

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**REGULACIÓN DEL GEN *leuO* POR *ArcA*, *Fis* Y
OmpR EN *Salmonella Typhi***

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA

Biol. Grecia López Méndez

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Edmundo Calva Mercado

CUERNAVACA, MORELOS

Junio, 2022

DEDICATORIAS

Le dedico este trabajo y mis ganas de continuar en la vida a los seres que más amo en mi vida y que siempre han estado conmigo aun cuando yo no sabia el camino y me guiaron de regreso.

Te la dedico a ti mi Dios, Gracias por darme un nuevo corazón y renovarlo de nuevo con tu amor....

Se la dedico a mi familia; mis padres, Alfonso López Santana y Heriberta Méndez López, porque con ellos, su impulso, su esfuerzo y su presencia en mi corazón, me han hecho ser mejor; también a mi hermano Erick, que siempre ha estado ahí cuando lo he necesitado y me ha amado.

Y te la dedico a ti Grecia, porque te esforzaste, porque fuiste valiente, por que tuviste fe y por que creíste en ti.... Valió la pena hacerlo.

Todo lo puedo en Cristo que me fortalece.

Filipenses 4:13

Agradecimientos

Agradezco en primera instancia a Dios por darme la oportunidad de seguir hasta este momento, porque nunca me ha soltado y porque me ha dado la vida, la salud, el amor, la esperanza y la fortaleza para guiarme y descubrirme en él.

Le agradezco este gran logro a mis padres, gracias porque me dieron la vida, el amor, la educación y los valores para ser la mujer que soy, gracias porque su esencia vive en mí; lo que soy y lo que he formado es por ustedes; son mi corazón, este también es su logro. Le agradezco a mi hermano su existencia en mi vida y que también a su manera me ha apoyado y ha estado ahí para mí, lo tienes todo para ser el mejor. De igual manera le agradezco a mi demás familia que siempre me ha dado un aliento y creído en mí.

Quiero agradecerle con una gran estima al Dr. Edmundo Calva Mercado, que me ha apoyado en las diferentes etapas de mi carrera, desde la licenciatura hasta la culminación de la maestría, gracias por ser un excelente tutor y más que tutor por ser un gran maestro de vida y enseñanza; gracias por enseñarme a buscar la belleza. Le agradezco también al Maestro Marcos Fernández que siempre aportó conocimiento y apoyo al proyecto y que estuvo siempre al tanto del laboratorio. De igual manera agradezco a la Dra. Sonia Dávila y al Dr. Ramón Batista por ser parte del comité tutor y que con sus aportaciones y observaciones enriquecieron la discusión del proyecto.

Quiero darle las gracias a mis compañeros y amigos del laboratorio, Gloria, Diego y Nallely, que me hicieron pasar los momentos más agradables, y que también me enseñaron mucho con todo su conocimiento, los adoro.

Quiero agradecerle a Marlen mi compañera de maestría, gracias por llegar a mi vida, estuvimos juntas desde el principio, gracias por tu apoyo, por tu conocimiento y por tu amistad. Quiero agradecerles a los diferentes compañeros del laboratorio que contribuyeron de manera directa o indirecta y que me dieron momentos muy bonitos; gracias Raúl (Rull) por todo, y por tener el laboratorio más bonito; gracias a Itzel, a Sofi, y a Alfredo, por que sus platicas eran las más bonitas, y los demás

compañeros del lab que me dieron lo más bonito de ellos. Gracias a mis chicas Get, que siempre me han dado su experiencia de vida, me han alentado, me han apoyado, y me han hecho sentir lo que soy y valgo, gracias por las risas y las terapias, las quiero mucho.

Quiero agradecerle a Dios que me hiciera regresar a ese cuarto seguro para mí, a ponerme mi armadura y permitirme conocer personas con un corazón hermoso y que me día a día me enseñan a vivir y a amar.

Y por último gracias a todas esas personas no nombradas que me dieron una palabra, una enseñanza, una lección, una lágrima, una sonrisa, un abrazo, una bendición y que eso me sirvió para llegar a este momento, los honro y bendigo en mi vida.

Este proyecto fue financiado por el PAPIIT/UNAM IN200517 (Regulación transcripcional del gen *leuO* en *Salmonella Typhi*) e IN201821 (Los promotores del gen *leuO* en *Salmonella Typhi*).

INDICE

DEDICATORIAS	i
Agradecimientos.....	ii
INDICE	iv
Resumen.....	vi
1. Marco Teórico	1
1.1 Generalidades del género <i>Salmonella</i>	1
1.2 <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi	1
1.3 Factores de Virulencia.....	3
1.4 Familia de reguladores Tipo LysR.....	4
1.5 Generalidades de LeuO	6
1.6 LeuO y su papel en virulencia.	7
1.7 Regulación de <i>leuO</i>	9
1.7 ArcA (Control de respiración aeróbica)	10
1.8 Fis (Factor de estimulación por inversión).....	10
1.9 OmpR (regulador de las proteínas de membrana externa)	11
2. Antecedentes	12
3. Justificación.....	16
4. Hipótesis.....	16
5. Objetivo General	16
5.1 Objetivos particulares.....	16
6. METODOLOGÍA.....	17
6.1 Mutagénesis dirigida por Método de Datsenko y Wanner.	19
6.1.1 Preparación de células triples mutantes electrocompetentes.....	19
6.2 Transformación de las cepas.	21
6.3 Selección de clonas.	21
6.4 Cultivo bacteriano de las cepas de <i>S. Typhi</i> con las diferentes fusiones traduccionales de <i>leuO</i> unidas al reportero <i>lacZ</i>	22
6.5 Cuantificación de proteína y Actividad de β - galactosidasa.	22
6.6 Análisis estadístico.....	23
7. Resultados.	24

8. Discusión.....	50
9. Conclusiones.....	61
10. Perspectivas.....	61
11. Referencias	62
12. Anexos	70
12.1 Medios de Cultivo.....	70
12.2 Amortiguadores	71
12.3 Antibióticos.....	71
12.4 Reactivos.....	71

Resumen

Salmonella enterica Serovar Typhi (*S. Typhi*) es una bacteria Gram-negativa patógena exclusiva del humano; la cual causa Fiebre Tifoidea, una enfermedad sistémica, febril y aguda con gran incidencia a nivel mundial, y que llega a ser mortal. Para potenciar su patogenicidad *S. Typhi* utiliza diferentes factores de virulencia durante el proceso infeccioso y el desarrollo de la enfermedad; dentro de los que destacan los reguladores transcripcionales.

LeuO es un regulador transcripcional tipo LysR que regula procesos involucrados a respuesta a estrés y virulencia, actuando como activador o represor. A pesar de que la expresión de su gen se considera quiescente, LeuO regula un conjunto ecléctico de genes, donde los niveles de proteína son cruciales para regular a sus genes blanco, alguno de los cuales son también quiescentes.

La regulación del gen *leuO* se ha estudiado en diversas bacterias patógenas. Sin embargo aunque se desconoce la señal precisa que desencadena su expresión, se sabe que está altamente reprimido por los reguladores globales H-NS y Lrp, pero que su expresión se favorece por la entrada a la fase estacionaria, la alarmona ppGpp y reguladores que actúen directa o indirectamente.

La regulación de *leuO* en *S. Typhi* se ha analizado a través de su región reguladora fusionada al reportero *lacZ*, en donde además de encontrar que H-NS y Lrp actúan como reguladores negativos de la región reguladora, se ha identificado la presencia de múltiples promotores que podrían estar modulando de manera diferencial la expresión de *leuO*. En este trabajo de maestría, tras investigar *in silico* qué reguladores eran candidatos para regular *leuO*, se diseñaron triples mutantes que carecieran de H-NS y Lrp así como del regulador a analizar (Fis, ArcA u OmpR), con el fin de conocer el efecto que tenían sobre la regulación de *leuO*. El análisis nos indicó que Fis y ArcA, en ausencia de H-NS y Lrp regulan positivamente la expresión del gen. Por lo anterior, a través de conocer nuevos reguladores y su efecto en conjunto sobre la expresión de *leuO*, se comprenden los ajustes finos de regulación que tiene en gen *leuO* en *S. Typhi*.

1. Marco Teórico

1.1 Generalidades del género *Salmonella*

Las enfermedades gastrointestinales infecciosas son aquellas causadas por un agente etiológico (parásitos, virus o bacterias), que generan un problema de salud pública. La salmonelosis es una de las enfermedades más frecuentes causada por bacterias englobadas en el género *Salmonella* (Parra et al., 2002).

El género *Salmonella* pertenece a la familia enterobacteriaceae; bacilos Gram-negativos, intracelulares y anaerobios facultativos, con un extenso rango de hospederos. Este género tiene dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*. Esta última se clasifica en 10 subespecies, : *enterica* (subsp. I), *salamae* (subsp. II), *arizonae* (subsp. IIIa), *diarizonae* (subsp. IIIb), *houtenae* (subsp. IV), *indica*(subsp. VI), subsp. VII sin nombrar, y tres subespecies más nombradas A,B y C (Alikhan et al., 2018 y Park et al., 2020).Una clasificación más divide a *Salmonella spp.* en más de 2600 serotipos determinado por la composición de sus antígenos somático (O), flagelar (H) y capsular (Vi) (Eng et al., 2015).

Las serovariedades se dividen dependiendo del cuadro clínico que tenga el paciente, siendo los más frecuentes: la gastroenteritis, forma más común causada por los serotipos *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*; y la fiebre tifoidea, una infección sistémica causada por los serotipos *S. Paratyphi* y *S. Typhi* (Sánchez y Cardona, 2003).

1.2 *Salmonella enterica* serovar Typhi

Salmonella enterica subespecie *enterica* serotipo Typhi (*S. Typhi*) es una bacteria patógena exclusiva de humanos, la cual genera una enfermedad conocida como fiebre tifoidea (FT) (LaRock et al., 2015). El término proviene del griego *typhus* y sufijo *oid* que significa “como humo” (Calva et al., 1988).

La FT es una infección de carácter global, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) cada año enferman de FT entre 11 y 20 millones de personas, de las que mueren entre 128 000 y 161 000 (Crump JA, 2004; Storey HL, 2015 y WHO, 2018).

En Latinoamérica existe una incidencia media de fiebre tifoidea de 10 a 120 casos por cada 100 mil habitantes por año; en México, de acuerdo al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) el periodo comprendido de 1984 a 2017 mostró un aumento considerable de fiebre tifoidea pasando de 7,629 a 45,280 casos, siendo Sinaloa y Tamaulipas los estados con mayor incidencia (Boletín epidemiológico semana 28, 2018, Buckle G, 2010 y Contreras-Soto et al., 2019).

La vía de transmisión de *S. Typhi* es oral-fecal, a través de la ingesta de alimentos y agua contaminada. Su periodo de incubación oscila de 2 a 3 semanas desde la ingesta, requiriendo un inóculo aproximadamente de 10^6 - 10^8 bacterias para el desarrollo de la enfermedad sintomática (Jiménez et al., 2010). El cuadro clínico de *S. Typhi* engloba síntomas como fiebre de 39°C o más por más de 72 horas, acompañado con dolores de cabeza, dolor abdominal, diarrea, y en algunos casos esplenomegalia y hepatomegalia (Parry, 2006 y Pui et al., 2011).

S. Typhi entra al cuerpo resistiendo la acidez gástrica del estómago, una vez superada esta barrera se dirige al intestino delgado donde encuentra un lugar óptimo para su proliferación (Jiménez et al., 2010). La invasión comienza cuando la bacteria se adhiere a la superficie del epitelio intestinal, en específico a las células M, que recubren las placas de Peyer (parte del tejido linfoide intestinal) (Fig. 1). Una vez que *S. Typhi* es internalizada, se dirige al sistema reticuloendotelial donde es fagocitada por macrófagos, en el lumen del intestino; facilitando la invasión a los nódulos linfáticos, hígado y bazo, provocando una bacteremia y daño sistémico (Haraga et al., 2008 y LaRock et al., 2015).

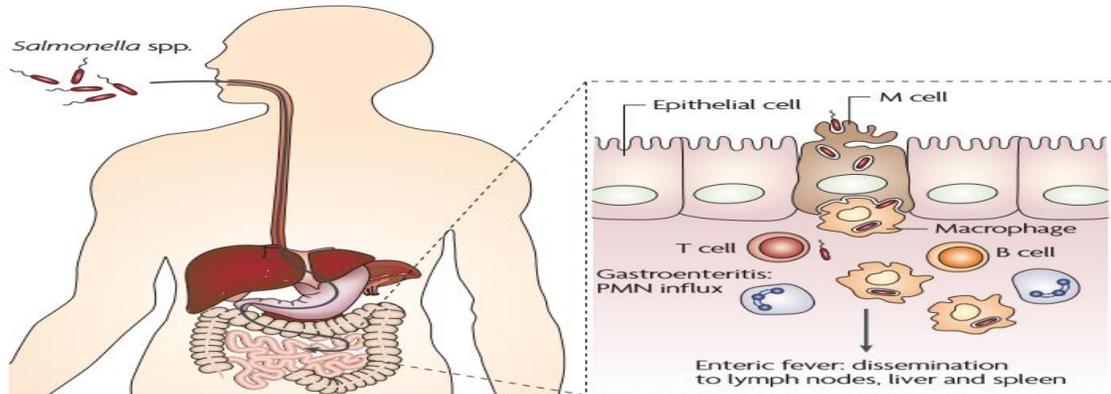


Fig 1. Mecanismo de invasión e infección de *Salmonella* spp. (Modificado de Haraga et al., 2008).

1.3 Factores de Virulencia

Para el proceso infeccioso y desarrollo de la enfermedad, *Salmonella* ha desarrollado elementos genéticos que desencadenan la virulencia, fenotipo característico de *Salmonella*; su estudio ha permitido el desarrollo de alternativas que ayudan a su diagnóstico y tratamiento. Estos elementos genéticos que potencian este fenotipo se conocen como factores de virulencia.

El genoma de *S. Typhi* es de 4.8 Mb con aproximadamente 4800 genes, de los cuales un 4% se asocian a la virulencia (Bowe et al., 1998). Dentro de los factores de virulencia identificados para *Salmonella* se encuentran: Las Islas de patogenicidad, elementos estructurales de membrana externa (LPS), cápsula, fimbrias y flagelos (Ver tabla 1).

Tabla 1. Descripción y ejemplos de Factores de Virulencia

Factor de Virulencia	Función	Cita
SPI-1	Isla de 40 kb, codifica para un sistema de secreción tipo III (T3SS), que inyecta moléculas efectoras a la célula hospedera, facilitando su entrada.	Que et al., 2013
SPI-2	Isla de 40 kb que codifica para un T3SS; se requiere para el mantenimiento bacteriano	Valdez et al., 2009

	dentro de macrófagos y la subsecuente infección sistémica.	
Lipopolisacárido (LPS)	Componente estructural de la membrana externa de bacterias Gram-negativas; facilita la infección en ratones, es un buen inmunógeno.	Khan et al., 1998
Cápsula	La cápsula de polisacáridos (antígeno Vi) es un factor único para la virulencia de <i>S. Typhi</i> . Previene el reconocimiento por el sistema inmune debido a que evita el contacto del LPS.	Wilson et al., 2008
Flagelo	Importante para la motilidad y se relaciona con la invasión de la bacteria.	Finlay and Falkow, 1989
Fimbrias	Importante en la adherencia hacia la célula hospedera.	Figueroa y Verdugo, 2005

La regulación genética de los factores de virulencia se estudia para entender qué reguladores favorecen la expresión de genes que permitan a *S. Typhi* desarrollar el cuadro infeccioso. La familia de reguladores transcripcionales tipo LysR es una de las más abundantes que engloban muchos procesos vitales, incluyendo virulencia.

1.4 Familia de reguladores Tipo LysR

Los reguladores transcripcionales tipo LysR (LTTR's) son la familia más grande de reguladores transcripcionales en bacterias; el primer estudio que englobó a la familia de los LTTR'S fue el realizado por Henikoff y colaboradores (1988), donde analizaron proteínas bacterianas que regulaban a genes por sus motivos de unión a DNA, y las cuales tenían cierta similitud en su secuencia de aminoácidos de estos motivos. Tras una búsqueda en bases de datos, y el alineamiento informático de sus secuencias, se encontró que 9 de estas proteínas pertenecían a la familia LysR ya que tenían el motivo helice-giro-helice (HTH) presente en todos los miembros de la familia.

Los LTTRs están involucrados en un amplio espectro de procesos celulares dentro de los que destacan: regulación del metabolismo central, respuesta a estrés

oxidativo, formación de biopelícula, fijación de nitrógeno, virulencia, entre otros (Schell, 1993; Fragel et al., 2019).

Los LTTRs son una familia con aproximadamente 800 miembros, que codifican para proteínas de 300 a 350 residuos de aminoácidos, siendo una de las familias más conocidas de proteínas de unión a ADN en procariontes; considerándose reguladores transcripcionales duales (activando o reprimiendo), y que reconocen a sus genes blanco por secuencias de ADN ricas en A-T en posiciones similares (Maddocks y Oyston, 2008 y Guadarrama et al., 2014).

La estructura de los LTTRs consta de un dominio de unión al ADN con un motivo hélice-giro-hélice (HTH) en el extremo N-terminal y un dominio regulador de unión a un coinductor en el extremo C-terminal como se indica en la Fig. 2. Los LTTRs regulan independientemente de la presencia del coinductor, el cual se une al LTTR en secuencias con posición entre los residuos 95-210 y con motivos estructurales en forma de hendidura (Fig. 2)(Maddocks y Oyston, 2008; Lahiri et al., 2009).

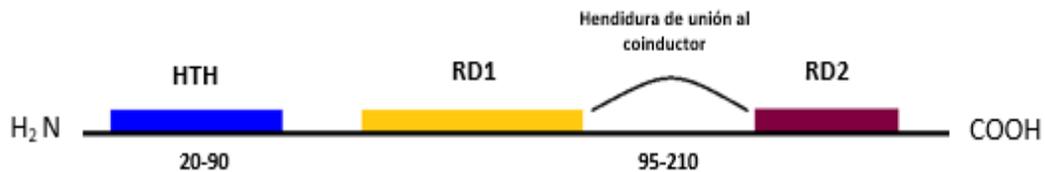


Fig. 2. Estructura de los LysR. El dominio HTH está a 20-90 residuos del extremo N-terminal y el dominio de unión al coinductor entre los residuos 95-210 del extremo C-terminal. Los dos dominios conservados RD1 Y RD2 se unen por una región de cruce formando una bisagra o hendidura. (Modificado de Maddocks y Oyston, 2008)

Dentro de los miembros de la familia LysR, LeuO ha sido objeto de interés y estudio en los últimos años dentro del género *Salmonella* por estar implicado en la virulencia y respuesta al estrés.

1.5 Generalidades de LeuO

LeuO es una proteína de 314 aminoácidos y es miembro de la familia de reguladores tipo LysR. El gen que lo codifica se encuentra en la región genómica comprendida entre 135983 pb a 136927 pb del mapa genético de *S. Typhi*, entre los operones *leuABCD* e *ilvIH* (como se indica en la Fig. 3), que corresponden a la síntesis de leucina y, de isoleucina y valina, respectivamente. De acuerdo a su localización se presumía que regulaba la expresión del operón *leuABCD*, sin embargo, esta idea fue rechazada cuando se demostró que una mutante en *leuO* no es auxótrofa para leucina (Ueguchi et al., 1998).

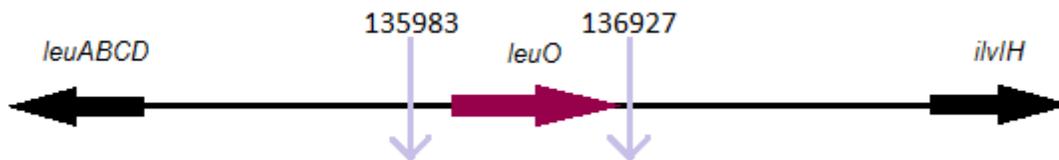


Fig. 3. Localización de *leuO* entre los operones *leuABCD* e *ilvIH*.

Los primeros estudios que avalaron a LeuO como un regulador fueron realizados en *E. coli*. Shi y Bennet en 1995 demostraron que la sobreexpresión de LeuO reprimía al gen *cadC*, encargado de la activación del operón *cadAB*, responsable de la respuesta de la bacteria a cambios de pH. También la sobreexpresión de LeuO favorecía la activación del operón *bgl*, involucrado en la utilización de ciertos β -glucósidos (Ueguchi et al. 1998). LeuO interviene en la expresión de factores sigma como σ^S , el cual se induce su expresión ante una condición de estrés; en este sentido, LeuO reprime el RNA regulador DsrA involucrado en la traducción de *rpoS* (Klauck et al., 1997). Más recientemente por estudios de inmuno-precipitación de la cromatina (ChIP-chip) y SELEX genómico se ha demostrado que LeuO regula más genes de los que previamente se han reportado (Shimada et al., 2011, Dillon et al., 2012, Ishihama et al., 2016).

En el laboratorio se ha estudiado a LeuO y sus efectos en *S. Typhimurium* y *S. Typhi*. Estudios proteómicos han mostrado que en *S. Typhi* LeuO regula positivamente la expresión de *assT*, *casA* y los genes de las porinas de membrana externa *ompS1* y *ompS2*. Por otro lado LeuO regula negativamente la expresión de

ompX (una porina transportadora de compuestos hidrofóbicos) y *tpx* (una tiol-peroxidasa periplásmica) (Fernández-Mora et al., 2004, De la Cruz et al., 2007, Hernández-Lucas et al., 2008). Un trabajo muy importante que vinculó a LeuO en virulencia fue el realizado por Rodríguez Morales y colaboradores en el 2006, en el cual a través de infectar ratones con cepas de *S. Typhimurium* mutadas en *ompS1*, *ompS2* y *leuO*, la virulencia se atenuaba.

La expresión del gen *leuO* se considera quiescente, término referido para definir una expresión muy baja en condiciones de laboratorio (Hernandez-Lucas, I. y Calva, E, 2012); diferente al concepto de quiescencia celular, es decir aquellas que están metabólicamente inactivas. Esto es importante pues tiene un efecto en la proteína, ya que LeuO regula un conjunto ecléctico de genes, y los niveles de proteína son cruciales para regular a sus genes blanco, los cuales algunos son también quiescentes, por ejemplo *ompS1* y *ompS2*, donde LeuO regula su expresión a diferentes concentraciones en *S. Typhi* (De la Cruz et al., 2007).

Los estudios en *Salmonella* han sido de gran impacto para el entendimiento del gen *leuO*, sin embargo no se ha determinado una señal que active la expresión del gen. Por otro lado para *E. coli* y *Vibrio Cholerae* existen condiciones que activan la expresión de *leuO*, las cuales son importantes ya que ayudarían a explicar porque LeuO se expresa en condiciones tan precisas como lo es la infección.

1.6 LeuO y su papel en virulencia.

Diversos estudios han relacionado a LeuO con la virulencia de diversas bacterias patógenas. Lo que sugiere que la expresión del gen *leuO* va dirigida a establecer mecanismos de supervivencia para la bacteria y su interacción con el hospedero.

En *Vibrio cholerae*, agente causal del cólera en humanos, se ha observado que a través de la vía de ToxR, LeuO incide en la expresión de genes relacionados a la virulencia, como son la resistencia a pH ácido y bilis, formación de biopelícula e inhibición de la toxina colérica (CT) y la pilina corregulada por la toxina (TCP) ((Bina, 2013; Ante et al., 2015a.; Ante et al., 2015b y Ayala et al., 2018).

En *Yersinia enterocolitica*, el agente causal de la enterocolitis, sobre todo en niños pequeños; LeuO es un regulador positivo del gen *rovA*, un importante regulador de

su virulencia, pues está involucrado en la adherencia de la bacteria a las placas de Peyer (Lawrenz et al., 2007).

En *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) causante de diarrea hemorrágica y síndrome urémico hemolítico, se ha observado que LeuO activa la expresión del operón LEE1 el cual codifica para proteínas estructurales del sistema de secreción tipo tres, involucrado en la generación de la lesión de adherencia y esfacelamiento de los enterocitos (Takao et al., 2014).

Como se mencionó arriba en *S. Typhimurium*, mutantes del gen *leuO* y los genes de porinas *ompS1* y *ompS2* resultan en la atenuación de la virulencia en ratones (Rodríguez-Morales et al., 2006). De igual manera, a través de microarreglos realizados tras la infección intraperitoneal en ratones se encontró que LeuO se expresa a los 7 días postinfección (Lawley et al., 2006). LeuO está involucrado en modular la invasión de *Salmonella*, pues regula la expresión de la Isla de patogenicidad 1 (SPI-1), reprimiendo la expresión de *hilE*, regulador negativo de *hilD*; el regulador maestro de SPI-1 (Espinosa, E. y Casadesús, 2014).

En *C. elegans* el cual se ha convertido en un modelo para el estudio de factores de virulencia de *Salmonella*, se encontró que una mutante en *leuO* invade de la misma manera que un cepa silvestre; sin embargo la mutante reduce significativamente la migración transepitelial de células polimorfonucleares (neutrófilos); lo que sugiere que LeuO actúa como un regulador que permite una comunicación entre *Salmonella* y el sistema inmune del hospedero para modularlo (Tenor et al., 2004). Esta afirmación en el que entre *Salmonella* y el sistema inmune hay una comunicación a través de LeuO se reafirma en *S. Typhi*, pues teniendo en cuenta que LeuO expresa las porinas OmpS1 y OmpS2 (Hernández-Lucas et al., 2014); la inmunización de ratones con las porinas favorecen la producción de IL-8, en donde OmpS1 y OmpS2 actúan como agonistas de los receptores tipo Toll (TLRs); además de que las porinas inducen la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) para estimular la reacción inflamatoria (Moreno-Eutimio et al., 2013).

1.7 Regulación de *leuO*

La regulación de *leuO* en *S. Typhi* es poco estudiada, y en nuestro grupo hemos estudiado sus condiciones de expresión. Los primeros estudios que caracterizaron la regulación de *leuO* fueron en la cepa CH582 de *S. Typhimurium* a través de un modelo denominado “mecanismo de relevo de promotor”, en el cual se demostró que al activar la expresión de *ilvIH*, secuencialmente se activaba la de *leuO* (normalmente reprimido), necesario para encender la expresión de *leuABCD* (encargado de la biosíntesis de leucina), el cual tenía una mutación en su promotor (*p_{leu}-500*), haciendo que la cepa creciera con dificultad en un medio sin leucina (Fang y Wu, 1998a). Al observar que la expresión del promotor de *leuABCD* se favorecía en la entrada a la fase estacionaria (Fan y Wu, 1998b) se planteó como una señal de estrés para la presencia de la alarmona guanósina 3´-5´bispirofosfato (ppGpp), al analizar que una mutante en *relA* (gen que codifica para la enzima encargada de la síntesis de ppGpp) no expresaba *leuO*, se dedujo que la alarmona afecta la expresión de *leuO* (Majumder et al 2000). Todo lo anterior se debe a través de la inactivación del sistema, pues ppGpp favorece la expresión de Lrp necesario para activar a *ilvIH* y a su vez este a *leuO* (Fang y Wu, 1998b). Además se ha observado que en *E. coli* una cepa carente de *relA*, LeuO favorece el crecimiento después de dos horas como consecuencia de la carencia de aminoácidos de cadena ramificada, sugiriendo que LeuO contribuye a que la bacteria sobreviva y se mantenga a causa de la fase estacionaria (Majumder et al., 2001).

