una curva estándar de actividad de β -galactosidasa previamente establecida. Para obtener la actividad relativa de la enzima, se dividió el resultado obtenido de la actividad enzimática y la concentración de proteína de las muestras; expresando el valor en U/mg (Unidades).

7.6 Síntesis de (p)ppGpp por la inducción del gen *relA* en las cepas WT con las fusiones *pleuOP9* y *pleuOP9P8*.

Para evaluar el efecto de (p)ppGpp en las fusiones *pleuOP9* y *pleuOP9P8*, se generó una construcción que permitiera sobre-producir la sintasa de esta molécula en respuesta a un inductor. El gen *relA'*, que codifica para una variante trunca de la proteína sintasa de (p)ppGpp RelA de 455 aa (RelA⁴⁵⁵) se clonó en el plásmido pMPM-T6 Ω bajo el control de un promotor fuerte, inducible en presencia de arabinosa, dando origen al plásmido pFC13. Con la finalidad de tener un control negativo, se creó el plásmido pFC14 derivado del plásmido pMPM-T6 Ω . El plásmido pFC14 contiene el gen que codifica para una proteína RelA' truncada de 331 aa (RelA³³¹) la cual es inactiva.

Las dos versiones trucadas del gen *relA*, RelA⁴⁵⁵ y RelA³³¹, fueron obtenidas de los plásmidos pALS13 y pALS14 respectivamente (**Tabla 1**), utilizados para la sobre-producción mediada por IPTG de la proteína RelA en *E. coli* JM109 (Schreiber *et al.*, 1991).

7.7 Purificación de plásmidos pMPM-T6 Ω , pALS13 y pALS14.

Se estriaron las dos cepas de *E. coli* que contienen los plásmidos pALS13 y pALS14 respectivamente, en agar TSGB con ampicilina, y la cepa de *E. coli* DH5 α que contiene el plásmido pMPM-T6 Ω en agar TSGB con tetraciclina, y se incubaron a 37°C toda la noche. Se inoculó una colonia de cada caja de las cepas antes

mencionadas, a un volumen de 10 ml de medio líquido TSGB (suplementado con sus respectivos antibióticos), y se incubaron toda la noche a 37°C en agitación. Transcurrido el tiempo, se colectó por centrifugación todo el cultivo a 16,000 x g a temperatura ambiente, tirando el sobrenadante y realizando su posterior purificación por lisis alcalina, para después correr en un gel de agarosa al 0.8% a 120 V para la identificación del ADN plasmídico. Posteriormente, por PCR se amplificó el inserto de cada vector para corroborar que los insertos de los plásmidos fueran correctos.

7.8 Digestión de los plásmidos.

El plásmido pALS13, el cual lleva el gen de la proteína RelA activa (RelA⁴⁵⁵), se digirió con las enzimas EcoR1 y Pst1. El inserto se comprobó, cortó y purificó en gel de agarosa al 1% con el protocolo comercial Zymo Clean Gel ADN recovery Kit, siguiendo las instrucciones del proveedor. Por otro lado el plásmido pALS14 el cual lleva el gen de la proteína RelA inactiva (RelA³³¹) se digirió con las enzimas EcoR1 y HindIII. Al mismo tiempo, el plásmido pMPM-T6Ω fue digerido con las mismas enzimas utilizadas para obtener los insertos de los plásmidos pALS13 y pALS14. El plásmido linearizado se comprobó, cortó y purificó del gel de agarosa al 1% con las condiciones descritas anteriormente.

7.9 Reacción de ligación.

Se procedió a hacer la reacción de ligación con los insertos obtenidos por digestión de los plásmidos pALS13, pALS14 y el vector pMPM-T6Ω linearizado con las enzimas de restricción correspondientes para cada construcción; agregándole a un tubo 2 µl de Buffer 10X, 15 µl de la mezcla (vector-inserto 1:1), 1 µl de ATP 200 mM y 1 µl de DTT 100 mM; y por último se le añadieron 1.5 µl de T4 ligasa. La mezcla se incubó aproximadamente 4 horas a 22°C.

7.10 Transformación en células electrocompetentes.

Para la transformación con los plásmidos pFC13 y pFC14, se usaron células electrocompetentes de la cepa *E. coli* Top10 dejándose descongelar en hielo, así como también se pusieron a enfriar las celdas de electroporación (BIORAD).

Posteriormente se agregaron 5 μ l de la reacción de ligación en 50 μ l de células electrocompetentes. Enseguida se les dio un pulso de 2.5 KV por 4.6 μ s (micropulser BIORAD). Inmediatamente se recuperaron en 1 ml de medio SOC (**Anexo**), incubándolas a 37 °C por una hora para su posterior plaqueo de 100 μ l en agar TSBG con tetraciclina y estreptomina, con la finalidad de seleccionar las clonas recombinantes.

7.11 Comprobación de los plásmidos recombinantes por PCR.

Para comprobar que las cepas contenían los plásmidos recombinantes pFC13 (de pALS13 y T6) y pFC14 (de pALS14 y T6), se hizo una PCR de colonia con los oligos pBADforw y pTrcHisRev3'-I'; relAForw y pTcHisRev'-I'. Una vez que la digestión terminó su lapso de incubación, se comprobaron los fragmentos digeridos por su peso molecular en un gel de agarosa al 1%.

7.12 Purificación de los plásmidos pFC13 y pFC14 y secuenciación.

Una vez comprobados los plásmidos por PCR, se hicieron glicerol de las cepas que los contenían: se inoculó una colonia en 10 ml medio TGSB con tetraciclina, y se incubó toda la noche a 37°C. Posteriormente se centrifugó el cultivo y la pastilla se resuspendió con 150 μ l de glicerol al 10% estéril, y se guardó a -70°C hasta su uso.

Se purificaron los plásmidos pFC13 y pFC14 por lisis alcalina, y luego con el kit "Zymo Zyppy Plasmid Miniprep" siguiendo las instrucciones del proveedor. Ambos plásmidos se mandaron a secuenciar a la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM, de acuerdo al protocolo recomendado: una concentración de 600-1000 ng de plásmido, combinado con los oligonucleótidos pBADforw y pTrcHisrev3'-I'; 25 μ M de 10 pmoles, en un volumen final de 16 μ l.

7.13 Sobre-producción de la proteína RelA en cepas de *E. coli* Top10.

Se evaluó el crecimiento de la cepas *E. coli* Top10 que contienen a los plásmidos pFC13 y pFC14, mediante curvas de crecimiento en presencia del inductor (arabinosa) del promotor pBAD. La arabinosa se agregó en concentraciones de 400

μM y $800 \mu\text{M}$ a una $D_{595} = 0.2$ o 0.4 , en medio MN y medio LB con tetraciclina. El crecimiento se comparó con respecto a las mismas cepas en ausencia de arabinosa.

7.14 Síntesis de (p)ppGpp por la inducción de la proteína RelA en cepas WT con las fusiones *pleuOP9* y *pleuOP9P8*.

Se procedió a transformar las cepas con las fusiones *pleuOP9* y *pleuOP9P8* de *S. Typhi* IMSS 1 WT, $\Delta hns \Delta lrp$ y $\Delta relA \Delta spoT$ con los plásmidos pFC13 y pFC14. Se realizaron cinéticas de crecimiento con arabinosa de ambos plásmidos, y un control sin arabinosa de cada uno. Para caracterizar este sistema en *S. Typhi*, se ocuparon dos medios de cultivo MN y LB con sus respectivos antibióticos; dos concentraciones de arabinosa 400 y $800 \mu\text{M}$; y dos densidades ópticas de inducción 0.2 y 0.4 . Se tomaron muestras de $1.5 \text{ ml} \times 2$ tubos eppendorf por duplicado a los tiempos 0 (antes de la inducción) y a los $5, 10, 20, 30, 60, 120$ y 180 minutos después de la inducción, para cada cepa. Posteriormente se realizó la cuantificación de la proteína y el ensayo de actividad de β -galactosidasa.

7.15 Gradiente de arabinosa en la cepa mutante $\Delta relA \Delta spoT$.

Para realizar el gradiente de arabinosa en el sistema RelA', se transformaron las cepas mutantes $\Delta relA \Delta spoT$ con los plásmidos pFC13 y pFC14, y sólo se indujo la cepa doble mutante con el plásmido pFC13 a diferentes concentraciones de arabinosa $0, 25, 50, 100$ y $400 \mu\text{M}$.

7.16 "Primer extension".

En el ensayo de "primer extension", el sitio de inicio de la transcripción para un gen, se determina experimentalmente identificando el extremo $5'$ del ARN mensajero codificado (ARNm). El método utiliza un oligonucleótido marcado radioactivamente, diseñado para hibridarse con el ARN en una posición río abajo del extremo $5'$ anticipado. Posteriormente, la transcriptasa inversa (RT) cataliza el alargamiento del oligonucleótido, que continúa extendiéndose hasta alcanzar el extremo $5'$ del ARN. Los productos de ADN complementario (ADNc) radiomarcados resultantes,

se analizan junto con una reacción de secuenciación del ADN genómico como molde, usando el mismo oligonucleótido marcado. De esta manera, se genera una escalera de secuenciación que se ejecuta en un gel de poliacrilamida adyacente al producto del “primer extension”, seguido de una autorradiografía. El fragmento en la escalera de secuenciación, que coincide con el tamaño del producto observado, define el nucleótido preciso que corresponde al inicio de la transcripción (+1) (Craig *et al.*, 2005; Carey *et al.*, 2013; Ghosh *et al.*, 1978).

7.16.1 Obtención y purificación de ARN total.

Se inocularon las cepas de interés en 5 ml de medio MN, con sus antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C en agitación por ocho horas. Después se pasaron los 5 ml de cultivo a 50 ml de MN con antibióticos, y se dejó en agitación a 37° toda la noche. Pasado ese tiempo, se procedió a poner en matraces de 100 ml de medio líquido M9, la cantidad de preinóculo suficiente (≈ 2 ml) como para iniciar con una $D_{0.595} = 0.1$, y se dejó en agitación a 37°C hasta alcanzar una $D_{0.595} = 0.6$. Se centrifugan dos partes de la muestra en un tubo Falcon (2x50 ml) (estéril) a 4,000 x g por 15 min a 4°C. Una vez decantado, a la pastilla se le agregaron 2 ml de agua DEPC estéril y fría. La pastilla resuspendida se pasó a dos tubos eppendorf de 2 ml (estériles) cada uno con 1 ml. Se centrifugó a 11,000 x g 1 min a 4°C. Se decantó la muestra y se guardó a -70°C.

Se purificó la pastilla por el método de fenol ácido: se colocaron en el heat block a 65°C tubos eppendorf de 1.5 ml, conteniendo 1 ml de fenol ácido. Se preparó la mezcla de la solución A (**Anexo**). A la pastilla se le agregaron 500 μ l de solución A y se mezcló con vortex. Se le agregaron a la muestra 500 μ l de fenol ácido precalentado (se mezcla en vortex hasta tener una mezcla homogénea), y se colocó el tubo en el heat block a 65°C por 15 min (mezclar cada minuto, evitando que se separe la mezcla). Se centrifugó a 16,000 x g por 2.5 min a temperatura ambiente, y se pasó el sobrenadante a tubos eppendorf limpios de 2 ml. Se agregó 1 ml de etanol absoluto a temperatura ambiente (mezclar), y se centrifugó por 5 min a 11,000 x g. Se tiró el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 70% (temperatura ambiente). Se centrifugó por 2:30 min a 11,000 x g y se tiró el sobrenadante. Se

agregó a la pastilla 400 µl de solución A (mezclar) y se repitieron los pasos, volviendo a agregar 1 ml de etanol absoluto. La pastilla se secó en el Savant y se resuspendió en 80 µl de agua DEPC.

Una vez obtenido el ARN total se determinó la D.O a 260 nm en el equipo “nanodrop”. Posteriormente, se analizó 1 microgramo de las muestras de ARN en un gel de agarosa al 2 % (se utilizaron las muestras de ARN total a una concentración final de 15 µg).

7.16.2 Marcaje del oligonucleótido pRS415-3’.

Después se prosiguió al marcaje del oligonucleótido específico que abarca nuestro fragmento de interés, con ayuda del kit T4 Polynucleotide Kinase (#EK0031) llevando a cabo el protocolo establecido por la compañía (contiene buffer 10x T4 K, agua DEPC, enzima T4 K y gamma p^{32} ATP 25 pM), obteniendo un volumen total de 10 µl. La mezcla obtenida se incubó a 37°C por 30 min y posteriormente, se agregaron 0.5 µl de EDTA y se incubó 5 min a 75°C. La muestra se guardó a 4°C hasta su posterior uso.

7.16.3 Reacción de secuenciación.

Con ayuda del estuche Thermo Sequenase Cycle Sequencing (#78500), se realizó la reacción de secuenciación con ayuda de la enzima Thermo sequenase ADN polymerase y el oligonucleótido marcado radioactivamente. Se repartieron 4 µl de esa mezcla a cada uno de los tubos con los diferentes ddNTPs (4 µl), en total cada tubo de PCR de cada ddNTP tendría 8 µl. Finalmente se colocó una gota de aceite vegetal y se metió al termociclador. Terminada la reacción, se guardó en un vial de radioactividad a -20°C.

7.16.4 Síntesis de ADNc.

Una vez obtenido el oligonucleótido marcado radioactivamente, se prosiguió a realizar el protocolo del estuche Thermo Scientific revertAid First sequence Transcriptasa reversa (#K1622), para la síntesis de ADNc. Posteriormente cada muestra se precipitó y se lavó con etanol al 70%, se decantó, secó la pastilla y se

guardó a -20°C . Las muestras resultantes se analizaron en un gel de poliacrilamida al 8 %, urea 8 M y amortiguador TBE 1X pH 8.8 para secuenciación, con el fin de obtener el sitio de inicio de la transcripción.

Posteriormente, el gel se colocó sobre un papel y se secó al vacío. Después se colocó sobre una película dentro de un cassette, y se dejó a -70°C por un día para finalmente revelar la película.

7.16.5 Análisis estadístico.

Se realizó el análisis estadístico (Statistica Software) de los resultados a través de la prueba T de Student, que predijo si las diferencias observadas entre los datos eran o no estadísticamente significativas, con un valor $p < 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1 “Primer extension”

Dado que inicialmente se encontraron los inicios de transcripción de P8 y P9, más no se determinó su ubicación, debido a que no se definió la secuencia; en primer lugar, se utilizó el programa “Softberry promoter” para predecir *in silico* posibles cajas -10 y -35 de estos dos promotores, utilizando las secuencias de las fusiones *pleuOP9* y *pleuOP9P8*, como se muestra en la **Figura 13**.

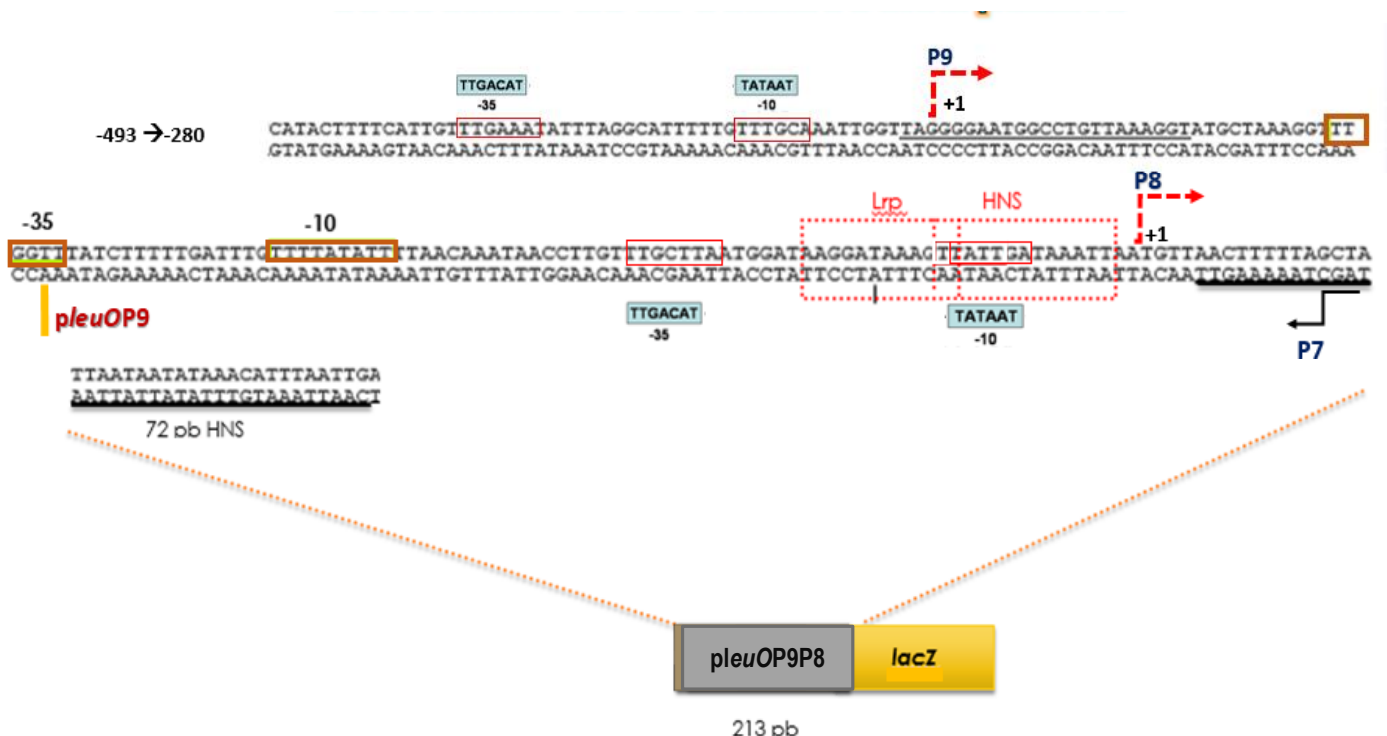
Las fusiones *pleuOP9* y *pleuOP9P8*, fueron construidas tomando parte de la región reguladora de *leuO*, río arriba de P3 hasta parte de la región estructural del operón *leuABCD*, debido a que la actividad de estos dos nuevos promotores, se observó a una distancia considerable de los demás (**Figura 11**). Sin embargo, al momento de construirlas se desconocía cuántos promotores habría en cada una. Fue por ello que se construyó una fusión más larga *pleuOP9* (503 pb), y una más corta *pleuOP9P8* (213 pb).

La técnica de “primer extension” permitió mapear el inicio de transcripción de P8 y P9, utilizando ARN total de las cepas con las fusiones *pleuOP9* y *pleuOP9P8* en los fondos genéticos WT, Δhns , Δlrp , $\Delta hns \Delta lrp$ y $\Delta relA \Delta spoT$.

