



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Laboratorio de Microbiología

**“PARTICIPACIÓN DEL FACTOR RpoN EN LA REGULACIÓN de *rfaH* de *S.*
Typhi.”**

Memoria para optar al Título de Bioquímico

Raimundo Felipe Salas Schweikart

Directores de Memoria:

Dra. Lucia Inés Contreras Osorio

Dr. Sergio Álvarez Armijo

Profesor Patrocinante:

Dra. Lucia Inés Contreras Osorio

Santiago, Chile

Noviembre 2006

Esta tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT 1040562

Dedico este trabajo
a mi familia, especialmente a
mis padres por el don de la vida.

Agradecimientos.

Especialmente agradezco a la Dra. Inés Contreras por guiarme en esta tesis con cariño, preocupación, apoyo y confianza constantes.

Al Dr. Sergio Álvarez por su toda su oportuna ayuda y simpatía durante el desarrollo de mi tesis.

A la Dra. Mercedes Zaldívar, por su cariño, apoyo y comprensión.

A la Dra. Soledad Saldías por su generosa ayuda durante mis primeros pasos en el laboratorio.

Al Dr. Mauricio Bittner por haberme ayudado generosamente y por los gratos momentos compartidos.

Francisco Altamirano por su gran ayuda en la realización de este trabajo, por su simpatía y amistad.

A Javier Carter, Anilei Hoare y Denisse Bravo, por todos los buenos momentos compartidos y la simpatía entregada.

A Carlos Blondel, Alan Zamorano, y Pablo Escobar, por los buenos y gratos años de estudios compartidos y por los mejores momentos vividos en el laboratorio.

A los profesores Davor Cotoras y Sergio Lobos por los comentarios que permitieron mejorar la calidad de este documento.

A la Sra. Patricia Fuentealba, Sra. Natividad Aguilar y a Don Luís Sarmiento, por todo el apoyo dado para la realización de esta tesis.

A Guillermo Baranda s.j. y Eugenio Valenzuela s.j. por el apoyo que hizo posible el termino de esta tesis

A Juan Díaz s.j. por su motivación, preocupación y desinteresada ayuda en todo este proceso.

A Pedro Labrín s.j. y Rodrigo Nuñez s.j. por la amistad compartida.

A Paz Vuscovic, Pedro Iacobelli, Pedro Langlois, Claudio Skvirsky, Gustavo Villavicencio, por los años de amistad y compañía.

Índice

Índice	vi
Índice Tablas y Figuras	ix
Abreviaturas	x
Resumen	xi
Summary	xiii
1. Introducción	1
2. Materiales y Métodos	9
2.1. Reactivos	9
2.2. Cepas bacterianas	10
2.3. Plasmidios	10
2.4. Partidores utilizados	10
2.5. Medios y condiciones de cultivo	10
2.6. Técnicas bioquímicas	14
2.6.1. Ensayo de actividad β-Galactosidasa	14
2.6.2. Determinación de la concentración de proteínas	15
2.6.3. Electroforesis de proteínas	15
2.7. Técnicas básicas de biología molecular	16
2.7.1. Extracción de DNA cromosomal	16
2.7.2. Extracción de plasmidios a gran escala	16
2.7.3. Extracción de plasmidios por kit E.Z.N.A.	17
2.7.4. Electroforesis en geles de agarosa	18
2.7.5. Purificación de DNA desde un gel de agarosa	18
2.7.6. Determinación de la concentración de DNA	18
2.7.7. Digestión de DNA con enzimas de restricción	19

2.7.8. Transformación de cepas mediante electroporación	19
2.8. Construcción de fusiones transcripcionales <i>rfaH-lacZ</i>	20
2.8.1. Clonamiento en el vector pGEM®-T easy	20
2.8.2. Sub-clonamiento en el vector pFZY1	21
2.9. Clonamiento y purificación de <i>rpoN</i>	22
2.9.1. Clonamiento de <i>rpoN</i> en pGEM®-T easy	22
2.9.2. Clonamiento de <i>rpoN</i> en el vector pET-21b(+)	22
2.9.3. Condiciones para la inducción de RpoN-HisTag	23
2.9.4. Preparación del extracto celular	23
2.9.5. Purificación de RpoN mediante cromatografía de afinidad a Ni	24
2.9.6. Concentración de la fracciones de RpoN purificadas	24
2.10. Ensayo de retardo de la movilidad electroforética en geles (EMSA)	25
2.10.1. Marcación terminal de la sonda de DNA con (γ - ³² P) ATP	25
2.10.2. Ensayo de unión	26
2.10.3. Electroforesis	27
2.11. Obtención de cepas mutantes de posibles proteínas regulatorias de RpoN (EBPs)	27
2.11.1. Obtención del producto de PCR	27
2.11.2. Transformación de <i>S. Typhi</i> con el plasmidio pKD46	28
2.11.3. Transformación de <i>S. Typhi</i> /pKD46 con el producto PCR	28
2.11.4. Confirmación de la mutación mediante PCR	29

3. Resultados	30
3.1. Caracterización y análisis de la región promotora de <i>rfaH</i> en <i>S. Typhi</i>	30
3.1.1. Construcción de los vectores reporteros	31
3.1.2. Ensayo de actividad β-galactosidasa	33
3.2. Clonamiento, sobreexpresión y purificación de RpoN	34
3.2.1. Clonamiento de RpoN en los vectores pGEM[®]-T easy y pET-21b(+)	34
3.2.2. Sobreexpresión y purificación de RpoN-HisTag de <i>S. Typhi</i>	36
3.2.3. Ensayo de retardo de la movilidad electroforética en geles (EMSA)	38
3.3. Proteínas activadoras de RpoN	39
4. Discusión	42
5. Conclusiones	46
6. Bibliografía	47

Índice de Tablas y Figuras.

Tabla 1. Cepas bacterianas	11
Tabla 2. Plasmidios utilizados en el presente estudio	12
Tabla 3. Partidores utilizados en el presente estudio	13
Figura 1. Esquema de la región promotora de <i>rfaH</i> de <i>S. Typhi</i>	31
Figura 2. Construcción de los vectores reporteros.	32
Figura 3. Expresión de las fusiones de los promotores P ₁ y/o P ₂	33
Figura 4. Esquema de la construcción del vector pFA1	35
Figura 5. Sobreexpresión y purificación de la proteína RpoN-HisTag	36
Figura 6. Estudio de la unión de RpoN-HisTag al promotor P ₁ de <i>rfaH</i>	38
Figura 7. Confirmación de la delección de genes de posibles EBPs	40
Figura 8. Efecto de la mutación de posibles EBPs sobre la transcripción de <i>rfaH</i>	41

Abreviaturas

AgO: Antígeno O

AL: Agar Luria

Amp: Ampicilina

Cam: Cloramfenicol

CIAP: Fosfatasa alcalina intestinal de bovino

CL: Caldo Luria

EBP: "Enhancer binding protein"

EMSA: Ensayo de retardo en geles

FRT: Secuencia blanco de la recombinasa FLP

IPTG: Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido

Kan: Kanamicina

LPS: Lipopolisacárido

ONPG: Orto-nitrofenilgalactopiranosido

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PMSF: Fluoruro fenilmetilsulfonil

Xgal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactopiranosido

Resumen

Salmonella enterica serovar Typhi (*S. Typhi*) es un patógeno exclusivo del ser humano y agente causal de la fiebre tifoidea. Esta enfermedad constituye un problema de salud pública a nivel mundial especialmente en países en vías de desarrollo. Nuestro trabajo se ha enfocado a comprender la regulación de la producción del lipopolisacárido (LPS) y su papel en la virulencia de esta bacteria. El LPS es el componente principal de la envoltura de las bacterias Gram negativas y, por lo tanto, es un importante mediador de las interacciones con el hospedero. Estudios anteriores de nuestro laboratorio han demostrado que la producción del antígeno O (AgO), el componente más externo de la molécula de LPS, varía durante el crecimiento bacteriano, aumentando en las fases exponencial tardía y estacionaria. Esta modulación es mediada por el factor RfaH, que regula positivamente la transcripción del operón *wba* encargado de la síntesis del AgO. La expresión del gen *rfaH* también aumenta en la etapa de transición a fase estacionaria y su activación requiere la función del factor sigma alternativo RpoN. En este trabajo se estudió el mecanismo de activación de la transcripción de *rfaH* mediado por RpoN. Se planteó como hipótesis que el factor sigma de estrés RpoN regula la expresión de *rfaH* en *S. Typhi*, mediante la unión directa a la región promotora de *rfaH* o indirectamente a través de proteínas accesorias.

El hallazgo previo de la existencia de dos sitios de inicio de la transcripción con sus respectivos promotores, se confirmó mediante la construcción de vectores reporteros que contienen fusiones transcripcionales de los respectivos promotores P₁ o P₂ al gen *lacZ*. Se demostró que el promotor P₁ es el responsable de la regulación fase-dependiente de la transcripción de *rfaH*, en cambio el promotor P₂ contribuiría marginalmente a esta regulación.

Se estudio la unión de RpoN a una probable secuencia de reconocimiento de este factor sigma en el promotor P₁. Para esto se clonó el marco de lectura en el vector pET-21b(+) y se sobreexpresó y purificó la proteína recombinante RpoN-HisTag mediante cromatografía de afinidad a Ni. Se utilizó una fracción altamente purificada de esta proteína en ensayos de retardo en geles (EMSA). Se demostró que RpoN no se une al promotor P₁ y por lo tanto no participa directamente en la regulación fase-dependiente de *rfaH*.

La regulación mediada por este factor sigma es dependiente de su activación por proteínas activadoras, denominadas "enhancer binding proteins" (EBP). Para identificar la EBP que participa en la regulación de *rfaH*, se construyeron mutantes por delección en 6 genes para las probables EBPs encontradas en el genoma de *S. Typhi*. De estas mutaciones, sólo aquella en *ygaA*, factor encargado de la transcripción de genes para detoxificar NO, presentó un efecto significativo sobre la transcripción de la fusión *rfaH-lacZ*, que consistió en un aumento de la actividad β -galactosidasa durante la fase exponencial temprana.

Los resultados de este trabajo indican que la regulación transcripcional fase-dependiente de *rfaH* es mediada de forma indirecta por RpoN, a través de proteínas accesorias que serían reguladas por este factor sigma para ejercer su efecto sobre el promotor P₁.

Summary

Salmonella enterica serovar Typhi (*S. Typhi*) infects only humans and causes typhoid fever. This disease constitutes a world wide problem in public health, especially in third world countries. Our work is directed to understanding the regulation of lipopolysaccharide (LPS) production and its role in virulence. LPS is the main component of the outer membrane of Gram negative bacteria, and therefore it is an important mediator in the interactions with the host. Previous research of our laboratory demonstrated that a component of LPS, the O antigen (OAg), changes during bacterial growth. We found that OAg production increases during logarithmic phase reaching a maximum in the stationary phase of growth. This regulation is mediated by the RfaH factor, which promotes the transcription of the *wba* operon, that contains the genes responsible for OAg synthesis. The activation of the RfaH factor requires the sigma factor RpoN. In this work we investigated the mechanism of activation of *rfaH* transcription. We hypothesized that the activation of *rfaH* transcription requires direct binding of RpoN to the promoter region of *rfaH* or indirectly by means of accessory proteins.

The previous finding that there are two transcription initiation sites, with their corresponding promoter sequences, was confirmed by the construction of reporter vectors containing the P₁ or P₂ promoter fused to the *lacZ* gene. We demonstrated that the P₁ promoter is responsible for the phase-dependent *rfaH* transcription whereas the P₂ promoter contributes minimally to growth phase regulation of *rfaH*.

To confirm the binding of RpoN to the RpoN box found in the P₁ promoter, RpoN was overexpressed in the pET-21b(+) vector and purified by a Ni affinity chromatography column. The fraction obtained was used in electrophoretic mobility shift assays (EMSA). The results showed that RpoN does not bind to the P₁

promoter region and consequently it does not directly participate in phase-dependent regulation of *rfaH*.

The RpoN mediated transcription requires proteins called “enhancer binding-proteins” (EBPs). To identify the EBP that participates in the regulation of *rfaH* transcription we constructed deletion mutants in 6 putative EBPs found in the *S. Typhi* genome. Of these mutants only $\Delta ygaA$, a factor involved in transcription of genes of the NO detoxification system, appeared to have a significant effect on the transcription of the *rfaH-LacZ* fusion, which consisted in an increase in β -galactosidase activity during early exponential phase.

The results of this work indicate that growth-phase regulation of *rfaH* transcription is exerted on the P_1 promoter indirectly by RpoN through the activity of unknown accessory proteins.

1. Introducción

Salmonella enterica serovar Typhi (*S. Typhi*) es un patógeno exclusivo del ser humano perteneciente a la Familia *Enterobacteriaceae*. Es el agente causal de la fiebre tifoidea, un problema de Salud Pública a nivel mundial, con una incidencia anual estimada en 21 millones de casos (Crump y cols, 2004). En Chile, aunque el número de casos disminuyó como resultado de las medidas implementadas para prevenir la epidemia de cólera, continúa siendo una enfermedad endémica. Esto porque la prevención de la tifoidea es un problema complejo, que requiere de una gran inversión en saneamiento ambiental y educación de la población, por lo que su erradicación es difícil en países subdesarrollados y en vías de desarrollo. En consecuencia, la aparición de brotes epidémicos constituye un riesgo permanente.

La infección por *S. Typhi* se produce por ingestión de agua o alimentos contaminados con la bacteria. En el estómago es capaz de resistir el pH ácido y pasa rápidamente al intestino delgado. En el íleo distal, a través de las células M de las placas de Peyer y de las células epiteliales, alcanza el subepitelio donde es fagocitada por los macrófagos. En estos sobrevive y alcanza los nódulos linfáticos mesentéricos donde se multiplica. Desde allí entra a la sangre dando lugar a la bacteremia primaria, la que es de carácter subclínico, resiste a la acción lítica del complemento y se disemina por todo el organismo. La bacteria es removida desde la sangre por macrófagos residentes del bazo, hígado y médula ósea, donde continua proliferando. El reingreso a la sangre (bacteremia secundaria) marca el inicio de los síntomas clínicos de la enfermedad. Desde el hígado, a través de la vesícula biliar, la bacteria vuelve al tracto digestivo, alcanzando las placas de Peyer por segunda vez, pero en

esta ocasión se produce la inflamación, ulceración y necrosis del tejido. La perforación del tejido necrótico puede eventualmente dar lugar a peritonitis o septicemia generalizada, siendo esta la causa más común de muerte por la enfermedad

Lipopolisacárido.