En *E. coli* se demostró que RcsB-BglJ (regulador de síntesis de la cápsula) activa la expresión de *leuO*. Un acontecimiento importante de este mismo estudio es que se encontró un segundo promotor (*P2_{leuO}*) (Stratman et al., 2012) del promotor (*P_{leuO}*) ya reportado en *S. Typhimurium* por Fang y Wu (1998b).

Se ha encontrado que *leuO* es blanco de proteínas asociadas al nucleóide (NAP), las cuales se unen al DNA en regiones ricas en A-T silenciando generalmente su expresión; para *leuO* una de estas NAP es H-NS; una proteína tipo Histona que reprime su expresión; demostrándose principalmente en *E. coli* (Kluack et al., 1997; Stratmann et al., 2012) y *S. Typhimurium* (Chen et al., 2001; Chen et al, 2005). Para

S. Typhi, *leuO* es regulado negativamente por H-NS y Lrp (Guadarrama, 2004; Sánchez-Popoca, 2015 y López-Mendez, 2018).

Por análisis *in silico* (prodoric.tu-bs.de) en nuestro grupo se han observado más blancos que se unen al DNA de *leuO* en *S. Typhi*, que corresponden a reguladores transcripcionales. En este trabajo se pretende determinar el efecto que tienen los reguladores ArcA, Fis y OmpR sobre *leuO*.

1.7 ArcA (Control de respiración aeróbica)

ArcA pertenece al sistema de dos componentes ArcAB, el cual forma parte de los reguladores globales que responden a la transición aerobia-anaerobia por cambios de O₂. ArcB es un sensor transmembranal cinasa de histidina que responde a los cambios de O₂, fosforilando a ArcA; mientras que ArcA, es la proteína que responde a esos cambios. Juntos modulan la expresión de genes que regulan vías dependientes de O₂, como el ciclo de Krebs y complejos de citocromo oxidasa (Evans et al., 2011) y también el papel que tiene ante la resistencia de ROS como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Morales et al., 2013). A través de micro-arreglos realizados en *S. Typhimurium* las cuales fueron cultivadas en un medio anaerobio, se determinó el regulón de ArcA (Evans et al., 2011). En este mismo estudio se observó que ArcA actúa de manera represiva sobre Fis. Por otro lado, también en *S. Typhimurium* se ha descubierto que ArcA promueve la supervivencia intracelular en macrófagos y neutrófilos, contribuyendo a la infección sistémica en ratones (Pardo-Este et al., 2018). En *E. coli* se ha caracterizado a través de micro-arreglos que el regulón de ArcA media la transición de un ambiente aerobio a anaerobio debido a los cambios de O₂, en el que *leuO* es uno de sus blancos (Salmon et al., 2005).

1.8 Fis (Factor de estimulación por inversión)

Fis es una proteína asociada al nucleóide (NAP), siendo un regulador global de la transcripción en bacterias. Fis está asociada a la capacidad que tiene de estimular la inversión del DNA mediado por Hin en *S. enterica* (Beach et al., 1998). Fis modula la expresión de genes asociados principalmente a las diferentes fases del

crecimiento principalmente en bacterias Gram-negativas como *E. coli* y *S. enterica* (Cameron et al., 2011). En *E. coli* se ha observado que su RNA mensajero es indetectable durante la fase lag, sin embargo, sus niveles aumentan rápidamente al llegar a la fase exponencial y vuelven a caer una vez que sale de la misma y entra a la fase estacionaria (Ball et al., 1992). Para *S. Typhimurium* ocurre un proceso similar, en donde se ha observado que *leuO* es uno de sus blancos a la mitad de la fase exponencial (Wang et al., 2015). Se ha observado su papel directo en la virulencia pues regula genes de las islas de patogenicidad SPI-1 y SPI-2 (Wang et al., 2013) y su ausencia disminuye la capacidad invasiva en células HeLa (Wang et al., 2015).

1.9 OmpR (regulador de las proteínas de membrana externa)

OmpR es considerado el regulador maestro de las porinas, proteínas de membrana externa (OMP's) encargadas de regular la permeabilidad de la bacteria a una variedad de solutos como iones, nutrientes, moléculas de desecho, etc (De la Cruz y Calva, 2010). Pertenece a un sistema de dos componentes junto con EnvZ, que es el sensor cinasa de histidina ubicado en la membrana interna encargado de fosforilar a OmpR, el cual será el regulador de respuesta que media la expresión de porinas y procesos como quimiotaxis y virulencia (Lee et al., 2000 y Maris et al., 2005). En *E. coli* está muy bien caracterizado su regulón (Quin et al., 2014), mientras que en *S. entérica* existen diferencias entre los diferentes serovares; ya que para *S. Typhimurium* OmpR regula SPI-1 y SPI-2 (Cameron et al., 2012), y en *S. Typhi* regula las porinas OmpC, OmpF, OmpS1 y OmpS2 (Puente et al., 1991, Oropeza et al., 1999 y Fernandez-Mora et al., 2004). En *S. Typhi* se ha observado que en ausencia de H-NS y OmpR aumenta la expresión de *leuO*, lo que indica que OmpR podría tener un efecto ya sea directo o indirecto sobre la expresión de *leuO* en ausencia de H-NS como su principal regulador negativo (Guadarrama, 2004).

2. Antecedentes

En el laboratorio se ha estudiado la regulación de *leuO* en *S. Typhi* cepa IMSS1, que ha mostrado ser quiescente, es decir que se expresa muy bajo en condiciones de laboratorio.

El gen *leuO* en *S. Typhi* cepa IMSS 1 en su región intergénica tiene 5 promotores en el sentido del gen (P1 a P5) (Fig. 4.A), y dos en el sentido inverso (P6 y P7) (Fig. 4. A) (Fernandez-Mora et al., 2021). El estudio de su regulación se ha hecho a través de la medición de la actividad traduccional de diferentes fragmentos de la región reguladora de *leuO* fusionadas al reportero *lacZ* (Fig. 4.B), y también por la expresión del RNA mensajero de *leuO* (propio del cromosoma) por RT-PCR (Fig 6.B).

Las actividades Beta-Galactosidasa de la cepa IMSS1 WT respecto de la doble mutante $\Delta hns \Delta lrp$ que contienen las diferentes fusiones (Fig.4.B) determinaron que H-NS y Lrp regulan negativamente la expresión de *leuO* (Fig.5) (Sánchez-Popoca, 2014 y López-Mendez, 2018).

Para el caso de la regulación por ppGpp, su estudio ha sido a través de la mutación de los genes que codifican las enzimas que lo sintetizan (*relA* y *spoT*) y fusiones transcripcionales unidas a *lacZ* que contienen por separado cada uno de los promotores. La actividad Beta-Galactosidasa de cada una de las fusiones en los distintos fondos genéticos analizados demostró que ppGpp regula diferencialmente a los promotores (Fig 6.A). Además de lo anterior, se analizó por RT-PCR el RNA mensajero propio de *leuO* (nivel cromosomal) con el fin de observar el efecto de la regulación de ppGpp sobre el gen. El análisis indicó que para que sea detectado el RNA mensajero *leuO* se requiere que esté libre de la represión de H-NS y Lrp; por lo tanto para que haya un efecto de la regulación de ppGpp hacia la expresión de *leuO* se necesita un paso previo de desrepresión mediado por los reguladores H-NS y Lrp (Fig. 6.B) (Sánchez-Popoca, 2018).

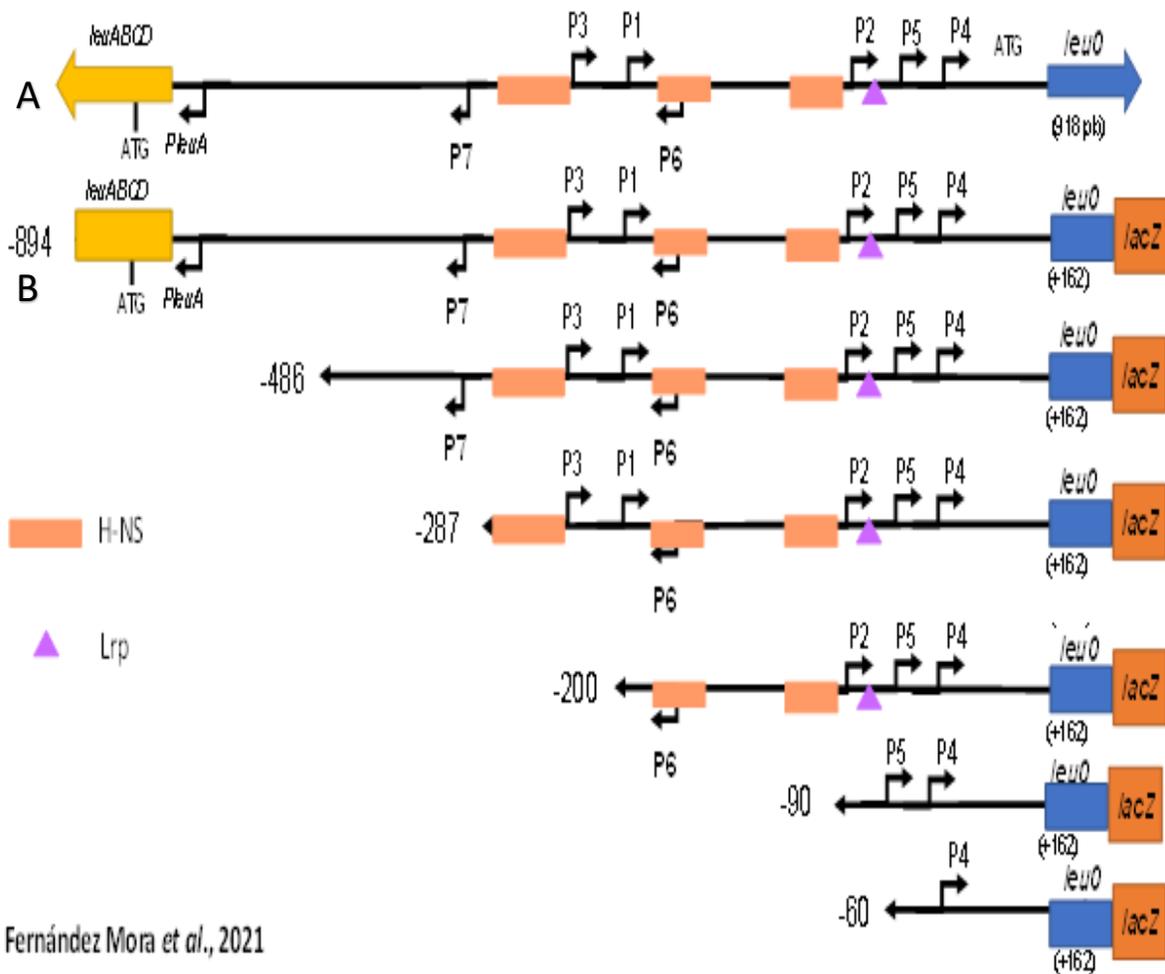


Fig. 4. A. Esquema de la región reguladora completa de *leuO* de *S. Typhi* cepa IMSS1. Se muestran los promotores 5 en el sentido del gen (P1 a P5), y 2 en el sentido reverso (P6 y P7), así como los sitios de unión a los reguladores HNS y Lrp. B. Esquematización de las construcciones que representan las fusiones traduccionales con distintos tamaños de la región reguladora del gen *leuO* y 162 pb que corresponden al gen estructural *leuO* unidas a *lacZ* (pMC1871): *pleuO894*, *pleuO436*, *pleuO287*, *pleuO200*, *pleuO90* y *pleuO60* (Modificado de Fernandez-Mora et al., 2021).

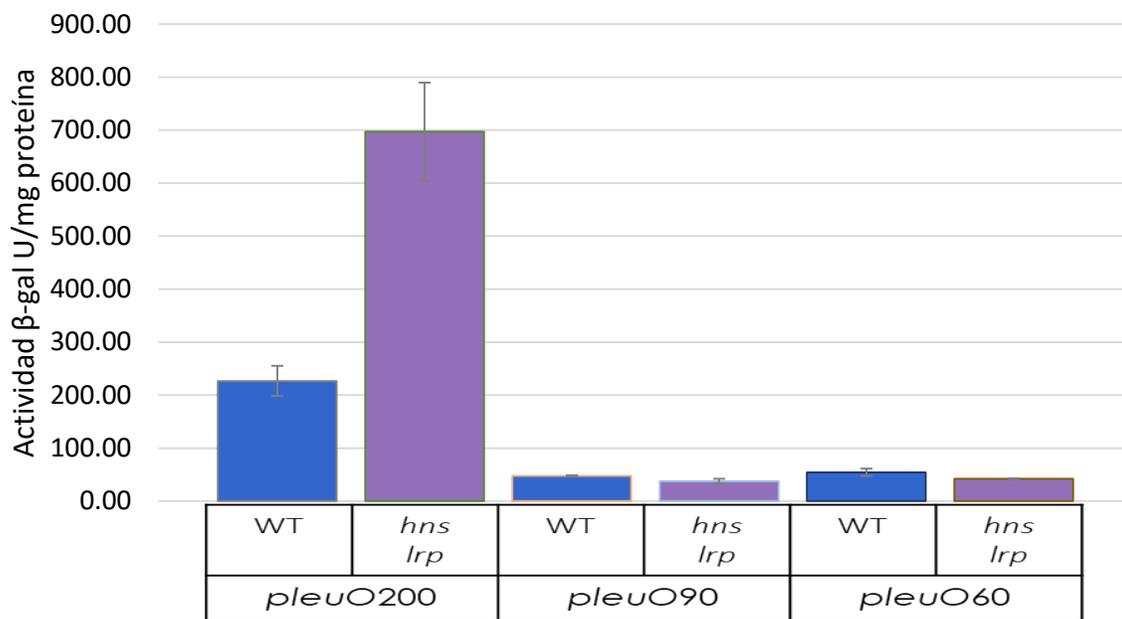
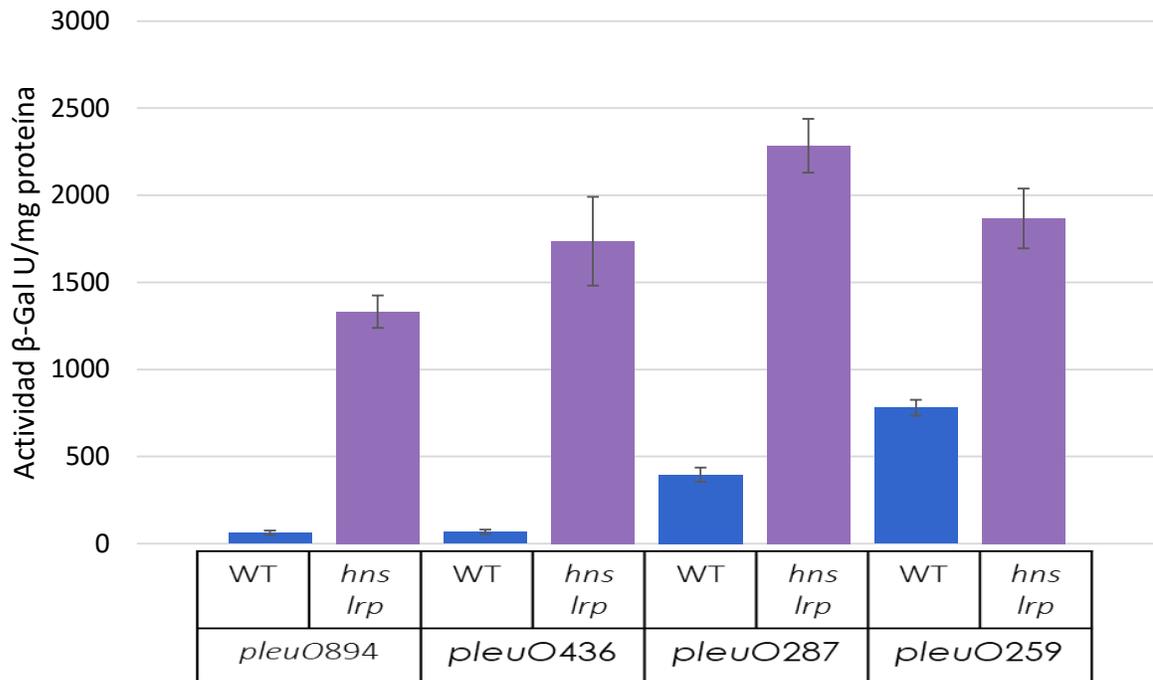


Fig. 5. Regulación de la expresión de las fusiones traduccionales de *leuO* (*pleuO894*, *pleuO436*, *pleuO287*, *pleuO200*, *pleuO90* y *pleuO60*) en el fondo silvestre (WT) y $\Delta hns \Delta lrp$. (Tomado de Sánchez-Popoca, 2014 y López-Mendez, 2018).

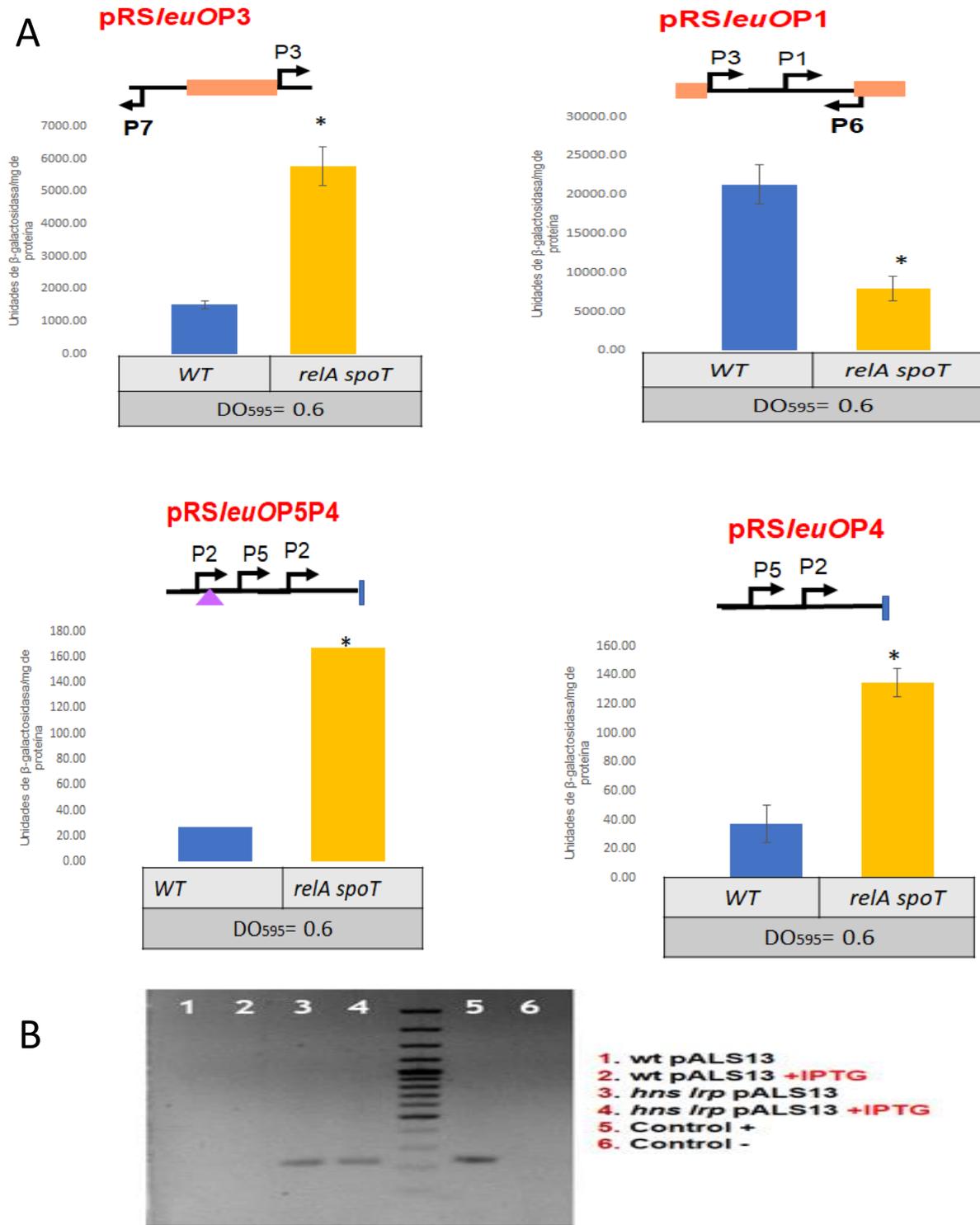


Fig. 6. A. Regulación de la expresión de las fusiones transcripcionales de los promotores individuales de *leuO*, cada grafica tiene la representación esquemática de la construcción que contiene el fragmento de 100 pb de la región reguladora de *leuO* que corresponde a los promotores individuales transcripcionalmente activos (P1, P2, P3, P4 Y P5). B. Visualización del RNA mensajero de *leuO* en la cepa silvestre WT y *hns lrp* con inducción y sin inducción de RelA'. Se muestra que para que tenga un efecto la regulación de ppGpp en *leuO* a nivel cromosomal, se requiere que esté libre de la represión de H-NS y Lrp (Modificado de Sanchez-Popoca,2018).

3. Justificación

LeuO es un regulador transcripcional que se ha asociado a la virulencia de *S. enterica*. En el laboratorio se ha estudiado la regulación del gen *leuO* en *S. Typhi*, en el cual se ha demostrado que su expresión es regulada negativamente por Lrp y H-NS. El fin de este trabajo es demostrar el posible papel que tienen los reguladores ArcA, Fis y OmpR en la expresión de *leuO* en ausencia de H-NS y Lrp como sus principales reguladores negativos.

4. Hipótesis

El gen *leuO* en *S. Typhi* es regulado por los reguladores ArcA, Fis y OmpR en ausencia de H-NS y Lrp.

5. Objetivo General

Determinar la influencia de los reguladores ArcA, Fis y OmpR en la expresión del gen *leuO* en *S. Typhi*.

5.1 Objetivos particulares

Realizar cepas triples mutantes que carezcan de los genes *hns*, *lrp*, más un tercer locus mutado en el gen del regulador de interés.

Medir la expresión de fusiones traduccionales *leuO* conteniendo diferentes regiones de la región 5' reguladora de *leuO*, en fondos genéticos *hns lrp* comparados con el fondo *hns lrp* y el regulador de interés.

6. METODOLOGÍA

A partir de una colección del plásmido pMC1871, que llevan fusiones traduccionales a *lacZ* y que contienen las construcciones de la región completa de *leuO* y los diferentes recortes de la región reguladora (Fig. 4), más las diferentes cepas de *S. Typhi* (Tabla 2.); se procedió a la transformación de las cepas con los plásmidos y así poder tener las diferentes combinaciones para la realización de este estudio (Tabla 3.).

Tabla 2. Descripción de las fusiones y cepas a utilizar en este estudio.

Cepas/Plásmidos	Características	Referencia
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi (<i>S. Typhi</i>)		
IMSS-1 WT (Silvestre)	Aislado Clínico Mexicano <i>S. Typhi</i> 9, 12, d, Vi	Puente et al., 1986
$\Delta hns \Delta lrp$	IMSS-1 derivada $\Delta hns \Delta lrp$	Fernandez-Mora et al., 2021
$\Delta fis::Km$	IMSS-1 derivada $\Delta fis::Km^r$	Fernandez-Mora, Datos no publicados.
$\Delta ompR::Km$	IMSS-1 derivada $\Delta ompR::Km^r$	Fernandez-Mora, Datos no publicados.
$\Delta arcA::Km$	IMSS-1 derivada $\Delta arcA::Km^r$	Fernandez-Mora, Datos no publicados.
$\Delta hns \Delta lrp \Delta fis::Km$	IMSS-1 derivada $\Delta hns \Delta lrp \Delta fis::Km^r$	Este estudio
$\Delta hns \Delta lrp \Delta arcA::Km$	IMSS-1 derivada $\Delta hns \Delta lrp \Delta arcA::Km^r$	Este estudio
Plásmidos		
<i>p_{leuO}894</i>	Plásmido derivado del pMC1871 conteniendo 64 pb del gen estructural <i>leuA</i> , la región reguladora 5' completa de <i>leuO</i> (830 pb) y	Fernandez-Mora et al., 2021

	162 pb de la región estructural de <i>leuO</i>	
<i>pleuO436</i>	Plásmido derivado del pMC1871 conteniendo 436 pb de la región reguladora de <i>leuO</i> y 162 pb de la región estructural de <i>leuO</i> .	Fernandez-Mora et al., 2021
<i>pleuO287</i>	Plásmido derivado del pMC1871 conteniendo 287 pb de la región reguladora de <i>leuO</i> y 162 pb de la región estructural de <i>leuO</i> .	Fernandez-Mora et al., 2021
<i>pleuO200</i>	Plásmido derivado del pMC1871 conteniendo 200 pb de la región reguladora de <i>leuO</i> y 162 pb de la región estructural de <i>leuO</i> .	Fernandez-Mora et al., 2021
<i>pleuO90</i>	Plásmido derivado del pMC1871 conteniendo 90 pb de la región reguladora de <i>leuO</i> y 162 pb de la región estructural de <i>leuO</i> .	Fernandez-Mora et al., 2021
<i>pleuO60</i>	Plásmido derivado del pMC1871 conteniendo 60 pb de la región reguladora de <i>leuO</i> y 162 pb de la región estructural de <i>leuO</i> .	Fernandez-Mora et al., 2021
pKD46	Plásmido derivado del pINT-ts que contiene el promotor <i>araB</i> inducible con arabinosa; y del plásmido pBAD18 que	Datsenko et al., 2000

	contiene los fragmentos de ADN correspondientes a los genes β y <i>exo</i> (Sistema Red)	
pKD4	Plásmido derivado del pCP15 (pANTS γ) que contienen el gen resistencia a Km flanqueadas por sitios FR repetidos.	Datsenko et al., 2000

Tabla 3. Combinación de los plásmidos con las diferentes cepas de *S. Typhi*.