En la **Figura 14** y **Anexo 13.1**, se muestran los dos inicios de transcripción encontrados en cada una de las fusiones con sus respectivas secuencias. Estos inicios, corresponden a P8 y P9. En ambos promotores, se observó una mayor expresión en los fondos mutantes comparados con los fondos silvestres, los cuales coinciden con los resultados obtenidos en los ensayos de β -galactosidasa (descritos más adelante). Sin embargo, este comportamiento difiere del “primer extension” hecho con la región reguladora completa (*pleuO684-lacZ*) (**Figura 11**), posiblemente porque las fusiones *pleuOP9* y *pleuOP9P8* son recortes de esta región, y los promotores en este contexto se encuentran aislados. Esto nos hablaría, de un comportamiento distinto en la expresión de *leuO*, cuando P8 y P9 están aislados que cuando están junto con los demás promotores.

En la **Figura 13**, se muestra la secuencia completa de las fusiones, los inicios de transcripción de P8 y P9 ubicados por “primer extension” y sus cajas -10 y -35.

Fusión *pleuOP9P8* (P8P9)



Fusión *pleuOP9* (P9)

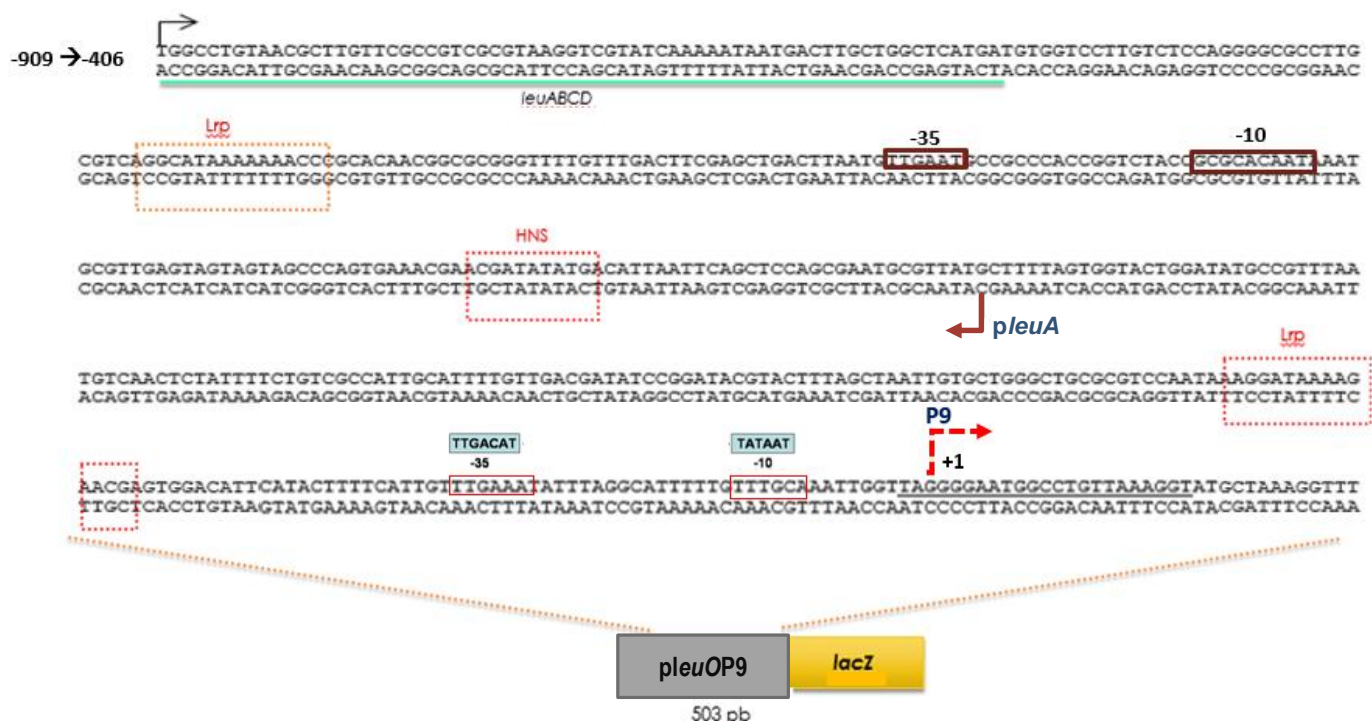


Figura 13. Secuencias de las fusiones *lacZ* transcripcionales *pleuOP9* (P9) y *pleuOP9P8* (P8P9). Se indican en recuadros punteados los sitios de pegado de las proteínas H-NS y Lrp encontrados por virtual footprinting, en verde parte de la región estructural del operón *leuABCD*, y en negro parte del sitio de nucleación de H-NS. La línea amarilla indica hasta donde sobrepone la fusión *pleuOP9* en la fusión *pleuOP9P8*. En rojo se muestran las cajas -10 y -35 de los promotores 8 y 9 así como sus inicios de transcripción (flechas rojas), y en café se muestran las secuencias promotores -10 y -35 de los promotores 8 y 9 previstas *in silico*. Se indica también el promotor reverso del operón *leuABCD*.

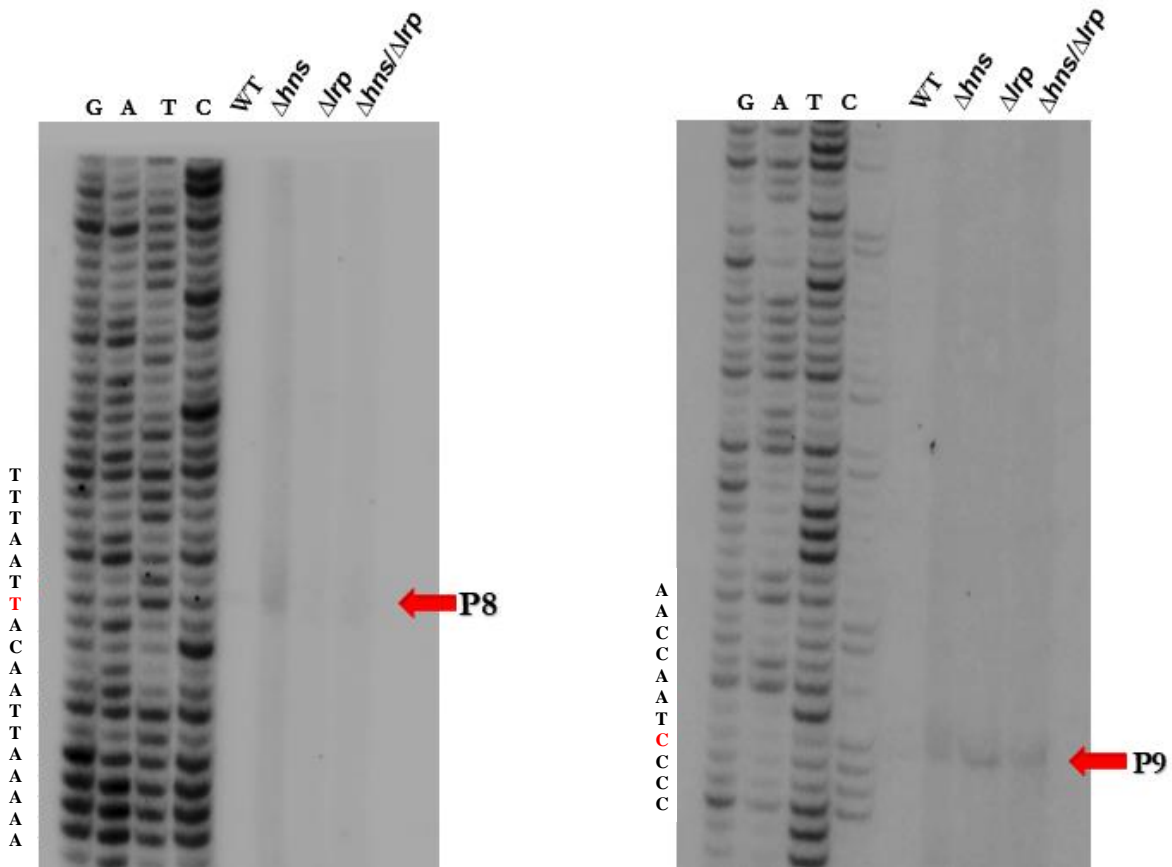


Figura 14. Ensayo de “primer extension” de las fusiones *lacZ* transcripcionales *pleuOP9* y *pleuOP9P8* en medio M9 D.O₅₉₅= 0.6. Se muestran con flechas y en letras rojas los inicios de transcripción y sus respectivos fondos genéticos.

Las fusiones transcripcionales al gen reportero *lacZ*, *pleuOP9* (P9) y *pleuOP9P8* (P9P8), utilizadas para medir la actividad de β -galactosidasa, así como los inicios de transcripción P8 y P9 se ilustran en la **Figura 15**. Los promotores P9 y P8 se encuentran a una distancia de -434 y -318 respectivamente, con respecto al ATG del gen *leuO*. La fusión *pleuOP9* de 503 pb, contiene parte de la región estructural del operón *leuABCD* y contiene sólo a P9. La fusión *pleuOP9P8* de 213 pb contiene 35 pb del sitio de nucleación de H-NS (72 pb) y la caja -10 del promotor antisentido P7. Esta fusión contiene a P9 y P8. Ambas fusiones se encuentran río arriba de P3 y se sobreponen por 84 nucleótidos.

Fusiones *pleuOP9* (P9) y *pleuOP9P8* (P9P8)

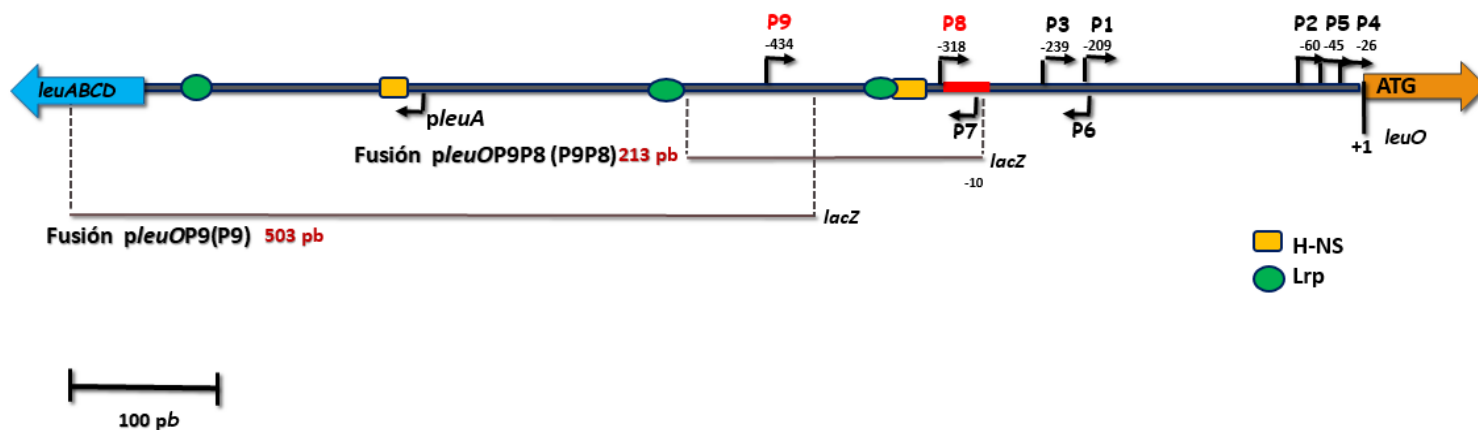


Figura 15. Fusiones *lacZ* transcripcionales *pleuOP9* (P9) y *pleuOP9P8* (P9P8). Se muestran las dos fusiones transcripcionales *pleuOP9* (P9) y *pleuOP9P8* (P9P8) entre líneas punteadas; así como la ubicación de los promotores P9, P8, P7, P6, P3, P1, P2, P5 y P4 con respecto al ATG de *leuO*. La región estructural del operón *leuABC* así como la de *leuO*, están en color azul y naranja respectivamente. La línea roja indica parte del sitio de nucleación de H-NS. En amarillo y verde se indican los sitios de pegado para H-NS y Lrp, ubicados por virtual footprinting.

8.2 Actividad de β -galactosidasa de las fusiones transcripcionales *pleuOP9* y *pleuOP9P8* en los fondos genéticos WT, Δhns , Δlrp , $\Delta hns \Delta lrp$, $\Delta relA$, $\Delta relA \Delta spoT$ y $\Delta lrp \Delta relA$ de la cepa *S. Typhi* IMSS 1.

Para determinar los niveles de expresión de los promotores P8 y P9 en la cepa silvestre; así como para evaluar el efecto de los reguladores H-NS, Lrp y (p)ppGpp en estos promotores, se midió la actividad de β -galactosidasa de las dos fusiones transcripcionales al gen reportero *lacZ*; *pleuOP9* y *pleuOP9P8* (**Figura 15**) en los fondos genéticos de la cepa *S. Typhi* IMSS 1: WT, Δhns , Δlrp , $\Delta hns \Delta lrp$, $\Delta relA$, $\Delta relA \Delta spoT$, y $\Delta lrp \Delta relA$.

Dado que se ha postulado que la expresión de *leuO* en *S. Typhimurium* permanece baja hasta la entrada de la fase estacionaria (Fang, 2000), y para demostrar si existía un cambio en la expresión a diferentes condiciones de crecimiento, se utilizaron tres densidades ópticas distintas; $D_{0.595} = 0.6$, $D_{0.595} = 1$ y 24 horas ($D_{0.595} \approx 1.8$) (fase exponencial, fase estacionaria temprana y fase estacionaria tardía respectivamente), así como dos medios diferentes de cultivo; medio rico MN y medio mínimo M9.

8.2.1 Efecto de H-NS y Lrp (mutantes Δhns , Δlrp y $\Delta hns \Delta lrp$).

a) Fusión *pleuOP9P8* (P8P9)

Para observar el efecto de los reguladores H-NS y Lrp, se comparó la actividad de β -galactosidasa del fondo silvestre con la actividad de β -galactosidasa en las mutantes Δhns , Δlrp y $\Delta hns \Delta lrp$.

En medio rico MN a la D. O_{595} = 0.6, la actividad de β -galactosidasa en el fondo silvestre (WT) fue de 1084 ± 268 U/mg (**Figura 16**), lo que demuestra que sí hay expresión en esta fusión. En estas mismas condiciones, sólo en la cepa mutante $\Delta hns \Delta lrp$ se observó un efecto modesto de desrepresión, dos veces mayor (2301 ± 249 U/mg) la actividad de β -galactosidasa observada en el fondo silvestre. Esto podría indicarnos que ambos reguladores actúan en conjunto para ejercer su efecto represor durante la fase exponencial. A la D. O_{595} = 1, la actividad de β -galactosidasa en el fondo WT aumentó a 1862 ± 289 U/mg, pero en esta condición los fondos mutantes no muestran diferencia significativa en la actividad de β -galactosidasa con respecto al fondo silvestre. A las 24 horas (D. O_{595} \approx 1.8) la actividad de β -galactosidasa de la cepa silvestre fue de 462 ± 261 U/mg, es decir, la mitad que en la fase exponencial (0.6), y sólo se observó una diferencia significativa en el fondo mutante Δhns de al menos seis veces la silvestre (2844 ± 136 U/mg). Probablemente, en esta fase de crecimiento la ausencia de H-NS podría ser importante, ejerciendo un efecto pleiotrópico sobre otras proteínas o reguladores.

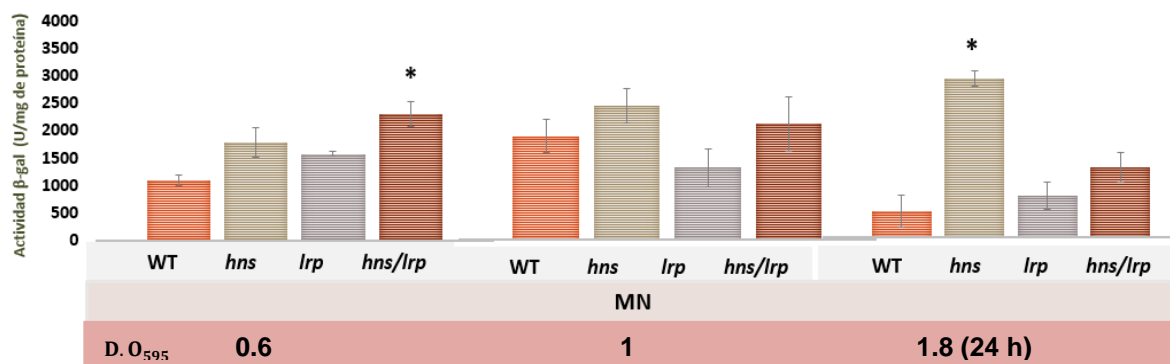


Figura 16. Actividad de β -galactosidasa de la fusión transcripcional *pleuOP9P8-lacZ* en *Salmonella Typhi* IMSS 1 en diferentes fondos genéticos. Se observan las actividades en medio rico MN, en fases de crecimiento exponencial (D. O_{595} = 0.6), fase estacionaria temprana (D. O_{595} = 1) y fase estacionaria tardía (24h). Actividad media de tres experimentos independientes (*Dato significativamente diferente a la cepa WT).

En medio mínimo M9 y a la $D_{0.595} = 0.6$, la expresión de la fusión transcripcional incrementó en la cepa WT, llegando a una actividad de β -galactosidasa de 2125 ± 95 U/mg (**Figura 17**), dos veces más que la observada en el medio MN (**Figura 16**). En esta fase de crecimiento, sólo se observó expresión diferencial en la doble mutante $\Delta hns \Delta lrp$ con respecto al fondo silvestre. Esto indicaría que ambas proteínas se comportan como represores. A la $D_{0.595} = 1$, en el fondo silvestre la actividad de β -galactosidasa se mantiene a un nivel similar que en la $D_{0.595} = 0.6$ (2376 ± 98 U/mg). De igual manera, se observa desrepresión en el fondo mutante $\Delta hns \Delta lrp$. Por otro lado, a las 24 horas ($D_{0.595} \approx 1.8$) este patrón de regulación cambia; el fondo silvestre disminuye en su actividad de β -galactosidasa (915 ± 60 U/mg) y ahora los fondos mutantes Δhns y Δlrp , al parecer muestran una ligera desrepresión en esta condición, siendo el cambio en la actividad de β -galactosidasa del doble en la mutante en Δhns comparado con el fondo silvestre, lo cual sugiere que H-NS es un represor en esta condición.