Una de las estructuras relevantes para la virulencia de *S. Typhi* y de otras enterobacterias es el lipopolisacárido (LPS). Esta molécula se encuentra en la membrana externa de las bacterias Gram negativas y debido a que es un componente mayoritario de la superficie bacteriana, media las interacciones de la bacteria con el medio ambiente. De hecho, constituye el antígeno inmunodominante y define muchas de las interacciones patógeno-hospedero (Rietschel y cols., 1994). Además, durante la multiplicación y la muerte bacteriana, el LPS es liberado de la superficie, constituyendo una potente toxina. Esta “endotoxina” es responsable de las manifestaciones tóxicas de las infecciones severas por Gram negativos, que desembocan en inflamación generalizada y “shock tóxico” (Raetz, 1990; Raetz y cols., 1991; Raetz, 1993; Rietschel y cols., 1994; Raetz, 1996).

El LPS está constituido por tres dominios unidos covalentemente: i) el lípido A, un disacárido de glucosamina acilado y fosforilado que constituye el ancla hidrofóbica del LPS en la membrana externa (Raetz, 1990; Raetz, 1996); ii) la región del “core”, un oligosacárido fosforilado constituido por heptosas y hexosas que conecta los otros dos dominios del LPS y es esencial para la viabilidad de la bacteria (Schnaitman y Klena, 1993; Raetz, 1996; Raetz y Whitfield, 2002); y iii) el polisacárido O, un polímero de oligosacáridos formado generalmente por unidades de cuatro a seis azúcares, repetidas

hasta 40 veces en *S. Typhi*, que se proyecta hacia el exterior de la superficie, también llamado antígeno O (AgO) (Reeves, 1993).

La biosíntesis y ensamblaje del LPS es un proceso complejo que involucra un gran número de genes agrupados en “clusters” que contienen uno o más operones (Reeves y cols., 1996; Raetz, 1996; Raetz y Whitfield, 2002). En *Salmonella* los operones *waa* y *wba*, codifican las proteínas necesarias para la biosíntesis y ensamblaje del “core” y del AgO, respectivamente.

Aunque existe bastante información sobre la bioquímica y genética de la síntesis del LPS, los mecanismos regulatorios que modulan su producción son poco conocidos. No obstante, está claramente establecido que la estructura del LPS es dinámica, presentando modificaciones en respuesta a señales ambientales. En patógenos, como *S. Typhi*, estos cambios favorecerían el establecimiento y la persistencia del patógeno en el hospedero (Lerouge y Valderleyden, 2001; Preston y Maskell, 2002).

Modulación del LPS por condiciones ambientales.

Reportes anteriores han señalado que la producción del LPS es modulada por las condiciones ambientales. Por ejemplo la activación del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ en respuesta a la baja disponibilidad de Mg^{2+} y acidez moderada, condiciones que son similares a las que se encuentran dentro de los macrófagos, produce cambios significativos en la estructura de la porción lípido A-core del LPS. Estos se traducen en una reducción de la carga negativa de la molécula, lo que contribuiría a la resistencia de la bacteria a los péptidos catiónicos y, posiblemente, a su sobrevivencia en los macrófagos (Stinavage y cols., 1989; Ernst y cols., 2001; Gunn, 2001). Respecto al AgO, diversos trabajos han demostrado que también está sujeto a

variaciones estructurales por cambios del medio ambiente. Por ejemplo, *Helicobacter pylori* modifica el AgO en respuesta al pH del medio. Así, a pH 5 se expresan moléculas de AgO de alto peso molecular que están ausentes en bacterias cultivadas a pH 7, lo que podría contribuir a la resistencia al ácido y a la sobrevivencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica (McGowan y cols., 1998). Recientemente, Delgado y cols. (Delgado y cols., 2006) demostraron que en *Salmonella*, en respuesta a bajo Mg^{2+} y a la presencia del ion Fe^{3+} , se produce un aumento en la transcripción del gen *wzz*, el cual codifica la proteína que determina el largo de la cadena de AgO, lo que modifica la estructura de la molécula de LPS. También en *S. Typhimurium*, la producción de LPS con cadenas de AgO muy largas aumenta cuando la bacteria se expone a suero inactivado (Murray y cols., 2003). En suma, estos antecedentes sugieren la importancia de las condiciones ambientales para la producción del LPS, y que estas condiciones influyen para que el LPS modifique su estructura, lo que repercute en la adaptación de la bacteria al medio ambiente.

Resultados recientes de nuestro laboratorio han demostrado la importancia de la producción de LPS en etapas claves para la infección por *S. Typhi* (Hoare y cols, 2006). Se ha visto que la presencia de AgO de alto peso molecular es esencial para la resistencia al suero. Por otro lado, también se observó que el oligosacárido “core” de la molécula es necesario para la invasión de *S. Typhi* a células HEp-2. Por lo tanto, una modulación fina de la producción del LPS, capaz de responder a los ambientes que va encontrando secuencialmente durante la infección, puede ser de gran relevancia para exponer la o las estructuras necesarias para la interacción con el hospedero.

Regulación de la producción del Antígeno O de *S. Typhi*.

Investigaciones de nuestro laboratorio en línea con lo expuesto más arriba, han demostrado que la biosíntesis del AgO es regulada durante el crecimiento, aumentando en la fase exponencial tardía y estacionaria (Rojas y cols., 2001). Como se mencionó, los genes necesarios para la producción del AgO están codificados en el operón *wba*. Debido al tamaño de este operón (17 Kb), para que su transcripción sea completa se requiere la actividad de un factor de antiterminación transcripcional llamado RfaH (Rojas y cols., 2001), que es el único regulador conocido para la expresión de este operón. Bittner y cols. (2004) demostraron que en *S. Typhi* este factor es indispensable para la producción de AgO. La transcripción del gen *rfaH* y la producción del AgO correlacionan temporalmente, presentando un aumento en la transición a fase estacionaria. Además, el aumento de la transcripción de *rfaH* se tradujo en un aumento del nivel celular de la proteína RfaH (Carter, 2004).

Factor de antiterminación RfaH.

Esta proteína es homóloga al factor NusG y regula positivamente la transcripción de los operones que contienen una secuencia de 8 pb llamada *ops* (operon polarity supresion) localizada en la región 5' no codificante de ciertos operones (Nieto y cols., 1996; Bailey y cols., 1997). Esta secuencia induce una pausa en el complejo de elongación de la transcripción, tanto *in vitro* como *in vivo* (Santangelo y Roberts, 2002). El mecanismo por el cual RfaH regula la transcripción de estos operones (incluido *wba*) es desconocido, pero se postula que se uniría al complejo de elongación pausado (o detenido) en la secuencia *ops* (operon polarity supresor),

haciendo a este complejo resistente a la terminación prematura (Artsimovitch y Landick, 2002).

Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que para la regulación fase-dependiente de la expresión de *rfaH* se requiere la función del factor sigma alternativo RpoN (σ^{54} , σ^N). Esto quedó en evidencia al fusionar la secuencia promotora de *rfaH* con el reportero *lacZ* en una mutante $\Delta rpoN$. Se demostró que en la mutante nula se suprimió la expresión diferencial de *rfaH*, así como también la regulación del AgO por la fase de crecimiento. Además, la limitación de nitrógeno, una condición que activa RpoN, aumentó significativamente tanto la expresión de *rfaH* como la síntesis de AgO (Bittner y cols, 2002).

Factor sigma alternativo RpoN.

El factor sigma RpoN participa en la transcripción de múltiples genes que constituyen un regulón. Estos genes están involucrados en procesos que van desde la utilización de fuentes de nitrógeno y de carbono, metabolismo energético, modificación del RNA, síntesis de flagelo y pili, quimiotaxia, síntesis de proteínas de membrana externa y cápsula, respuesta a shock térmico e, incluso, la expresión de otros factores sigma (revisado en Merrick, 1993 y en Buck y cols., 2000). Debido a la cantidad de genes regulados por RpoN, su participación en la transcripción de *rfaH* en *S. Typhi* podría ser de a través de la participación de algún gen que esté dentro del regulón de RpoN y no de forma directa.

La gran diversidad de funciones reguladas por RpoN se explica por el mecanismo de la activación transcripcional mediada por este factor sigma. De hecho, constituye una clase aparte, ya que posee propiedades muy distintas al resto de los

factores sigma: i) su secuencia no presenta homología con otros factores sigma, ii) dirige a la RNA polimerasa a promotores con motivos conservados en las regiones -24 y -12, donde una mutación en estas bases provoca la pérdida de la transcripción (Wang y cols., 1998) y iii) la unión de RpoN-RNA polimerasa-core forma un complejo cerrado en el promotor, que es incapaz de isomerizar a un complejo abierto en ausencia de un regulador positivo. Por lo tanto, y dado que en la mayoría de las bacterias los niveles intracelulares de RpoN son constantes (Jishage y cols., 1996; Jurado y cols., 2003), la regulación mediada por este factor sigma es absolutamente dependiente de su activación por proteínas activadoras específicas.

“Enhancer Binding Proteins”.

Las proteínas activadoras de RpoN se unen a secuencias localizadas entre 100 y 200 pb río arriba del promotor que funcionan independientemente de su orientación, por lo que estas regiones son semejantes a los “enhancers” eucarióticos y se las denomina “enhancer binding proteins” (EBPs) (Shingler, 1996; Buck y cols., 2000; Reitzer y Schneider, 2001). Una característica común a todas las EBPs es que poseen un dominio altamente conservado de unión a RpoN que une e hidroliza ATP (Nº de acceso Pfam PF00158). Además, la mayoría de las EBPs posee en el extremo C-terminal un dominio hélice-vuelta-hélice de unión al DNA (Nº de acceso Pfam PF02954) y un dominio regulatorio N-terminal, sensor de una determinada condición ambiental, que responde a alguna vía de transducción de señales, con el resultado final de gatillar la actividad ATPásica intrínseca de la proteína (Studholme y Dixon, 2003).

Como la actividad de las EBPs es regulada por una amplia variedad de señales ambientales, el factor sigma alternativo RpoN dirige la transcripción de los genes necesarios para la adaptación a muy variadas condiciones fisiológicas. Aunque estas vías son diversas, el mecanismo final es el mismo y consiste en gatillar la actividad ATPásica de una EBP, lo que resulta en la formación del complejo abierto y el inicio de la transcripción. El hallazgo de la EBP que participe en la transcripción de *rfaH* en *S. Typhi* daría cuenta de la vía fisiológica involucrada en la regulación de la producción del AgO.

De acuerdo con los antecedentes expuestos en este trabajo se propuso la siguiente Hipótesis: El factor sigma de estrés RpoN regula la expresión de *rfaH* en *S. Typhi*, mediante la unión directa a la región promotora de *rfaH* o indirectamente a través de proteínas accesorias.

El objetivo general del trabajo es:

Determinar el mecanismo de activación de RfaH mediado por RpoN.

Objetivos específicos:

1. Clonar las regiones promotoras de *rfaH* en el vector reportero pFZY1
2. Clonar, sobreexpresar y purificar RpoN de *S. Typhi*.
3. Determinar la unión de RpoN a la región promotora de *rfaH*.
4. Identificar las probables proteínas que activan a RpoN durante la regulación de *rfaH* en *S. Typhi*.

2.- Materiales y Métodos

2.1. Reactivos.

De Difco Laboratories (Detroit, MI, E.E.U.U.) se obtuvo: Triptona, extracto de levadura, Bacto-Agar.

De Omega Bio- Tek, Inc (Doraville, GA, E.E.U.U.) se obtuvo: E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit I.

De Gibco BRL (Grand Island, NY, E.E.U.U.) se obtuvo: Dodecilsulfato de sodio (SDS), Tris, acrilamida, bisacrilamida, bromuro de etidio, agarosa.

De Promega (Madison, WI, E.E.U.U.) se obtuvo: DNA ligasa T₄, (γ -³²P) ATP, pGEM[®] – T Easy Vector System I, Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System.

De Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, E.E.U.U.) se obtuvo: DNA Ladder 1Kb, DNA Ladder 100 bp, Taq DNA polimerasa, T₄ polinucleótido Quinasa, Fosfatasa alcalina intestinal de bovino (CIAP) dTTP, dCTP, dATP, dGTP, ATP, las enzimas *EcoR1*, *XhoI* y *NdeI*, los partidores RfaH2, RfaHint2, RfaH115, RfaH219, RpoN1, RpoN2, WpspF-1, WpspF-2, pspF-1, pspF-2, WfhIA-1, WfhIA-2, fhIA-1, fhIA-2, WtyrR-1, WtyrR-2, tyrR-1, tyrR-2, WclpB-2, clpB-1, clpB-2.

De Merck Química Chilena Soc. Ltda. se obtuvo: Cloruro de sodio, sulfato de magnesio heptahidratado, ácido cítrico monohidratado, glucosa, cloroformo, cloruro de potasio, cloruro de magnesio hexahidratado, glicerol, ácido clorhídrico, isopropanol, ácido acético glacial, ácido peryódico, hidróxido de sodio, amoníaco, nitrato de plata, ácido bórico, formaldehído 37%, alcohol isoamílico, fenol, acetato de sodio, etanol absoluto.

De Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, E.E.U.U.) se obtuvo: kanamicina (Kan), ampicilina (Amp), cloranfenicol (Cam), L-arabinosa (Ara), orto-nitrofenilgalactopiranosido (ONPG), isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG), β -

Mercaptoetanol, azul de bromofenol, Xileno-cianol, proteinasa K, persulfato de amonio (APS), N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED), tricina, Fluoruro fenilmetilsulfonil (PMSF), 5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactopiranosido (X-Gal), ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA), acetato de amonio, filtros Millipore 0,25 μm .