Plásmidos (Fusiones de <i>leuO</i>)	Cepa <i>S. Typhi</i>
<i>pleuO894</i>	WT
<i>pleuO436</i>	$\Delta fis::Km$
<i>pleuO287</i>	$\Delta ompR::Km$
<i>pleuO200</i>	$\Delta arcA::Km$
<i>pleuO90</i>	$\Delta hns \Delta lrp$
<i>pleuO60</i>	$\Delta hns \Delta lrp \Delta fis::Km$
	$\Delta hns \Delta lrp \Delta arcA::Km$

6.1 Mutagénesis dirigida por Método de Datsenko y Wanner.

6.1.1 Preparación de células triples mutantes electrocompetentes

La mutagenesis dirigida por el Método de Datsenko y Wanner (Datsenko et al., 2000) se desarrolló para realizar triples mutantes que carecieran de *hns lrp* y del regulador a analizar, *arcA*, *fis* y *ompR*. A la cepa de *S. Typhi* mutante en $\Delta hns \Delta lrp$ se le transformó con el plásmido pKD46 (Tabla 2.) (Fig. 7.A); una vez que la cepa fue transformada se creció en medio líquido LB (Ver anexo) con el inductor arabinosa y ampicilina como antibiótico de resistencia; todo esto con el fin de expresar la proteína recombinasa Red a una $DO_{600} = 0.6$. Posteriormente se procedió a hacer gliceroles para guardar a $-70^{\circ}C$ hasta su uso.

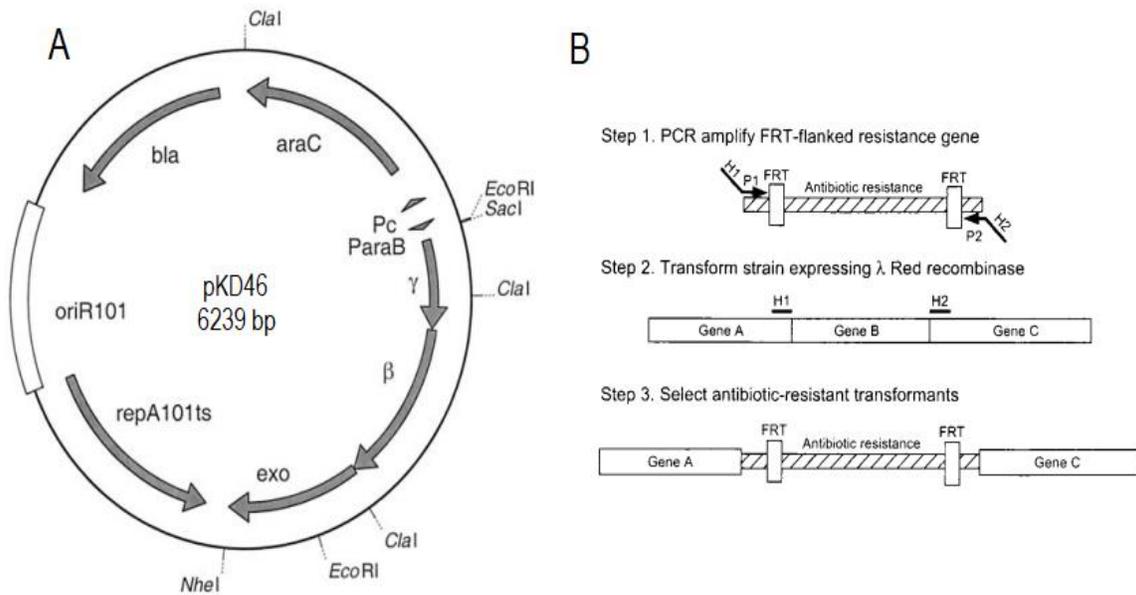


Fig. 7.A. Mapa del plásmido pKD46 que lleva el sistema recombinasa Red. B. Estrategia para la interrupción del gen *fis* y *arcA*. H1 y H2 son las regiones de extensión que pertenecen al gen a interrumpir. Mientras que P1 y P2 se refieren a sitios de cebado en el cassette de Km dentro del plásmido pKD4 (Modificado de Datsenko et al., 2000) .

Con el plásmido pKD4 que lleva una resistencia al antibiótico kanamicina (Km), se amplificaron los fragmentos que sustituirían las regiones de cada gen, a través de la construcción de oligos que lleven las regiones de cada extremo del cassette (P1 Y P2) y las regiones externas del gen (*fis*, *arcA* y *ompR*) dentro del cromosoma (H1 Y H2) (Fig.7.B). Una vez que los fragmentos se amplificaron, se procedió a transformarlos en la cepa $\Delta hns \Delta lrp$ con el plásmido pKD46 que ya tenía expresada la recombinasa Red; las transformantes se recuperaron en medio SOC (Ver anexo) y se platearon en cajas LB más el respectivo antibiótico (Km), asegurando que solo se seleccionaran las células que integraron la mutación con el cassette en el cromosoma. Para eliminar el plásmido pKD46 de las nuevas cepas triples mutantes $\Delta hns \Delta lrp \Delta fis::km$ y $\Delta hns \Delta lrp \Delta arcA::km$ se pusieron a crecer en Km y a una temperatura de 40°C, para asegurar que el plásmido se eliminara debido a su termosensibilidad. Una vez que las cepas triples mutantes estaban libres del plásmido pKD46, se confirmaron por PCR los fragmentos que corresponden a los genes mutados (*hns*, *lrp*, *fis* y *arcA*) y el fragmento IS200 específico de *S. Typhi*

(descartar contaminantes); por ultimo las cepas triples mutantes resultantes se almacenaron en gliceroles a -70°C hasta su uso.

Una vez obtenidas todas las mutantes, las bacterias se estriaron en agar TSGB (mutantes y silvestre) incubándolas a 37°C toda la noche. Posteriormente se tomó una azada y se inoculó en 100 ml de medio TSGB incubándolos a 37°C en agitación hasta alcanzar una $\text{DO}_{600} = 0.8$. Las bacterias se concentraron por centrifugación a 6000 rpm por 10 min a una temperatura de 4°C . La pastilla resultante se lavó tres veces con agua estéril fría. Al final la pastilla se resuspendió en 600 μl con glicerol al 10% y se alicuotó en tubos Eppendorf de 0.6 ml guardándose a -70°C hasta su uso.

6.2 Transformación de las cepas.

Las cepas de *S. Typhi* (Tabla 2.) electrocompetentes se descongelaron en hielo y también se enfriaron las celdas de electroporación (BIORAD). Posteriormente se agregaron 10 μl de plásmido con las fusiones en 50 μl de células electrocompetentes, añadiendo 10 μl más de agua estéril. Las células electrocompetentes se les dió un pulso de 2.5KV por 4.6 μs (micropulser BIORAD) e inmediatamente se recuperaron en 1 ml de medio SOC incubándolas a 37°C por 1 hora para el posterior plaqueo de 100 μl en agar TSBG con X-gal y sus antibióticos correspondientes (Ver anexo), con la finalidad de seleccionar las clonas recombinantes.

6.3 Selección de clonas.

Las clonas se seleccionaron por su resistencia a antibióticos y fenotipo azul debido a la acción enzimática de la enzima Beta-galactosidasa con el sustrato X-gal que da esa coloración. Las clonas se inocularon en tubos de ensayo con 5 ml de TSBG con tetraciclina o Ampicilina y se incubaron a 37°C con agitación durante 12-16 horas. Después el DNA plasmídico se extrajo por lisis alcalina y por PCR se verificaron los insertos que corresponden a las mutaciones de los genes, las fusiones y el 1S200 de *S. Typhi*.

6.4 Cultivo bacteriano de las cepas de *S. Typhi* con las diferentes fusiones traduccionales de *leuO* unidas al reportero *lacZ*.

Las Clonas de *S. Typhi* se incubaron a 37°C con sus respectivos antibióticos. Primero se estriaron en agar TSBG con X- gal incubándolas por 24 horas. Al día siguiente se hizo un preinóculo en tubos con 5 ml de MN y se incubaron por 7 horas para pasar a matraces con 50 ml de LB, incubando a 37°C con agitación toda la noche. Pasado el tiempo se procedió a poner en matraces de 50 ml de medio MN el inóculo suficiente. Las bacterias se dejaron crecer en agitación a 37°C; al llegar a una $DO_{595} = 0.6$ se tomó una muestra de 1.5 ml en un tubo Eppendorf de 2 ml por duplicado, repitiendo el mismo paso a $DO_{595} = 1.0$ y $DO_{595} = 1.6$, tomando 1 ml y 250 μ l respectivamente. Estas muestras se centrifugaron a 12,000 rpm 1 min, la pastilla se lavó con 1 ml de amortiguador Z 1x (Ver anexo) y se centrifugó nuevamente, finalmente la pastilla se guardó a -70°C hasta su uso para la cuantificación de proteína y el ensayo de Beta-galactosidasa.

6.5 Cuantificación de proteína y Actividad de Beta-galactosidasa.

Las pastillas se resuspendieron en amortiguador Z 1X, de manera que la concentración de proteína total quedara en un rango de 0.15-0.3 mg/ml. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry, colocando por duplicado 20 μ l de la muestra y de control (BSA 0.2 mg/ml) en una placa de Elisa de 96 pozos. Posteriormente a cada muestra se le agregó 100 μ l de solución de Lowry y se mezcló incubando a temperatura ambiente durante 15 minutos. Enseguida se adicionó 100 μ l de reactivo folin-ciocalteu al 16.9%, de igual manera mezclando e incubando a temperatura ambiente por 30 minutos. Se procedió a la cuantificación de proteína con un lector de placas tipo Ceres (Bio-Tek), el protocolo compara la absorbancia de las muestras con una curva estándar de concentraciones de BSA previamente establecida. Una vez ajustada esa concentración al rango de concentraciones de BSA, se analizó la actividad de Beta-galactosidasa (Fernandez-Mora et al., 2021).

Para la actividad de Beta-galactosidasa se utilizó una placa de 96 pozos en la cual se agregaron por duplicado 20µl de muestra. Después de esto se añadió una solución de lisis (agua destilada, amortiguador Z 1X, lisozima 0.22 mg/ml, tritón 0.22%, β-mercaptoetanol) y se incubó por 20 min a 37°C. Para la reacción se agregó a la placa 100µl de ONPG (O-nitrofenil β-D-galacto piranósido, 1 mg/ml de agua) el cual se tornó a color amarillo por la actividad enzimática de la Beta-galactosidasa. La absorbancia medida se realizó en un lector tipo Ceres a 415 nm, por 5 min. Las lecturas se compararon con una curva estándar de actividad de Beta-galactosidasa previamente establecida. Para obtener la concentración de enzima, se dividió el valor obtenido de la actividad enzimática y la concentración de proteína de la muestra; expresando el valor en U/mg. Cabe resaltar que todos los experimentos se realizaron por triplicados, y que nos ayudó a hacer el análisis estadístico.

6.6 Análisis estadístico.

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

7. Resultados.

7.1 Generación de triples mutantes $\Delta hns\Delta lrp\Delta regulador$ por inactivación de un paso por recombinación homóloga y transformación en las fusiones traduccionales de *leuO*.

Teniendo el conocimiento de que una doble mutante $\Delta hns\Delta lrp$ libera la expresión del gen *leuO* en *S. Typhi*, la generación de triples mutantes por recombinación homóloga (Datsenko et al., 2000) $\Delta hns\Delta lrp\Delta arcA::km$ y $\Delta hns\Delta lrp\Delta fis::km$ nos permitió observar el efecto de ArcA y Fis sobre *leuO* en ausencia de H-NS y Lrp como sus moduladores negativos.

Una vez que la recombinación homóloga se realizó (Fig. 8) las colonias se aislaron y se caracterizaron por su crecimiento en presencia del antibiótico que corresponde al cassette de la mutación (Km), por la amplificación de los fragmentos específicos correspondientes a la mutación de los genes (*hns*, *lrp* y regulador), y por la amplificación de los insertos que corresponden a la mutación con oligos localizados dentro del cassette de kanamicina (K1 y K2).

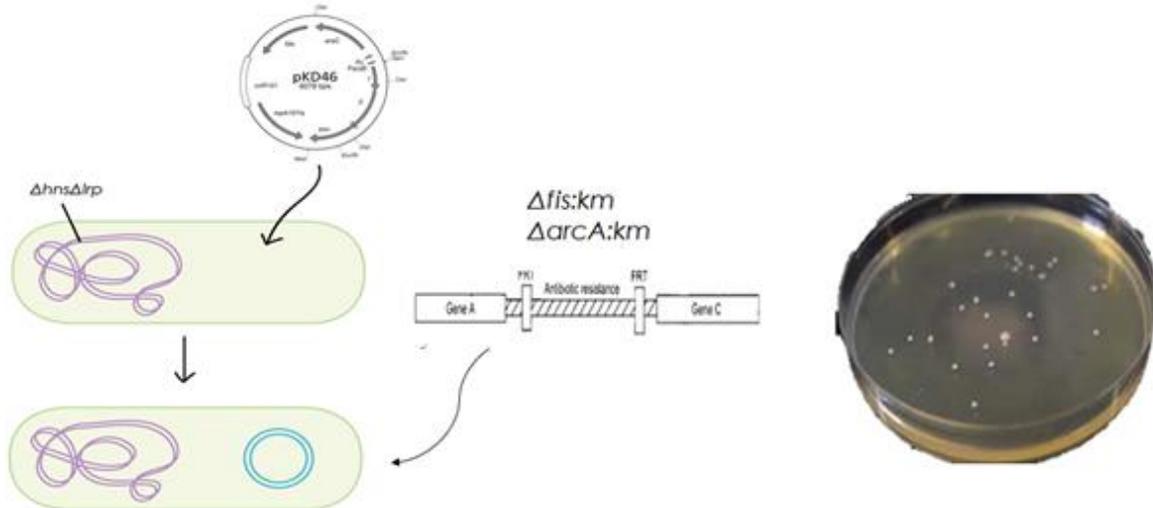
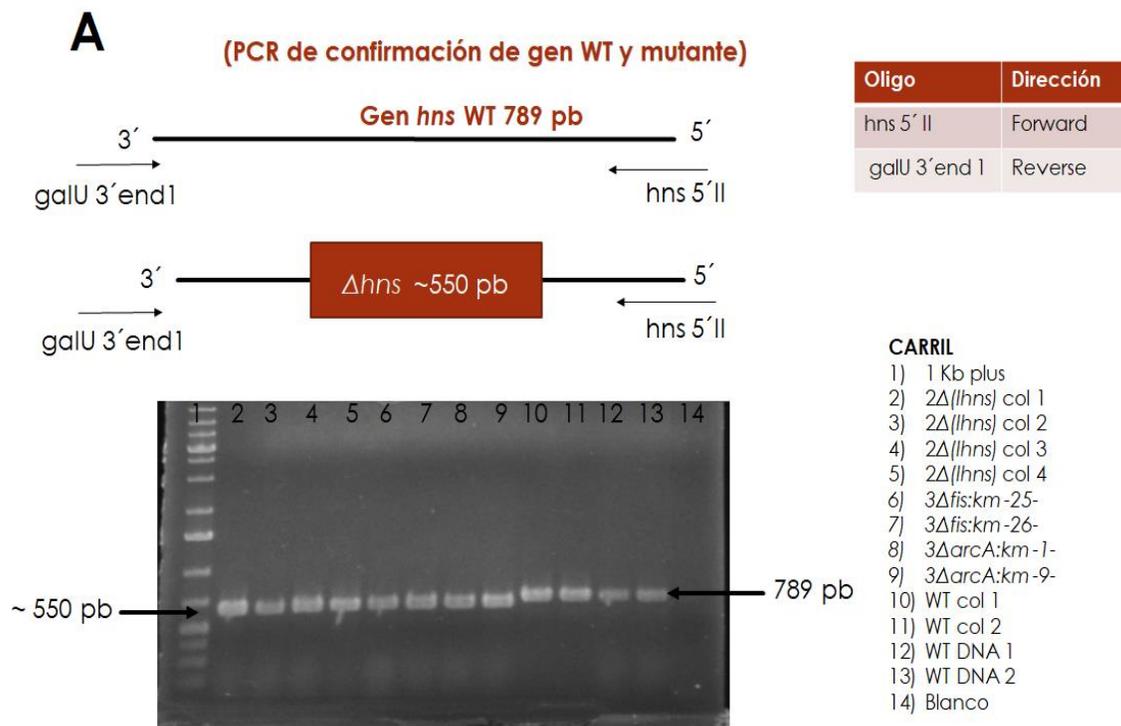


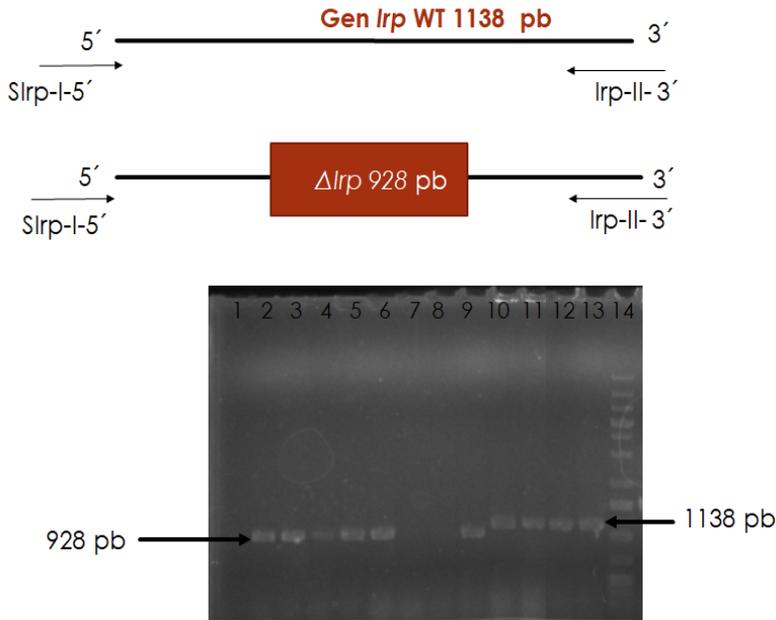
Fig.8. Con la cepa IMSS $\Delta hns\Delta lrp$ y el inserto que contiene la mutación de cada regulador, se realizó la mutación por recombinación homóloga con el plasmido pKD46 que contiene la recombinasa red inducible con arabinosa. Una vez obtenida la recombinación se plateó en cajas que contuvieran el antibiotico Km para seleccionar las clonas que fueran positivas y resistieran al antibiotico, para despues realizar su caracterización genética.

La figura 9 muestra la caracterización genética de la triple mutante $\Delta hns\Delta lrp\Delta fis::km$ y $\Delta hns\Delta lrp\Delta arcA::km$ con la amplificación de los insertos de los genes WT y mutante para *hns* (Fig 9.A), *lrp* (Fig 9.B), *fis* (Fig 9.C) y *arcA* (Fig. 9.D); con oligos externos que corresponden a cada gen y así obtener amplicones de tamaño específico. Por ultimo se amplificaron los insertos que corresponden a la mutación de *fis::km* (Fig 9.E)) y de *arcA::km* (Fig. 9.F), ocupando no solo el juego de los oligos externos si no también oligos internos localizados dentro del cassette de kanamicina.

Una vez que se obtuvo la clona positiva de la cepa triple mutante $\Delta hns\Delta lrp\Delta fis::km$ y $\Delta hns\Delta lrp\Delta arcA::km$ se transformaron en todas las fusiones traduccionales (Tabla 3.) para su posterior análisis por ensayo de Beta-Galactosidasa. Para el caso de la triple mutante $\Delta hns\Delta lrp\Delta ompR::km$ no ha sido viable la generación de la misma debido a que el inserto $\Delta ompR::km$ no recombina en los sitios correspondientes para sustituir al gen *ompR* (Fig. 7-8) y al realizar el PCR de confirmación para el inserto de la mutación en *ompR*, el fragmento amplificado correspondiente a la triple mutante es del mismo tamaño que el gen silvestre (datos no mostrados).



B (PCR de confirmación de gen WT y mutante)

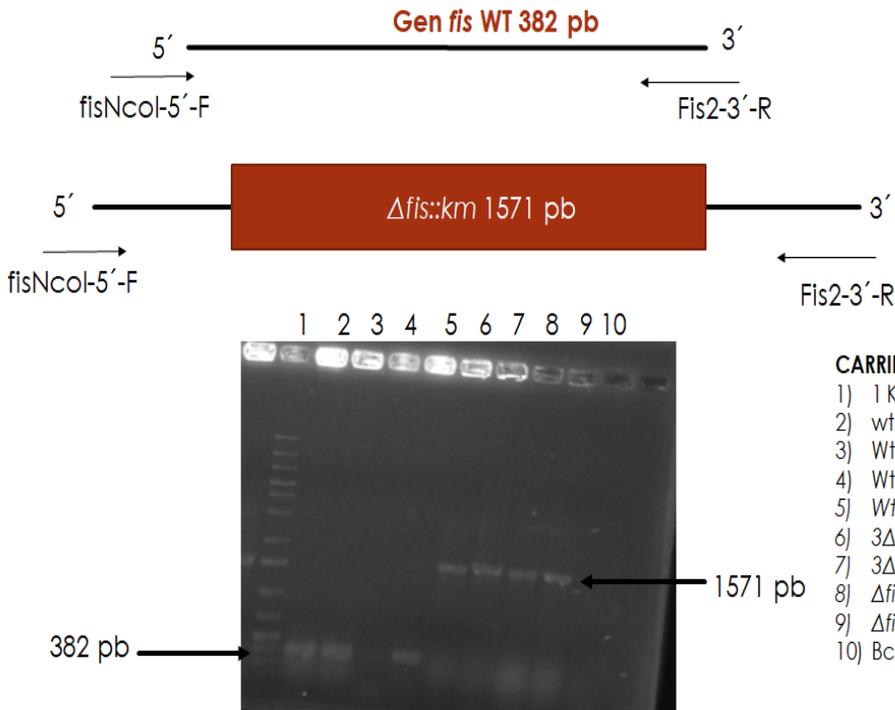


Oligo	Dirección
Slrp-I-5'	Forward
lrp-I-3'	Reverse

CARRIL

- 1) Blanco
- 2) 2Δ(lrp) col 1
- 3) 2Δ(lrp) col 2
- 4) 2Δ(lrp) col 3
- 5) 2Δ(lrp) col 4
- 6) 3Δfis:km-25-
- 7) 3Δfis:km-26-
- 8) 3ΔarcA:km-1-
- 9) 3ΔarcA:km-9-
- 10) WT col 1
- 11) WT col 2
- 12) WT DNA 1
- 13) WT DNA 2
- 14) 1 Kb plus

C (PCR de confirmación de gen WT y mutante)

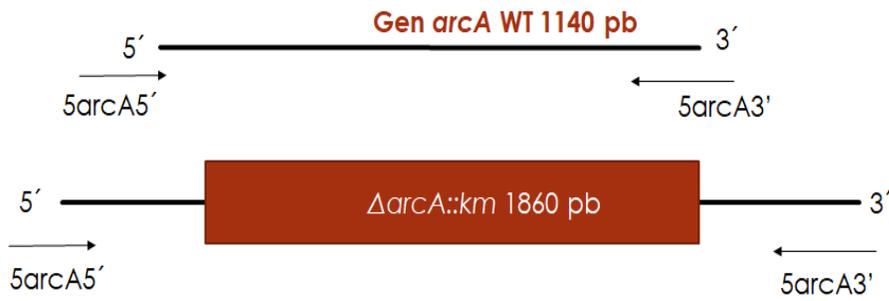


Oligo	Dirección
fisNcol-5'-F	Forward
Fis2-3'	Reverse

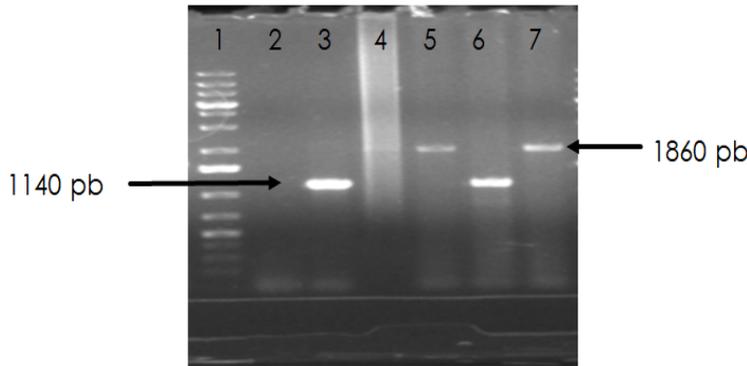
CARRIL

- 1) 1 Kb plus
- 2) wt col 1
- 3) Wt col 2
- 4) Wt DNA 1
- 5) Wt DNA 2
- 6) 3Δfis:km-25-
- 7) 3Δfis:km-26-
- 8) Δfis:km-1-
- 9) Δfis:km-2-
- 10) Bco

D (PCR de confirmación de gen WT y mutante)



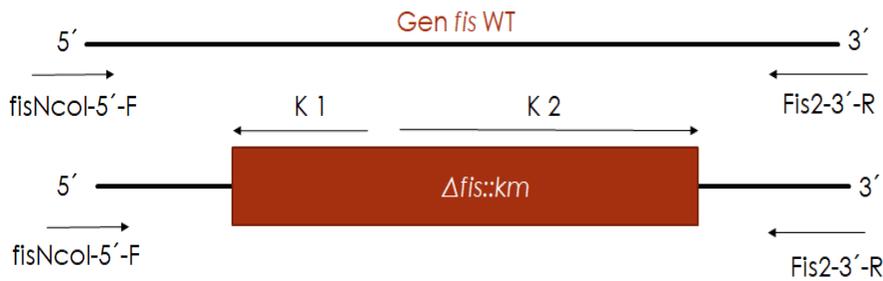
Oligo	Dirección
5arcA5'	Forward
5arcA3'	Reverse



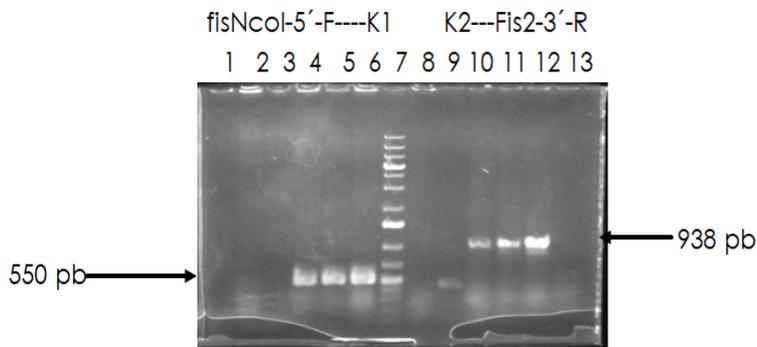
CARRIL

- 1) 1 Kb plus
- 2) Bco
- 3) WT DNA 1
- 4) $\Delta arcA::km$
- 5) $3\Delta arcA::km-1-$
- 6) $3\Delta arcA::km-4-$
- 7) $3\Delta arcA::km-9-$