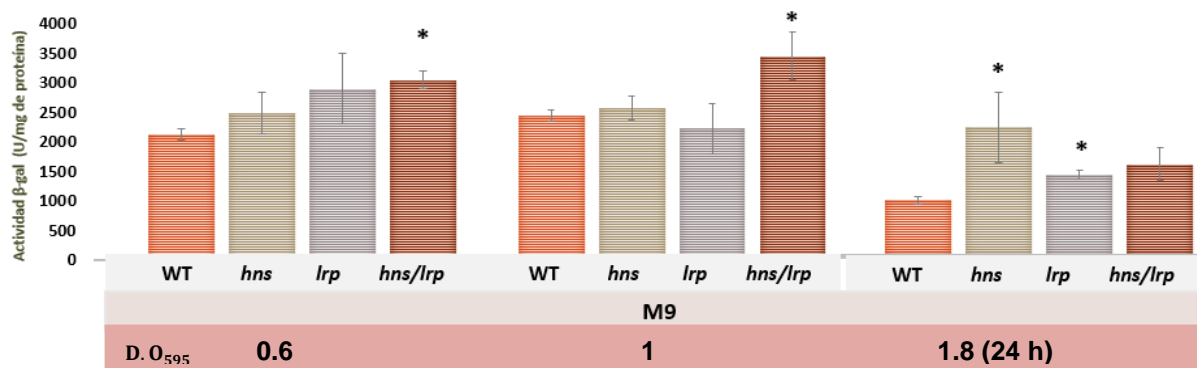


Figura 17. Actividad de β -galactosidasa de la fusión transcripcional $p_{leuOP9P8-lacZ}$ en *Salmonella Typhi* IMSS 1 en diferentes fondos genéticos. Se observan las actividades en medio mínimo M9, en fases de crecimiento exponencial ($D_{0.595} = 0.6$), fase estacionaria temprana ($D_{0.595} = 1$) y fase estacionaria tardía (24h). Actividad media de tres experimentos independientes (*Dato significativamente diferente a la cepa WT).

b) Fusión p_{leuOP9} (P9)

Esta fusión es más larga que la fusión $p_{leuOP9P8}$ y sólo contiene a P9. Al igual que en el caso de la fusión $p_{leuOP9P8}$, se analizó la expresión en los fondos genéticos Δhns , Δlrp y $\Delta hns \Delta lrp$; midiendo la actividad del reportero β -galactosidasa.

A la $D_{0.595} = 0.6$ en medio rico MN, la actividad de β -galactosidasa en el fondo WT fue de 1130 ± 96 U/mg (**Figura 18**). La actividad de β -galactosidasa en los fondos Δlrp y $\Delta hns \Delta lrp$ aumentó dos y tres veces respectivamente con respecto al fondo silvestre. Esto indica que Lrp y H-NS son reguladores negativos de este promotor y que probablemente Lrp juegue papel más significativo que H-NS en esta condición. A la $D_{0.595} = 1$, la cepa silvestre se mantuvo en el mismo nivel de actividad de β -galactosidasa y al igual que en la condición de fase exponencial (0.6), y en los fondos mutantes Δlrp y $\Delta hns \Delta lrp$, estos reguladores nuevamente ejercieron un efecto negativo. A las 24 horas ($D_{0.595} \approx 1.8$) la actividad de β -galactosidasa en el fondo silvestre disminuyó más de la mitad (393 ± 198 U/mg), y aumentó aproximadamente dos veces, la actividad de β -galactosidasa en los fondos mutantes Δhns , Δlrp y $\Delta hns \Delta lrp$, con respecto al fondo silvestre.

Al parecer a la $D_{0.595} = 1$, al ser similares las actividades tanto en la mutante en Lrp como en la doble mutante y al no observarse efecto en la mutante en H-NS, el efecto es ejercido sólo por Lrp, independientemente de la presencia de la proteína H-NS. Sin embargo a las 24 horas ($D_{0.595} \approx 1.8$), no se descarta que H-NS pueda jugar un papel minoritario en la represión.

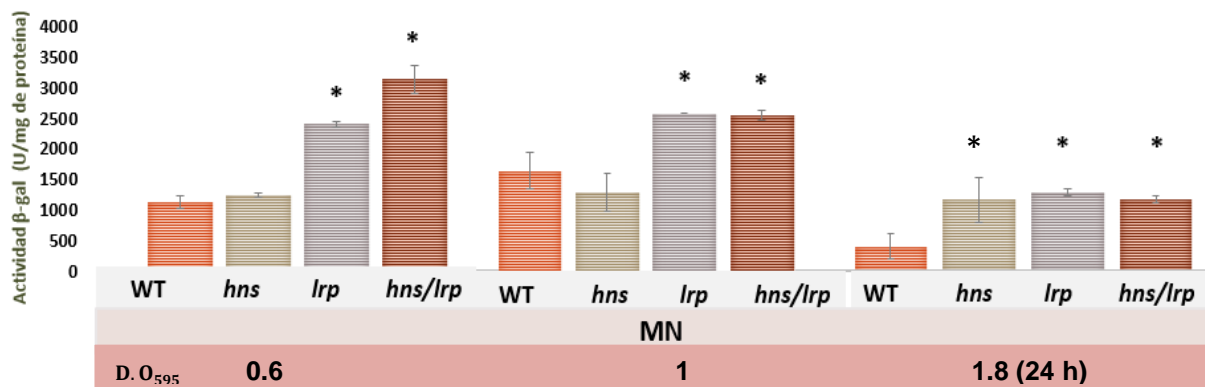


Figura 18. Actividad de β -galactosidasa de la fusión transcripcional *pleuOP9-lacZ* en *Salmonella Typhi* IMSS 1 en diferentes fondos genéticos. Se observan las actividades en medio rico MN, en fases de crecimiento exponencial ($D_{0.595} = 0.6$), fase estacionaria temprana ($D_{0.595} = 1$) y fase estacionaria tardía (24h). Actividad media de tres experimentos independientes (*Dato significativamente diferente a la cepa

En medio mínimo M9 a la $D. O_{595} = 0.6$, la actividad de β -galactosidasa del fondo WT aumentó al doble (2053 ± 184 U/mg) con respecto al medio rico a la misma densidad (**Figura 19**), y se mantuvo un aumento en la expresión, de al menos el doble, en los fondos mutantes Δlrp y $\Delta hns \Delta lrp$, observándose un mayor efecto represor por Lrp, al igual que a la $D. O_{595} = 1$. A las 24 horas ($D. O_{595} \approx 1.8$), la actividad de β -galactosidasa en el fondo silvestre disminuyó nuevamente a 353 ± 180 U/mg, y sólo se observó un efecto significativo en la doble mutante $\Delta hns \Delta lrp$.

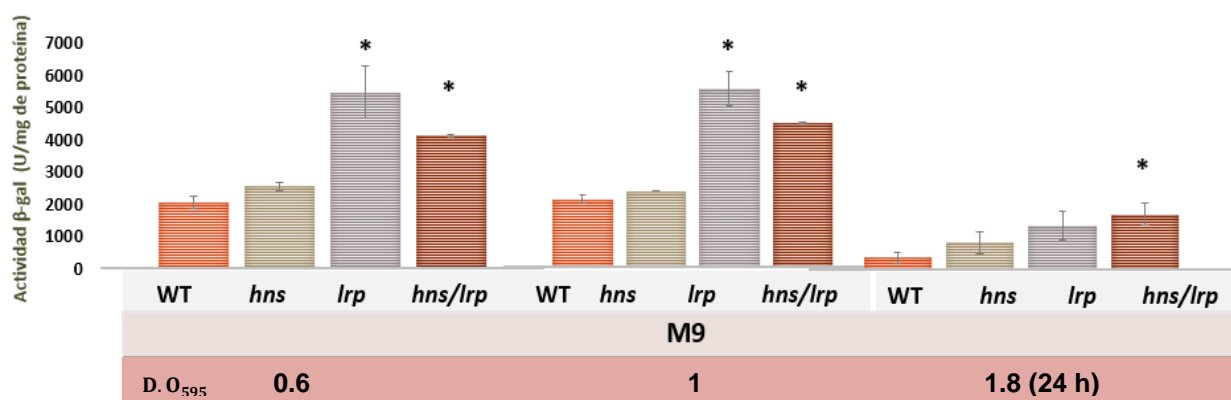


Figura 19. Actividad de β -galactosidasa de la fusión transcripcional *pleuOP9-lacZ* en *Salmonella Typhi* IMSS 1 en diferentes fondos genéticos. Se observan las actividades en medio mínimo M9, en fases de crecimiento exponencial ($D. O_{595} = 0.6$), fase estacionaria temprana ($D. O_{595} = 1$) y fase estacionaria tardía (24h). Actividad media de tres experimentos independientes (*Dato significativamente diferente a la cepa WT).

8.2.2 Efecto de (p)ppGpp (mutantes $\Delta relA$, $\Delta relA \Delta spoT$ y $\Delta lrp \Delta relA$)

Las fusiones transcripcionales *pleuOP9P8* y *pleuOP9*, se utilizaron para evaluar el efecto de esta alarmona en mutantes en dos enzimas que la biosintetizan (*RelA* y *SpoT*). Esta es una forma de medir el efecto de (p)ppGpp en un estado estable sin estrés, que nos permite ver los efectos resultantes de quitar el (p)ppGpp existente en un estado basal.

a) Fusión *pleuOP9P8* (P8P9)

Para observar el efecto de la alarmona (p)ppGpp, se comparó la actividad de β -galactosidasa del fondo silvestre con la actividad de β -galactosidasa en las mutantes $\Delta relA$ y $\Delta relA \Delta spoT$. En medio rico MN, la expresión de esta fusión

transcripcional aumenta alrededor de cuatro veces, en la cepa $\Delta relA \Delta spoT$ comparado con la expresión de la fusión en la cepa silvestre (**Figura 20**). Este cambio en expresión se mantiene de forma similar en los tres puntos de crecimiento medidos. La expresión de la fusión no cambia de manera significativa con respecto a la cepa WT en la mutante sencilla $\Delta relA$. Esto sugiere que la contribución del 10% de (p)ppGpp dado por SpoT es importante para mantener los niveles de expresión cercanos a los niveles silvestres. Estos resultados sugieren que el promotor P8 y P9 se regulan negativamente por (p)ppGpp.

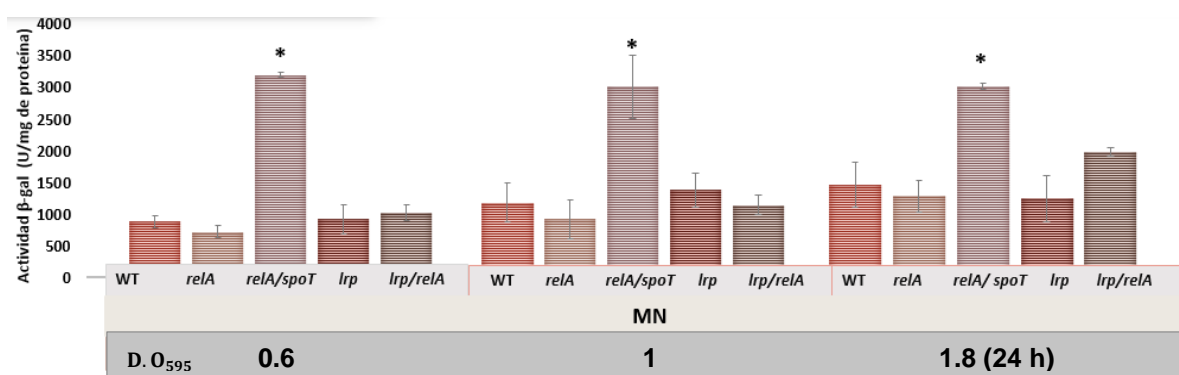


Figura 20. Actividad de β -galactosidasa de la fusión transcripcional $p/leuOP9P8-lacZ$ en *Salmonella Typhi* IMSS 1 en diferentes fondos genéticos. Se observan las actividades en medio rico MN, en fases de crecimiento exponencial ($D. O_{595} = 0.6$), fase estacionaria temprana ($D. O_{595} = 1$) y fase estacionaria tardía (24h). Actividad media de tres experimentos independientes (*Dato significativamente diferente a la cepa WT).

La alarmona (p)ppGpp puede modular la expresión de Lrp de manera positiva, tanto en *E. coli* como en *S. Typhi* (Landgraf *et al.*, 1996; Sanchez Popoca., 2019). Por lo tanto, es posible que el efecto negativo de (p)ppGpp sobre la expresión a nivel de los promotores P8 y P9 esté mediado por Lrp, que como se demostró en párrafos anteriores es un represor de estos promotores. Para evaluar esta posibilidad, se comparó la expresión de la fusión $p/leuOP9P8$ en la cepa WT con la expresión en las cepas mutantes Δlrp y $\Delta lrp \Delta relA$. En esta fusión, en la doble mutante $\Delta relA \Delta spoT$ el (p)ppGpp reprime a P8 y P9, sin embargo las mutantes en Δlrp y $\Delta lrp \Delta relA$, muestran un nivel de actividad de β -galactosidasa similar a la silvestre y por lo tanto, Lrp no participa en un mecanismo de regulación indirecta por (p)ppGpp.

En el medio mínimo M9 (**Figura 21**) en las $D. O_{595} = 0.6, 1$ y 24 horas ($D. O_{595} \approx 1.8$), no se observa un efecto significativo en los fondos mutantes. Es posible que las

condiciones de crecimiento afecten los niveles de (p)ppGpp en estos fondos genéticos, o que los efectores regulatorios que responden a la alarmona no se encuentren presentes o activos.

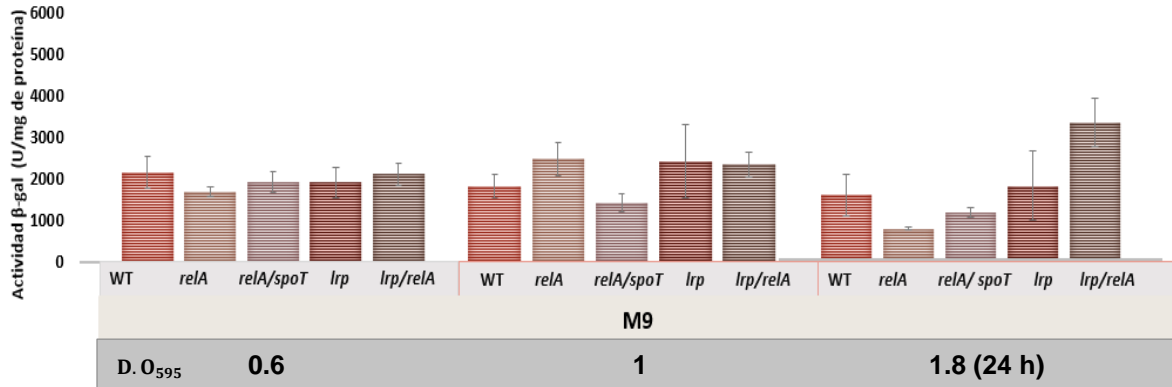


Figura 21. Actividad de β -galactosidasa de la fusión transcripcional *pleuOP9P8 lacZ* en *Salmonella Typhi* IMSS 1 en diferentes fondos genéticos. Se observan las actividades en medio mínimo M9, en fases de crecimiento exponencial (D. O_{595} = 0.6), fase estacionaria temprana (D. O_{595} = 1) y fase estacionaria tardía (24h). Actividad media de tres experimentos independientes (*Dato significativamente diferente a la cepa WT).

b) Fusión *pleuOP9* (P9)

En medio rico MN (Figura 22), se observó que la expresión asociada a el promotor P9, disminuye al menos dos veces en la cepa $\Delta relA \Delta spoT$ en comparación con el fondo WT en los tres puntos de crecimiento medidos. Este resultado sugiere que la expresión asociada a este promotor es regulada positivamente por (p)ppGpp. Al igual que en la Figura 18, se observa el efecto represor de Lrp. Sin embargo, en la mutante sencilla Δlrp , este regulador reprime a P9 sin depender de la cantidad de (p)ppGpp aportada por RelA, ya que la actividad de β -galactosidasa en la doble mutante $\Delta lrp \Delta relA$ es muy similar a la mutante sencilla Δlrp .

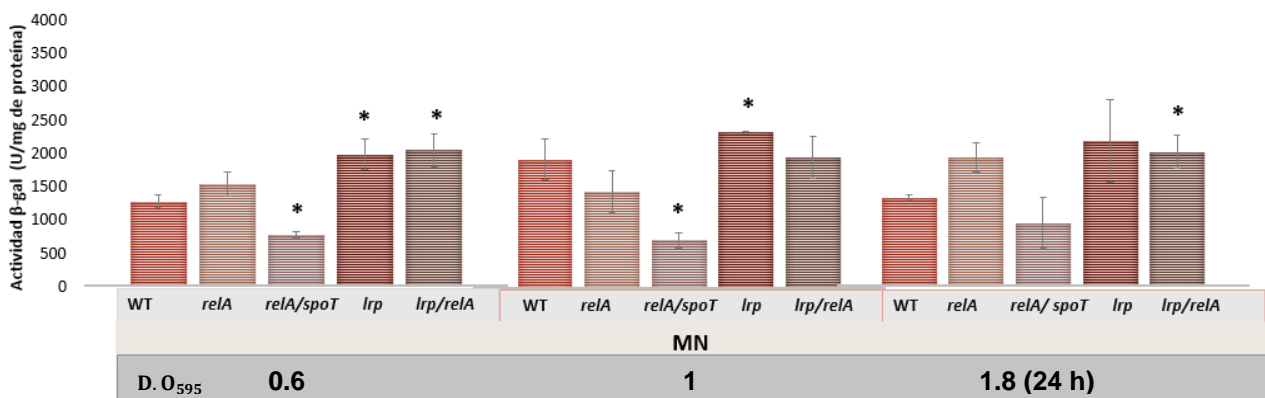


Figura 22. Actividad de β -galactosidasa de la fusión transcripcional *pleuOP9-lacZ* en *Salmonella Typhi* IMSS 1 en diferentes fondos genéticos. Se observan las actividades en medio rico MN, en fases de crecimiento exponencial (D. O_{595} = 0.6), fase estacionaria temprana (D. O_{595} = 1) y fase estacionaria tardía (24h). Actividad media de tres experimentos independientes (*Dato significativamente diferente a la cepa WT).

En el medio mínimo M9 (**Figura 23**), se observa un patrón similar al del medio rico MN, y el mismo efecto represor de Lrp.

Una posibilidad es que la ausencia de P8 en esta fusión, pueda estar direccionando la regulación de (p)ppGpp y de esta manera pueda regular positivamente a P9, y negativamente a P8 y P9 cuando están juntos en la fusión *pleuOP9P8*.