De CESAT, Universidad de Chile (Santiago, Chile) se obtuvo: los partidores SP6, T7, T7t, WyaA-1, WygaA-2, WyieN-1, WyieN-2, WclpB-1, ygaA-1, ygaA-2, yieN-1, yieN-2, RfaHP2_1, RfaHP2_2.

2.2. Cepas bacterianas. Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio y sus propiedades relevantes se muestran en la tabla 1.

2.3. Plasmidios. Los plasmidios utilizados en este estudio y sus propiedades relevantes se muestran en la Tabla 2.

2.4. Partidores utilizados. Las secuencias de los partidores se muestran en la Tabla 3.

2.5. Medios y condiciones de cultivo. Las bacterias se cultivaron a 37°C en forma aeróbica en caldo Luria (CL, triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 5 g/L). Los cultivos en medio sólido agar Luria (AL) se llevaron a cabo en el mismo medio base conteniendo 15 g/L de Bacto agar. Aquellas cepas que poseían el plasmidio de replicación termosensibles pKD46, se incubaron a 30°C. Cuando fue necesario curarlas, las cepas se crecieron sin selección a una temperatura no permisiva (42°C). Los antibióticos se utilizaron a las siguientes concentraciones finales: Amp 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Kan 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Cam 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Nal 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El indicador

cromogénico X-Gal para la actividad β -galactosidasa se utilizó a una concentración final de 40 μ g/mL.

Tabla 1. Cepas bacterianas.

Cepa	Genotipo / Fenotipo relevante	Fuente o Referencia
<i>Salmonella enterica</i>		
serovar Typhi		
Ty2	cepa silvestre	I.S.P.*
R100	Ty2 Δ clpB, Kan ^R	Este trabajo
R200	Ty2 Δ fhIA, Kan ^R	Este trabajo
R300	Ty2 Δ pspF, Kan ^R	Este trabajo
R400	Ty2 Δ tyrR, Kan ^R	Este trabajo
R500	Ty2 Δ ygaA, Cam ^R	Este trabajo
R600	Ty2 Δ yieN, Cam ^R	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F ⁻ ϕ 80 lacZ M15 endA recA hsdR (r _K m _K) supE thi gyrA relA Δ (lacZYA-argF)U169	Stock del laboratorio
BL21(λ D3)	F ⁻ ompT gal [dcm] [lon] hsdS B (r _B m _B); cepa E. coli B), profago λ con la polimerasa del fago T7.	Stock del laboratorio
BW25113/pKD46	Δ (araD-araB)567 Δ lacZ4787 lacIp-4000(lacI ^Q) λ -poS396(Am) rph-1 Δ (rhaD-rhaB) 568 rrnB-3 hsdR514 . Cepa portadora del plasmidio pKD46.	Datsenko y Wanner, 2000
BW25141/pKD3	Δ (araD-araB)567 Δ lacZ4787 lacIp-4000(lacI ^Q) Δ (phoB-phoR)580 λ -gal U95 Δ uidA3::pir ⁺ rpoS396 (Am) Δ endA9::FRT rph-1 Δ (rhaD-rhaB) 568 rrnB-3 hsdR 514. Cepa portadora del plasmidio pKD3.	Datsenko y Wanner, 2000
BW25141/pKD4	Δ (araD-araB)567 Δ lacZ4787 lacIp-4000(lacI ^Q) Δ (phoB-phoR)580 λ -gal U95 Δ uidA3::pir ⁺ rpoS396 (Am) endA9::FRT rph-1 Δ (rhaD-rhaB)568 rrnB-3 hsdR514. Cepa portadora del plasmidio pKD4.	Datsenko y Wanner, 2000

* Instituto de Salud Pública

Tabla 2. Plasmidios utilizados en el presente estudio.

Plasmidio	Características	Fuente o Referencia
pKD46	<i>bla</i> P _{BAD} <i>gam bet exo</i> pSC101 oriTS, Amp ^R	Datsenko y Wanner, 2000
pKD3	<i>bla</i> FRT <i>cat</i> FRT PS1 PS2 ori R6K, Amp ^R , Cam ^R	Datsenko y Wanner, 2000
pKD4	<i>bla</i> FRT <i>aph</i> FRT PS1 PS2 ori R6K, Amp ^R , Kan ^R	Datsenko y Wanner, 2000
pCP20	<i>bla cat</i> cl857 IPR flp pSC101 oriTS, Cam ^R	Datsenko y Wanner, 2000
pGEM-T easy	vector de clonamiento, Amp ^R	Promega
pFZY1	vector de clonamiento sin promotor, Amp ^R F' <i>lac</i> replicón, <i>lacZ</i> ⁺ <i>Y</i> ⁺ <i>A</i> ⁺	Koop y cols., 1987
pCE334	pFZY1 que contiene un fragmento de 334 pb de la región promotora del gen <i>rfaH</i> de <i>S. Typhi</i> Ty2, Amp ^R	Bittner y cols., 2004
pRS219	pFZY1 que contiene un fragmento de 219 pb de la región promotora del gen <i>rfaH</i> de <i>S. Typhi</i> Ty2, Amp ^R	Este trabajo
pRS215	pFZY1 que contiene un fragmento de 215 pb de la región promotora del gen <i>rfaH</i> de <i>S. Typhi</i> Ty2, Amp ^R	Este trabajo
pRS115	pFZY1 que contiene un fragmento de 115 pb de la región promotora del gen <i>rfaH</i> de <i>S. Typhi</i> Ty2, Amp ^R	Este trabajo
pET-21b (+)	Vector de clonamiento con el promotor y el terminador del fago T7 que contiene en la región C-terminal secuencias que codifican para 6 histidinas (Hys Tag), usadas para la purificación, Amp ^R .	Novagen.
pFA-1	pET-21b(+) que contiene insertado el marco lectura abierto de RpoN de <i>S. Typhi</i> . Amp ^R	Este trabajo

Tabla 3. Partidores utilizados en el presente estudio.

Nombre	Secuencia
RfaH2	GTG ATA TTT CAT GGC GTC CAT TGT A
P57	TGG CAA ACA GAG ATT GTG
RfaHint2	AAG GCC TTC GTT TTC CGC GTA CCA TTT TT
RfaH115	TTA GCG TTG GTT GCC AGA GTT C
RfaH219	ATC CAG ATA CGG CTT AAA GGA TG
RfaHP2_1	GGC ATG GCG TAA CCT TTA GGA T
RfaHP2_2	GCC GTA TAA TGA TGC GCT TAC C
SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
T7t	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G
rpoN-C-Xho I	AAC CAG CTG TTT GCG TTG GTT TGA C
rpoN-N- Nde I	ATG AAG CAA GGT TTG CAA CTC AGG C
WclpB-1	TGC GTC TGG ATC GTC TTA CTA ACA AAT TCG <u>TGT AGG</u> <u>CTG GAG CTG CTT CG</u>
WclpB-2	AGG ATT TGC TGC GCC AGT GGG TTT TCG ATC TGC TGT TGA <u>ACA TAT GAA TAT CCT CCT TAG</u>
WfhIA-1	ACG ACT TAT ACC TAT AAT TCA TTT ACC GTT TTC GCA CCG <u>TGT GTA GGC TGG AGC TGC TTC G</u>
WfhIA-2	GGC AGT CAT ATC CGG CAG CGA CAG TTG TAG CAC ATT <u>GCA TAT GAA TAT CCT CCT TAG</u>
WpspF-1	TTT TAT ATT ATT GAT AGT TAA GGA ATT ATT TCG TTT TAG <u>TGT AGG CTG GAG CTG CTT CG</u>
WpspF-2	GTT CGG CGG GAT AGC GTT GAA AAG GAT CGA TAA CAA TTT <u>CCA TAT GAA TAT CCT CCT TAG</u>
WtyrR-1	TGA CCC GCG AAT TAC TTG ATT TAC TGG TGT TAC GTA <u>GGT GTA GGC TGG AGC TGC TTC G</u>
WtyrR-2	GAT ATT TAT TTT TCT ACT CTT CAC CCT TCT TCT GGC TCA <u>CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG</u>
WygaA-1	TCA GGA TCG TTT TCA GCG GCT GAT TAC TAC <u>GTG TAG</u> <u>GCT GGA GCT GCT TC</u>
WygaA-2	TTC AGT CCC AGA CGC TTC GCC AGC CGC <u>ATA TGA ATA</u> <u>TCC TCC TTA G</u>

WyieN-1	TGA GAA GGG GCT GTA TGA ACG TAG TCA CGG <u>TGT AGG</u> <u>CTG GAG CTG CTT C</u>
WyieN-2	TTC TCC TAC ATC CTG CAG GCT GGC CTC AAT <u>CAT ATG</u> <u>AAT ATC CTC CTT AG</u>
clpb-1	TTT AGC AAA AGA TGC GCA AG
clpb-2	CCC GTT TTA TTC AAA TTT GT
fhIA-1	GAA GGA AAA CTG GTG ATT GC
fhIA-2	CTT TAT CAA TAC CCA ATC GC
pspF-1	GTA GCC TGT TCA ATA CGA CG
pspF-2	ATT TGC AAA GTG TAT CGC AC
tyrR-1	CTG GAT GTC TCA GGA TCT GG
tyrR-2	ATG CCG GAG GAT ATT TAT TT
ygaA-1	CAC AAA CTC ACG GCT AAA CT
ygaA-2	TCC TTC AGT CCC AGA CGC TT
yjeN-1	CCA ATA GCT GCG AGG GTA AT
yjeN-2	TAT TTA GCG TAT CCA GCG TC

Las secuencias que aparean con zonas de los plasmidios pKD3 y pKD4 están subrayadas (ver más adelante).

2.6. Técnicas bioquímicas.

2.6.1. Ensayo de actividad β -Galactosidasa. Las cepas bacterianas se cultivaron en 5 mL de CL con los antibióticos correspondientes a 37°C durante toda la noche. De estos cultivos se sembraron 200 μ L en 200 mL de CL con Amp y se incubó a 37°C con agitación orbital (200 RPM). Cada 30 min se tomó una alícuota de 1 mL y se midió la DO₆₀₀. Cuando el cultivo alcanzaba la densidad óptica deseada se tomaron alícuotas de 0,2 mL y se llevaron a un volumen final de 1 mL con amortiguador Z (Na₂HPO₄ 60 mM, NaH₂PO₄ 40 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 1 mM, pH 7, y β -mercaptoetanol 50 mM agregado al momento de usar). Las células se permeabilizaron con 20 μ L de CHCl₃ y 10 μ L de SDS al 0,1% agitando

vigorosamente en vortex durante 15 seg. Se incubó a 30°C durante 10 min y se agregó 0,2 mL del sustrato orto-nitrofenilgalactopiranosido (ONPG) (4 mg/mL). Al cabo de 15 min, la reacción se detuvo agregando 0,5 mL de Na₂CO₃ 0,5 M y se midió la absorbancia de la reacción enzimática a 420 y 550 nm. La actividad se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{ACTIVIDAD (U Miller)} = \frac{(\text{Abs}_{420\text{nm}} - 1,75 \times \text{Abs}_{550\text{nm}}) \times 1000}{\text{Volumen (mL)} \times \text{Tiempo (min.)} \times \text{DO}_{600\text{nm}}}$$

2.6.2. Determinación de la concentración de proteínas. Se utilizó el kit “Coomasie® Protein plus Assay Reagent Kit” (Pierce) según las instrucciones dadas por el proveedor. Brevemente, se construyó una curva de calibración de absorbancia versus µg de albúmina de suero bovino (BSA). Luego se tomó una alícuota de la proteína a medir y se determinó la absorbancia para extrapolar los µg/µL de proteína.

2.6.3. Electroforesis de proteínas. Los geles de poliacrilamida se realizaron en una cámara mini-Protean II (BioRad). Para el gel resolutivo se mezclaron 1,67 mL de solución de 30% acrilamida total – 0,8% bisacrilamida; 1,25 mL de tampón Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 0,4% SDS; 1,93 mL de H₂O destilada; 25 µL de APS y 2,5 µL de TEMED. Luego de cargar la mezcla del gel resolutivo, se cubrió la solución con 200 µL de isopropanol. Una vez polimerizada la mezcla del gel resolutivo, se retiró el isopropanol y se cargó la mezcla del gel concentrador, que se preparó mezclando 0,43 mL de solución 30% acrilamida total 0,8% bisacrilamida; 0,63 mL de buffer Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 0,4% SDS; 15 µL de APS y 4 µL de TEMED. La cámara de electroforesis se llenó con amortiguador de corrida para proteínas (Glicina 1,44%,

Tris 0,3%, SDS 0,1%). En cada pocillo se cargó la muestra mezclada con amortiguador de carga (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2%, Glicerol 10%, Azul de Bromofenol 0,01%, β -mercaptoetanol 5%). La electroforesis se realizó a 100 Volts constantes. Los geles fueron teñidos con una solución de azul de Coomassie (azul de Coomassie 0,1%, Metanol 45%, ácido acético 10%).

2.7. Técnicas básicas de biología molecular.

2.7.1. Extracción de DNA cromosomal. Las bacterias se cultivaron en 5 mL de CL (con el antibiótico correspondiente) durante la noche a 37°C con agitación. Se centrifugó 1,5 mL de cultivo por 2 min a 10.000 x g. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 560 μ L de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). Se agregaron 30 μ L de SDS 10% y 10 μ L de Proteinasa K (10 mg/mL). La mezcla se agitó suavemente y se incubó por 1 h a 37°C. Luego se agregó $\frac{1}{2}$ volumen de la mezcla cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y $\frac{1}{2}$ volumen de fenol. Se agitó vigorosamente hasta obtener una emulsión y se centrifugó 5 min a 10.000 x g. Se transfirió la fase acuosa (superior) a un tubo limpio y el DNA cromosomal se precipitó agregando 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Se agitó por inversión y se dejó 20 min a -20°C. Luego se centrifugó 15 min a 10.000 x g y el precipitado se lavó con 500 μ L de etanol 70% frío, se centrifugó por 5 min a 10.000 x g, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, el DNA se resuspendió en 100 μ L de H₂O destilada estéril y se mantuvo a 4°C hasta el momento de su uso.