E (PCR de confirmación y dirección)



Oligo	Dirección
fisNcoI-5'-F	Forward
Fis2-3'-R	Reverse
K1	Reverse
K2	Forward



CARRIL

- 1) Bco
- 2) wt1 col
- 3) Wt DNA
- 4) $3\Delta fis::km-25-$
- 5) $3\Delta fis::km-26-$
- 6) $\Delta fis::km$
- 7) 1 kb plus
- 8) wt1 col
- 9) Wt DNA
- 10) $3\Delta fis::km-25-$
- 11) $3\Delta fis::km-26-$
- 12) $\Delta fis::km$
- 13) Bco

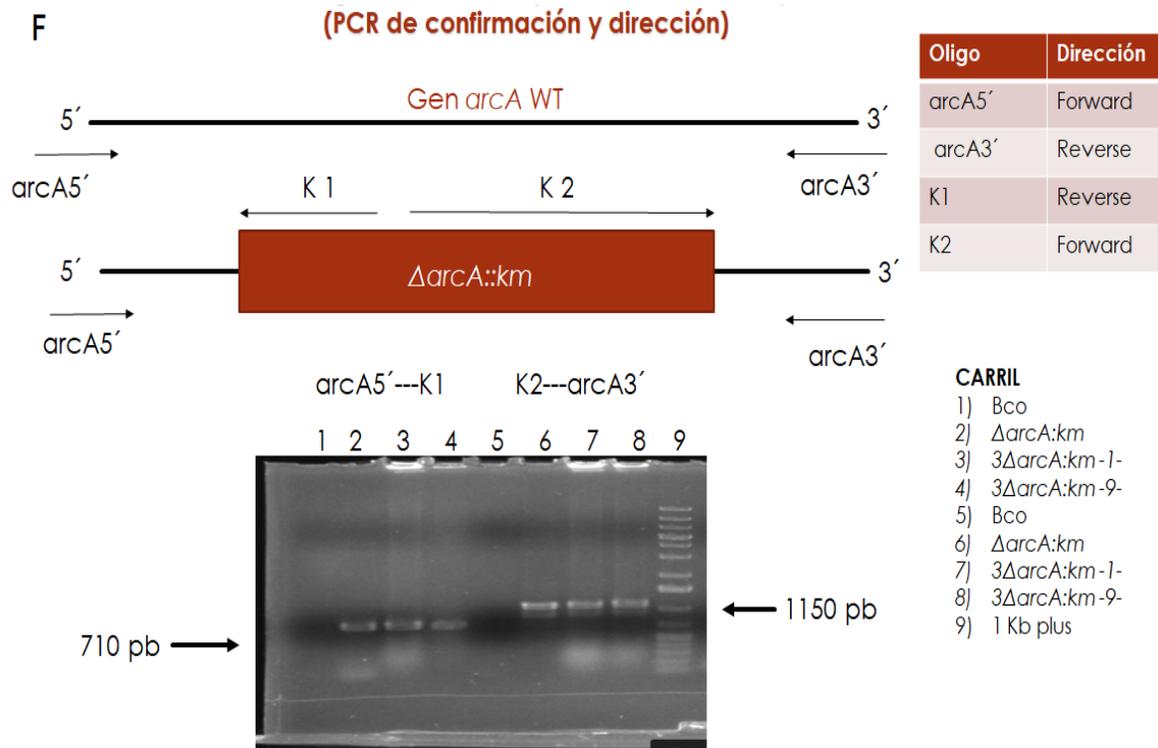


Fig.9. Visualización de los insertos amplificados para la caracterización genética de las triples mutantes $\Delta hns\Delta lrp\Delta fis::km$ y $\Delta hns\Delta lrp\Delta arcA::km$ con el marcador 1 Kb plus para referencia de los tamaños. A. Para checar la mutación en *hns* respecto al WT con los oligos externos del gen, se observa la diferencia en tamaños donde Δhns corresponde a ~550 pb y el gen silvestre a 789 pb, utilizando los respectivos controles para cada amplicon. B. Para checar la mutación en *lrp* respecto al WT con los oligos externos del gen, se observa la diferencia en tamaños donde Δlrp corresponde a 928 pb y el gen silvestre a 1138 pb, utilizando los respectivos controles para cada amplicon. C. Para checar la mutación en *fis* respecto al WT con los oligos externos del gen, se observa la diferencia en tamaños donde $\Delta fis::km$ corresponde a ~1571 pb y el gen silvestre a 382 pb, utilizando los respectivos controles para cada amplicon. D. Para checar la mutación en *arcA* respecto al WT con los oligos externos del gen, se observa la diferencia en tamaños donde $\Delta arcA::km$ corresponde a ~1860 pb y el gen silvestre a 1140 pb, utilizando los respectivos controles para cada amplicon. E. Para checar la mutación $\Delta fis::km$ respecto el WT con los oligos externos del gen y los internos a la mutación; se observa la diferencia en tamaños donde la combinación *fis*NcoI5'-F---K1 corresponde a 550 pb y la combinación K2---Fis2-3'-R a 938 pb, utilizando los respectivos controles para cada amplicon. F. Para checar la mutación $\Delta arcA::km$ respecto el WT con los oligos externos del gen y los internos a la mutación; se observa la diferencia en tamaños donde la combinación 5arcA5'---K1 corresponde a 710 pb y la combinación K2---arcA3' a 1150 pb, utilizando los respectivos controles para cada amplicon.

7.2 Efecto del regulador Fis sobre la región reguladora de *leuO*.

Para realizar el análisis del efecto que tenía el regulador Fis sobre la expresión de la región reguladora de *leuO*, se utilizaron los fondos genéticos WT y derivadas de la cepa *S. Typhi* IMSS 1 sobre cada una de las fusiones de *leuO* (Tabla 3.).

Actividad β -Galactosidasa de las fusiones traduccionales a $DO_{595}=0.6$, $DO_{595}=1.0$ Y $DO_{595}=1.6$.

a) Fase Exponencial ($DO_{595}=0.6$)

En esta fase de crecimiento encontramos que para la fusión *pleuO894*, la cual tiene la región completa de *leuO* y todos los promotores (Fig. 4.B), en el fondo WT tuvo una expresión de tan solo 53 U/mg, y al comparar la mutante sencilla $\Delta fis::km$ la actividad fue de 55 U/mg, siendo una actividad similar a la silvestre, lo que indica que Fis por si solo no tenía un efecto en la regulación de la fusión. Al analizar los fondos doble mutante $\Delta hns \Delta lrp$ y triple mutante $\Delta hns \Delta lrp \Delta fis::km$ se obtuvieron actividades de 1,384 U/mg y 1,388 U/mg, respectivamente; las cuales no son significativos entre ellos. Estos resultados indican que en la fusión *pleuO894*, durante la fase exponencial, el regulador Fis no tiene un efecto en la regulación de *leuO* (Fig.10).

En la fusión *pleuO436*, la cual sigue conteniendo todos los promotores, pero con 458 pb menos (Fig. 4.B), tanto en el fondo silvestreT como en el $\Delta fis::km$ se obtuvieron actividades de 29 U/mg, indicando que la mutante sencilla no tiene un efecto sobre la fusión. Sin embargo, al comparar los fondos $\Delta hns \Delta lrp$ con una actividad de 901 u/mg y $\Delta hns \Delta lrp \Delta fis::km$ con una actividad de 521 U/mg, hubo una disminución significativa de más de 400 unidades, lo que nos sugiere que a fase exponencial Fis tiene un efecto positivo sobre la expresión de esta fusión en ausencia de H-NS y Lrp (Fig. 10).

La fusión *pleuO287* está más recortada pues tiene 507 pb menos comparado con la fusión completa, sin embargo mantiene los 5 promotores (Fig. 4.B). El fondo silvestre tuvo una actividad de 257 U/mg, aumentado significativamente comparado con las fusiones anteriores en el mismo fondo. Esto se debe a que dentro del recorte

de la fusión hay un recorte en el sitio de nucleación para H-NS, el cual es considerado un sitio de regulación negativa. Al analizar la expresión en el fondo $\Delta fis::km$ resultó no ser significativa respecto a la silvestre; indicando que Fis no tiene efecto en la fusión. En la mutante $\Delta hns \Delta lrp$ mostró una actividad de 1594 U/mg y al compararla con la mutante triple $\Delta hns \Delta lrp \Delta fis::km$ hubo una disminución de 378 U/mg los cuales fueron significativos y sugieren que en esta fusión Fis sigue teniendo un efecto positivo al ya no estar H-NS y Lrp presentes (Fig. 10).

La fusión $pleuO200$ tiene un recorte de 694 pb respecto de la fusión completa y además solo contiene 3 promotores (2,4 y 5), que son los más cercanos al ATG (Fig. 4.B). Al analizar los fondos silvestre y $\Delta fis::km$ tuvieron una actividad de 133 y 187 U/mg respectivamente; que no fueron significativas para que Fis tenga un efecto por sí solo. De manera interesante, en esta fusión, al comparar los fondos $\Delta hns \Delta lrp$ y $\Delta hns \Delta lrp \Delta fis::km$ hubo una disminución significativa de 3 veces en la actividad, con lo que se sigue observando la regulación positiva de Fis en ausencia de H-NS y Lrp (Fig. 10).

La fusión $pleuO90$ sólo contiene dos promotores, que son el 4 y 5 (Fig. 4.B). Sin embargo, fue notable que al quitar el promotor 2 la expresión bajó considerablemente en todos los fondos. Su expresión fue de tan solo 20 U/mg en la silvestre, y al compararlas con todas las mutantes se pudo observar que no hay diferencias significativas (Fig. 11), por lo que en esta fase de crecimiento no observamos regulación. Por último la fusión $pleuO60$ que únicamente tiene al promotor 4 (Fig. 4.B) tuvo los mismos niveles de expresión en todos los fondos analizados (Fig. 11), por lo que de igual manera que en la fusión anterior no se observó regulación.

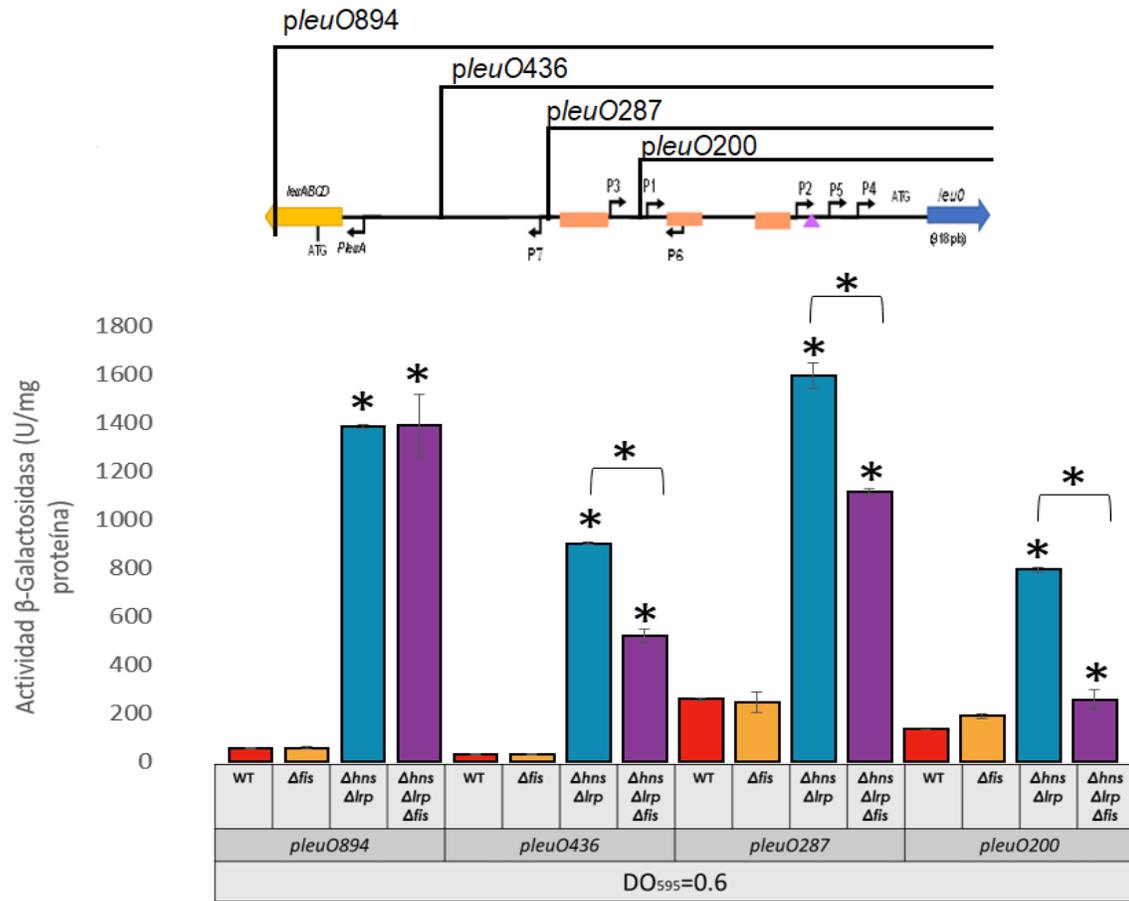


Fig. 10. Regulaci3n de la expresi3n de las fusiones traducci3nales *pleuO894*, *pleuO436*, *pleuO287* y *pleuO200* en fase exponencial (DO₅₉₅=0.6) en medio rico MN en las cepas silvestre (WT), $\Delta fis::km$, $\Delta hns \Delta lrp$ y $\Delta hns \Delta lrp \Delta fis::km$. Actividad media de tres experimentos independientes. *Datos significativamente diferentes a la cepa WT y a la $\Delta hns \Delta lrp$ (P<0.05).

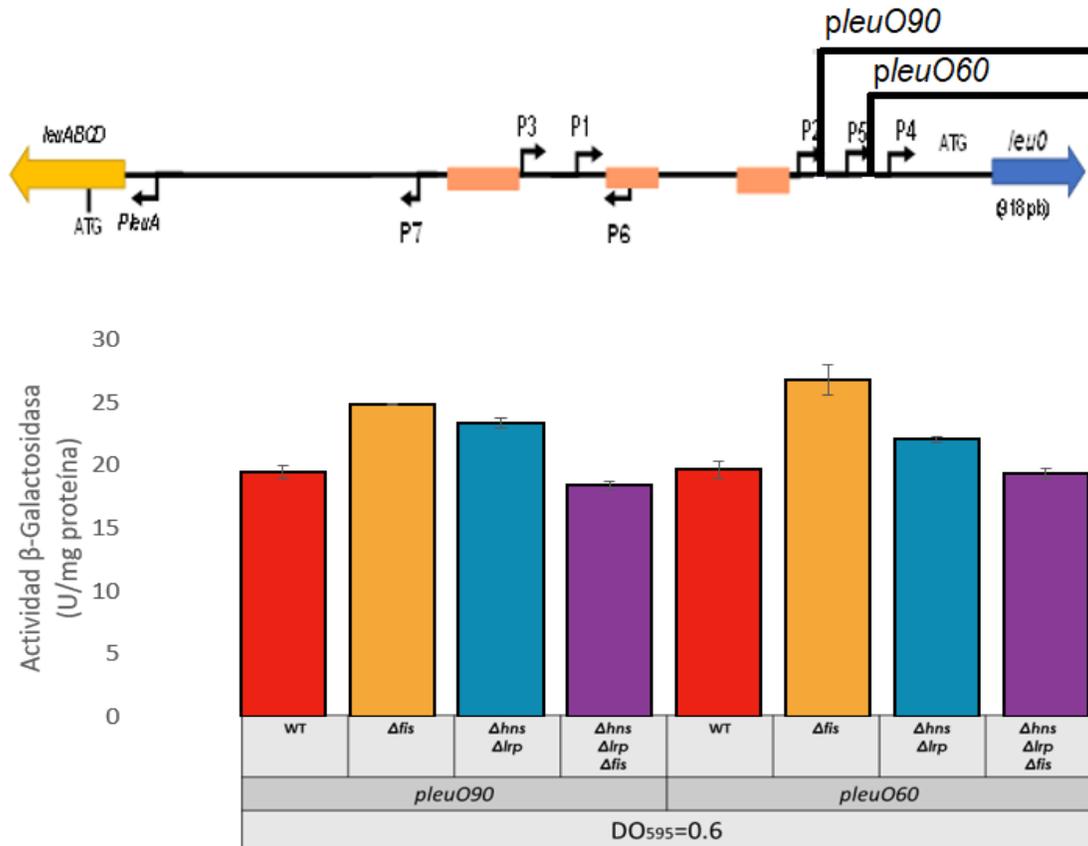


Fig. 11. Regulación de la expresión de las fusiones traduccionales *pleuO90* y *pleuO60* en fase exponencial ($DO_{595}=0.6$) en medio rico MN en las cepas silvestre (WT), $\Delta fis::km$, $\Delta hns \Delta lrp$ y $\Delta hns \Delta lrp \Delta fis::km$. Actividad media de tres experimentos independientes. *Datos significativamente diferentes a la cepa WT y a la $\Delta hns \Delta lrp$ ($P < 0.05$).

b) Fase Estacionaria temprana(DO₅₉₅=1.0)

En la fusión *pleuO894* (Fig. 4.B) al entrar a la fase estacionaria el fondo silvestre tuvo una actividad de 76 U/mg, al compararlo con el fondo sencillo $\Delta fis::km$ que tuvo 28 U/mg hubo una disminución de casi 3 veces, lo que sugiere que Fis por sí solo es capaz de regular la fusión al entrar a la fase estacionaria. Al comparar los fondos $\Delta hns\Delta lrp$ y $\Delta hns\Delta lrp\Delta fis::km$ estos tuvieron valores de 928 y 884 U/mg (Fig. 12), que al no ser diferencias significativas entre sí nos indica que Fis no tiene un efecto positivo en ausencia de H-NS y Lrp.

La fusión *pleuO436* (Fig. 4.B) en los fondos silvestre y $\Delta fis::km$ no tuvieron diferencias significativas, de igual manera al comparar los fondos $\Delta hns\Delta lrp$ con 897 U/mg y $\Delta hns\Delta lrp\Delta fis::km$ con 682 U/mg, estos valores no fueron significativas para que Fis tuviera un efecto en ausencia de H-NS y Lrp (Fig. 12).

En la fusión *pleuO287* (Fig. 4.B) tuvo un efecto similar a la fusión anterior, ya que en el fondo silvestre y $\Delta fis::km$ tuvieron unidades de actividad muy parecidas, las cuales no fueron significativas; por otro lado en los fondos $\Delta hns\Delta lrp$ y $\Delta hns\Delta lrp\Delta fis::km$ a pesar de que hubo una diferencia de 290 unidades estas no fueron significativas para que Fis tuviera un efecto en ausencia de H-NS y Lrp (Fig. 12).

En la fusión *pleuO200* (Fig. 4.B), en esta fase de crecimiento el fondo silvestre tuvo 188 U/mg, al compararlo con el fondo $\Delta fis::km$ los valores no fueron significativos, indica que Fis no tiene un efecto por sí solo en la fusión. Sin embargo, al analizar los fondos $\Delta hns\Delta lrp$ y $\Delta hns\Delta lrp\Delta fis::km$ con 604 U/mg y 224 U/mg hubo una disminución de 2.7 veces las cuales si fueron significativas (Fig. 12), indicando que al entrar a la fase estacionaria Fis sigue teniendo un efecto en la fusión en ausencia de H-NS y Lrp.

La fusión *pleuO90* (Fig. 4.B) mostró una expresión de tan solo 20 U/mg en la silvestre, y al compararla con todas las mutantes se pudo observar que no hay diferencia significativa (Fig. 13), por lo que en esta fase de crecimiento no observamos regulación. De igual manera en la fusión *pleuO60* (Fig. 4.B) tuvo los

mismos niveles de expresión en todos los fondos analizados (Fig. 13), por lo que de igual manera que en la fusión anterior no se observa regulación.

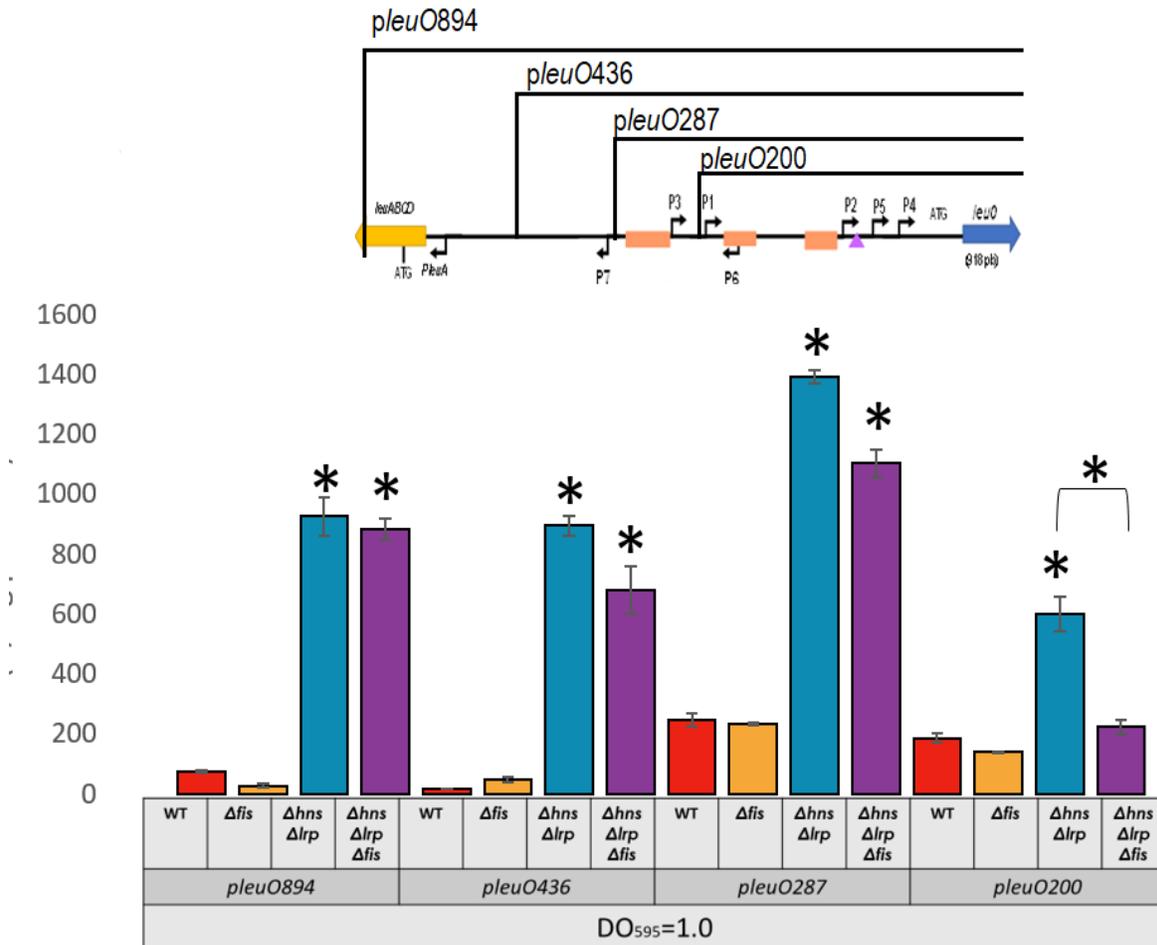


Fig. 12. Regulación de la expresión de las fusiones traducciónales *pleu0894*, *pleu0436*, *pleu0287* y *pleu0200* al entrar a la fase estacionaria ($DO_{595}=1.0$) en medio rico MN en la cepa silvestre (WT), $\Delta fis::km$, $\Delta hns \Delta lrp$ y $\Delta hns \Delta lrp \Delta fis::km$. Actividad media de tres experimentos independientes. *Datos significativamente diferentes a la cepa WT y a la $\Delta hns \Delta lrp$ ($P < 0.05$).

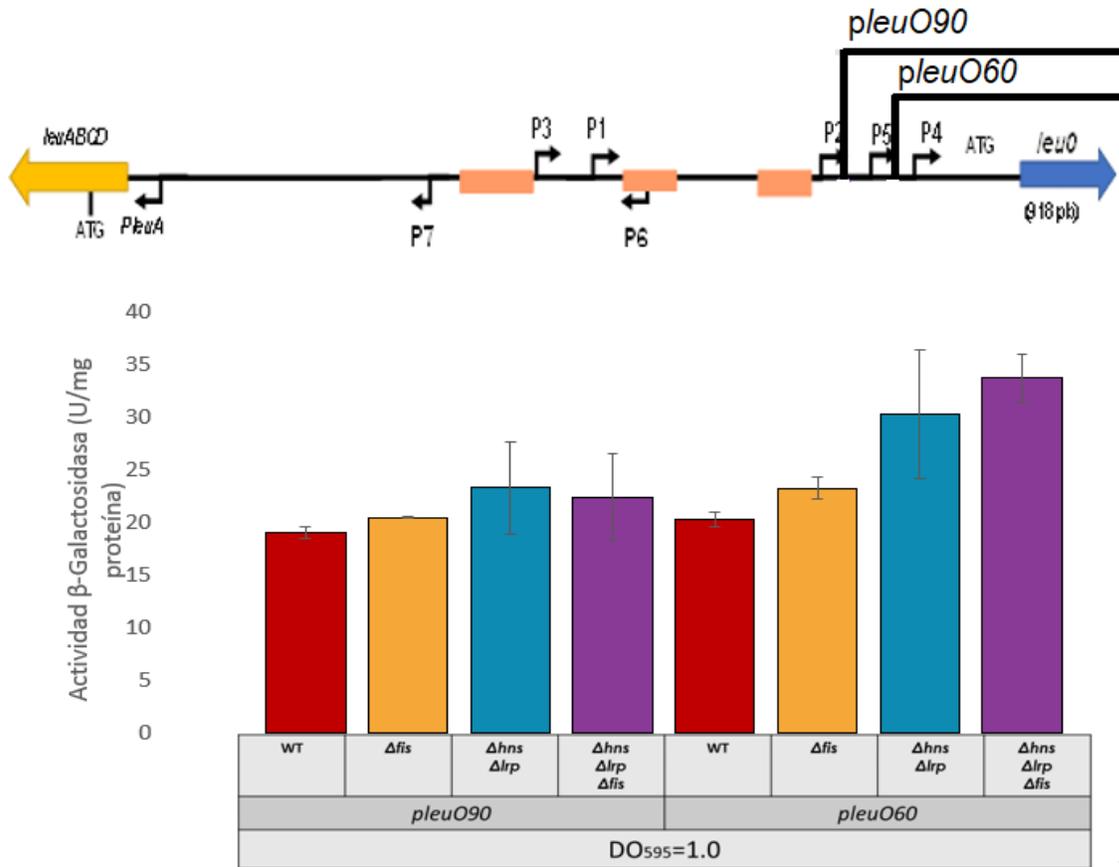


Fig. 13. Regulación de la expresión de las fusiones traduccionales *pleuO90* y *pleuO60* al entrar a la fase estacionaria ($DO_{595}=1.0$) en medio rico MN en la cepa silvestre (WT), $\Delta fis::km$, $\Delta hns \Delta lrp$ y $\Delta hns \Delta lrp \Delta fis::km$. Actividad media de tres experimentos independientes. *Datos significativamente diferentes a la cepa WT y a la $\Delta hns \Delta lrp$ ($P < 0.05$).

c) Fase Estacionaria tardía (DO₅₉₅=1.6)

En esta fase de crecimiento la fusión *pleuO894* (Fig. 4.B) el fondo silvestre y $\Delta fis::km$ dieron la misma actividad de 20 U/mg. De manera interesante, en esta fase de crecimiento sólo se pudo obtener actividad, además de los fondos sencillos, en el fondo doble mutante $\Delta hns\Delta lrp$, el cual tuvo 1008 U/mg, sin embargo no fue posible compararlo con el fondo triple mutante $\Delta hns\Delta lrp\Delta fis::km$ ya que los tiempos de cinética no fueron suficientes para que esta cepa alcanzara la densidad deseada (Fig. 14). Esto significa que, la triple mutante exhibe un defecto en el crecimiento de las fusiones *pleuO894*, *pleuO436* y *pleuO287* cómo se describe más adelante (Fig. 16).