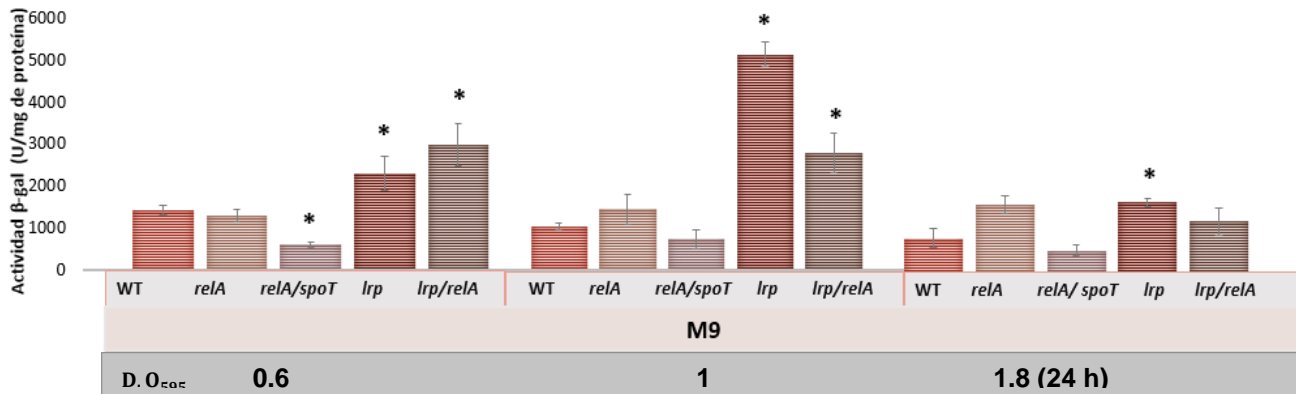


Figura 23. Actividad de β -galactosidasa de la fusión transcripcional *pleuOP9-lacZ* en *Salmonella Typhi* IMSS 1 en diferentes fondos genéticos. Se observan las actividades en medio mínimo M9, en fases de crecimiento exponencial ($D. O_{595} = 0.6$), fase estacionaria temprana ($D. O_{595} = 1$) y fase estacionaria tardía (24h). Actividad media de tres experimentos independientes (*Dato significativamente diferente a la cepa WT).

8.3 Efecto de la sobre-expresión de RelA en la expresión de las fusiones *pleuOP9P8* y *pleuOP9*.

Los resultados anteriores, mostraron la regulación de (p)ppGpp en P8 y P9 en un estado estable sin estrés, al quitar los niveles basales de la alarmona mediante mutantes en las enzimas que lo biosintetizan, y así comparar su efecto en la expresión de cada una de las fusiones. Esto nos llevó a pensar que posiblemente, si se simulara un pulso del (p)ppGpp, es decir, un estado semejante al ocasionado en la respuesta estricta (Schreiber *et al.*, 1991), mediante la sobre-inducción de la enzima RelA, esta estrategia permitiría potenciar el efecto de regulación positiva sobre P9 y negativa en P8 y P9. Además, se ha visto que *leuO* responde a un pulso de (p)ppGpp a los cinco minutos después de la inducción en *E. coli* (Sánchez-Vázquez *et al.*, 2019).

Para evaluar el efecto de la sobre-producción de (p)ppGpp en la expresión mediada por los promotores P8 y P9, se indujo la respuesta estricta con la sobre-

expresión de la sintasa mutante de (p)ppGpp, RelA' (RelA *activa* codificada en el plásmido pFC13 inducible con arabinosa). Esta variante de RelA es más corta que la proteína *silvestre* (743 aa) y tiene ausente un dominio que interacciona con el ribosoma; esto promueve la sobre-producción de (p)ppGpp sin retroalimentación del ribosoma con el ARNt descargado. La proteína RelA truncada (RelA³³¹) codificada en el plásmido inducible pFC14 es *inactiva*, esta variante se ha utilizado como un control negativo de los efectos causados por la sobre-producción de (p)ppGpp (Svitil *et al.*, 1993).

Las dos versiones trucadas de la proteína RelA, RelA⁴⁵⁵ y RelA³³¹, fueron obtenidas de los plásmidos pALS13 y pALS14 respectivamente (**Figura 24**). Estos plásmidos permiten la sobre-expresión mediada por IPTG de las variantes de la proteína RelA (Schreiber *et al.*, 1991). Sin embargo, estos plásmidos inducibles no pudieron emplearse en nuestro estudio, debido a que poseen el mismo origen de replicación y el mismo gen de resistencia a antibióticos que los plásmidos de las fusiones *pleuOP9* y *pleuOP9P8*. Por ello, se construyeron los plásmidos pFC13 y pFC14 compatibles con las fusiones.

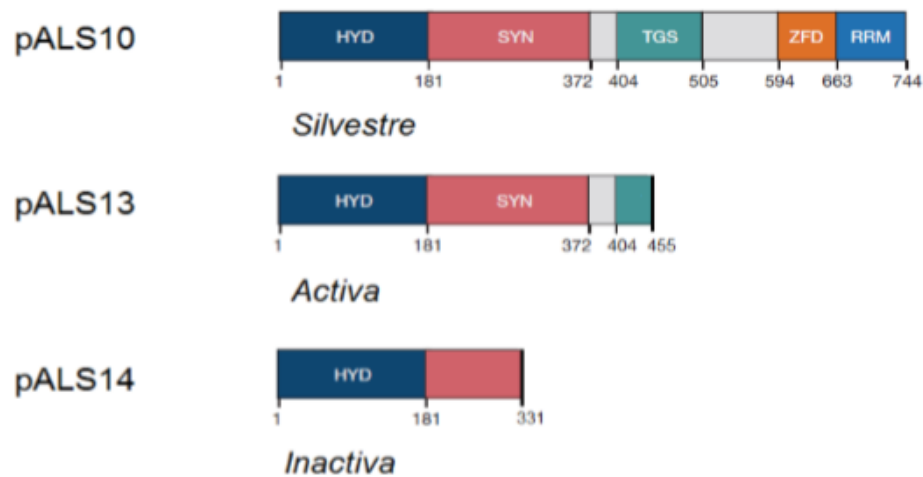


Figura 24. Distintas formas truncadas de la enzima RelA codificadas en los plásmidos pALS. Se ilustran los dominios que contienen: HYD (hidrolasa), SYN (sintetasa), TGS (ThrRS, GTPasa, SpoT), ZFD (dedos de Zinc), RRM (Motivo de reconocimiento del ARN). La construcción de pALS10 expresa a RelA silvestre (de 744 aa), la construcción pALS13 expresan la enzima con 455 aa pero aún activa, mientras que la construcción pALS14 expresa una enzima con solo 331 aa la cual es inactiva. (Modificado de Brown *et al.*, 2016; Svitil *et al.*, 1993).

Una forma de evaluar la respuesta estricta en bacterias, además de medir el contenido de (p)ppGpp, es mediante la disminución de la tasa de crecimiento, al aumentar la concentración intracelular de esta alarmona. Por esta razón, en primer lugar se evaluó el sistema con los plásmidos pFC13 y pFC14 en *E. coli*, mediante cinéticas de crecimiento induciendo al promotor pBAD a $D_{0.595} = 0.2$ con 400 μM de arabinosa en medio MN y LB (**Figura 25a**).

Como ya se había documentado (Schreiber *et al.*, 1991), la cepa con el plásmido pFC13 que sobre-produce a la enzima RelA activa en presencia de arabinosa, presentó dificultad para dividirse 1.5 horas después de la inducción. Esto no se observó en la cepa con el plásmido pFC13 sin inducir, ni en las dos cepas con el plásmido pFC14 que sobre-produce a la enzima RelA inactiva. Enseguida, se procedió a transformar *S. Typhi* IMSS 1 WT (*pleuOP9* y *pleuOP9P8*) con los plásmidos pFC13 y pFC14, y se realizaron curvas de crecimiento con arabinosa para verificar que este mismo arresto del crecimiento ocurría en *S. Typhi*.

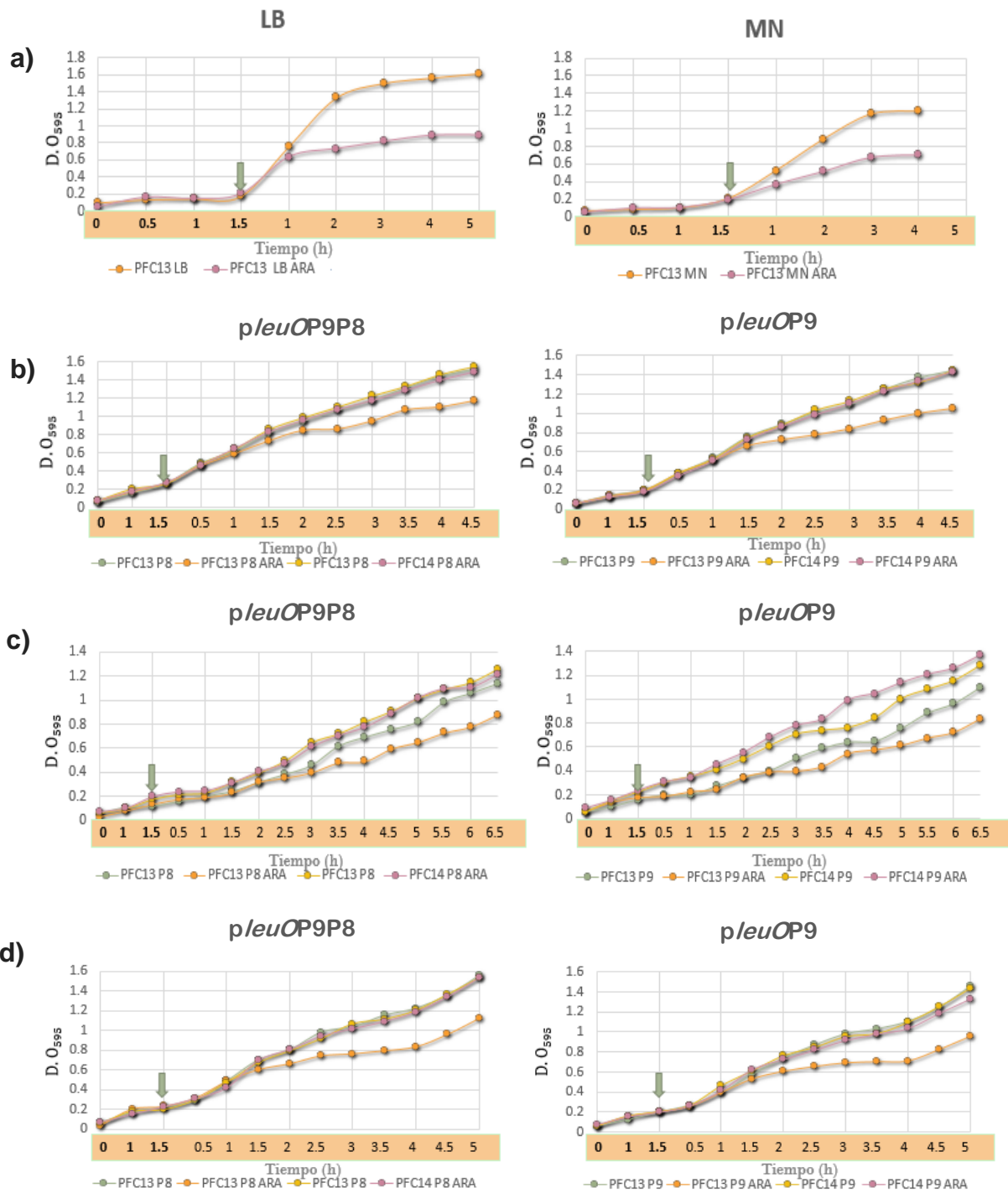


Figura 25. Caracterización del sistema RelA'. a) Curvas de crecimiento del sistema RelA' en *E. coli* con los plásmidos pFC13 en medio LB y MN, inducción $D.O_{595} = 0.2$ con 400 μM de arabinosa. b) Curvas de crecimiento del sistema RelA' en *S. Typhi* IMSS 1 *pleuOP9* y *pleuOP9P8* con los plásmidos pFC13 y pFC14 en medio LB, inducción $D.O_{595} = 0.2$ con 400 μM de arabinosa. c) Curvas de crecimiento del sistema RelA' en *S. Typhi* IMSS 1 *pleuOP9* y *pleuOP9P8* con los plásmidos pFC13 y pFC14 en medio MN, inducción $D.O_{595} = 0.2$ con 800 μM de arabinosa. d) Curvas de crecimiento del sistema RelA' en *S. Typhi* IMSS 1 *pleuOP9* y *pleuOP9P8* con los plásmidos pFC13 y pFC14 en medio LB, inducción $D.O_{595} = 0.2$ con 800 μM de arabinosa. Las flechas indican el $t=0$ (momento de la inducción).

Para caracterizar este sistema en Typhi, se usaron dos medios de cultivo: MN y LB; dos concentraciones de arabinosa, 400 y 800 μM ; y la densidad óptica (a 595 nm) de inducción fue de 0.2 (**Figura 25b, c, d**).

La inducción se llevó a cabo en dos medios de cultivo debido a que en nuestro modelo se utiliza el medio rico MN, además en varios estudios el medio LB es útil en los sistemas de inducción del promotor *pBAD* de arabinosa (Brown *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2014; Széliová *et al.*, 2016). El sistema en *S. Typhi* IMSS 1 WT con las dos fusiones *pleuOP9* y *pleuOP9P8*, se indujo de manera eficiente en el medio LB, y con mayor dificultad tanto para crecer como para inducirse en medio MN (**Figura 25c**).

En ambos medios de cultivo, la cepa con el plásmido *pFC13* inducido con arabinosa que expresa la enzima RelA activa, disminuyó su tasa de crecimiento con respecto a la cepa con el plásmido *pFC13* si inducir y las dos cepas control con los plásmidos *pFC14*. No obstante, se observó que en medio LB el sistema se indujo mejor. Una explicación del por qué esta diferencia en el crecimiento, podría ser la carga metabólica que presenta la cepa al contener los dos plásmidos, además de que el medio de cultivo MN es más rico en nutrientes que el medio LB. Es posible que el glicerol en el medio MN, afecte la expresión mediada por el promotor *pBAD* de manera similar a la regulación que ejerce la glucosa. Esta fuente de carbono promueve la reducción de los niveles de AMP cíclico, impidiendo la expresión de un catabolito importante para la activación del promotor de *pBAD* (Miyada *et al.*, 1984). Sin embargo, en *E. coli* un estudio previo no observó diferencia en la inducción cuando la cepa crece en un medio con o sin glicerol (Guzmán *et al.*, 1995).

En un principio se decidió trabajar con la $D. O_{595} = 0.4$, ya que en el laboratorio ya se había utilizado esta densidad en la inducción en Typhi con IPTG. Sin embargo, la $D. O_{595} = 0.2$ no presentó diferencias en cuanto al comportamiento en el crecimiento, (datos no mostrados) y se decidió trabajar con esa densidad óptica ya documentada (Burgos H *et al.*, 2017), en donde se asegura un crecimiento rápido y sin estrés, siendo el mejor momento para realizar la inducción y detener el metabolismo de la bacteria.

Debido a que los sistemas de transporte de arabinosa son más eficientes en *E. coli* que en *S. Typhi*, se decidió inducir a las células con 400 y 800 μM de arabinosa. Nuestros resultados no revelaron diferencias en inducción en presencia de estas dos concentraciones de arabinosa (**Figura 25b y d**). Por tanto, dado que el comportamiento de inducción fue el mismo en las dos concentraciones de inductor, se optó por trabajar con la concentración más baja de arabinosa (400 μM), en medio LB cuando la densidad óptica (a 595 nm) llegara a 0.2. Se usó el medio rico LB porque en este medio no se observó mucha variación en la expresión de las fusiones *p/leuOP9* y *p/leuOP9P8* entre experimentos, comparados con los resultados obtenidos en el medio MN (datos no mostrados).

Una vez caracterizado el sistema, se tomaron muestras de los cultivos de ambas fusiones *p/leuOP9* y *p/leuOP9P8* de *S. Typhi* IMSS 1 al tiempo 0 (antes de la inducción), y a los minutos 5, 10, 20, y 60 después de la inducción con arabinosa, en las fusiones con los plásmidos pFC13 con y sin arabinosa; y los plásmidos control pFC14. Además se siguió la curva de crecimiento y posteriormente, se midió la cantidad de proteína y la actividad de β -galactosidasa.

En ausencia de (p)ppGpp ($\Delta\text{relA } \Delta\text{spoT}$) se promueve la expresión mediada por los promotores P8 y P9 de la fusión *p/leuOP9P8*, lo cual sugiere que la alarmona juega un papel negativo en la regulación de esta región. Por el contrario, cuando se analizó la expresión aislada del promotor P9 en la fusión *p/leuOP9*, se observó que la alarmona juega un papel positivo. Para analizar si estos efectos se mantenían e incluso, eran más significativos en condiciones en las que se aumentaran artificialmente los niveles de (p)ppGpp, analizamos la expresión de las fusiones *p/leuOP9P8* y *p/leuOP9* en presencia del plásmido pFC13.

Nuestros resultados revelaron que la inducción de la sobre-producción de (p)ppGpp no tiene efecto en la expresión de estas fusiones transcripcionales (**Figura 26a y b**). Esto sugiere que la actividad de los promotores en estas fusiones transcripcionales responde a niveles bajos de (p)ppGpp pero no a niveles altos de la alarmona.

Para evaluar si había alguna regulación indirecta de *p/leuOP9P8* y *p/leuOP9* ocasionada por la sobreproducción de (p)ppGpp a tiempos más largos, se midió la

actividad de β -galactosidasa a los 120 y 180 minutos después de la inducción (**Figura 26c y d**). Los resultados obtenidos fueron similares a los reportados en tiempos cortos. La expresión de las fusiones disminuyó al menos a la mitad en los tiempos largos (120 y 180 minutos), con respecto a la expresión inicial al tiempo 0 en los tiempos. Esto podría deberse a un efecto del crecimiento o la densidad celular.

Dado que la fusión *p/leuOP9* que contiene a P9 es modestamente reprimida por Lrp; y además las dos fusiones se encuentran en una región que está sometida a una mayor represión por H-NS y Lrp (Sanchez-Popoca, 2019), podría ser necesario un paso previo de desrepresión para que (p)ppGpp ejerciera su efecto. Por ello se utilizaron las fusiones de *S. Typhi p/leuOP9* y *p/leuOP9P8* en el fondo mutante $\Delta hns \Delta lrp$ con los plásmidos pFC13 y pFC14, sin embargo, tampoco se encontró una diferencia significativa en las actividades antes y después de la inducción (sólo se muestra la fusión *p/leuOP9*) (**Figura 26e**).