2.7.2. Extracción de plasmidios a gran escala. La cepa se cultivó en 5 mL de CL suplementado con Amp durante la noche. Con este cultivo se inoculó 100 mL de CL con Amp (a una dilución 1/500). Una vez que este cultivo llegó a fase estacionaria,

se centrifugó a 6000 x g por 20 min. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 800 μ L de solución de lisis (Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM, glucosa 50 mM) y después se agregó RNasa hasta llegar a una concentración final de 100 μ g/mL y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Se dividió el volumen en alícuotas de 200 μ L, a las que se agregó 400 μ L de una solución NaOH 0.2 N y SDS 1%, se agitó por inversión y se dejó en hielo durante 20 min. En seguida se agregaron 300 μ L de una solución de acetato de amonio 7,5 N y se dejó incubar hielo por 20 min. Luego se centrifugó por 10 min a 10.000 x g. Se recuperaron 800 μ L de sobrenadante que fueron trapasados a un tubo eppendorf nuevo para ser precipitados con 500 μ L de isopropanol por 20 min a temperatura ambiente. Después se centrifugó por 30 min a 10.000 x g y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente se efectuó un lavado con 500 μ L de etanol 70% frío y se centrifugó por 5 min a 10.000 x g, para descartar el sobrenadante y resuspender en 50 μ L finales de H₂O.

2.7.3 Extracción de plasmidios por kit E.Z.N.A. Se siguieron las instrucciones señaladas por el fabricante. Brevemente, se sedimentó por centrifugación 4,5 mL de cultivo crecido durante la noche para luego ser resuspendido en la solución I. Se agrego solución II, se mezcló la solución resultante por inversión y finalmente se agregó la solución III para nuevamente mezclar por inversión. Se centrifugó 10 min a 10.000 x g y se traspasó el sobrenadante a la columna proporcionada por el fabricante. Luego se lavó con los tampones HB y DNA Wash Buffer. Finalmente se eluyó en 50 μ L de H₂O.

2.7.4. Electroforesis en geles de agarosa. Se prepararon geles de agarosa utilizando concentraciones de 0,7%, 1% y 1,5% en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). Las muestras de DNA a analizar se mezclaron con el volumen adecuado de tampón Blue II 10X (glicerol 20% (v/v), azul de bromofenol 0,25% (p/v), Xileno-cianol 0,25% (p/v), EDTA 0,1 M) antes de ser cargadas en el gel. Se utilizaron estándares de peso molecular para determinar el tamaño amplificado de la muestra de DNA cargada. La electroforesis se realizó a 100 Volts constantes, luego el gel se tiñó por 5 min en una solución de bromuro de etidio (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las bandas de DNA se visualizaron y se fotografiaron sobre un transiluminador UV.

2.7.5. Purificación de DNA desde un gel de agarosa. Se cortó la banda de interés desde un gel de agarosa y se traspasó a un tubo eppendorf de 1,5 mL. Posteriormente, se utilizó el kit “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” de Promega siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante, obteniéndose el DNA de la banda en 50 μL finales de H_2O .

2.7.6. Determinación de la concentración de DNA. Se realizó a partir de una foto Polaroid® de un gel de agarosa con un estándar de peso molecular cuyas bandas tienen una concentración conocida. El estándar utilizado fue GeneRuler™ 1kb DNA Ladder de Fermentas®. La foto fue digitalizada y analizada con el programa UN-SCAN-IT de Silk Scientific. La intensidad (I) de una banda de interés se comparó con la intensidad de una banda de tamaño similar del estándar de peso molecular. Para esto se utilizó la siguiente fórmula:

$$C_x = (I_{ST} * C_{ST}) / I_x$$

Donde:

I_x es la intensidad de píxeles de la muestra

I_{ST} es la intensidad de píxeles del estándar

C_{ST} es la concentración del estándar

C_x es la concentración de la muestra

2.7.7. Digestión de DNA con enzimas de restricción. Para la digestión con *EcoRI* se agregó el tampón 10X suministrado por el proveedor y luego se agregó la enzima. En general para 30 μ L de reacción final se agregó 3 μ L del tampón 10X, 24,5 μ L del material que se quiere digerir y 2,5 μ L de enzima. Se dejó incubar a 37°C durante 2 h. La digestión fue luego verificada y la banda de interés se purificó desde un gel de agarosa. La digestión con *XhoI* y con *NdeI* del plasmidio pGEM T easy que posee el inserto del gen *rpoN* se realizó como sigue: para 30 μ L de reacción final se agregó 3 μ L del tampón 10X, 15 μ L de plasmidio que se quiere digerir, 2 μ L de cada enzima y 8 μ L de H₂O estéril. Se dejó incubar a 37°C durante 2 h. La digestión fue luego verificada y la banda de interés se purificó desde un gel de agarosa.

2.7.8. Transformación de cepas mediante electroporación. Se prepararon células electrocompetentes para lo cual las bacterias se cultivaron con agitación a 37°C en CL hasta una DO₆₀₀ de 0,5. Se centrifugó 3 mL del cultivo a 10.000 x g por 2 min, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 500 μ L de H₂O fría. Se centrifugó nuevamente a 10.000 x g por 2 min, se descartó el sobrenadante y se repitió el mismo procedimiento 3 veces. Finalmente, las células se resuspendieron en 50 μ L de H₂O. Se mezclaron los 50 μ L de esta suspensión con 2 μ L-10 μ L de DNA previamente dializado contra H₂O para eliminar las sales

minerales. Se electrotransformó en un electroporador “*E. coli* Pulser™” (Bio-Rad) a un voltaje de 1,8 KVolts. Inmediatamente después de electroporar se agregó 1 mL de medio CL y se incubó a 30°C por 90 min. Luego se centrifugó a 10.000 x g durante 1 min, resuspendiéndose en 100 µL de CL los que finalmente se sembraron en placas de AL con el antibiótico correspondiente.

2.8. Construcción de fusiones transcripcionales *rfaH-lacZ*

2.8.1. Clonamiento en el vector pGEM®-T easy. Se amplificó la región promotora del gen *rfaH* mediante una reacción de PCR utilizando DNA de *S. Typhi* y la enzima Pfu DNA polimerasa. Se utilizaron las siguientes parejas de partidores (Tabla 3): para el promotor P₂ RfaHP2_1-RfaHP2_2, RfaH2-Rfa115 y para el promotor P₁ RfaH219-RfaHint2. Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes:

Tampón de Reacción 5X	20 µL
dNTPs 10mM	4 µL
P ₁ (25 pmol/µL)	1 µL
P ₂ (25 pmol/µL)	1 µL
DNA	2 µL
H ₂ O	70 µL
Pfu DNA polimerasa (5 U/µL)	2 µL

El programa de amplificación consistió en un ciclo de desnaturalización (94°C x 1 min), 33 ciclos de amplificación (94°C x 30 seg; 55°C x 30 seg; 72°C x 30 seg) y un ciclo de elongación final (72°C x 7 min). El producto de amplificación se purificó desde un gel de agarosa 1,5% como se explicó en el punto y 2.7.5. Luego se agregó una adenina terminal mediante la siguiente reacción por 20 min a 72°C:

Tampón de PCR 10X	5 µL
MgCl ₂ 50 mM	1,5 µL
dATP 10 mM	1 µL
Producto PCR purificado	42 µL
Taq DNA polimerasa (5 U/µL)	0,5 µL

Luego se precipitó el DNA y se resuspendió en 10 µL de H₂O estéril. La ligación de los insertos con el plasmidio pGEM®-T easy se realizó como sigue:

Tampón de Ligación 2X	5 μ L
Producto PCR	3 μ L
pGEM®-T easy	1 μ L
T ₄ DNA ligasa.	1 μ L

Esta reacción se llevó a cabo durante 12 h a temperatura ambiente. Luego se transformó la cepa *E. coli* DH5 α con el producto de la reacción de ligación y se sembró en placas de AL con Amp y X-gal. Se seleccionaron las colonias blancas y se realizó una reacción de PCR de colonias (1 colonia resuspendida en 100 μ L) con los partidores SP6 y T7 (Tabla 3). La ligación se confirmó por la aparición de un amplificado del tamaño esperado en un gel de agarosa de 1,5%. Las condiciones para la amplificación fueron:

Tampón de PCR 10X	10 μ L
MgCl ₂ 50 mM	3 μ L
dNTPs 10 mM	2 μ L
primer 1 (25 pmol/ μ L)	1 μ L
primer 2 (25 pmol/ μ L)	1 μ L
DNA	1 μ L
H ₂ O	81 μ L
Taq DNA polimerasa (5 U/ μ L)	1 μ L

El programa de amplificación para los fragmentos consistió en un ciclo de denaturación (94°C x 1 min), 33 ciclos de amplificación (94°C x 30 seg; 55°C x 30 seg; 72°C x 30 seg) y un ciclo de elongación final (72°C x 7 min).

2.8.2. Sub-clonamiento en el vector pFZY1. Se purificó el plasmidio con la inserción del promotor correspondiente y se digirió con la enzima de restricción *EcoRI* (2.7.7). El inserto liberado se recuperó desde un gel de agarosa para ligarlo en el plasmidio de copia única pFZY1. Por otra parte, el vector fue digerido con *EcoRI* y desfosforilado por tratamiento con 1 μ L de CIAP a 37°C por 30 min. A esta reacción se agregó ½ volumen de una mezcla cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y ½ volumen de fenol. Se agitó vigorosamente hasta obtener una emulsión y se

centrifugó 5 min a 10.000 x g. Se transfirió la fase acuosa (superior) a un tubo limpio y el plasmidio digerido se precipitó y resuspendió en un volumen final de 10 μ L. La reacción de ligación se realizó de la siguiente manera:

Inserto	5 μ L
pFZY1	3 μ L
Tampón de ligasa 10X	1 μ L
T ₄ DNA ligasa	1 μ L

Esta reacción se incubó a temperatura ambiente por 12 h, y luego se utilizó para a transformar la cepa DH5 α . Se sembró de la misma manera que lo mencionado anteriormente, pero se seleccionaron colonias azules. La orientación de la inserción se analizó mediante PCR de colonia como se describió anteriormente. Las parejas de partidores fueron las siguientes: rfaHP2_1–P57, rfaH2–P57 y rfaH219–P57 (Tabla 3). Aquellas colonias que dieron la amplificación esperada en un gel de agarosa de 1,5% se guardaron y se le extrajo el plasmidio para transformar *S. Typhi* mediante electroporación. Amplicones generados con estos mismos partidores, se secuenciaron en el Centro de Biotecnología de la Universidad de Chile y la Unidad de Diversidad Molecular de la facultad de Ciencias Biológicas de la PUC.

2.9. Clonamiento y purificación de *rpoN*.

2.9.1. Clonamiento de *rpoN* en pGEM®-T easy. Se utilizó DNA genómico de *S. Typhi* para amplificar el marco de lectura del gen *rpoN*. Se utilizó la enzima Pfu DNA polimerasa y los partidores rpoN-N-NdeI y rpoN-C-XhoI. Las condiciones para la amplificación se describen en el punto 2.8.1. El producto amplificado se purificó y ligó en pGEM®-T easy y con esta reacción se transformó la cepa *E. coli* DH5 α (ver puntos anteriores).

2.9.2. Clonamiento de RpoN en el vector pET-21b(+). Se purificó el plasmidio pGEM[®]-T easy que contiene clonado el marco de lectura abierto de *rpoN*. El plasmidio fue digerido con las enzimas *NdeI* y *XhoI* (ver 2.7.7) y el inserto liberado fue purificado desde un gel 1% de agarosa. Éste se ligó al plasmidio pET-21b(+), previamente digerido con las enzimas *NdeI* y *XhoI*, como se indica:

Inserto	5 μ L
pET-21b(+)	3 μ L
Tampón de ligasa 10X	1 μ L
T ₄ DNA ligasa	1 μ L

La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 12 h y se electrotransformó la cepa *E. coli* BL21(λ D3) (ver 2.7.8). Para verificar la presencia del vector con el marco de lectura abierto en la cepa BL21 se hizo una reacción de PCR ocupando los partidores *rpoN-N-NdeI* y *rpoN-C-XhoI* (Tabla 3). El plasmidio resultante se denominó pFA-1.

2.9.3. Condiciones para la inducción de RpoN-HisTag. La cepa BL21/pFA-1 se cultivo en CL con Amp. Cuando el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de 0,9 se indujo con 1 mM de IPTG durante 1 h a 37°C.

2.9.4. Preparación del extracto celular. El extracto se preparó a partir de 1 L de cultivo de BL21/pFA-1 inducido con IPTG. El sedimento de 1,8 g se resuspendió en 4 mL de Tampón de unión (50 mM Tris HCl pH 8, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazol), suplementado con PMSF hasta 1 mM final. Se lisaron mediante 4 ciclos de congelamiento a -80°C y descongelamiento por sonicación. El lisado se centrifugó 5 min a 7.000 x g a 4°C, se rescató el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 16.000 x g por 30 min a 4°C, para ser guardado a 4°C.

2.9.5. Purificación de RpoN-HisTag mediante cromatografía afinidad a Ni. El extracto proteico obtenido en el punto anterior se filtró con un filtro Millipore 0,42 μ M y se mezcló con 3 mL de resina Ni-NTA (QIAGEN) (previamente equilibrada con dos volúmenes de Tampón de unión) durante 1h a 4°C con agitación. Posteriormente, la resina con las proteínas se empacó en una jeringa de 10 mL. La cromatografía se realizó de la siguiente manera:

20 lavados con 1 mL de Tampón de unión, 5 mM imidazol
20 lavados con 1 mL de Tampón de unión, 30 mM imidazol
4 eluciones con 1 mL de Tampón de unión, 200 mM de imidazol.

Las fracciones se analizaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida 10%, teñido con Azul de coomassie y se midió la concentración de proteínas. Las fracciones purificadas de mayor concentración se juntaron y dializaron dos veces contra 500 mL de tampón que contenía Tris HCl 20 mM pH 8, 1 mM DTT y 10% glicerol.