La fusión *pleuO90* y *pleuO60* (Fig. 4.B) la expresión de la actividad fue muy parecida en el fondo silvestre, y comparado con sus respectivos fondos se mantuvieron en los mismos niveles de expresión, los cuales no fueron significativos. Por lo que en esta fase de crecimiento no observamos regulación por parte de las fusiones más cortas (Fig. 15).

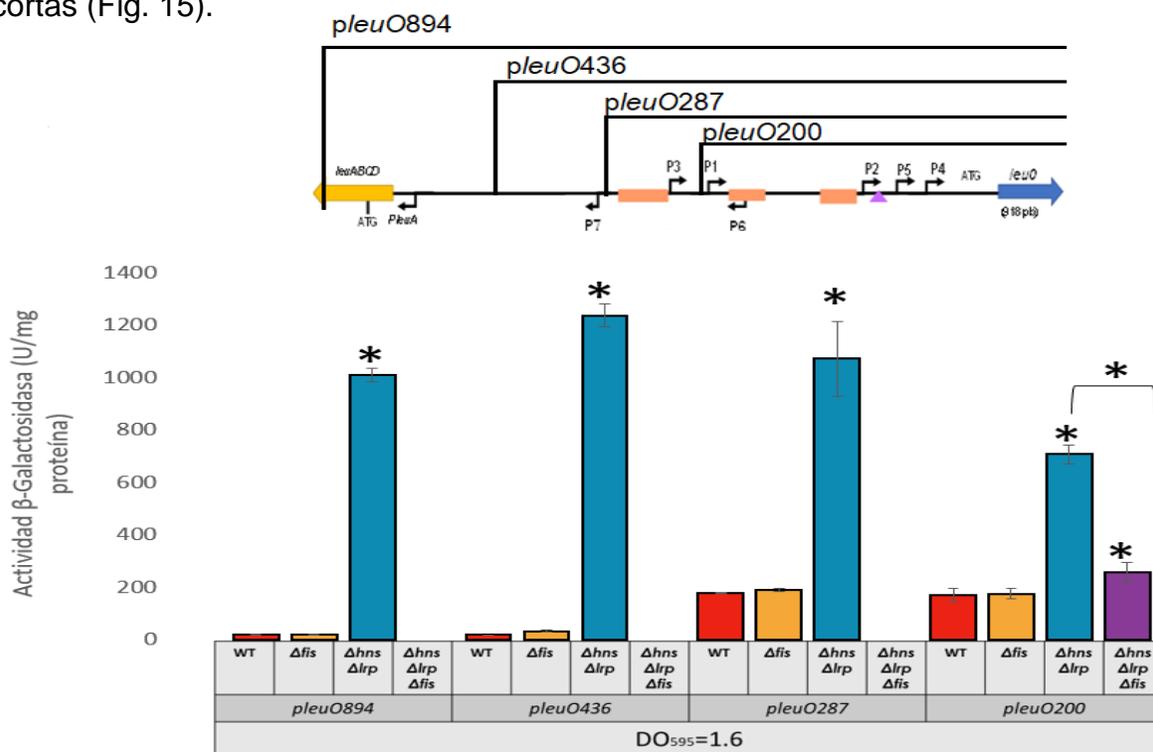


Fig. 14. Regulación de la expresión de las fusiones traducciónales *pleuO894*, *pleuO436*, *pleuO287* y *pleuO200* en la fase estacionaria (DO₅₉₅=1.6) en medio rico MN en la cepa silvestre (WT), $\Delta fis::km$, $\Delta hns\Delta lrp$ y $\Delta hns\Delta lrp\Delta fis::km$. Actividad media de tres experimentos independientes. *Datos significativamente diferentes a la cepa WT y a la $\Delta hns\Delta lrp$ (P<0.05).

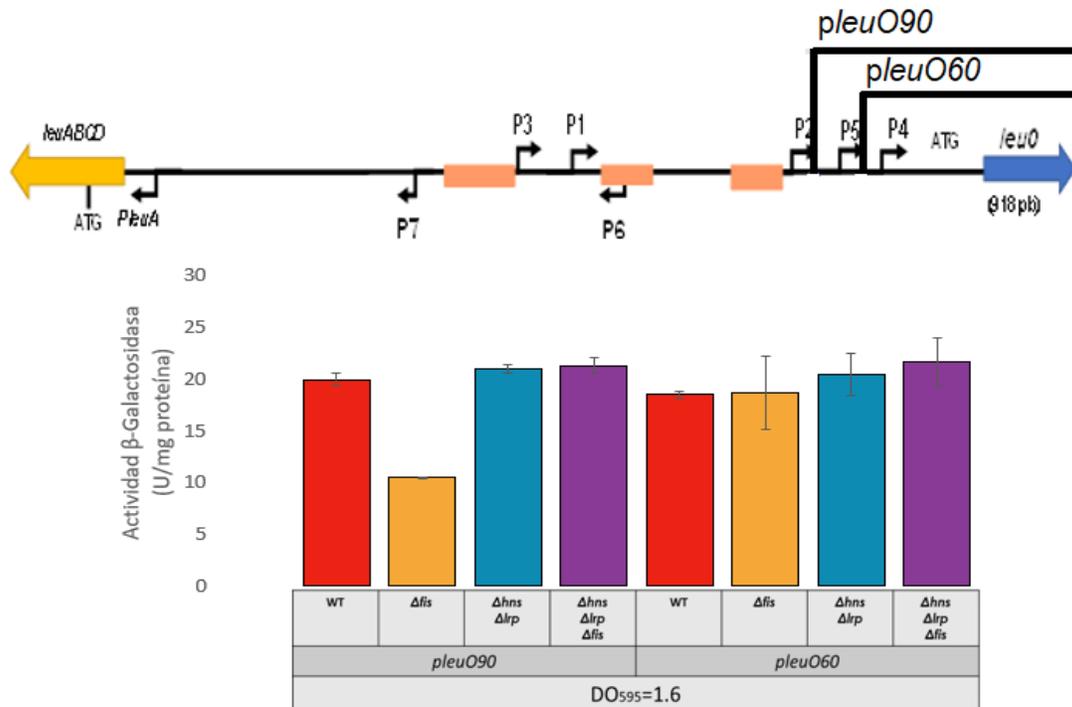


Fig. 15. Regulación de la expresión de las fusiones traducciónales *pleuO90* y *pleuO60* en la fase estacionaria ($DO_{595}=1.6$) en medio rico MN en la cepa silvestre (WT), $\Delta fis::km$, $\Delta hns \Delta lrp$ y $\Delta hns \Delta lrp \Delta fis::km$. Actividad media de tres experimentos independientes. *Datos significativamente diferentes a la cepa WT y a la $\Delta hns \Delta lrp$ ($P < 0.05$).

Cinética de crecimiento de las fusiones traducciónales de *leuO* en los distintos fondos genéticos para el análisis del regulador Fis.

Debido a que para tomar las muestras de la actividad se necesitaba seguir la cinética de crecimiento de las fusiones en los distintos fondos genéticos, se graficaron los tiempos por hora de cada fusión en sus distintas combinaciones de fondo para tener el registro de las mismas. De hecho, diferencias en las actividades de *leuO* podrían deberse a una compensación de los defectos en el metabolismo celular en las cepas mutantes y no necesariamente a una actividad directa del regulador en cuestión. Dichos defectos podrían causar las diferencias en las cinéticas de crecimiento observadas, y descritas a continuación.

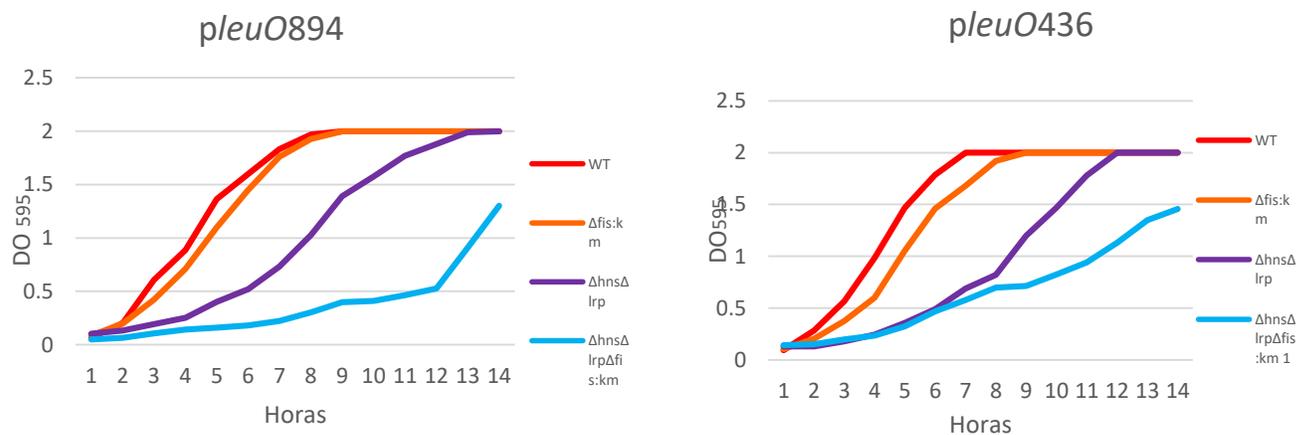
En la fusión *pleuO894* (Fig. 16) se observó que los fondos silvestre y $\Delta fis::km$ tienen tiempos de crecimiento muy parecidos, pues ambos alcanzaron una $DO_{595}= 2.0$ a

las 8 horas de cultivo, con un ligero retraso en la $\Delta fis::km$. Al comparar los fondos $\Delta hns\Delta lrp$ y $\Delta hns\Delta lrp\Delta fis::km$, en ambas cepas hubo un retraso de crecimiento más marcado, pues su tiempo de cultivo se alargó a más de 15 horas; sin embargo una diferencia fue que el fondo $\Delta hns\Delta lrp$ si alcanzó una $DO_{595} = 2.0$, pero no así el fondo $\Delta hns\Delta lrp\Delta fis::km$ que a los mismos tiempos de crecimiento no alcanzó una $DO_{595} = 1.6$ requerida para tomar la muestra de la actividad.

Para la fusión $pleuO436$ y $pleuO287$ ocurrió el mismo efecto que la fusión $pleuO894$ en el fondo silvestre y $\Delta fis::km$ (Fig. 16). Ambos alcanzaron una $DO_{595} = 2.0$ a las 8 horas de cultivo, con un ligero retraso en la $\Delta fis::km$; en las mutantes dobles y triples se alargó el crecimiento a más de 15 horas; en donde la $\Delta hns\Delta lrp$ si alcanzó una $DO_{595} = 2.0$ pero no así el fondo $\Delta hns\Delta lrp\Delta fis::km$ que no llegó a una $DO_{595} = 1.6$ requerida para tomar la muestra de la actividad.

En la fusión $pleuO200$ el fondo silvestre, $\Delta fis::km$ y $\Delta hns\Delta lrp$ mantuvieron el mismo efecto; de manera interesante en esta fusión para el fondo $\Delta hns\Delta lrp\Delta fis::km$ los tiempos de crecimiento sí permitieron llegar a una $DO_{595} = 2.0$ a las 14 horas de crecimiento (Fig. 16) y por tanto tomar la muestra para el ensayo de actividad.

Por último, para las fusiones más cortas $pleuO90$ y $pleuO60$ los tiempos de crecimiento se redujeron en todos los fondos, pues todos llegaron a una $DO_{595} = 2.0$ en 12 horas (Fig. 16). Conservando los efectos observados en los fondos, como en las fusiones anteriores.



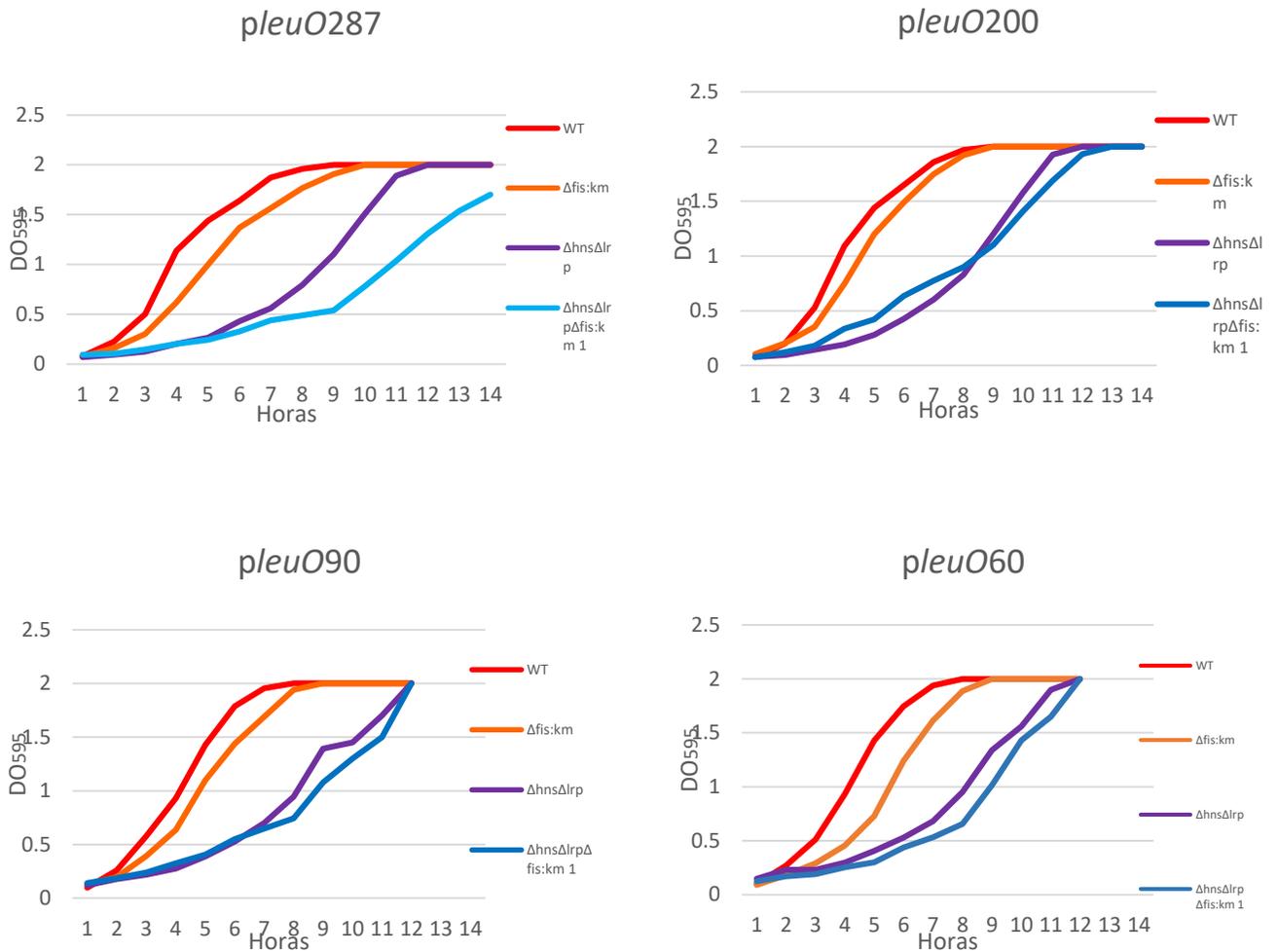


Fig. 16. Cinética de crecimiento de las fusiones traduccionales de *leuO* a lo largo del crecimiento en los distintos fondos genéticos de la cepa IMSS 1 (WT y derivadas) para el análisis del regulador Fis.

7.3 Efecto de la región reguladora de *leuO* analizando el regulador OmpR.

El efecto del regulador OmpR sobre la región reguladora de *leuO*, se analizó utilizando únicamente los fondos genéticos WT y Δ ompR::*km*, sobre cada una de las fusiones traduccionales (Tabla 3.). La realización del fondo genético Δ hns Δ lrp Δ ompR::*km* por la técnica de mutagénesis dirigida por recombinación homóloga (Datsenko et al., 2000) no ha sido viable, sin embargo se siguen estableciendo estrategias para su caracterización.

Actividad Beta-Galactosidasa de las fusiones traduccionales de *leuO* a lo largo del crecimiento

Al analizar los fondos silvestre WT y $\Delta ompR::km$ en las fusiones (Fig. 4.B) a una $DO_{595}=0.6$ se observó que ninguna de las fusiones tuvo un efecto, indicándonos que la mutación por sí sola de *ompR* no es capaz de estimular la regulación de las fusiones (Fig. 17). Se midió la actividad en fase estacionaria temprana y tardía, y se observó el mismo efecto para todos los casos (datos no mostrados).

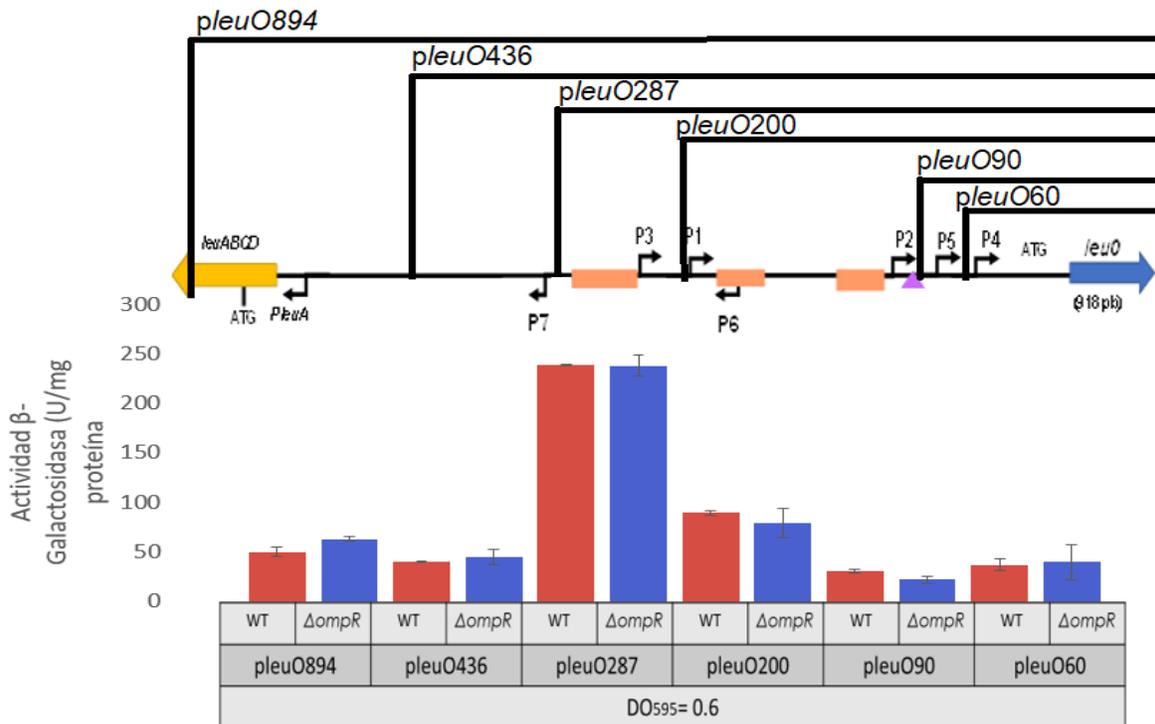


Fig. 17. Regulación de la expresión de las fusiones traduccionales a *leuO* en fase exponencial ($DO_{595}=0.6$) en medio rico MN en la cepa silvestre (WT), $\Delta ompR::km$. Actividad media de tres experimentos independientes. *Datos significativamente diferentes a la cepa WT ($P<0.05$).

Cinética de crecimiento de las fusiones traduccionales de *leuO* con las cepas WT y *ompR*

Para la toma de las muestras de la actividad se siguió la cinética de crecimiento de las fusiones en los fondos genéticos silvestre y *ompR*; se graficaron los tiempos por hora de cada fusión para tener el registro de las mismas y poder observar algún cambio en el crecimiento que estuviera ligado por la ausencia del regulador *OmpR*.

De acuerdo a la figura 18 las gráficas que contienen las fusiones *pleuO894*, *pleuO436* y *pleuO287*, presentaron la misma cinética de crecimiento en los fondos silvestre y $\Delta ompR::km$, lo que indica que en estas fusiones la ausencia de OmpR no altera el crecimiento. Al analizar las fusiones *pleuO200*, *pleuO90* y *pleuO60* se observó que la cinética de crecimiento del fondo $\Delta ompR::km$ alcanzaba más rápido la fase exponencial y la fase estacionaria temprana, con un ligero retardamiento en el fondo silvestre; estos datos sugieren que la ausencia de OmpR mejora el crecimiento durante la fase exponencial y a la entrada de la fase estacionaria.

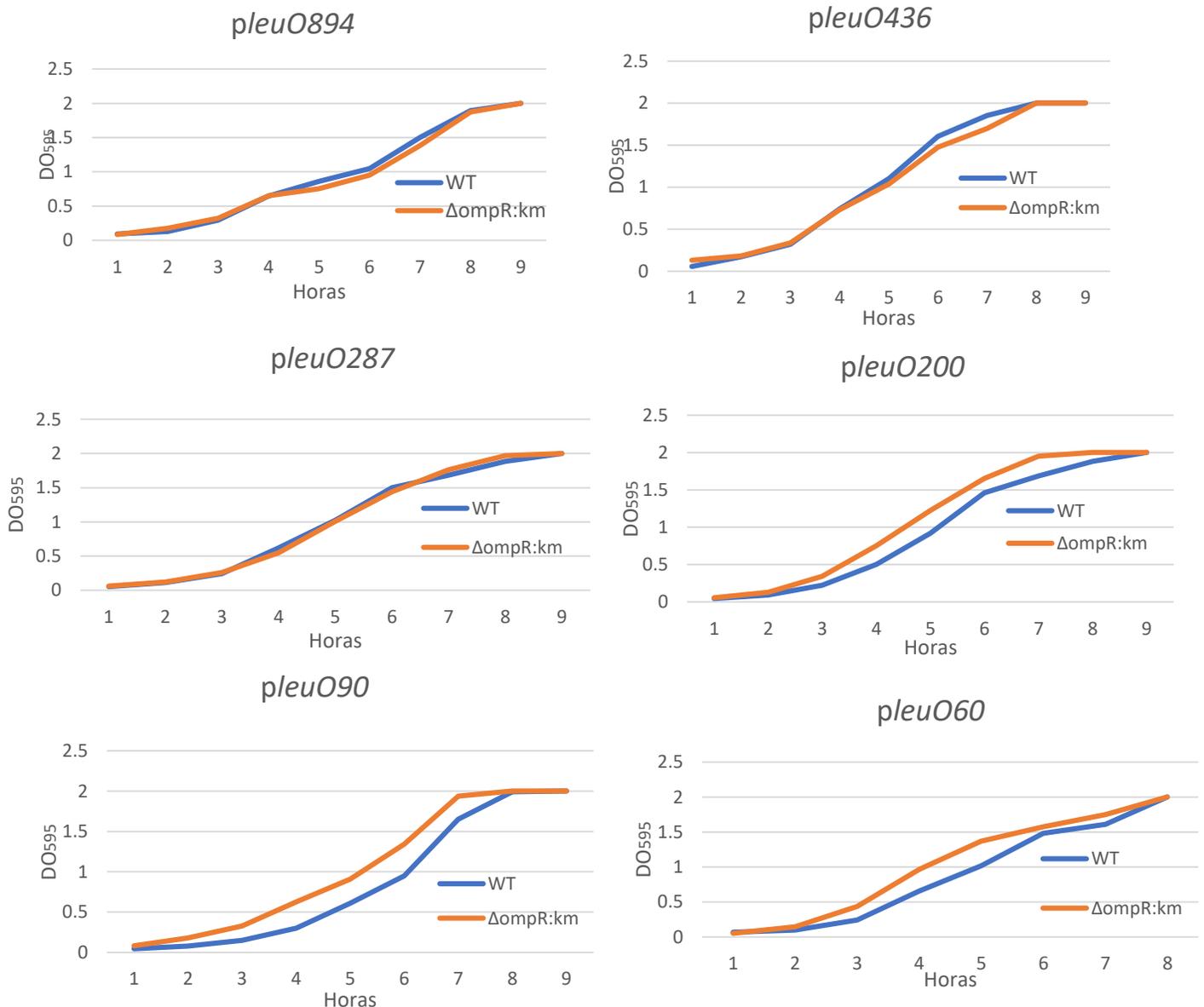


Fig. 18. Cinética de crecimiento de las fusiones traduccionales de *leuO* a lo largo del crecimiento en los distintos fondos genéticos de la cepa IMSS 1 (WT y derivadas) para el análisis del regulador OmpR.