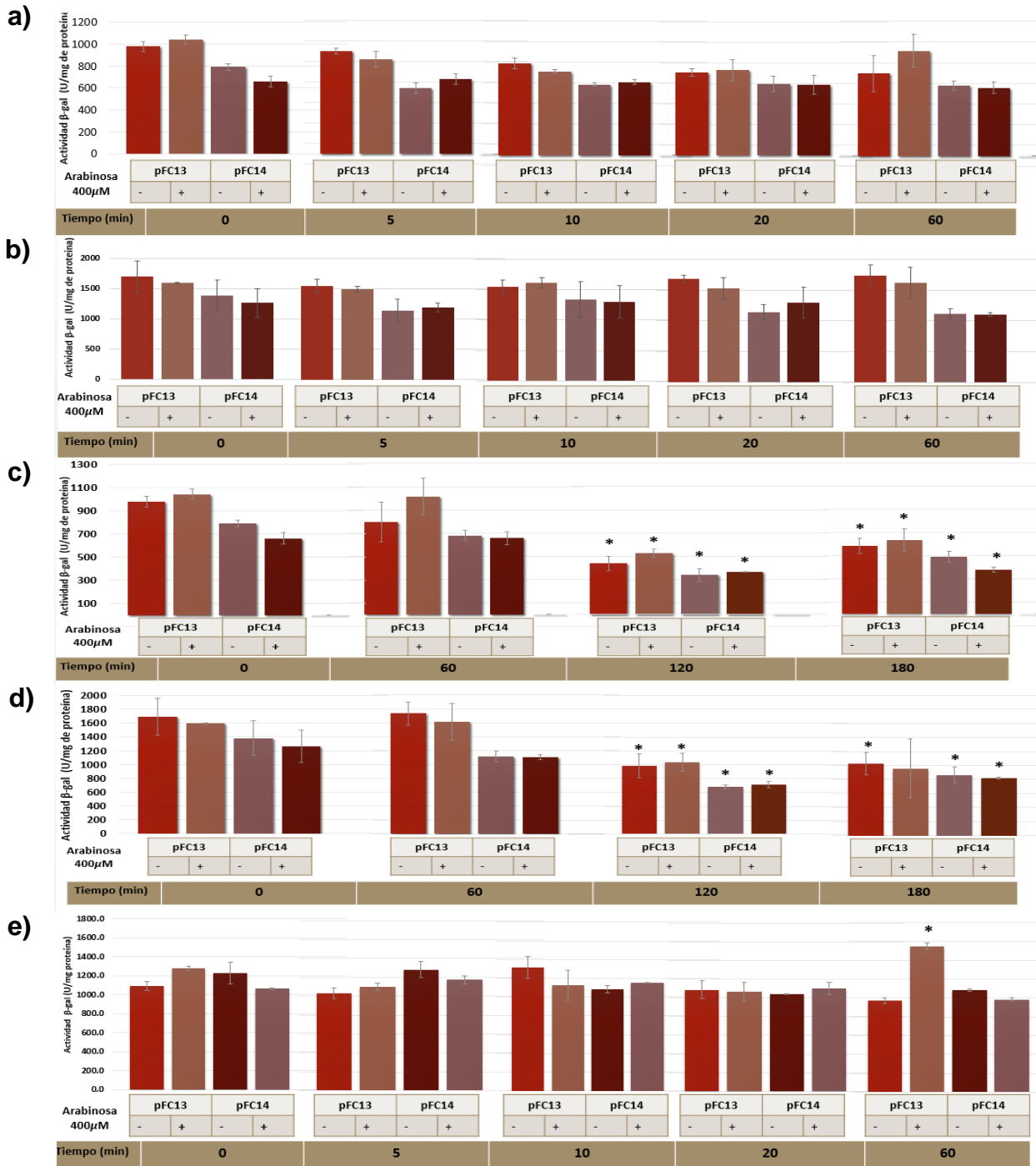


Figura 26. Actividad de β -galactosidasa de las fusiones *pleuOP9P8-lacZ* y *pleuOP9-lacZ* en *Salmonella* Typhi IMSS 1 WT con los plásmidos pFC13 y pFC14 en el ensayo de inducción de la respuesta estricta (sistema RelA'). a) Actividad de la fusión *pleuOP9P8-lacZ* en *Salmonella* Typhi IMSS 1 WT bajo la inducción de la respuesta estricta al tiempo 0 y a los 5, 10, 20 y 60 minutos después de la inducción con arabinosa en los plásmidos pFC13 y pFC14. b) Actividad de la fusión *pleuOP9-lacZ* en *Salmonella* Typhi IMSS 1 WT bajo la inducción de la respuesta estricta al tiempo 0 y a los 5, 10, 20 y 60 minutos después de la inducción con arabinosa en los plásmidos pFC13 y pFC14. c) Actividad de la fusión *pleuOP9P8-lacZ* en *Salmonella* Typhi IMSS 1 WT bajo la inducción de la respuesta estricta al tiempo 0 y a los 60, 120 y 180 minutos después de la inducción con arabinosa en los plásmidos pFC13 y pFC14. d) Actividad de la fusión *pleuOP9-lacZ* en *Salmonella* Typhi IMSS 1 WT bajo la inducción de la respuesta estricta al tiempo 0 y a los 60, 120 y 180 minutos después de la inducción con arabinosa en los plásmidos pFC13 y pFC14. e) Actividad de la fusión *pleuOP9-lacZ* en *Salmonella* Typhi IMSS 1 $\Delta hns \Delta lrp$ bajo la inducción de la respuesta estricta al tiempo 0 y a los 5, 10, 20 y 60 minutos después de la inducción con arabinosa en los plásmidos pFC13 y pFC14. Actividad media de tres experimentos independientes (*Dato significativamente diferente a la cepa sin inducir T=0).

Una explicación del por qué no ocurrió un cambio en la actividad de β -galactosidasa de las fusiones *pleuOP9* y *pleuOP9P8*, con los plásmidos inducidos con arabinosa que contenían la enzima RelA activa, podría ser la falta de síntesis de (p)ppGpp. No obstante, observamos la disminución del crecimiento en las cepas inducidas con esos plásmidos.

Para corroborar que hubiera producción de la alarmona, se transformaron las cepas mutantes $\Delta relA \Delta spoT$ con los plásmidos pFC13 y pFC14, y se indujo la expresión de *relA* en la cepa doble mutante con el plásmido pFC13 con diferentes concentraciones de arabinosa (**Figura 27**). Pudo observarse que la inducción de la expresión de *relA* en la cepa mutante $\Delta relA \Delta spoT$, promueve una disminución en el crecimiento a partir de una concentración de 25 μ M de arabinosa; esta disminución es mayor a concentraciones de inductor de 100 y 400 μ M (cantidad utilizada en este trabajo). Esto sugiere fuertemente que la inducción del gen *relA* codificado en el plásmido pFC13 promueve la producción de (p)ppGpp, y que los niveles de alarmona que se obtienen después de la inducción con al menos 100 μ M de arabinosa, son suficientes para detener por completo el crecimiento de la cepa $\Delta relA \Delta spoT$, que no posee un sistema de degradación (SpoT); fenotipo que ya ha sido anteriormente documentado en una cepa *relA*⁺ (Xiao *et al.*, 1991).

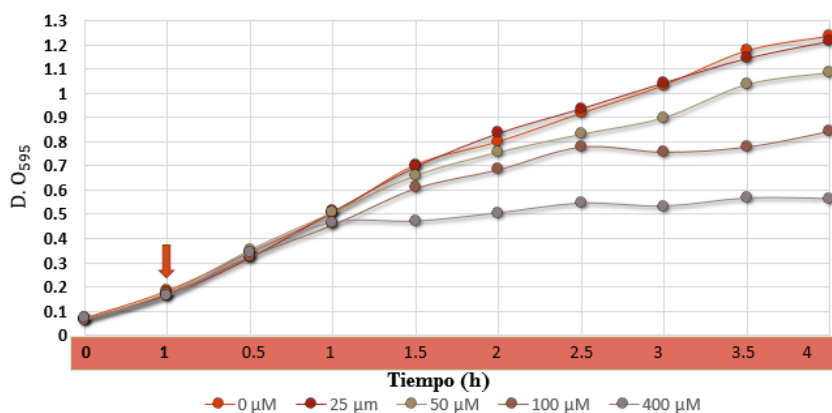


Figura 27. Curva de crecimiento de *S. Typhi* $\Delta relA \Delta spoT$ con el sistema RelA'. Inducción con el plásmido pFC13 en medio LB a D.O= 0.2 con 0, 25, 50, 100 y 400 μ M de arabinosa. La fecha indica el T=0 (momento de la inducción).

Teniendo conocimiento de que posiblemente P8 y P9 no responden a un pulso de (p)ppGpp, sino a niveles basales de la alarmona, se procedió a evaluar el restablecimiento del perfil silvestre de expresión de las fusiones *p_{leu}OP9* y *p_{leu}OP9P8* en la cepa $\Delta relA \Delta spoT$ en respuesta a la sobre-producción (p)ppGpp. Es decir, se esperaba una complementación en trans por la sobre-expresión del gen *relA*. Sin embargo, no observamos complementación en la expresión de ninguna de las dos fusiones, a ninguno de los tiempos después de la inducción (5, 30, 60 min). Además, las cepas con el plásmido control pFC14 (*RelA* inactiva) mostraron un decremento drástico en la expresión de las fusiones tanto en presencia como en ausencia del inductor arabinosa (**Anexo 13.1**). Después de transformar las cepas $\Delta relA \Delta spoT/p_{leu}OP9$ y $\Delta relA \Delta spoT/p_{leu}OP9P8$ con los plásmidos pFC13 y pFC14, las colonias mostraban un fenotipo de coloración azul en presencia del sustrato de la β -Galactosidasa (*X-gal*). Sin embargo, la coloración se perdía en incubaciones prolongadas y al resembrar los cultivos se observaron fenotipos heterogéneos, lo cual indicaba que parte de la población había perdido la capacidad de degradar *X-gal*. Además, las curvas de crecimiento no se comportaron como en la cepa $\Delta relA \Delta spoT$ sin plásmidos, descrita anteriormente a la concentración de 400 μ M (**Anexo 13.1**). Esto sugiere que hay una alta frecuencia de aparición de mutaciones supresoras en las dobles mutantes $\Delta relA \Delta spoT$, y/o que la carga metabólica de mantener dos plásmidos es una fuerte selección negativa en la cepa $\Delta relA \Delta spoT$.

9. DISCUSIÓN

9.1 Efecto de H-NS y Lrp en los promotores P8 y P9 del gen *leuO*.

El gen *leuO* posee un mecanismo de regulación complejo, hasta el momento se han caracterizado cinco promotores en sentido del gen y dos inicios de la transcripción en la cadena complementaria. Recientemente, por la técnica de “primer extension”, se identificaron dos nuevos inicios de la transcripción para P8 y P9, los cuales se encuentran en las fusiones transcripcionales al gen reportero *lacZ p_{leu}OP9P8* y *p_{leu}OP9* (**Figura 15**). Ambas fusiones muestran una actividad de β -galactosidasa en el fondo WT, y esta varía en los diferentes fondos genéticos, lo que indica la presencia de inicios de transcripción (**Figura 14 y Anexo 13.1**). La actividad de β -

galactosidasa de ambas fusiones es muy similar, lo que probablemente indica que sólo este activo uno de los promotores, y que este sea el que esté proporcionando la mayor expresión del gen *leuO*, debido a que en el “primer extension”, en la fusión *p_{leu}OP9P8* sólo se observa P8 y no ambos inicios.

En medio M9, la actividad de β -galactosidasa fue dos veces mayor comparada con el medio MN (**Figuras 15 y 17**), lo que denota que *LeuO* se expresa mejor en condiciones donde la bacteria se encuentra sometida a estrés, y en este caso el medio mínimo puede simular esta condición (Fang, 2000).

De manera interesante, a las 24 horas (fase estacionaria tardía), hubo una disminución considerable en la actividad en ambos medios y en todos los fondos con respecto a las otras dos fases de crecimiento (**Figuras 14-17**). Estos resultados sugieren, en el caso de P8 y P9, que *leuO* se expresa a mayores niveles en la fases exponencial y estacionaria temprana, y por alguna razón durante la fase estacionaria tardía, donde existe una mayor condición de estrés y de escasas de nutrientes, *leuO* se requiere en menor cantidad o que quizá, pudiera existir un factor que reprime aún más su expresión, independientemente de las proteínas H-NS y Lrp, observación que sólo habíamos reportado en medio M9 en otras fusiones transcripcionales.

En la región reguladora completa de *leuO* de *S. Typhi*, denominada *p_{leu}O684*, se ha determinado que H-NS y Lrp reprimen la expresión del gen *leuO* (Sanchez-Popoca, 2015), y a través de fusiones más cortas, se ha demostrado el importante papel que juegan estos dos reguladores globales para reprimir su expresión.

En nuestro estudio, se analizó el efecto de estos dos reguladores en las fusiones transcripcionales *p_{leu}OP9P8* y *p_{leu}OP9*. Anteriormente, se había observado que estas fusiones tienen una zona rica en AT, la cual es un sitio de alta afinidad para H-NS. Asimismo, la fusión *p_{leu}OP9P8* tiene 35 pares de bases del sitio de nucleación de 72 pb de esta proteína, reportado anteriormente en *S. Typhimurium* (Chen *et al.*, 2005); además de regiones de unión de H-NS y Lrp, reportadas *in silico* (**Figura 26**). Los datos obtenidos sugieren que en la fusión *p_{leu}OP9P8*, tanto H-NS como Lrp actúan conjuntamente para reprimir a P8 y P9 (**Figura 15**), y que además, su actuación conjunta en este caso es indispensable,

tal y como se ha mostrado en la represión de la transcripción del promotor ribosomal *rrnBP1* de *E. coli*, en donde la interacción de H-NS con el ADN, altera su estructura y favorece la afinidad de Lrp hacia este (Pul *et al.*, 2007). Por otro lado, los experimentos de interacción ADN-proteína (EMSA) por Sánchez-Popoca en 2015, demostraron que Lrp se une a un fragmento de 150 pb, que se encuentra dentro de la fusión *p_{leuOP9}* (promotor 9), la cual muestra una fuerte represión por la proteína Lrp. La diferencia en la preferente regulación de la fusión *p_{leuOP9P8}* por H-NS y Lrp, y la fusión *p_{leuOP9}* solamente por Lrp, nos hace pensar que posiblemente al estar tanto P8 como P9 en la fusión *p_{leuOP9P8}*, debe ejercerse una mayor represión, y por lo tanto sería necesaria la participación de las dos proteínas para regular esta región.

9.2 Efecto del (p)ppGpp en los promotores P8 y P9 del gen *leuO*.

Se ha demostrado que los promotores del gen *leuO* tienen una regulación diferencial por (p)ppGpp (Sánchez-Popoca, 2015). Nuestros resultados sugieren que en la fusión *p_{leuOP9P8}*, P8 y P9 son reprimidos por (p)ppGpp pero no por vía Lrp (**Figura 20**). En la fusión *p_{leuOP9}*, sucede lo opuesto, P9 es activado por (p)ppGpp (**Figura 22**). Cabe señalar que en esta fusión existe represión por Lrp, y aunque se observó por la mutante en $\Delta lrp \Delta relA$ que el efecto de (p)ppGpp no podría ser vía Lrp, habría que descartar si en una mutante $\Delta relA \Delta spoT \Delta lrp$, el nivel de Lrp aportado por SpoT sería importante en la regulación de P9. Esto podría ser posible, debido a que mientras la mutación sencilla en $\Delta relA$ parece no afectar suficiente la expresión de los promotores, quitar SpoT mostraría el efecto real de la alarmona, como se muestra en la mutante $\Delta relA \Delta spoT$ en nuestros experimentos.

Este hecho ya ha sido demostrado por Pizarro-Cerdá y Tedin en 2004, en donde observaron que los efectos de una mutante sencilla en $\Delta relA$ y la mutante $\Delta relA \Delta spoT$ eran distintos, siendo SpoT importante para determinar el mecanismo de invasión y proliferación celular.

Por otro lado, parece interesante que el (p)ppGpp regule positivamente a P9, sin embargo, cuando se encuentra junto a P8, la regulación es negativa. Una posibilidad es que la presencia de P8 esté redireccionando la regulación del

(p)ppGpp en ese estado basal, ya que esta alarmona es la responsable de desestabilizar el complejo abierto de la RNAP de todos los promotores censados (Barker *et al.*, 2001a). De esta manera, el tiempo de vida media del complejo abierto de P9, sería tan alto como los promotores de biosíntesis de aminoácidos que son activados en la respuesta estricta, impidiendo al (p)ppGpp desestabilizar la transcripción, y por otro lado el tiempo de vida de P8 podría ser tan corto como los promotores ribosomales inhibidos por (p)ppGpp, el cual ejerce un fuerte efecto represor de su transcripción (Barker *et al.*, 2001a; Barker *et al.*, 2001b). De esta forma, al estar juntos y como se ha postulado en el modelo pasivo (Zhou & Jin, 1998; Barker & Gourse, 2001), ambos promotores podrían competir por las polimerasas reguladas por la alarmona, y esto podría impedir la activación de P9 a pesar de ser insensible a la disminución del tiempo de vida media de su complejo abierto, inactivando a ambos promotores a bajos niveles de (p)ppGpp.

Como ya se ha observado, los niveles de SpoT aportan el (p)ppGpp suficiente para observar su efecto completo en la doble mutante $\Delta relA \Delta spoT$ en la regulación de P8 y P9, lo cual nos da el indicio de que, en un mecanismo directo de regulación, éste activa a P9 al estar solo y reprime a P8 y P9 cuando están juntos. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que (p)ppGpp pueda actuar de forma indirecta, ya que se ha visto que este es un regulador global el cual ocasiona un impacto pleiotrópico, y podría así tener efecto en otras proteínas que a su vez regulen a los promotores de *leuO* (Durfee *et al.*, 2008; Traxler *et al.*, 2008; Dalebroux *et al.*, 2010). Por otro lado, estas fusiones transcripcionales son largas, y no podemos descartar que el efecto de (p)ppGpp sea a través de otros reguladores que pudieran unirse al ADN, y no solamente por la unión de la alarmona a la RNAP. Si fuera así, para activar a P9, (p)ppGpp podría activar a un activador o reprimir a un represor, y por otra parte, para reprimir a P8 y P9 al estar juntos, (p)ppGpp podría reprimir a un activador o activar a un represor (**Figura 28**).

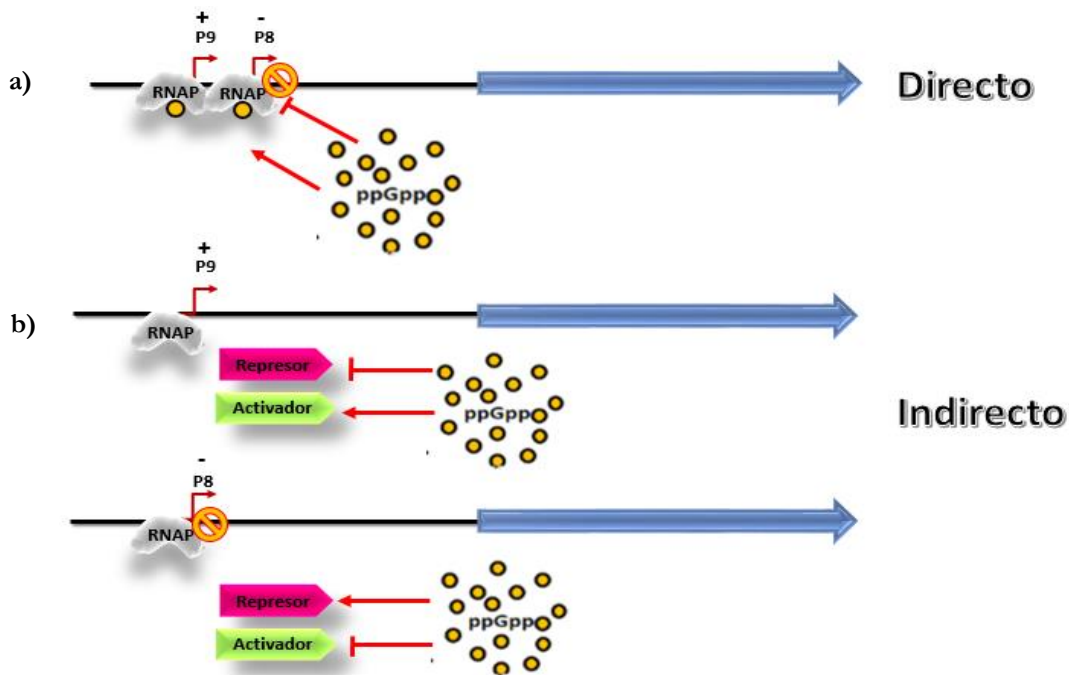


Figura 28. Dos modelos de regulación de los promotores P8 y P9 a través de (p)ppGpp. (p)ppGpp podría tener un efecto directo en la transcripción, donde interacciona con la polimerasa y favorece o desfavorece la expresión en estos promotores. **a)** De manera indirecta (p)ppGpp podría estar activando a un activador del promotor 9 o podría reprimir la expresión de un represor. **b)** Para el promotor 8(9), (p)ppGpp podría estar modulando positivamente a un represor o controlando negativamente la expresión de un activador.

