



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Identificación de los genes regulados por el  
sistema de dos componentes BarA/UvrY de  
*Escherichia coli*

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA:  
CLAUDIA FABIOLA MÉNDEZ CATALÁ

DIRECTOR DE TESIS: DR. DIMITRIS GEORGELLIS

MÉXICO D.F.

MAYO 2005

m 343774



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres que me han apoyado incondicionalmente durante toda mi vida.

A mi familia y amigos que siempre están conmigo compartiendo mis logros.

Al Dr. Dimitris Georgellis por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

A la Unidad de Microarreglos del IFC, en especial al Dr. Jorge Ramirez.

A mis sinodales: Dra. Gloria Soberón, Dra Irma Romero Álvarez, Dr. Laura Camarena Mejía y Dra. Berta María Josefina González Pedrajo.

A mis compañeros de laboratorio: Claudia Rodríguez Rangel (técnico académico), Bernardo Franco, Gabriela Peña, Ana Martínez, Yael Gonzales, Verónica Mondragón, Roxana Malpica, Luis Nuñez y Arturo Martínez por todos los gratos momentos.

Agradezco al Q. Javier de la Mora del laboratorio del Dr. Georges Dreyfus Cortés por su ayuda.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, al Instituto de Fisiología Celular y a sus unidades de apoyo: Cómputo y Biología Molecular.

A DGAPA por el donativo IN218902-3 otorgado para desarrollar este proyecto.

*"Data does not equal information; information does not equal knowledge; and, most importantly of all, knowledge does not equal wisdom. We have oceans of data, rivers of information, small puddles of knowledge, and the odd drop of wisdom."*

Henry Nix

## RESUMEN

Los sistemas de dos componentes comprenden el principal mecanismo de transducción de señales en los organismos procariontes; éstos detectan un estímulo y provocan los eventos intracelulares necesarios a través de la fosforilación de proteínas efectoras por cinasas para generar una respuesta. La proteína cinasa BarA y el regulador de respuesta UvrY de *Escherichia coli* forman un sistema de dos componentes poco caracterizado; no se conocen las señales que lo modulan, y salvo dos casos, tampoco se conocen los genes que regulan. UvrY activa la transcripción de CsrB y CsrC, dos ARN pequeños regulatorios no traducidos del sistema de regulación de almacenamiento de carbono (Csr). El componente central de este último sistema es CsrA, una proteína que activa la biosíntesis de flagelo y la movilidad, reprime la formación de biopelículas y controla el flujo de carbono activando la expresión de genes de la glicólisis y reprimiendo la de aquellos relacionados con la gluconeogénesis. CsrA actúa a nivel post-transcripcional y su actividad es antagonizada por CsrB y por CsrC.

BarA/UvrY se ha relacionado con la desintoxicación por peróxido de hidrógeno, la formación de biopelículas y, al ser regulador del sistema Csr, también se ha involucrado con la regulación de la movilidad y del equilibrio para el flujo de carbono entre glicólisis y gluconeogénesis.

Utilizando como reportero la fusión transcripcional *csrB-lacZ* en cromosoma, probamos algunas condiciones que activaran al sistema BarA/UvrY de *E. coli*. La adición de peróxido de hidrógeno y de casaminoácidos no tuvo ningún efecto en la expresión del reportero. Resultados preliminares sugieren que la presencia en el medio del autoinductor 2 (AI-2), relacionado a mecanismos de “Quorum Sensing” en *E. coli* tampoco afectó la expresión de *csrB-lacZ*. No obstante, la adición de sobrenadantes de cultivos en fase estacionaria induce la expresión del reportero en etapas donde la expresión suele ser baja.

Por otra parte, para identificar al regulón del sistema BarA/UvrY se hicieron ensayos de microarreglos donde se comparó el perfil de expresión de una cepa silvestre con el de una mutante *uvrY* isogénica de *Escherichia coli*. Se construyó una tabla final con una lista de 297 genes regulados, éstos fueron organizados por grupos funcionales de acuerdo a la clasificación del EcoCyc y del GeneProtEc ([www.ecocyc.org](http://www.ecocyc.org), <http://genprotec.mbl.edu>). Nuestros resultados preliminares sugieren que el sistema BarA/UvrY participa en la regulación del metabolismo de energía, estructuras celulares, biosíntesis de purinas, ARN y ADN, en la respiración y en la resistencia a condiciones ácidas dependiente de glutamato.

## ÍNDICE

### 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades	6
1.2. Las cinasas sensoras	9
1.2.1 El dominio sensor y el de enlace	9
1.2.2 El centro catalítico cinasa	10
1.2.3 Las cinsas sensoras híbridas o tripartitas	11
1.3. Los reguladores de respuesta	14
1.3.1 El dominio receptor	14
1.3.2 El dominio efector	15
1.4. El sistema BarA/UvrY de <i>E. coli</i>	16
1.4.1 Los genes regulados por el sistema BarA/UvrY y fenotipos de las mutantes	18
1.4.2 Regulación transcripcional de BarA/UvrY	20
1.5. Los ortólogos de BarA/UvrY	20
1.5.1 Genes regulados por los ortólogos de BarA/UvrY y sus fenotipos	22
1.6. “Quorum sensing”	24
1.6.1 Sistemas de “Quorum Sensing” en <i>E. coli</i>	25
1.6.2 SdiA y UvrY	26
1.7 Los microarreglos y la expresión genética en <i>E. coli</i> , regulones y estimulones	27

### OBJETIVOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS	30
2.1 Cepas y Cultivos	30
2.2 Ensayo de $\beta$ -galactosidasa	31
2.3 Obtención de medios condicionados	31
2.4 Obtención de sobrenadantes con AI-2	31
2.5 Purificación de las proteínas	32
2.6 Fosforilación de His <sub>6</sub> -UvrY con Acp <sup>32</sup>	32
2.7 Fosforilación <i>in vitro</i> de His <sub>6</sub> -UvrY	32
2.8 Ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)	33
2.9 Extracción del ARN total por el método del fenol caliente	33
2.10 Microarreglos	34
2.10.1 Análisis de los transcritos	34
2.10.2 Impresión de los arreglos	34

2.10.3 Preparación e hibridación de las sondas	34
2.10.4 Análisis de las imágenes de microarreglos y adquisición de los datos	35
2.10.5 Selección de señales y ruido de fondo	35
2.10.6 Selección de los genes regulados en arreglos individuales	35
2.10.7 Selección de los genes regulados entre arreglos	36
2.10.8 Bases de datos utilizadas	36
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>37</b>
3.1 Parte I.- Ensayos <i>in vivo</i>	
3.1.1 Monitoreo de la expresión de la fusión transcripcional <i>csrB-lacZ</i>	37
3.1.2 Búsqueda de condiciones que activen la fusión <i>csrB-lacZ</i>	38
A. Peróxido de hidrógeno	38
B. Casaminoácidos	40
C. Anaerobiosis	41
D. Densidad celular	42
E. Adición de sobrenadantes de cultivos crecidos hasta la fase estacionaria	43
F. Adición de sobrenadantes, ¿Está involucrado un mecanismo de “Quorum Sensing” mediado por el AI-2?	45
3.2 Parte II.- Ensayos <i>in vitro</i>	47
3.2.1 UvrY puede ser fosforilado por Acp <sup>32</sup>	47
3.2.2 Ensayos de cambio en la movilidad electroforética	48
3.2.3 Microarreglos	50
3.2.4 Fenotipos descritos para la mutante $\Delta uvrY$ por la técnica de Microarreglos de Fenotipos	65
3.2.4.1 En $\Delta uvrY$ aumenta el uso de D-melibiosa	67
3.2.4.2 $\Delta uvrY$ es más resistente a hidroxilamina	67
3.2.4.3 $\Delta uvrY$ es más sensible a nitrofurazona	68
3.2.4.4 $\Delta uvrY$ es más sensible a polimixina B	68
3.2.4.5 $\Delta uvrY$ es más sensible a dihidroestreptomicina	71
<b>4. COMENTARIOS FINALES</b>	<b>73</b>
<b>5. PERSPECTIVAS</b>	<b>74</b>
<b>6. ABREVIATURAS</b>	<b>76</b>
<b>7. ANEXO 1</b>	<b>78</b>
<b>8. ANEXO 2</b>	<b>85</b>
<b>9. REFERENCIAS</b>	<b>86</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

Los organismos unicelulares suelen experimentar cambios drásticos en su medio ambiente; por ejemplo, la temperatura, la acidez, la osmolaridad y los nutrientes disponibles, pueden variar rápida e inesperadamente. Por lo tanto, es importante que tengan mecanismos efectivos que perciban y procesen la información del medio para generar una respuesta adaptativa. A pesar de la gran diversidad de estímulos y respuestas, los sistemas de transducción de señales basados en la fosforilación de proteínas son una de las estrategias más utilizadas. En el caso de los organismos eucariontes y en especial de los unicelulares, muchas de las cascadas de señalización dependen de la actividad de proteínas cinasas, la fosforilación ocurre generalmente en residuos de serina, treonina y tirosina. En el caso de organismos procariontes, la transducción de señales depende en su gran mayoría de la fosfotransferencia entre dos proteínas: una histidina cinasa que percibe el estímulo (CS “Cinasa Sensora”) y un regulador de respuesta (RR) que ejerce las acciones necesarias. A esta vía de señalización se le ha denominado genéricamente como “Sistemas de Dos Componentes” (SDC) [1]. Algunos ejemplos de eventos regulados por los SDC en las bacterias son: el metabolismo de energía, la fijación de nitrógeno, la quimiotaxis, la osmoregulación, la división celular, la esporulación, la virulencia y las interacciones patógenas con plantas y animales.

El descubrimiento de los SDC se deriva del estudio del gen *glnA* de *Escherichia coli* que codifica para la glutamina sintetasa. Se demostró que la activación de este gen desde el promotor *glnAp2* estaba relacionada con el cambio de un medio rico en nitrógeno a un medio pobre [2]. Se sabía además que su transcripción requería el núcleo de la polimerasa, el factor  $\sigma^{54}$ , el producto del gen *glnG* (NtrC, NRI) y el producto del gen *glnL* (NtrB, NRII); sin embargo, cuando se hicieron estudios de transcripción-traducción con extractos de células que carecían de  $\sigma^{54}$ , NRI o NRII, se descubrió que sólo  $\sigma^{54}$  y NRI se requerían para iniciar la transcripción [3]. Además el factor NRI necesitaba de NRII para responder de manera apropiada. En 1986 se descubrió que NRII fosforilaba a NRI [4], cuando se obtuvieron las secuencias de NRI y NRII de *Bradyrhizobium parasponiae* se dieron cuenta de que el extremo amino-terminal de ciertas proteínas reguladoras era homólogo al de NRI (dominio receptor de la fosforilación de los reguladores de respuesta) y que cada una de estas proteínas tenía compañeros cuyos extremos



carboxilos terminales eran homólogos a NRII (dominio de fosfotransferencia de las cinasas sensoras) [1], en este mismo trabajo se propuso el término “Sistemas de Dos Componentes”.

En la mayoría de las eubacterias los SDC son abundantes, llegan a constituir aproximadamente el 1% de las proteínas codificadas [5]. El genoma de la bacteria *Escherichia coli* posee 61 proteínas de dos componentes: 29 cinasas sensoras (24 ortodoxas y 5 híbridas o tripartitas cuya descripción se hará más adelante) y 32 reguladores de respuesta [6]. Un análisis del genoma de la cianobacteria *Synechocystis* sp. ha estimado 80 SDC [7], el de *Bacillus subtilis* 70 [8], y el de *Mycoplasma genitalium* ninguno [9]. En las arqueobacterias los SDC suelen constituir una minoría de los sistemas de señalización [5], dos casos extremos son *Methanobacterium thermoautotrophicum*, en donde se estiman 24 SDC [10] y *Methanococcus jannaschii*, en donde no se estima alguno [9].

Aunque estos sistemas predominan en organismos procariontes, también existen en algunos eucariontes como hongos, plantas y amibas. En el caso de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, los SDC median respuestas a estrés ambiental [11-15]. En *Dictyostelium discoideum* participan en osmoregulación y en el desarrollo del cuerpo fructífero [16-18]. En *Arabidopsis thaliana* están involucrados en osmoregulación, crecimiento celular y diferenciación [5, 12, 19]. Los SDC en eucariontes a diferencia de los de procariontes, confluyen con otras vías convencionales de señalización como la cascada de las MAP-cinasas y la de los nucleótidos cíclicos [5, 15].

La fig. 1 muestra el prototipo de los SDC, la histidina cinasa sensora generalmente se encuentra anclada a la membrana interna por dos segmentos transmembranales que delimitan un dominio periplásmico, el dominio catalítico citosólico tiene una región o caja de unión (G) al adenosín trifosfato (ATP) y una histidina altamente conservada (H). El regulador de respuesta consta de un dominio receptor con un aspartato altamente conservado (D) y un dominio efector que generalmente es de unión a ADN.

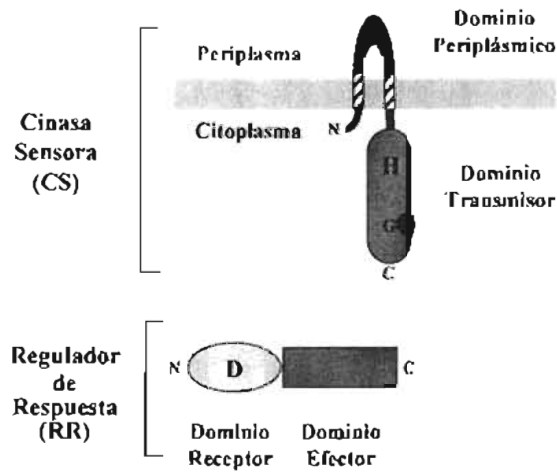


Figura 1. Esquema de la estructura de un SDC típico.(H) histidina; (D) aspartato; (G) caja de unión al ATP; (N) extremo amino terminal; (C) extremo carboxilo terminal.

El funcionamiento básico de estos sistemas es el siguiente (fig. 2): un estímulo ambiental (Señal) interacciona con la región amino-terminal de la proteína cinasa sensora (paso #1), lo que promueve su autofosforilación dependiente del ATP en el residuo conservado de histidina (pasos #2 y #3). Posteriormente el grupo fosfato es transferido al residuo conservado de aspartato del regulador de respuesta (paso #4). Esta fosfotransferencia entre histidinas y aspartatos permite la activación del RR y por ende se genera la respuesta necesaria. A continuación se detallará la estructura y función de estas proteínas.

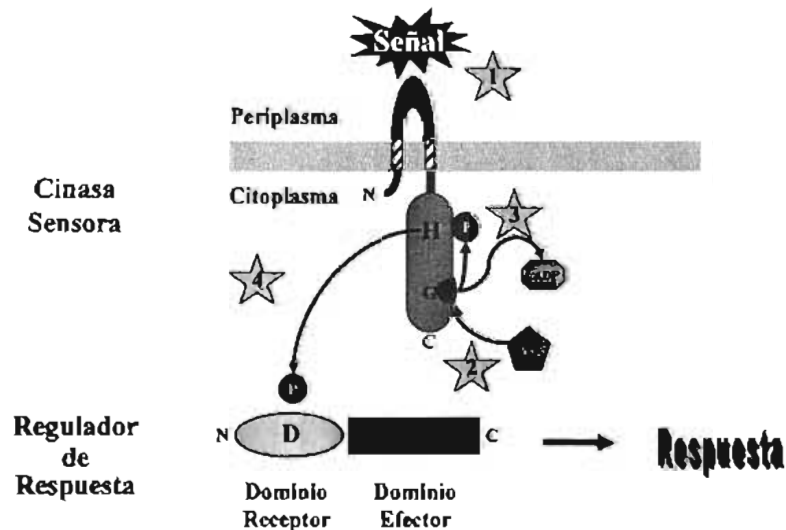


Figura 2. Esquema del funcionamiento de un SDC típico. Las abreviaturas son las mismas que las de la fig. 1.

## 1.2 Las Cinasas Sensoras

Las cinasas sensoras (CS) forman una gran familia de enzimas que catalizan la autofosforilación dependiente de ATP de su residuo histidina conservado, esta actividad se lleva a cabo *in trans*, es decir entre monómeros y depende de la formación de homodímeros [20, 21].

La arquitectura de las CS es modular, poseen dominios conservados organizados de varias maneras que dan una gran versatilidad a los sistemas de dos componentes. Una CS ortodoxa o típica (fig. 3) consta de un dominio amino-terminal sensor casi siempre periplásmico y un dominio carboxilo-terminal catalítico citosólico transmisor de la señal. Generalmente se encuentran unidas a la membrana por medio de dos dominios transmembranales; sin embargo, FixL, un regulador de la fijación de nitrógeno de *Rhizobium etli* [22] y UhpB, parte del sistema de transporte de azúcares de *Escherichia coli* [23], poseen 4 y 8 dominios transmembranales respectivamente. Algunas CS están solubles en el citoplasma como NtrB(NRII) el regulador de nitrógeno del que se habló anteriormente [24] y CheA involucrada en quimiotaxis [25].

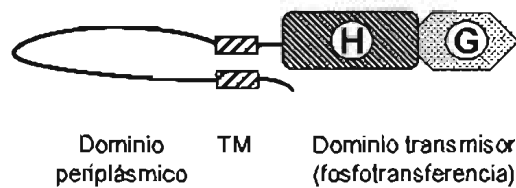


Figura 3. Esquema de una cinasa sensora ortodoxa. TM Regiones transmembranales; G caja de unión al ATP; H histidina.

### 1.2.1 Dominio sensor y el de enlace

El dominio sensor regula la actividad catalítica de la cinasa. Se cree que al ser extremadamente diversos en secuencia y estructura son específicos para la interacción con un ligando [26]. Un estímulo puede ser detectado directa o indirectamente en el periplasma por el dominio amino terminal sensor (dominio periplásmico), por ejemplo en la cinasa PhoQ [27], VanS [28] PmrB [29]; o en el citoplasma como en el caso de FixL [30] y ArcB [31, 32]. Algunas CS poseen dominios PAS, son módulos citosólicos de aproximadamente 100 aminoácidos que permiten monitorear estímulos de luz, potencial redox, oxígeno y pequeños ligandos. Su nombre se deriva de las iniciales de las proteínas donde se identificó por primera vez: PER (“Period Clock Protein” de *Drosophila*), ARNT (“Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator” de

vertebrados) y SJM (“Single-Minded Protein” de *Drosophila*). La mayoría de los dominios PAS identificados en procariontes se encuentran en las cinasas sensoras [33] en el caso de *E. coli*, se han identificado 14 proteínas con dominios PAS [34]. La importancia de este dominio varía en cada CS, por ejemplo en PhoR, un regulador de la disponibilidad de fosfato, su eliminación no tiene un efecto aparente, lo que sugiere que es innecesario para la activación de la respuesta mediada por esta cinasa [35]. Al contrario de ResE, un regulador del metabolismo anaeróbico y de respiración aeróbica de *B. subtilis* [36, 37] donde el PAS es indispensable para su actividad, y el dominio periplásmico tiene un papel secundario [38].

En las CS unidas a membrana, el dominio sensor está conectado al centro catalítico por medio de una de las regiones transmembranales seguida de un dominio de enlace. Dentro de esta última suele encontrarse un dominio HAMP o “Región Linker P”; comprende alrededor de 50 aminoácidos que se han modelado como dos  $\alpha$ -hélices anfipáticas (AS I y AS II). El HAMP es un probable elemento regulatorio de proteínas transmembranales: cinasas sensoras, proteínasceptoras de metilos (MCPs) y de señalización; su nombre deriva del acrónimo formado por las primeras proteínas en donde se localizó: “Histidine kinases”, “Adenyl cyclases”, “Methyl-accepting proteins” y “Phosphatases” [39]. Se cree que el dominio HAMP no está directamente involucrado con la detección de la señal sino que más bien es necesario para su correcta transducción [40]. La importancia de este dominio también varía en cada proteína, por ejemplo, en ResE el regulador de genes de anaerobiosis del que se habló, mutaciones y deleciones en el HAMP tienen un papel mínimo en el funcionamiento del sistema [38]. Mientras que en la cinasa sensora EnvZ de *E. coli*, diferentes mutaciones puntuales en este dominio favorecen el estado de cinasa o de fosfatasa. En general las mutaciones en el HAMP alteran la señalización y las respuestas de las CS [40].

### 1.2.2 El centro catalítico cinasa

El centro catalítico cinasa es de aproximadamente 350 aminoácidos, está conformado por un dominio independiente de dimerización y un dominio catalítico responsable de unir al ATP y dirigir la fosfotransferencia. Esta región se define por 5 motivos: la caja H, donde se encuentra la histidina conservada y las cajas N, G1, F y G2 que juntas forman el surco de unión al nucleótido, también son importantes para la catálisis y la fosfotransferencia. En muchas CS la caja H es parte

del dominio de dimerización [26]. A veces a las cajas G1 y G2 se le llaman D y G respectivamente [20].

El dominio de unión a ATP tiene homología en secuencia y estructura con el de GyrB (topoisomerasa tipo II), MutL (proteína reparadora de apareamientos incorrectos) y Hsp90 (proteína de estrés calórico). Este dominio consta de una serie de  $\alpha$ -hélices empacadas frente a una serie de  $\beta$ -plegadas antiparalelas en su mayoría, que forman un asa alrededor del ATP. El aspartato que define la caja D se une directamente a la adenina del ATP por puentes de hidrógeno, los aminoácidos adicionales de las cajas N y D se le unen por medio del agua que queda atrapada en la cavidad. Los residuos en la caja N interactúan con los fosfatos del nucleótido por medio de un ion de  $Mg^{2+}$ . La caja F es parte de la tapa que cubre el ATP mientras que la caja G forma una bisagra flexible al final de ella. La hidrólisis del ATP se acopla a la liberación del  $Mg^{2+}$  y el cambio conformacional destruye la organización de esta cavidad. Se ha propuesto que el ordenamiento de la tapa que cubre el ATP puede acoplar la unión del ATP con las interacciones entre los dominios de las CS, como el del dominio catalítico y la caja H [41].

Por análisis de secuencia las CSs se han dividido en 11 subfamilias [42] pero de manera más general se pueden dividir en dos: las cinasas sensoras ortodoxas ó típicas y las híbridas, las primeras son las más comunes en los procariontes [26].

### *1.2.3 Cinasas sensoras híbridas o tripartitas*

Las cinasas sensoras híbridas o tripartitas son más complejas en su arquitectura pues poseen dos dominios adicionales al transmisor (His conservada). El primero es un dominio receptor con un Asp conservado, similar al encontrado en los reguladores de respuesta y el segundo es un dominio de fosfotransferencia que contiene otra His conservada (fig. 4). En algunos casos estos dominios se encuentran como proteínas separadas. Las histidinas cinasas de eucariontes conocidas hasta ahora entran dentro de esta clasificación, la única excepción es ERS, un receptor de etilenos de *Arabidopsis thaliana* [12, 19]

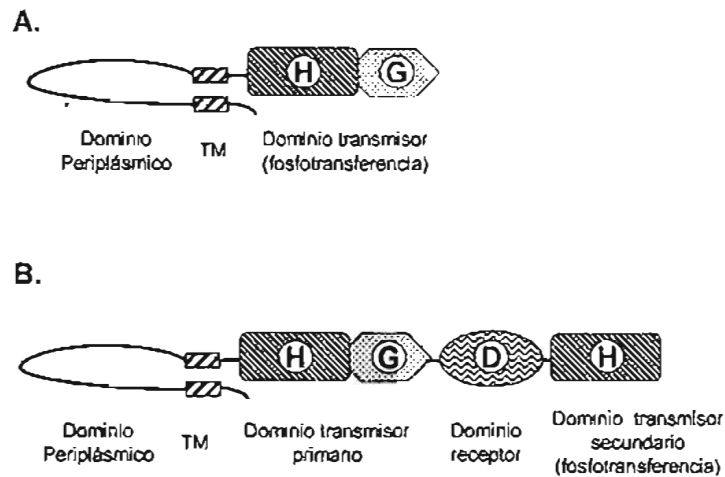


Figura 4. **A.** Cinasa sensora ortodoxa; **B.** Cinasa sensora híbrida. TM Regiones transmembranales; G caja de unión al ATP; H histidina; D aspartato.

Se mencionó anteriormente que las cinasas sensoras ortodoxas activan a los reguladores de respuesta por un mecanismo de fosfotransferencia His->Asp; sin embargo la activación de las cinasas sensoras híbridas y sus reguladores de respuesta se lleva a cabo por un mecanismo similar llamado fosfo-relevo representado como His->Asp->His->Asp (fig. 5). La transferencia del grupo fosfato debe ser secuencial dentro de la misma cinasa o de los módulos aislados antes de ser transferido al regulador de respuesta [43, 44].

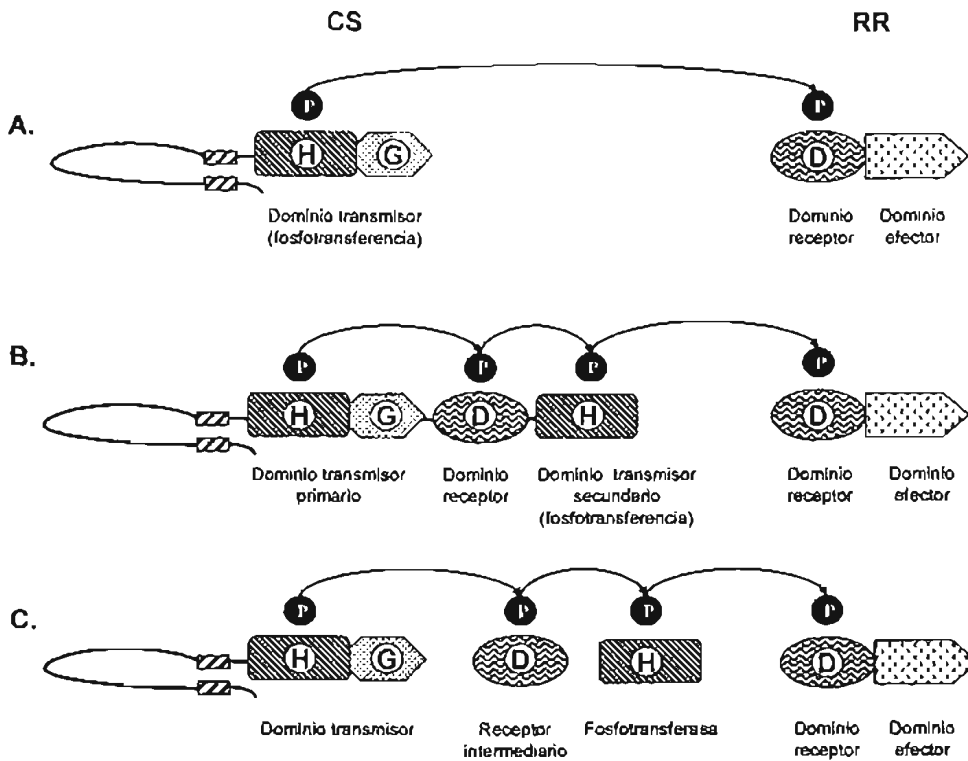


Figura 5. A. Modelo de fosfo-transferencia en una CS ortodoxa. Modelo de fosfo-relevo en una CS híbrida: B. dentro de la misma proteína; C. en módulos separados.

El primer ejemplo reportado de fosfo-relevo fue el de las cinasas sensoras KinA, KinB, KinC, KinD y KinE y los reguladores de respuesta Spo0F, Spo0B y Spo0A de *B. subtilis*, este sistema regula el inicio de la esporulación de la bacteria [8, 45]. El modelo corresponde al inciso C de la fig. 5, las cinco cinasas pueden transferir el fosfato al Asp del regulador de respuesta Spo0F, este a su vez dona el fosfato al residuo de His de Spo0B y por último éste transfiere el fosfato al Asp del factor de transcripción Spo0A [8]. El siguiente sistema activado por fosfo-relevo que se identificó, fue el de BvgS-BvgA, un controlador de virulencia de *Bordetella pertussis*, en esta vía los tres primeros pasos de fosforilación ocurren en una sola proteína, la cinasa sensora BvgS [46], el modelo corresponde al inciso B de la fig. 5.

Se cree que la complejidad de los sistemas activados por fosfo-relevo proporciona puntos de regulación adicionales que permiten un control fino de la señalización [26]. Un ejemplo es el sistema Arc de *E. coli*, en condiciones anaeróbicas la cinasa sensora híbrida ArcB fosforila al regulador de respuesta ArcA y regula genes involucrados con la respiración y el metabolismo fermentativo [47, 48]. En condiciones aeróbicas las quinonas oxidadas son señales negativas que inhiben la actividad cinasa de ArcB [32]. Por otra parte, el D-lactato, un metabolito intermediario

de fermentación, aumenta la actividad cinasa de ArcB bajo condiciones de estimulación (-O<sub>2</sub>); aunque el mecanismo de acción no es claro, se sabe que se requiere el dominio receptor (Asp) de ArcB. En otras palabras, el primer nivel de control de ArcB está dado por las quinonas oxidadas, mientras que el D-lactato participa en un segundo nivel amplificando la actividad cinasa de ArcB en condiciones anaeróbicas. [49, 50].

### 1.3 Los Reguladores de Respuesta

En los sistemas procariontes los reguladores de respuesta suelen encontrarse al final de las vías de fosfotransferencia. La transferencia del grupo fosfato de la histidina de la cinasa sensora a un residuo conservado de aspartato (Asp) en el dominio regulador de los RR provoca su activación. Se ha propuesto que la energía de el enlace acil-fosfato formado, es utilizada para dirigir cambios conformacionales a gran distancia que le permiten interactuar intra o intermolecularmente para generar la respuesta necesaria [26].

#### 1.3.1 Dominio receptor

El dominio receptor de un regulador de respuesta consta de aproximadamente 110 aminoácidos, contiene al Asp conservado [51]. El ejemplo típico de un dominio receptor se basa en la estructura de CheY, un regulador de respuesta para quimiotaxis [26, 52]. Consiste en una serie de cinco hebras  $\beta$ -plegadas paralelas dobladas sobre sí mismas rodeadas de cinco  $\alpha$ -hélices que forman un centro hidrofóbico. El sitio de fosforilación (Asp57) se localiza en una asa expuesta al solvente adyacente a otros dos residuos de Asp que forman una cuenca ácida cerca del carboxilo terminal de la estructura de  $\beta$ -plegadas.

Con base en la estructura del dominio de CheY fosforilado y de otros RR se confirmó la idea de que la fosforilación de los dominios receptores causa cambios estructurales de largo alcance; no se altera el plegamiento general ni la estructura secundaria, sólo se reubican ligeramente los elementos [26].



### 1.3.2 Dominio efector

Los reguladores de respuesta (RR) suelen poseer un dominio efector en el carboxilo y en la mayoría de los casos este dominio es de unión a ADN, en *E. coli*, 25 de los 32 RR identificados lo tienen [6, 26].

Algunos RR pueden tener dominios efectores con actividad enzimática como CheB de *E. coli*, una metilesterasa de quimiorreceptores MCP que regula la respuesta mediada por éstos [53]. RegA de *Dictyostelium* es una fosfodiesterasa de AMPc, ajusta los niveles de este segundo mensajero y regula la actividad de una proteína cinasa, ésta a su vez controla los eventos morfogénicos necesarios para la esporulación [17]. El RR de quimiotaxis CheY de *E. coli* carece de un dominio efector, su fosforilación le permite unirse a FliM, un componente del motor del flagelo [54].

Existen varias formas de activación de los RR, la fosforilación puede liberar una inhibición, promover la dimerización u oligomerización y mediar la interacción con otras proteínas o con el ADN; no obstante, ninguna de estas formas es excluyente [26].

El balance entre fosforilación y desfosforilación de los reguladores de respuesta determina la amplitud e intensidad de una respuesta adaptativa, por ello la vida media de los reguladores de respuesta fosforilados es muy variada, puede ser de segundos y hasta de horas, dependiendo de los requerimientos de cada sistema. Muchos RR tienen actividad de autofosfatasa y otros requieren de fosfatasas auxiliares. Dentro del sistema que regula el inicio de la esporulación de *B. subtilis* mencionado con anterioridad, hay dos familias de aspartil-fosfatasas que controlan el fosfo-relevo: RapA, RapB y RapE desfosforilan específicamente a Spo0F; mientras que Spo0E, YnzD y YisI hacen lo mismo con Spo0A [55, 56].