7.4 Efecto de la región reguladora de *leuO* analizando el regulador ArcA

El análisis del papel que tiene el regulador ArcA sobre la región reguladora de *leuO*, se realizó utilizando los fondos genéticos silvestre (WT), $\Delta arcA::km$, $\Delta hns\Delta lrp$ y $\Delta hns\Delta lrp\Delta arcA::km$ sobre cada una de las fusiones traduccionales (Tabla 3.) y ver el efecto que tuviesen en cada uno.

Actividad Beta-Galactosidasa de las fusiones traduccionales de *leuO* a lo largo del crecimiento.

a) Fase Exponencial ($DO_{595}=0.6$)

Para la fusión *p_{leuO894}* la cual contiene la región promotora completa (Fig. 4), se observó que en esta fase del crecimiento el fondo silvestre generó una actividad de 50 U/mg y en el fondo mutante sencillo $\Delta arcA::km$ una actividad de 44 U/mg, los cuales no fueron significativos entre sí, y por tanto no hay un efecto de ArcA por sí solo en la fusión. Al analizar los fondos doble mutante $\Delta hns\Delta lrp$ y triple mutante $\Delta hns\Delta lrp\Delta arcA::km$ que dieron una actividad de 783 U/mg y 237 U/mg respectivamente hubo una diferencia de 3.3 veces, los cuales si fueron significativos entre sí y por tanto indicaron que en la fusión *p_{leuO894}* ArcA tiene un efecto positivo en ausencia de H-NS y Lrp (Fig. 19).

En la fusión *p_{leuO436}* (Fig. 4.B) el fondo silvestre como el $\Delta arcA::km$ tuvieron actividades que no fueron significativas demostrando que la ausencia de ArcA no tenía un efecto en la fusión. Al comparar los fondos $\Delta hns\Delta lrp$ con una actividad de 564 u/mg y $\Delta hns\Delta lrp\Delta arcA::km$ con una actividad de 320 U/mg, hubo una disminución significativa de 244 unidades, indicando que a fase exponencial ArcA tiene un efecto positivo sobre la expresión de esta fusión en ausencia de H-NS y Lrp (Fig. 19).

Al analizar la fusión *p_{leuO287}*, la cual se deriva de un recorte de 507 pb menos de la fusión completa, pero que conserva todos sus promotores (Fig. 4.B), en el fondo silvestre tuvo una actividad de 233 U/mg y en el fondo $\Delta arcA::km$ tuvo una actividad de 215 U/mg las cuales no fueron significativas; indicando que ArcA por sí solo no tiene efecto sobre la actividad de la fusión. En la mutante $\Delta hns\Delta lrp$ mostró una

actividad de 831 U/mg mientras que la mutante triple $\Delta hns\Delta lrp\Delta arcA::km$ fue de 305 U/mg, siendo una disminución significativa de 2.7 veces. Estos datos son importantes ya que indican que aun con el recorte ArcA modula la expresión de la fusión al no estar H-NS y Lrp presentes (Fig. 19).

Al analizar la expresión de la fusión $pleuO200$ que solo contiene tres promotores (2,4 y 5) (Fig. 4.B), en los fondos silvestre y $\Delta arcA::km$ la actividad fue similar entre ellas y por tanto no hubo un efecto; sin embargo al comparar los fondos $\Delta hns\Delta lrp$ y $\Delta hns\Delta lrp\Delta arcA::km$ se observó una disminución de 7 veces en la actividad. Estos datos nos demostraron que ArcA sigue teniendo un efecto positivo en ausencia de H-NS y Lrp (Fig. 19) aun con el recorte y la ausencia de los promotores 1 y 3.

La fusión $pleuO90$ la cual contiene sólo los promotores 4 y 5 generó una actividad basal de tan solo 15 U/mg en el fondo silvestre, la cual fue igualmente baja respecto a las demás mutantes (Fig. 20), y que por tanto no fueron significativas. Resultados similares se obtuvieron para la fusión $pleuO60$ (Fig. 20). Esta información nos indicó que para las fusiones mas cortas ArcA no tiene un efecto sobre las mismas.

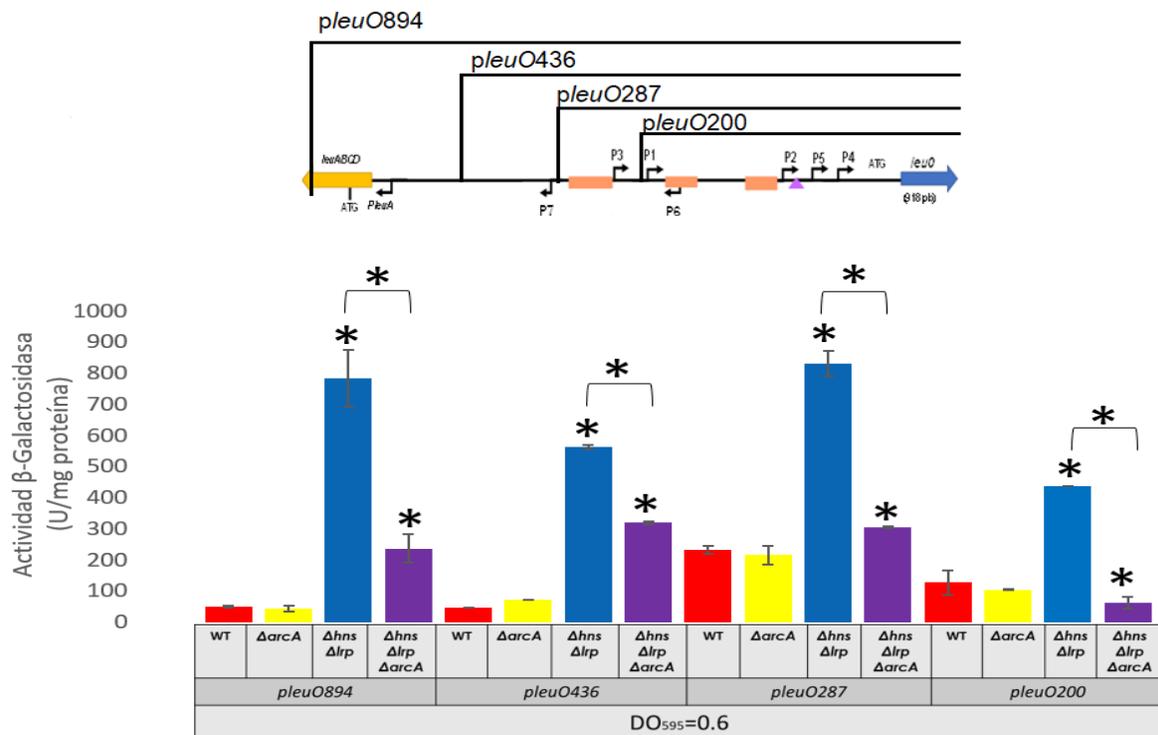


Fig. 19. Regulación de la expresión de las fusiones traduccionales $pleuO894$, $pleuO436$, $pleuO287$ y $pleuO200$ de *leuO* en fase exponencial (DO₅₉₅=0.6) en medio rico MN en la cepa silvestre (WT), $\Delta arcA::km$, $\Delta hns\Delta lrp$ y $\Delta hns\Delta lrp\Delta arcA::km$. Actividad media de tres experimentos independientes. *Datos significativamente diferentes a la cepa WT y a la $\Delta hns\Delta lrp$ (P<0.05).

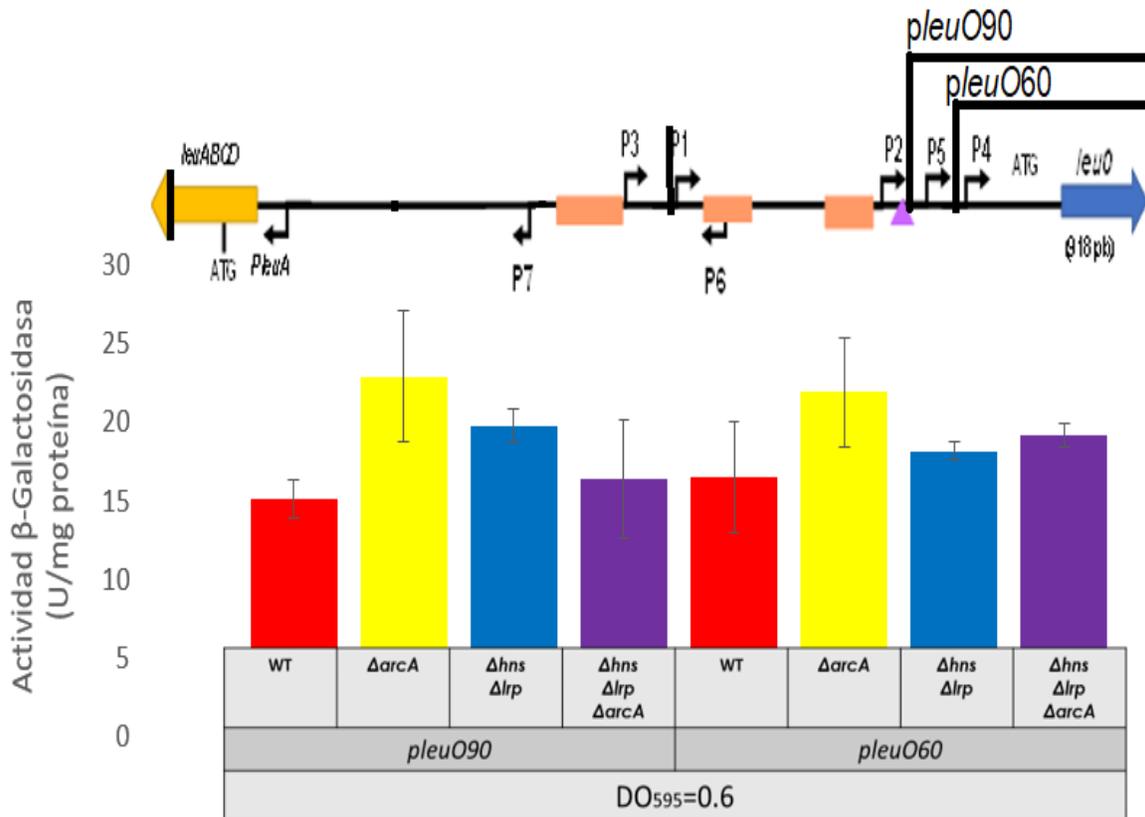


Fig. 20. Regulaci3n de la expresi3n de las fusiones traducci3nales *pleu090* y *pleu060* en fase exponencial ($DO_{595}=0.6$) en medio rico MN en la cepa silvestre (WT), $\Delta arcA::km$, $\Delta hns \Delta lrp$ y $\Delta hns \Delta lrp \Delta arcA::km$. Actividad media de tres experimentos independientes. *Datos significativamente diferentes a la cepa WT y a la $\Delta hns \Delta lrp$ ($P < 0.05$).

b) Fase estacionaria temprana ($DO_{595}=1.0$).

La fusi3n *pleu0894* (Fig 4.B) al entrar a la fase estacionaria el fondo silvestre tuvo una actividad de 55 U/mg, al compararlo con el fondo sencillo $\Delta arcA::km$ no hubo diferencia significativa, sugiriendo que ArcA por s3 solo no es capaz de regular la fusi3n. El fondo $\Delta hns \Delta lrp$ mostr3 un aumento significativo de 15 veces respecto del fondo silvestre confirmando el papel negativo de H-NS y Lrp; sin embargo no fue posible compararlo con la a fusi3n $\Delta hns \Delta lrp \Delta arcA::km$ debido a que la cin3tica de crecimiento no permiti3 la recolecci3n de la muestra (Fig. 22). La fusi3n *pleu0436* mostr3 el mismo efecto que la fusi3n anterior en donde no hubo una diferencia significativa entre las actividades de los fondos silvestre y $\Delta arcA::km$, adem3s que

los tiempos de cinética no permitieron la recolección de la muestra del fondo $\Delta hns\Delta lrp\Delta arcA::km$ para hacer la respectiva comparación con el fondo doble mutante (datos no mostrados).

Al analizar la fusión $pleuO287$ (Fig. 4.B) en el fondo silvestre y $\Delta arcA::km$ tuvieron unidades de actividad muy parecidas; sin embargo en los fondos $\Delta hns\Delta lrp$ y $\Delta hns\Delta lrp\Delta arcA::km$ hubo una diferencia significativa de 2.2 veces (Fig. 21.A); por lo que estos datos nos indican que al entrar a la fase estacionaria ArcA sigue regulando positivamente la fusión $pleuO287$ al no estar presente H-NS y Lrp.

La fusión $pleuO200$ (Fig. 4.B) al igual que la fusión anterior no mostró diferencia significativa entre los fondos silvestre y $\Delta arcA::km$, pero sí en los fondos $\Delta hns\Delta lrp$ y $\Delta hns\Delta lrp\Delta arcA::km$ pues tuvieron actividades de 754 U/mg y 182 U/mg respectivamente, con una disminución significativa de 4 veces (Fig. 21.A); es decir que al entrar a la fase estacionaria ArcA sigue manteniendo un efecto positivo en la fusión en ausencia de H-NS y Lrp.

Para las fusiones $pleuO90$ y $pleuO60$ (Fig. 4.B) se siguió observando el mismo comportamiento que en la fase exponencial, en donde ningún fondo mutante tuvo una diferencia significativa respecto a la silvestre (datos no mostrados).

c) Fase Estacionaria tardía ($DO_{595}=1.6$)

En esta fase de crecimiento la fusión $pleuO894$ y $pleuO436$ (Fig. 4.B) el fondo silvestre y $\Delta arcA::km$ dieron la misma actividad, y solo se pudo obtener el valor de la doble mutante pero no así el valor de la actividad de la triple mutante debido a que los tiempos de cinética no permitieron la recolección de la muestra para la actividad (Fig. 22). La fusión $pleuO287$ y $pleuO200$ (Fig. 4.B) sí presentaron diferencias significativas analizando la doble mutante $\Delta hns\Delta lrp$ con la triple $\Delta hns\Delta lrp\Delta arcA::km$ demostrando el papel positivo de ArcA en ausencia de H-NS y Lrp (Fig 21.B). Por ultimo en las fusiones $pleuO90$ y $pleuO60$ la actividad del fondo silvestre fue similar a los demás fondos, indicando que a esta fase de crecimiento no hay regulación por parte de ArcA (datos no mostrados).

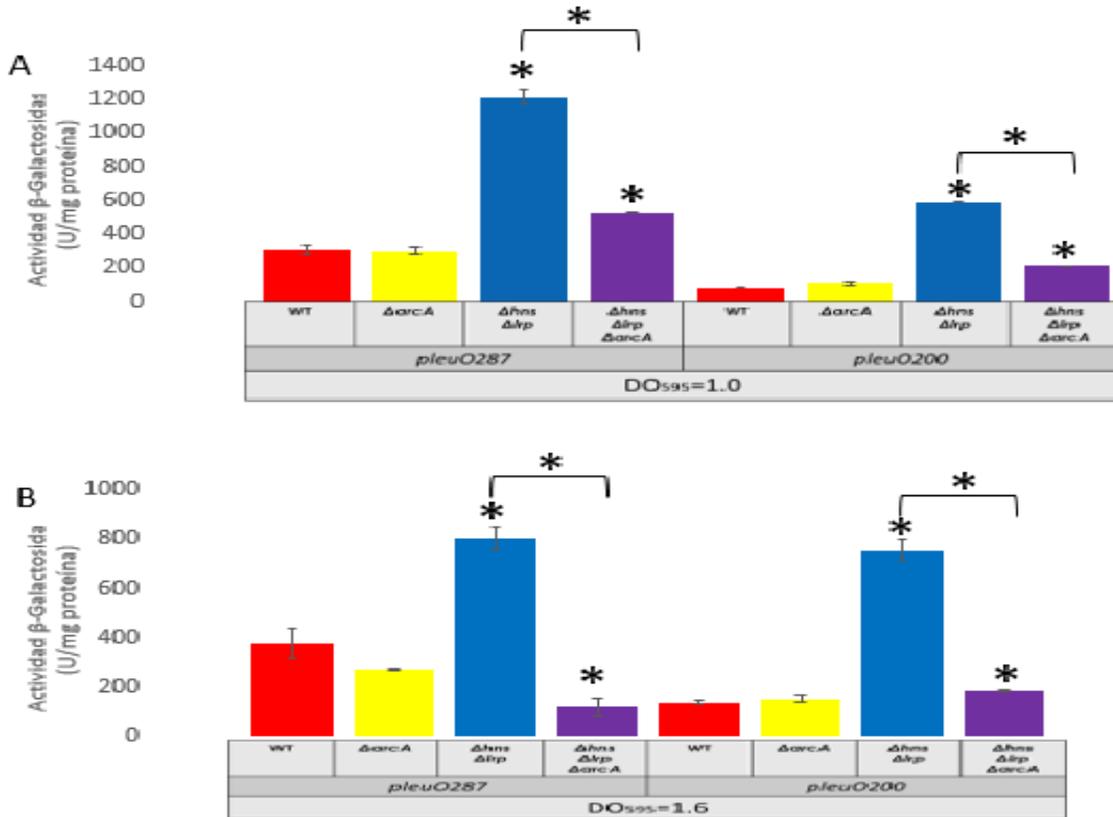
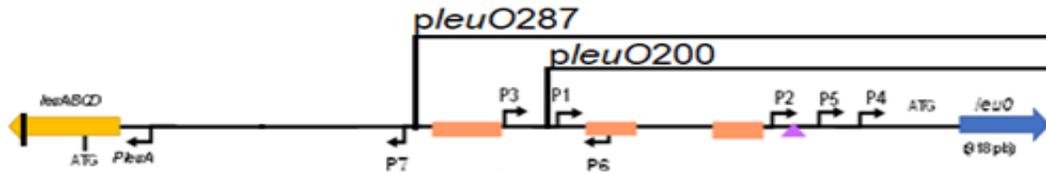


Fig. 21. A. Regulación de la expresión de las fusiones traducciónales *pleuO287* y *pleuO200* al entrar a la fase estacionaria ($DO_{595}=1.0$) en medio rico MN en la cepa silvestre (WT), $\Delta arcA::km$, $\Delta hns\Delta lrp$ y $\Delta hns\Delta lrp\Delta arcA::km$. B. Regulación de la expresión de las fusiones traducciónales *pleuO287* y *pleuO200* en fase estacionaria ($DO_{595}=1.6$) en medio rico MN en la cepa silvestre (WT), $\Delta arcA::km$, $\Delta hns\Delta lrp$ y $\Delta hns\Delta lrp\Delta arcA::km$. Actividad media de tres experimentos independientes. *Datos significativamente diferentes a la cepa WT y a la $\Delta hns\Delta lrp$ ($P < 0.05$).

Cinética de crecimiento de las fusiones traducciónales de *leuO* en los distintos fondos genéticos.

Para la toma de las muestras de la actividad se necesitó seguir la cinética de crecimiento de las fusiones en los distintos fondos genéticos, y se graficaron los tiempos por hora de cada fusión en sus distintas combinaciones de fondo para tener

el registro de las mismas; además de que proporcionó información valiosa del efecto que las mutaciones podían tener sobre el crecimiento de la bacteria.

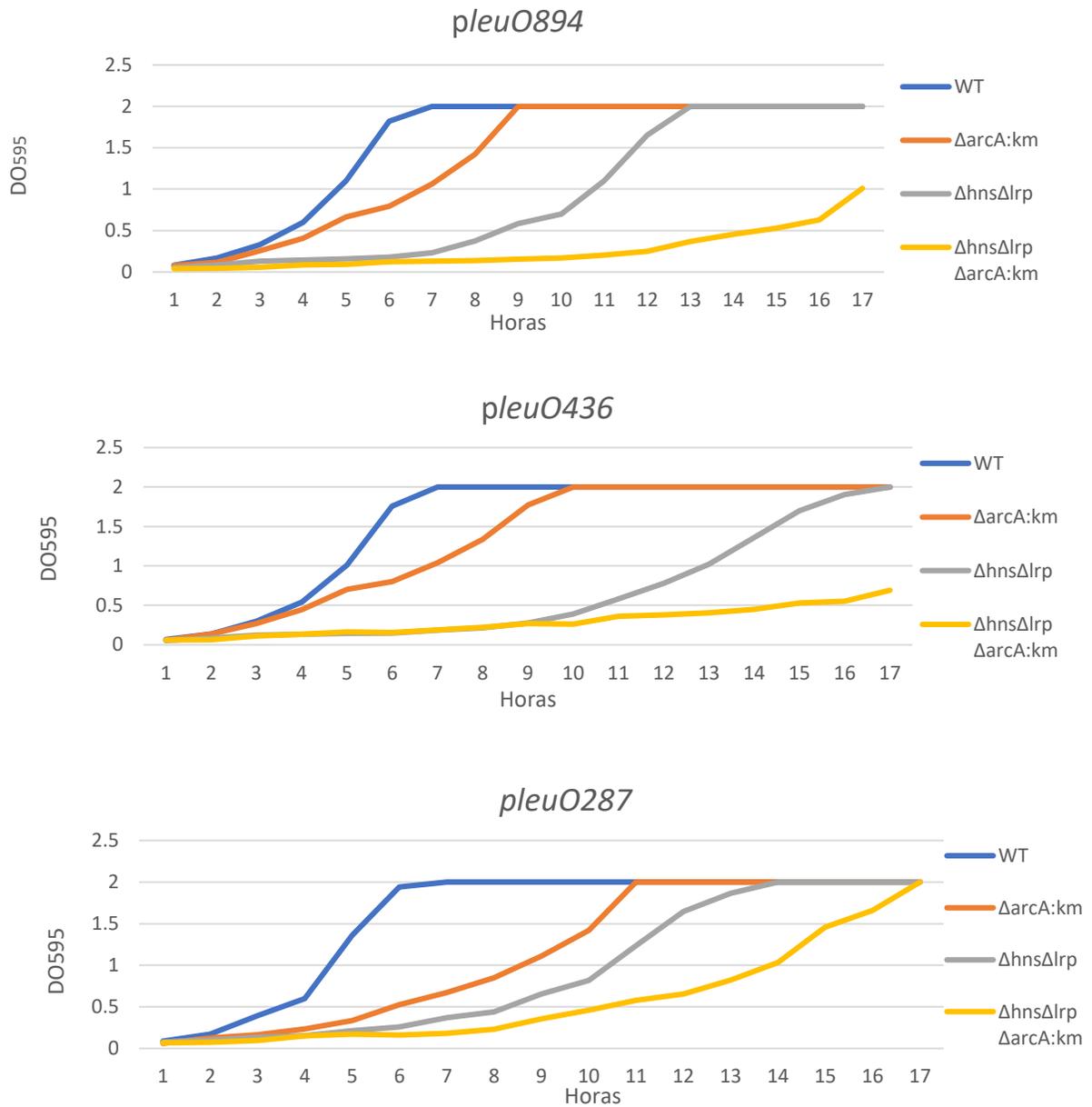
En la fusión *pleuO894* (Fig. 22) se observó que los fondos silvestre y $\Delta arcA::km$ tienen tiempos de crecimiento parecidos, sin embargo hubo un ligero retardo en el crecimiento de la mutante sencilla $\Delta arcA::km$, pues mientras que el fondo silvestre llegó a una $DO_{595} = 2.0$ a las 8 horas de cultivo, $\Delta arcA::km$ llegó a la misma densidad a las 10 horas de cultivo. Al comparar los fondos $\Delta hns\Delta lrp$ y $\Delta hns\Delta lrp\Delta arcA::km$, en ambas cepas hubo un retraso más marcado del crecimiento, pues su tiempo de cultivo se alargó a más de 12 horas; el fondo $\Delta hns\Delta lrp$ sí alcanzó una $DO_{595} = 2.0$ a las 13 horas de cultivo pero no así el fondo $\Delta hns\Delta lrp\Delta arcA::km$ que a las 17 horas de crecimiento (los cuales se consideraron para realizar la cinética), no alcanzó una $DO_{595} = 1.6$ requerida para tomar la muestra de la actividad.

Para la fusión *pleuO436* ocurrió el mismo efecto que en la fusión anterior en los fondos analizados. El fondo silvestre y $\Delta arcA::km$ llegaron a una $DO_{595} = 2.0$ a las 9 horas de cultivo con un ligero retraso en la $\Delta arcA::km$; por otro lado en las mutantes dobles y triples se alargó el crecimiento a más de 15 horas, donde la $\Delta hns\Delta lrp$ sí alcanzó una $DO_{595} = 2.0$ y la $\Delta hns\Delta lrp\Delta arcA::km$ alcanzó apenas una $DO_{595} = 0.6$ a las 17 horas de crecimiento.

En la fusión *pleuO287* en el fondo silvestre y $\Delta arcA::km$ ambos alcanzaron una $DO_{595} = 2.0$ a las 10 horas de cultivo con un ligero retraso en la $\Delta arcA::km$; la doble mutante alcanzó una $DO_{595} = 2.0$ a las 13 horas de crecimiento e interesantemente a diferencia de las fusiones anteriores en el fondo $\Delta hns\Delta lrp\Delta arcA::km$ llegó a una $DO_{595} = 2.0$ a las 17 horas de crecimiento.

En la fusión *pleuO200* ocurrió el mismo efecto que la fusión *pleuO287*; el fondo silvestre y $\Delta arcA::km$ llegaron a una $DO_{595} = 2.0$ a las 10 horas de crecimiento con el retardo en la mutante sencilla; la mutante $\Delta hns\Delta lrp$ llegó a una $DO_{595} = 2.0$ a las 14 horas de crecimiento, mientras que la $\Delta hns\Delta lrp\Delta arcA::km$ alcanzó la misma densidad a las 16 horas de crecimiento.

Por último para las fusiones más cortas *pleu090* y *pleu060* los tiempos de crecimiento fueron muy parecidas entre ellas conservando en cada fusión (con sus respectivos fondos) los efectos de las fusiones anteriores (*pleu0287* y *pleu0200*), es decir que redujeron en todos los fondos, pues todos llegaron a una $DO_{595} = 2.0$ en 12 horas.