Estos resultados sugieren que la regulación por (p)ppGpp puede ser diferencial, dependiendo si los promotores se encuentran juntos o separados uno de otro; sin embargo, esto sólo podríamos descartarlo al mutar las cajas de algunos de los promotores, y así discriminar si la actividad de uno pueda estar dada por influencia del otro. Además, se podrían hacer fusiones más cortas para descartar efectos indirectos de la alarmona

9.3 Efecto del (p)ppGpp en un pulso por la sobre-inducción de la proteína RelA.

Al simular un pulso del (p)ppGpp, es decir, un estado semejante al ocasionado en la respuesta estricta (Schreiber *et al.*, 1991), mediante la sobre-inducción de la enzima RelA, nos planteamos la hipótesis de que esta estrategia permitiría potenciar el efecto de regulación positiva sobre P9 y negativa en P8 y P9. Sin embargo, el pulso no afectó la expresión de las dos fusiones a tiempos cortos, ni a tiempos largos (**Figura 26a, b, c y d**). Por otro lado, al dar el pulso en cepas mutantes en H-NS y

Lrp con las fusiones que, como se ha visto, son proteínas represoras que pudieran posicionarse en el ADN, y obstruir el efecto de la alarmona sobre la RNAP, tampoco se observó una diferencia (**Figura 26e**). En nuestros resultados, pudimos comprobar que este efecto no se debe a la falta de síntesis de la alarmona dado que sí se produjo el suficiente (p)ppGpp para inducir la respuesta estricta. Sin embargo, no descartamos la posibilidad de cuantificar directamente el (p)ppGpp mediante cromatografía en capa fina, para evidenciar su presencia al inducirlo, o mediante controles que sean regulados por esta alarmona; como es el promotor de *iraP* en *E. coli*, responsable de la síntesis de un anti adaptador, proteína necesaria para la estabilización del factor sigma (Bougdor & Gottesman, 2007; Ross *et al.*, 2016), y así evaluar su respuesta a un pulso en nuestro sistema.

Nuestros resultados demuestran que P8 y P9 no responden a un pulso de (p)ppGpp, pero se requiere una producción limitada de la alarmona para ver su efecto en regulación (estado estable).

Este hecho ya se ha visto al inducir la respuesta estricta, en un estudio en donde se utilizaron RNAPs mutadas en los dos sitios de unión del (p)ppGpp a la RNAP, lo cual permitiría distinguir los efectos directos de la alarmona en la polimerasa de los indirectos, mediante su unión a otros blancos (Sánchez-Vázquez *et al.*, 2019). En este estudio para diversos genes, la mutación de estos sitios en un estado estable (tiempo 0, antes de la sobre-inducción de RelA), mostró un nivel de expresión diferente y opuesto, a los 5 y a los 10 minutos de inducirse la respuesta estricta (después del pulso), lo cual habla de que existen genes que se expresan de manera distinta en un estado estable y en un pulso de (p)ppGpp. Tal es el caso de genes como *ompF* y *lrhA*, que muestran disminución en la expresión durante el estado estable, mientras que en un pulso no hay un cambio significativo en su expresión (Sánchez-Vázquez, 2019).

Este fenómeno, posiblemente es debido a que hay dos sitios de interacción del (p)ppGpp con la RNAP; el primero entre las subunidades β' y ω , el cual no requiere de la participación del factor DksA, y el segundo en la interface entre β' y DksA (Mechold *et al.*, 2013; Ross *et al.*, 2013; Ross *et al.*, 2016). Mientras que se ha postulado que el primer sitio es el de mayor afinidad para el (p)ppGpp, el segundo

sitio es el de menor afinidad, ya que se requiere el doble de cantidad de moléculas de (p)ppGpp, para causar efectos en la inhibición del promotor ribosomal *rrnBP1*, que se sabe responde a la respuesta estricta. Asimismo, se le ha atribuido ser el sitio en el que mayores efectos aporta la alarmona (Ross *et al.*, 2016).

Esta característica podría ser importante, ya que al haber dos sitios para (p)ppGpp con diferentes afinidades, se ampliaría el rango dinámico para la respuesta estricta en diferentes condiciones de crecimiento. Nuestros datos predicen que el sitio 1 sería responsable de los efectos al inicio de la transcripción, ya sea desestabilizando el complejo abierto e inactivando la transcripción de un promotor o promoviendo su transcripción, cuando las concentraciones de (p)ppGpp son bajas, es decir, durante el crecimiento en medio rico o temprano en una respuesta estricta basal.

Sin embargo, cuando las concentraciones de (p)ppGpp son lo suficientemente altas, como para llenar ambos sitios, (respuesta estricta, simulación de un pulso) la presencia de la proteína DksA favorecería cambios conformacionales de la RNAP, afectando las interacciones RNAP-promotor (Ross *et al.*, 2016), inhibiendo el efecto de la alarmona sobre sus blancos (Ross *et al.*, 2013; Ross *et al.*, 2016).

Aunque la mayoría de los promotores que están regulados por (p)ppGpp también responden a DksA, un estudio ya ha demostrado que DksA y (p)ppGpp, incluso, pueden regular genes de manera diferencial (Aberg *et al.*, 2009). En este estudio se ha encontrado, mediante proteómica, que mientras algunos genes son regulados negativamente por (p)ppGpp y DksA, otros son regulados positivamente sólo por DksA, sin ser necesaria la participación de (p)ppGpp.

Esto ya ha sido visualizado en estudios *in vivo* con los genes *argX* y *fimB* (Aberg *et al.*, 2009; Lyzen *et al.*, 2016), donde se ha propuesto un mecanismo alternativo de regulación por la alarmona, en el cual DksA puede unirse primero al canal secundario de la RNAP, en condiciones de bajo (p)ppGpp (Paul *et al.*, 2004; Pederina *et al.*, 2004), dándole una conformación a la RNAP para activar o reprimir la transcripción. Posteriormente, al generarse la respuesta estricta, se uniría el (p)ppGpp, alterando el estado conformacional de la molécula y modulando nuevamente la actividad de la enzima por el promotor (Ross *et al.*, 2016).

En este trabajo, se caracterizó parte de la regulación de los promotores 8 y 9, en donde se intentó esclarecer su regulación con las proteínas H-NS, Lrp y la alarmona (p)ppGpp, esta última fue analizada en un estado estable es decir, sin condiciones de estrés o sin cambios nutricionales, y en un pulso de (p)ppGpp, el cual simula la respuesta estricta y hasta ahora se propone un modelo general la regulación por H-NS, Lrp y (p)ppGpp y un modelo alternativo de regulación por (p)ppGpp, en los promotores 8 y 9 del gen *leuO*.

P8 y P9 se encuentran normalmente reprimidos por H-NS y Lrp, habiendo un efecto represor mayor hacia P9 por parte de Lrp y, en ambos promotores tanto de H-NS como de Lrp. Posteriormente, y como ha sido previamente descrito (Sánchez-Popoca, 2019), es necesario un primer paso de desrepresión, en donde un factor sea capaz de reacomodar o desplazar los represores, de tal manera que la polimerasa tenga acceso a la transcripción, y potencialmente su actividad sea modulada con (p)ppGpp en función de su concentración. Durante el estado estable se ocuparía el sitio 1 el cual se llenaría respondiendo a bajos niveles de la alarmona. Al estar ambos promotores juntos, estos podrían competir por la RNAP y posiblemente el (p)ppGpp, no podría ejercer su efecto, es decir, disminuiría la tasa de transcripción y la regulación sería negativa. Sin embargo, cuando se aísla sólo al promotor 9 en el mismo estado estable la regulación cambia, siendo (p)ppGpp un activador. Posteriormente, al aumentar los niveles de la alarmona durante la respuesta estricta, se llenarían tanto el sitio 1 como el sitio 2, y al estar saturados, la presencia del factor DksA podría alterar el estado conformacional de la RNAP, inhibiendo los efectos del (p)ppGpp sobre los promotores del gen *leuO* (**Figura 29**).

Un modelo alternativo de regulación durante el estado estable, sería sobre P9 regulado positivamente, en el cual DksA (al mantener su concentración constante) (Paul *et al.*, 2004) se uniría al sitio 2, sin ser necesaria la presencia de (p)ppGpp, el cual se encontraría en bajos niveles, favoreciendo la transcripción. Sin embargo, al aumentar los niveles de (p)ppGpp, este se uniría y se llenarían ambos sitios ejerciendo el efecto opuesto en la transcripción junto con DksA, ya que se ha observado que los efectos de (p)ppGpp *in vivo*, requieren del factor DksA (Lyzen *et al.*, 2016) (**Figura 30**).

Futuros estudios de mutantes en DksA, así como mutantes en los sitios de unión de (p)ppGpp a la RNAP, ayudarían a detallar el mecanismo de regulación para cada promotor de *leuO*, así como para observar si el efecto sobre estos promotores es directo, o se lleva a cabo a través de otro factor.

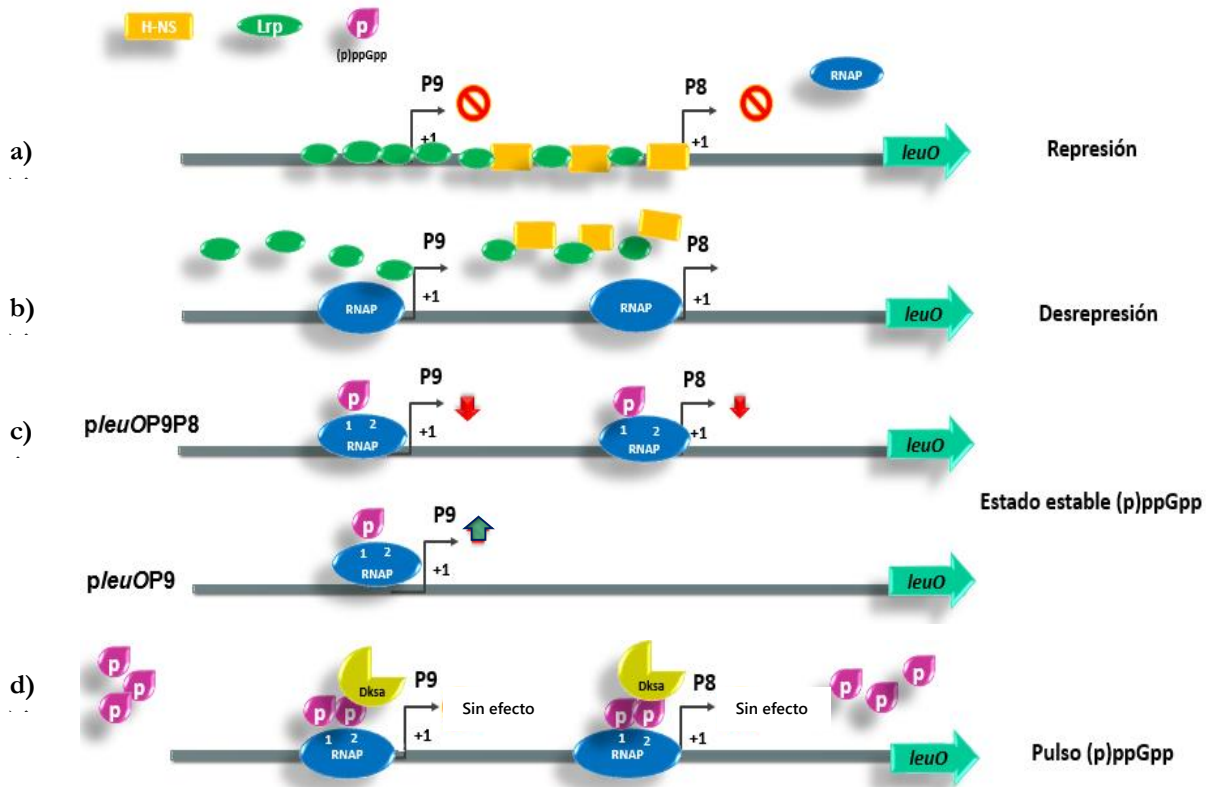


Figura 29. Modelo de regulación de los promotores P8 y P9 por H-NS, Lrp y (p)ppGpp. **a)** En condiciones estándar de laboratorio, los promotores P8 y P9 del gen *leuO* están reprimidos por H-NS y Lrp. **b)** Posteriormente una señal desconocida desencadena la desrepresión por H-NS y Lrp, permitiendo la transcripción por la RNAP a través de (p)ppGpp. **c)** Durante el estado estable sin estrés, la alarmona (p)ppGpp puede aprovechar la desrepresión de esta zona y así modular a ambos promotores: de manera positiva al promotor 9, y negativa a los promotores 8 y 9, uniéndose al sitio 1 de menor afinidad. **d)** Durante la respuesta estricta, la cantidad de la alarmona aumentaría, llenando los dos sitios de interacción con la RNAP. Estos promotores por sí solos no responden a un pulso de (p)ppGpp, y por lo tanto aunque esta zona ya esté desreprimida por reguladores negativos, los efectos de la alarmona no son visibles a altas concentraciones.

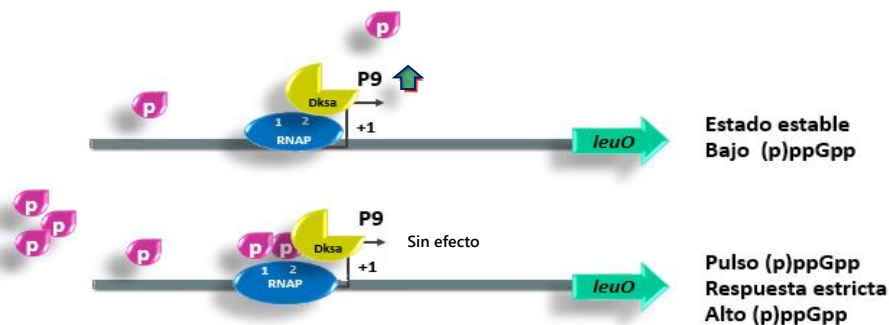


Figura 30. Modelo alternativo de regulación de (p)ppGpp sobre el promotor 9. Después de la desrepresión por H-NS y Lrp durante el estado estable y bajo concentraciones bajas de (p)ppGpp, el factor DksA se une al promotor 9 en el sitio 2 de la RNAP y activa su transcripción. Sin embargo, durante la respuesta estricta, la cantidad del (p)ppGpp aumenta, llenando los dos sitios de interacción con la RNAP, alterando la interacción RNAP-promotor, e inactivando su transcripción.

9.4 Los contrastes y las sutilezas de LeuO

LeuO es un regulador positivo y negativo de diversos procesos biológicos con un papel fundamental en la vida libre, así como en la patogénesis de diversos microorganismos. Una de las preguntas más importantes que ha surgido del estudio de LeuO es ¿cómo el mismo regulador permite la adaptación en respuesta a una variedad de estímulos en diferentes bacterias?

En *S. Typhi* hemos encontrado nueve inicios de la transcripción en la región reguladora de LeuO, lo cual nos ha llevado a proponer hipótesis que expliquen su sentido biológico. ¿Por qué se ha seleccionado conservar nueve inicios de la transcripción para *leuO* en la historia evolutiva de *S. Typhi*? Iniciar la transcripción de un gen desde múltiples promotores, puede proveer flexibilidad adicional en el control de la expresión. En *E. coli*, se ha estimado que el 25% de las unidades de transcripción tienen más de un promotor, y se ha propuesto que múltiples promotores también pueden servir como una reserva. Esto aseguraría que las mutaciones potencialmente nocivas que eliminan la función de un promotor, no conduzcan a la pérdida de la expresión del gen (Huerta *et al.*, 2006; Jia *et al.*, 2017). Asimismo, se ha visto que promotores múltiples ayudan a adaptar la expresión de un gen en particular a un entorno nutricional. En estos casos, un promotor es a menudo constitutivo, mientras que el otro es inducible. Otros ejemplos demuestran que cada promotor podría aportar transcritos con diferente estabilidad, dada la diferencia en sus secuencias líder (Schibler & Sierra, 1987).

Por otro lado, diversos estudios nos dejan claro que los niveles de LeuO determinan el contenido del regulón; hecho que le permitiría a la bacteria controlar las concentraciones intracelulares de LeuO, y así regular a diferentes subgrupos de genes blanco dependiendo de su concentración (Dillon *et al.*, 2012). Tal es el caso de las porinas OmpS1 y OmpS2, que al igual que *leuO* son quiescentes, las cuales se ha propuesto, necesitan dosis opuestas de este regulador para activar su expresión (De la Cruz *et al.*, 2007).

Otras interrogantes son: ¿Cuál es la contribución de los nueve inicios de transcripción para controlar la dosis de LeuO en respuesta a diferentes señales?

¿Cómo se regula o coordina, o ambos el inicio de transcripción desde cada promotor para modular la dosis de LeuO?

Hasta el momento nuestros datos sugieren que los promotores P1 y P3 de LeuO, podrían aportar mayor cantidad de transcrito que los otros promotores; y que estos últimos podrían hacerlo en menor cantidad y a diferentes niveles.

La presencia de promotores con diferente fuerza, asemeja un sistema de modulación fina. Esto podría lograrse con un sistema binario de encendido-apagado, combinado con un sistema de interruptores que le ayudarían a la bacteria a adaptarse a diferentes nichos dentro del hospedero, y así modular los niveles de *leuO* convenientemente. Probablemente, esto también le permitiría al gen ser regulado de manera alternativa por diferentes reguladores. En *Listeria monocitogenes*, un mecanismo similar ocurre con el regulador PrfA, siendo sus tres promotores el interruptor que desencadena la transición de un estilo de vida saprófito ambiental a patógeno (De las Heras et al., 2011; Gaballa et al., 2019; Kreft et al., 2001; Scotti et al., 2007).