Existen casos en los que la cinasa sensora también posee actividad de fosfatasa, estos estados son regulados por los estímulos recibidos [57-59]. Se cree que esta vía es utilizada en casos donde se requiere apagar rápido la respuesta [26]. Un ejemplo es la cinasa sensora híbrida ArcB mencionada con anterioridad, en condiciones anaeróbicas fosforila al regulador de respuesta ArcA y regula genes involucrados con la respiración y el metabolismo fermentativo [47, 48]. En condiciones aeróbicas ArcB desfosforila a ArcA y apaga la respuesta [59, 60]. Otro ejemplo es la CS EnvZ de *E. coli*, el balance entre su actividad cinasa y fosfatasa determina el nivel de fosforilación del regulador de respuesta OmpR, lo que resulta en una expresión diferencial de los genes de porinas *ompC* y *ompF* [58, 61].

La eliminación de los reguladores de respuesta causa la pérdida de la regulación de los genes blanco, mientras que la inactivación o supresión de la cinasa sensora generalmente resulta en una expresión constitutiva a bajo nivel de éstos. Este fenómeno se puede explicar debido a que se ha visto en experimentos *in vitro* e *in vivo* que en ausencia de la cinasa sensora los reguladores de respuesta pueden fosforilarse mediante moléculas pequeñas donadoras de fosfato como el carbamil fosfato, el fosforoamidato y el acetil fosfato [62, 63].

#### 1.4 El sistema BarA/UvrY de *Escherichia coli*

La cinasa sensora BarA y el regulador de respuesta UvrY constituyen un sistema de dos componentes en *Escherichia coli* (Pernesting, 2001) aún no caracterizado. Este sistema se ha asociado con la regulación de la movilidad, la desintoxicación por peróxido de hidrógeno, la formación de biopelículas y con la regulación del equilibrio para el flujo de carbono entre glicólisis y gluconeogénesis [64, 65].

La proteína BarA de *E. coli*, antes llamada AirS, pertenece a la subclase de cinasas sensoras híbridas o tripartitas. Su nombre viene de “Bacterial Adaptative Response Gene A” y se identificó porque su sobreexpresión suprimía el fenotipo de una mutante suprimida en la cinasa sensora EnvZ y controlaba a OmpR, el regulador de respuesta específico de esta cinasa. Sin embargo, la señalización cruzada entre BarA y OmpR no pudo ser demostrada *in vitro* [66]. La relevancia fisiológica de la señalización cruzada no es clara ya que la fosfotransferencia entre cinasas y reguladores de diferentes sistemas sólo se ha visto *in vitro*, o *in vivo* cuando la cinasa sensora específica está ausente o la heteróloga se encuentra en una dosis elevada [67].

BarA es una proteína de 918 aminoácidos (fig. 6) consta de un segmento amino terminal citosólico muy corto, dos regiones transmembranales canónicas (TM) que comprenden los residuos 10-32 y 135-149, ambas forman un puente periplásmico de 145 aminoácidos. Del aminoácido 200 al 252 se predice un dominio HAMP. Dentro del dominio transmisor primario, los aminoácidos 292-357 comprenden la caja H con el primer residuo de histidina conservado (His 302). Del residuo 404-520 se encuentran los motivos N, D/F, G1 de unión a ATP. El dominio receptor primario que contiene al residuo conservado de ácido aspártico (Asp 718) comprende del residuo 668 al 781. El dominio transmisor secundario comprende del residuo 819 al 914, aquí se encuentra el segundo residuo conservado de histidina (His 861).

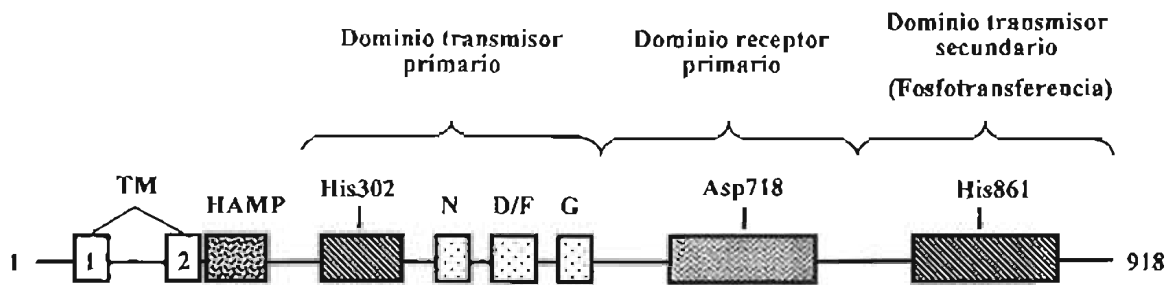


Figura 6. Esquema de BarA de *E. coli*.

Se ha sugerido que BarA posee entre los aminoácidos 200 y 350 un dominio PAS con menos de 30% de homología; sin embargo, dada la baja homología este dato debe ser validado a nivel de secuencia y experimentalmente [68].

Se propuso que BarA era un regulador de la adquisición de hierro (sideróforos) y tenía un papel fundamental en la colonización del tracto urinario por *E. coli* O157:H7 [69]; sin embargo, el defecto en la formación de sideróforos de la mutante  $\Delta barA$  parece ser específico de la cepa que se utilizó en ese trabajo, ya que la misma mutación en otras cepas tanto patógenas como no patógenas no tiene efecto en la formación de sideróforos [64, 65].

La eliminación de BarA en *E. coli* atenúa la formación de biopelículas, aumenta la sensibilidad a radiación por luz UV y reduce la expresión de catalasas, por lo que se incrementa la sensibilidad a estrés oxidativo [68].

El regulador de respuesta específico de la cinasa BarA es la proteína UvrY [64], su nombre se deriva por estar estrechamente relacionado, en un ARNm bicistrónico, al gen *uvrC* del sistema de reparación de ADN dañado por luz UV; sin embargo, mutaciones en *uvrY* no afectan la respuesta de este sistema [70], lo que resulta contrario al fenotipo de sensibilidad que presenta la mutante BarA a radiación por luz UV [68].

UvrY tiene la estructura clásica de un regulador de respuesta (fig. 7), tiene 218 aminoácidos y posee un dominio receptor que contiene al Asp conservado en la posición 54 y un dominio efector hélice vuelta hélice (HVH) de unión a ADN. Se ha clasificado como un miembro de la familia FixJ y no tiene una función asignada en las células [64].

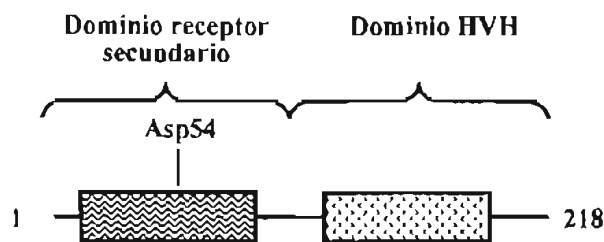


Figura 7. Esquema de UvrY de *E. coli*

#### 1.4.1 Los genes regulados por BarA/UvrY y fenotipos de las mutantes en *E. coli*

Hasta la fecha sólo se conocen tres genes regulados por el sistema BarA/UvrY de *E. coli*. Los dos primeros, *csrB* y *csrC* son componentes del sistema de regulación del almacenamiento de carbono (Csr), se describirán más adelante [71-74]. El tercero es *rpoS* que codifica para un factor sigma de fase estacionaria, regula genes en respuesta a privación de nutrientes, a la variación en la tensión del oxígeno y a cambios en el pH y en la osmolaridad [75]. La regulación de *rpoS* es muy compleja pues involucra mecanismos transcripcionales, post-transcripcionales y post-traduccionales [76]. A pesar de los estudios realizados, el mecanismo de regulación por el sistema BarA/UvrY sigue siendo controversial, ya que se han encontrado diferentes resultados para la mutantes  $\Delta uvrY$  y  $\Delta barA$ . Mukhopadhyay, *et al* [77], proponen que BarA se requiere para la inducción transcripcional de *rpoS* y de dos genes regulados por éste último, *katG*, que codifica para la principal catalasa de *E. coli* y *osmY*, que codifica para una proteína de estrés osmótico. Hengge-Aronis, *et al* [76], concluye que UvrY no está involucrado en la activación de *rpoS* y sugiere que BarA puede activarlo por otra vía. Oshima, *et al* [78], proponen que *rpoS* es regulado positivamente a nivel transcripcional por BarA, pero es regulado negativamente por UvrY. El contexto fisiológico por el que *rpoS* es activado por BarA no está claro [65].

El componente central del sistema Csr es CsrA, una proteína de 61 aminoácidos que actúa a nivel post-transcripcional alterando de manera positiva o negativa la estabilidad de sus ARNs blanco. CsrA es un activador de la glicólisis, la movilidad y el metabolismo de acetato y es un represor de la gluconeogénesis, de la biosíntesis del glucógeno y de la formación de biopelículas [79-82]. Se ha sugerido que promueve la degradación de los transcritos de mRNA uniéndose a las cercanías del sitio de unión ribosomal. En el caso del transcrito *glgCAP* que codifica las enzimas requeridas para la síntesis de glucógeno, se ha demostrado que CsrA se une a dos regiones: a la secuencia líder de este ARNm en un sitio que se superpone con la secuencia Shine-Dalgarno de

*glgC* y a un sitio dentro de una horquilla río arriba de la misma; esta interacción bloquea la unión de los ribosomas y por lo tanto la traducción [80].

El mecanismo de acción como regulador positivo no está claro, se sabe que CsrA se une y estabiliza al transcrito de *flhDC* que codifica las dos subunidades del regulador maestro de genes involucrados con la biosíntesis de flagelo, la movilidad y la quimiotaxis. Una hipótesis es que CsrA protege al mensajero de las endoribonucleasas [79].

El gen *csrB* codifica un ARN de 366 pares de bases perteneciente a la familia de pequeños ARNs no traducidos (ARNp). Es un antagonista de la actividad de CsrA ya que secuestra a esta proteína en un complejo formado por una molécula de CsrB y aproximadamente 18 moléculas de CsrA. La sobreexpresión de CsrB causa el mismo fenotipo que una cepa  $\Delta$ *csrA* [72, 73, 82].

CsrB posee 18 repeticiones imperfectas de la secuencia: 5'-CAGGA(U/C/A)G-3' distribuidas en todo lo largo de la molécula y se ha propuesto que éste es el sitio de unión para CsrA. La unión de CsrA a CsrB no altera su estabilidad [82].

El tercer componente del sistema Csr, es CsrC, también pertenece a la familia de pequeños ARNs no traducidos, tiene un tamaño de 245 nucleótidos y se ha reportado que, al igual que CsrB, une varias moléculas de CsrA y la secuestra en un complejo. CsrC sólo posee 9 secuencias imperfectas repetidas similares a las de CsrB, y por ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA por sus siglas en inglés) se demostró que CsrA tiene mayor afinidad por CsrB que por CsrC [71].

La razón de la existencia de estos dos ARNp no es clara, una posibilidad es que exista una expresión diferencial dependiente de las condiciones de crecimiento de la bacteria, en este sentido, el tener más componentes permite una regulación más fina del flujo de carbono. Existe una regulación compensatoria en los niveles de CsrC y CsrB en las células, pues la mutación de uno causa un incremento en la expresión del otro y viceversa [71]. La expresión de *csrB* y *csrC* se mantiene hasta por lo menos la fase estacionaria tardía, de acuerdo a los resultados de hibridación tipo Northern [83, 84].

En *E. coli* se ha demostrado que los niveles de CsrB, CsrC y CsrA se van acumulando conforme los cultivos se aproximan a la fase estacionaria, y esta expresión es independiente del factor RpoS [83].

#### 1.4.2 Regulación Transcripcional de BarA y UvrY

La transcripción de *barA* es inducida durante la fase exponencial de crecimiento [77]. Tanto CsrA como UvrY estimulan la expresión de *barA* a nivel transcripcional [74]. CsrA promueve la transcripción de CsrB y CsrC por medio de UvrY aunque de manera diferencial. CsrC es menos dependiente [83]. La eliminación de UvrY no tiene ningún efecto en la transcripción de CsrA [74] y la sobreexpresión de SdiA, un activador transcripcional de la familia LuxR del cual se hablará mas adelante, induce la transcripción de *uvrY* y de *uvrC* 12 y 9 veces respectivamente [85] y la expresión de *csrB* mediante UvrY [74].

### 1.5 Los ortólogos de BarA y UvrY

El primer reporte de la cinasa sensora BarA fue en la bacteria patógena *Pseudomonas syringae* (cepa B728a), inicialmente se llamó LemA (“lession manifestation”) porque se identificó como un factor esencial para la manifestación de la lesión en hojas de frijol [86]. En la actualidad recibe el nombre de GacS. Al regulador de respuesta UvrY se le identificó por primera vez en *Pseudomonas fluorescens* (cepa CHA0) con el nombre de GacA (“Global Activator ...”), es un activador global de producción de antibióticos y de cianuro [87]. La primera evidencia de que GacS y GacA constituyan un SDC fue en *Pseudomonas syringae* p.v *syringae* [88], de ahí derivaron muchos reportes que confirmaron esta relación [89].

Las proteínas BarA y UvrY se encuentran conservadas en otras  $\gamma$ -proteobacterias, se han localizado cerca de 20 ortólogos en bacterias entéricas [89]; en la Tablas 1 y 2 se muestra el porcentaje de identidad de dichas proteínas con respecto a sus ortólogos en algunas especies.

Tabla 1. Porcentaje de identidad de los ortólogos de BarA

	BarA <i>E. coli</i>	BarA <i>S. typhimurium</i>	ExpS <i>E. carotovora</i>	NP_232082 <i>V. cholerae</i> biovar citor	GacS <i>P. aeruginosa</i>
BarA <i>E. coli</i>	100%	89%	58%	52%	39%
BarA <i>S. typhimurium</i>		100%	60%	52%	37%
ExpS <i>E. carotovora</i>			100%	48%	35%
NP_232082 <i>V. cholerae</i> biovar citor				100%	34%
GacS <i>P. aeruginosa</i>					100%

Tabla 2. Porcentaje de identidad en los ortólogos de UvrY

	UvrY <i>E. coli</i>	SirA <i>S. typhimurium</i>	ExpA <i>E. carotovora</i>	VarA <i>V. cholerae</i>	GacA <i>P. aeruginosa</i>
UvrY <i>E. coli</i>	100%	96%	82%	75%	60%
SirA <i>S. typhimurium</i>		100%	83%	76%	60%
ExpA <i>E. carotovora</i>			100%	72%	59%
VarA <i>V. cholerae</i>				100%	61%
GacA <i>P. aeruginosa</i>					100%

La relación de BarA y UvrY con sus ortólogos no sólo es a nivel de secuencia, también la organización genómica está conservada. A diferencia de la mayoría de los SDC, los genes *barA* (GacS) y *uvrY* (GacA) no forman una unidad transcripcional, además *uvrY* se encuentra ligado al gen *uvrC* [64].

Un análisis de similitud entre 18 ortólogos de BarA [89] confirmó que el dominio transmisor, el receptor y el de fosfotransferencia (Hpt) están altamente conservados. El dominio

de enlace (HAMP) tiene una similitud arriba del valor promedio del alineamiento global. Dentro del dominio transmisor hay un alto nivel de conservación rodeando a la caja H y a la región del dominio HAMP. En el dominio receptor hay dos regiones altamente conservadas además del Asp característico, se trata de una lisina (K) y dos aspartatos (DD). Hay otra región de alta similitud en el amino terminal del dominio de fosfotransferencia y en una región que rodea el sitio de fosforilación de este dominio. Existen tres regiones de baja similitud, la primera se localiza entre el dominio transmisor y el receptor, la segunda es una secuencia corta entre el dominio receptor y el dominio de fosfotransferencia y por último la región periplásmica, lo que ha llevado a cuestionar si la señal es percibida en el periplasma y si es la misma para todos los ortólogos de BarA. El estímulo fisiológico que activa al sistema BarA/UvrY o a sus ortólogos no ha sido identificado, los fenotipos dependientes de GacA (UvrY), en ausencia de un organismo hospedero son expresados preferentemente durante la transición de fase exponencial a la estacionaria [89] Se reportó que en una cepa uropatógena de *E. coli*, la expresión de BarA es inducida por el contacto vía P- pili de la bacteria con la célula eucarionte hospedera [69]; sin embargo, no todas las cepas producen el P-pili, por lo que es posible que otro estímulo actúe sobre BarA [64].

#### 1.5.1 Genes regulados por los ortólogos de BarA/UvrY y sus fenotipos

En *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* el sistema BarA/SirA regula la expresión de HilA, un regulador transcripcional de los genes involucrados con la invasión de las células huésped y de HilC [90-92]. HilA y HilC controlan la mayoría de los genes de la isla de patogenicidad I de *Salmonella* (SPI1) que codifica para un sistema de secreción de tipo III, este último promueve la invasión intestinal y la gastroenteritis [93]. En las mutante  $\Delta barA$  y  $\Delta sirA$  de *S. typhimurium* se compromete la habilidad para invadir células epiteliales en cultivo [90]. SirA regula positivamente al gen de virulencia *sopB*, y negativamente los tres niveles de los genes flagelares [94].

En *Erwinia carotovora*, un patógeno de plantas, el sistema ExpS/ExpA controla a los genes que codifican la celulasa, pectato liasa y poligalacturonasa. En modelos de fitopatogenicidad la virulencia de la mutante  $ExpA^-$  es reducida [95, 96].

En *Vibrio cholerae*, VarA, el ortólogo de UvrY, se requiere para la expresión del regulón ToxR y la colonización del intestino murino [97].



En la bacteria fijadora de nitrógeno *Azotobacter vinelandii* la mutante *gacS* disminuye la producción de alginato y la acumulación de poli- $\beta$ -hidroxibutirato, ambos polímeros están involucrados en el proceso de enquistamiento [98]. GacA regula positivamente a *algD*, que codifica la enzima clave de la vía de biosíntesis de alginato y a *rpoS* [99].

En *Pseudomonas*, tanto patógenas como benéficas de plantas (*P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. syringae*, *P. viridiflava* y *P. aureofaciens*) el sistema GacS/GacA regula de la síntesis de productos extracelulares y factores de virulencia como enzimas y metabolitos secundarios (por ejemplo el 2,4-diacetilfloroglucinol y el cianuro de hidrógeno), y el nado [100, 101]. Las mutantes *gacA* de *Pseudomonas* benéficas para plantas pierden la habilidad de biocontrol, en las especies patógenas se reduce la virulencia. [89].

En tres especies: *P. aeruginosa*, *P. syringae* y *P. aureofaciens* el sistema GacA/GacS regula positivamente la síntesis de N-acil-homoserin lactonas que a su vez regulan la expresión genética dependiente de la densidad celular (“Quorum Sensing”) [102-105]. En *P. aeruginosa* la cascada de “Quorum Sensing” influencia la expresión de *rpoS* [106, 107] y de genes de virulencia [108]. En modelos de fitopatogenicidad de las mutantes  $\Delta$ *gacA*, la virulencia se reduce (revisado en [89]).

En *P. aeruginosa* y en *E. coli* se ha reportado que BarA/UvrY participa en la formación de biopelículas [74, 109]; sin embargo, el mecanismo por el cual lo hace no ha sido determinado aunque se sabe que en *E. coli* es por una vía independiente del sistema Csr.

Estudios más recientes han demostrado que la íntima relación entre el sistema BarA/UvrY y el sistema de regulación de almacenamiento de carbono (Csr) está conservada en otras  $\gamma$ -proteobacterias como *E. carotovora*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* y *S. enterica*. Los homólogos de CsrB (RsmB, RsmZ, RsmY o PrrB) se encuentran bajo el control del sistema GacS/GacA [105, 110-114]. Al igual que en *E. coli*, RsmA, el homólogo de CsrA, controla sus genes blanco a nivel postranscripcional, esta actividad es antagonizada por los homólogos de CsrB.

Se han identificado homólogos del gen *csrC* en *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* O157:H7 y en *Salmonella enterica*, *typhi* y *paratyphi* [71]; parece ser que este gen no está presente en otras eubacterias.

## 1.6 “Quorum Sensing”

Se ha llamado “Quorum Sensing” al mecanismo por el cual los organismos procariontes perciben la densidad de la población por medio de la detección de moléculas que se acumulan en el medio llamadas autoinductores. Esto les permite coordinar ciertas conductas como la producción de factores de virulencia, de proteínas, la síntesis de sideróforos, la bioluminiscencia, la formación de biopelículas y la conjugación de plásmidos [115, 116]

En el caso de las  $\gamma$ -proteobacterias los autoinductores son N-acil-homoserin-lactonas (HSLs o AIs) generalmente producidas por las proteínas de tipo LuxI, cuyas cadenas acilo varían en largo, saturación y modificación en el tercer carbono [115]. Los autoinductores de tipo HSL se unen a proteínas de tipo LuxR que son reguladores transcripcionales, una excepción es *Vibrio harveyi* donde la HSL (AI-1) es detectada por un sistema de dos componentes. Se han encontrado sistemas homólogos a LuxI/LuxR en muchas  $\gamma$ -proteobacterias que generalmente regulan genes importantes para interactuar con un hospedero [117].

El primer mecanismo de “Quorum Sensing” que se descubrió fue en la bacteria marina *Vibrio fischeri*, el aumento de la densidad celular activa al sistema LuxI/LuxR y genera bioluminiscencia; esto es muy importante en la relación simbiótica que tiene con su hospedero, el calamar *Euprymna scolopes* [118]. La señal es una N-3-oxo-hexanoil-homoserinlactona producida por LuxI a partir de S-adenosil-metionina (SAM) y una proteína acarreadora de acilos (acil-ACP) [119, 120]. Cuando el nivel de la HSL alcanza concentraciones nanomolares se une a LuxR, de esta forma se activa la transcripción del operón *luxICDABE* requerido para la bioluminiscencia.

Un segundo mecanismo, del cual carece *Vibrio fischeri*, se encontró en *Vibrio harveyi*, es mediado por el autoinductor 2 (AI-2) y junto con AI-1 regula la bioluminiscencia de esta bacteria. El AI-2 es un ester-furanosil [121] sintetizado por la proteína LuxS del ciclo del metilo, el objetivo de esta vía es la generación de S-adenosilmetionina (SAM), el principal donador de metilos de las células. La SAM se produce a partir de metionina y ATP por una metionina sintetasa; las enzimas metil transferasas utilizan a la SAM como donador para generar ARN, ADN, proteínas y metabolitos metilados y S-adenosilhomocisteína (SAH). El SAH es tóxico para la célula por lo que la enzima Pfs (metiladenosin/SAH nucleosidasa) convierte el SAH en S-ribosilhomocisteína (SRH) el cual es convertido en homocisteína (HCY) y DPD (4,5 dihidroxi-

2.3-pentanodiona) por LuxS. Se cree que por una reacción espontánea el DPD se convierte en AI-2 y MHF (4-hidroxi-5metil-3(2H) furanona). La metionina se regenera a partir de la homocisteína por la acción de las homocisteína metil transferasas [122].

Se cree que el AI-2 es una señal de comunicación interespecie porque se han encontrado homólogos de *luxS* en prácticamente todas las bacterias patógenas y no patógenas que producen compuestos capaces de activar biosensores AI-2 [115, 123]. También se ha propuesto que el principal rol de LuxS es en el metabolismo central intermediario [122] más que en “Quorum Sensing” [124] por dos razones: es parte del ciclo del metilo [122, 125] y el AI-2 producido es una fuente potencial de carbono y boro [126].

#### 1.6.1 Sistemas de “Quorum Sensing” en *Escherichia coli*

En *E. coli* y *Salmonella* se han reportado algunos procesos regulados por “Quorum Sensing” aunque siguen siendo controversiales por el hecho de que no se han encontrado todos los componentes que participan en estos procesos, es decir, en ambos organismos se identificó a SdiA, un activador transcripcional de la familia LuxR, pero no a una proteína que sintetice HSL [127]. Por el otro lado se han identificado homólogos a *luxS* que producen al AI-2 en condiciones como bajo pH, alta osmolaridad y en fuentes de carbono como glucosa [128] pero no a un receptor para este autoinductor.

En ambas bacterias el AI-2 se produce durante la fase exponencial de crecimiento [128] y en la fase estacionaria temprana es importado (fig. 8) por un sistema de transporte ABC codificado por el operón *lsr* en *Salmonella* [129] y *b1513* en *E. coli* [130, 131]. La cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* no produce AI-2 debido a la eliminación de 1 nucleótido del gen *luxS* que trunca la proteína tempranamente [132]; sin embargo, es capaz de degradar o tomar el AI-2 del medio [130].

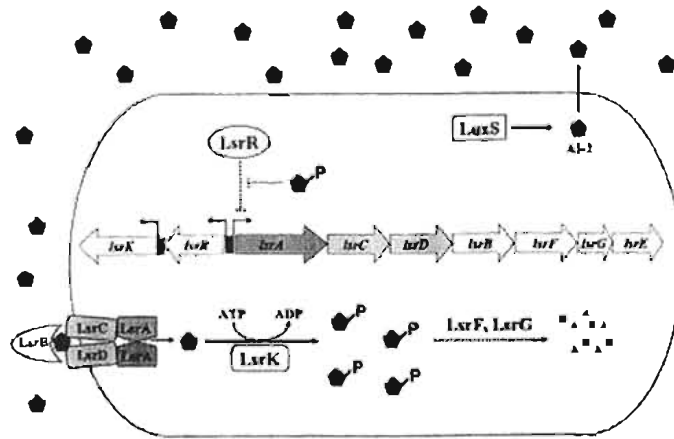


Figura. 8. Modelo de producción e internalización del AI-2 en *Salmonella*. El AI-2 producido por LuxS se acumula extracelularmente, es internalizado por LsrABC, el transportador de tipo ABC. El AI-2 es fosforilado por la cinasa LsrK; el fosfo AI-2 es un inductor del operón *lsr*. LsrR es el represor de este operón, se cree que es inactivado por el fosfo AI-2. LsrF y LsrG se requieren para el procesamiento final. En *E. coli* no está presente *lsrE*. Modificado de [131].

En la cepa de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7 se ha propuesto un mecanismo de “Quorum Sensing” por medio del AI-2 que regula la expresión de factores de virulencia, del sistema de secreción tipo III, quimiotaxis, síntesis de flagelo y movilidad [133] y la actividad de SdiA cuyo blanco son los genes de división celular *ftsQAZ* [134]. En la cepa enteropatógena (EPEC) O127:H6 la expresión de flagelina es controlada por LuxS [135]. Se ha propuesto que la cepa de *E. coli* K-12 usa el AI-2 para controlar la quimiotaxis, la movilidad y las síntesis flagelar [116, 136].

Existen autores que sugieren tener cuidado en la interpretación de los fenotipos observados en la mutante  $\Delta luxS$  y en la adición de AI-2 a los cultivos, porque pueden ser consecuencia de cambios en el metabolismo más que de la detección de una señal [137, 138].

### 1.6.2 SdiA y UvrY

El gen de *sdiA* se encuentra río arriba de *uvrY* en *E. coli*, *S. enterica* y *Klebsiella* [137], un dato curioso es que son las mismas especies en las que no se ha encontrado una sintetasa de HSL [127]. La señal a la que responde SdiA no es clara, una hipótesis es que detecta las HSLs de otras especies [137, 139]. Hay un reporte de la cepa de *E. coli* O157:H7 (EHEC) que sugiere que el amino terminal de SdiA puede unir un factor del sobrenadante de cultivos en fase estacionaria, el cual a su vez regula otros factores de virulencia en esta bacteria [137, 140-142], sin embargo,

este dato es difícil de reconciliar con la falta de producción de HSLs en seis cepas diferentes de EHEC [139].

Un experimento de microarreglos en donde sobreexpresan a SdiA reveló que la transcripción de *uvrY* y de *uvrC* se activa 12 y 9 veces respectivamente, estos dos genes se encuentran río abajo de *sdiA* y se transcriben en el mismo sentido; sin embargo, no se afecta la transcripción de *yecF*, un gen intermedio de diferente polaridad. Los niveles del *rpoS* no se ven afectados [85]. SdiA estimula la expresión de *csrB* mediante UvrY [74]. En *Salmonella* SdiA responde a las homoserina lactonas [139]; sin embargo, la adición de N-(cetocaproil)-L-acilhomoserinlactona a los cultivos de *E. coli* no produce ningún efecto en las fusiones *lacZ* de *csrA*, *csrB* y *uvrY* [74].

### **1.7 Los microarreglos y la expresión genética en *Escherichia coli*, regulones y estimulones**

El concepto de regulación genética global se desarrolló a partir de la observación de que las bacterias pueden responder a alteraciones en su ambiente expresando una pequeña o una gran cantidad de genes bajo el control de una o varias proteínas reguladoras. El término regulón se refiere al conjunto de unidades transcripcionales controladas por una proteína reguladora, los regulones se pueden sobreponer cuando las unidades de transcripción poseen sitios de unión para más de un regulador. La unión de varios regulones forma un modulón, que se define como el conjunto de unidades de transcripción que son controladas directa e indirectamente por una proteína reguladora. Un estimulón comprende a grupos de unidades de transcritos que se expresan en respuesta a una perturbación ambiental, es diferente de un alarmón que se define como el conjunto de transcritos que responden a una condición de estrés.

Recientemente ha habido un auge en el estudio de los sistemas de regulación global y en el cómo se conectan entre ellos para generar una respuesta adaptativa. Una herramienta muy poderosa para este tipo de análisis son los microarreglos, el principio básico de esta técnica es hibridar oligonucleótidos, ARNm, ADNc o ADN cromosomal marcado con secuencias específicas complementarias inmovilizadas y arregladas en sustratos sólidos. Cada una de estas secuencias corresponde a un gen y se llega a tener todo el conjunto de genes de un organismo.

Esta técnica ha resultado muy útil en el estudio de la regulación genética en bacterias, ya que se puede monitorear la expresión global de los transcritos de una condición comparada con otra condición control o de mutantes contra cepas de tipo silvestre y ha permitido un gran avance en la identificación de miembros de regulones y estímulos. En *E. coli*, los microarreglos han permitido identificar los regulones de más de 46 factores de transcripción [143] y los estímulos de diversas condiciones (para una revisión visitar el sitio RegulonDB: [www.cifn.unam.mx/Computational Genomics/regulondb](http://www.cifn.unam.mx/Computational_Genomics/regulondb)), algunos ejemplos se ilustran en la Tabla 3.

Tabla 3. Ejemplos de regulones y estímulos descritos por microarreglos.

Regulones	Estímulos y condiciones de crecimiento
ArcA: Regulador de respuesta del sistema ArcA/B [144].	Estrés calórico [145].
RpoS: Factor sigma de fase estacionaria [146].	El crecimiento en diversos pH's [147].
EvgA: Regulador de respuesta del sistema EvgA/S [148].	El crecimiento en medio rico contra medio mínimo [149].
NtrC: Regulador de genes dependientes de $\sigma^{54}$ , crecimiento en condiciones de limitación de nitrógeno [150].	La transición de fase exponencial a fase estacionaria [151].

## OBJETIVOS

### Objetivo General

- I. Caracterizar al sistema de dos componentes BarA/UvrY de *Escherichia coli*.

### Objetivos particulares

- I Identificar condiciones que activen al sistema BarA/UvrY de *Escherichia coli*.
- II Identificar los genes regulados por el sistema de dos componentes BarA/UvrY de *Escherichia coli*.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

**2.1 Cepas y Cultivos:** Todas las cepas utilizadas son derivadas de *Escherichia coli* K-12. El crecimiento de las cepas se llevó a cabo en el medio Luria-Bertani (LB) que contiene por litro: 10gr de NaCl, 5g de extracto de levadura y 10 gr de bacto triptona. Las concentraciones de los antibióticos utilizados fueron de: ampicilina (Amp) 100 µg/ml; kanamicina (Kan) 100 µg/ml y cloranfenicol (Cm) 33 µg/ml. Los cultivos aeróbicos se crecieron con agitación rotacional a 37°C, salvo previa indicación. Los cultivos anaeróbicos se crecieron en frascos de 5 ml a su máximo volumen con medio LB y se agitaron con una barra magnética.

Se construyeron las cepas IFC302 (tipo silvestre) e IFC304 (*uvrY::cm*) por electroporación del plásmido pCBZ1 en las cepas parentales MG1655 y MG1655 *uvrY::cm* respectivamente.