2.9.6. Concentración de las fracciones de RpoN-HisTag purificada. Las fracciones dializadas se concentraron mediante ultrafiltración utilizando un tubo Vivaspin 6 (con un corte de 5 KDa) según las condiciones del proveedor. Brevemente, 1 mL de proteína purificada se centrifugó a 16.000 x g a 4°C hasta reducir el volumen a menos de 100 μ L. Posteriormente se analizaron las fracciones de proteína concentrada, y no concentrada mediante electroforesis y se determinó la concentración final de las proteínas.

2.10. Ensayo de retardo de la movilidad electroforética en geles (electrophoretic mobility shift assay, EMSA).

2.10.1. Marcación de la sonda de DNA con (γ - ^{32}P) ATP. La sonda se obtuvo mediante una reacción de PCR utilizando como templado DNA cromosomal de *S. Typhi* y partidores marcados radiactivamente. La marcación se llevó a cabo fosforilando el extremo 5' de los partidores con la enzima Polinucleótido Quinasa de acuerdo al siguiente protocolo:

Partidor RfaH219 (25 pmoles/ μL)	2 μL
Partidor RfaHint2 (25 pmoles/ μL)	2 μL
Tampón 10X	5 μL
T ₄ polinucleótido Quinasa	3 μL
(γ - ^{32}P) ATP 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$	6 μL
H ₂ O	32 μL

La mezcla se incubó en un durante 50 min a 37°C. La reacción se detuvo a 65°C durante 10 min. Paralelamente, se realizó una reacción con ATP frío, para utilizarla en los ensayos de competición. Posteriormente, se realizó la reacción de PCR mezclando 25 μL de la reacción anterior con los siguientes reactivos:

Tampón de PCR 10X	10 μL
MgCl ₂ 50 mM	3 μL
dNTPs 10 mM	2 μL
DNA	1 μL
Taq DNA polimerasa (5 U/ μL)	1 μL
H ₂ O	58 μL

El producto PCR se precipitó con 0,1 vol de acetato de sodio 3M y 2,5 vol de etanol absoluto frío e incubación a -20°C durante 20 min y se centrifugó por 15 min a 16.000 x g. El material precipitado se lavó con 500 μL de etanol 70% frío, se centrifugó por 5 min, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió en 30 μL de H₂O. A esta solución se le agregó 8 μL de Tampón de carga (Glicerol 50%) y se cargaron alícuotas de 10 μL

en un gel de poliacrilamida al 10% para purificar la sonda. El gel de poliacrilamida fue preparado de la siguiente manera:

Poliacrilamida 30%/0,8% bisacrilamida	1 mL
TBE 10X	0,3 mL
H ₂ O	4,6 mL
MgCl ₂ 1M	24 μL
TEMED	4,5μL
APS 10%	100μL

El gel se corrió a 100 V durante 1 h en tampón TBE con 4 mM de MgCl₂. Luego fue expuesto a una película Kodak Biomax MR a temperatura ambiente por 10 min. Mediante esta autorradiografía se localizó el lugar de migración de la sonda y se procedió a cortar el gel. El trozo de gel fue fragmentado y se incubó en 2 mL Tampón P (200 mM de NaCl, 20 mM de Tris HCl, 2mM EDTA) a 42°C durante la noche para eluir el fragmento de DNA marcado. El eluido fue precipitado y resuspendido en un volumen de 30 μL de H₂O. Luego se extrajo una alícuota de 1μL para determinar la radiactividad en un contador de centelleo líquido Beckman. Del mismo modo se purificó la sonda no radiactiva.

2.10.2. Ensayo de unión. La reacción se realizó en una solución de Tris-acetato 20 mM pH 8, poli dI-dC 10 μg/mL, DTT 0,1 mM, EDTA 0,1 mM, glicerol 12,5%, MgCl₂ 4 mM, acetato de sodio 8 mM, NaCl 42 mM con 25 ng de sonda marcada, y 5 μg de RpoN-HisTag en un volumen final de 20 μL. La unión fue realizada incubando la mezcla durante 20 min a temperatura ambiente. Como competidor específico se utilizó la sonda de 219 pb fría. Además se utilizó dos competidores inespecíficos, poli dIdC y un producto de PCR correspondiente a una región no promotora.

2.10.3. Electroforesis. Los geles de poliacrilamida para los EMSA se realizaron en una cámara mini-Protean II (BioRad). La mezcla fue la siguiente: 1000 μ L de solución de 30% acrilamida total – 0,8% bisacrilamida; 250 μ L de Tampón TBE 10X (Tris 890 mM pH 8, ácido bórico 890 mM, EDTA 20 mM), 3694 μ L de H₂O destilada; 50 μ L de persulfato de amonio y 6 μ L de TEMED. La cámara de electroforesis se llenó con amortiguador TBE que contenía MgCl₂ a una concentración final de 4 mM y fue precorrída durante 1 hora a 100 V. Se cargó 10 μ L de la mezcla de unión más 2 μ L de mismo tampón conteniendo 50% glicerol y se corrió por 120 min a 100 V. El gel se secó sobre un papel filtro y se expuso a una película Kodak Biomax MR a -60°C por 24 h.

2.11. Obtención de cepas mutantes de posibles proteínas reguladoras de RpoN (EBPs). Se construyeron mutantes no polares por delección en los genes *pspF*, *tyrR*, *clpB*, *fhIA*, *yjeN* y *ygaA*. Las mutantes se obtuvieron por reemplazo alélico del gen correspondiente por un cassette génico compuesto por el gen *cat* (cloranfenicol acetiltransferasa; resistencia a Cam) o por el gen *aph* (aminoglicósido fosfotransferasa; resistencia a Kan). El reemplazo se realizó mediante una técnica que involucra la recombinación homóloga de productos de PCR utilizando el sistema de recombinación Red del fago lambda (Datsenko y Wanner, 2000) como se describe a continuación.

2.11.1. Obtención del producto de PCR. Se diseñaron partidores de aproximadamente 50 ó 60 pb, cuyos extremos 5' contenían 40 nucleótidos idénticos a las regiones que flanquean al gen a mutar. Por otra parte, el extremo 3' de los partidores contenía 20 nucleótidos cuya secuencia apareaba con secuencias presentes en el plasmidio pKD3 o pKD4 (ver Tabla 3). Estos plasmidios poseen

clonado el cassette génico compuesto por el gen *cat* y *aph*, respectivamente, flanqueado por la secuencia FRT (Tabla 2). La amplificación de este cassette se realizó según el punto 2.8.1, utilizando los partidores de la Tabla 2, y como templado el plasmidio pKD3 o pKD4. El programa de amplificación consistió en un ciclo de desnaturalización (94°C x 2 min), 33 ciclos de amplificación (94°C x 30 seg; 55°C x 30 seg; 72°C x 90 seg) y un ciclo de elongación final (72°C x 10 min). Se obtuvo productos de amplificación de 1,1 Kpb (pKD3) o 1,6 Kpb (pKD4) correspondientes al gen *cat* o *aph* flanqueado por zonas homólogas al gen a mutar. Estos productos se precipitaron con 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío, para ser finalmente resuspendidos en 10 µL de H₂O estéril.

2.11.2. Transformación de *S. Typhi* con el plasmidio pKD46. La mutagénesis se realizó sobre *S. Typhi* Ty2 transformada con el plasmidio termosensible pKD46 (Tabla 2). Éste contiene los genes que codifican para las subunidades de la recombinasa Red del fago λ bajo el control del promotor inducible por arabinosa P_{ara}. Para obtener la cepa Ty2/pKD46, se prepararon células electrocompetentes según el punto 2.7.8., pero con la diferencia que las incubaciones se realizaron a 30°C (el plasmidio pKD46 es termosensible). Finalmente, se seleccionó uno de los clones resistentes a Amp. La cepa Ty2/pKD46 así construida se creció a 30°C y agitación, hasta una DO₆₀₀ de 0,5 en 10 mL de CL con Amp y arabinosa (10 mM) para inducir la expresión de la recombinasa Red.

2.11.3. Transformación de la cepa *S. Typhi*/pKD46 con el producto PCR. Se prepararon células electrocompetentes como se describió anteriormente y se mezclaron 50 µL de bacterias con 10 µL de producto de PCR concentrado y

dializado. Las transformantes fueron recuperadas en CL a 37°C por 1 h para luego ser seleccionadas a 37°C en placas de AL suplementadas con Cam o Kan. El plasmidio pKD46 se eliminó sembrando repetidamente las transformantes en placas de AL con Cam o Kan a 42°C. Finalmente se seleccionaron aquellas colonias resistentes a Cam o Kan y sensibles a Amp.

2.11.4. Confirmación de la mutación mediante PCR. El reemplazo alélico en cada mutante generada se confirmó mediante reacción de PCR utilizando las parejas de partidores (Tabla 3) *clpb-1/clpb-2*, *fhIA-1/fhIA-2*, *pspF-1/pspF-2*, *tyrR-1/tyrR-2*, *ygaA-1/ygaA-2* y *yjeN-1/yjeN-2*, que apareaban en regiones externas al sitio del reemplazo. Como templado se utilizó 1 µL de la suspensión que resulta al resuspender una colonia en 100 µL de H₂O. La reacción de PCR se realizó de la siguiente manera:

Tampón de PCR 10X	1	µL
MgCl ₂ 50 mM	0,3	µL
dNTPs 10 mM	0,2	µL
Primer 1 (25 pmol/µL)	0,2	µL
Primer 2 (25 pmol/µL)	0,2	µL
DNA	1	µL
H ₂ O	7	µL
Taq DNA polimerasa (5 U/µL)	0,1	µL

El programa de amplificación utilizado consistió en un ciclo de desnaturalación (94°C x 2 min), 25 ciclos de amplificación (94°C x 30 seg; 55°C x 30 seg; 72°C x 180 seg) y un ciclo de elongación final (72°C x 10 min). Como control se realizó la reacción de PCR utilizando DNA de *S. Typhi* Ty2. La amplificación se verificó mediante electroforesis analítica en un gel de agarosa al 1,5%.

3.- Resultados

3.1. Caracterización y análisis de la región promotora de *rfaH* en *S. Typhi*.

Un análisis *in silico* previo de la región promotora de *rfaH* con el software “Natural Network Promoter Prediction” (www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html), predijo la existencia de un promotor (P₁) cercano al sitio de inicio de la traducción de *rfaH* (Fig. 1A). Mediante ensayos de extensión del partidador se encontró un sitio de inicio de la transcripción en una adenina cercana a la revelada bioinformáticamente, lo que confirmó la existencia del promotor P₁ (Fig. 1A). Además, este ensayo reveló la presencia de un segundo sitio de inicio de la transcripción ubicado río arriba del promotor P₁, definiendo al promotor P₂ (Fig. 1A). En cada uno de estos promotores se encontró probables cajas de reconocimiento para el factor sigma RpoN, con sus correspondientes secuencias -12 y -24 altamente conservadas (Fig. 1A). La actividad de esta región promotora, correspondiente a la secuencia de 334 pb mostrada en la Fig. 1A, se analizó mediante una fusión al reportero *lacZ* en el vector de copia única pCE334 y fue descrita como dependiente de la fase de crecimiento y bajo la regulación del factor sigma RpoN (Rojas y cols., 2001; Bittner y cols., 2004). Debido a que la actividad β -galactosidasa de esta fusión sería el resultado de la actividad de estos dos probables promotores, cabe preguntarse en qué medida participa cada uno de ellos en la regulación fase-dependiente de *rfaH* y qué implicancias tendría la existencia de estos dos promotores en su regulación.

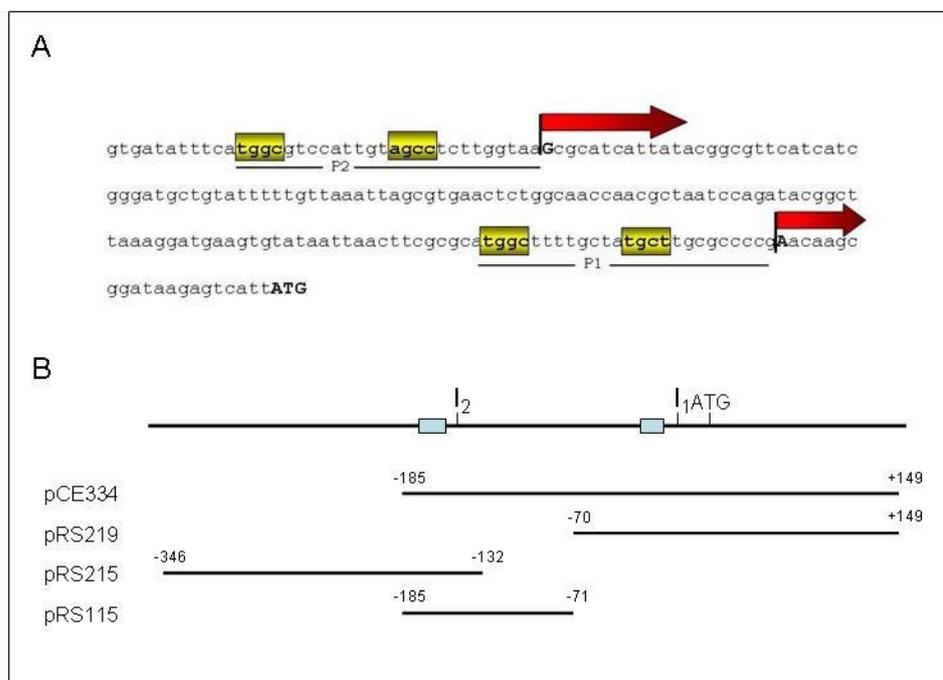


Figura 1. Esquema de la región promotora de *rfaH* de *S. Typhi*. (A). La secuencia promotora de *rfaH* presenta dos sitios de inicio de la transcripción. En la imagen se muestran subrayadas las secuencias de los promotores P₁ y P₂ de *rfaH* y en amarillo las posibles cajas -12 y -24 de unión a RpoN. **(B).** Esquema de los fragmentos de DNA utilizados para construir las fusiones a *lacZ*. Cada fragmento aparece en la ubicación correspondiente respecto a la región promotora del gen *rfaH*. Los números sobre cada fragmento señalan las posiciones 5' y 3', respecto al sitio I1. A la izquierda se muestran los plasmidios generados con cada uno de estos amplicones.