El entendimiento de la regulación de LeuO, podría ser aún más complejo si tomamos en cuenta la posible interacción en sus promotores ¿Podría la transcripción de uno de sus promotores afectar la transcripción de los otros? Se ha demostrado que el superenrollamiento favorece la transcripción en relevo, entre dos promotores adyacentes en el gen capsular *kps* en *E. coli* (Jia et al., 2017). Además, hallazgos recientes concluyeron que un exceso de promotores en ciertos genes, puede tener un efecto silenciador en la transcripción, al proporcionar una plataforma para la interferencia entre varias moléculas de RNAP (Bykov et al., 2020). Estudios próximos por mutagenesis en cada promotor de *leuO*, nos permitirán contestar esta interrogante.

Otra de las interrogantes es ¿cómo se regula y coordina la transcripción de cada promotor de LeuO? El uso de diferentes factores sería una posible estrategia. Algunos genes de enterobacterias, utilizan un factor sigma alternativo que ayuda a la transcripción de un promotor diferente en la entrada de la fase estacionaria, precisamente para regular el aporte de transcrito durante la respuesta a estrés.

CsrA, una proteína de unión a ARN, la cual controla amplia una variedad de procesos y comportamientos celulares, y que autores remarcan de regulación compleja; con cinco promotores, nos muestra un mecanismo similar de regulación (Dávalos-García *et al.*, 2001; Yakhnin *et al.*, 2011). Curiosamente, dos de sus promotores se encuentran tan cercanos como los promotores P5 y P4 de *leuO*, y se ha demostrado que compiten por la RNAP *in vivo*, más no *in vitro* (Yakhnin *et al.*, 2011). La presencia de un regulador, parece ser la clave. Múltiples promotores pueden ser regulados independientemente, por diferentes activadores o represores y, por lo tanto, pueden permitir la integración de diferentes estímulos ambientales ¿En *LeuO*, qué favorecería esa diferencia?

Nuestro grupo ha intentado explicarse, ¿por qué cada promotor de *leuO* es regulado diferencialmente por la alarmona (p)ppGpp durante un estado basal?, y ¿por qué no en respuesta a un pulso de la alarmona? como lo hemos demostrado en este trabajo con P8 y P9. Para responder esta pregunta, sería interesante cuantificar la concentración intracelular de la alarmona, durante un estado estable y durante la respuesta estricta; hipotetizando que en cada promotor el aporte de la alarmona sea distinto. Al parecer, quizá sólo hemos abierto una pequeña ventana de un complejo mundo de regulación entre *LeuO* y (p)ppGpp.

Lo que sabemos hasta ahora, es que los reguladores globales H-NS y Lrp, tienen un papel importante en la represión de *leuO*, y que su actuación conjunta parece ser indispensable para una mayor represión. Hecho que hemos observado al hacer recortes de distintas fusiones transcripcionales, observando que cuanto más corta es la región reguladora, se puede liberar aún más la expresión en los fondos mutantes en esas proteínas.

Esto nos hace pensar en un paso previo de desrepresión, dando pie a una pregunta más importante: ¿qué desencadenaría esa desrepresión? Algunas evidencias en otras bacterias como *S. Typhimurium* y *V. cholerae*, han demostrado que la expresión de *leuO* se requiere *in vivo* para favorecer el desarrollo de la enfermedad en ratones (Rodríguez *et al.*, 2006; Lawley, *et al.*, 2006), indicando que es probable que la señal de desrepresión de *leuO* se halla dentro del intestino (Bina

et al., 2013), o es producida por el sistema inmune del hospedero (Tenor *et al.*, 2004).

Estudios recientes en *S. Typhimurium*, demostraron que la cantidad de H-NS disminuye 16 veces cuando está dentro del macrófago (Choi *et al.*, 2019). Este mecanismo descubierto, permite que un patógeno exprese genes de virulencia extraños, para adquirir la capacidad de sobrevivir dentro del macrófago durante la infección. Sería interesante que *leuO* fuera un gen de este tipo y que, su adquisición fuera importante para favorecer la invasión y colonización, así como contender mejor la respuesta inmune del huésped. Además, el papel antagonista de LeuO sobre H-NS como se ha postulado por varios autores, podría potenciar mejor su expresión en estas condiciones (Chen & Wu, 2005; De la Cruz *et al.*, 2007; Shimada *et al.*, 2011).

Por otro lado, al tener los mismos sitios de unión que H-NS, LeuO podría estar actuando como un regulador de respaldo para esta proteína, y por lo tanto, el papel como activador o como represor podría darse en el contexto de la abundancia de H-NS (Dillon *et al.*, 2012; Espinosa & Casadesús, 2014).

Ensayos que nos permitan seguir la expresión de *leuO in vivo* mediante fluorescencia, ayudarían a entender el papel que desempeñan LeuO y cada uno de sus promotores durante la infección. No es de sorprender la complejidad de este regulador, dada su capacidad para regular a un conjunto ecléctico de genes, incluidos algunos importantes inmunógenos como es el caso de las porinas OmpS1 y OmpS2 (Hernández-Lucas *et al.*, 2008; Guadarrama *et al.*, 2014). Esto ha abierto la posibilidad de desarrollar vacunas para tratar la fiebre tifoidea, y quizás como adyuvantes para otras más (Moreno Eutimio *et al.*, 2013).

10. CONCLUSIONES

- Los segmentos de la región 5' reguladora del gen *leuO*, contenidos en las fusiones *pleuOP9P8* y *pleuOP9* muestran actividad de β -galactosidasa de promotor en un fondo silvestre y esta varía en los diferentes fondos genéticos.
- P9 es regulado de manera negativa por Lrp cuando este se encuentra aislado.
- P8 y P9 cuando se encuentran juntos, son regulados de manera negativa por H-NS y Lrp.
- La alarmona (p)ppGpp regula positivamente a P9 y negativamente a promotores P8 y P9.
- P8 y P9 responden a niveles basales y no a un pulso de (p)ppGpp.

11. PERSPECTIVAS

- Utilizar un control positivo que se ha documentado responde a un pulso de (p)ppGpp, como es el promotor de *iraP* en *E. coli* para evaluar el sistema de inducción de la proteína RelA.
- Mutar a uno de los promotores para determinar si la actividad de uno es influenciada por la actividad de otro.
- Hacer fusiones más cortas para observar si existe un cambio en la regulación en cada promotor.
- Cuantificar la cantidad de (p)ppGpp mediante cromatografía en capa fina, para medir los niveles de alarmona aportados durante el estado estable y al simular la respuesta estricta.
- Hacer mutantes en los sitios de unión del (p)ppGpp a la RNAP, y evaluar si los efectos de cada sitio (*in vivo*), corresponden con los efectos observados *in vitro* en este trabajo.

12. REFERENCIAS

- Aberg A., Fernandez-Vázquez J., Cabrer-Panes J. D., Sánchez A., & Balsalobre C. (2009). Similar and divergent effects of ppGpp and DksA deficiencies on transcription in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 191(10):3226- 3236.
- Andino A., & Hanning I. (2014). *Salmonella enterica*: Survival, colonization, and virulence differences among serovars. *The Scientific World Journal*. 2015:16.
- Ante V., Bina X., Howard M., Sayeed S., Taylor D., & Bina J. E. (2015a). *Vibrio cholerae leuO* transcription is positively regulated by ToxR and contributes to bile resistance. *Journal of Bacteriology*. 197:3499-3510.
- Ante V., Bina X., & Bina J. (2015b). The LysR-type regulator LeuO regulates the acid tolerance response in *Vibrio cholerae*. *Microbiology*. 161:2434-2443.
- Barker M., & Gourse R. (2001). Regulation of rRNA transcription correlates with nucleoside triphosphate sensing. *Journal of Bacteriology*. 183:6315–6323.
- Barker M., Gaal T., & Gourse R. (2001a). Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. II. Models for positive control based on properties of RNAP mutants and competition for RNAP. *Journal of Molecular Biology*. 305: 689–702.
- Barker M., Gaal T., Josaitis C., & Gourse R. (2001b). Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation in vivo and in vitro. *Journal of Molecular Biology*. 305:673–688.
- Betancor L., & Yim L. (2012). *Salmonella* y salmonelosis. Departamento de Bacteriología y Virología. Revisión. Facultad de Medicina.
- Bina X., Taylor D., Vikram A., Ante V., & Bina J. (2013). *Vibrio cholerae* ToxR downregulates virulence factor production in response to cyclo (Phe-Pro). *Molecular Biology and Physiology*. 4:1-9.
- Breddermann H., & Schnetz K. (2017). Activation of *leuO* by LrhA in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 104(4):664-676.
- Borman E., Stuart C., & Wheeler K. (1944). Taxonomy of the Family Enterobacteriaceae. *Journal of Bacteriology*. 48(3):351-67.
- Bougdor A., & Gottesman S. (2007). ppGpp regulation of RpoS degradation via anti-adaptor protein IraP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104:12896–12901.
- Brown A., Fernández I., Gordiyenko Y., & Ramakrishnan V. (2016). Ribosome-dependent activation of stringent control. *Nature*. 1 (0).
- Burgos H., O'Connor K., Sanchez-Vazquez., & Gourse R. (2017). Roles of transcriptional and translational control mechanisms in regulation of ribosomal protein synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 199: 00407–00417.
- Bykov A., Glazunova O., Alikina O., Sukharicheva N., Masulis I., Shavkunov K., & Ozoline O. (2020). Excessive promoters as silencers of genes horizontally acquired by *Escherichia coli*. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 7:28.
- Calva E., Puente J., & Calva J. (1988). Research opportunities in typhoid fever: epidemiology and molecular biology. *BioEssays*. 9:173177.
- Calvo J., Freundlich M., & Umbarger H. (1969). Regulation of branched-chain amino acid biosynthesis in *Salmonella* Typhimurium: isolation of regulatory mutants. *Journal of Bacteriology*. 97(3):1272-1282.

- Carey M., Peterson C., & Smale S. (2013). The primer extension assay. Cold Spring Harbor Protocols. doi:10.1101/pdb.prot071902.
- Cashel M., & Gallant J. (1969). Two Compounds implicated in the function of the RC Gene of *Escherichia coli*. *Nature* .221:838-841.
- Chen C., Fang M., Majunder A., & Wu H. (2001). A 72 pair AT-rich ADN sequence element functions as a bacterial gene silencer. *The Journal of Biological Chemistry*. 276:9478-9485.
- Chen C., Ghole M., Majunder A., Wang Z., Chandana S., & Wu H. (2003). LeuO-mediated transcriptional derepression. *The Journal of Biological Chemistry*. 278:38094-38103.
- Chen C., & Wu H. (2005). LeuO protein delimits the transcriptionally active and repressive domains on the bacterial chromosome. *The Journal of Biological Chemistry*. 280:15111–15121.
- Chen C., Chou M., Huang C., Majumder A., & Wu H. (2005). A cis-spreading nucleoprotein filament is responsible for the gene silencing activity found in the promoter relay mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*. 280: 5101–5112.
- Chen S., Rosner M., & Calvo J. (2001). Leucine-regulated self-association of leucine responsive regulatory protein (Lrp) from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*. 312:625–635.
- Chen S., & Calvo J. (2002). Leucine-induced dissociation of *Escherichia coli* Lrp hexadecamers to octamers. *Journal of Molecular Biology*. 318:1031–1042.
- Curran T., Abacha F., Hibberd S., Rolfe M., Lacey M., & Green J. (2017). Identification of new members of the *Escherichia coli* K-12 MG1655 SlyA regulon. *Microbiology*. 163:400- 409.
- Dalebroux Z., Svensson S., Gaynor E., & Swanson M. (2010). ppGpp conjures bacterial virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 74:171-199.
- Dalebroux Z., & Michele S. (2012). ppGpp magic beyond RNA polymerase. *Nature Reviews Microbiology*. 10:203-2012.
- Davalos-Garcia M., Conter A., Toesca I., Gutierrez C., & Cam K. (2001). Regulation of *osmC* gene expression by the two-component system *rcsB-rscC* in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 183 (20):5870–5876.
- De las Heras A., Cain R., Bielecka M., & Vázquez-Boland J. (2011). Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Current Opinion in Microbiology*. 14:118–127.
- De la Cruz MA., Fernández-Mora M., Guadarrama C., Flores-Valdez MA., Bustamante VH., Vázquez A., & Calva E. (2007). LeuO antagonizes H-NS and StpA-dependent repression in *Salmonella enterica* *ompS1*. *Molecular Microbiology*. 66:727-743.
- Dillon C., Espinosa E., Okamp K., Ussery W., Casadesús J., & Dorman C. (2012). LeuO is a global regulator of gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*. 85(6):1072- 1089.
- Dorman C., & Dorman M. (2017). Control of virulence gene transcription by indirect readout in *Vibrio cholerae* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Environmental Microbiology*. 19(10):3834-3845.

- Durfee T., Hansen A., Zhi H., Blattner F., & Jin D. (2008). Transcription profiling of the stringent response in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 190:1084–1096.
- Enciclopedia de Genes y Genomas Kyoto. Recuperado el 01 de Marzo del 2020 de http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?sty:STY0134.
- Espinosa E., & Casadesús J. (2014). Regulation of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 (SPI-1) by the LysR-type regulator LeuO. *Molecular Microbiology*. 91(6):1057–69.
- Fang M., Majumder A., Tsai K., & Wu H. (2000). ppGpp-dependent *leuO* expression in bacteria under stress. *Biochimica et Biophysica Acta*. 276:64-70.
- Fang M., & Wu H. (1998a). A promoter relay mechanism for sequential gene activation. *Journal of bacteriology*. 180:3, 626–633.
- Fang M., & Wu H. (1998b). Suppression of *leu-500* mutation in *topA+* *Salmonella* Typhimurium strains. *The Journal of Biological Chemistry*. 273(45):29929–34.
- Fernandez-Mora M., Puente J., & Calva E. (2004). OmpR and LeuO positively regulate the *Salmonella enterica* Serovar Typhi *ompS2* porin gene. *Journal of Bacteriology*. 186:2909-2920.
- Figueroa-Ochoa., & Verdugo Rodriguez. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 47:25-38.
- Gaballa A., Guariglia-Oropeza V., Wiedmann M., BoorK J. (2019). Crosstalk between SigB and PrfA in *Listeria monocytogenes* facilitates transitions between extra-and intracellular environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 83:e00034-19.
- Ghosh P., Reddy V., Swinscoe J., Lebowitz P., & Weissman S. (1978). Heterogeneity and 5'-terminal structures of the late RNAs of simian virus 40. *Journal of Molecular Biology*. 126:813–846.
- Gourse R., Chen A., Gopalkrishnan S., Sanchez-Vazquez P., Myers A., & Ross W. (2018). Transcriptional responses to ppGpp and DksA. *Annual Review of Microbiology*. 8 (72):163-184.
- Groisman E., & Ochman H. (1997). How *Salmonella* became a pathogen. *Trends In Microbiology*. 343:5, 9.
- Guadarrama C. (2004). Estudio de la regulación de la expresión del gen *leuO* de *Salmonella* Typhi. (Tesis de licenciatura inédita). Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Facultad de Ciencias Biológicas. Cuernavaca, Mor.
- Guadarrama C., Medrano-López A., Oropeza R., Hernández-Lucas I., & Calva E. (2014). The *Salmonella enterica* Serovar Typhi LeuO global regulator forms tetramers: residues involved in oligomerization, ADN binding, and transcriptional regulation. *Journal of Bacteriology*. 196:2143- 2154.
- Guadarrama C., Villaseñor T., & Calva E. (2014). The subtleties and contrasts of the LeuO regulator in *Salmonella* Typhi: implications in the immune response. *Frontiers in Immunology*. 5: 581.
- Guzman L., Belin D., Carson M., & Beckwith J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of bacteriology*. 177(14):4121–4130.

- Haurilyuk V., Atkinson G., Murakami K., Tenson T., & Gerdes K. (2016). Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nature Reviews Microbiology*. 13(5):298–309.
- Hernández-Lucas I., & Calva E. (2012). The coming of age of the LeuO regulator. *Molecular Microbiology*. 85:1026-1028.
- Hernández-Lucas I., Gallego-Hernández A., Encarnación S., Fernández-Mora M., Martínez-Batallar A., Salgado H., Oropeza R., & Calva E. (2008). The LysR-type transcriptional regulator LeuO controls expression of several genes in *Salmonella enterica* Serovar Typhi. *Journal of bacteriology*. 190:5,1658–1670.
- Hong H., Lim D., Kim G., Park S., Kim H., Hong Y., Choy H., & Min J. (2014). Targeted deletion of the ara operon of *Salmonella* Typhimurium enhances L-arabinose accumulation and drives PBAD-promoted expression of anti-cancer toxins and imaging agents. *Cell Cycle*. 13:(19) 3112-3120.
- Hume P., Singh V., Davidson A., & Koronakis V. (2017). Swiss army pathogen: the *Salmonella* entry toolkit. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 7:348.
- Hurley D., Matthew P., McCusker A., Fanning S., & Martins M. (2014). *Salmonella*–host interactions – modulation of the host innate immune system. *Frontiers in Immunology*: 5, 481.
- Jia J., King E., Goldrick M., Aldawood E., & Roberts I. (2017). Three tandem promoters, together with IHF, regulate growth phase dependent expression of the *Escherichia coli* kps capsule gene cluster. *Scientific Reports*. 7:17924.
- Kanjee U., Ogata K., & Houry W. (2012). Direct binding targets of the stringent response alarmone (p)ppGpp. *Molecular Microbiology*. 85 (6):1029-1043.
- Klauck E., Böhlinger J., & Hengge- Aronis E. (1997). The LysR-like regulator LeuO in *Escherichia coli* is involved in the translational regulation of rpoS by affecting the expression of the small regulatory DsrA- RNA. 25 (3):559- 569.
- Kreft A., & Vázquez-Boland J. (2001). Regulation of virulence genes in *Listeria*. *International Journal of Medical Microbiology*. 291:145-157.
- Laffler T., & Gallant J. (1974). *spoT* a new genetic locus involved in the stringent response in *E. coli*. *Cell*. 1(1): 27-30.
- Landgraf J., Wu J., & Calvo J. (1996). Effects of nutrition and growth rate on Lrp levels in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 178:23, 6930–6936.
- Lawrenz M., & Miller V. (2007). Comparative analysis of the regulation of *rovA* from the pathogenic *Yersinia*. *Journal of Bacteriology*. 189:5963-5975.
- Levinthal M., Lejeune P., & Danchin A. (1994). The H-NS protein modulates the activation of the *ilvIH* operon of *Escherichia coli* K12 by Lrp, the leucine regulatory protein. *Molecular Genetics and Genomics*. 242:736-743.
- Lyzen R., Maitra A., Milewsk K., Kochanowska—Lyzen M., Hernandez J., & Szalewska-Palasz A. (2016). The dual role of DksA protein in the regulation of *Escherichia coli* pArgX promoter. *Nucleic Acids Research*. 44 (21):10316–10325.
- Maddocks S., & Oyston P. (2008). Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family protein. *Microbiology*. 154, 3609–3623.