Cepas utilizadas:

Nombre	Cepa parental	Características relevantes	Fuente
1. MG1655	MG1655	Derivada de K-12	Colección del laboratorio
2. MG1655 <i>uvrY::cm</i>	MG1655	<i>uvrY::cm</i>	Colección del laboratorio
3. #106	M15 (QIAGEN)	pREP4, pQE30UvrY	[64]
4. #125	M15 (QIAGEN)	pREP4, pQE30BarA 198-918	[64]
5. DH5α		<i>luxS</i>	Colección del laboratorio
6. IFC302	MG1655	pCBZ1	Este trabajo
7. IFC304	MG1655 <i>uvrY::cm</i>	<i>uvrY::cm</i> + pCBZ1	Este trabajo
8. KSB837	CF7789 (MG1655 $\Delta$ <i>lacI</i> Z (MluI))	$\Delta$ ( <i>att-lom</i> ):: <i>bla</i> $\phi$ ( <i>csrB-lacZ</i> )1(Hyb)	[83]
9. UY KSB837	KSB837	<i>uvrY::cm</i>	[74]
10. BA KSB837	KSB837	<i>barA::kan</i>	[74]

Plásmidos utilizados:

Nombre	Fuente	Características
pBAD30	Donada por el Dr. Ojar Melefors	Vector de expresión, el promotor es inducible por arabinosa.
pBAD30UvrY	Donada por el Dr. Ojar Melefors	Gen codificante <i>uvrY</i> clonado en el vector pBAD30
pQE30	[64]	Vector de sobreexpresión. El gen se encuentra bajo el control del promotor T5 y es reprimido por LacI. Se crea una proteína recombinante con un



pQE30UvrY	[64]	epítoto de 6-histidinas en el amino terminal, es inducible por IPTG. Gen codificante <i>uvrY</i> clonado en el vector pQE30.
pQE30BarA198-918	[64]	Gen codificante de BarA clonado en el vector pQE30. Comprende del aminoácido 198 al 918, carece de los dominios transmembranales y del periplásmico.
pCBZ1 pGE593Φ( <i>csrB-lacZ</i> )	[83]	Fusión transcripcional de 245 pb correspondientes al promotor de <i>csrB</i> (-242 pb al +4 pb del gen) y el gen <i>lacZ</i> . [83]

**2.2 Ensayo de β-galactosidasa:** Se realizo de acuerdo al protocolo descrito anteriormente [152].

La fórmula para calcular las Unidades Miller de β-galactosidasa es:

$$\frac{(Abs_{420nm} - (1.75 * Abs_{550nm}))}{T * I * Abs_{600nm}}$$

Donde la absorbencia a 420nm es la medición del producto de la actividad de β-galactosidasa; 1.75\*Abs<sub>550</sub> es un factor de corrección por la absorbencia de las dendritas celulares. T se refiere al tiempo de reacción (15 min); I al volumen en ml del cultivo de bacterias para cada reacción y por último Abs<sub>600nm</sub> es la medición de la densidad óptica del cultivo a 600 nm. Se hicieron al menos dos experimentos independientes para corroborar los patrones obtenidos en los ensayos de β-galactosidasa.

**2.3 Obtención de medios condicionados:** Se creció un cultivo de la cepa KSB837 toda la noche a 37°C, a la mañana siguiente se inoculó un matraz a una dilución de 1:50, las células se crecieron hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.9. Se recolectó 20 ml del cultivo, se centrifugó a 3,500 rpm y el sobrenadante se filtró por una membrana de 0.22μm. Los sobrenadantes se alicuotaron y guardaron a -20°C hasta su uso.

Para los ensayos de inducción se creció un precultivo de KSB837 hasta una DO<sub>600nm</sub> de 0.5, se centrifugó y resuspendió a una DO<sub>600</sub> final de 0.1 en cada sobrenadante y en LB fresco.

**2.4 Obtención de sobrenadantes con AI-2:** Se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito anteriormente [128]. Las cepas de *E. coli* DH5α y MG1655 se crecieron toda la noche a 30°C en medio LB con glucosa al 0.5% y aeración, al día siguiente de este cultivo se inoculó un matrás

con LB y glucosa al 0.5% a una dilución 1:100. A las 6 y 8h de crecimiento a 30°C se tomaron 20 ml de los cultivos, se centrifugaron a 3,500 rpm y filtraron a través de una membrana de 0.22µm, los sobrenadantes se alicuotaron y guardaron a -20°C. Para los ensayos de inducción un cultivo de KSB837 se creció hasta una DO<sub>600nm</sub> de 0.2 donde se adicionó 1/10 de volumen del sobrenadante correspondiente.

**2.5 Purificación de las proteínas:** La proteína UvrY con el epítipo de 6 histidinas en el amino terminal (His<sub>6</sub>-UvrY) fue purificada por cromatografía de afinidad Niquel-NTA agarosa (QUIAGEN) de acuerdo al protocolo descrito anteriormente [64] con ligeras modificaciones. El cultivo de #106 (M15 cotransformado con el pREP4 y el pQE30UvrY) se indujo a una DO<sub>600</sub> de ~0.5 con 1 mM de IPTG por 4h. La proteína se purificó de la fracción soluble en condiciones no desnaturizantes a 4°C. Se dializó en un amortiguador que contiene 100mM de fosfato de sodio (pH 8), 1mM de Na<sub>2</sub>EDTA, 150 mM de NaCl, 10 mM de β-mercaptoetanol y 30% de glicerol [153]. La proteína se cuantificó por Bradford usando albúmina sérica bovina como estándar y se guardó a -20°C. La purificación de His<sub>6</sub>-BarA se realizó de la misma manera que la de His<sub>6</sub>-UvrY.

**2.6 Fosforilación de His<sub>6</sub>-UvrY con AcP<sup>32</sup>:** La síntesis de AcP<sup>32</sup> fue hecha por el Q. Javier de la Mora de acuerdo al protocolo descrito anteriormente [154] con ligeras modificaciones. 1.5 µg de His<sub>6</sub>-UvrY y el AcP<sup>32</sup> se incubaron por 1 min, la reacción se detuvo añadiendo amortiguador de carga 5X para SDS-PAGE (250 mM de Tris, 500 mM DTT, 10% (peso/volumen) de SDS, 0.5% de azul de bromofenol, 10% (volumen/volumen) de glicerol). La electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito en [155]. Después de la electroforesis el gel fue secado y se obtuvo el autoradiograma.

**2.7 Fosforilación *in vitro* de His<sub>6</sub>-UvrY:** La fosforilación con carbamil fosfato se hizo de acuerdo al protocolo descrito anteriormente [153] con ligeras modificaciones. His<sub>6</sub>UvrY a una concentración final de 60µg/ml se incubó por 30 minutos a 30°C en un amortiguador que contiene 100 mM de Tris-HCl pH 7, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 125mM de KCl y 50mM de carbamil fosfato disódico; en el caso de la proteína no fosforilada se utilizó la misma reacción pero en un

amortiguador sin carbamil fosfato disódico. La fosforilación de His<sub>6</sub>UvrY por His<sub>6</sub>BarA se realizó de acuerdo al protocolo descrito anteriormente [64].

**2.8 Ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA):** El plásmido pCBZ1 (*csrB::lacZ*) fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*, el fragmento resultante de 245 pb que corresponde a la región promotora del gen *csrB*, fue purificado por extracción en gel (“Gel extraction Kit” de Roche). El marcaje de la sonda se realizó con T4 polinucleótido cinasa y [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (3000 Ci/mmol). El ensayo de EMSA se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito anteriormente [156] con ligeras modificaciones. La proteína fue mezclada con el fragmento de 245pb marcado con <sup>32</sup>P en relaciones milimolares (mM) a picomolares (pM) respectivamente. Las incubaciones se hicieron a 25°C por 30 minutos en amortiguador A (20 mM HEPES pH 7.9, 100 mM KCl, 2 mM de EDTA y 20% de glicerol). Se utilizaron geles de acrilamida (40% acrilamida 1% bisacrilamida) y TBE 1x (89 mM de Tris-base, 89 mM ácido Bórico y 2mM de Na<sub>2</sub>EDTA) como amortiguador para la electroforesis. En todas las reacciones se utilizó ADN de esperma de salmón (Sigma) como competidor no específico; en las competiciones específicas se usó un exceso molar de 500 veces de sonda no marcada. El gel fue secado y se obtuvo el autoradiograma.

**2.9 Extracción del ARN total por el método del fenol caliente:** El manejo del ARN se hizo con los cuidados sugeridos en el manual de Sambrook *et al* [155]. La extracción se hizo de acuerdo al protocolo de fenol caliente [157] con ligeras modificaciones. Se crecieron las células en agitación a 37°C y se resuspendieron en la solución I (acetato de sodio 0.1 M, sacarosa 0.3 M, pH 4.5). Las células se lisaron con la solución II (acetato de sodio 0.01 M, SDS 2%, pH 4.5), éstas muestras se calentaron a 70°C por 1.5 minutos. Se adicionó un volumen de fenol caliente equilibrado en agua y se incubó a 70°C por 3 minutos, este proceso se repitió una vez más pero incubando en hielo. Posteriormente se hicieron 2 extracciones con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. El sobrenadante de la última extracción se precipitó con 1/10 de volumen de una solución 3M de acetato de sodio y 2.5 volúmenes de etanol. La pastilla se resuspendió en dH<sub>2</sub>O tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC). Las muestras de ARN se trataron con desoxirribonucleasa I libre de ribonucleasas de acuerdo a las instrucciones del fabricante (“DNAse I amplification grade” Invitrogen) y se extrajeron una vez más con un volumen de fenol-

cloroformo-alcohol isoamílico. El sobrenadante de la última extracción se precipitó con etanol y se resuspendió en dH<sub>2</sub>O tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC), se guardó a -20°C hasta su uso.

Se confirmó la integridad del ARN en geles de agarosa-formaldehído y se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm. La pureza se estimó calculando la relación de las mediciones a 260 nm y 280 nm de las muestras, se utilizaron muestras cuya relación estaba entre 1.9 y 2. Para corroborar la ausencia de ADN en las muestras se hicieron reacciones de PCR con oligos específicos para dos genes, en ninguna de ellas se obtuvo el producto.

**2.10 Microarreglos:** Para los ensayos de microarreglos los cultivos se crecieron aeróbicamente a 37°C en medio (LB) con agitación rotacional. En el microarreglo MG, las células se cosecharon en las siguientes fases: exponencial tardía, estacionaria temprana, estacionaria media y estacionaria tardía. El ARN total utilizado en estos ensayos se procesó de acuerdo al protocolo descrito anteriormente. Estas muestras fueron entregadas a la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

**2.10.1 Análisis de los transcritos:** Se utilizó la biblioteca de oligos de 50-mer de MWGBiotech Oligo Sets ([www.mwgbio.com](http://www.mwgbio.com)). Contiene las 4286 sondas específicas de oligonucleótidos que representan el genoma completo de *E. coli* K-12. El análisis global de transcripción se hizo en la cepa MG1655 (tipo silvestre) y MG1655 *uvrY::cm*.

**2.10.2 Impresión de los arreglos:** La biblioteca de oligonucleótidos de 50-mer de MWGBiotech Oligo Sets se resuspendió a 40 µM en “Micro Spottins solution” (Telachem International Inc.) Las laminillas de 25x75 mm cubiertas de SuperAmine se imprimieron por duplicado y se fijaron a 80°C por 4 horas. Para la pre-hibridación las laminillas se rehidrataron con vapor de agua a 60°C y se fijaron con dos ciclos de luz UV (1200J). Después de hervirlas por dos minutos a 92°C, las laminillas se lavaron con etanol al 95% por un minuto y se prehibridaron en 5x SSC, 0.1% SDS y 1% BSA por una hora a 42°C. Las laminillas se lavaron y secaron para la hibridación.

**2.10.3 Preparación e hibridación de las sondas:** Se utilizaron 10 µg de ARN total para la síntesis e incorporación de los marcadores/colorantes dUTP-Cy3 o dUTP-Cy5 con el kit

“CyScribe First-Strand cADN labeling” de Amersham-Pharmacia. Se analizó la incorporación del fluoróforo midiendo la absorbencia a 555nm para Cy3 y a 655nm para Cy5. Se hibridó con cantidades iguales de cADN marcado y con la solución HybIT2 (Telachem International Inc.) agregadas a la colección de arreglos de *E. coli* por 14 horas a 42°C.

**2.10.4 Análisis de las imágenes de microarreglos y adquisición de los datos:** La adquisición y cuantificación de las imágenes se realizó con el ScanArray 4000 y su software ScanArray 4000 de Packard BioChips. Todas las imágenes se capturaron usando 60% de ganancia de PMT gain, 70-75% de la potencia del laser y 10  $\mu\text{m}$  de resolución a 50% de la velocidad. Para cada aplicación (“spot”) el valor de la media de la densidad (D), el valor de la media del background (B) y el valor de la media normalizada de la señal (S) que es el resultado de  $(D-B)$  y el diámetro interno (I) se calcularon con el software ArrayPro Analyzer de Media Cybernetics. El valor de la media normalizada de la señal (S) para cada aplicación se normalizó usando como 100% el valor de la media de la señal total obtenido de todas las aplicaciones del arreglo.

**2.10.5 Selección de señales y ruido de fondo:** Para seleccionar los cambios significativos, se calculó la relación entre la media de la densidad de todas las aplicaciones y la media del fondo ( $D_{\text{media}}/B_{\text{media}}$ ). Se seleccionaron como “aceptables” aquellas aplicaciones de Cy3 o Cy5 que cumplieran con la siguiente ecuación:  $D_{\text{CyX}}/B_{\text{CyX}} \geq (D_{\text{media}}/B_{\text{media}})$ . Se seleccionaron como “tamaño de aplicación aceptable” aquellas cuya relación de diámetro interno de Cy3 ( $I_{\text{Cy3}}$ ) / diámetro interno Cy5 ( $I_{\text{Cy5}}$ ) fuera mayor o igual que 0.9 y menor o igual que 1.1.

**2.10.6 Selección de los genes regulados en arreglos individuales:** Se obtuvo la relación del  $\text{Log}_2$  (Cy3/Cy5) para cada aplicación. Se consideraron activados los genes cuyo  $\text{Log}_2$  ( $S_{\text{Cy3}}/S_{\text{Cy5}}$ ) fuera mayor o igual a 0.4 (represión por UvrY de 1.3 veces) y reprimidos aquellos cuyo  $\text{Log}_2$  ( $S_{\text{Cy3}}/S_{\text{Cy5}}$ ) fuera menor o igual a -0.4 (activación por UvrY de 1.3 veces). Se decidió utilizar una condición relajada (1.3 veces) para generar el mayor número de candidatos del regulón de UvrY. Los genes se encuentran por duplicado en cada arreglo, por lo que se calculó la media y la desviación estándar de ambas aplicaciones para cada gen. Se seleccionaron como positivas aquellas aplicaciones cuyo promedio entre los duplicados fuera mayor que dos veces la

desviación estándar de los mismos, ésto se hizo con el objeto de tener valores de expresión confiables para cada gen.

Las condiciones para considerar a los genes como reprimidos por UvrY fueron:

$$D_{Cy3}/B_{Cy3} \geq D_{mediaCy3}/B_{mediaCy3}; I_{Cy3}/I_{Cy5} \geq 0.9; I_{Cy3}/I_{Cy5} \leq 1.1; \text{Log}_2(S_{Cy3}/S_{Cy5}) > 0.4 \text{ y } S_{Average} > 2x \text{ StDev.}$$

Las condiciones para considerar a los genes como activados por UvrY fueron:

$$D_{Cy5}/B_{Cy5} \geq D_{mediaCy5}/B_{mediaCy5}; I_{Cy3}/I_{Cy5} \geq 0.9; I_{Cy3}/I_{Cy5} \leq 1.1; \text{Log}_2(S_{Cy3}/S_{Cy5}) < -0.4 \text{ y } S_{Average} > 2x \text{ StDev.}$$

Resultados similares se obtienen con el software BRB arrays tools (linus.ncbi.nlm.nih.gov).

**2.10.7 Selección de los genes regulados entre arreglos:** Los genes que presentaron regulación, ya sea positiva o negativa de 1.3 veces de cambio en al menos 2 microarreglos fueron filtrados en hojas de Excel para análisis posteriores. Se seleccionaron un total de 297 genes (lista Anexo 1). El programa Cluster 3.0 se utilizó para comparar los perfiles de expresión de los genes [158], está disponible en el sitio <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>.

**2.10.8 Bases de datos utilizadas:**

EcoCyc	<a href="http://www.ecocyc.org">www.ecocyc.org</a>
GeneProtEc	<a href="http://genprotec.mbl.edu">http://genprotec.mbl.edu</a>
KEGG	<a href="http://www.genome.jp/kegg">www.genome.jp/kegg</a>
RegulónDB	<a href="http://www.cifn.unam.mx/Computational_Genomics/regulondb">www.cifn.unam.mx/Computational_Genomics/regulondb</a>

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Parte I.- Ensayos *in vivo*

##### 3.1.1 Monitoreo de la expresión de la fusión *csrB-lacZ*

Los experimentos se realizaron con cepas derivadas de la MG1655, se eligió este fondo genético porque fue el utilizado en la secuenciación del genoma de *Escherichia coli* K-12 [159]. Las cepas #300 (MG1655) Y #301 (MG1655 *uvrY::cm*) fueron transformadas por electroporación con el plásmido pCBZ1 (*csrB-lacZ*), se nombraron IFC302 e IFC304 respectivamente. Se crecieron por 24 horas en medio LB con agitación rotacional, la actividad del reportero *csrB-lacZ* fue monitoreada por ensayos de  $\beta$ -galactosidasa (fig. 9).

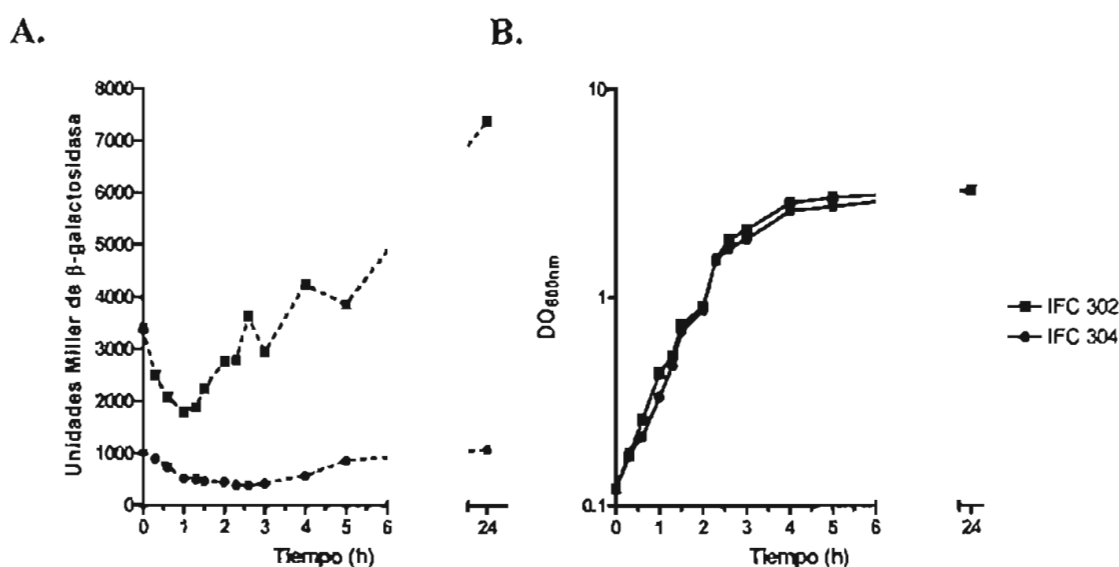


Figura 9. Monitoreo de la expresión de *csrB-lacZ* en las cepas (■)IFC302 e (●) IFC304. A. Ensayo de  $\beta$ -galactosidasa. B. Curva de crecimiento.

La elevada expresión del reportero en el tiempo cero se debe a la actividad remanente del cultivo del inóculo, conforme las bacterias crecen se ve una disminución de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa; cuando el cultivo alcanza la fase exponencial media, la actividad empieza a aumentar de forma gradual, a las 24 h se alcanza la máxima actividad (~ 7 400 unidades Miller). En IFC304 los niveles de  $\beta$ -galactosidasa son muy bajos por lo que la expresión de *csrB-lacZ* es

dependiente de UvrY. La máxima diferencia en la actividad del reportero se alcanza a las 24 h y es de aproximadamente 7 veces. Estos datos concuerdan con lo reportado en la literatura [74].

La cepa MG1655 posee el gen *lacZ* cromosomal por lo que se quiso eliminar la expresión del gen endógeno utilizando las cepas KSB837 (tipo silvestre), UY KSB837 (mutante *uvrY* isogénica) y BA KSB837 (mutante *barA* isogénica); todas son derivadas de MG1655 (*lacZ*) y contienen en cromosoma y en monocopia, a la fusión transcripcional *csrB-lacZ*. Las cepas se crecieron en medio LB hasta por 8 h con agitación rotacional (fig. 10).

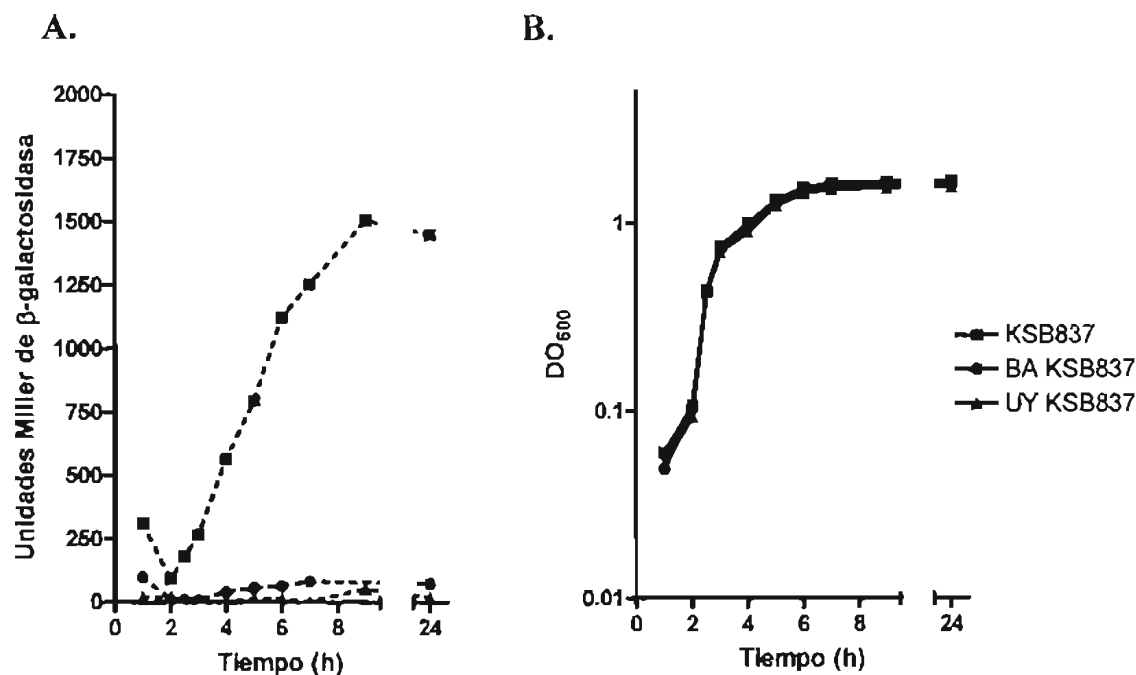


Figura 10. Monitoreo de la fusión cromosomal *csrB-lacZ* en aerobiosis. A. Ensayo de  $\beta$ -galactosidasa. B. Curva de crecimiento. (■) KSB837, (●) BA KSB837 y (▲) UY KSB837.

La expresión del reportero es muy baja en UY KSB337 y en BA KSB837 por lo que la expresión de *csrB* depende de UvrY y de BarA. La activación del reportero ocurre en la fase exponencial tardía (~3 h) y es de forma gradual; el máximo nivel de la expresión ocurre ya entrada la fase estacionaria tardía (~7 h). Se observa actividad remanente del cultivo del inóculo que disminuye hasta que el cultivo empieza a crecer.

Esta tendencia es consistente con el hecho de que en  $\gamma$ -proteobacterias crecidas en cultivo líquido, la mayoría de los fenotipos dependientes de GacA se expresan durante la transición de fase exponencial a estacionaria, la actividad del sistema GacS/GacA es baja durante el crecimiento exponencial y/o a baja densidad celular [89].



### 3.1.2 Búsqueda de condiciones que activen a la fusión *csrB-lacZ*

Utilizando al reportero *csrB-lacZ* en cromosoma (KSB837), exploramos algunas condiciones probables que activaran al sistema BarA/UvrY o bien que indujeran la producción de la señal que lo activa.

#### A. Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )

Se reportó que las mutantes *barA* y *uvrY* son más sensibles que la cepa de tipo silvestre al crecer en presencia de 0.1 y 1 mM de peróxido de hidrógeno; esta última concentración disminuye la viabilidad de las mutantes y, en menor grado, la de la cepa silvestre [64]. Por ello para probar si este compuesto podía activar al reportero *csrB-lacZ* se eligió utilizar 0.1 mM de  $H_2O_2$ . La estrategia fue crecer dos cultivos de la cepa KSB837 hasta una  $DO_{600}$  de  $\sim 0.1$ , donde la expresión del reportero es baja, a uno se le adicionó 0.1 mM de  $H_2O_2$  mientras que el otro sirvió de control. La actividad del reportero *csrB-lacZ* se monitoreó por 3h (fig. 11).

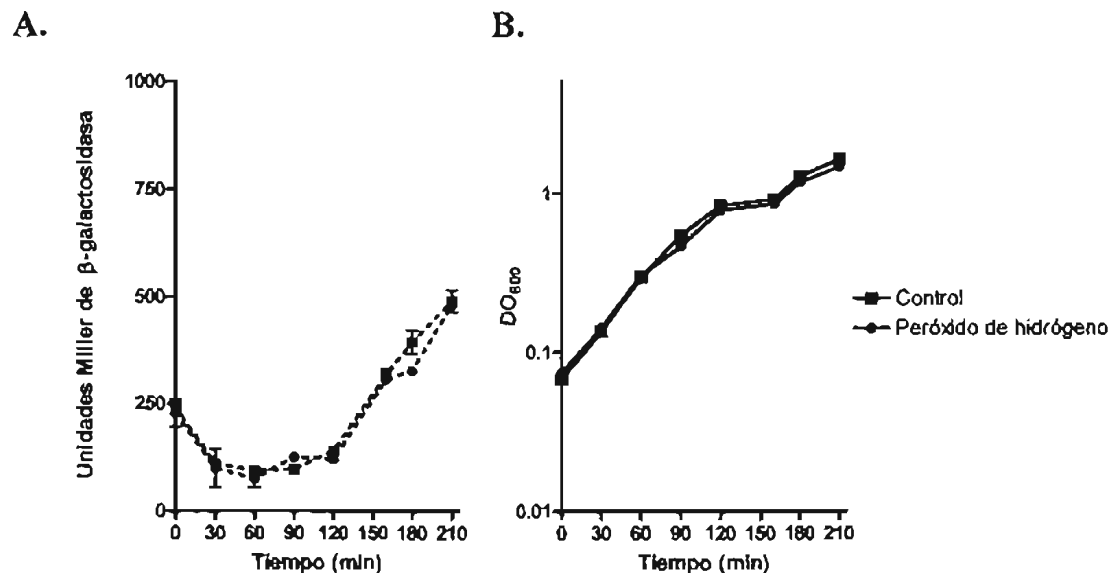


Figura 11. Cultivos de KSB837 con y sin 0.1 mM de peróxido de hidrógeno. A. Ensayo de  $\beta$ -galactosidasa. B. Curva de crecimiento. (■) Control; (●) Peróxido de hidrógeno.

El  $H_2O_2$  a una concentración de 0.1 mM no tiene efecto en la expresión del reportero *csrB-lacZ*. Estos datos sugieren que el peróxido *per se* o el estrés inducido por éste a la concentración utilizada, no está relacionado con la activación del reportero *csrB-lacZ*.

## B. Casaminoácidos

El sistema BarA/UvrY se ha relacionado con la regulación entre glicólisis y gluconeogénesis al ser un regulador del sistema Csr. En experimentos de competencia entre las mutantes *barA* y *uvrY* contra el tipo silvestre se demostró que ambas mutantes dominan en crecimiento sobre el tipo silvestre cuando se crecen en sustratos gluconeogénicos como los casaminoácidos o la triptona [65]. Por ello se probó si la adición de casaminoácidos activa la expresión del reportero *csrB-lacZ*. La estrategia fue crecer un cultivo de KSB837 a una  $DO_{600nm}$  de 0.2, donde la expresión del reportero *csrB-lacZ* aún es baja y adicionar casaminoácidos al 1% (fig. 12).

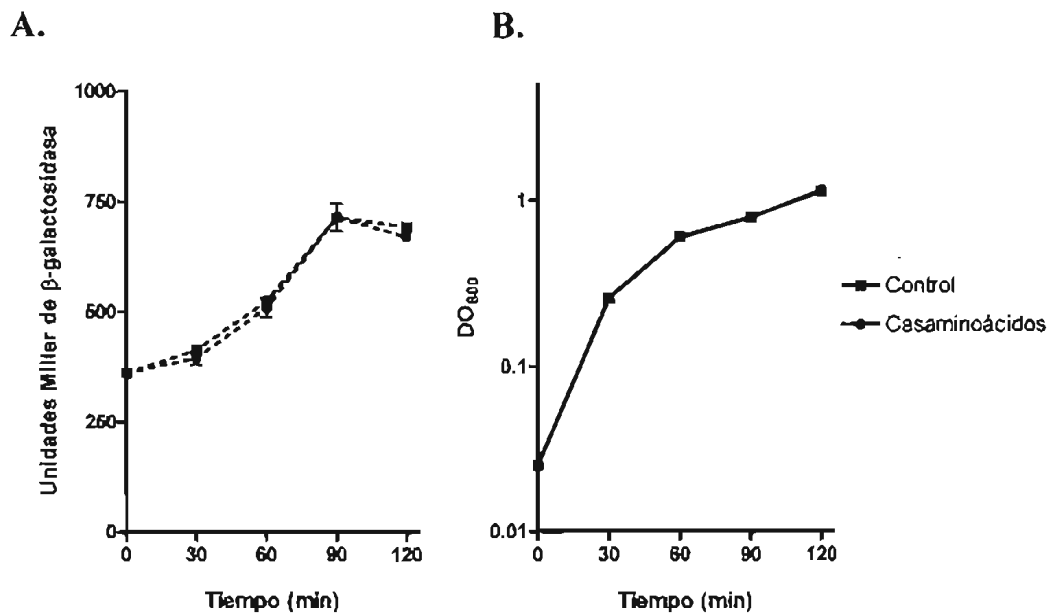


Figura 12. Adición de casaminoácidos al 1% a un cultivo de KSB837. **A.** Ensayo de  $\beta$ -galactosidasa. **B.** Curva de crecimiento. (■) Control; (●) Casaminoácidos.

La adición de casaminoácidos al 1% en el medio no tiene ningún efecto en la expresión del reportero, por lo que no parece ser la señal que active al sistema BarA/UvrY.