3.1.1. Construcción de los vectores reporteros.

Para de determinar la participación de estos posibles promotores en la regulación fase dependiente de *rfaH* se construyeron fusiones transcripcionales a *lacZ* con fragmentos de PCR que contenían al promotor P₁ ó P₂, en el vector de copia única pFZY1. Los fragmentos de la región promotora de *rfaH* se amplificaron utilizando las siguientes parejas de partidores (Tabla 3): *rfaH2/rfaH115* (115 pb) y *rfaHP2_1/rfaHP2_2* (215 pb), que amplifican la región correspondiente al promotor 2, y *rfaH219/rfaHint2* (219 pb), que amplifica la región correspondiente al promotor P₁. En la Fig. 1B se muestra la posición de cada uno de estos amplicones respecto

a la región promotora de *rfaH*. Luego se clonaron en el plasmidio pGEM®-T easy, como se muestra en la Fig. 2A. Posteriormente, los plasmidios resultantes se digirieron con *EcoRI* y los fragmentos liberados, que contenían la región promotora de *rfaH*, se purificaron y clonaron en el plasmidio pFZY1 frente al gen reportero *lacZ* (Fig. 2A). La presencia y orientación del fragmento de DNA clonado se determinó mediante PCR utilizando los partidores *rfaHP2_1*, *rfaH219* y *rfaH2*, que apareaban con el inserto, y P57 que amplificaba desde el gen *lacZ* presente en el vector. En cada caso se amplificó un fragmento con la orientación correcta y del tamaño esperado (Fig. 2B). Los plasmidios resultantes se denominaron pRS215, pRS115 y pRS219, respectivamente (Fig. 1B). Además se usó el plasmidio pCE334 (Rojas y cols., 2001) que incluye a ambos promotores.

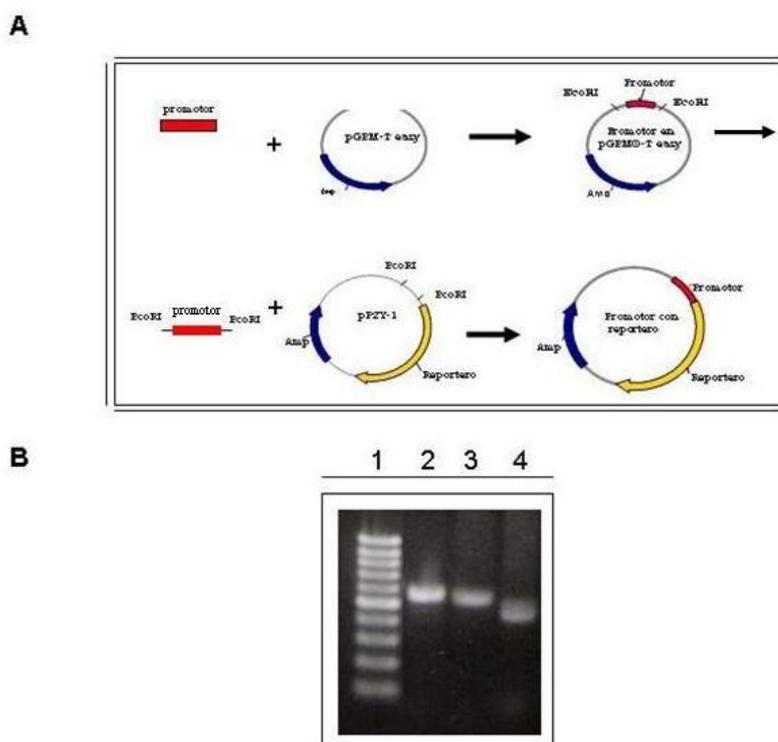


Figura 2. Construcción de los vectores reporteros. (A). Esquema de la construcción de los vectores reporteros usados en el presente estudio. Los detalles se explican en el texto. **(B).** Confirmación por PCR de la inserción de los fragmentos que contienen a los promotores P₁ y P₂ en el vector pFZY1. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio. Carril 1: estándar 100 pb, carril 2: amplificado de fusión 219 en vector pFZY1 a partir de pRS219, 3: amplificado de fusión 215 en vector pFZY1 a partir de pRS215, carril 4: amplificado de fusión 115 en vector pFZY1 a partir de pRS115.

3.1.2.- Ensayo de actividad β -galactosidasa.

Se transformó la cepa silvestre *S. Typhi* con estos plasmidios, y se determinó la actividad β -galactosidasa durante el crecimiento bacteriano. Estos resultados se compararon con el comportamiento de la cepa transformada con el plasmidio pCE334, descrita anteriormente (Rojas y cols., 2001). Como se esperaba, la actividad de este último plasmidio, que contiene a los promotores P_1 y P_2 , mostró una regulación de la transcripción de *rfaH* durante el crecimiento de *S. Typhi*, con un aumento en fase estacionaria (Fig. 3). La actividad del promotor P_1 (pRS219) también presentó una regulación fase-dependiente, similar a lo obtenido con la fusión del plasmidio pCE334 (Fig. 3). La actividad obtenida con esta fusión fue consistentemente mayor a la alcanzada con la fusión del pCE334, llegando a 250 unidades Miller. Por el contrario, la actividad del promotor P_2 (pRS115) mostró una actividad inferior a la de pCE334, con un leve aumento durante el crecimiento, llegando a las 60 unidades Miller en fase estacionaria.

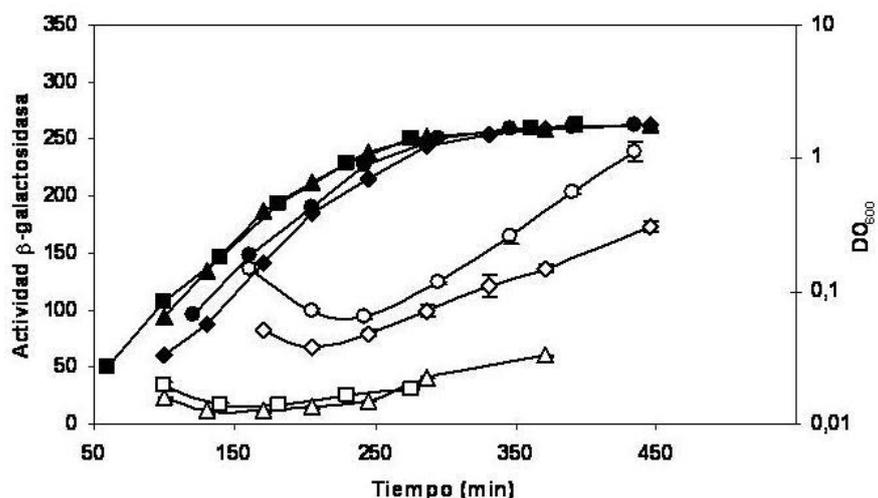


Figura 3. Expresión de las fusiones de los promotores P_1 y/o P_2 de *rfaH* a *lacZ* durante el crecimiento de *S. Typhi*. Los símbolos cerrados representan el crecimiento bacteriano de las cepas transformadas con el correspondiente plasmidio. Los símbolos abiertos representan las unidades de Miller correspondiente a la actividad β -galactosidasa de cada fusión. ◇, ◆, *S. Typhi*/pCE334; ○, ●, *S. Typhi*/pRS219; □, ■, *S. Typhi*/pRS215 y △, ▲, *S. Typhi*/pRS115

Debido a que el factor RpoN requiere la actividad de proteínas activadoras que se unen en regiones distantes a las correspondientes cajas, se construyó una fusión con un fragmento que incluyó alrededor de 200 pb río arriba de la posible caja *rpoN* del promotor P₂ (Fig. 1B), generando el plasmidio pRS215. La actividad de esta construcción mostró una actividad inferior relativamente constante a lo largo de la curva de crecimiento (Fig. 3).

3.2. Clonamiento, sobreexpresión y purificación de RpoN.

Resultados anteriores de nuestro laboratorio mostraron que una mutación puntual que reemplazó la guanina de la posición -25, la cual es esencial para la actividad de RpoN (Wang y Gralla, 1998), por una adenina, no produjo un defecto en la regulación fase-dependiente de la expresión de *rfaH* (Bittner, 2004). Por otra parte, mediante EMSA, utilizando la sonda de 334 pb, no se observó diferencias en los retardos producidos por extractos proteicos de la cepa Ty2 versus una cepa $\Delta rpoN$. Esto sugiere que la probable caja RpoN del promotor P₁ no sería funcional, por lo tanto, RpoN no se uniría directamente a este promotor de *rfaH* y su participación en la regulación de *rfaH* sería indirecta. Para confirmar los resultados anteriores se decidió estudiar la unión del factor RpoN purificado a la región promotora de *rfaH*.

3.2.1 Clonamiento de RpoN en los vectores pGEM[®]-T easy y pET-21b(+).

Para purificar la proteína RpoN de *S. Typhi* se clonó el marco de lectura abierto de *rpoN*, amplificándolo por PCR a partir de DNA genómico. Para esto se diseñaron los partidores específicos *rpoN*-N-NdeI y *rpoN*-C-XhoI (Tabla 3) a partir de la secuencia genómica disponible de *S. Typhi* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi??db=nucleotide&val=AE014613>). En

estos partidores se incluyeron sitios de corte para las enzimas *Nde*I y *Xho*I, respectivamente, con el objeto de dirigir la orientación de la clonación. En la secuencia del partidor 3' se excluyó el codón de término para así fusionar una secuencia de 6 histidinas en el extremo carboxilo terminal de la proteína recombinante. El fragmento amplificado, de aproximadamente 1,4 kb, se ligó al vector pGEM®-T easy, como se muestra en la Fig. 4, y esta construcción se usó para transformar la cepa *E. coli* DH5 α .

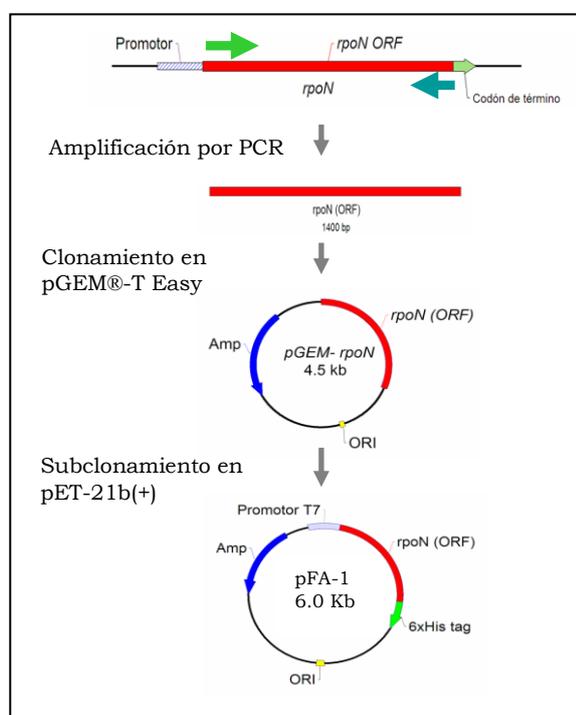


Figura 4. Esquema de la construcción del vector pFA-1, para la sobreexpresión de RpoN-HisTag. Los detalles se describen en el texto.

El plasmidio se purificó, se cortó con las enzimas *Nde*I y *Xho*I y se purificó el fragmento resultante desde un gel de agarosa al 1,5%. Estos fragmentos se ligaron en el plasmidio pET-21b(+) (Novagen), que previamente fue digerido con las mismas enzimas. El producto de la reacción de ligación se empleó para transformar la cepa *E. coli* DH5 α . El plasmidio resultante (pFA-1) se purificó y se transformó la

cepa *E. coli* BL21 (\square DE3). La inserción fue corroborada mediante PCR utilizando los partidores T7 y T7t (Tabla 3).

3.2.2 Sobreexpresión y purificación de RpoN-HisTag de *S. Typhi*.

El marco de lectura clonado en la cepa *E. coli* BL21/pFA1 se utilizó para sobreproducir la proteína recombinante RpoN-HisTag. La cepa inducida con IPTG presentó una intensa banda correspondiente a la proteína recombinante sobreexpresada (Fig. 5A, carril 3).

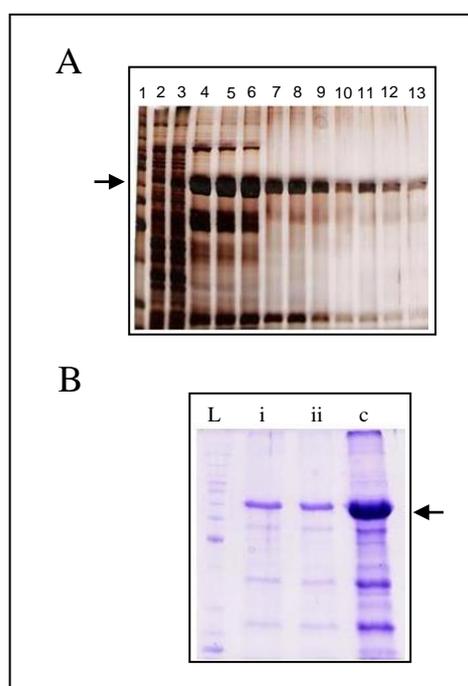


Figura 5. Sobreexpresión y purificación de la proteína RpoN-HisTag mediante cromatografía de afinidad por metales. (A). Las proteínas se analizaron mediante SDS-PAGE al 10% y tinción con plata. Carril 1: estándar de peso molecular; Carriles 2 y 3: proteínas totales de la cepa BL21/pFA1 no inducida e inducida con IPTG, respectivamente; Carriles 4-9: lavados con 20mM de Imidazol; Carril 10-13: elución de RpoN-HisTag con 200mM Imidazol. **(B).** Concentración mediante ultrafiltración de la proteína recombinante RpoN-HisTag. Las fracciones purificadas (i y ii) y la solución concentrada (C) se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con Azul de coomassie. L, estándar de peso molecular

Estudios de solubilidad de la proteína sobreexpresada mostraron que RpoN-HisTag está mayoritariamente asociada a la fracción de proteína insoluble, probablemente debido a la formación de cuerpos de inclusión, no obstante, una cantidad remanente permaneció en la fracción soluble (no mostrado). Se decidió purificar la proteína a partir de esta última fracción, para así favorecer la obtención de la proteína en su estado nativo.