- Majumder A., Fang M., Tasai K., Ueguchi C., Mizuno T., & Wu H. (2001). LeuO expression in response to starvation for branched-chain amino acids. *The Journal of Biological Chemistry*. 276:19046-19051.
- Majumder A., Fang M., Tsai K., & Wu H. (2000). ppGpp-dependent *leuO* expression in bacteria under stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 276:64-70.
- Marasco R., Varcamonti M., La Cara F., Ricca E., De Felice M., & Sacco M. (1994). In vivo footprinting analysis of Lrp binding to the *ilvIH* promoter region of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 176(17):5197-201.
- Martinez-Alvarez N. (2007). Virulencia, Resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevelantes de *Salmonella enterica*. Departamento de biología funcional. Universidad de Oviedo.
- Marcus S., Brumell J., Pfeifer C., & Finlay B. (2000). *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes and Infection*. 2:145–156.
- Mayer M. (1995). A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. Elsevier Science. 163:41-46.
- Mechold U., Potrykus K., Murphy H., Murakami K., & Cashel M. (2013). Differential regulation by ppGpp versus pppGpp in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*. 41 (12):6175-6189.
- Miyada C., Stoltzfus S., & Wilcox G. 1984. Regulation of the *araC* gene of *Escherichia coli*: catabolite repression, autoregulation, and effect on *araBAD* expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 81:4120–4124.
- Moorthy S., & Watnick P. (2005) Identification of novel stage-specific genetic requirements through whole genome transcription profiling of *Vibrio cholerae* biofilm development. *Molecular Microbiology*. 57(6):1623–35.
- Moreno-Eutimio MA., Tenorio-Calvo A., Pastelín-Palacios R., Pérez-Shibayama C., Gil-Cruz C., & López-Santiago R. (2013). *Salmonella* Typhi OmpS1 and OmpS2 porins are potent protective immunogens with adjuvant properties. *Immunology* 139(4):459–71.
- Paul B., Barker M., Ross W., Schneider D., Webb C., Foster J., & Gourse R. (2004). DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell*. 118, 311–322.
- Pizarro-Cerdá J., & Tedin K. (2004). The bacterial signal molecule, ppGpp, regulates *Salmonella* virulence gene expression. *Molecular Microbiology*. 52 (6):1827-1844.
- Perederina A., Svetlov V., Vassylyeva M., Tahirov T., Yokoyama S., Artsimovitch I., & Vassylyev D. (2004). Regulation through the secondary channel-structural framework for ppGpp-DksA synergism during transcription. *Cell*. 118, 297–309.
- Platko J., Willins D., & Calvo J. (1990). The *ilvIH* operon of *Escherichia coli* is positively regulated. *Journal of Bacteriology*. 172(8):463- 4670.
- Potrykus K., & Cashel M. (2007). (p)ppGpp: Still Magical?. *Annual Reviews of Microbiology*. 62:35-51.
- Pradha D., & Devi N. (2019). Stress-induced adaptations in *Salmonella*: A ground for shaping its pathogenesis. *Microbiological Research*. 59(6):1683–95.

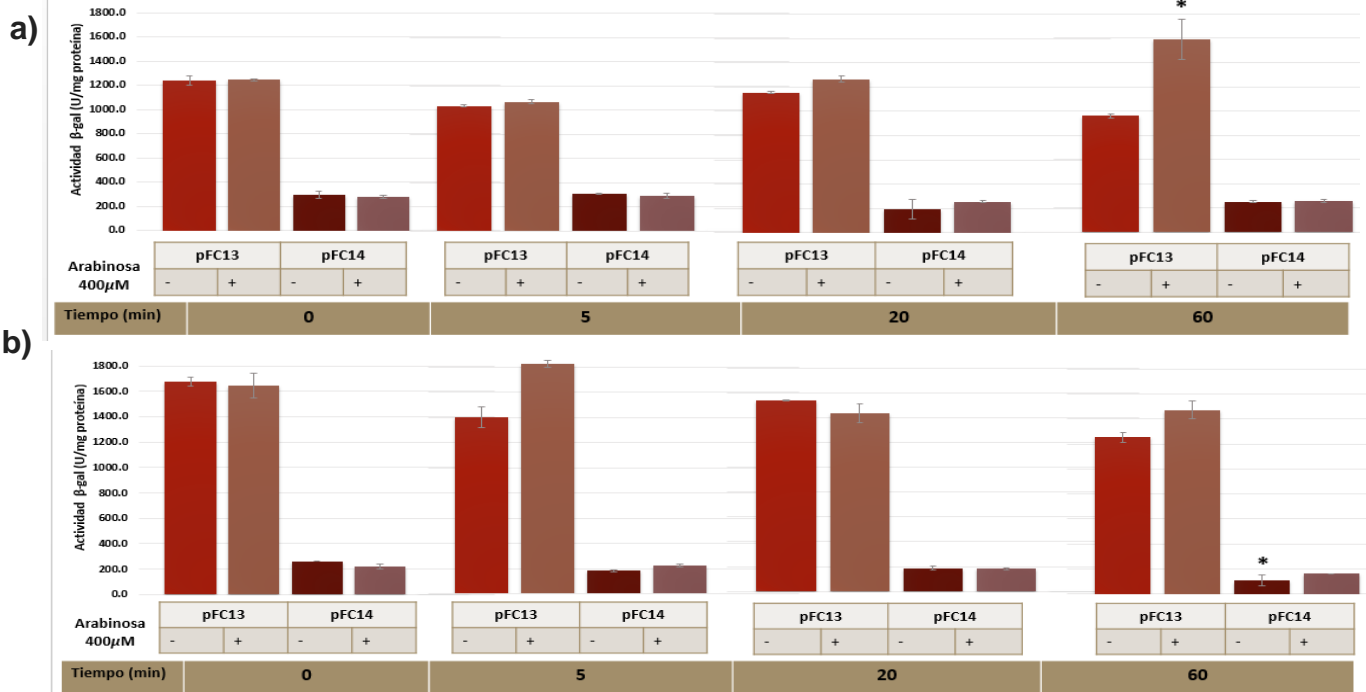
- Pul Ü., Wurm R., & Wagner R. (2007). The role of LRP and H-NS in transcription regulation: involvement of synergism, allostery and macromolecular crowding. *Journal of Molecular Biology* 366:900-915.
- Ramachandran V., Shearer N., & Thompson A. (2014). The primary transcriptome of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and its dependence on ppGpp during late stationary phase. *Plos one*. 9(3):e92690.
- Riggs D., Mueller R., Kwan H., & Artz S. (1986). Promoter domain mediates guanosine tetraphosphate activation of the histidine operon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 83, 9333–9337.
- Rodríguez-Morales O., Fernández-Mora M., Hernández-Lucas I., Vázquez A., Puente JL., & Calva E. (2006). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *ompS1* and *ompS2* mutants are attenuated for virulence in mice. *Infection and Immunity*. 74:1398-1402.
- Ross W., Vrentas C., Sanchez-Vazquez P., Gaal T., & Gourse R. (2013). The magic Spot: A ppGpp binding site on *E. coli* RNA polymerase responsible for regulation of transcription initiation. *Molecular Cell*. 9; 50(3):420-429.
- Ross W., Sánchez-Vázquez P., Chen A., Lee J., Burgos H., & Gouse 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.
- Ryals J., Little R., & Bremer H. (1982). Control of rRNA and tRNA Syntheses in *Escherichia coli* by Guanosine Tetraphosphate. *Journal of bacteriology*. 151(3):1261-1268.
- Sánchez M., & Cardona N. (2003). Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. Revisión. Asociación Colombiana de Infectología.
- Sánchez Popoca D. (2015). H-NS y Lrp como reguladores del gen *leuO* en *Salmonella enterica* serovar Typhi. in Facultad de Biología. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Sánchez Popoca D. (2019). Estudio del efecto de (p)ppGpp en los promotores del gen *leuO* en *Salmonella enterica* serovar Typhi in Facultad de Biología. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma del México.
- Sanchez-Vazquez., Deweyb C., Kittena N., Ross W., & Gourse R. (2019). Genome-wide effects on *Escherichia coli* transcription from ppGpp binding to its two sites on RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 116 (17):8310–8319.
- Sasakawa C. (2009). *Molecular mechanisms of bacterial infection via the gut*. Tokyo, Japan.
- Secretaría de Salud, 2019.
- Schreiber G., Metzguer S., Aizenman E., Roza S., Cashel M., & Glaser G. (1991). Overexpression of the *relA* Gene in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*. 266:3760-3767.
- Scorti M., Monzo H., Lacharme-Lora L., Lewis D., & Vázquez-Boland J. (2007). The PrfA virulence regulon. *Microbes and Infection*. 9:1196-1207.
- Seyfzadeh M., Keener J., & Nomura D. (1993). spoT-dependent accumulation of guanosine tetraphosphate in response to fatty acid starvation in *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 90:11004- 11008.

- Schell M. (1993). Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annual Reviews of Microbiology*. 47:597–626.
- Shi X., Waasdorp B., & Bennett G. (1993). Modulation of acid-induced amino acid decarboxylase gene expression by HNS in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 175(4):1182–6.
- Shi X., & Bennett G. (1995). Effects of multicopy LeuO on the expression of the acid-inducible lysine decarboxylase gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 177:810-814.
- Shimada T., Yamamoto K., & Ishihama A. (2009). Involvement of the leucine response transcription factor LeuO in regulation of the genes for sulfa drug efflux. *Journal of Bacteriology*. 191:4562–4571.
- Shimada T., Bridier A., Briandet R., & Ishihama A. (2011). Novel roles of LeuO in transcription regulation of *E. coli* genome: antagonistic interplay with the universal silencer H-NS. *Molecular Microbiology*. 82:378–397.
- Stratmann T., Pul U., Wurm R., Wagner R., & Schnetz K. (2012). RcsB-BglJ activates the *Escherichia coli leuO* gene, encoding an H-NS antagonist and pleiotropic regulator of virulence determinants. *Molecular Microbiology*. 83: 1109-1123.
- Svitil A., Cashel M., & Zyskind J. (1993). Guanosine tetraphosphate inhibits proteins synthesis in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*. 268:2307-2311.
- Takao M., Yen H., & Tobe T. (2014). LeuO enhances butyrate-induced virulence expression through a positive regulatory loop in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 88: 1115-1123.
- Tellez Galicia I. (2014). Analisis comparativo de los promotores del gen *leuO* de *Salmonella enterica* serovar Typhi. (Tesis inédita). Universidad Politécnica del Estado de Morelos. Ingeniería en Biotecnología. Jiutepec, Mor.
- Travers A. (1980). Promoter sequence for stringent control of bacterial ribonucleic acid synthesis. *Journal of Bacteriology*. 141, 973–976.
- Travers A. (1984). Conserved features of coordinately regulated *E. coli* promoters. *Nucleic Acids Research*. 12(6).
- Traxler M., Summers S., Nguyen H., Zacharia V., Hightower G., Smith J., & Conway T. (2008). The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 68, 1128–1148.
- Turnbull A., Kim W., & Surette M. (2012). Transcriptional regulation of *sdiA* by cAMP-receptor protein, LeuO, and environmental signals in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *The Canadian Journal of Microbiology*. (58(1):10–22.
- Ueguchi C., Ohta T., Seto C., Suzuki T., & Mizuno T. (1998). The *leuO* gene product has a latent ability to relieve *bgl* silencing in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 180:190-193.
- VanBogelen R., Olson E., Wanner B., & Neidhardt F. (1996). Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 178 (15):4344- 4366.
- Vinella D., Albrecht C., Cashel M., & D’Ari R. (2005). Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 56 (4):958-970.
- Wu H., & Fang M. (2003). ADN supercoiling and transcription control: a model from the study of suppression of the *leu-500* mutation in *Salmonella Typhimurium*

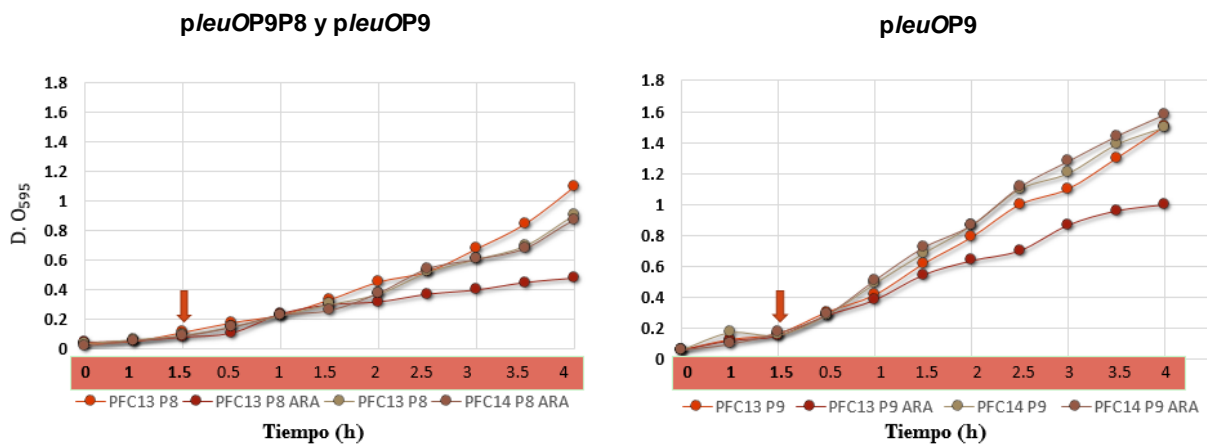
- topA*-strains. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. 73:43–68.
- Xiao H., Kalman M., Ikehara K., Zemel S., Glaser G., & Cashel M. (1991). Residual 3', 5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. The Journal of Biological Chemistry. 266 (9):5980-5990.
- Yakhnin H., Yakhnin A., Baker S., Sineva E., Berezin I., Romeo T., & Babitzke P. (2011). Complex regulation of the global regulatory gene *csrA*: CsrA-mediated translational repression, transcription from five promoters by s70 and E sS, and indirect transcriptional activation by CsrA. Molecular Microbiology. 81(3):689–704.
- Yamashino T., Ueguchi C., & Mizuno T. (1995). Quantitative control of the stationary phase-specific sigma factor, sigma S, in *Escherichia coli*: involvement of the nucleoid protein H-NS. The Embo Journal. 14(3):594–602.
- Zhou N., & Jin D. (1998). The *rpoB* mutants destabilizing initiation complexes at stringently controlled promoters behave like “stringent” RNA polymerases in *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 95:2908–2913.

13. ANEXOS

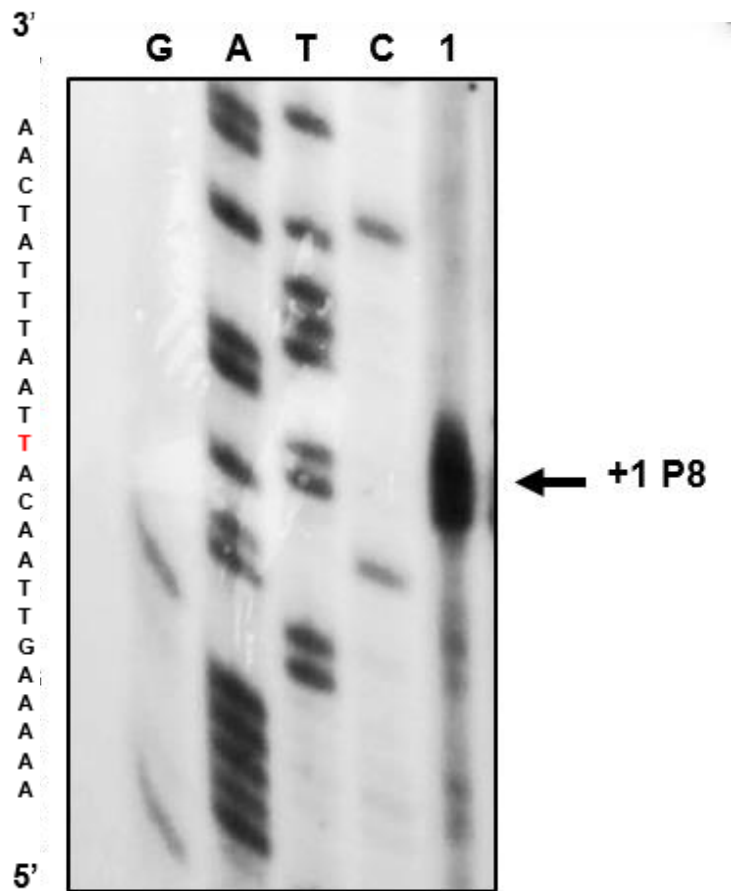
13.1 Experimentos



Actividad de β -galactosidasa de las fusiones *pleuOP9P8-lacZ* y *pleuOP9-lacZ* en *Salmonella Typhi* IMSS 1 $\Delta relA \Delta spoT$ con los plásmidos pFC13 y pFC14 en el ensayo de inducción de la respuesta estricta (sistema *RelA'*). a) Actividad de la fusión *pleuOP9P8-lacZ* en *Salmonella Typhi* IMSS 1 $\Delta relA \Delta spoT$, bajo la inducción de la respuesta estricta al tiempo 0 y a los 5, 20 y 60 minutos después de la inducción con arabinosa en los plásmidos pFC13 y pFC14. b) Actividad de la fusión *pleuOP9-lacZ* en *Salmonella Typhi* IMSS 1 $\Delta relA \Delta spoT$, bajo la inducción de la respuesta estricta al tiempo 0 y a los 5, 20 y 60 minutos después de la inducción con arabinosa en los plásmidos pFC13 y pFC14. Actividad media de tres experimentos independientes (*Dato significativamente diferente a la cepa sin inducir T=0).



Curva de crecimiento de las fusiones *pleuOP9P8-lacZ* y *pleuOP9-lacZ* $\Delta relA \Delta spoT$ con el sistema *RelA'*. La inducción se realizó en medio LB a $D_{595} = 0.2$ con $400 \mu\text{M}$ de arabinosa. La fecha indica el T=0 (momento de la inducción).



Ensayo de “primer extension” de la fusión *lacZ* transcripcional *pleuOP9P8* en medio M9 D.O₅₉₅= 0.6. Se muestra con una flecha y en color rojo (+1) el inicio de transcripción sólo en el fondo WT.

13.2 Medios de cultivo

MN (Medio nutritivo) para 1L de medio.

Bacto caldo nutritivo (NB)	7g
Extracto de levadura (YE)	1g
Glicerol	2 ml
K ₂ HPO ₄	3.75 g
KH ₂ PO ₄	1.3 g

M9 (Medio mínimo) Stock 10X para 1L de medio.

Na ₂ HPO ₄	60 g
KH ₂ PO ₄	30 g
NaCl	5 g
NH ₄ Cl	10 g

Ajustar pH a 7.4

Componentes del medio M9 (100ml)	
MgSO ₄ (1M)	100 µl
CaCl ₂ (1M)	10 µl
Trp (0.3mM)	500 µl
Cys (0.3mM)	500 µl
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	3.75(250ml)

13.3 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

13.4 Antibióticos

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

13.5 Otros reactivos

ONPG (orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosodico) (1 mg/ml)
--

X-gal (rna (50 mg/ml)

Reactivo de Lowry Na_2CO_3 15.4g y NaOH 3.38 g para 500ml

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	