### C. Anaerobiosis

Una condición de estrés común para las bacterias patógenas y no-patógenas de *E. coli* que tiene un efecto directo sobre la regulación genética y el metabolismo, es la limitación de oxígeno en el medio, por ello monitoreamos la expresión del reportero en estas condiciones. La estrategia fue crecer las cepas KSB837 y UY KSB837 en medio LB y en condiciones anaeróbicas, la expresión de *csrB-lacZ* se siguió hasta por 36 h (fig. 13)

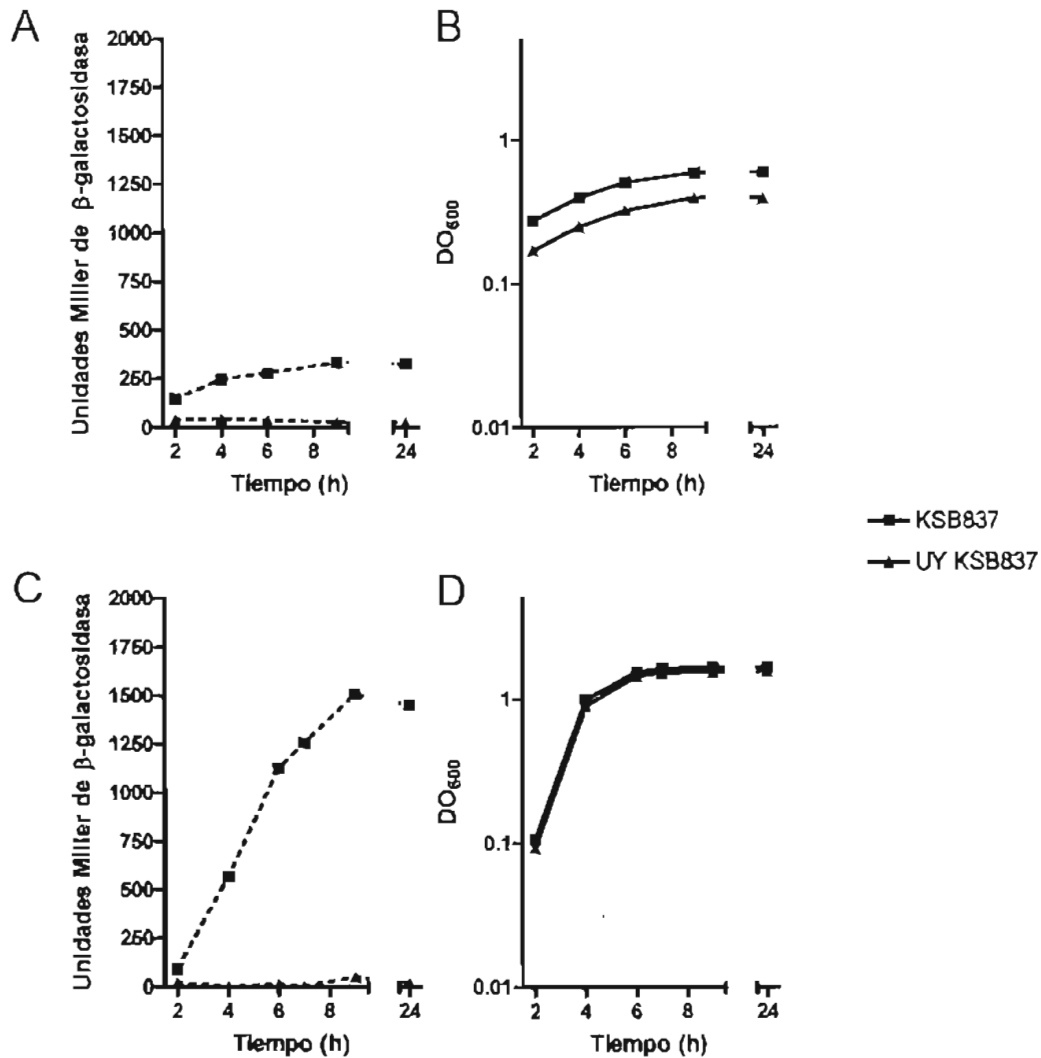


Figura 13. Monitoreo de la expresión de *csrB-lacZ* en las cepas KSB837 y UY KSB837 **A.** Actividad de  $\beta$ -galactosidasa en condiciones anaeróbicas; **B.** Crecimiento en condiciones anaeróbicas; **C.** Actividad de  $\beta$ -galactosidasa en condiciones aeróbicas; **D.** Crecimiento en condiciones aeróbicas. (■) KSB837, (▲) UY KSB837.

La mutante UY KSB837 presenta menor crecimiento en condiciones anaeróbicas si se compara con la cepa de tipo silvestre KSB837 (fig. 13B). En UY KSB837 no hay expresión de *csrB-lacZ* en ninguna de las dos condiciones. En el caso de KSB837 la expresión inicial del reportero en anaerobiosis solo alcanza a duplicarse una vez (de 2 a 4 h) y se mantiene casi sin cambio en niveles muy bajos, de ~300 Unidades Miller de  $\beta$ -galactosidasa hasta las 36 horas. En condiciones aeróbicas la expresión del reportero comienza en la fase exponencial media de crecimiento y alcanza un máximo de 1200 Unidades Miller en la fase estacionaria.

La falta de expresión del reportero en anaerobiosis se puede explicar por varias razones, la primera es que el sistema BarA/UvrY no esté activo y esto sugeriría que la señal de activación se encuentra en condiciones aeróbicas, la segunda es que el sistema se encuentre inhibido, la tercera es que exista otro regulador que en condiciones anaeróbicas supera la regulación de CsrB por UvrY y por último que la activación del sistema requiera de una densidad celular específica a la cual no llegan las bacterias en condiciones anaeróbicas.

Resultados recientes obtenidos por Verónica Mondragón en el laboratorio sugieren que sí hay activación de la expresión de *csrB-lacZ* en anaerobiosis en otros medios de cultivo: Kornberg (1.1%  $K_2HPO_4$ , 0.85%  $KH_2PO_4$ , 0.6% de extracto de levadura, 0.5% de glucosa), LB amortiguado con fosfatos a pH 7 (1.1%  $K_2HPO_4$ , 0.85%  $KH_2PO_4$ ) y LB con 0.5% de glucosa. Estos datos sugieren que la presencia o ausencia de oxígeno en el medio no es una señal de activación del sistema BarA UvrY, pero el medio parece influir en la expresión del reportero, un común denominador entre todos éstos es que sostienen un mayor crecimiento que en el medio LB.

#### D. Densidad-celular

Para probar si la activación de *csrB-lacZ* depende de la densidad celular, se inocularon 5 matraces con medio LB a  $DO_{600}$  iniciales de 0.025, 0.1, 0.25, 0.5 y 1 a partir de un cultivo crecido durante la noche, la expresión del reportero *csrB-lacZ* fue monitoreada por 7 horas (fig. 14).

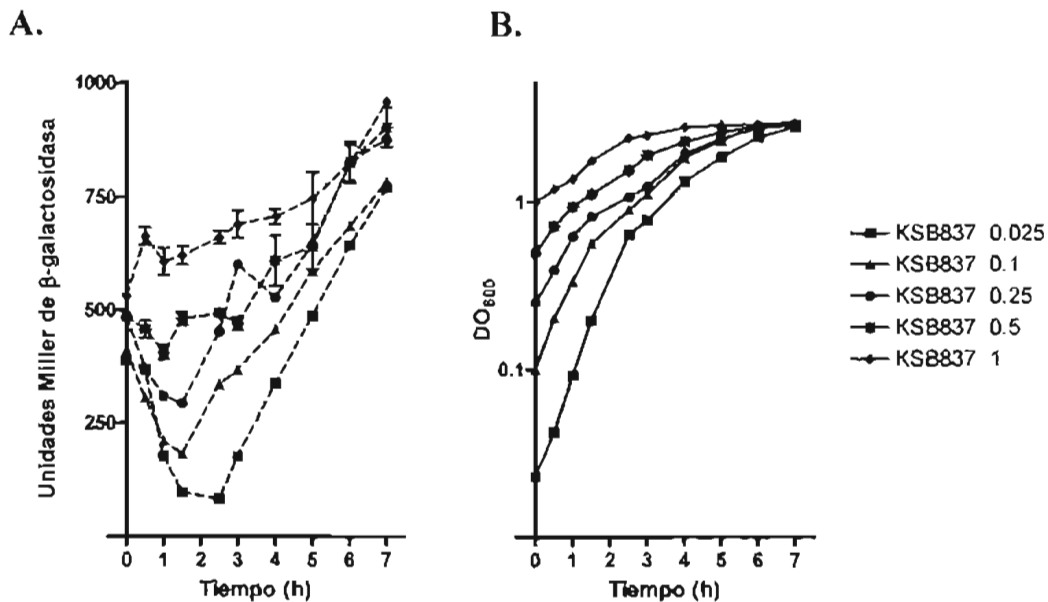


Figura 14. Monitoreo de la expresión de *csrB-lacZ* partiendo de diferentes  $DO_{600}$  iniciales en la cepa KSB837. A. Ensayo de  $\beta$ -galactosidasa. B. Curva de crecimiento. (■)  $DO_{600}$  0.025, (▲)  $DO_{600}$  0.1, (●)  $DO_{600}$  0.25, (\* )  $DO_{600}$  0.5, (◆)  $DO_{600}$  1.

El patrón de la expresión de *csrB-lacZ* es dependiente de la dilución inicial del cultivo, mientras más se diluye,  $DO_{600}$  de 0.025, más tiempo tarda en activarse el reportero. Por otra parte a mayor densidad inicial,  $DO_{600}$  de 1, el nivel de expresión es mayor aunque la activación es menor si se compara con la muestra más diluida. En los cinco casos la activación de la expresión de *csrB-lacZ* ocurre cuando los cultivos alcanzan una  $DO_{600}$  de entre 0.7 y 1.3.

Estos datos sugieren que la activación de *csrB-lacZ* es dependiente de una densidad celular que corresponde a una densidad óptica de entre 0.7 y 1.3; sin embargo no podemos discernir si el efecto es mediado por el contacto célula-célula, por la fase de crecimiento, por la velocidad de crecimiento o en un último caso por la acumulación o remoción de algún metabolito en el medio.

#### E. Adición de sobrenadantes de cultivos crecidos hasta la fase estacionaria

Se probó si el sobrenadante de una cepa de tipo silvestre podía activar la expresión de *csrB-lacZ* a densidades ópticas bajas. La estrategia fue obtener sobrenadantes de cultivos de KSB837 donde la expresión de *csrB-lacZ* es activa ( $DO_{600} \sim 0.9$ ), crecidos en medio LB y en medio LB + 0.5% de glucosa; se decidió agregar la glucosa al medio de cultivo para explorar si el AI-2, producido en ésta condición, influenciaba la expresión del reportero. Un precultivo de la

cepa KSB837 fue crecido hasta una  $DO_{600}$  de 0.5, donde la expresión del reportero todavía es baja y se resuspendió a una  $DO_{600}$  de  $\sim 0.1$  en los sobrenadantes colectados previamente y en medio LB fresco; la actividad del reportero fue monitoreada por 3 horas (fig. 15).

- 1) M1: LB Nuevo
- 2) MC2: Sobrenadante crecido en medio LB
- 3) MC3: Sobrenadante crecido en medio LB +0.5% Glucosa

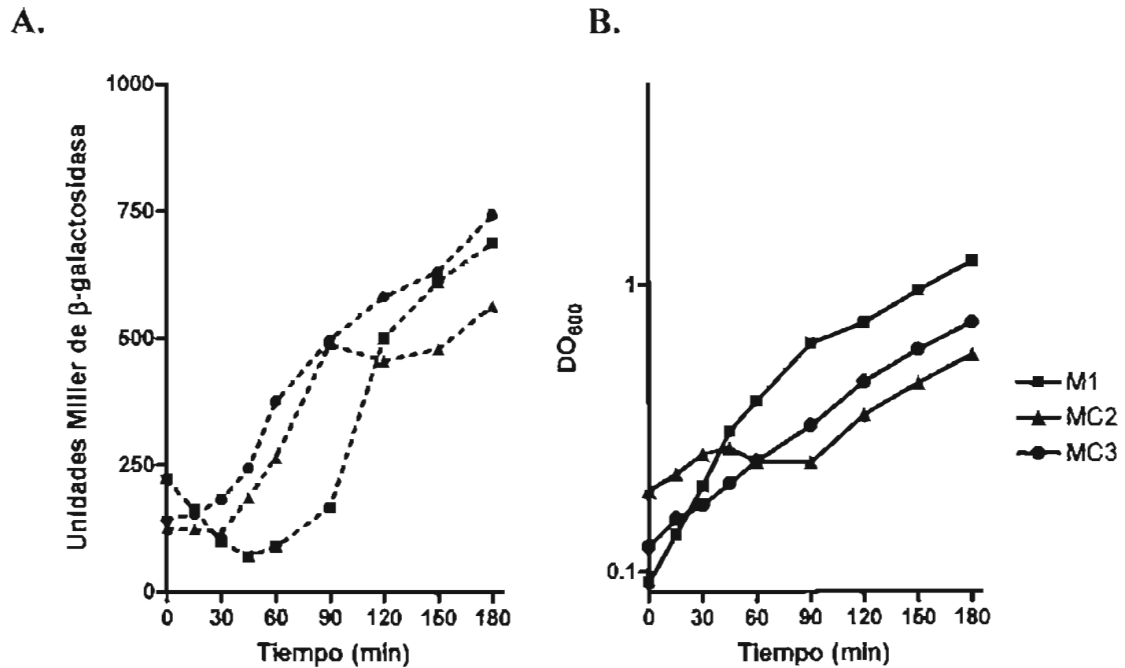


Figura 15. Cultivos de KSB837 resuspendidos en sobrenadantes de medios condicionados. (■)M1, (▲)MC2, (●)MC3.

Cuando se adicionan los medios condicionados (MC2 y MC3) a cultivos de densidades ópticas bajas, la expresión de *csrB-lacZ* aumenta si se compara con la del cultivo al que se le adicionó LB (M1). El experimento también indica que la densidad celular es un factor secundario ya que aunque el cultivo M1 crece más rápido que MC2 y MC3, la expresión del reportero se retarda. A partir de los 120 min hay una diferencia en el nivel de expresión de *csrB-lacZ* entre el MC2 (sobrenadante sin glucosa) y el MC3 (sobrenadante con glucosa) que podría deberse al AI-2 o a otro metabolito; sin embargo, como también está afectada la velocidad de crecimiento, no se puede distinguir cuál de las dos posibilidades es la que influye en la expresión del reportero. Estos datos sugieren que hay un componente en el sobrenadante que estimula la expresión de

*csrB-lacZ*. no podemos discernir si es un metabolito, por ejemplo el AI-2, que se acumula o que se agota. Sin embargo, los datos también sugieren que la velocidad de crecimiento puede ser un factor que regula la expresión del repotero. Para determinar si el AI-2 está influyendo en la expresión del repotero, en la sección F se realizó otro experimento en donde no se afectara la velocidad de crecimiento, utilizando sobrenadantes de una cepa AI2<sup>+</sup> y una AI2<sup>-</sup>.

Se ha especulado que BarA en *E. coli* monitorea algún producto metabólico del medio que es representativo del estatus energético del mismo [65] los datos obtenidos en la fig. 15 apoyan esta teoría. De manera interesante, los sobrenadantes de cultivos densos de *Pseudomonas fluorescens CHA0* contienen un componente que estimula la expresión de *rsmZ* (CsrB) y del regulón GacA [111].

F. Adición de sobrenadantes ¿La activación de BarA/UvrY depende de un mecanismo de tipo "Quorum Sensing" mediado por AI-2?

*E. coli* y *Salmonella* producen el Autoinductor-2 (AI-2) durante la fase exponencial de crecimiento, el máximo se alcanza durante la transición a la fase estacionaria. En este punto es capturado del medio por un sistema de transporte y procesamiento codificado en el operón *lsr* (antes llamado *b1513* en *E. coli*). Existen dos reportes que coinciden en que la cepa DH5- $\alpha$  de *E. coli* no produce el AI-2 pero difieren en cuanto a las condiciones en las que es producido por la cepa MG1655. El primero sugiere que la presencia de glucosa y otros azúcares en el medio es necesaria para se produzca el AI-2 [128], el segundo detecta actividad de AI-2 en presencia y ausencia de glucosa [130]. La explicación a esta discrepancia está en que la represión catabólica, mediada por el AMPc y la proteína receptora de AMPc (CRP), influencia la acumulación del AI-2. En presencia de glucosa el nivel de AMPc disminuye, por lo que CRP es incapáz de activar la transcripción del operón *lsr* y el AI-2 se acumula en el medio. En ausencia de glucosa, el nivel de AMPc aumenta por lo que el complejo AMPc-CRP estimula la transcripción del operón y el AI-2 es capturado del medio por el sistema Lsr [131].

Se realizó un experimento preliminar para ver si *csrB-lacZ* respondía a la presencia o ausencia del AI-2 en el medio, se utilizaron las condiciones donde se obtiene la máxima producción del AI-2 [128]. Las cepas MG1655 (tipo silvestre) y DH5 $\alpha$  (AI-2<sup>-</sup>) se crecieron por 6 y 8 hrs a 30°C con y sin glucosa al 0.5%. Los cultivos se centrifugaron y filtraron por una membrana de 0.22 $\mu$ m para colectar los sobrenadantes, se guardaron a -20°C hasta su uso. Al día

siguiente estos sobrenadantes fueron adicionados a una concentración final del 10% volumen en volumen a un precultivo de la cepa KSB837 ( $DO_{600}$  0.2), se monitoreó la expresión de *csrB-lacZ* (fig. 16).

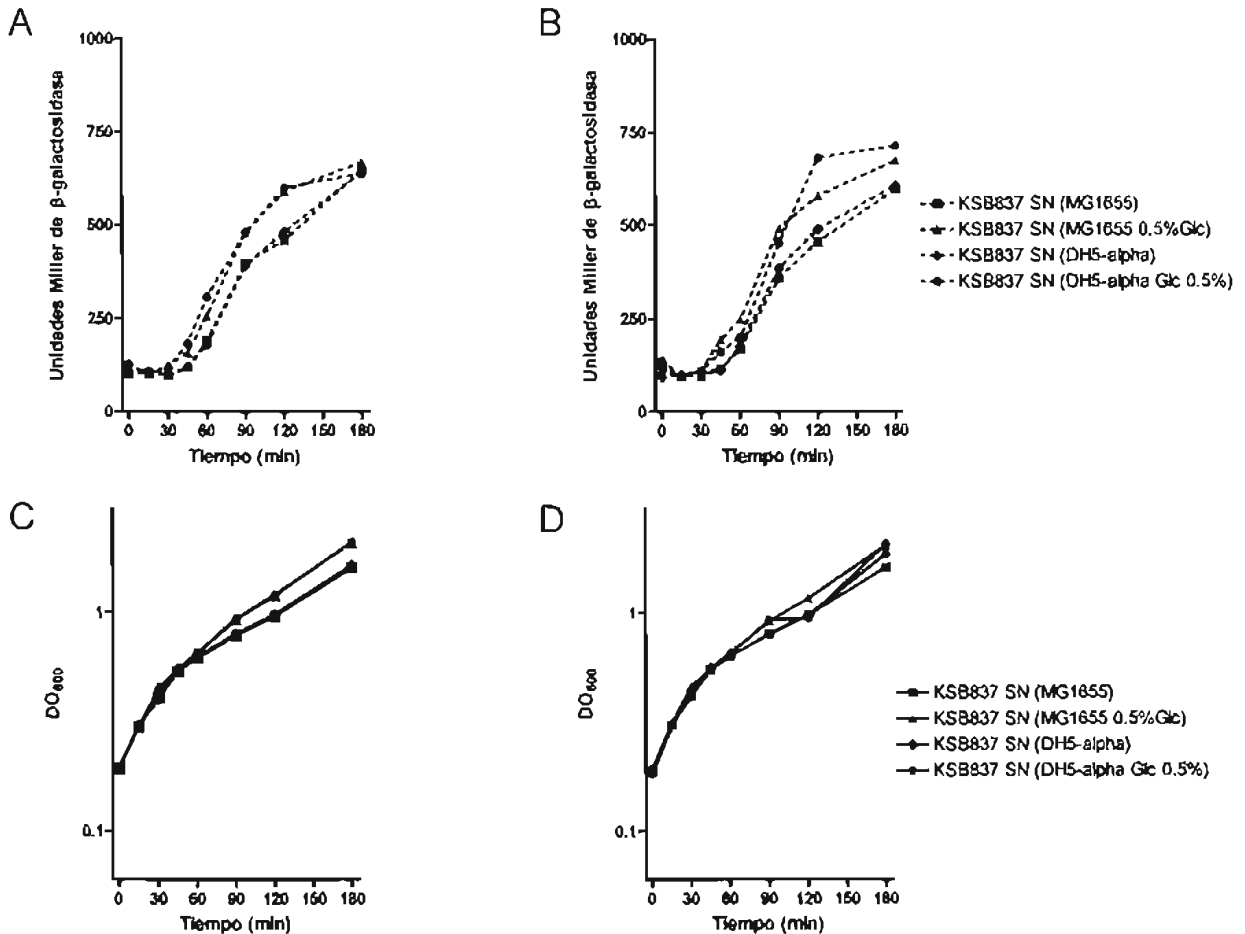


Figura 16. Adición de sobrenadantes (SN) de MG1655 y DH5 $\alpha$  crecidos con y sin glucosa (Glc) a cultivos de la cepa KSB837. **A.** Monitoreo de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa (SN de 6h); **B.** Curva de crecimiento (SN de 6h); **C.** Monitoreo de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa (SN 8h); **D.** Curva de crecimiento (SN 8h). (■) SN MG1655, (▲)SN MG1655 Glc, (◆) SN DH5 $\alpha$ , (●) SN DH5 $\alpha$  Glc

Los datos preliminares sugieren que AI-2 no participa en la activación de *csrB-lacZ*, ya que no hay cambios en los patrones de expresión del reportero cuando se agregan los sobrenadantes de la cepa MG1655 y DH5 $\alpha$  crecidos con y sin glucosa en ambos tiempos. La ligera diferencia entre los sobrenadantes crecidos en glucosa y aquellos crecidos sin glucosa no parece ser significativa. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en la fig. 15, la adición de sobrenadantes (1 a 10 volumen/volumen) sigue estimulando la expresión del reportero



*csrB-lacZ* a densidades ópticas bajas. No podemos discernir si este efecto es mediado por un metabolito que se acumula o uno que se agota del medio.

Para corroborar que el AI-2 obtenido es funcional, se necesita hacer el control experimental de la activación del biosensor por los sobrenadantes, es decir, hay que adicionarlos a bacterias como *V. harveyi* o que poseen sistemas de “Quorum Sensing” que responden al AI-2.

Recientemente se ha propuesto que además del AI-2, *E. coli* produce un autoinductor 3 (AI-3) dependiente también de la proteína LuxS. Se sugiere que es el AI-3, y no el AI-2, el que regula la movilidad (flagelo) y al sistema de secreción de proteínas tipo III de una cepa enterohemorrágica. Además, se ha propuesto que el AI-3 tiene relación en estructura con las catecolaminas de mamíferos, epinefrina y norepinefrina, ya que ambas pueden sustituir al AI-3 y restaurar la movilidad y al sistema de secreción tipo III. [160]. Sería interesante probar si el AI-3 o la epinefrina y norepinefrina tienen alguna relación con el sistema BarA/UvrY.

## 3.2 Parte II.- Ensayos *in vitro*

### 3.2.1 La proteína UvrY puede ser fosforilada *in vitro* por acetil fosfato

La fosforilación de reguladores de respuesta por compuestos donadores de fosfato de bajo peso molecular como el acetil fosfato es un fenómeno conocido desde hace tiempo [63]. Para probar si UvrY puede ser fosforilado *in vitro* por acetil fosfato (AcP) se purificó la proteína y se incubó con AcP marcado con el isótopo  $P^{32}$ . El vector de sobreexpresión pQE30UvrY en la cepa M15 (pREP4) fue inducido con 1mM de IPTG, la proteína His<sub>6</sub>-UvrY fue purificada en condiciones nativas por cromatografía de níquel NTA-Agarosa. La proteína UvrY dializada fue incubada por 1 min con acetil fosfato marcado con  $P^{32}$  (AcP<sup>32</sup>). La reacción se detuvo con amortiguador de carga para geles de SDS-PAGE y fue sujeta a electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), se obtuvo el autoradiograma.

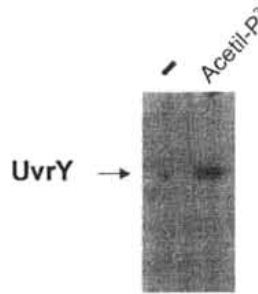


Figura 17. Fosfoimagen de UvrY incubada con AcP<sup>32</sup> por 1 min.

La fig. 17 muestra que el AcP es un donador de fosfato para la proteína UvrY. Estos datos sugieren que la proteína purificada se encuentra en la conformación nativa y puede ser fosforilada *in vitro* con AcP no marcado y muy posiblemente por carbamil fosfato también.

Con el objeto de identificar el sitio de unión al ADN de la proteína UvrY fosforilada se realizaron ensayos de cambio en la movilidad electroforética. El objetivo final era obtener las condiciones de unión al ADN para hacer los ensayos de protección a DNasa I y determinar la secuencia consenso del sitio de unión de este factor. Una vez obtenido se buscaría en las secuencias río arriba de los genes regulados en los microarreglos para obtener el regulón de UvrY.

### 3.2.2 Ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)

Para identificar el sitio de unión UvrY (caja UvrY) se realizaron ensayos de cambio en la movilidad electroforética (“Electrophoretic Mobility Shift Assay” EMSA por sus siglas en inglés) sobre el promotor del gen *csrB*. Esta técnica es la más común en el estudio de interacciones ADN-proteína. El principio general se basa en que un fragmento de ADN tiene un movimiento dependiente de su tamaño durante la electroforesis en una matriz de poliacrilamida o agarosa. Dado que las moléculas más grandes se mueven más lentamente, un complejo ADN-proteína tendrá un retardo en la migración si se compara con el fragmento de ADN solo [156].

Como sonda se utilizó un fragmento de 245pb correspondientes al promotor y a la región río arriba del gen *csrB* que comprende desde el nucleótido -242 al +4 relativos al inicio de la transcripción. Una vez que corroboramos que la proteína His<sub>6</sub>-UvrY puede ser fosforilada *in vitro*, se utilizó el carbamil fosfato para ello, de acuerdo al protocolo descrito en Materiales y Métodos.

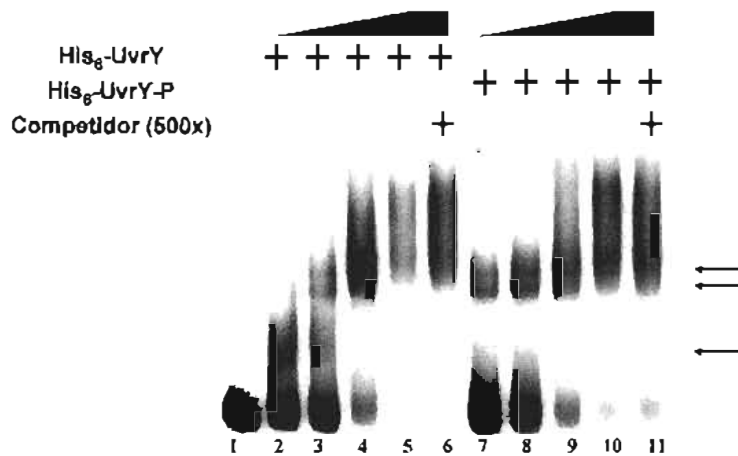


Figura 18. EMSA de His<sub>6</sub>-UvrY (carril 2-6) y His<sub>6</sub>-UvrY-P (carril 7-11) sobre el promotor y la región río arriba del gen *csrB*.

La proteína His<sub>6</sub>-UvrY es capaz de unirse al promotor de *csrB* (fig. 18 carril 2-6) al igual que His<sub>6</sub>-UvrY-P (carril 7-11). Existe una ligera diferencia en los complejos formados ya que con la concentración más baja de proteína His<sub>6</sub>-UvrY-P (carril 7) se observa un complejo de dos bandas, mientras que con la misma condición de His<sub>6</sub>-UvrY se ve una banda poco definida que migra más rápido (carril 2), el complejo de dos bandas se observa al incrementar la concentración de proteína (carril 3). Tanto con His<sub>6</sub>-UvrY-P como con His<sub>6</sub>-UvrY el incremento de la proteína provoca la formación de un complejo menos definido y aunque la unión parece ser específica por la presencia de ADN heterólogo en las reacciones, un exceso (500x) de sonda no marcada es incapaz de competir al complejo (comparar carril 6 con 5 y 11 con 10). Patrones similares se obtuvieron con la proteína fosforilada con acetil fosfato y con la cinasa BarA (datos no mostrados). Falta por determinar las condiciones óptimas de unión para este ensayo, quizá sea necesario modificar la fuerza iónica del amortiguador o las condiciones de electroforesis. También es posible que la proteína recombinante purificada se encuentre fosforilada. En un ensayo de EMSA de SirA (*S. typhimurium*) sobre el promotor de CsrB también se observa unión de la proteína recombinante sin fosforilar [92].

Las interacciones observadas son alentadoras en un sentido: todas fueron en presencia de ADN heterólogo por lo tanto no son totalmente inespecíficas. Lo importante es lograr competir con la sonda fría, de este modo se podrán establecer condiciones de unión confiables para hacer el mapeo por DNasaI. Es posible que la proteína His<sub>6</sub>-UvrY en las condiciones probadas no

dimeriza u oligomeriza correctamente, por lo que se pueden probar varias condiciones de sal, pH, glicerol) y DTT entre otras para lograr obtener un complejo específico que pueda ser competido.

### 3.2.3 Microarreglo (MGs)

En paralelo se hicieron análisis de microarreglos para identificar al modulón del sistema BarA/UvrY de *Escherichia coli*, la estrategia fue comparar el perfil global de expresión de la cepa MG1655 tipo silvestre (TS) con el de MG1655 *uvrY::cm*, la mutante isogénica *uvrY* durante el crecimiento en medio rico (LB) y aerobiosis. Se decidió seguir esta estrategia para generar el mayor número de datos posibles ya que no se conoce bien la fisiología del sistema BarA/UvrY.

El ARN total se extrajo en los puntos marcados con las flechas en la fig. 19, el tiempo I corresponde a la fase exponencial tardía (MGI), II a la fase estacionaria temprana (MGII), III a la fase estacionaria media (MGIII) y IV a la fase estacionaria tardía (MGIV).

En los microarreglos no se invirtió el marcaje del cADN, por lo que datos detallados de expresión en cada punto de la curva requieren de más controles (un duplicado biológico además del intercambio de colorantes).

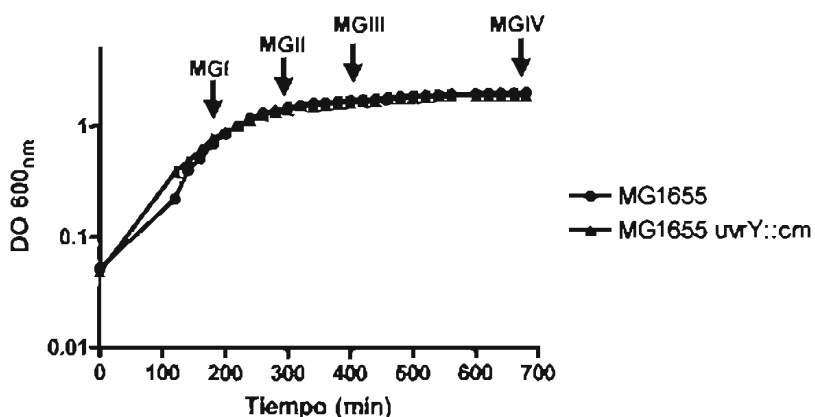


Figura 19. Curva de crecimiento de MG1655 y MG1655 *uvrY::cm*. Las flechas indican el tiempo en el que se extrajo el ARN total. (●)MG1655, (▲)MG1655 *uvrY::cm*.

También se analizó la integridad de los ARN's en geles de agarosa-formaldehído y se estimó su pureza calculando la relación de las absorbencias a 260 y 280nm ( $Abs_{260nm}/Abs_{280nm}$ ), relaciones de 1.8 a 2 indican preparaciones de ARN altamente puras (fig. 20).

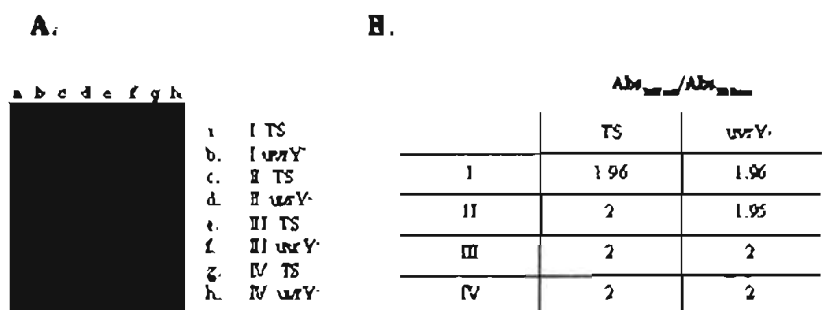


Figura 20. **A.** Gel de ARN, se cargaron 5  $\mu$ g de ARN total por carril; **B.** Relación de las absorbencias. TS (tipo silvestre) se refiere al ARN de la cepa MG1655, *uvrY* se refiere a la cepa MG1655 *uvrY::cm*.