La purificación mediante cromatografía de afinidad a níquel se realizó en condiciones no desnaturalantes. Se realizaron varios ensayos para optimizar las condiciones de purificación. Los lavados con concentraciones crecientes de imidazol permitieron la eliminación de varios polipéptidos unidos con baja afinidad o inespecíficamente (Fig. 5A, carriles 4 al 9). Luego de eluir con 200 mM de imidazol se obtuvieron fracciones altamente purificadas, en las que se pudo observar una proteína de alrededor de 70 kDa (Fig. 5A, carriles 10 al 13), la que representa alrededor de un 90% de la proteína presente en estas fracciones. La masa molecular aparente de la proteína purificada (~ 70 kDa) no corresponde con la masa molecular teórica para esta proteína (~ 55 kDa). Sin embargo, la secuenciación de la construcción en pFA1, mostró que el fragmento de 1,4 kb clonado es idéntico al marco de lectura encontrado en la base de datos. Esta discrepancia en la masa molecular aparente de RpoN ya había sido reportada en un trabajo en que se purificó RpoN de *S. Typhimurium* (Popham y cols., 1991). No obstante, los autores demostraron inequívocamente que la actividad de del factor RpoN se asociaba a esta proteína.

La concentración de proteína en las fracciones purificadas fue de 200 µg/mL en promedio, lo cual es insuficiente para su utilización en ensayos de retardo (Muro-Pastor y cols., 1994). Se decidió entonces concentrar estas fracciones mediante ultrafiltración utilizando el sistema Vivaspin con un corte de 5 kDa. Así se obtuvo

una solución de proteínas con una concentración de 1 mg/mL. En el análisis mediante SDS-PAGE de la solución concentrada (Fig. 5B) se observó la proteína recombinante inalterada, sin evidencias de degradación. Esta fracción concentrada se utilizó para los ensayos de EMSA.

3.2.3 Ensayo de retardo de la movilidad electroforética en geles (EMSA).

Se utilizó la fracción concentrada de RpoN-HisTag purificada (Fig. 5B), la cual se enfrentó a la sonda de 219 pb, correspondiente al promotor P₁ (ver Fig. 1B), marcada radiactivamente con γ -³²P ATP. Bajo estas condiciones, no se observó una banda retardada (Fig. 6, carril 1), consecuentemente tampoco se observó un retardo al utilizar un exceso de sonda fría específica (Fig. 6, carril 4) o un exceso de poli dIdC como sonda inespecífica (Fig. 6, carril 5).

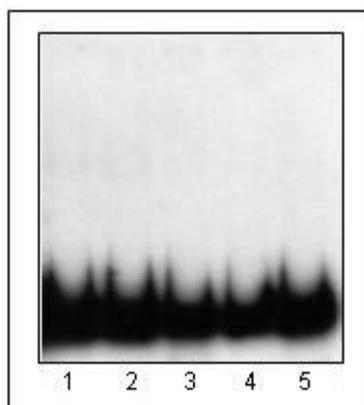


Figura 6. Estudio de la unión de RpoN-HisTag al promotor P₁ de *rfaH*. Ensayo de retardo en geles de poliacrilamida al 7% (EMSA) utilizando una sonda de 219 pb y una fracción purificada de la proteína recombinante RpoN-HisTag de *S. Typhi*. Se aplicó 43 femtomoles de sonda marcada con ³²P y 520 ng de RpoN-HisTag. Carril 1, Sonda 219 pb; Carril 2, sonda 219 pb con RpoN hervida; Carril 3, sonda 219 pb con RpoN; Carril 4, sonda 219 pb con RpoN + 50x sonda fría; Carril 5, sonda 219 pb con RpoN + 50x de DNA competidor inespecífico

Eventualmente, en algunos ensayos se observó una banda retardada, la que, sin embargo, fue desplazada tanto por un exceso de sonda fría como por un exceso de sonda inespecífica (no mostrado). De estos resultados se puede concluir

que el factor sigma alternativo RpoN-HisTag no se une de forma específica al promotor P₁ de *rfaH* y, por lo tanto, la participación de este factor sigma en la regulación transcripcional de *rfaH* es indirecta.

3.3 Proteínas activadoras de RpoN.

Para la expresión de genes dependientes de RpoN se requiere la función de proteínas activadoras, denominadas "enhancer binding proteins" (EBP) (Jurado y cols., 2003). Existe un gran número de estas proteínas, las que responden a distintos estímulos ambientales. Se planteó, entonces, que conociendo cuál EBP es necesaria para la regulación transcripcional de *rfaH* se podría avanzar en la dilucidación de la vía regulatoria involucrada en la expresión fase-dependiente de este gen. La delección de una EBP que participe en la expresión de un promotor bajo el control de RpoN, traería como consecuencia la pérdida de la regulación, la cual se puede determinar con un vector reportero que contenga al promotor en cuestión. El vector reportero utilizado en este caso, pCE334, contiene la secuencia promotora de *rfaH* y presenta una actividad fase-dependiente, bajo el control de RpoN (Bittner y cols, 2002).

Las EBPs tienen como característica principal un dominio conservado de unión a RpoN. Una búsqueda informática para encontrar marcos de lectura abiertos con dominios conservados de unión a RpoN reveló la presencia de 12 posibles EBPs en la secuencia completa del genoma de *S. Typhi*. Anteriormente se estudiaron 4 de estas probables EBPs (Carter, 2004), que se escogieron por tener dominios de respuesta de sistemas de dos componentes. En este proyecto se evaluó la participación de otras 6 EBPs en la regulación fase-dependiente de *rfaH*. Para esto se construyeron mutantes nulas en estos genes según el método descrito por Datsenko y Wanner (2000).

Se obtuvieron 4 cepas transformantes resistentes a Kan (*tyrR*, *pspF*, *fhIA* y *clpB*) y 2 cepas transformantes resistentes a Cam (*yjeN* y *ygaA*), en las cuales el gen *cat* (para las resistentes a Cam) o el gen *aph* (para las Kan^R) están interrumpiendo el gen de la EBP deseada. El genotipo de las cepas mutantes obtenidas se confirmó mediante PCR. En este trabajo los partidores utilizados amplifican DNA de tamaño distinto para la cepa nativa y para la correspondiente cepa con la EBP mutada (Figura 7A-F).

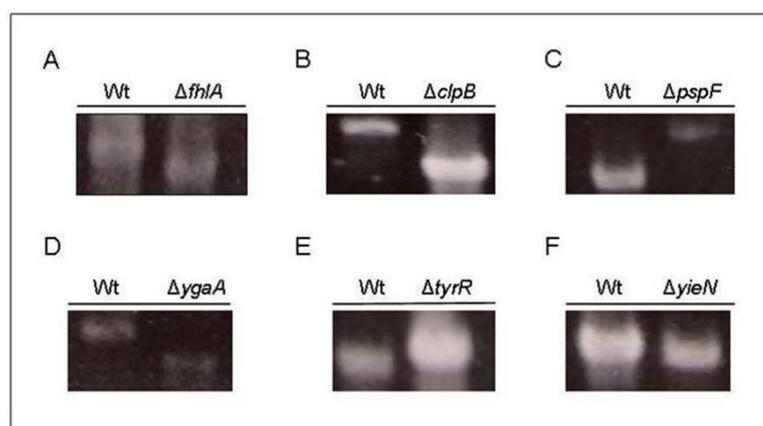


Figura 7. Confirmación mediante PCR de la delección de posibles EBP en *S. Typhi*. (A-F). Se muestra la amplificación de los posibles genes de las EBP en la cepa nativa (Wt) y los correspondientes amplicones para las cepas mutantes en los genes que codifican para las probables proteínas activadoras de RpoN.

Las cepas mutantes obtenidas, fueron transformadas con el plasmidio pCE334. Se ensayó la actividad β -galactosidasa en las etapas exponencial, exponencial tardía y estacionaria de crecimiento. En estos puntos se observó el comportamiento fase-dependiente de la transcripción de *rfaH*, la cual se caracteriza por un aumento desde la fase exponencial tardía hasta la fase estacionaria. Como control se utilizó la cepa *S. Typhi*/pCE334 cuyo comportamiento fue mencionado anteriormente.

En la Fig. 8 se observan las 6 cepas estudiadas y la cepa control *S. Typhi*/pCE334. Las cepas mutantes Δ *pspF*, Δ *tyrR*, Δ *yjeN* y Δ *fhIA* mostraron un

aumento de la actividad β -galactosidasa similar a la cepa nativa. En la cepa $\Delta ygaA$ el nivel de actividad β -galactosidasa fue similar a la cepa silvestre durante la fase estacionaria, sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en la cepa silvestre, el aumento de actividad ocurrió más temprano, durante la fase exponencial media. Por otra parte $\Delta clpB$ mostró un comportamiento similar a la cepa silvestre, pero con una actividad consistentemente menor a la cepa nativa.

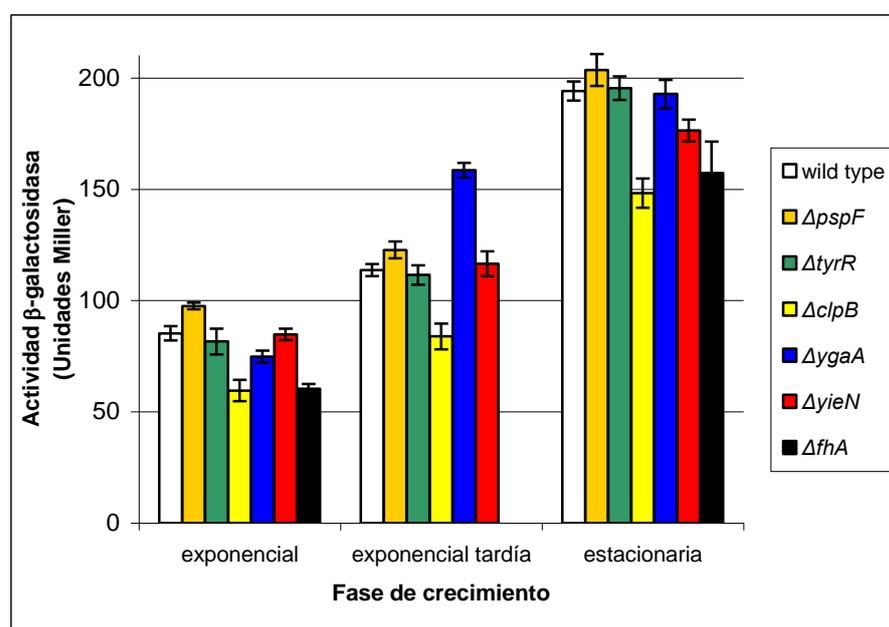


Figura 8. Efecto de la mutación de posibles proteínas activadoras de RpoN sobre la transcripción de *rfaH*. Se muestran las actividades de las correspondientes cepas transformadas con el plasmidio pCE334 en las fases exponencial, exponencial tardía y estacionaria.

4. DISCUSIÓN

En este estudio se investigó el papel del factor sigma RpoN sobre la expresión del antiterminador transcripcional RfaH en *S. Typhi*. Antecedentes de nuestro laboratorio indicaban que en *S. Typhi* la producción de AgO es regulada positivamente por el factor de antiterminación RfaH y que su función es esencial para la síntesis del LPS, ya que mutantes $\Delta rfaH$ producen un LPS carente de AgO y con un “core” truncado (Rojas y cols., 2001). Además, la expresión de *rfaH*, así como la producción de AgO, varían durante el crecimiento bacteriano, alcanzando un máximo en fase estacionaria (Bittner y cols., 2002). En esta regulación, que se ejerce a nivel de inicio de la transcripción, participa el factor RpoN, sin embargo no estaba dilucidado si la participación de RpoN se ejerce directamente sobre *rfaH*, o indirectamente mediante la participación de otros factores, probablemente regulados por RpoN. Asimismo, dado que *rfaH* posee dos promotores, se desconocía cuál es la participación de cada uno de ellos en la regulación fase-dependiente de *rfaH*.

Mediante la construcción de vectores reporteros de copia única, que contienen sólo al promotor P₁ o P₂ (Fig. 1B, Fig. 2A) fusionado a *lacZ*, se demostró que sólo el promotor P₁ es regulado por el crecimiento. El promotor P₂, en cambio mostró una actividad transcripcional que parece contribuir marginalmente a la regulación fase-dependiente del gen *rfaH*. Con estos resultados podemos responder la pregunta mencionada anteriormente: sólo el promotor P₁ es responsable de la regulación fase-dependiente de *rfaH*.

Las disímiles actividades transcripcionales de los promotores P₁ y P₂ sugieren que ambos cumplen funciones fisiológicas diferentes. El promotor P₁ participa en la regulación fase-dependiente de *rfaH*, proceso adaptación a las

condiciones ambientales generadas durante la fase estacionaria. Por otro lado, el promotor P₂, dada su actividad constante, estaría encargado de la transcripción constitutiva de *rfaH*. La existencia de más de un promotor que, mediante la regulación diferencial de su actividad, cumplen papeles fisiológicos distintos en la expresión de un gen se ha descrito en la literatura. Es así como, por ejemplo, Raina y cols., (1995) demostraron en *E. coli* que la expresión de *rpoH*, un factor sigma que se induce bajo condiciones de estrés térmico, es regulada por dos promotores que cumplen roles fisiológicos distintos, siendo uno sólo de ellos el encargado de la inducción de la transcripción de *rpoH* en situaciones de estrés térmico.