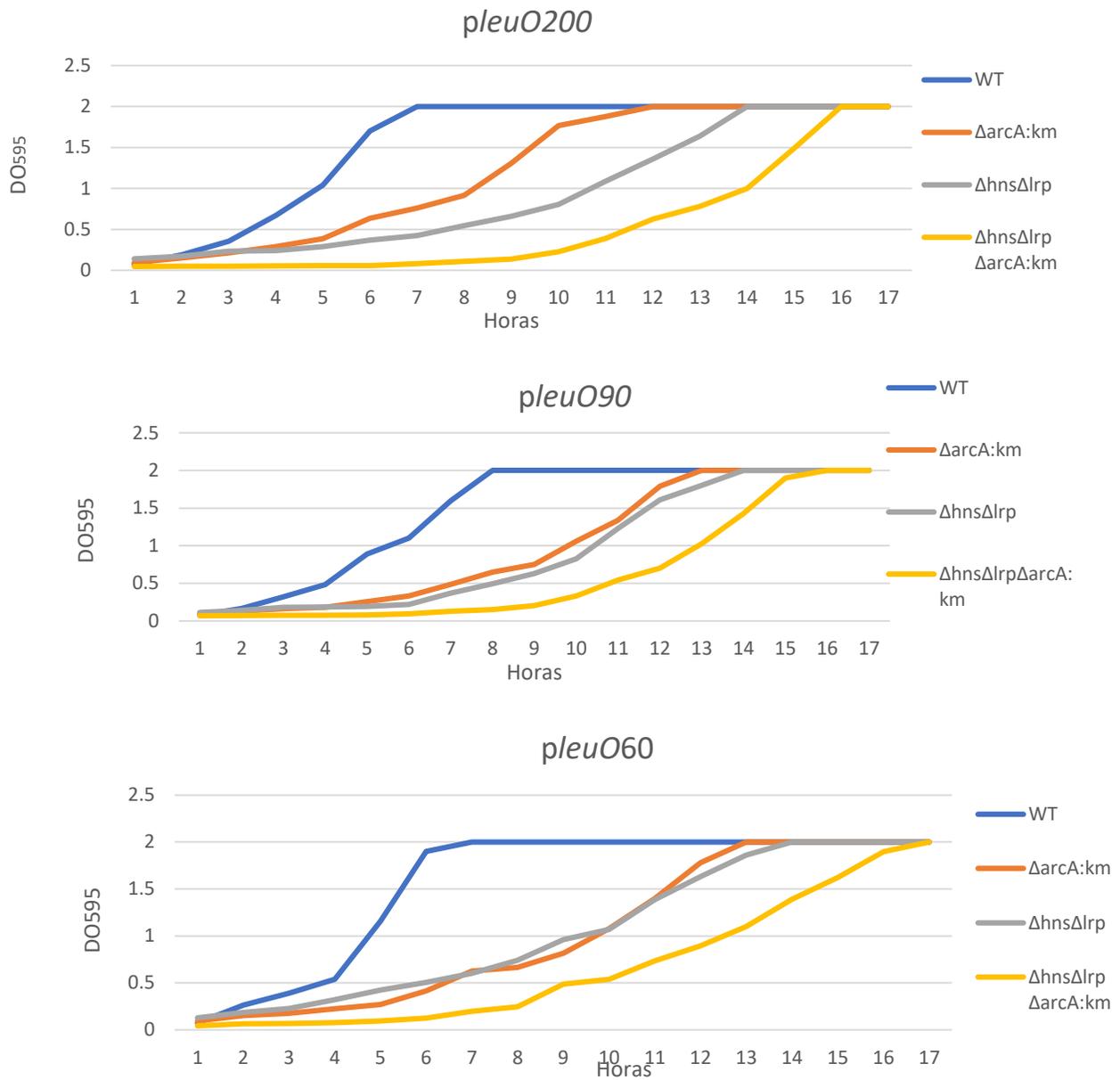


Fig. 22. Cinética de crecimiento de las fusiones traduccionales a *leuO* a lo largo del crecimiento en los distintos fondos genéticos para el regulador ArcA.

8. Discusión.

El objetivo del presente estudio fue conocer la influencia de los reguladores Fis, OmpR y ArcA en la expresión de *leuO* en *S. Typhi* en ausencia de sus principales moduladores negativos H-NS y Lrp, esto a través de la generación de triples mutantes que carecieran de los genes *hns*, *lrp* y el regulador a analizar (*fis*, *arcA* y *ompR*). Con base en los resultados obtenidos a través de las fusiones traduccionales en los diferentes fondos genéticos para cada regulador, se obtuvo información acerca de la regulación que ejerce el regulador Fis, OmpR y ArcA sobre el gen de *leuO* de *S. Typhi*.

Generación de triples mutantes $\Delta hns\Delta lrp\Delta$ regulador por inactivación de un paso por recombinación homóloga.

La generación de triples mutantes por recombinación homóloga fue de gran utilidad debido a las facilidades metodológicas de la técnica (Datsenko et al., 2000). El principio de la técnica está basado en el sistema Red que proviene del fago λ , el cual codifica sus propios sistemas de recombinación homóloga. El sistema Red incluye tres genes: γ , β y *exo*, cuyos productos son Gam, Bet y Exo (Murphy, K. C, 1998). Gam es la encargada de inhibir a la exonucleasa V endógena del sistema RecBCD permitiendo así la entrada a la célula de un fragmento lineal de ADN, para que posteriormente Bet y Exo puedan acceder a los extremos del ADN a recombinar. En este sentido la estrategia experimental es reemplazar una secuencia cromosómica de un gen específico con un gen de resistencia a un antibiótico seleccionable que se genera por PCR, y la construcción de oligonucleótidos que tengan extensiones de 36 nucleótidos (H1 y H2) que pertenecen al gen a remover, y otra extensión de nucleótidos (P1 y P2) que pertenecen al gen de resistencia (Fig. 7) (Datsenko et al., 2000).

Basado en lo anterior, se lograron obtener por recombinación homóloga dos cepas triples mutantes: $\Delta hns\Delta lrp\Delta fis::km$ y $\Delta hns\Delta lrp\Delta arcA::Km$, a partir del fondo genético doble mutante $\Delta hns \Delta lrp$, el cual se utilizó como ADN molde para quitar los genes del regulador en cuestión (*fis* y *arcA*) (Fig. 8). Una vez que se obtuvieron las colonias que tuvieran la triple mutación, se tenía que eliminar el plasmido pKD46 que

contenia el sistema Red; el plasmido pKD46 (Fig. 7) tiene un origen de replicación que es termosensible fácilmente a 43°C además de que es resistente a Ampicilina. Esto fue favorable para que metodológicamente se pudieran escoger colonias que crecieran a 37°C (temperatura óptima de crecimiento de *S. Typhi*) y que solo fueran resistentes al antibiótico Km que proviene de la mutación del gen del regulador a estudiar (*fis* y *arcA*).

La caracterización genética por PCR de los fragmentos que corresponden a los insertos de las mutaciones (*hns*, *lrp*, *fis* y *arcA*) de las nuevas cepas triples mutante $\Delta hns\Delta lrp\Delta fis::km$ y $\Delta hns\Delta lrp\Delta arcA::Km$ fue practica ya que solo se necesitó un par de oligonucleotidos para cada gen regulador (*hns*, *lrp*, *fis* y *arcA*). Esto se debe a que los oligonucleótidos son externos al gen en cuestión y por tanto amplificaron fragmentos de tamaño específico, haciendo la comparación del tamaño del gen silvestre y el gen mutado (Fig. 9.A-D).

De acuerdo a Datsenko y cols. (2000), se diseñaron juegos de oligonucleótidos (K1 y K2) que estuvieran dentro del gen de resistencia a Km en el plasmido pKD4, esto con el fin de que una vez que se obtuviera la recombinación, se verificara la estructura de la mutación con estos oligos, además de los oligonucleotidos externos para cada regulador (*fis* y *arcA*). La figura 9. E y F muestran los fragmentos amplificados con las diferentes combinaciones de oligonucleótidos para cada mutación ($\Delta fis::Km$ y $\Delta arcA::Km$), debido a que los oligonucleótidos K1 y K2 tienen diferentes posiciones dentro del cassette de Km, los insertos amplificados tuvieron tamaños específicos que ayudaron a verificar cada mutación.

Para el caso del regulador OmpR en el cual a partir de un fondo genético doble mutante $\Delta hns\Delta lrp$ y el inserto $\Delta ompR::Km$ no se ha podido obtener su caracterización, se han planteado estrategias experimentales que puedan favorecer dicha caracterización, como lo es utilizar un fondo genético doble mutante $\Delta hns\Delta ompR::Km$ y a partir de esta cepa mutar el gen *lrp*. Esta alternativa se deriva del hecho de que el inserto $\Delta ompR::Km$ dentro de la cepa doble mutante $\Delta hns\Delta lrp$ no recombina y se mantiene el gen silvestre; esto se comprobó al momento de realizar la caracterización genética de la mutación $\Delta ompR::Km$ ya que los fragmentos

amplificados que correspondían a la mutación tenían el mismo peso que el control del gen silvestre. Otra alternativa es que a partir del fondo doble mutante $\Delta hns\Delta lrp$ inducir la expresión de *ompR* en un vector que sea compatible con los plásmidos que contienen las fusiones de *leuO* derivados del plásmidos pMC1871 (Tabla 2.)

Efecto de Fis en las fusiones traduccionales de *leuO* a lo largo del crecimiento.

Los datos obtenidos de las fusiones para *leuO* son de gran importancia, debido a que hasta este momento no se tiene conocimiento de trabajos previos estudiando la regulación de *leuO* mediada por Fis; por lo anterior estos resultados representan un nuevo camino en el entendimiento de la regulación de *leuO* en *S. Typhi*.

El estudiar el fondo $\Delta fis::km$ y $\Delta hns\Delta lrp\Delta fis::km$ permitió saber el efecto positivo que el regulador Fis tiene sobre las fusiones en nuestro modelo de estudio *S. Typhi*; ya que está muy bien caracterizado que Fis es un regulador dual que puede actuar tanto como activador como represor en *E. coli* y *S. Typhimurium* (Grainger et al., 2008, Cameron et al., 2011 y Wang et al., 2015). La información que obtuvimos es muy importante ya que indica que Fis para que tenga un efecto positivo sobre *leuO* es necesario la ausencia tanto de H-NS como Lrp como sus principales moduladores negativos, pues las actividades nos mostraron que la mutación sencilla en *fis* no tiene un efecto. Esta regulación ya había sido vista anteriormente por Sánchez-Popoca en el 2018, en donde estudiando el efecto de ppGpp en la región reguladora de *leuO* en *S. typhi*, se dio cuenta que para que la inducción de ppGpp tuviera un efecto sobre la regulación de *leuO* tenía que haber un paso previo de desrepresión mediado por la ausencia de H-NS y Lrp (Fig. 6.B) (Sanchez-Popoca 2018).

Al analizar el efecto de las fusiones pudimos observar que las fusiones que tuvieron un efecto positivo por Fis en ausencia de H-NS y Lrp fueron las fusiones *pleuO436*, *pleuO287* y *pleuO200* en los primeros estadios del crecimiento; las dos primeras fusiones contienen todos los promotores de *leuO* (promotores 1,2,3,4 y 5), sin embargo se observó que la fusión *pleuO200*, la cual solo contiene los promotores 2,4 y 5, y que son los más cercanos al inicio de la traducción, fue la fusión que tuvo

el efecto más grande al haber una reducción de tres veces en el fondo $\Delta hns\Delta lrp\Delta fis::km$ respecto $\Delta hns\Delta lrp$. Algo contrastante fue que al comparar la fusión más larga *pleuO894* y la cual también contiene el fragmento que correspondería a las otras fusiones (Fig.4), esta fusión *pleuO894* no muestra una reducción en la actividad de la triple mutante comparado con la doble mutante (Fig. 10); esta información sugiere que probablemente la regulación por Fis sea a nivel local por sitios de unión al DNA que haya en la región comprendida -436 a -110, ya que las regiones que corresponden a las fusiones más cortas *pleuO90* y *pleuO60* tampoco tuvieron un efecto; o a su vez que al ser regiones más cortas el DNA está más lineal y por tanto Fis tiene la oportunidad de regular de una manera más eficiente la región que abarca -436 a -110 pb (correspondientes a las fusiones que tuvieron un efecto en la triple mutante respecto de la doble); siempre y cuando H-NS y Lrp estén ausentes, al menos en fase exponencial.

Esta información es relevante en el sentido que estaríamos caracterizando las regiones importantes para la regulación por Fis en ausencia de H-NS y Lrp, además de la fuerza promotora que ejerza uno o más promotores en la expresión. Los resultados arrojados en fase exponencial nos estarían indicando que la fusión *pleuO200* tendría los sitios más críticos para la regulación por Fis ya que la disminución de la expresión es de tres veces, y además dicha expresión estaría mediada por el promotor 2 puesto que los promotores 4 y 5 no tienen participación en la expresión (Fig. 11).

Algo que fue muy notable fue observar que la regulación por Fis se mantuviera en la fusión *pleuO200* a lo largo del crecimiento. En el caso del regulador Fis, se está muy bien caracterizado que su expresión se ve favorecida en las primeras etapas de crecimiento y disminuye hacia la entrada a la fase estacionaria (Ball et al., 1992 y Wang et al., 2015), siendo sus niveles ya mínimos a una fase estacionaria tardía. Con todo lo anterior, nos estaría indicando que sí los niveles de expresión de Fis en la fase estacionaria temprana y tardía son efectivamente bajos, éstos son suficientes para regular únicamente la fusión *pleuO200*, en donde se vería favorecido el promotor 2.

Estos datos si bien son pioneros y permiten darnos una noción de la regulación de *leuO* por Fis de *S. Typhi*; en *S. Typhmuri* a través de microarreglos se ha observado que *leuO* es uno de sus blancos a la mitad de la fase exponencial favoreciendo su expresión (Wang et al., 2015).

Seguir la cinética de crecimiento para la toma de las muestras y así tener la actividad de expresión fue muy importante porque nos dio información valiosa acerca de las fusiones. La fusión *pleuO894*, *pleuO436* y *pleuO287* que son las más largas presentaron retardos de crecimientos en los fondos $\Delta fis::km$ y $\Delta hns\Delta Irp\Delta fis::km$ consistente con lo ya reportado en la literatura y en nuestros resultados (Fig. 16). Sin embargo, estas fusiones en el fondo $\Delta hns\Delta Irp\Delta fis::km$ tuvieron tiempos de cinética de más de 15 horas en los cuales no fue posible alcanzar una $DO_{595} = 1.6$ (requerido para la toma de la muestra a fase estacionaria tardía) respecto de sus otros fondos que para esos tiempos ya habían alcanzado el pico máximo de crecimiento. Al comparar estas fusiones con las más cortas *pleuO200*, *pleuO90* y *pleuO60* (Fig. 16) se observó en su cinética que todos sus fondos alcanzaron el máximo pico de crecimiento en tiempos de menos de 14 horas. Con esta información acerca de la cinética nos hace pensar que hay algo en las fusiones más largas que hace que no crezcan tan bien en un fondo $\Delta hns\Delta Irp\Delta fis::km$. Las fusiones *pleuO894*, *pleuO436* y *pleuO287* a diferencia de las más cortas *pleuO200*, *pleuO90* y *pleuO60* tienen los promotores reversos P6 y P7 que dentro del laboratorio se estudian (Altamirano Cruz, 2018). Esto nos lleva a sugerir que en este fondo y en estas fusiones largas la ausencia de Fis produce algo tóxico para la bacteria que retarda el crecimiento y que además podría estar mediada por los promotores reversos ya que es la única diferencia que tienen comparado con las fusiones cortas. Otra posibilidad es que las diferencias en las actividades de *leuO* podrían deberse a una compensación de los defectos en el metabolismo celular en las cepas mutantes y no necesariamente a una actividad directa del regulador en cuestión.

Por último, todos estos resultados nos abren un camino en la exploración de Fis como regulador positivo de *leuO*, y muy probablemente este camino lleve a

descubrir condiciones más precisas que medien la regulación de *leuO* mediada por Fis.

En el 2013, Cameron y Cols., demostraron que en *S. Typhimurium* la expresión de Fis aumenta en la fase estacionaria cuando hay baja disponibilidad de O₂. Este fenómeno tiene por definición expresión sostenida, y se refiere a que el promotor de *fis* está activo en esta fase de crecimiento, manteniendo niveles altos de proteína y en los cuales hay un aumento en los niveles de invasión a células epiteliales (Croinin y Dorman, 2007). En condiciones no aireadas, se ha encontrado que ArcA reprime la expresión de *fis*, por lo que se podría postular un switch de regulación mediada por estos reguladores, a través de condiciones bajas de oxígeno y seguir en el conocimiento de la regulación de *leuO*.

Efecto de OmpR en las fusiones traduccionales de *leuO* a lo largo del crecimiento.

Los resultados obtenidos en las fusiones analizando la mutante sencilla $\Delta ompR::km$ en *S. Typhi*, nos permitió tener un panorama acerca del efecto que tiene OmpR sobre la regulación de *leuO*; pues OmpR al actuar como regulador maestro de porinas lo pone en el centro de muchos procesos metabólicos importantes para la bacteria.

La figura 17 nos mostró que todas las fusiones analizadas tuvieron la misma actividad en el fondo WT comparado con el $\Delta ompR::km$. En el 2004 Guadarrama-Roman observó que en una mutante sencilla $\Delta ompR::km$ no mostraba un efecto sobre las fusiones de *leuO* que hasta en ese momento se tenían caracterizadas (*pleuO894*, *pleuO436* y *pleuO287*), por lo tanto de acuerdo a lo ya reportado y los datos de este estudio en las fusiones más cortas (*pleuO200*, *pleuO90* y *pleuO60*), nos indica que la mutación por sí sola no es suficiente para que OmpR ejerza una modulación en *leuO*.

Como ya se mencionó anteriormente OmpR pertenece a un sistema de dos componentes, siendo el regulador de respuesta principalmete a cambios de osmolaridad dado por su regulador sensor EnvZ, influyendo directamente sobre la

expresión de las Porinas. En *S. Typhi* las principales porinas que se expresan mayormente son la OmpF y OmpC (Puente, J. L et al., 1986) además de dos porinas quiescentes las cuales son OmpS1 y OmpS2 (Oropeza et al., 1999 y Fernández-Mora et al., 2004), todas ellas moduladas positivamente por OmpR.

Si bien es cierto que OmpR por sí solo no es capaz de tener un efecto en la regulación de las fusiones de *leuO*, hay datos que sustentan la posible relación que pueda haber entre LeuO y OmpR, a través de la vía de expresión de porinas. La primera de ellas es el trabajo de Fernandez-Mora y Cols. en el 2004 en el cual demostraron que la sobreexpresión de LeuO regula positivamente las porinas OmpS1 y OmpS2, y que esta expresión es mediada por las concentraciones de LeuO; además de que debe estar presente OmpR para que haya una expresión, ya que la sobreinducción de LeuO por sí misma no es suficiente. Otra evidencia relaciona al sistema *cas-CRISPR*, donde se ha demostrado que LeuO regula positivamente el sistema (Hernández-Lucas et al., 2008; Medina-Aparicio et al., 2011). Más aún, a través de un estudio en el 2021, Medina-Aparicio y Cols. demostraron que *cas-CRISPR* regula positivamente a OmpR (activador de OmpC, OmpF, OmpS1 y OmpS2 en *S. Typhi*), y que la sobreinducción de LeuO en una mutante *cas-CRISPR* no expresa ni OmpR ni las porinas OmpS2, OmpC y OmpF. Una evidencia de un estudio anterior, que pone en escenario la relación entre OmpR y *leuO*, es que al comparar una mutante sencilla Δhns con una $\Delta hns\Delta ompR$ en las fusiones *pleuO894*, *pleuO436* y *pleuO287*, la doble mutante bajó su expresión a la mitad en comparación con la sencilla en Δhns , indicando que H-NS libera mejor la expresión de las fusiones cuando OmpR está presente (Guadarrama, 2004).

Por todo lo anterior es importante aclarar que el hecho de que la ausencia de OmpR por sí sola no fue capaz de generar un cambio en la expresión de *leuO*, esto no significa que no pueda tenerlo en sinergia con otros reguladores ya sea de manera directa o indirecta. Todo esto nos lleva a un reto más grande, pues la caracterización de la triple mutante $\Delta hns\Delta lrp\Delta ompR$, o la implementación de otras alternativas metodológicas para este fin, nos dará una visión más clara del papel que pueda

tener OmpR sobre *leuO*, teniendo siempre presente su naturaleza quiescente y la acción negativa que tiene H-NS y Lrp sobre el gen.

Efecto de ArcA en las fusiones traduccionales de *leuO* a lo largo del crecimiento.

ArcA es un regulador global de la transcripción que pertenece a un sistema de dos componentes actuando como el regulador de respuesta. Su principal función es modular la transición de un medio aerobio a uno anaerobio, reprimiendo genes involucrados en el metabolismo energético dependiente de oxígeno y activando aquellos que sean necesarios para contender ante este cambio (Evans et al., 2011). Diversas bacterias patógenas que generan infecciones gastrointestinales necesitan contender ante las múltiples señales ambientales que ahí se encuentran para poder invadir y desencadenar una enfermedad.

Para el caso de *S. Typhi*, la información que se sabe acerca de la regulación por ArcA es poca, sin embargo en su homólogo *S. Typhimurium* hay información bien sustentada de los diferentes fenotipos virulentos dados por el regulador (Calderón et al., 2011, Evans et al., 2011, Pardo et al., 2018 y 2019); además de que gracias a que es posible utilizar modelos murinos, se pueden entender los mecanismos moleculares y fisiológicos que ocurren en la infección sistémica (cuadro sintomatológico que ocurre por *S. Typhi* en humanos).

Por otro lado para el caso de *leuO*, hay reportes en *E. coli* donde a través de micro-arreglos se ha reportado que *leuO* es uno de sus blancos, formando parte del regulón de que media la transición de un ambiente aerobio a anaerobio debido a los cambios de O₂. (Salmon et al., 2005). Por lo anterior, el hecho de conocer el efecto de ArcA en nuestro modelo de estudio *S. Typhi* y en nuestro gen *leuO*, nos pondría en un gran escenario acerca de los mecanismos de regulación del gen para ayudar a la virulencia de la bacteria.

Los resultados obtenidos a través de las fusiones traduccionales nos indicaron que ArcA por sí solo no es capaz de tener un efecto sobre las mismas (Fig. 18-20), sin

embargo impactó en el crecimiento general de la bacteria pues hubo un retardo significativo comparado con el fondo silvestre (Fig. 21). Tanto en *E. coli* como en *Salmonella* está bien caracterizado que ArcA regula diferencialmente genes asociados al metabolismo del ciclo de Krebs y aminoácidos, entrada de hierro y transporte de azúcares (Oshima et al., 2002; Salmon et al., 2005; Evans et al., 2005 y Wang et al., 2018); todos ellos contribuyendo al crecimiento celular y directa o indirectamente al buen funcionamiento energético de la bacteria.

Al analizar las fusiones comparando el fondo doble mutante $\Delta hns\Delta lrp$ y triple mutante $\Delta hns\Delta lrp\Delta arcA::km$, arrojaron datos importantes acerca del efecto de ArcA. De todas las fusiones, las que tuvieron un efecto significativo comparando los dos fondos, fueron las fusiones *pleuO894*, *pleuO436*, *pleuO287* y *pleuO200*, pues en todas ellas la actividad de la triple mutante disminuyó más de 2 veces comparado con la doble mutante, indicando que en ausencia de H-NS y Lrp, ArcA regula positivamente la actividad de estas fusiones. Esta información es importante pues nos indica la presencia de una regulación mediada por ArcA en la región comprendida entre -894 a -110 (Fig. 4), pues las fusiones *pleuO90* y *pleuO60* (fusiones más cortas y cercanas al ATG) no hay regulación en ningún fondo. Por lo tanto en este sentido los promotores que estarían actuando en la expresión mediada por ArcA serían el promotor 1,2 y 3.

Cabe resaltar que estos resultados fueron bien caracterizados en todas las fusiones en la fase exponencial ($DO_{595}=0.6$), por la recolección de las muestras para la actividad. Lo anterior es interesante ya que al analizar las cinéticas de crecimiento se observó que en las fusiones *pleuO894* y *pleuO436* los tiempos de crecimiento no alcanzaron para la toma de las muestras de la actividad, que correspondían a la fase estacionaria temprana y tardía; no así las demás fusiones que sí llegaron a la fase estacionaria tardía después de 17 horas de crecimiento. Las fusiones *pleuO894* y *pleuO436* son las más largas y las más completas, ya que contienen todos los elementos de control negativo así como los promotores de *leuO*. A partir de la fusión *pleuO287* y las subsecuentes fusiones el área se fue delimitando y con ello las regiones de control negativo así como el número de promotores activos; por lo tanto

la región río arriba de -287 pb (correspondiente al inicio de la fusión *pleuO287*), tendría un elemento adicional además de las mismas mutaciones dadas por los reguladores, que promueve el retardo en el crecimiento de estas dos fusiones para que apenas solo alcancen la fase exponencial (en este estudio).

Una de las explicaciones sería el promotor antisentido P7 encontrado en las fusiones (*pleuO894* y *pleuO436*), analizado dentro del laboratorio (Altamirano-Cruz, 2018). Este promotor tiene un terminador intrínseco tallo-asa, que lo hace candidato para generar transcritos cortos que a su vez generen productos pequeños que impacten en la fisiología de la bacteria; y el hecho que se encuentre presente en las fusiones *pleuO894* y *pleuO436* podría colaborar junto con ArcA para retardar el crecimiento, además del efecto que tenga la ausencia de H-NS y Lrp; y que sea suficiente para alcanzar la fase exponencial, y que ArcA ejerza un efecto positivo sobre dichas fusiones y los promotores.

Estos resultados son muy importantes en el sentido que abre el camino hacia la exploración de la regulación por ArcA, siempre considerando la modulación negativa que tiene *leuO* por H-NS y Lrp. En primera instancia el hecho de que haya una regulación “local” a través de una región delimitada que abarca -894 a -110 conlleva a saber si la regulación pueda ser directa por sitios de unión de ArcA al DNA, o una regulación indirecta por sinergia con otros reguladores que modulen y conformen toda una red de regulación mediada por la regulación positiva de arcA sobre *leuO*; y que además de todo lo anterior, esta regulación abarque tres promotores 1,2 y 3 los cuales son los más activos (Fernandez-Mora et al., 2021). Todo esto nos lleva a la siguiente tarea, que es saber cual de estos tres promotores puedan ser los que se están expresando cuando ArcA modula positivamente al no estar H-NS y Lrp, y para que así LeuO pueda tener un efecto sobre la fisiología y virulencia de la bacteria. Fernandez-Mora y cols. (2021), mencionan que las concentraciones de LeuO pueden variar de acuerdo a la presencia de múltiples promotores que aporten diferentes fuerzas y con ello influya en su función.