Estas muestras fueron entregadas a la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular para los ensayos de microarreglos. El ARNm fue convertido a ADNc por la acción de la transcriptasa reversa, en el proceso se incorporaron los fluoróforos Cy3 y Cy5 para la mutante y la cepa de tipo silvestre respectivamente. Las laminillas del microarreglo que representan a los 4286 ORFs de *E. coli* fueron hibridadas con cantidades iguales del ADNc marcado. Los genes con niveles idénticos de expresión son representados por un color mixto de los fluoróforos, en términos de veces de cambio su valor es 1 por la relación de Cy3/Cy5. Aquellos que difieren en los niveles de expresión, uno de los dos fluoróforos domina, la relación Cy3/Cy5 se aleja de 1 de manera positiva o negativa.

En la fig. 21 se muestra un gráfico con el total de genes regulados por UvrY de cada microarreglo, el límite de selección fue de 1.3 veces de cambio en *uvrY* con relación a la tipo silvestre. El análisis del microarreglo MGI reveló un total de 767 genes regulados por UvrY: 369 positivamente y 397 negativamente. En MGII el total disminuyó a 276, de ellos 130 están regulados positivamente y 146 negativamente. En MGIII, cuando los cultivos alcanzan la fase estacionaria, el total de genes regulados aumenta a 610: 253 positivamente y 357 negativamente. Para MGIV, correspondiente a 11 horas de crecimiento, existe una gran diferencia en la expresión de los genes entre la mutante *uvrY* y la tipo silvestre, el total fue de 1336 genes regulados: 850 positivamente y 486 negativamente.

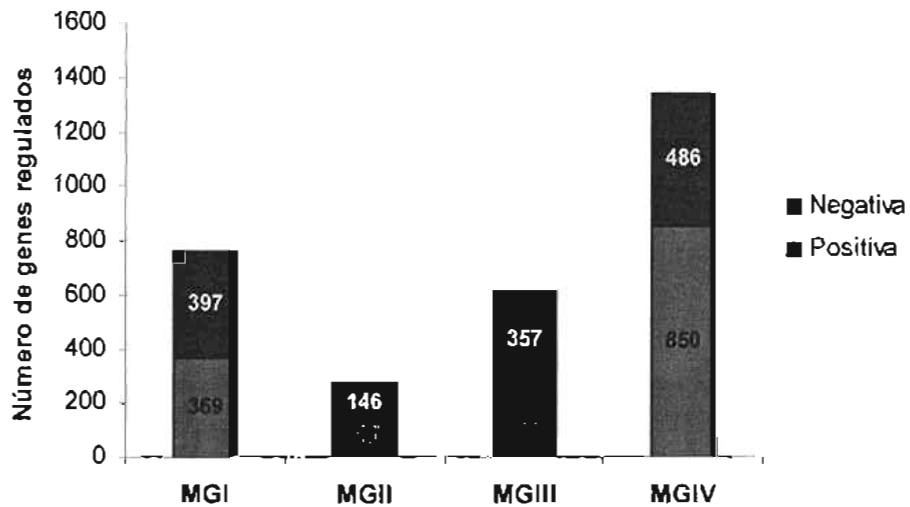


Figura 21. Total de genes regulados por UvrY (+/- 1.3 veces de cambio) de cada microarreglo.

El número de genes afectados por UvrY en MGIV es muy grande; sin embargo, no hay que perder de vista que las células se encuentran en un estado general de estrés debido, por ejemplo, al agotamiento de nutrientes, a la acumulación de daño por oxidación debido al crecimiento y a la fase estacionaria y la acumulación de productos metabólicos tóxicos [161]. El análisis también reveló que la expresión de varios reguladores pleiotrópicos p ej. RpoS y HNS está afectada, por lo que este número puede reflejar también funciones superpuestas de varios regulones.

La fig. 22 es una vista general de todos estos genes que presentaron cambios significativos (+/- 1.3 veces) en cada microarreglo agrupados por grupo funcional de acuerdo a la Enciclopedia de *E. coli* ([www.ecocyc.org](http://www.ecocyc.org)) y al GenProtEc ([www.genprotec.mbl.edu](http://www.genprotec.mbl.edu)) como se describió en [149].

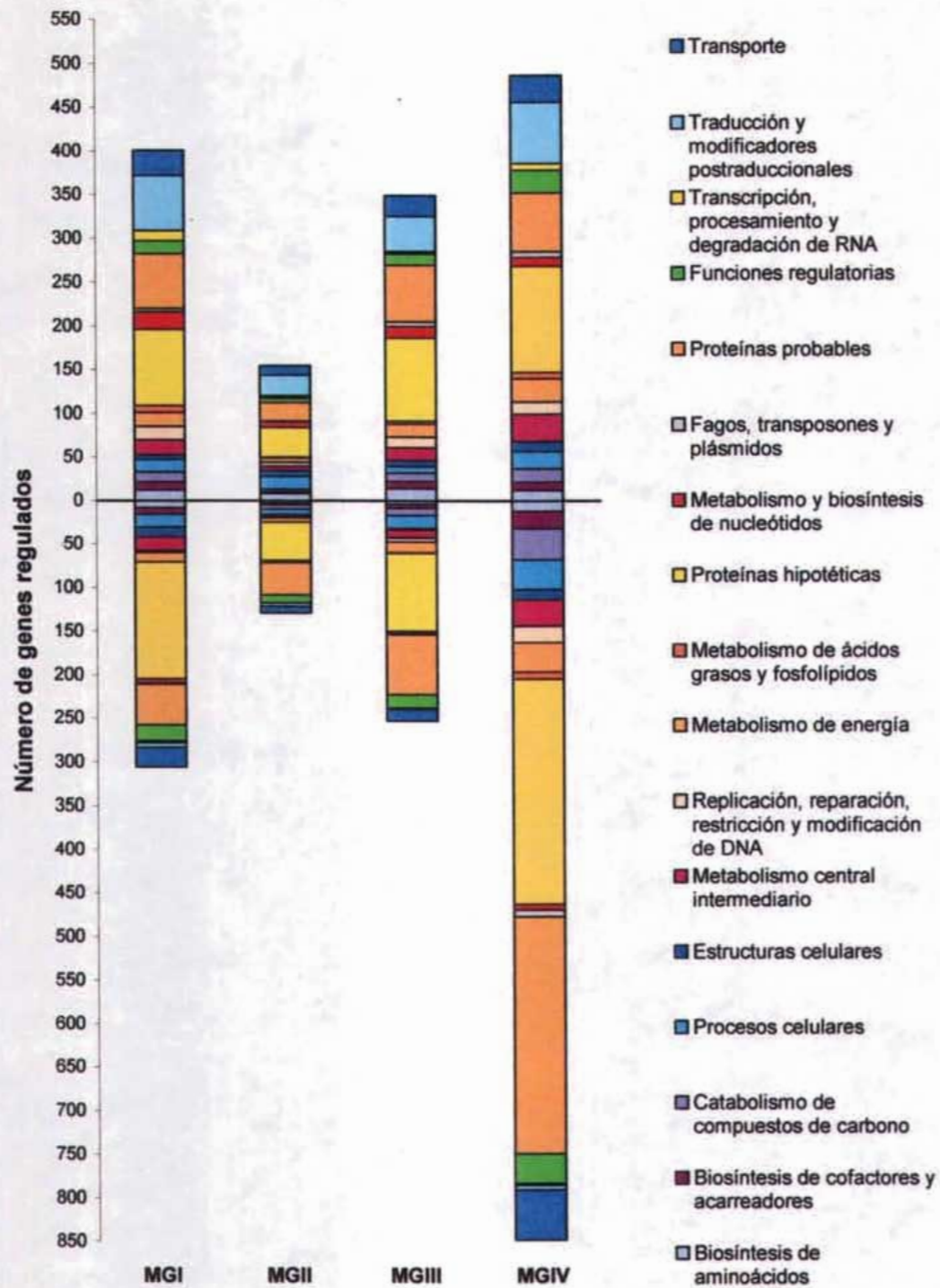


Figura 22. Vista general de los genes que presentaron cambios significativos ( $\pm 1.3$  veces) en cada microarreglo agrupados por grupo funcional. El eje de las X divide los genes que son regulados negativamente (parte superior) o positivamente (parte inferior) por UvrY.



Tomando como criterio estricto la regulación positiva (+) o negativa (-) en al menos dos microarreglos seleccionamos un total de 297 genes; de esta forma se identifican a los genes con cambios reproducibles en su expresión en los microarreglos MGI, MGII, MGIII y MGIV, son fuertes candidatos a ser parte del regulón de UvrY. La lista de los 297 genes agrupados por grupo funcional está en el ANEXO1.

Los datos fueron analizados con el programa Cluster 3.0 [158] disponible en <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>. El algoritmo utilizado hace un análisis de todos los patrones de la expresión de genes que convierte en vectores, se comparan entre ellos y se crea una matriz de correlación con estos vectores, mientras mayor sea ésta, mayor es la similitud. Estos elementos se juntan para formar un nodo, a su vez a este nodo se le asigna un nuevo vector que es el promedio de los elementos que lo conforman. Este vector compuesto es comparado con todos los vectores de la expresión de los genes y el proceso se repite hasta que se agrupan todos los elementos, aquellos que son similares, quedan juntos en una estructura de tipo “árbol”, parecida a los dendogramas, donde las ramas cortas representan elementos similares y las ramas largas indican una disminución en la similitud. El algoritmo utilizado fue el de agrupamiento por promedio, la medición de la distancia se basó en una correlación Pearson.

La fig. 23 es una vista general de los 297 genes regulados, están agrupados jerárquicamente por sus tendencias de expresión de acuerdo al programa Cluster 3.0 [158]. El color rojo indica regulación negativa por UvrY (<-1.3 veces), el color verde indica regulación positiva (>1.3 veces) y negro indica sin cambio, la intensidad de cada color refleja el nivel de expresión del gen.

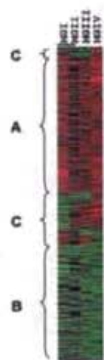


Figura 23. Agrupamiento por jerarquía en las tendencias de expresión de los 297 genes seleccionados.



De manera general podemos clasificar los genes en 3 grandes grupos de acuerdo a la tendencia en su expresión, los del grupo A tienden a estar regulados negativamente por UvrY, el grupo B tiende a estar regulados positivamente y el grupo C son genes que tienden a cambiar el patrón de regulación. La lista completa de los 297 genes clasificados en los grupos A, B y C está en el ANEXO 2.

Los genes *csrB* y *csrC* no están representados en el microarreglo, por lo que no podemos ver sus patrones de expresión en estos experimentos.

Todavía no tenemos clara la relación entre los genes de estos grupos, ni cómo pueden estar interaccionado entre ellos; sin embargo tomando en cuenta este análisis y la tabla de genes agrupados por grupo funcional, se hicieron las siguientes observaciones.

Dentro del grupo A (regulados negativamente por UvrY) están:

- Los genes *atpABCEFH* que codifican para la ATP sintasa. Del operón (*atpIBEFHAGDC*) únicamente *atpG* no presentó regulación en ninguna condición.

Gen	Microarreglo			
	MGI	MGII	MGIII	MGIV
<i>atpA</i>	-1.5		-1.4	-2.5
<i>atpB</i>	-1.4			-2.6
<i>atpC</i>			-2.0	-2.2
<i>atpD</i>				-1.8
<i>atpE</i>	-1.5		-1.4	-3.3
<i>atpF</i>	-2.1	-1.4	-1.6	-2.7
<i>atpH</i>	-2.3		-1.3	-2.1
<i>atpI</i>	-1.5			-1.8

- Genes que codifican componentes de estructuras ribosomales de 30S y 50S. *rplA*, *rplB*, *rplD*, *rplE*, *rplF*, *rplJ*, *rplK*, *rplO*, *rplP*, *rplR*, *rplU*, *rplW*, *rplY*, *rpmA*, *rpmB*, *rpmD*, *rpmG*, *rpmH*, *rpmI*, *rpsB*, *rpsD*, *rpsG*, *rpsH*, *rpsL*, *rpsM*, *rpsN*, *rpsP*, *rpsQ*, y *rpsU*.

Gen	Microarreglo			
	MG I	MG II	MG III	MG IV
<i>rplA</i>	-2.0	-1.6	-1.5	-1.8
<i>rplB</i>	-2.6	-1.5		-2.3
<i>rplD</i>	-3.7		-1.8	-2.4
<i>rplE</i>	-4.7	-2.7	-3.6	-8.2
<i>rplF</i>	-3.5	-2.7	-1.7	-7.3
<i>rplJ</i>	-1.6	-1.5	-1.4	-1.7
<i>rplK</i>	-2.1		-1.6	-2.7
<i>rplO</i>	-1.7	-1.4		-2.2
<i>rplP</i>	-2.1			-2.1
<i>rplR</i>	-2.3	-1.6		-1.9
<i>rplT</i>			-1.4	-1.6
<i>rplU</i>	-2.3	-1.5	-2.2	-2.7
<i>rplW</i>	-3.0	-1.3		-2.0
<i>rplY</i>		-2.0	-1.6	-3.0
<i>rpmA</i>	-2.0	-1.4		-3.1
<i>rpmB</i>	-1.7			-2.0
<i>rpmD</i>	-2.0			-6.6
<i>rpmG</i>	-1.5		-1.7	-2.4
<i>rpmH</i>	-1.7		-1.4	-2.8
<i>rpmI</i>			-1.6	-1.7
<i>rpsB</i>	-1.7	-1.4		-1.5
<i>rpsD</i>	-2.8	-1.5	-1.8	-2.3
<i>rpsG</i>	-2.1		-1.3	-2.3
<i>rpsH</i>	-2.6	-1.6		-1.8
<i>rpsL</i>	-1.6	-1.5	-1.5	-2.2
<i>rpsM</i>	-1.9	-1.5	-1.5	-3.7
<i>rpsN</i>	-3.3			-2.3
<i>rpsP</i>	-1.6			-1.9
<i>rpsQ</i>	-1.5	-1.4		-1.5
<i>rpsU</i>	-3.1		-1.7	-2.1

El número de ribosomas y ARNt varía con el crecimiento de *E. coli*, por ejemplo durante el crecimiento rápido las células contienen unos 70, 000 ribosomas, mientras que durante el crecimiento lento sólo poseen unos 20,000. Las proteínas ribosomales y el ARNr son sintetizados independientemente y ensamblados, sin embargo ésta síntesis está co-regulada ya que no hay proteínas ribosomales o ARNr libre [162]. Dos puntos a resaltar son (i) la regulación dependiente de la velocidad de crecimiento de los ARNr's y

los ARNt's; y (ii) en la fase estacionaria la síntesis de ARNr es inhibida y la transcripción de los componentes ribosomales disminuye (revisado en [163])

En los microarreglos no están representados los genes que codifican los ARNr; sin embargo, la regulación de las proteínas ribosomales aunado al hecho de que el sistema BarA/UvrY se activa en la fase exponencial tardía, sugiere que UvrY, directa o indirectamente puede ser un regulador negativo de los componentes ribosomales. También se sabe que la alarmona ppGpp sintetizada por la proteína RelA es inducida durante condiciones de ayuno e inhibe la transcripción del rARN y de tARN (revisado en [163]); un dato interesante es que el gen *relA* está regulado positivamente por UvrY 1.4 y 1.5 veces en MGII y MGIV respectivamente.

- Genes del operón *infC-rpmI-rplT* que codifican para el factor del inicio de la traducción IF3 y las proteínas ribosomales L35 y L20 respectivamente. En *Pseudomonas fluorescens* CHA0 el operón *infC-rpmI-rplT* suprime en multicopia una mutación *gacA* (*ivrY*). En *Pseudomonas syringae* este operón también actúa como un supresor de una mutación en *gacS* (*barA*) [164].

Gen	Microarreglo			
	MGI	MGII	MGIII	MGIV
<i>infC</i>	-1.6			-1.4
<i>rpmI</i>			-1.6	-1.7
<i>thrS</i>	-1.5			-1.3

- Genes relacionados con la biosíntesis de nucleótidos: *dcd*, *trxA*, *ndk*, *purL* y *carB*. El gen *purA* en realidad pertenece al grupo C pero al ser parte del grupo funcional se incluyó aquí.

Gen	Microarreglo			
	MGI	MGII	MGIII	MGIV
<i>dcd</i>	-1.4		-1.4	
<i>trxA</i>	-1.5	-1.5	-1.7	-2.0
<i>ndk</i>	-1.6		-1.6	-1.4
<i>purA</i>	1.4		-1.5	-2.6
<i>purL</i>	-1.6		-1.8	
<i>carB</i>	-4.4	-1.5		

- Genes relacionados con la respiración: *cydB* que codifica la subunidad II de la citocromo oxidasa; *cyoA* codifica una subunidad de la citocromo oxidasa O, *fdoGH*

subunidades de la formato deshidrogenasa; *dmsB* codifica una subunidad de la DMSO reductasa y *torA* una subunidad de la TMAO reductasa.

Gen	Microarreglo			
	MG I	MG II	MG III	MG IV
<i>cydB</i>			-1.4	-4.8
<i>cyoA</i>	-2.6		-2.3	-1.8
<i>fdoG</i>	-1.4			-1.8
<i>fdoH</i>	-2.2			-1.6
<i>dmsB</i>	-2.2		-1.6	-1.9

- Tres genes llaman la atención por tener una regulación a lo largo de todos los microarreglos: *gshA* (gama-glutamato-cisteína ligasa), *ilvE* (aminotransferasa de aminoácidos) y *ompF* (proteína de membrana externa).

Gen	Microarreglo			
	MG I	MG II	MG III	MG IV
<i>gshA</i>	-2	-1.6	-1.7	-1.4
<i>ilvE</i>	-1.5	-1.6	-1.8	-1.6
<i>ompF</i>	-1.4	-2.1	-2.6	-2.1

Dentro del grupo B (regulados positivamente por UvrY) están:

- Genes relacionados con la respuesta a condiciones ácidas dependientes de glutamato, se discutirán más adelante.
- Genes relacionados con la respiración: *hyaAB* (subunidades de la hidrogenasa-1) y *torA* (subunidad de la TMAO reductasa).

Gen	Microarreglo			
	MG I	MG II	MG III	MG IV
<i>hyaA</i>		1.6	2.2	2.1
<i>hyaB</i>			1.4	1.6
<i>torA</i>	1.8	1.4	1.8	

- Los genes *tdh* (treonina deshidrogenasa), *feaB* (fenilacetaldehido deshidrogenasa) y *exuT* (transportador de hexuronatos) llaman la atención porque su perfil de expresión está conservado en todos los microarreglos.

Gen	Microarreglo			
	MG I	MG II	MG III	MG IV
<i>tdh</i>	1.6	1.4	1.7	2.0
<i>feaB</i>	2.6	1.7	1.4	2.1
<i>exuT</i>	1.5	2.2	1.5	1.6

Dentro del grupo C (Cambios en las tendencias de expresión) están:

- Genes relacionados con el transporte de maltosa: *malE* (proteína periplásmica de unión a maltosa) y *malM* (proteína periplásmica del regulón de mal).

Gen	Microarreglo			
	MGI	MGII	MGIII	MGIV
<i>malE</i>	2.2	-1.5		
<i>malM</i>	2.8	-1.5		-1.7

- Genes relacionados con respiración, *cydA* que codifica la subunidad I de la citocromo oxidasa y *glpC* una subunidad de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa anaeróbica.

Gen	Microarreglo			
	MGI	MGII	MGIII	MGIV
<i>cydA</i>	1.4			-2.5
<i>glpC</i>	-2	-1.4	-2.2	1.6

- Los genes *nagE* (enzima IIABC para N-acetilglucosamina del sistema PTS) y *gcvH* (complejo del corte de glicina) presentan regulación en todos los microarreglos.

Gen	Microarreglo			
	MGI	MGII	MGIII	MGIV
<i>nagE</i>	-1.5	-1.5	-1.5	1.4
<i>gcvH</i>	1.9	-2.4	-1.8	-7.2

#### Regulón de resistencia a condiciones ácidas (Sistema AR2)

Las cepas comensales y patógenas de *E. coli* tienen tres sistemas de resistencia a condiciones ácidas (AR), el primero involucra a un sistema reprimido por glucosa cuyos componentes y mecanismo de acción no son conocidos, parece ser controlado por *rpoS* y por CRP, el receptor de AMPc [165], el segundo y el tercer sistema dependen del transporte y la descarboxilación de glutamato y arginina respectivamente, se cree que ambas descarboxilaciones consumen los protones que entran a la célula y el producto resultante es transportado en intercambio por el aminoácido respectivo del medio [166]. El sistema más efectivo es el dependiente de glutamato (AR2), los genes *gadA* y *gadB* codifican dos isoformas de la glutamato descarboxilasa que convierten al glutamato en  $\gamma$ -aminobutirato, *gadB* es transcrito junto con el gen *gadC* (*xasA*) que codifica el antiportador de glutamato:ácido  $\gamma$ -aminobutírico. Los genes *gad* (*gadA/BC*) se inducen en respuesta a señales ácidas, osmóticas y de fase estacionaria [167, 168], su regulación es muy compleja y no está del todo entendida ya que involucra a varios factores

(Tabla 4). Se hará énfasis en H-NS, CRP, RpoS, GadX (YhiX), GadW (YhiW), GadE (YhiE) y GadY por los datos obtenidos en los microarreglos.

El factor RpoS activa a los genes *gad* dentro de la fase estacionaria en medio rico; sin embargo en medio mínimo y glucosa su expresión es independiente de  $\sigma^S$ , aunque sigue induciéndose en esta fase, también se pueden activar en la fase exponencial a pH ácido. GadX es un activador de los genes *gad*, GadW reprime a GadX pero también puede activar directamente a estos genes dentro de la fase estacionaria de crecimiento en medio rico a pH 8 [168-172]. La proteína GadE (YhiE) es absolutamente requerida para la expresión de los genes *gad* independientemente de las condiciones de crecimiento o del medio utilizado [173]. GadY funciona como un regulador positivo a nivel postranscripcional del mensajero de *gadX*, el modelo sugiere que GadY se une al extremo 3' no traducido del mensajero e incrementa su estabilidad, coinmunoprecipita con Hfq, una proteína que se requiere para la función de los pequeños ARN's que se aparean con mensajeros blanco; sin embargo la participación de esta proteína en el mecanismo de acción de GadY no es clara [174].

H-NS, la proteína tipo histona, y CRP, el receptor de AMP cíclico, reprimen al sistema *gad*, la importancia de H-NS parece ser dependiente de la cepa utilizada [168, 169] y la participación de CRP es reprimiendo de la producción de RpoS [175].

Tabla 4. Genes involucrados en la regulación de la resistencia a condiciones ácidas dependiente de glutamato. Modificado de [171].

Proteína	Descripción	Función
RpoD	$\sigma^{70}$	Transcripción de <i>gadA/BC</i>
RpoS	$\sigma^{38}$	Transcripción de <i>gadX</i>
EvgAS	SDC	Activa la transcripción de <i>ydeO</i> y <i>gadE</i>
YdeO	Regulador tipo AraC	Activa la transcripción <i>gadE</i>
GadE	Activador relacionado a LuxR	Requerida para la resistencia a estrés ácido, se une a la caja <i>gad</i> y activa la transcripción de <i>gadA/BC</i> y reprime a <i>ydeO</i>
GadX	Regulador tipo AraC	Activa a <i>gadE</i> , coactiva a <i>gadA/BC</i> , reprime a <i>gadW</i>
GadW	Regulador tipo AraC	Inhibe la producción de RpoS, activa a <i>gadE</i> y coactiva a <i>gadA/BC</i> a pH 8
GadY	ARN pequeño	Regula positivamente al mensajero de GadX
CRP	Proteína receptora de AMPc	Inhibe la producción de RpoS
TrmE	GTPasa tipo Era	Activa la producción del mensajero de <i>gadE</i> , estimula la traducción del mensajero de <i>gadA</i> y <i>gadB</i>
HNS	Proteína tipo histona	Regulador negativo
TorR	Regulador de respuesta de la TMAO reductasa	Regulador negativo de <i>gadE</i>

Cuando el pH externo baja a 2.5, el pH interno también disminuye de 7.5 a 4.5, en este punto el exceso de protones que entra es consumido por las reacciones de descarboxilación (sistemas AR2 y AR3). Para que los sistemas antiportadores funcionen debe mantenerse una poza de productos descarboxilados en el interior; sin embargo, estos productos tienen una carga neta del doble del aminoácido original, lo que contribuye a incrementar las cargas positivas dentro de la célula. Por ello se requiere de un sistema que equilibre el exceso de estas cargas y prevenga la hiperpolarización de la membrana. De acuerdo al modelo de resistencia ácida con potencial eléctrico interno positivo, los canales antiportadores de cloro  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  jugarían este papel al balancear el exceso de cargas positivas intracelulares por la remoción de protones del interior y la intrusión de cargas negativas al interior de la célula [171, 176, 177].

La regulación positiva de los genes involucrados con la respuesta a estrés ácido dependiente de glutamato es constante en todos estos microarreglos MG (Tabla 5), *gadE* y *gadW* presentan regulación positiva desde MGI, el primero mantiene esta tendencia hasta el último

microarreglo, MGIV, el segundo la mantiene hasta el MGIII. El gen *gadX* presentó cambio en MGII y MGIII; *gadB* está regulado positivamente en en MGII, MGIII y MGIV.

En *E. coli* se han descrito dos genes que codifican homólogos de los canales de cloro CIC, los genes *mriT* (*b1592*) y *eriC* (*yadQ*, *clcA*), en los microarreglos únicamente este último está regulado positivamente por UvrY en las condiciones MGI, MGIII y MGIV respectivamente.

El gen *rpoS* está regulado negativamente -1.7 veces en MGIV. Los genes *hns* (codifica para el regulador negativo de los genes *gad*) y *crp* (codifica para CRP que inhibe la producción de *rpoS*) están regulados negativamente por UvrY -2 y -1.6 veces respectivamente en MGIV.

El *gada* (*b3517*) y el ARNp GadY no están representados en los microarreglos por lo que no podemos monitorear el perfil de su expresión por esta técnica.

Tabla 5. Expresión de los genes de resistencia a condiciones ácidas dependiente de glutamato en los microarreglos MGI, MGII, MGIII y MGIV. El número denota las veces de cambio en la cepa de tipo silvestre.

Gen	Microarreglo			
	MGI	MGII	MGIII	MGIV
<i>gadB</i>		2.8	2.0	1.6
<i>xasA</i> ( <i>gadC</i> )		2.3	2.9	1.9
<i>yhiE</i> ( <i>gadE</i> )	1.8	3.1	2.2	1.9
<i>yhiW</i> ( <i>gadW</i> )	2.3	2.0	1.9	
<i>yhiX</i> ( <i>gadX</i> )		1.7	2.0	
<i>yadQ</i> ( <i>clcA</i> )	1.6		1.4	1.5
<i>rpoS</i>				-1.7
<i>hns</i>				-2.0
<i>crp</i>				-1.6

No sabemos cual es el mecanismo por el que UvrY está regulando a los genes de resistencia a condiciones ácidas dependientes de glutamato (AR2). También sería interesante probar si GadY es regulado por UvrY, ya que su expresión en medio LB [174] es similar al patrón de activación del reportero *crsB-lacZ*.

La resistencia a estrés ácido es fundamental para la sobrevivencia de *E. coli*, las cepas patógenas cruzan y colonizan el tracto digestivo de los mamíferos donde el pH varía normalmente entre 2 y 3 [172], sería interesante probar si las mutantes *uvrY* de cepas patógenas de *E. coli* están comprometidas en su capacidad invasiva.

El metabolismo fermentativo de *E. coli* genera una disminución en el pH del medio. El crecimiento disminuido de la mutante *uvrY* (UY KSB837) con respecto al tipo silvestre (KSB837) en condiciones anaeróbicas (fig. 13) podría deberse también a una sensibilidad de la



mutante a condiciones ácidas, ya que de acuerdo a los resultados de los transcriptomas, UvrY regula positivamente a los genes de respuesta a condiciones ácidas dependientes de glutamato.

Algunos genes fueron excluidos de la lista de 297 genes por los criterios establecidos, pero se han reportado como parte del regulón BarA/UvrY.

El gen *rpoS*, está regulado negativamente -1.7 veces por UvrY en MGIV. Los genes de las catalasas *katG* y *katE* de *E. coli* y son parte del regulón de RpoS también están regulados negativamente -1.5 y -1.4 por UvrY en la misma condición. El gen *osmY*, regulado también por RpoS y BarA [77] no presentó ningún cambio.

Existen varias razones que pueden explicar la falta de regulación de *rpoS* en todas las condiciones: la primera es la misma complejidad de su regulación, ya que involucra varios procesos que pueden cambiar a lo largo de la curva de crecimiento y actúan a niveles fuera de la transcripción [75, 76]. Tampoco podemos excluir un problema de degradación del mensajero o de las limitantes de la técnica de microarreglos en cuanto a la abundancia de éste, el marcaje y la hibridación.

La regulación de la movilidad por el sistema BarA/UvrY involucra al sistema Csr. CsrA estabiliza al transcrito de *flhDC*, el regulador maestro de los genes de flagelo y quimiotaxis; CsrB activado transcripcionalmente por UvrY es un antagonista de la actividad de CsrA. En los microarreglos no hubo cambios transcripcionales en *flhDC* en ninguna de las condiciones.

Los genes clave para la formación de sideróforos (enterobactina) *entC* y *entF* no presentaron cambios en su expresión; estos datos concuerdan con lo descrito anteriormente [65].

#### Microarreglo de BarA y UvrY

En la literatura existen dos reportes de microarreglos de las mutantes del sistema BarA/UvrY; el primer trabajo hecho por Oshima, *et al* [78] fue en cultivos de *E. coli* en fase logarítmica (DO<sub>600</sub> ~0.4), se comparó el perfil de expresión de las mutantes sencillas (supresión de *barA* y de *uvrY*) contra cepas isogénicas de tipo silvestre. De acuerdo al monitoreo de la expresión de *csrB-lacZ*, este punto representa una fase en la que todavía no se activa el sistema. Se identificaron diferentes patrones de expresión para las mutantes  $\Delta uvrY$  y  $\Delta barA$ , el total de genes regulados fue de 123 y 26 respectivamente. Se propuso a UvrY como un regulador de la respiración, del transporte de maltosa y de *rpoS*, no se identificó una nueva función para BarA fuera del papel en la sensibilidad a peróxido de hidrógeno.

Es difícil la comparación entre los datos del análisis de Oshima y los microarreglos de este trabajo ya que el ARN de los experimentos se extrajo en diferentes puntos de la curva de crecimiento, no obstante existen algunas similitudes.

De acuerdo al trabajo de Oshima, los genes del transporte de maltosa están regulados positivamente por UvrY. En la lista de 297 genes obtenida en este trabajo, se observa una regulación positiva de *malE* y *malM* por UvrY en MGI, y una regulación negativa de ambos en MGII y en el caso de *malM*, también hay regulación negativa en MGIV.

Oshima propone que UvrY regula positivamente a los genes *narGHJ* y *narZY* que codifican subunidades de la nitrato reductasa A y Z respectivamente. Sólo *narG* es regulado positivamente por UvrY en los microarreglos MGI y MGII.

También proponen un papel de UvrY en la respiración, ya que los genes que codifican la citocromo oxidasa O *cyoABCDE* están regulados negativamente por este regulador de respuesta. En los microarreglos de esta tesis únicamente *cyoA* es regulado negativamente en MGI, MGIII y MGIV. Sin embargo, hay otros genes relacionados con la respiración que están regulados, de condiciones aeróbicas *hyaAB* (subunidades de la hidrogenasa) son regulados positivamente por UvrY. De condiciones anaeróbicas *fdoGH* (subunidades de la formato deshidrogenasa) y *dmsB* (subunidad de la DMSO reductasa), están regulados negativamente por UvrY; *torA* (subunidad de la TMAO reductasa) está regulado positivamente y *glpC* (subunidad de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa anaeróbica) tiende a cambiar el patrón de expresión, está regulado negativamente hasta la última condición donde la expresión se vuelve positiva.