Los ensayos de retardo en geles (EMSAs) con la proteína RpoN-HisTag indican que esta proteína no se une directamente al promotor P₁, ya que no se observó un retardo en la movilidad electroforética de la sonda correspondiente. Este resultado fue sorprendente, porque, además de estar *rfaH* sujeto a la regulación por RpoN, este promotor posee una probable caja de reconocimiento (-12 y -24) para RpoN con una alta similitud al consenso descrito (Barrios y cols., 1999). Cabe mencionar que para estos ensayos de retardo se purificó la proteína RpoN recombinante sobreexpresada desde la fracción de proteína soluble, por lo tanto es poco probable que el resultado negativo sea producto de la utilización de una proteína en su estado no nativo. Sin embargo, no se puede descartar que la presencia de la cola de polihistidina pudiera afectar la actividad de la proteína. No obstante, este resultado está en concordancia con una observación no publicada de nuestro laboratorio que muestra que la mutación puntual en una base altamente conservada en el promotor P₁, que sería fundamental para la actividad de RpoN, no afectó la regulación transcripcional de *rfaH* (Bittner, 2004). Por lo tanto, estos resultados nos permiten afirmar que la regulación que ejerce RpoN sobre la

expresión de *rfaH* sería indirecta, es decir, en este proceso intervendría algún otro determinante que probablemente formaría parte del regulón de este factor sigma.

Los genes controlados por RpoN codifican principalmente para proteínas relacionadas con la asimilación de nitrógeno y con el catabolismo de aminoácidos y otros metabolitos (Reitzer y Schneider, 2001; Reitzer, 2003). La definición del regulón RpoN en *E. coli*, y otras enterobacterias, proviene de la recopilación de datos experimentales fragmentados de la literatura. A nuestro entender, no existen estudios a escala global, ya sea de proteómica o genómica funcional, del regulón RpoN en estas bacterias. Sin embargo, recientemente se realizó una definición bioinformática del regulón de *E. coli* (Reitzer y Schneider, 2001), encontrándose un gran número de promotores con potenciales cajas para RpoN, entre ellos genes para algunos sistemas de dos componentes y para el metabolismo de DNA, los que podrían participar en la posterior regulación de la expresión de genes como *rfaH*. En un estudio a escala global de transcriptómica y proteómica realizado con una mutante *rpoN* de *Listeria monocytogenes* (Arous y cols., 2004), se definió un regulón de 77 genes, entre los cuales también se encuentran algunos sistemas de dos componentes y reguladores transcripcionales de la familia AraC. En apoyo de nuestros resultados, la mayoría de ellos serían regulados de forma indirecta por RpoN, así a nuestro parecer, es perfectamente posible que en *S. Typhi* el gen *rfaH* sea regulado indirectamente por RpoN, probablemente por algún factor transcripcional regulado directamente por este factor sigma.

La ruta regulatoria que lleva a la inducción de *rfaH* durante la transición a fase estacionaria es desconocida. Dado que la actividad de RpoN depende estrictamente de la función de proteínas activadoras (EBPs), las que forman parte de rutas de señalización diversas, en este estudio se planteó la hipótesis que conociendo la EBP involucrada en la activación de *rfaH* se podría avanzar en

conocer esta ruta. Nuestros resultados no mostraron una clara relación entre la delección de alguna de las probables EBPs de *S. Typhi* y la regulación fase-dependiente de *rfaH*. Sólo la mutante $\Delta ygaA$ presentó una diferencia con respecto a la cepa silvestre: el aumento en la expresión de *rfaH* ocurrió durante la fase exponencial temprana. La proteína YgaA de *S. Typhi* tiene un 80% de identidad con la EBP NorR de *E. coli*, la que regula la expresión del operón *norVW*, que codifica las proteínas para la detoxificación de óxido nítrico. Así, una explicación para esta observación no es evidente. En cualquier caso, sería interesante analizar el fenotipo del LPS de esta cepa durante el crecimiento para saber si correlaciona con la regulación de *rfaH*. Debido a que no se pudo identificar cabalmente la EBP involucrada en la regulación de *rfaH*, estamos intentando establecer cuál o cuáles son las condiciones ambientales y, mediante una estrategia genética, cuál o cuáles son los reguladores globales involucrados en el fenómeno, para así dilucidar la ruta regulatoria.

En conjunto, nuestros resultados indican que la regulación fase-dependiente de *rfaH* es mediada indirectamente por el factor sigma de estrés RpoN, por la unión de una proteína desconocida regulada por este factor sigma, que actúa sobre el promotor P_1 de *rfaH*.

5.- Conclusiones

Se logró clonar independientemente los promotores P_1 y P_2 de *rfaH*. Ambos promotores tienen una actividad distinta entre sí: el promotor P_1 , aumenta su transcripción desde un estado basal durante el crecimiento exponencial hasta un máximo en la fase estacionaria, por lo que es regulado fase-dependientemente; el promotor P_2 , presenta una actividad significativamente menor que el promotor P_1 durante el crecimiento bacteriano, por lo que contribuye marginalmente a la regulación fase-dependientemente de este gen.

Se logró el clonamiento, sobreexpresión y enriquecimiento de RpoN-HisTag. Los resultados de los ensayos EMSA demuestran que RpoN no se une al promotor P_1 , de forma que su participación en la transcripción de *rfaH* es de modo indirecto.

Se construyeron mutantes nulas en los genes que codifican para las EBP encontradas en *S. Typhi*. Ninguna de ellas participa en la regulación fase-dependiente de RfaH

6.- Bibliografía

Arous S, Buchrieser C, Folio P, Glaser P, Namane A, Hebraud M y Hechard Y. (2004). Global analysis of gene expression in an *rpoN* mutant of *Listeria monocytogenes*. *Microbiology*. **150**:1581-1590.

Artsimovitch I, y Landick R. (2002). The transcriptional regulator RfaH stimulates RNA chain synthesis after recruitment to elongation complexes by the exposed nontemplate DNA strand. *Cell*. **109**:193-203.

Bailey MJ, Hughes C y Koronakis V. (1997). RfaH and the *ops* element, components of a novel system controlling bacterial transcription elongation. *Mol Microbiol*. **26**:845-51.

Bastin DA, Stevenson G, Brown PK, Haase A y Reeves PR. (1993). Repeat unit polysaccharides of bacteria: a model for polymerization resembling that of ribosomes and fatty acid synthetase, with a novel mechanism for determining chain length. *Mol Microbiol*. **5**:725-734.

Bittner M. (2004). Regulación transcripcional del gen *rfaH* de *Salmonella enterica* serovar Typhi: efecto sobre la expresión diferencial del lipopolisacarido (LPS). Tesis para optar al grado de Doctor en Bioquímica. Universidad de Chile.

Bittner M, Saldias S, Altamirano F, Valvano MA y Contreras I. (2004). RpoS and RpoN are involved in the growth-dependent regulation of *rfaH* transcription and O antigen expression in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Microb Pathog*. **36**:19-24.

Bittner M, Saldias S, Estevez C, Zaldivar M, Marolda CL, Valvano MA y Contreras I. (2002). O-antigen expression in *Salmonella enterica* serovar Typhi is regulated by nitrogen availability through RpoN-mediated transcriptional control of the *rfaH* gene. *Microbiology*. **148**:3789-3799.

Buck M, Gallegos MT, Studholme DJ, Guo Y y Gralla JD. (2000). The bacterial enhancer-dependent sigma(54) (sigma(N)) transcription factor. *J Bacteriol.* **182**:4129-36.

Carter J. (2004). Regulación transcripcional del gen *rfaH* de *Salmonella* Typhi. Memoria para optar al Título de Bioquímico. Universidad de Chile.

Crump, J. A., S. P. Luby, y E. D. Mintz. (2004). The global burden of typhoid fever. *Bulletin of World Health Organization* **8**:346-353

Datsenko KA y Wanner BL. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:6640-6645.

Delgado MA, Mouslim C y Groisman EA. (2006). The PmrA/PmrB and RcsC/YojN/RcsB systems control expression of the *Salmonella* O-antigen chain length determinant. *Molecular Microbiology* **60**: 39–50.

Ernst RK, Guina T y Miller SI. (2001). *Salmonella typhimurium* outer membrane remodeling: role in resistance to host innate immunity. *Microbes Infect.* **3**:1327-1334.

Gunn JS. (2001). Bacterial modification of LPS and resistance to antimicrobial peptides. *J Endotoxin Res.* **7**:57-62.

Hoare A, Bittner M, Carter J, Alvarez S, Zaldivar M, Bravo D, Valvano MA y Contreras I. (2006). The outer core lipopolysaccharide of *Salmonella enterica* serovar Typhi is required for bacterial entry into epithelial cells. *Infect Immun.* **74**:1555-1564.

Jishage M, Iwata A, Ueda S y Ishihama A. (1996). Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of four species of sigma subunit under various growth conditions. *J Bacteriol.* **178**:5447-5451.

Jurado P, Fernandez LA y de Lorenzo V. (2003). Sigma 54 levels and physiological control of the *Pseudomonas putida* Pu promoter. *J Bacteriol.* **185**:3379-3383.

Kadrmaz JL, Brozek KA y Raetz CR. (1996). Lipopolysaccharide core glycosylation in *Rhizobium leguminosarum*. An unusual mannosyl transferase resembling the heptosyl transferase I of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **271**:32119-32125.

Koop AH, Hartley ME y Bourgeois S. (1987). A low-copy-number vector utilizing beta-galactosidase for the analysis of gene control elements. *Gene.* **52**:245-56.

Lerouge I y Vanderleyden J. (2002). O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions. *FEMS Microbiol Rev.* **26**:17-47.

McGowan CC, Necheva A, Thompson SA, Cover TL y Blaser MJ. (1998). Acid-induced expression of an LPS-associated gene in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol.* **30**:19-31.

Merrick MJ. (1993). In a class of its own--the RNA polymerase sigma factor sigma 54 (sigma N). *Mol Microbiol.* **10**:903-909.

Muro-Pastor AM y Maloy S. (1994). Proline dehydrogenase activity of the transcriptional repressor PutA is required for induction of the *put* operon by proline. *J Biol Chem.* **270**:9819-9827.

Murray GL, Attridge SR y Morona R. (2003). Regulation of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide O antigen chain length is required for virulence; identification of FepE as a second Wzz. *Mol Microbiol.* **47**:1395-1406.

Ng LC, O'Neill E y Shingler V. (1996). Genetic evidence for interdomain regulation of the phenol-responsive final sigma54-dependent activator DmpR. *J Biol Chem.* **271**:17281-17286.

Nieto JM, Bailey MJ, Hughes C y Koronakis V. (1996). Suppression of transcription polarity in the *Escherichia coli* haemolysin operon by a short upstream element shared by polysaccharide and DNA transfer determinants. *Mol Microbiol.* **19**:705-713.

Pang T, Levine M, Ivanoff B, Wain J y Finlay B. (1998) Typhoid fever - Important issues still remain. *Trends Microbiol.* **6**:131-133.

Popham D, Keener J y Kustu S. (1991). Purification of the alternative sigma factor, sigma 54, from *Salmonella typhimurium* and characterization of sigma 54-holoenzyme. *J Biol Chem.* **266**:19510-19518.

Preston A y Maskell DJ. (2002). Molecular genetics and role in infection of environmentally regulated lipopolisaccharide expression. *Int J Med Microbiol.* **292**:7-15.

Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zahringer U, Seydel U y Di Padova F. (1994). Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* **2**:217-225.

Raetz CR. (1990) Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem.* **59**:129-170.

Raetz CR. (1993). Bacterial endotoxins: extraordinary lipids that activate eucaryotic signal transduction. *J Bacteriol.* **175**:5745-53.

Raetz CR. (1996) Bacterial lipopolisaccharide: a remarkable family of bioactive macroamphiphiles. In: Neidhatr FC, editors, 2nd ed. *Escherichia*

coli and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology., Vol 1. Washington, DC: ASM Press; p. 1035-1063.

Raetz CR y Dowhan W. (1990). Biosynthesis and function of phospholipids in *Escherichia coli*. J Biol Chem. **265**:1235-1238.

Raetz CR, Ulevitch RJ, Wright SD, Sibley CH, Ding A y Nathan CF. (1991) Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. FASEB J. **12**:2652-12660.

Raetz CR y Whitfield C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. Annu Rev Biochem. **71**:635-700.

Raina S, Missiakas D y Georgopoulos C. (1995). The *rpoE* gene encoding the sigma E (sigma 24) heat shock sigma factor of *Escherichia coli*. EMBO J. **14**:1043-1055.

Reeves PR. (1993). Evolution of *Salmonella* O antigen variation by interspecific gene transfer on a large scale. Trends Genet. **9**:17-22.

Reeves PR, Hobbs M, Valvano MA, Skurnik M, Whitfield C, Coplin D, Kido N, Klena J, Maskell D, Raetz CR y Rick PD. (1996) Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. Trends Microbiol. **12**:495-503.

Reitzer L. (2003). Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. Annu Rev Microbiol. **57**:155-176.

Reitzer L y Schneider BL. (2001). Metabolic context and possible physiological themes of sigma(54)-dependent genes in *Escherichia coli*. Microbiol Mol Biol Rev. **65**:422-444.

Rojas G, Saldias S, Bittner M, Zaldivar M y Contreras I. (2001). The *rfaH* gene, which affects lipopolysaccharide synthesis in *Salmonella enterica*

serovar Typhi, is differentially expressed during the bacterial growth phase. FEMS Microbiol Lett. **204**:123-128.

Santangelo TJ, Roberts JW. (2002). RfaH, a bacterial transcription antiterminator Mol Cell. **9**:698-700.

Schnaitman CA y Klena JD. (1993) Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. Microbiol Rev. **57**:655-682.

Shingler V. (1996). Signal sensing by sigma 54-dependent regulators: derepression as a control mechanism. Mol Microbiol. **3**:409-416.

Stevenson G, Andrianopoulos K, Hobbs M y Reeves PR. (1996). Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. J Bacteriol. **178**:4885-4893.

Stinavage P, Martin LE y Spitznagel JK. (1989). O antigen and lipid A phosphoryl groups in resistance of *Salmonella typhimurium* LT-2 to nonoxidative killing in human polymorphonuclear neutrophils. Infect Immun. **57**:3894-3900.

Studholme DJ y Dixon R. (2003). Domain architectures of sigma54-dependent transcriptional activators. J Bacteriol. **185**:1757-1767.

Wang L y Gralla JD. (1998). Multiple in vivo roles for the -12-region elements of sigma 54 promoters. J Bacteriol. **180**:5626-5631.