Esto también es importante ya que si en condiciones estándar podemos observar regulación fina para el regulador ArcA, al implementar condiciones como la

presencia o ausencia de oxígeno, podremos observar las particularidades de la regulación y ver que se mantengan o cambien. Esto se observa con la alarmona ppGpp, pues se ha observado que en el estado estable (estado basal de no estrés) el promotor 1 se activa mientras que la actividad de los demás disminuye (Fernandez-Mora et al., 2021), y que además durante el estado estable los niveles de ppGpp son inversamente proporcionales a la tasa de crecimiento cuando la calidad nutricional varía (Imholz NCE et al., 2020). Con todo no es de extrañarse que exista una regulación diferencial por parte de las fusiones que serían el resultado de cambios metabólicos en conjunto como lo podemos observar para las fusiones *pleuO894* y *pleuO436*, que apenas alcanzan la fase exponencial y que se puede ver un efecto positivo por ArcA en ausencia de H-NS y Lrp; y que por otro lado, esta regulación se mantenga a lo largo del crecimiento para las fusiones *pleuO287* y *pleuO200*; todo lo anterior extendiéndose a un rango de tres promotores (1,2 y 3); los cuales podrían mediar a diferentes niveles la expresión de *leuO* y por tanto las concentraciones de la proteína.

Por todo lo anterior esto podría considerarse un ajuste fino de modulación, ya que a través de diferentes transcritos (mediado por la combinación de promotores o solo uno en particular) la bacteria pueda compensar defectos metabólicos importantes como lo es la ausencia de reguladores globales tales como *arcA*, H-NS y Lrp. Es claro que múltiples señales pueden desencadenar una regulación fina en conjunto, con la acción que los reguladores tengan sobre sus genes blanco para así generar una respuesta en la bacteria. Calva y Oropeza (2006) mencionan que el estudio de los sistemas de dos componentes, como los reguladores de respuesta OmpR y ArcA, ayudan a entender cómo es que las señales ambientales modulan la respuesta en el hospedero dentro del campo de la patogénesis, así como también lo hacen los reguladores Fis, H-NS y Lrp, todos ellos modulando un posible miembro de su regulación, *leuO*.

9. Conclusiones.

- Fis presentó un efecto positivo sobre la expresión de la fusión traduccional *pleuO200* durante el crecimiento en fase exponencial y fase estacionaria en ausencia de H-NS y Lrp.
- La mutante en *ompR* no tiene un efecto por sí sola en las fusiones traduccionales de *leuO*.
- ArcA presenta un efecto positivo sobre la expresión de las fusiones traduccionales *pleuO894*, *pleuO436*, *pleuO287* y *pleuO200* en fase exponencial y en ausencia de H-NS y Lrp.
- Los efectos de estos reguladores sobre la expresión de *leuO* podrían no ser directos, sino deberse a una compensación de los defectos en el metabolismo celular en las cepas mutantes. Dichos defectos causarían las diferentes cinéticas de crecimiento observadas.

10. Perspectivas.

- Hacer primer extensión de la actividad de los promotores de la fusión *pleuO200*, en los fondos *hns lrp fis* y *hns lrp* en fase exponencial.
- Hacer EMSA para ver interacción de Fis, H-NS y Lrp con el DNA.
- Medir la fusión de *fis* para ver sus niveles de expresión en *S. Typhi*
- Inducir OmpR en un fondo doble mutante *hns lrp* y ver el efecto en las fusiones.
- A partir de una doble mutante *hns ompR* hacer una triple mutante *hns ompR lrp*.
- Hacer primer extensión de la actividad de los promotores de las fusiones *pleuO894*, *pleuO436*, *pleuO287* y *pleuO200*, en el fondo *hns lrp arcA* y *hns lrp* en fase exponencial.
- Hacer EMSA para ver interacción de ArcA, H-NS y Lrp con el DNA.
- Medir la fusión de *arcA* para ver sus niveles de expresión en *S. Typhi*.

11. Referencias

- Alikhan N-F, Zhou Z, Sergeant MJ, Achtman M. 2018. A genomic overview of the population structure of *Salmonella*. PLoS Genet 14: e1007261.
- Ball, C.A., Osuna, R., Ferguson, K.C y Johnson, R.C. (1992). Dramatic changes in Fis levels upon nutrient upshift in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 174:8043–8056.
- Beach, M.B and Osuna,R. (1998). Identification and Characterization of the *fis* Operon in Enteric Bacteria. Journal of Bacteriology.180(22): 5932–5946.
- Bove, F., Lipps, C. J., Tsohis, R. M., Goisman, E., Heffron, F. y Kusters J. G. (1998). At least four percent of the *Salmonella* Typhimurium genome is required for fatal infection of mice. Infection and Immunity. 66: 3372-3377.
- Brandi, A., Giangrossi, M., Giuliadori, A.M. and Falconi, M. (2016). An Interplay among FIS, H-NS, and Guanosine Tetraphosphate Modulates Transcription of the *Escherichia coli cspA* Gene under Physiological Growth Conditions. Front. Mol. Biosci. 3:19.
- Buckle G, Fischer C, Black R, Typhoid fever and paratyphoid fever: Systematic review to estimate global morbidity and mortality for 2010, Published Online, URL (acceso 22 de febrero 2016): <http://doi:10.7189/jogh.02.010401>.
- Calderon,I.L.,Morales,E.,Caro,N.J.,Chahuan,C.A.,Collao,B.,Gil,F.,Villareal, J. M., Ipinza, F., Mora, G. C., and Saavedra, CP. (2011). Response regulator ArcA of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium downregulates expression of OmpD, a porin facility a ting uptake of hydrogen peroxide. Res.Microbiol.162, 214–222.
- Calva, E., y Oropeza, R. (2006). Two-component signal transduction systems, environmental signals, and virulence. Microbial ecology, 51(2), 166–176.
- Calva, E., Puente, J. L. y Calva J. J. (1988). Research opportunities in Typhoid Fever: Epidemiology and Molecular Biology. Bio Essays. 9: 173-177.

- Cameron, A.D., Stoebel, D.M y Dorman, C.J. (2011). DNA supercoiling is differentially regulated by environmental factors and FIS in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 80:85–101.
- Cameron, A.D. y Dorman, C.J. (2012). A Fundamental Regulatory Mechanism Operating through OmpR and DNA Topology Controls Expression of Pathogenicity Islands SPI-1 and SPI-2. *PLoS Genet* 8(3): e1002615.
- Cameron, A.D.S., Kröger, C., Quinn, H.J., Scally, I.K. y Daly, A.J. (2013) Transmission of an Oxygen Availability Signal at the *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium *fis* Promoter. *PLoS ONE* 8(12): e84382.
- Chen, C. C., Chou, M. Y., Huang, C. H., Mjumder, A. y Wu, H. Y. (2005). A *Cis*-spreading Nucleoprotein Filament Is Responsible for the Gene Silencing Activity Found in the Promoter Relay Mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*. 280: 5101-5112.
- Chen, C.C., Fang, M., Majunder, A. and Wu, H. Y. (2001). A 72 Pair AT-rich DNA Sequence Element Functions as a Bacterial Gene Silencer. *The Journal of Biological Chemistry*. 276: 9478-9485.
- Choi, J., & Groisman, E. A. (2020). *Salmonella* expresses foreign genes during infection by degrading their silencer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(14), 8074–8082.
- Contreras-Soto, M. B., Medrano-Félix, J. A., Ibarra-Rodríguez, J. R., Martínez-Urtaza, J., Chaidez, Q. C., Castro-del Campo, N. (2019). The last 50 years of *Salmonella* in Mexico: Sources of isolation and factors that influence its prevalence and diversity. *Revista Bio Ciencias* 6(nesp): Inocuidad Alimentaria, e540.
- Cróinín, T.Ó. y Dorman, C.J. (2007). Expression of the Fis protein is sustained in late-exponential- and stationary-phase cultures of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium grown in the absence of aeration. *Mol Microbiol* 66: 237–251.
- Crump JA, Luby SP, Mintz ED. The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Org* 2004;82:346–53.

- De la Cruz, M. A. y Calva, E. (2010). The complexities of porin genetic regulation. *J. Mol. Microbiol Biotechnol.* 18:24–36.
- De la Cruz, M. A., Fernández- Mora, M., Guadarrama, C., Flores-Valdez, M. A., Bustamante, V. H., Vázquez, A. y Calva, E. (2007). LeuO antagonizes H-NS and Stpa- dependent repression in *Salmonella enterica ompS1*. *Molecular Microbiology.* 66 (3):727- 743.
- Dillon, C. S., Espinosa, E., Okamp, K., Ussery, W. D., Casadesús, J. y Dorman, C. J. (2012). LeuO is a global regulator of gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology.* 85(6): 1072- 1089.
- Eng, S-K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N-S., Ser, H-L., Chan, K-G y Lee, L-H. (2015). *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance, *Frontiers in Life Science.* 1-10.
- Evans, M.R., Fink, R.C., Vazquez-Torres, A., Porwollik, S., Jones-Carson, J., McClelland, M., *et. al.* (2011). Analysis of the ArcA regulon in anaerobically grown *Salmonella enterica* sv. Typhimurium. *BMC Microbiol.* 11(58):1-16.
- Fang, M. y Wu, H. Y. (1998a). A Promoter Relay Mechanism for Sequential Gene Activation. *Journal of Bacteriology.* 180: 626-633.
- Fang, M. y Wu, H. Y. (1998b). Suppression of *leu-500* Mutation in *topA*⁺ *Salmonella* Typhimurium Strains. *The Journal of Biological Chemistry.* 273: 29929-29934.
- Fernández-Mora, Marcos., Puente, J. L. y Calva, E. (2004). OmpR and LeuO Positively Regulate the *Salmonella enterica* Serovar Typhi *ompS2* Porin Gene. *Journal of Bacteriology.* 186: 2909- 2920.
- Figueroa-Ochoa, I. M. and Verdugo Rodriguez. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella sp.* *Revista Latinoamericana de Microbiología.* 47: 25-38.
- Finlay, B. B y Falkow, S. (1989). *Salmonella* as an intracellular parasite. *Molecular Microbiology.* 12: 1833-1841.

- Guadarrama, Román, M. del C. (2004). Estudio de la Regulación de la Expresión del gen *leuO* de *Salmonella typhi*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Facultad de Ciencias Biológicas. Cuernavaca, Mor.
- Haraga, A., Ohlson, M. B. y Miller, S. I. (2008). *Salmonellae* interplay with host cells. *Nature Rev Microbiology*. 6: 53-56.
- Henikoff, S., Haughn, G. W., Calvo, J. M. and Wallace, J. C. (1988). A large family of bacterial activator proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 6602-6606.
- Hernández-Lucas, I., Gallego-Hernandez, A.L., Encarnación, S., Fernandez-Mora, M., Martinez-Batallar, A. G. y Salgado, H. (2008). The LysR-Type Transcriptional Regulator LeuO Controls expression of Several Genes in *Salmonella enterica* Serovar Typhi. *Journal of Bacteriology*. 190: 1658-1670.
- Ishihama, A., Shimada, T. and Yamazaki. (2016). Transcription profile of *Escherichia coli*: genomic SELEX search for regulatory targets of transcription factors. *Nucleic Acids Research*. 44: 2058- 2074.
- Jiang, F., An, C., Bao, Y., Zhao, X., Jernigan, R. L., Lithio, A., Nettleton, D., Li, L., Wurtele, E. S., Nolan, L. K., Lu, C., & Li, G. (2015). ArcA Controls Metabolism, Chemotaxis, and Motility Contributing to the Pathogenicity of Avian Pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 83(9), 3545–3554.
- Jiménez, R., Arenas, C., Doblas, A., Rivero, A. y Torre-Cisneros, J. (2010). Fiebre tifoidea y otras infecciones por *salmonellas*. *Medicine*. 10(52):3497501.
- Kan, B., Habibi, H., Schmid, M., Liang W., Wang, R. y Wang D. (2004). Proteome comparison of *Vibrio cholerae* cultured in aerobic and anaerobic conditions. *Proteomics*. 4:3061-7
- Khan, S. A., Everest, P., Servos, S., Foxwell, N., Zähringer, U., Brade, H. *et al.* (1998). A lethal role for lipid A in *Salmonella* infections. *Molecular Microbiology*. 29: 571-579.
- Klauck, E., Böhlinger, J. y Hengge, A. (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.

- LaRock, D. L., Chaudhary, A. y Miller, S. I. (2015). Salmonellae interactions with host processes. *Nature Rev Microbiology*. 13: 191-205
- Lee, A.K., Detweiler, C.S. y Falkow, S. (2000). OmpR regulates the two-component system SsrA-SsrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J Bacteriol*. 1 (82):771–781.
- López-Mendez, G. (2018). Regulación de los promotores p2, p5 y p4 DEL GEN *leuO* por Lrp y H-NS en *Salmonella enterica* Serovar Typhi. Tesis de licenciatura. Univ. Autónoma del Estado de Morelos.
- Maddocks, S. E. y Oyston, P. C. (2008). Structure and function of the LysRtype transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology*. 154: 3609-3623.
- Majumder, A., Fang, M., Tsai, K. J., Ueguchi, C. Mizuno, T. and Wu, H. Y. (2001). LeuO Expression in Response to Starvation for Branched-chain Amino Acids. *The Journal of Biological Chemistry*. 276: 19046-19051.
- Majumder, A., Fang, M., Tsai, K. J. and Wu, H. Y. (2000). ppGpp-dependent leuO expression in bacteria under stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 276: 64-70.
- Maris, A.E., Walther, D., Mattison, K., Byers, N. y Kenney L.J. (2005). The response regulator OmpR oligomerizes via beta-sheets to form head-to-head dimers. *J Mol Biol*. 3 (50):843– 856.
- Morales, E.H., Collao, B., Desai, P.T., Calderon, I.L., Gil, F., Luraschi, R., *et al.* (2013). Probing the ArcA regulon under aerobic/ROS conditions in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *BMC Genomics*.14(626):1-14.
- Moreno-Eutimio, M., Tenorio-Calvo, A., Pastelín-Palacios, R., Pérez-Shibayama, C., Gil-Cruz, C., López-Santiago, R., Baeza, I., Fernández-Mora, M., Bonifaz, L., Isibasi, A., Calva, E., and López-Macías, C. (2013). *Salmonella* Typhi OmpS1 and OmpS2 porins are potent protective immunogens with adjuvant properties. *Immunology* **139**: 459-471, 2013. doi:10.1111/imm.12093.

- Murret-Labarthe, C., Kerhoas, M., Dufresne, K., & Daigle, F. (2020). New Roles for Two-Component System Response Regulators of *Salmonella enterica* Serovar Typhi during Host Cell Interactions. *Microorganisms*, 8(5), E722.
- Oropeza, R., Sampieri, C.L., Puente, J.L. y Calva, E. (1999). Negative and positive regulation of the nonosmoregulated *ompS1* porin gene in *Salmonella typhi*: a novel regulatory mechanism that involves OmpR. *Mol Microbiol.* 32:243–252.
- Pardo-Este, C., Hidalgo, A.A., Aguirre, C., Briones, A.C., Cabezas, C.E., Castro-Severyn, J. *et al.* (2018). The ArcAB two-component regulatory system promotes resistance to reactive oxygen species and systemic infection by *Salmonella Typhimurium*. *PLoS. ONE.* 13(9):1-20.
- Pardo-Esté, C., Castro-Severyn, J., Krüger, G.I., Cabezas, C.E., Briones, A.C., Aguirre, C., Morales, N., Baquedano, M.S., Sulbaran, Y.N., Hidalgo, A.A., Meneses, C., Poblete-Castro, I., Castro-Nallar, E., Valvano, M.A. and Saavedra, C.P. (2019). The Transcription Factor ArcA Modulates *Salmonella*'s Metabolism in Response to Neutrophil Hypochlorous Acid-Mediated Stress. *Front. Microbiol.* 10:2754
- Park CJ, Andam CP. 2020. Distinct but intertwined evolutionary histories of multiple *Salmonella enterica* subspecies. *mSystems* 5:e00515-19..
- Parra, M., Durango, J. y Mattar, S. (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. *MVZ-CÓRDOBA.* 7(2):187-200.
- Parry, C.M. (2005). *Epidemiological and clinical aspects of human typhoid fever.* Cambridge University Press. 1: 1-10.
- Puente, J.L., Verdugo-Rodríguez, A. y Calva, E. (1991). Expression of *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* OmpC is influenced differently by medium osmolarity: dependence on *Escherichia coli* OmpR. *Mol Microbiol.* 5:1205–1210.

- Pui, C., Wong, W., Chai, L., Tunung, R., Jeyaletchumi, P., Hidayah, N., Ubong, A., Farinazleen, M., Cheah, Y., Son, R. (2011). *Salmonella*: a foodborne pathogen. *Int. Food Res. J.* 18 (2):465-473.
- Que, F., Wu, S. y Huang, R. (2013). *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) at Work. *Curr Microbiol.* 66: 582-587.
- Rodríguez-Morales, Olivia., Fernández-Mora, Marcos., Hernández-Lucas, I., Vázquez, A., Puente, J. L. and Calva, E. (2006). *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium *ompS1* and *ompS2* Mutants Are Attenuated for Virulence in Mice. *Infection and Immunity.* 74: 1398-1402.
- Salmon, K.A., Hung, S.P., Steffen, N.R., Krupp, R., Baldi, P., Wesley, H y Gunsalus, R.P. (2005). Global Gene Expression Profiling in *Escherichia coli* K12. Effects of oxygen availability and ArcA. *The journal of biological chemistry.* 280(15): 15084–15096.
- Sánchez, M y Cardona, N. M. (2003). Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. *Infectio.* 7(1): 22-29.
- Sánchez-Popoca, D. (2015). H-NS y Lrp como reguladores del gen *leuO* en *Salmonella enterica* serovar Typhi. Tesis de licenciatura, Univ. Autónoma del Estado de Morelos.
- Schell, M. A. (1993). Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 597-626.
- Shi, X. and Bennett, G.N. (1995). Effects of Multicopy LeuO on the Expression of the Acid- Inducible Lysine Decarboxylase Gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology.* 177: 810-814.
- Shimada, T., Bridier, A., Briandet, R. and Ishihama, A. (2011). Novel roles of LeuO in transcription regulation of *E. coli* genome: antagonistic interplay with the universal silencer H-NS. *Molecular Microbiology.* 82: 378-397.
- Storey HL, Huang Y, Crudder C, Golden A, de los Santos T, Hawkins K (2015) A Meta-Analysis of Typhoid Diagnostic Accuracy Studies: A Recommendation to Adopt a Standardized Composite Reference. *PLoS ONE* 10(11): e0142364. doi:10.1371/journal.pone.0142364.

- Stratmann, T., Pul, U. Wurm, R., Wagner, R. and Schnetz, K. (2012). RcsB-BglJ activates the *Escherichia coli leuO* gene, encoding an H-NS antagonist and pleiotropic regulator of virulence determinants. *Molecular Microbiology*. 83: 1109-1123.
- Ueguchi, C., Ohta, T., Seto, C., Suzuki, T. y Mizuno, T. (1998). The *leuO* Gene product has a latent ability to relieve *bgl* silencing in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 180: 190-193.
- Valdez, Y., Ferreira R. B. R. and Finlay B. B. (2009). Molecular Mechanisms of *Salmonella* Virulence and Host Resistance. Sasakawa, C. (Ed.). *Molecular Mechanisms of Bacterial Infection via the Gut* (93-127). Tokyo, Japan: Springer.
- Villarreal, J.M., Becerra-Lobato, N., Rebollar-Flores, J.E., Medina-Aparicio, L., Carbajal-Gómez, E. (2014). The *Salmonella enterica* serovar Typhi *ItrR-ompR-ompC-ompF* genes are involved in resistance to the bile salt sodium deoxycholate and in bacterial transformation. *Mol Microbiol*. 92:1005–1024.
- Xi, D., Yang, S., Liu, Q., Li, Y., Li, Y., Yan, J., Wang, X., Ning, K. y Cao, B. (2020). The response regulator ArcA enhances biofilm formation in the *vpsT* manner under the anaerobic condition in *Vibrio cholerae*. *Microbial Pathogenesis*. (20):30484-8.
- Wang, H., Liu, B., Wang, Q. y Wang, L. (2013). Genome-wide analysis of the *salmonella* Fis regulon and its regulatory mechanism on pathogenicity islands. *PLoS One* 8: e64688.
- Wang, H., Wang, L., Li, P., Hu, Y., Zhang, W. y Tang, B. (2015). Dynamic Transcriptional Regulation of Fis in *Salmonella* During the Exponential Phase. *Curr Microbiol*. 71:713–718.
- Wilson, R. P., Raffatellu, M., Chessa, D., Winter, S. E., Tükel, C., and Bäumler, A. J. (2008). The Vi-Capsule prevents Toll-like receptor 4 recognition of *Salmonella*. *Cellular Microbiology*. 10(4): 876-890.

12. Anexos

Medios de Cultivo

MN(Medio nutritivo)

Bacto caldo nutritivo	7g
Extracto de levadura	1g
Glicerol	2 ml
K₂HPO₄	3.7 gr
KH₂PO₄	1.3 gr

TSG

Bacto soyton	7 grs
Bacto triptona	3 grs
NaCl	5grs
Fosfato de potasio dibasico	2.5 gr
Glucosa	2.5gr
Bacto agar	3.7 (250ml)

Medio Soc

Bacto trptona	7 grs
Extracto de levadura	1 grs
NaCl 5M	2ml
KCl	3.7 gr
MgSO₄ 1 M	1.3 gr
MgCl₂ 1 M	1 ml
Glucosa	0.36

Amortiguadores

Tris Boratos (TBE) 10x

Trisma base (89 mM)	108 gr
Acido borico (24.98 mM)	55 gr
EDTA (0.5 mM)	40 ml

Tris Acetatos (TAE) 10x

Trisma base (89 mM)	242 gr
Acido borico (24.98 mM)	136.1 gr
Acido acético (24.98)	73 ml
EDTA (0.5 mM)	40 ml

Amortiguador Z 5x

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

Antibióticos.

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

Reactivos

Otros reactivos

ONPG(orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosodico) (1 mg/ml)
X-gal (5-bromko-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopironosodico (50 mg/ml)

**DR. JEAN MICHEL GRÉVY MACQUART
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada: **REGULACIÓN DEL GEN *leuO* POR *Arca*, *Fis* Y *OmpR* EN *Salmonella Typhi***, que presenta la alumna **Grecia López Méndez (10033414)** para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Ramón Antonio Gonzalez García-Conde CIDC-UAEM	APROBADO	
Dra. Sonia Dávila Ramos CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. José Luis Puente García IBT-UNAM	APROBADO	
Dra. María del Rayo Sánchez Carbente CEIB-UAEM	APROBADO	
Dr. Edmundo Calva Mercado IBT-UNAM	APROBADO	



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2022-05-27 13:30:56 | Firmante

P17nvpNk+gR/xKjZmb17dOycAsHRsazBBFiBJADmFRdD5c4bFYnXhfV3SmXYDfUhusYub1J6/O+Y1LdHOpxW14JVgKN1s4O/taAe263OoVLLUFAR+NpxYkZyGYZgTazakC8XS2uDWzIXzO6MQ0pqUoLDWctw7ZvkH0PjPKIU2CbaEy5ryz1kFk3z644Izvi2qz9ilZezTBTbdWTH3HCvXkywrELIDOdXOXzAJYjxrWS6glpDj7HEw4xRRpicSKwl4+wB8raJhj4InA67NV/Brb1YEeqng/2MmruJTVKip3ay3IjWCLnFOsa5/kjZ3NfdaXtIX+waggPljBCDJ/wg==

RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE | Fecha:2022-05-27 13:34:30 | Firmante

wpkXRBFGRmECPB/vgCyMltyeZ6YkFM1PW53hTsmZ0arWJ6vA/9MVb1M/TUDR5ugJeAkSgPjQkv49DkVVRhReV+UphWhqWhrjkAwllmqSgoABA6FX2BUELZKURJPrCv+CC1HFBciGpwgFFkF57Xix3mz9mrdRH5StTaLWvF4aa1XII7iOlbkMQTy10mkx6WSyQt2anu26uwt6i00OVSvinmaXV8SyVCCFc+OpDiwu7cfGKZj7UwlehxBwfk+of6/xRLh/oOWTpiyeUU+Y0iPyXNB4r3OmRFlaYosgTCeLmAnFlxxQXqoEdSbtLW6HZ5OI47neNgrax64o3peuktRQ==

EDMUNDO CALVA MERCADO | Fecha:2022-05-27 14:26:52 | Firmante

fX4e/SCeoEAZR596Ryxau3pjJ5VSAHw24dacWjRAPlhOsEi8Qc85FRH9GKY83PdBCfSCUDpXNCc/Gn5ROYVeFM0SUf9kUnyDAkApwSDPRVnsSLnPkuGS2oMJ9PfiN7pAH/rJVVvd8ll4x/sXPSrPB1DEQ7IUmoFCjVdtDOB9bumK98T7eoOKcc8gjSomK2WkGFMzbVURB5CmknG28CqMHR1XvGp81HORfGGEVW1UOgWvP0b+BAW9YMxrouDnuwJK6pOjxES614qzA84REyie65dzhMRuPFRkvhwvzGgZQWz8M3i271tVzMP8f1U+JSTSOqoerB1iGs27CXYTEVQ==

JOSÉ LUIS PUENTE GARCÍA | Fecha:2022-06-04 18:29:30 | Firmante

VlohYZxHwVVNxDb2nA3epWNq6wp5pB0+4gmICOEgXq93T7LesrTnjfmK9gvD4kNARShX/JCQCNDK8f4Q0+mfDLv22i1cGvQoCCjFJNjyOuls5Ow+uyli7pyxDI4LtyadhEKDHPxxxrDVmjfFZCIR1GNgdkCgLite/3cRAZA2seJqg2JkbYMqv1Sd4s/raxANh9BNPwacPYT1Ft7KIYST9tgWf5sXLmVLCGeX+O17lqXnpXgtTz6oRDeSJwwE2IsSzNvFisy+TWqHsPly1VYBnpt+Y7vJg8odScU4x5rJ7c4bmRuX1DYDhMgKOITryZsS+RU08qwwluPXVX07+mJfg==

MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2022-06-06 15:33:36 | Firmante

EMtEx4Jv9FDksEgf07qitS2UG8MvMd3sNp3xMkw86/AXCDBkij2dFgEyAxxEng7dwDshzjEIIZYDYcYtuKkBGxuxfT6bYglN16si+g1pgz6wjND4nNIVMxA+MuWvJbY/6NkHbxsXzhd48daAOcUYIOV3zmCKgqmjzWQSfT3jjUay97P3qiUFvCiAmKB2S55MwbZKbFhT7upltwkwfue9jD3jZyNoQpLsKR/Qu0evVo5H8wwmeYrcrFBuJucjTYBSqEhH2xwXBwp3YFzuboTJXP39GOzr9RL2I9h5kC8h0wzMO8yZe8m3SU+4OunC1enBuvkeVNrJDACCOnb6Y+3A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



UqY2zLf5J

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/DGMkAg4U7QQY3oDk0K5oh9YPqICFbQeZ>