El análisis de microarreglos hecho por Oshima reveló que en la mutante  $\Delta$ *uvrY* se sobreexpresa  $\sigma^S$  y su regulón, pero no se detecta ningún cambio en la mutante  $\Delta$ *barA* a pesar de que se ha demostrado que la expresión de la fusión *rpoS-lacZ* disminuye en este fondo genético [77]. Los datos de los microarreglos realizados en este trabajo sugieren que UvrY participa en la regulación negativa de *rpoS* en fase estacionaria tardía (MGIV); sin embargo no se puede descartar que esté participando directa o indirectamente a otro nivel en fases más tempranas. Dos genes regulados por RpoS: *katG* y *katE* que codifican la catalasa principal y menor de *E. coli*, también están regulados negativamente por UvrY en MGIV.

Los genes *gadB*, *gadA* y *gadC* (*xasA*) también son regulados positivamente por UvrY de acuerdo a los datos de Oshima; sin embargo los reguladores *gadE*, *gadW* y *gadX* no están reportados como parte del regulón de UvrY.

## Microarreglo de BarA

El segundo trabajo, realizado por Sahu, *et al* [68], comparó el perfil de expresión de la mutante *barA* con el de la cepa isogénica de tipo silvestre (MG1655) en la fase logarítmica tardía  $DO_{600} \sim 1$ . Los autores sugieren que BarA es un regulador global de la división celular, el metabolismo de carbono, de hierro, flagelo y de la formación del pili. De la lista parcial representativa que publican hay cinco genes que concuerdan con la lista obtenida en este trabajo (Anexo 1): *hupB*, *crl*, *gmhA*, *rpoS* y *fisA*. No podemos comparar los perfiles de expresión porque la lista es sólo cualitativa y se dificulta porque los microarreglos no se realizaron justo en la misma fase; aún así son fuertes candidatos a ser parte del regulón BarA/UvrY.

La comparación de los resultados obtenidos por los microarreglos de Oshima, Sahu y esta tesis plantea puntos interesantes. Los modulones para BarA y para UvrY difieren en cuanto al número de genes descritos, quizá por el hecho de que en las mutantes *barA*, la proteína UvrY puede activarse por otras moléculas donadoras de fosfato como el acetil fosfato o el carbamil fosfato. Por ello, la eliminación de *uvrY* en los microarreglos evita este problema y se puede obtener con mayor exactitud su modulón. La estrategia utilizada en nuestros microarreglos hace posible obtener el mayor número de genes regulados durante el periodo en el que está activo el sistema BarA/UvrY de acuerdo al monitoreo del reportero *csrB-lacZ*; por consiguiente, podemos obtener más candidatos del modulón de UvrY. Esta estrategia también nos permitirá ver posteriormente la dinámica del modulón de UvrY a lo largo del crecimiento de *E coli*.

### 3.2.4 Fenotipos descritos para la mutante $\Delta uvrY$ por Microarreglo de Fenotipos

La técnica de microarreglos de fenotipos (MF) es una nueva tecnología que permite asignar funciones a los genes probando simultáneamente el crecimiento de mutantes en un gran número de condiciones ( $\sim 2,000$ ). Esta técnica consiste en crecer las cepas (p ej. mutante vs tipo silvestre) en microplacas de 96 pozos que contienen diversos nutrientes e inhibidores, el crecimiento se mide a través de la respiración con un indicador redox que al reducirse forma una sal insoluble, ésta puede ser cuantificada por un equipo, el crecimiento de ambas cepas se compara de forma similar a los microarreglos [178]. Los MF también tiene limitaciones ya que hay fenotipos que no pueden ser revelados como cambios en la estructura de membrana, movilidad, formación de biopelículas y aquellos relacionados a anaerobiosis, o fenotipos que requieran de una condición específica p ej. la interacción con algún hospedero [179].

Un análisis de mutantes individuales en 37 sistemas de dos componentes de *E. coli* K-12 por MF [180] reveló nuevos fenotipos para las mutantes  $\Delta uvrY$  y  $\Delta barA$  al compararlas con las cepas isogénicas de tipo silvestre (Tabla 6). Con base en estos nuevos fenotipos descritos, buscamos genes regulados en los microarreglos que pudieran explicarlos.

Ambas mutantes ( $\Delta uvrY$  y  $\Delta barA$ ) presentaron mayor utilización de D –melibiosa como fuente de carbono,  $\Delta barA$  adicionalmente presentó mayor utilización de ácido melibiónico. Las mutaciones en cinasas sensoras no dan fenotipos tan severos como las mutaciones de los reguladores de respuesta, por ello no es una sorpresa que la mutante  $\Delta uvrY$  presentara mayor número de fenotipos: mayor resistencia a hidroxilamina y mayor sensibilidad a nitrofurazona, polimixina B, dihidroestreptomicina, cloruro de metil-tri-octilamonio y violeta de yodonitrotetrazolio.

Tabla 6. Fenotipos descritos para las mutantes  $\Delta barA$  y  $\Delta uvrY$  por los microarreglos de fenotipos.

<i>ΔbarA</i>			
Prueba	Modo de acción del compuesto prueba	Fenotipo	Genes posiblemente involucrados que está regulados en los microarreglos
D -Melibiosa	Fuente de carbono	Mejor crecimiento	<i>melA, melR</i>
Ácido melibiónico	Fuente de carbono	Mejor crecimiento	n.d
<i>ΔuvrY</i>			
Prueba	Modo de acción del compuesto prueba	Fenotipo	Genes posiblemente involucrados que están regulados en los microarreglos
D –Melibiosa	Fuente de carbono	Mejor crecimiento	<i>melA, melR</i>
Hidroxilamina	Daño a ADN, antifolato	Mayor resistencia	<i>gcvH, gcvT y folD</i>
Nitrofurazona	Síntesis de ADN	Mayor sensibilidad	<i>mdaA y rfnB</i>
Polimixina B	Agente membranal externo	Mayor sensibilidad	<i>ugd, pmrF, pmrH, acrD</i>
Dihidroestreptomicina	Aminoglicósido	Mayor sensibilidad	<i>oppA, acrD</i>
Cloruro de metil-tri-octilamonio	Detergente catiónico membranal	Mayor sensibilidad	n.d
Violeta de Yodonitrotetrazolio	Respiración	Mayor sensibilidad	n.d

n.d= no determinado

### 3.2.4.1 En $\Delta uvrY$ aumenta el uso de D-Melibiosa

Los operones encargados del transporte y la degradación de la D-melibiosa son *melAB*, que codifican para la  $\alpha$ -glicosidasa y la permeasa respectivamente y *melR* que es el regulador positivo de *melAB* y negativo de si mismo [181, 182].

En el microarreglo *melA* está regulado positivamente 1.5 veces por UvrY en MGIV, *melB* y *melR* están regulados negativamente en MGIV -3.6 y -1.9 veces respectivamente.

Gen	Microarreglo			
	MGI	MGII	MGIII	MGIV
<i>melA</i>				1.5
<i>melB</i>				-3.6
<i>melR</i>				-1.9

La discrepancia entre la expresión de *melA* y *melB* no está clara, pero los datos de los transcriptomas y de los microarreglos de fenotipos sugieren que UvrY participa en la regulación del operón de melibiosa.

### 3.2.4.2 $\Delta uvrY$ es más resistente a hidroxilamina

Entre los efectos biológicos de la hidroxilamina están el daño a ADN por deaminación y la inhibición de la biosíntesis de proteínas [183]. En *E. coli* reacciona con el 5,10-metilentetrahidrofolato y depleta a las células de la poza intracelular de unidades monocarbonadas de folato, esto lleva a la disminución del 10-formil-tetrahidrofolato y por ello se ha propuesto que previene la síntesis de formil-metionina-tARN, lo cual explicaría el efecto inhibitorio en la síntesis de proteínas [184]

Las enzimas codificadas por *gcvH*, *gcvT* y *folD*, relacionadas con la biosíntesis de formil-tetrahidrofolato, tiende a estar reguladas negativamente por UvrY. Los datos de los transcriptomas sugieren que el aumento en la transcripción de los genes en la mutante *uvrY* podría a su vez aumentar los niveles de las enzimas y finalmente incrementar los niveles de formil-tetrahidrofolato. Aumentar la poza de este compuesto podría explicar el aumento en la resistencia a hidroxilamina de la mutante *uvrY*.

Gen	Microarreglo			
	MGI	MGII	MGIII	MGIV
<i>gcvH</i>	1.9	-2.4	-1.8	-7.2
<i>gcvT</i>	1.8	-1.5		-2.0
<i>folD</i>	-1.5	-1.4	-1.7	-1.9

Con los datos de los transcriptomas no es claro si UvrY participa en la reparación de ADN por deaminación.

### 3.2.4.3 *ΔuvrY* es más sensible a nitrofurazona

Los compuestos nitrosubstituidos se han utilizado como agentes antimicrobianos, su toxicidad se deriva de los intermediarios formados por la reducción del grupo nitro por las nitroreductasas, los productos finales de la reacción son biológicamente inactivos. En *E. coli* se han identificado dos nitroreductasas insensibles a oxígeno, NfsA y NfsB, cuyas actividades enzimáticas son suficientes para obtener la máxima actividad de nitroreductasa [185]. NfsA (codificada por el gen *mdaA*) es una proteína dimérica que contiene FMN, el monómero es de 26.8 kDa y usa NADPH como fuente de equivalentes reductores [186, 187]; NfsB (codificada por *nfnB*) es también una proteína dimérica que contiene FMN, el monómero tiene un peso molecular de 24kDa y puede usar como cofactor tanto al NADPH como al NADH [188, 189]. Las mutaciones en estos genes incrementan la resistencia a nitrofurazona y a otros nitrfuranos [185].

Gen	Microarreglo			
	MGI	MGII	MGIII	MGIV
<i>mdaA</i>	-1.5			
<i>nfnB</i>		-1.3	-1.6	

UvrY regula negativamente -1.5 veces a *mdaA* en MGI y a *nfnB* -1.3 y -1.6 veces en MGII y MGIII respectivamente, lo cual podría relacionarse con la sensibilidad a nitrofurazonas de la mutante *uvrY*.

### 3.2.4.4 *ΔuvrY* es más sensible a polimixina B (PMB)

La polimixina B (PMB) es una mezcla de derivados de decapeptidos cíclicos y catiónicos producidos por *Bacillus polymyxa*, es un bactericida de Gram negativas que se ha considerado como uno de los compuestos más eficientes para permeabilizar las células [190]. Aunque el

mecanismo de acción no está completamente determinado, se sabe que el blanco de la PMB es el lípido A, un fosfoglicolípido compuesto de disacáridos de D-glucosamina con enlaces  $\beta$ -1'-6, substituidos en las posiciones 1 y 4 por grupos fosfato y por ácidos grasos saturados (con hidroxilos en la posición 3) de 12 a 16 carbonos, se encuentra glicosilado en la posición 6' con dos grupos KDO (ácido 3-deoxy-D-manno-octulosónico). El lípido A es uno de los tres componentes de los lipopolisacáridos (LPS), funciona como un ancla hidrofóbica para los otros dos componentes: el centro de oligosacáridos no repetidos y el antígeno O, polisacáridos de diversas repeticiones (Para revisión ver[191]).

En *S. typhimurium* y *E. coli* se ha descrito que la transferencia de grupos palmitato al lípido A y la adición de fosfoetanolamina (pEtN) y/o 4-amino-4-deoxi-L-arabinosa (L-Ara4N) a los grupos fosfato del mismo, confieren resistencia a polimixina B y a varios péptidos antimicrobianos catiónicos [192-198]. La resistencia se debe a que se evita la penetración de los compuestos por la disminución de la carga negativa del lípido A [197, 198]. En *S. typhimurium* la modificación del lípido A con aminoarabinosa y fosfoetanolamina es controlada principalmente por el sistema de dos componentes PmrB/PmrA [197] que responde a  $Fe^{3+}$  [29] y pH medianamente ácido [199]; además *pmrA* es activado a nivel postranscripcional por la proteína PmrD, que a su vez es activada por bajos niveles de  $Mg^{2+}$  a través del SDC PhoP/PhoQ [200]. La eliminación de *pmrA* y *pmrB* incrementa la sensibilidad a PMB, las mutantes  $\Delta pmrD$  son sensibles a este compuesto cuando crecen en condiciones de poco  $Mg^{2+}$ , pero son resistentes cuando crecen en altas concentraciones de hierro [200, 201]. El gen *pagP*, responsable de la adición de grupos palmitato al lípido A, es controlado por PhoP/PhoQ, su eliminación causa sensibilidad a algunos péptidos catiónicos antimicrobianos [194, 202]. La proteína PmrA activa al gen *ugd*(*pmrE*) y al operón *pgbP* (llamado también loci *pmrHFIJKLM*) responsables de la modificación por aminoarabinosa [192, 203, 204] y a *pmrC* (*pagB*) responsable de la modificación por fosfoetanolamina [205]. En *S. typhimurium* y *E. coli*, algunos genes de loci *pmrHFIJKLM* se han renombrado *arn*: *arnB* (*pmrH*), *arnC* (*pmrF*), *arnA* (*pmrI*) y *arnT* (*pmrK*), los demás: *pmrJ*, *pmrL*, *pmrG* y *pmrM* no tienen una función específica asignada. La eliminación de *pmrA*, *ugd* (*pmrE*), *pmrHijkl* y *pmrC* (*pagB*) está asociado con la pérdida de la resistencia a polimixina B [192, 205].

## Vía de síntesis de L-Ara-4N

Ugd es una deshidrogenasa que cataliza la conversión de UDP glucosa a ácido UDP-glucurónico. La siguiente enzima de la vía es ArnA, la cual cataliza la oxidación del azúcar en la posición 4 y posteriormente su descarboxilación en la posición 6, generando UDP-4-cetopiranos. La enzima ArnB cataliza la transaminación de ésta última usando ácido glutámico como donador de la amina para formar UDP-L-Ara4N. ArnA participa de nuevo transfiriendo en grupo formil del 10-formiltetrahidrofolato a la amina 4 del UDP-L-Ara4N; ArnC transfiere esta última molécula al undecaprenil-fosfato de la membrana interna, se especula que después de ser transportado de ésta, el grupo formil es removido para dejar el undecaprenil-fosfato-L-4AraN, el cual sirve como sustrato de ArnT para la transferencia del grupo L-Ara-4N al lípido A de la membrana externa (Revisado en [191]).

En *E. coli* K-12 se ha visto que las modificaciones descritas anteriormente sólo se producen cuando las células son tratadas con metavanadato de amonio ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ), un inhibidor no específico de fosfatasa [206], o en mutantes *pmrA* constitutivas [198, 207]. Recientemente se demostró que a diferencia de *Salmonella*, la proteína PmrD de *E. coli* K-12 no conecta los sistemas PmrA/PmrB y PhoP/PhoQ por lo que no se producen modificaciones del lípido A en respuesta a bajos niveles de  $\text{Mg}^{2+}$  [208].

En los microarreglos realizados en este trabajo no encontramos cambio en los transcritos de los genes que participan en la adición de fosfoetanolamina y grupos palmitato. BasS/BasR, los homólogos de PmrB/PmrA en *E. coli*, no presentaron cambios a nivel transcripcional en los microarreglos. No obstante, tres genes relacionados con la vía de biosíntesis de L-Ara-4N son regulados positivamente por UvrY: *ugd* y *arnT* (*pmrK*, *b2257*) en MGI; *arnC* (*pmrF*, *b2254*), en MGIV y *arnB* (*pmrH*, *b2253*) en MGIV. La disminución en la expresión de estos genes en la mutante *uvrY* podría llevar a una reducción del lípido A modificado con L-4AraN y por lo tanto causar sensibilidad a PMB.

El gen *acrD* codifica a un transportador que funciona como bomba de salida para aminoglicósidos, su eliminación causa una ligera sensibilidad a polimixina B [209]. En MGIV *acrD* está regulado positivamente 1.8 veces por UvrY, lo cual podría explicar también el aumento de la sensibilidad a PMB de la mutante *uvrY*.



Gen	Microarreglo			
	MG I	MG II	MG III	MG IV
<i>ugd</i>	1.4			
<i>arnT (b2257)</i>	1.4			
<i>arnC (b2254)</i>				1.7
<i>arnB (b2253)</i>				1.7
<i>acrD</i>				1.8

### 3.2.4.5 *ΔuvrY* es más sensible a dihidroestreptomicina (DHS)

La DHS es un antibiótico de la familia de los aminoglicósidos, se une a la subunidad 30S de los ribosomas e inhibe el crecimiento y la síntesis de proteínas [210]. Se han propuesto tres pasos en la captura de los aminoglicósidos, el primero involucra una unión lenta a la membrana por cargas electrostáticas, el segundo una acumulación lenta probablemente mediada por un transporte activo y el tercero una acumulación rápida que se cree es debida a la permeabilización de la membrana citoplásmica por la inserción de proteínas mal traducidas (Revisado en [211]). Se ha propuesto que el sitio de unión en la primera fase son los lipopolisacáridos y las cabezas polares de los fosfolípidos, para la segunda fase se requiere un potencial de membrana [212] y al sistema transportador de oligopéptidos ya que el aumento en la expresión de OppA (proteína periplásmica que se une a oligopéptidos) incrementa la sensibilidad a aminoglicósidos [213]. Para la última fase se requiere energía del transporte de electrones y posiblemente de la hidrólisis de ATP, además de la síntesis de proteínas [211].

En nuestros transcriptomas observamos que UvrY regula negativamente a *oppA* -3.1 veces en MGIV, lo que podría relacionarse con el aumento en la sensibilidad a dihidroestreptomicina de la mutante. Las poliaminas (putrescina) estimulan la expresión de *oppA* a nivel post-transcripcional [213], un dato curioso es que en los microarreglos las enzimas codificadas por los genes *feaB*, *gabT*, *gabD* y *aldA* que participan en la vía de degradación de putrescina, arginina y 4-aminobutirato están reguladas positivamente por UvrY, excepto *aldA* que está regulado negativamente. Si la disminución de estos transcritos influencia los niveles de las enzimas y esto a su vez tiene un efecto en la vía metabólica, es posible que la regulación de *oppA* por UvrY sea un efecto secundario por la alteración del metabolismo de poliaminas.

Además de la ligera sensibilidad a polimixina B, la mutante *acrD* de *E. coli* presenta hipersensibilidad a varios aminoglicósidos (amicacina, gentamicina, neomicina, kanamicina y

tobramicina) y acumulación de dihidroestreptomicina y gentamicina [209], como se mencionó anteriormente *acrD* está regulado positivamente por UvrY 1,8 veces en MGIV.

Gen	Microarreglo			
	MGI	MGII	MGIII	MGIV
<i>oppA</i>				-3.1
<i>acrD</i>				1.8
<i>feaB</i>	2.6	1.7	1.4	2.1
<i>gabT</i>			1.6	1.6
<i>gabD</i>	1.5		1.7	
<i>aldA</i>			-2	-2.1

No se ha podido explicar el aumento de la sensibilidad de  $\Delta uvrY$  al cloruro de metil-tri-octilamonio y al violeta de yodotetrazolio porque no se posee información precisa sobre los mecanismos de acción de estos compuestos.

Los diversos fenotipos descritos para la mutante  $\Delta uvrY$  por la técnica de MF y la regulación de genes que pueden explicarlos en los microarreglos MGI-MGIV (Tabla 6), proponen a estos últimos como fuertes candidatos a ser parte del modulón de UvrY.

#### 4. COMENTARIOS FINALES

El monitoreo del reportero *csrB-lacZ* en cromosoma sugiere que el sistema BarA/UvrY se activa gradualmente cuando el cultivo alcanza la fase exponencial tardía (DO<sub>600</sub> de 0.76 y 1.3) la actividad alcanza un máximo en la fase estacionaria y permanece hasta por lo menos 24 horas.

La adición de peróxido de hidrógeno y casaminoácidos a cultivos de baja densidad óptica no incrementan la expresión del reportero

Durante el crecimiento en medio LB y anaerobiosis, la expresión de *csrB-lacZ* está disminuida; sin embargo, resultados recientes obtenidos en el laboratorio por Verónica Mondragón sugieren que la ausencia de oxígeno en el medio no participa en la señalización por BarA.

La densidad óptica *per se* no parece ser un factor decisivo en la activación del sistema, ya que la composición del medio y la velocidad de crecimiento también influyen.

La adición de sobrenadantes a DO<sub>600</sub> de 0.1 incrementa la actividad del reportero, no sabemos si este efecto es mediado por la presencia o ausencia de algún metabolito en el medio o por la velocidad de crecimiento.

Los resultados previos sugieren que el autoinductor 2 relacionado con mecanismos de “Quórum Sensing” en *E. coli* tampoco está involucrado en la activación de *csrB-lacZ*.

Todavía no está claro el regulón del sistema de dos componentes BarA/UvrY, los datos preliminares de los microarreglos sugieren que UvrY participa en la regulación del metabolismo de energía, de estructuras celulares, la biosíntesis de purinas, ARN y ADN, en la respiración y en la respuesta a condiciones ácidas dependientes de glutamato.

## 5. PERSPECTIVAS

### Ensayos de EMSA

- Estandarizar el ensayo de EMSA para UvrY y UvrY-P sobre el promotor *csrB*, establecer las condiciones a usar en el ensayo de “Footprinting”. Una vez que se determine el sitio de unión de UvrY-P, se buscará esta secuencia en las regiones río arriba de los genes posiblemente regulados en los microrreglos para identificar aquellos que estén directamente regulados por la proteína UvrY.
- Otra técnica que se puede utilizar para buscar sitios de unión de un factor transcripcional *in vivo* es una variante de la “Inmunoprecipitación de Cromatina” utilizada en organismos eucariontes. Consiste en tratar el cultivo *in vivo* con un agente entrecruzante como el formaldehído e inmunoprecipitar con un anticuerpo específico para la proteína de interés, que en este caso sería UvrY. Se revierte el entrecruzamiento y se subclonan los fragmentos de ADN obtenidos, otra opción es usarlos para hibridar un microarreglo. De esta manera se pueden identificar los sitios de unión directa del factor transcripcional de interés. [214, 215].

### Busqueda de la señal:

- Hacer fraccionamientos y tratamientos de los sobrenadantes de fase estacionaria. Realizar la inducción a densidades ópticas bajas con estos sobrenadantes para tratar de identificar la señal.
- Explorar otras condiciones como el crecimiento en diversas fuentes de carbono (p.ej hexuronatos y maltosa), más sustratos gluconeogénicos (p.ej triptona) y diversos pH's.
- Probar si la señal es endógena utilizando lisados de células en diferentes puntos de la curva de crecimiento para inducir o reprimir la expresión del reportero *csrB-lacZ*.
- Explorar si las poliaminas (p.ej putrescina, espermidina, espermina y cadaverina) son una señal que active al sistema BarA/UvrY.
- Probar si el Autoinductor 3 o las catecolaminas de mamíferos, epinefrina y noepinefrina tienen un papel en la activación del reportero *csrB-lacZ*.
- Adicionar sobrenadantes de cultivos crecidos anaeróbicamente a cultivos de densidad baja de KSB837 crecido aeróbicamente.

## Perspectivas de los microarreglos

- Validación de los resultados de microarreglo. Para ello se planean hacer ensayos de RT-PCR o de hibridación tipo Northern de los genes candidatos a ser regulados por UvrY.
- También se pueden amplificar las regiones río arriba de los genes que hayan sido positivos en la validación para hacer fusiones con el reportero *lacZ* y medir actividad en las cepas tipo silvestre y *uvrY::cm*.
- Medir los niveles de poliaminas de la cepa silvestre y la mutante *uvrY*.
- Examinar si la mutante *uvrY* produce las mismas modificaciones del lípido A que la cepa de tipo silvestre.
- Hacer el reto ácido para el sistema AR2, para ello una cepa de tipo silvestre y la mutante *uvrY::cm* se cambiarán a medio mínimo pH 2.5 en presencia de glutamato y se contará la viabilidad a diferentes tiempos.
- Continuar con el análisis de los datos del microarreglo y con la interpretación de éstos.

## 6. ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
AcP	Acetil fosfato
Abs	Absorbencia
AI-2	Autoinductor 2
AI-3	Autoinductor 3
Asp	Aspartato
ATP	Trifosfato de adenosina
Amp	Ampicilina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AMPC	Monofosfato de adenosina cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNp	Pequeños ARNs no traducidos
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
Cm	Cloranfenicol
CS	Cinasa sensora
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO <sub>600</sub>	Densidad óptica, absorbencia medida a 600 nanómetros
DTT	Ditiotreitol
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EMSA	Cambio en la movilidad electroforética “Electrophoretic movility shift assay”
Glc	Glucosa
His	Histidina
HSL	Homoserin-lactona
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
IPTG	Isopropil-tio-β-D-galactosido
Kan	Kanamicina
KDO	Ácido 3-deoxi-D-manno-octulosónico

LPS	Lipopolisácaridos
L-Ara4N	4-amino-4-deoxi-L-arabinosa
MF	Microarreglo de fenotipos
pb	par de bases
pEtN	Fosfoetanolamina
PMB	Polimixina B
ppGpp	Guanosin-tetrafosfato
PTS	Sistema de Fosfotransferencia
rpm	Revoluciones por minuto
RR	Regulador de respuesta
SDC	Sistema de dos componentes
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (Sodiumdodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis)
SN	Sobrenadante
TM	Dominio transmembranal
TMAO	Tri-metilamina N-óxido

## 7. ANEXO 1

		MG I	MG II	MG III	MG IV
<b>Biosíntesis de aminoácidos</b>					
gcvH	in glycine cleavage complex, carrier of aminomethyl moiety via covalently bound lipoyl cofactor	1.9	-2.4	-1.8	-7.2
argF	ornithine carbamoyltransferase 2, chain F	-1.4	-1.4	-1.6	
aroB	3-dehydroquinate synthase	-1.8	-1.5		
ilvE	branched-chain amino-acid aminotransferase	-1.5	-1.6	-1.8	-1.6
ilvH	acetolactate synthase III, valine sensitive, small subunit	1.3			2.2
aroG	3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase (DAHP synthetase, phenylalanine repressible)	-1.6		-1.9	-2.2
tyrA	chorismate mutase-T and prephenate dehydrogenase	-1.7	-1.5	-1.5	
gcvT	aminomethyltransferase (T protein; tetrahydrofolate-dependent) of glycine cleavage system	1.8	-1.5		-2.0
hisL	his operon leader peptide	1.9			1.5
thrL	thr operon leader peptide		1.5		1.9
asd	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	-1.5		1.4	-1.5
<b>Biosíntesis de cofactores y acarreadores</b>					
folD	5,10-methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase; 5,10-methylene-tetrahydrofolate cyclohydrolase	-1.5		-1.7	-1.9
pdxK	pyridoxal/pyridoxine/pyridoxamine kinase	1.5		1.4	1.5
gshA	gamma-glutamate-cysteine ligase	-2.0	-1.6	-1.7	-1.4
<b>Catabolismo de compuestos de carbono</b>					
gabT	4-aminobutyrate aminotransferase activity			1.6	1.6
gabD	succinate-semialdehyde dehydrogenase, NADP-dependent activity	1.5		1.7	
hsIV	heat shock protein hsIVU, proteasome-related peptidase subunit			2.3	2.1
tdh	threonine dehydrogenase	1.6	1.7	1.4	2.0
tdh-r	threonine dehydrogenase	1.5	1.4		1.6
aldB	aldehyde dehydrogenase B (lactaldehyde dehydrogenase)				-1.8
feaB	phenylacetaldehyde dehydrogenase	2.6	1.7	1.4	2.1
lacZ	beta-D-galactosidase	1.5			1.7
mhpE	4-hydroxy-2-ketovalerate aldolase	-1.8			-1.5
malM	periplasmic protein of mal regulon	2.8	-1.5		-1.7
<b>Procesos celulares</b>					
glgP	glycogen phosphorylase		-1.9	-1.8	
mdoG	periplasmic glucans biosynthesis protein	-2.0			-1.9
osmB	osmotically inducible lipoprotein	1.5	1.6		
mopB	GroES, 10 Kd chaperone binds to Hsp60 in pres. Mg-ATP, suppressing its ATPase activity		1.4	1.6	-1.5
tolA	membrane spanning protein, required for outer membrane integrity	-1.5		-1.4	-2.1
sfnH	involved in fimbrial assembly		-1.5	-1.4	1.4
bolA	possible regulator of murein genes	1.5	1.6	1.5	
mreC	rod shape-determining protein	-1.6		2.4	1.7
flgF	flagellar biosynthesis, cell-proximal portion of basal-body rod			-1.7	1.7
flhE	flagellar protein	-1.5		-1.8	-1.3
fliN	flagellar biosynthesis, component of motor switch and energizing, enabling rotation and determining its direction			1.5	2.0
nfnB	oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase		-1.3	-1.6	
ftsA	ATP-binding cell division protein, septation process, complexes with FtsZ, associated with junctions of inner and outer membranes	-1.4		1.5	
ftsE	ATP-binding component of a membrane-associated complex involved in cell division		-1.8	-1.5	
ftsW	cell division; membrane protein involved in shape determination	-1.4			2.1



		MG I	MG II	MG III	MG IV
ftsI	septum formation; penicillin-binding protein 3; peptidoglycan synthetase			1.4	-1.4
<b>Estructuras celulares</b>					
pal	peptidoglycan-associated lipoprotein			-1.4	-1.9
lpp	murein lipoprotein	2.1		-1.5	-1.5
ompF	outer membrane protein 1a (Ia;b;F)	-1.4	-2.1	-2.6	-2.1
ompG	outer membrane protein	1.6			1.8
slp	outer membrane protein induced after carbon starvation	1.8	2.5		-3.4
gmhA	phosphoheptose isomerase	1.4		1.5	-1.3
<b>Metabolismo central intermediario</b>					
glmS	L-glutamine:D-fructose-6-phosphate aminotransferase	-1.5			-1.4
ppsA	phosphoenolpyruvate synthase	-1.7			-1.5
rpe	D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase	-1.6		-1.6	-1.6
rpiB	ribose 5-phosphate isomerase B	-1.6		-1.6	
gadB	glutamate decarboxylase isozyme		2.8	2.0	1.6
ppa	inorganic pyrophosphatase	-1.4	-1.5		-1.9
gapC_2	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (second fragment)			1.5	1.4
aceF	pyruvate dehydrogenase (dihydrolipoyltransacetylase component)	-1.6	-3.3	-1.9	-2.0
acnB	aconitate hydratase B		-1.5	-2.1	-1.6
sucA	2-oxoglutarate dehydrogenase (decarboxylase component)	2.1			1.4
lpdA	lipoamide dehydrogenase (NADH); component of 2-oxodehydrogenase and pyruvate complexes; L-protein of glycine cleavage complex			-1.3	-1.5
eno	Enolase			1.9	-1.9
<b>Replicación, reparación, restricción y modificación de DNA</b>					
xseB	exonuclease VII, small subunit		-1.4		-1.8
dnaN	DNA polymerase III, beta-subunit	-1.5	-1.5	-1.4	-1.8
hsdM-r	host modification; DNA methylase M	-1.5	-1.5	-1.5	
mutM	Formamidopyrimidine DNA glycosylase	-1.4		-1.6	
hipA	histone-like protein, located in outer membrane or nucleoid	-1.4	-1.4		
hupB	DNA-binding protein HU-beta, NS1 (HU-1)			-1.6	-3.7
mioC	initiation of chromosome replication	-1.8			-2.2
tus	DNA-binding protein; inhibition of replication at Ter sites		1.5	1.6	1.7
<b>Metabolismo de energía</b>					
napF	ferredoxin-type protein: electron transfer			1.4	1.8
atpA	membrane-bound ATP synthase, F1 sector, alpha-subunit	-1.5			-2.5
atpB	membrane-bound ATP synthase subunit a AtpB	-1.4			-2.6
atpC	membrane-bound ATP synthase, F1 sector, epsilon-subunit			-2.0	-2.2
atpD	membrane-bound ATP synthase, F1 sector, beta-subunit				-1.8
atpE	membrane-bound ATP synthase, F0 sector, subunit c	-1.5		-1.4	-3.3
atpF	membrane-bound ATP synthase, F0 sector, subunit b	-2.1	-1.4	-1.6	-2.7
atpH	membrane-bound ATP synthase, F1 sector, delta-subunit	-2.3		-1.3	-2.1
atpI	membrane-bound ATP synthase, dispensable protein, affects expression of atpB			-1.5	-1.8
cyoA	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II	-2.6		-2.3	-1.8
hyaA	hydrogenase-1 small subunit		1.6	2.2	2.1
hyaB	hydrogenase-1 large subunit			1.4	1.6
dmsB	anaerobic dimethyl sulfoxide reductase subunit B	-2.2		-1.6	-1.9
fdoG	formate dehydrogenase-O, major subunit	-1.4			-1.8
fdoH	formate dehydrogenase-O, iron-sulfur subunit	-2.2			-1.6

		MGI	MGII	MGIII	MGIV
glpC	sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase (anaerobic), K-small subunit	-2.0	-1.4	-2.2	1.6
torA	trimethylamine N-oxide reductase subunit	1.8	1.4	1.8	
cydA	cytochrome d terminal oxidase, polypeptide subunit I	1.4			-2.5
cydB	cytochrome d terminal oxidase polypeptide subunit II			-1.4	-4.8
cybC	cytochrome b(562)		1.5	1.5	
aldA	aldehyde dehydrogenase, NAD-linked			-2.0	-2.1
hycH	processing of large subunit (HycE) of hydrogenase 3 (part of the FHL complex)			1.8	1.9

#### Metabolismo de ácidos grasos y fosfolípidos

fabB	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase I			-1.3	-2.6
------	---	--	--	------	------

#### Proteínas hipotéticas

b1330	orf, hypothetical protein	1.8			1.7
b1500	orf, hypothetical protein	-1.7		-1.3	
b1582	orf, hypothetical protein	1.5	1.5	1.6	1.4
b1759	orf, hypothetical protein	2.4		1.5	2.4
b1777	orf, hypothetical protein			-1.7	-2.0
b1953	orf, hypothetical protein			-1.7	-1.5
b1976	orf, hypothetical protein	2.1	-1.6		-1.6
b2097	orf, hypothetical protein		1.3	1.7	
b2529	orf, hypothetical protein	-1.6		-1.7	-2.5
b2655	orf, hypothetical protein	-1.6		-1.4	
b2809	orf, hypothetical protein	1.5			1.4
b3914	orf, hypothetical protein	1.9	2.0		
cof	orf, hypothetical protein	1.6		1.4	
hdeA	orf, hypothetical protein	3.2	2.4	2.0	
hdeB	orf, hypothetical protein	4.9	2.5	2.6	
hdeD	orf, hypothetical protein	1.8	1.4		
yacA	orf, hypothetical protein	1.5		1.6	
yaeJ	orf, hypothetical protein	-1.4			-1.6
yafS	orf, hypothetical protein		1.5	2.0	2.0
yahH	orf, hypothetical protein	1.4		1.6	2.3
ybaA	orf, hypothetical protein	-1.9	-1.3	-1.6	
ybdQ	orf, hypothetical protein	2.2	1.6	2.1	-1.7
ybgA	orf, hypothetical protein			1.9	1.6
ybhH	orf, hypothetical protein	2.9		2.9	3.3
ybiM	orf, hypothetical protein			1.5	2.3
ybjD	orf, hypothetical protein		1.7		1.5
ycbN	orf, hypothetical protein	1.4			1.4
yccC	orf, hypothetical protein	1.5		1.7	2.0
yccJ	orf, hypothetical protein		-1.5	-1.4	-2.7
yccV	orf, hypothetical protein		1.6	2.1	1.6
ycdF	orf, hypothetical protein	1.5		1.5	2.9
ycfR	orf, hypothetical protein			1.5	2.5
ychB	orf, hypothetical protein	-2.4	-1.5		-2.1
yciO	orf, hypothetical protein	-1.6	-1.4	-1.7	
ycjC	orf, hypothetical protein	1.4	1.5	2.9	2.0
ydaQ	orf, hypothetical protein	-2.4	-1.5	-1.5	
ydeJ	orf, hypothetical protein			-1.6	-1.5
yeeA	orf, hypothetical protein	-1.7	-1.8	-1.4	
yegN	orf, hypothetical protein		-1.4	-1.5	

		<b>MGI</b>	<b>MGII</b>	<b>MGIII</b>	<b>MGIV</b>
ygaF	orf, hypothetical protein	2.1		1.8	1.6
ygfZ	orf, hypothetical protein	-1.5	-1.3		-1.7
ygiA	orf, hypothetical protein	1.6	1.8	1.7	
yhbC	orf, hypothetical protein	-2.3	-1.4	-1.4	
yhbV	orf, hypothetical protein		-1.5	-2.0	-1.7
yhbY	orf, hypothetical protein	-2.3			-1.8
yhjQ	orf, hypothetical protein		1.4	1.5	1.6
yiaC	orf, hypothetical protein	1.6	1.5		
yiaG	orf, hypothetical protein	-2.0	1.5	2.2	1.5
yiaH	orf, hypothetical protein			1.6	2.4
yiiM	orf, hypothetical protein	-1.9	-1.5	-2.2	-1.6
yjbJ	orf, hypothetical protein		1.5	1.6	1.7
yjfO	orf, hypothetical protein	2.4	-1.4	-2.0	-1.8
yjiH	orf, hypothetical protein	1.7		1.5	-2.5
yjiN	orf, hypothetical protein	1.4		1.4	2.1
yjjM	orf, hypothetical protein	1.6		1.4	1.8
yIaC	orf, hypothetical protein	-1.4	-1.5		-1.6
ymgA	orf, hypothetical protein			2.6	1.9
ymgB	orf, hypothetical protein	1.5		1.4	
ynaE	orf, hypothetical protein		1.5	1.9	
yqjF	orf, hypothetical protein	1.9	1.9	2.3	
yraL	orf, hypothetical protein	-1.3		-1.7	-1.5
yrdB	orf, hypothetical protein	-1.5		-1.6	-1.8

#### Metabolismo y biosíntesis de nucleótidos

dcd	2'-deoxycytidine 5'-triphosphate deaminase	-1.4		-1.4	
trxA	thioredoxin 1	-1.5	-1.5	-1.7	-2.0
ndk	nucleoside diphosphate kinase	-1.6		-1.6	-1.4
purA	adenylosuccinate synthetase	1.4		-1.5	-2.6
purL	phosphoribosylformyl-glycineamide synthetase = FGAM synthetase	-1.6		-1.8	
carB	carbamoyl-phosphate synthase large subunit	-4.4	-1.5		

#### Fagos, transposones y plásmidos

nmpC	outer membrane porin protein; locus of qsr prophage	1.6		-2.2	-5.6
rhsE	rhsE protein in rhs element			1.4	2.6
trs5_5	IS5 transposase	-1.6	-1.4	-2.0	

#### Enzimas probables

sgbH	probable 3-hexulose 6-phosphate synthase		-1.5	-1.4	
yfiD	putative formate acetyltransferase	-2.1		-1.7	-1.6
b1009	putative acetyltransferase			1.6	2.5
b1011	putative synthetase	1.5			1.7
b1297	putative glutamine synthetase (EC 6.3.1.2)		2.4	1.8	
b2899	putative oxidoreductase		1.4	2.3	-1.7
b2997	putative hydrogenase subunit		-1.4		1.4
ppdD	prelipin peptidase dependent protein			1.4	2.5
pqqL	putative peptidase		1.5	1.4	
prpB	putative phosphonmutase 2	1.8			1.4
prpC	putative citrate synthase; propionate metabolism?	2.8	1.6		
ybeM	putative amidase			1.4	1.7
ycaH	putative EC 1.2 enzyme	-1.5	-1.5	-1.4	-2.2

		MGI	MGII	MGIII	MGIV
yceG	putative thymidylate kinase (EC 2.7.4.9)	1.6		1.5	1.4
ydiS	flavoprotein; probably electron transport			2.6	1.7
ygbD	putative oxidoreductase	2.4	2.1	1.9	
yibF	putative S-transferase			1.5	1.6
yihV	putative kinase			-1.5	1.8
yjgB	putative oxidoreductase	-1.4			-2.5
ykgE	putative dehydrogenase subunit	-1.4			-1.7
yrfF	putative dehydrogenase	2.3			1.5
sfmC	putative chaperone		1.4	2.5	1.4
ygdP	putative invasion protein	-1.5		-1.4	-1.6
yhbZ	putative GTP-binding factor	-1.8		-1.6	-1.7
sbmA	sensitivity to microcin B17, possibly envelop protein		1.7	1.6	
b0795	putative membrane protein	1.5	1.5	2.2	1.6
yciD	putative outer membrane protein			-2.1	-5.8
yfiB	putative outer membrane protein	1.5			2.0
ytfF	putative transmembrane subunit	1.5		1.4	2.1
b1499	putative ARAC-type regulatory protein		2.3		1.7
ydeW	putative transcriptional regulator, sorC family	1.6		1.6	1.4
yeeY	putative transcriptional regulator LYSR-type	-1.3	-1.4		-1.5
yfhF	putative regulator			-1.5	-1.9
yggD	putative transcriptional regulator	2.1	-1.6	-1.4	-1.6
ynfL	putative transcriptional regulator LYSR-type		1.4	1.4	
b1486	putative transport system permease protein		1.5	2.1	
fliY	putative periplasmic binding transport protein	1.6		-2.0	-1.9
mdlB	putative ATP-binding component of a transport system	-1.7		-1.4	1.5
sapB	homolog of Salmonella peptide transport permease protein		1.6	1.5	1.6
uup	putative ATP-binding component of a transport system	-1.5		-1.6	
ybaT	putative amino acid/amine transport protein	-1.6	1.5	1.6	
yccA	putative carrier/transport protein			-1.6	-1.7
yeaV	putative transport protein	1.6		1.6	1.5
yeeE	putative transport system permease protein		1.4		1.5
yeiJ	putative transport system permease protein	1.4			1.5
yifK	putative amino acid/amine transport protein	1.3		1.5	2.1
yihO	putative permease			-1.4	-1.9
yjdL	putative peptide transporter			1.7	1.6
ykfD	putative amino acid/amine transport protein	3.5	1.5		-1.7
yqgA	putative transport protein	1.5		1.6	1.5
ytfL	putative transport protein		2.1	2.5	
ytfS	putative ATP-binding component of a transport system	1.5		1.5	2.0
ybeL	putative alpha helical protein	2.0	1.4	-1.7	-1.8
yjfJ	putative alpha helical protein		1.3	1.8	1.6
yjgA	putative alpha helix protein	1.4			1.7
bax	putative ATP-binding protein		-1.5	-2.1	-2.9
yraK	putative fimbrial protein	1.4			1.9
yggP	putative oxidoreductase		1.4	1.4	1.9

#### Funciones regulatorias

relA	(p)ppGpp synthetase I (GTP pyrophosphokinase); regulation of RNA synthesis; stringent factor		1.4		1.5
nagC	transcriptional repressor of nag (N-acetylglucosamine) operon			1.4	1.3
mtlR	repressor for mtl	1.6	1.4	1.8	

		MG I	MG II	MG III	MG IV
fnr	transcriptional regulation of aerobic, anaerobic respiration, osmotic balance			-1.4	-1.8
fur	negative regulator			-1.6	-1.7
feaR	regulatory protein for 2-phenylethylamine catabolism		2.0	2.3	1.8
deoR	transcriptional repressor for deo operon, tsx, nupG		-1.4	-1.6	-1.6
rscB	positive response regulator for colanic capsule biosynthesis, (sensor, RcsC)	-1.7	-1.4		-2.0
crl	transcriptional regulator of cryptic csgA gene for curli surface fibers	-1.5			-1.8
yhiE	orf, hypothetical protein	1.8	3.1	2.2	1.9
yhiW	putative ARAC-type regulatory protein	2.3	2.0	1.9	
yhiX	putative ARAC-type regulatory protein		1.7	2.0	
dniR	transcriptional regulator for nitrite reductase (cytochrome c552)			-2.5	-2.7

#### Transcripción, procesamiento y degradación de RNA

rnc	RNase III, ds RNA	-2.0		-1.4	-1.4
rpoA	RNA polymerase, alpha subunit	-1.9	-1.4		-2.0
rpoB-r	RNA polymerase, beta subunit	-1.3			-1.4
rpoZ	RNA polymerase, omega subunit	-1.6	-1.6	-1.8	-1.5
rpoN	RNA polymerase, sigma(54 or 60) factor; nitrogen and fermentation regulation	1.4		1.4	

#### Traducción, modificadores postraduccionales

dsbA	protein disulfide isomerase I, essential for cytochrome c synthesis and formate-dependent reduction	-1.7		-1.8	-1.4
fkpA	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (rotamase)	-1.4		-1.5	-1.7
glnS	glutamine tRNA synthetase		-1.6	-1.7	-1.7
glnS-r	glutamine tRNA synthetase		-1.4		-1.6
infC	protein chain initiation factor IF-3	-1.6			-1.4
pheT	phenylalanine tRNA synthetase, beta-subunit	-1.6			-1.5
ppiB	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B (rotamase B)			-1.5	-3.0
prfH	probable peptide chain release factor	2.9			1.8
rimK	ribosomal protein S6 modification protein	-1.4		-1.4	1.9
rplA	50S ribosomal subunit protein L1, regulates synthesis of L1 and L11	-2.0	-1.6	-1.5	-1.8
rplB	50S ribosomal subunit protein L2	-2.6	-1.5		-2.3
rplD	50S ribosomal subunit protein L4, regulates expression of S10 operon	-3.7		-1.8	-2.4
rplE	50S ribosomal subunit protein L5	-4.7	-2.7	-3.6	-8.2
rplF	50S ribosomal subunit protein L6	-3.5	-2.7	-1.7	-7.3
rplJ	50S ribosomal subunit protein L10	-1.6	-1.5	-1.4	-1.7
rplK	50S ribosomal subunit protein L11	-2.1		-1.6	-2.7
rplO	50S ribosomal subunit protein L15	-1.7	-1.4		-2.2
rplP	50S ribosomal subunit protein L16	-2.1			-2.1
rplR	50S ribosomal subunit protein L18	-2.3	-1.6		-1.9
rplT	50S ribosomal subunit protein L20, and regulator			-1.4	-1.6
rplU	50S ribosomal subunit protein L21	-2.3	-1.5	-2.2	-2.7
rplW	50S ribosomal subunit protein L23	-3.0	-1.3		-2.0
rplY	50S ribosomal subunit protein L25		-2.0	-1.6	-3.0
rpmA	50S ribosomal subunit protein L27	-2.0	-1.4		-3.1
rpmB	50S ribosomal subunit protein L28	-1.7			-2.0
rpmD	50S ribosomal subunit protein L30	-2.0			-6.6
rpmG	50S ribosomal subunit protein L33	-1.5		-1.7	-2.4
rpmH	50S ribosomal subunit protein L34	-1.7		-1.4	-2.8
rpmI	50S ribosomal subunit protein A			-1.6	-1.7
rpsB	30S ribosomal subunit protein S2	-1.7	-1.4		-1.5
rpsD	30S ribosomal subunit protein S4	-2.8	-1.5	-1.8	-2.3

		<b>MGI</b>	<b>MGII</b>	<b>MGIII</b>	<b>MGIV</b>
rpsG	30S ribosomal subunit protein S7, initiates assembly	-2.1		-1.3	-2.3
rpsH	30S ribosomal subunit protein S8, and regulator	-2.6	-1.6		-1.8
rpsL	30S ribosomal subunit protein S12	-1.6	-1.5	-1.5	-2.2
rpsM	30S ribosomal subunit protein S13	-1.9	-1.5	-1.5	-3.7
rpsN	30S ribosomal subunit protein S14	-3.3			-2.3
rpsP	30S ribosomal subunit protein S16	-1.6			-1.9
rpsQ	30S ribosomal subunit protein S17	-1.5	-1.4		-1.5
rpsU	30S ribosomal subunit protein S21	-3.1		-1.7	-2.1
slyD	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (rotamase)	-1.9	-1.4	-1.6	-2.0
tgt	tRNA-guanine transglycosylase	-1.5	-1.4		-2.7
tgt-r	tRNA-guanine transglycosylase	-1.8		-2.3	-2.7
thrS	threonine tRNA synthetase	-1.5			-1.3
valS	valine tRNA synthetase	-1.8		-1.4	
<b>Transporte</b>					
ftn	cytoplasmic ferritin (an iron storage protein)	2.0		-2.8	-3.7
nagE	PTS system, N-acetylglucosamine-specific enzyme IIABC	-1.5	-1.5	-1.5	1.4
celC	PEP-dependent phosphotransferase enzyme III for cellobiose, arbutin, and salicin	-1.4		-1.4	-1.5
ptsH	PTS system protein HPr	-1.5	-1.4		-2.2
mgtA	Mg <sup>2+</sup> transport ATPase, P-type 1	1.5	1.4		1.4
argT	lysine-, arginine-, ornithine-binding periplasmic protein	-1.5		-1.4	-1.7
hisM	histidine transport, membrane protein M			1.5	1.7
narK	nitrite extrusion protein	-1.7	-1.4	-1.6	-1.6
sbp	periplasmic sulfate-binding protein		2.8		1.8
exuT	transport of hexuronates	1.5	2.2	1.5	1.6
gntT	high-affinity transport of gluconate / gluconate permease		1.8	1.8	
fepD	ferric enterobactin (enterochelin) transport	1.5			2.0
dppD	putative ATP-binding component of dipeptide transport system		1.6	1.7	
secG	protein export - membrane protein	-2.3		-2.5	
xasA	acid sensitivity protein, putative transporter		2.3	2.9	1.9
malE	periplasmic maltose-binding protein; substrate recognition for transport and chemotaxis	2.2	-1.5		
yadQ	putative channel transporter	1.6		1.4	1.5

## 8. ANEXO 2

### Genes del grupo A, regulados negativamente (-) por UvrY:

<i>aceF</i>	<i>b2529</i>	<i>fnr</i>	<i>narK</i>	<i>rplF</i>	<i>rpsB</i>	<i>tyrA</i>	<i>ygdP</i>
<i>acnB</i>	<i>b2655</i>	<i>folD</i>	<i>ndk</i>	<i>rplJ</i>	<i>rpsD</i>	<i>uup</i>	<i>ygfZ</i>
<i>aldA</i>	<i>bax</i>	<i>ftsE</i>	<i>nfnB</i>	<i>rplK</i>	<i>rpsG</i>	<i>valS</i>	<i>yhbC</i>
<i>aldB</i>	<i>carB</i>	<i>fur</i>	<i>ompF</i>	<i>rplO</i>	<i>rpsH</i>	<i>xseB</i>	<i>yhbV</i>
<i>argF</i>	<i>celC</i>	<i>glgP</i>	<i>pal</i>	<i>rplP</i>	<i>rpsL</i>	<i>yaeJ</i>	<i>yhbY</i>
<i>argT</i>	<i>crl</i>	<i>glmS</i>	<i>pheT</i>	<i>rplR</i>	<i>rpsM</i>	<i>ybaA</i>	<i>yhbZ</i>
<i>aroB</i>	<i>cydB</i>	<i>glnS</i>	<i>ppa</i>	<i>rplT</i>	<i>rpsN</i>	<i>ycaH</i>	<i>yihO</i>
<i>aroG</i>	<i>cyoA</i>	<i>glnS-r</i>	<i>ppiB</i>	<i>rplU</i>	<i>rpsP</i>	<i>yccA</i>	<i>yiiM</i>
<i>atpA</i>	<i>dcd</i>	<i>gshA</i>	<i>ppsA</i>	<i>rplW</i>	<i>rpsQ</i>	<i>yccJ</i>	<i>yjgB</i>
<i>atpB</i>	<i>deoR</i>	<i>hlpA</i>	<i>ptsH</i>	<i>rplY</i>	<i>rpsU</i>	<i>ychB</i>	<i>ykge</i>
<i>atpC</i>	<i>dmsB</i>	<i>hsdM-r</i>	<i>purL</i>	<i>rpmA</i>	<i>secG</i>	<i>yciD</i>	<i>ylaC</i>
<i>atpD</i>	<i>dnaN</i>	<i>hupB</i>	<i>rceB</i>	<i>rpmB</i>	<i>sgbH</i>	<i>yciO</i>	<i>yraL</i>
<i>atpE</i>	<i>dniR</i>	<i>ilvE</i>	<i>rnc</i>	<i>rpmD</i>	<i>slyD</i>	<i>ydaQ</i>	<i>yrdB</i>
<i>atpF</i>	<i>dsbA</i>	<i>infC</i>	<i>rpe</i>	<i>rpmG</i>	<i>tgt</i>	<i>ydeJ</i>	
<i>atpH</i>	<i>fabB</i>	<i>lpdA</i>	<i>rpiB</i>	<i>rpmH</i>	<i>tgt-r</i>	<i>yeeA</i>	
<i>atpI</i>	<i>fdoG</i>	<i>mdoG</i>	<i>rplA</i>	<i>rpml</i>	<i>thrS</i>	<i>yeeY</i>	
<i>b1500</i>	<i>fdoH</i>	<i>mhpE</i>	<i>rplB</i>	<i>rpoA</i>	<i>tolA</i>	<i>yegN</i>	
<i>b1777</i>	<i>fkpA</i>	<i>mioC</i>	<i>rplD</i>	<i>rpoB-r</i>	<i>trs5_5</i>	<i>yfhF</i>	
<i>b1953</i>	<i>flhE</i>	<i>mutM</i>	<i>rplE</i>	<i>rpoZ</i>	<i>trxA</i>	<i>yfiD</i>	

### Genes del grupo B, regulados positivamente (+) por UvrY:

<i>b0795</i>	<i>dppD</i>	<i>hisM</i>	<i>pqqL</i>	<i>torA</i>	<i>ycdF</i>	<i>yhiW</i>	<i>ynaE</i>
<i>b1009</i>	<i>exuT</i>	<i>hslV</i>	<i>prfH</i>	<i>tus</i>	<i>yceG</i>	<i>yhiX</i>	<i>ynfL</i>
<i>b1011</i>	<i>feaB</i>	<i>hyaA</i>	<i>prpB</i>	<i>xasA</i>	<i>ycfR</i>	<i>yhjQ</i>	<i>yqgA</i>
<i>b1297</i>	<i>feaR</i>	<i>hyaB</i>	<i>prpC</i>	<i>yacA</i>	<i>ycjC</i>	<i>yiaC</i>	<i>yqjF</i>
<i>b1330</i>	<i>fepD</i>	<i>hycH</i>	<i>relA</i>	<i>yadQ</i>	<i>ydeW</i>	<i>yiaH</i>	<i>yraK</i>
<i>b1486</i>	<i>fliN</i>	<i>ilvH</i>	<i>rhsE</i>	<i>yafS</i>	<i>ydiS</i>	<i>yibF</i>	<i>yrfF</i>
<i>b1499</i>	<i>gabD</i>	<i>lacZ</i>	<i>rpoN</i>	<i>yahH</i>	<i>yeaV</i>	<i>yijK</i>	<i>ytff</i>
<i>b1582</i>	<i>gabT</i>	<i>mgtA</i>	<i>sapB</i>	<i>ybeM</i>	<i>yeeE</i>	<i>yjbJ</i>	<i>ytfl</i>
<i>b1759</i>	<i>gadB</i>	<i>mtlR</i>	<i>sbmA</i>	<i>ybgA</i>	<i>yeiJ</i>	<i>yjdL</i>	<i>ytfs</i>
<i>b2097</i>	<i>gapC_2</i>	<i>nagC</i>	<i>sbp</i>	<i>ybhH</i>	<i>yfiB</i>	<i>yjfJ</i>	
<i>b2809</i>	<i>gntT</i>	<i>napF</i>	<i>sfmC</i>	<i>ybiM</i>	<i>ygaF</i>	<i>yjgA</i>	
<i>b3914</i>	<i>hdeA</i>	<i>ompG</i>	<i>sucA</i>	<i>ybjD</i>	<i>ygbD</i>	<i>yjiN</i>	
<i>bolA</i>	<i>hdeB</i>	<i>osmB</i>	<i>tdh</i>	<i>ycbN</i>	<i>yggP</i>	<i>yjjM</i>	
<i>cof</i>	<i>hdeD</i>	<i>pdxK</i>	<i>tdh-r</i>	<i>yccC</i>	<i>ygiA</i>	<i>ymgA</i>	
<i>cybC</i>	<i>hisL</i>	<i>ppdD</i>	<i>thrL</i>	<i>yccV</i>	<i>yhiE</i>	<i>ymgB</i>	

### Genes del grupo C, la regulación por UvrY presenta cambios en las tendencias de expresión (+/- y viceversa):

<i>asd</i>	<i>eno</i>	<i>ftsI</i>	<i>gmhA</i>	<i>mopB</i>	<i>rimK</i>	<i>ybeL</i>	<i>yjiH</i>
<i>b1976</i>	<i>flgF</i>	<i>ftsW</i>	<i>lpp</i>	<i>mreC</i>	<i>sfmH</i>	<i>yggD</i>	<i>ykfD</i>
<i>b2899</i>	<i>fliY</i>	<i>gcvH</i>	<i>malE</i>	<i>nagE</i>	<i>slp</i>	<i>yiaG</i>	
<i>b2997</i>	<i>ftn</i>	<i>gcvT</i>	<i>malM</i>	<i>nmpC</i>	<i>ybaT</i>	<i>yihV</i>	
<i>cydA</i>	<i>ftsA</i>	<i>glpC</i>	<i>mdlB</i>	<i>purA</i>	<i>ybdQ</i>	<i>yjfO</i>	

## 9. REFERENCIAS

1. Nixon, B.T., C.W. Ronson, y F.M. Ausubel, *Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes ntrB and ntrC*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. 83(20): p. 7850-4.
2. Reitzer, L.J. y B. Magasanik, *Expression of glnA in Escherichia coli is regulated at tandem promoters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. 82(7): p. 1979-83.
3. Hirschman, J., P.K. Wong, K. Sei, J. Keener, y S. Kustu, *Products of nitrogen regulatory genes ntrA and ntrC of enteric bacteria activate glnA transcription in vitro: evidence that the ntrA product is a sigma factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. 82(22): p. 7525-9.
4. Ninfa, A.J. y B. Magasanik, *Covalent modification of the glnG product, NRI, by the glnL product, NRII, regulates the transcription of the glnALG operon in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. 83(16): p. 5909-13.
5. West, A.H. y A.M. Stock, *Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems*. Trends Biochem Sci, 2001. 26(6): p. 369-76.
6. Mizuno, T., *Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of Escherichia coli*. DNA Res, 1997. 4(2): p. 161-8.
7. Mizuno, T., T. Kaneko, y S. Tabata, *Compilation of all genes encoding bacterial two-component signal transducers in the genome of the cyanobacterium, Synechocystis sp. strain PCC 6803*. DNA Res, 1996. 3(6): p. 407-14.
8. Fabret, C., V.A. Feher, y J.A. Hoch, *Two-component signal transduction in Bacillus subtilis: how one organism sees its world*. J Bacteriol, 1999. 181(7): p. 1975-83.
9. Mizuno, T., *His-Asp phosphotransfer signal transduction*. J Biochem (Tokyo), 1998. 123(4): p. 555-63.
10. Smith, D.R., L.A. Doucette-Stamm, C. Deloughery, H. Lee, J. Dubois, T. Aldredge, R. Bashirzadeh, D. Blakely, R. Cook, K. Gilbert, D. Harrison, L. Hoang, P. Keagle, W. Lumm, B. Pothier, D. Qiu, R. Spadafora, R. Vicaire, Y. Wang, J. Wierzbowski, R. Gibson, N. Jiwani, A. Caruso, D. Bush, J.N. Reeve, y et al., *Complete genome sequence of Methanobacterium thermoautotrophicum deltaH: functional analysis and comparative genomics*. J Bacteriol, 1997. 179(22): p. 7135-55.
11. Maeda, T., S.M. Wurgler-Murphy, y H. Saito, *A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast*. Nature, 1994. 369(6477): p. 242-5.
12. Hwang, I., H.C. Chen, y J. Sheen, *Two-component signal transduction pathways in Arabidopsis*. Plant Physiol, 2002. 129(2): p. 500-15.
13. Posas, F., S.M. Wurgler-Murphy, T. Maeda, E.A. Witten, T.C. Thai, y H. Saito, *Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor*. Cell, 1996. 86(6): p. 865-75.
14. Shieh, J.C., M.G. Wilkinson, V. Buck, B.A. Morgan, K. Makino, y J.B. Millar, *The Mcs4 response regulator coordinately controls the stress-activated Wak1-Wis1-Sty1 MAP kinase pathway and fission yeast cell cycle*. Genes Dev, 1997. 11(8): p. 1008-22.
15. Wurgler-Murphy, S.M. y H. Saito, *Two-component signal transducers and MAPK cascades*. Trends Biochem Sci, 1997. 22(5): p. 172-6.
16. Shaulsky, G., R. Escalante, y W.F. Loomis, *Developmental signal transduction pathways uncovered by genetic suppressors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(26): p. 15260-5.
17. Shaulsky, G., D. Fuller, y W.F. Loomis, *A cAMP-phosphodiesterase controls PKA-dependent differentiation*. Development, 1998. 125(4): p. 691-9.
18. Thomason, P.A., D. Traynor, G. Cavet, W.T. Chang, A.J. Harwood, y R.R. Kay, *An intersection of the cAMP/PKA and two-component signal transduction systems in Dictyostelium*. Embo J, 1998. 17(10): p. 2838-45.



19. Chang, C., S.F. Kwok, A.B. Bleecker, y E.M. Meyerowitz, *Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators*. Science, 1993. 262(5133): p. 539-44.
20. Hoch, J.A. y T.J. Silhavy, *Two-Component Signal Transduction*. 1995, Washington, D. C.: ASM Press.
21. Robinson, V.L., D.R. Buckler, y A.M. Stock, *A tale of two components: a novel kinase and a regulatory switch*. Nat Struct Biol, 2000. 7(8): p. 626-33.
22. Lois, A.F., G.S. Ditta, y D.R. Helinski, *The oxygen sensor FixL of Rhizobium meliloti is a membrane protein containing four possible transmembrane segments*. J Bacteriol, 1993. 175(4): p. 1103-9.
23. Island, M.D., B.Y. Wei, y R.J. Kadner, *Structure and function of the uhp genes for the sugar phosphate transport system in Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1992. 174(9): p. 2754-62.
24. MacFarlane, S.A. y M. Merrick, *The nucleotide sequence of the nitrogen regulation gene ntrB and the glnA-ntrBC intergenic region of Klebsiella pneumoniae*. Nucleic Acids Res, 1985. 13(21): p. 7591-606.
25. Stock, A., T. Chen, D. Welsh, y J. Stock, *CheA protein, a central regulator of bacterial chemotaxis, belongs to a family of proteins that control gene expression in response to changing environmental conditions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. 85(5): p. 1403-7.
26. Stock, A.M., V.L. Robinson, y P.N. Goudreau, *Two-component signal transduction*. Annu Rev Biochem, 2000. 69: p. 183-215.
27. Garcia Vescovi, E., F.C. Soncini, y E.A. Groisman, *Mg<sup>2+</sup> as an extracellular signal: environmental regulation of Salmonella virulence*. Cell, 1996. 84(1): p. 165-74.
28. Hong, H.J., M.I. Hutchings, J.M. Neu, G.D. Wright, M.S. Paget, y M.J. Buttner, *Characterization of an inducible vancomycin resistance system in Streptomyces coelicolor reveals a novel gene (vanK) required for drug resistance*. Mol Microbiol, 2004. 52(4): p. 1107-21.
29. Wosten, M.M., L.F. Kox, S. Chamnongpol, F.C. Soncini, y E.A. Groisman, *A signal transduction system that responds to extracellular iron*. Cell, 2000. 103(1): p. 113-25.
30. Monson, E.K., G.S. Ditta, y D.R. Helinski, *The oxygen sensor protein, FixL, of Rhizobium meliloti. Role of histidine residues in heme binding, phosphorylation, and signal transduction*. J Biol Chem, 1995. 270(10): p. 5243-50.
31. Malpica, R., B. Franco, C. Rodriguez, O. Kwon, y D. Georgellis, *Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(36): p. 13318-23.
32. Georgellis, D., O. Kwon, y E.C. Lin, *Quinones as the redox signal for the arc two-component system of bacteria*. Science, 2001. 292(5525): p. 2314-6.
33. Zhulin, I.B. y B.L. Taylor, *Correlation of PAS domains with electron transport-associated proteins in completely sequenced microbial genomes*. Mol Microbiol, 1998. 29(6): p. 1522-3.
34. Taylor, B.L. y I.B. Zhulin, *PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light*. Microbiol Mol Biol Rev, 1999. 63(2): p. 479-506.
35. Shi, L. y F.M. Hulett, *The cytoplasmic kinase domain of PhoR is sufficient for the low phosphate-inducible expression of pho regulon genes in Bacillus subtilis*. Mol Microbiol, 1999. 31(1): p. 211-22.
36. Nakano, M.M., P. Zuber, P. Glaser, A. Danchin, y F.M. Hulett, *Two-component regulatory proteins ResD-ResE are required for transcriptional activation of fnr upon oxygen limitation in Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 1996. 178(13): p. 3796-802.
37. Sun, G., E. Sharkova, R. Chesnut, S. Birkey, M.F. Duggan, A. Sorokin, P. Pujic, S.D. Ehrlich, y F.M. Hulett, *Regulators of aerobic and anaerobic respiration in Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 1996. 178(5): p. 1374-85.
38. Baruah, A., B. Lindsey, Y. Zhu, y M.M. Nakano, *Mutational analysis of the signal-sensing domain of ResE histidine kinase from Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 2004. 186(6): p. 1694-704.

39. Aravind, L. y C.P. Ponting, *The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins*. FEMS Microbiol Lett, 1999. 176(1): p. 111-6.
40. Williams, S.B. y V. Stewart, *Functional similarities among two-component sensors and methyl-accepting chemotaxis proteins suggest a role for linker region amphipathic helices in transmembrane signal transduction*. Mol Microbiol, 1999. 33(6): p. 1093-102.
41. Wolanin, P.M., P.A. Thomason, y J.B. Stock, *Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom*. Genome Biol, 2002. 3(10): p. REVIEWS3013.
42. Grebe, T.W. y J.B. Stock, *The histidine protein kinase superfamily*. Adv Microb Physiol, 1999. 41: p. 139-227.
43. Kwon, O., D. Georgellis, y E.C. Lin, *Phosphorelay as the sole physiological route of signal transmission by the arc two-component system of Escherichia coli*. J Bacteriol, 2000. 182(13): p. 3858-62.
44. Georgellis, D., A.S. Lynch, y E.C. Lin, *In vitro phosphorylation study of the arc two-component signal transduction system of Escherichia coli*. J Bacteriol, 1997. 179(17): p. 5429-35.
45. Burbulys, D., K.A. Trach, y J.A. Hoch, *Initiation of sporulation in B. subtilis is controlled by a multicomponent phosphorelay*. Cell, 1991. 64(3): p. 545-52.
46. Uhl, M.A. y J.F. Miller, *Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the Bordetella pertussis BvgAS phosphorelay*. Embo J, 1996. 15(5): p. 1028-36.
47. Iuchi, S. y E.C. Lin, *arcA (dye), a global regulatory gene in Escherichia coli mediating repression of enzymes in aerobic pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. 85(6): p. 1888-92.
48. Iuchi, S., Z. Matsuda, T. Fujiwara, y E.C. Lin, *The arcB gene of Escherichia coli encodes a sensor-regulator protein for anaerobic repression of the arc modulon*. Mol Microbiol, 1990. 4(5): p. 715-27.
49. Georgellis, D., O. Kwon, y E.C. Lin, *Amplification of signaling activity of the arc two-component system of Escherichia coli by anaerobic metabolites. An in vitro study with different protein modules*. J Biol Chem, 1999. 274(50): p. 35950-4.
50. Rodriguez, C., O. Kwon, y D. Georgellis, *Effect of D-lactate on the physiological activity of the ArcB sensor kinase in Escherichia coli*. J Bacteriol, 2004. 186(7): p. 2085-90.
51. Chang, C. y R.C. Stewart, *The two-component system. Regulation of diverse signaling pathways in prokaryotes and eukaryotes*. Plant Physiol, 1998. 117(3): p. 723-31.
52. Volz, K. y P. Matsumura, *Crystal structure of Escherichia coli CheY refined at 1.7-A resolution*. J Biol Chem, 1991. 266(23): p. 15511-9.
53. Simms, S.A., M.G. Keane, y J. Stock, *Multiple forms of the CheB methylesterase in bacterial chemosensing*. J Biol Chem, 1985. 260(18): p. 10161-8.
54. Welch, M., K. Oosawa, S. Aizawa, y M. Eisenbach, *Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(19): p. 8787-91.
55. Perego, M., *Kinase-phosphatase competition regulates Bacillus subtilis development*. Trends Microbiol, 1998. 6(9): p. 366-70.
56. Perego, M., *A new family of aspartyl phosphate phosphatases targeting the sporulation transcription factor Spo0A of Bacillus subtilis*. Mol Microbiol, 2001. 42(1): p. 133-43.
57. Russo, F.D. y T.J. Silhavy, *The essential tension: opposed reactions in bacterial two-component regulatory systems*. Trends Microbiol, 1993. 1(8): p. 306-10.
58. Perego, M. y J.A. Hoch, *Protein aspartate phosphatases control the output of two-component signal transduction systems*. Trends Genet, 1996. 12(3): p. 97-101.
59. Georgellis, D., O. Kwon, P. De Wulf, y E.C. Lin, *Signal decay through a reverse phosphorelay in the Arc two-component signal transduction system*. J Biol Chem, 1998. 273(49): p. 32864-9.
60. Pena-Sandoval, G.R., O. Kwon, y D. Georgellis, *Requirement of the Receiver and Phosphotransfer Domains of ArcB for Efficient Dephosphorylation of Phosphorylated ArcA In Vivo*. J Bacteriol, 2005. 187(9): p. 3267-72.

61. Hsing, W., F.D. Russo, K.K. Bernd, y T.J. Silhavy, *Mutations that alter the kinase and phosphatase activities of the two-component sensor EnvZ*. J Bacteriol, 1998. 180(17): p. 4538-46.
62. Lukat, G.S., W.R. McCleary, A.M. Stock, y J.B. Stock, *Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(2): p. 718-22.
63. McCleary, W.R. y J.B. Stock, *Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators*. J Biol Chem, 1994. 269(50): p. 31567-72.
64. Pernestig, A.K., O. Melefors, y D. Georgellis, *Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in Escherichia coli*. J Biol Chem, 2001. 276(1): p. 225-31.
65. Pernestig, A.K., D. Georgellis, T. Romeo, K. Suzuki, H. Tomenius, S. Normark, y O. Melefors, *The Escherichia coli BarA-UvrY two-component system is needed for efficient switching between glycolytic and gluconeogenic carbon sources*. J Bacteriol, 2003. 185(3): p. 843-53.
66. Nagasawa, S., S. Tokishita, H. Aiba, y T. Mizuno, *A novel sensor-regulator protein that belongs to the homologous family of signal-transduction proteins involved in adaptive responses in Escherichia coli*. Mol Microbiol, 1992. 6(6): p. 799-807.
67. Bijlsma, J.J. y E.A. Groisman, *Making informed decisions: regulatory interactions between two-component systems*. Trends Microbiol, 2003. 11(8): p. 359-66.
68. Sahu, S.N., S. Acharya, H. Tuminaro, I. Patel, K. Dudley, J.E. LeClerc, T.A. Cebula, y S. Mukhopadhyay, *The bacterial adaptive response gene, barA, encodes a novel conserved histidine kinase regulatory switch for adaptation and modulation of metabolism in Escherichia coli*. Mol Cell Biochem, 2003. 253(1-2): p. 167-77.
69. Zhang, J.P. y S. Normark, *Induction of gene expression in Escherichia coli after pilus-mediated adherence*. Science, 1996. 273(5279): p. 1234-6.
70. Moolenaar, G.F., C.A. van Sluis, C. Backendorf, y P. van de Putte, *Regulation of the Escherichia coli excision repair gene uvrC. Overlap between the uvrC structural gene and the region coding for a 24 kD protein*. Nucleic Acids Res, 1987. 15(10): p. 4273-89.
71. Weilbacher, T., K. Suzuki, A.K. Dubey, X. Wang, S. Gudapaty, I. Morozov, C.S. Baker, D. Georgellis, P. Babitzke, y T. Romeo, *A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of Escherichia coli*. Mol Microbiol, 2003. 48(3): p. 657-70.
72. Liu, M.Y., G. Gui, B. Wei, J.F. Preston, 3rd, L. Oakford, U. Yuksel, D.P. Giedroc, y T. Romeo, *The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in Escherichia coli*. J Biol Chem, 1997. 272(28): p. 17502-10.
73. Liu, M.Y. y T. Romeo, *The global regulator CsrA of Escherichia coli is a specific mRNA-binding protein*. J Bacteriol, 1997. 179(14): p. 4639-42.
74. Suzuki, K., X. Wang, T. Weilbacher, A.K. Pernestig, O. Melefors, D. Georgellis, P. Babitzke, y T. Romeo, *Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of Escherichia coli*. J Bacteriol, 2002. 184(18): p. 5130-40.
75. Ishihama, A., *Functional modulation of Escherichia coli RNA polymerase*. Annu Rev Microbiol, 2000. 54: p. 499-518.
76. Hengge-Aronis, R., *Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase*. Microbiol Mol Biol Rev, 2002. 66(3): p. 373-95, table of contents.
77. Mukhopadhyay, S., J.P. Audia, R.N. Roy, y H.E. Schellhorn, *Transcriptional induction of the conserved alternative sigma factor RpoS in Escherichia coli is dependent on BarA, a probable two-component regulator*. Mol Microbiol, 2000. 37(2): p. 371-81.
78. Oshima, T., H. Aiba, Y. Masuda, S. Kanaya, M. Sugiura, B.L. Wanner, H. Mori, y T. Mizuno, *Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of Escherichia coli K-12*. Mol Microbiol, 2002. 46(1): p. 281-91.

79. Wei, B.L., A.M. Brun-Zinkernagel, J.W. Simecka, B.M. Pruss, P. Babitzke, y T. Romeo, *Positive regulation of motility and flhDC expression by the RNA-binding protein CsrA of Escherichia coli*. Mol Microbiol, 2001. 40(1): p. 245-56.
80. Baker, C.S., I. Morozov, K. Suzuki, T. Romeo, y P. Babitzke, *CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of glgC in Escherichia coli*. Mol Microbiol, 2002. 44(6): p. 1599-610.
81. Wei, B., S. Shin, D. LaPorte, A.J. Wolfe, y T. Romeo, *Global regulatory mutations in csrA and rpoS cause severe central carbon stress in Escherichia coli in the presence of acetate*. J Bacteriol, 2000. 182(6): p. 1632-40.
82. Romeo, T., *Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB*. Mol Microbiol, 1998. 29(6): p. 1321-30.
83. Gudapaty, S., K. Suzuki, X. Wang, P. Babitzke, y T. Romeo, *Regulatory interactions of Csr components: the RNA binding protein CsrA activates csrB transcription in Escherichia coli*. J Bacteriol, 2001. 183(20): p. 6017-27.
84. Argaman, L., R. Hershberg, J. Vogel, G. Bejerano, E.G. Wagner, H. Margalit, y S. Altuvia, *Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of Escherichia coli*. Curr Biol, 2001. 11(12): p. 941-50.
85. Wei, Y., J.M. Lee, D.R. Smulski, y R.A. LaRossa, *Global impact of sdiA amplification revealed by comprehensive gene expression profiling of Escherichia coli*. J Bacteriol, 2001. 183(7): p. 2265-72.
86. Hrabak, E.M. y D.K. Willis, *The lemA gene required for pathogenicity of Pseudomonas syringae pv. syringae on bean is a member of a family of two-component regulators*. J Bacteriol, 1992. 174(9): p. 3011-20.
87. Laville, J., C. Voisard, C. Keel, M. Maurhofer, G. Defago, y D. Haas, *Global control in Pseudomonas fluorescens mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(5): p. 1562-6.
88. Rich, J.J., T.G. Kinscherf, T. Kitten, y D.K. Willis, *Genetic evidence that the gacA gene encodes the cognate response regulator for the lemA sensor in Pseudomonas syringae*. J Bacteriol, 1994. 176(24): p. 7468-75.
89. Heeb, S. y D. Haas, *Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria*. Mol Plant Microbe Interact, 2001. 14(12): p. 1351-63.
90. Johnston, C., D.A. Pegues, C.J. Hueck, A. Lee, y S.I. Miller, *Transcriptional activation of Salmonella typhimurium invasion genes by a member of the phosphorylated response-regulator superfamily*. Mol Microbiol, 1996. 22(4): p. 715-27.
91. Ahmer, B.M., J. van Reeuwijk, P.R. Watson, T.S. Wallis, y F. Heffron, *Salmonella SirA is a global regulator of genes mediating enteropathogenesis*. Mol Microbiol, 1999. 31(3): p. 971-82.
92. Teplitski, M., R.I. Goodier, y B.M. Ahmer, *Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in Salmonella*. J Bacteriol, 2003. 185(24): p. 7257-65.
93. Zhang, S., R.A. Kingsley, R.L. Santos, H. Andrews-Polymenis, M. Raffatellu, J. Figueiredo, J. Nunes, R.M. Tsolis, L.G. Adams, y A.J. Baumler, *Molecular pathogenesis of Salmonella enterica serotype typhimurium-induced diarrhea*. Infect Immun, 2003. 71(1): p. 1-12.
94. Goodier, R.I. y B.M. Ahmer, *SirA orthologs affect both motility and virulence*. J Bacteriol, 2001. 183(7): p. 2249-58.
95. Eriksson, A.R., R.A. Andersson, M. Pirhonen, y E.T. Palva, *Two-component regulators involved in the global control of virulence in Erwinia carotovora subsp. carotovora*. Mol Plant Microbe Interact, 1998. 11(8): p. 743-52.
96. Frederick, R.D., J. Chiu, J.L. Bennetzen, y A.K. Handa, *Identification of a pathogenicity locus, rpfA, in Erwinia carotovora subsp. carotovora that encodes a two-component sensor-regulator protein*. Mol Plant Microbe Interact, 1997. 10(3): p. 407-15.



97. Wong, S.M., P.A. Carroll, L.G. Rahme, F.M. Ausubel, y S.B. Calderwood, *Modulation of expression of the ToxR regulon in Vibrio cholerae by a member of the two-component family of response regulators*. Infect Immun, 1998. 66(12): p. 5854-61.
98. Castaneda, M., J. Guzman, S. Moreno, y G. Espin, *The GacS sensor kinase regulates alginate and poly-beta-hydroxybutyrate production in Azotobacter vinelandii*. J Bacteriol, 2000. 182(9): p. 2624-8.
99. Castaneda, M., J. Sanchez, S. Moreno, C. Nunez, y G. Espin, *The global regulators GacA and sigma(S) form part of a cascade that controls alginate production in Azotobacter vinelandii*. J Bacteriol, 2001. 183(23): p. 6787-93.
100. Kinscherf, T.G. y D.K. Willis, *Swarming by Pseudomonas syringae B728a requires gacS (lemA) and gacA but not the acyl-homoserine lactone biosynthetic gene ahII*. J Bacteriol, 1999. 181(13): p. 4133-6.
101. Heurlier, K., F. Williams, S. Heeb, C. Dormond, G. Pessi, D. Singer, M. Camara, P. Williams, y D. Haas, *Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in Pseudomonas aeruginosa PAOI*. J Bacteriol, 2004. 186(10): p. 2936-45.
102. Reimmann, C., M. Beyeler, A. Latifi, H. Winteler, M. Foglino, A. Lazdunski, y D. Haas, *The global activator GacA of Pseudomonas aeruginosa PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase*. Mol Microbiol, 1997. 24(2): p. 309-19.
103. Chancey, S.T., D.W. Wood, y L.S. Pierson, 3rd, *Two-component transcriptional regulation of N-acyl-homoserine lactone production in Pseudomonas aureofaciens*. Appl Environ Microbiol, 1999. 65(6): p. 2294-9.
104. Kitten, T., T.G. Kinscherf, J.L. McEvoy, y D.K. Willis, *A newly identified regulator is required for virulence and toxin production in Pseudomonas syringae*. Mol Microbiol, 1998. 28(5): p. 917-29.
105. Pessi, G. y D. Haas, *Dual control of hydrogen cyanide biosynthesis by the global activator GacA in Pseudomonas aeruginosa PAOI*. FEMS Microbiol Lett, 2001. 200(1): p. 73-8.
106. Venturi, V., *Control of rpoS transcription in Escherichia coli and Pseudomonas: why so different?* Mol Microbiol, 2003. 49(1): p. 1-9.
107. Latifi, A., M. Foglino, K. Tanaka, P. Williams, y A. Lazdunski, *A hierarchical quorum-sensing cascade in Pseudomonas aeruginosa links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS*. Mol Microbiol, 1996. 21(6): p. 1137-46.
108. de Kievit, T.R. y B.H. Iglewski, *Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships*. Infect Immun, 2000. 68(9): p. 4839-49.
109. Parkins, M.D., H. Ceri, y D.G. Storey, *Pseudomonas aeruginosa GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation*. Mol Microbiol, 2001. 40(5): p. 1215-26.
110. Aarons, S., A. Abbas, C. Adams, A. Fenton, y F. O'Gara, *A regulatory RNA (PrrB RNA) modulates expression of secondary metabolite genes in Pseudomonas fluorescens F113*. J Bacteriol, 2000. 182(14): p. 3913-9.
111. Heeb, S., C. Blumer, y D. Haas, *Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in Pseudomonas fluorescens CHA0*. J Bacteriol, 2002. 184(4): p. 1046-56.
112. Liu, Y., Y. Cui, A. Mukherjee, y A.K. Chatterjee, *Characterization of a novel RNA regulator of Erwinia carotovora ssp. carotovora that controls production of extracellular enzymes and secondary metabolites*. Mol Microbiol, 1998. 29(1): p. 219-34.
113. Valverde, C., S. Heeb, C. Keel, y D. Haas, *RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in Pseudomonas fluorescens CHA0*. Mol Microbiol, 2003. 50(4): p. 1361-79.

114. Blumer, C., S. Heeb, G. Pessi, y D. Haas, *Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in Pseudomonas fluorescens involves specific ribosome binding sites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(24): p. 14073-8.
115. Miller, M.B. y B.L. Bassler, *Quorum sensing in bacteria*. Annu Rev Microbiol, 2001. 55: p. 165-99.
116. Ren, D., L.A. Bedzyk, R.W. Ye, S.M. Thomas, y T.K. Wood, *Stationary-phase quorum-sensing signals affect autoinducer-2 and gene expression in Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol, 2004. 70(4): p. 2038-43.
117. Swift, S., J.A. Downie, N.A. Whitehead, A.M. Barnard, G.P. Salmond, y P. Williams, *Quorum sensing as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology*. Adv Microb Physiol, 2001. 45: p. 199-270.
118. Visick, K.L., J. Foster, J. Doino, M. McFall-Ngai, y E.G. Ruby, *Vibrio fischeri lux genes play an important role in colonization and development of the host light organ*. J Bacteriol, 2000. 182(16): p. 4578-86.
119. Hanzelka, B.L. y E.P. Greenberg, *Quorum sensing in Vibrio fischeri: evidence that S-adenosylmethionine is the amino acid substrate for autoinducer synthesis*. J Bacteriol, 1996. 178(17): p. 5291-4.
120. Schaefer, A.L., D.L. Val, B.L. Hanzelka, J.E. Cronan, Jr., y E.P. Greenberg, *Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified Vibrio fischeri LuxI protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(18): p. 9505-9.
121. Chen, X., S. Schauder, N. Potier, A. Van Dorsselaer, I. Pelczer, B.L. Bassler, y F.M. Hughson, *Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron*. Nature, 2002. 415(6871): p. 545-9.
122. Winzer, K., K.R. Hardie, y P. Williams, *Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now - gone to lunch!* Curr Opin Microbiol, 2002. 5(2): p. 216-22.
123. DeLisa, M.P., C.F. Wu, L. Wang, J.J. Valdes, y W.E. Bentley, *DNA microarray-based identification of genes controlled by autoinducer 2-stimulated quorum sensing in Escherichia coli*. J Bacteriol, 2001. 183(18): p. 5239-47.
124. Bassler, B.L., *Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria*. Cell, 2002. 109(4): p. 421-4.
125. Winzer, K., K.R. Hardie, N. Burgess, N. Doherty, D. Kirke, M.T. Holden, R. Linforth, K.A. Cornell, A.J. Taylor, P.J. Hill, y P. Williams, *LuxS: its role in central metabolism and the in vitro synthesis of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone*. Microbiology, 2002. 148(Pt 4): p. 909-22.
126. Coulthurst, S.J., N.A. Whitehead, M. Welch, y G.P. Salmond, *Can boron get bacteria talking?* Trends Biochem Sci, 2002. 27(5): p. 217-9.
127. Ahmer, B.M., J. van Reeuwijk, C.D. Timmers, P.J. Valentine, y F. Heffron, *Salmonella typhimurium encodes an SdiA homolog, a putative quorum sensor of the LuxR family, that regulates genes on the virulence plasmid*. J Bacteriol, 1998. 180(5): p. 1185-93.
128. Surette, M.G. y B.L. Bassler, *Quorum sensing in Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(12): p. 7046-50.
129. Taga, M.E., J.L. Semmelhack, y B.L. Bassler, *The LuxS-dependent autoinducer AI-2 controls the expression of an ABC transporter that functions in AI-2 uptake in Salmonella typhimurium*. Mol Microbiol, 2001. 42(3): p. 777-93.
130. Hardie, K.R., C. Cooksley, A.D. Green, y K. Winzer, *Autoinducer 2 activity in Escherichia coli culture supernatants can be actively reduced despite maintenance of an active synthase, LuxS*. Microbiology, 2003. 149(Pt 3): p. 715-28.
131. Xavier, K.B. y B.L. Bassler, *Regulation of uptake and processing of the quorum-sensing autoinducer AI-2 in Escherichia coli*. J Bacteriol, 2005. 187(1): p. 238-48.
132. Bassler, B.L., *How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing*. Curr Opin Microbiol, 1999. 2(6): p. 582-7.

133. Sperandio, V., A.G. Torres, J.A. Giron, y J.B. Kaper, *Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7*. J Bacteriol, 2001. 183(17): p. 5187-97.
134. Wang, X.D., P.A. de Boer, y L.I. Rothfield, *A factor that positively regulates cell division by activating transcription of the major cluster of essential cell division genes of Escherichia coli*. Embo J, 1991. 10(11): p. 3363-72.
135. Giron, J.A., A.G. Torres, E. Freer, y J.B. Kaper, *The flagella of enteropathogenic Escherichia coli mediate adherence to epithelial cells*. Mol Microbiol, 2002. 44(2): p. 361-79.
136. Ren, D., L.A. Bedzyk, R.W. Ye, S.M. Thomas, y T.K. Wood, *Differential gene expression shows natural brominated furanones interfere with the autoinducer-2 bacterial signaling system of Escherichia coli*. Biotechnol Bioeng, 2004. 88(5): p. 630-42.
137. Ahmer, B.M., *Cell-to-cell signalling in Escherichia coli and Salmonella enterica*. Mol Microbiol, 2004. 52(4): p. 933-45.
138. Winzer, K., K.R. Hardie, y P. Williams, *LuxS and autoinducer-2: their contribution to quorum sensing and metabolism in bacteria*. Adv Appl Microbiol, 2003. 53: p. 291-396.
139. Michael, B., J.N. Smith, S. Swift, F. Heffron, y B.M. Ahmer, *SdiA of Salmonella enterica is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities*. J Bacteriol, 2001. 183(19): p. 5733-42.
140. Garcia-Lara, J., L.H. Shang, y L.I. Rothfield, *An extracellular factor regulates expression of sdiA, a transcriptional activator of cell division genes in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1996. 178(10): p. 2742-8.
141. Kanamaru, K., I. Tatsuno, T. Tobe, y C. Sasakawa, *Regulation of virulence factors of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 by self-produced extracellular factors*. Biosci Biotechnol Biochem, 2000. 64(11): p. 2508-11.
142. Kanamaru, K., I. Tatsuno, T. Tobe, y C. Sasakawa, *SdiA, an Escherichia coli homologue of quorum-sensing regulators, controls the expression of virulence factors in enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7*. Mol Microbiol, 2000. 38(4): p. 805-16.
143. Rhodius, V.A. y R.A. LaRossa, *Uses and pitfalls of microarrays for studying transcriptional regulation*. Curr Opin Microbiol, 2003. 6(2): p. 114-9.
144. Liu, X. y P. De Wulf, *Probing the ArcA-P modulon of Escherichia coli by whole genome transcriptional analysis and sequence recognition profiling*. J Biol Chem, 2004. 279(13): p. 12588-97.
145. Richmond, C.S., J.D. Glasner, R. Mau, H. Jin, y F.R. Blattner, *Genome-wide expression profiling in Escherichia coli K-12*. Nucleic Acids Res, 1999. 27(19): p. 3821-35.
146. Patten, C.L., M.G. Kirchhof, M.R. Schertzberg, R.A. Morton, y H.E. Schellhorn, *Microarray analysis of RpoS-mediated gene expression in Escherichia coli K-12*. Mol Genet Genomics, 2004. 272(5): p. 580-91.
147. Maurer, L.M., E. Yohannes, S.S. Bondurant, M. Radmacher, y J.L. Slonczewski, *pH regulates genes for flagellar motility, catabolism, and oxidative stress in Escherichia coli K-12*. J Bacteriol, 2005. 187(1): p. 304-19.
148. Masuda, N. y G.M. Church, *Escherichia coli gene expression responsive to levels of the response regulator EvgA*. J Bacteriol, 2002. 184(22): p. 6225-34.
149. Tao, H., C. Bausch, C. Richmond, F.R. Blattner, y T. Conway, *Functional genomics: expression analysis of Escherichia coli growing on minimal and rich media*. J Bacteriol, 1999. 181(20): p. 6425-40.
150. Zimmer, D.P., E. Soupene, H.L. Lee, V.F. Wendisch, A.B. Khodursky, B.J. Peter, R.A. Bender, y S. Kustu, *Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of Escherichia coli: scavenging as a defense against nitrogen limitation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(26): p. 14674-9.
151. Wei, Y., J.M. Lee, C. Richmond, F.R. Blattner, J.A. Rafalski, y R.A. LaRossa, *High-density microarray-mediated gene expression profiling of Escherichia coli*. J Bacteriol, 2001. 183(2): p. 545-56.

152. Miller, J.H., *Experiments in Molecular Genetics*. 1972, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, N.Y. 352-355.
153. Lynch, A.S. y E.C. Lin, *Transcriptional control mediated by the ArcA two-component response regulator protein of Escherichia coli: characterization of DNA binding at target promoters*. J Bacteriol, 1996. 178(21): p. 6238-49.
154. Stadtman, E.R., *Preparation and assay of acetyl phosphate*. Methods Enzymol, 1957. 3: p. 228-231.
155. Sambrook y Russell, *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. 3 ed ed. 2001, Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Press.
156. Molloy, P.L., *Electrophoretic mobility shift assays*. Methods Mol Biol, 2000. 130: p. 235-46.
157. Emory, S.A. y J.G. Belasco, *The ompA 5' untranslated RNA segment functions in Escherichia coli as a growth-rate-regulated mRNA stabilizer whose activity is unrelated to translational efficiency*. J Bacteriol, 1990. 172(8): p. 4472-81.
158. Eisen, M.B., P.T. Spellman, P.O. Brown, y D. Botstein, *Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(25): p. 14863-8.
159. Blattner, F.R., G. Plunkett, 3rd, C.A. Bloch, N.T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J.D. Glasner, C.K. Rode, G.F. Mayhew, J. Gregor, N.W. Davis, H.A. Kirkpatrick, M.A. Goeden, D.J. Rose, B. Mau, y Y. Shao, *The complete genome sequence of Escherichia coli K-12*. Science, 1997. 277(5331): p. 1453-74.
160. Sperandio, V., A.G. Torres, B. Jarvis, J.P. Nataro, y J.B. Kaper, *Bacteria-host communication: the language of hormones*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(15): p. 8951-6.
161. Nystrom, T., *Stationary-phase physiology*. Annu Rev Microbiol, 2004. 58: p. 161-81.
162. Snyder, L. y W. Champness, *Molecular Genetics of Bacteria*. 1997, Washington D.C.: ASM Press.
163. Paul, B.J., W. Ross, T. Gaal, y R.L. Gourse, *rRNA transcription in Escherichia coli*. Annu Rev Genet, 2004. 38: p. 749-70.
164. Blumer, C. y D. Haas, *Multicopy suppression of a gacA mutation by the infC operon in Pseudomonas fluorescens CHA0: competition with the global translational regulator RsmA*. FEMS Microbiol Lett, 2000. 187(1): p. 53-8.
165. Castanie-Cornet, M.P. y J.W. Foster, *Escherichia coli acid resistance: cAMP receptor protein and a 20 bp cis-acting sequence control pH and stationary phase expression of the gadA and gadBC glutamate decarboxylase genes*. Microbiology, 2001. 147(Pt 3): p. 709-15.
166. Lin, J., I.S. Lee, J. Frey, J.L. Slonczewski, y J.W. Foster, *Comparative analysis of extreme acid survival in Salmonella typhimurium, Shigella flexneri, and Escherichia coli*. J Bacteriol, 1995. 177(14): p. 4097-104.
167. Castanie-Cornet, M.P., T.A. Penfound, D. Smith, J.F. Elliott, y J.W. Foster, *Control of acid resistance in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1999. 181(11): p. 3525-35.
168. De Biase, D., A. Tramonti, F. Bossa, y P. Visca, *The response to stationary-phase stress conditions in Escherichia coli: role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system*. Mol Microbiol, 1999. 32(6): p. 1198-211.
169. Ma, Z., H. Richard, D.L. Tucker, T. Conway, y J.W. Foster, *Collaborative regulation of Escherichia coli glutamate-dependent acid resistance by two AraC-like regulators, GadX and GadW (YhiW)*. J Bacteriol, 2002. 184(24): p. 7001-12.
170. Tramonti, A., P. Visca, M. De Canio, M. Falconi, y D. De Biase, *Functional characterization and regulation of gadX, a gene encoding an AraC/XylS-like transcriptional activator of the Escherichia coli glutamic acid decarboxylase system*. J Bacteriol, 2002. 184(10): p. 2603-13.
171. Foster, J.W., *Escherichia coli acid resistance: tales of an amateur acidophile*. Nat Rev Microbiol, 2004. 2(11): p. 898-907.
172. Waterman, S.R. y P.L. Small, *Transcriptional expression of Escherichia coli glutamate-dependent acid resistance genes gadA and gadBC in an hns rpoS mutant*. J Bacteriol, 2003. 185(15): p. 4644-7.



173. Ma, Z., S. Gong, H. Richard, D.L. Tucker, T. Conway, y J.W. Foster, *GadE (YhiE) activates glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in Escherichia coli K-12*. Mol Microbiol, 2003. 49(5): p. 1309-20.
174. Opdyke, J.A., J.G. Kang, y G. Storz, *GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in Escherichia coli*. J Bacteriol, 2004. 186(20): p. 6698-705.
175. Ma, Z., H. Richard, y J.W. Foster, *pH-Dependent modulation of cyclic AMP levels and GadW-dependent repression of RpoS affect synthesis of the GadX regulator and Escherichia coli acid resistance*. J Bacteriol, 2003. 185(23): p. 6852-9.
176. Richard, H. y J.W. Foster, *Escherichia coli glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential*. J Bacteriol, 2004. 186(18): p. 6032-41.
177. Iyer, R., T.M. Iverson, A. Accardi, y C. Miller, *A biological role for prokaryotic ClC chloride channels*. Nature, 2002. 419(6908): p. 715-8.
178. Bochner, B.R., P. Gadzinski, y E. Panomitros, *Phenotype microarrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function*. Genome Res, 2001. 11(7): p. 1246-55.
179. Bochner, B.R., *New technologies to assess genotype-phenotype relationships*. Nat Rev Genet, 2003. 4(4): p. 309-14.
180. Zhou, L., X.H. Lei, B.R. Bochner, y B.L. Wanner, *Phenotype microarray analysis of Escherichia coli K-12 mutants with deletions of all two-component systems*. J Bacteriol, 2003. 185(16): p. 4956-72.
181. Webster, C., K. Gaston, y S. Busby, *Transcription from the Escherichia coli melR promoter is dependent on the cyclic AMP receptor protein*. Gene, 1988. 68(2): p. 297-305.
182. Webster, C., L. Gardner, y S. Busby, *The Escherichia coli melR gene encodes a DNA-binding protein with affinity for specific sequences located in the melibiose-operon regulatory region*. Gene, 1989. 83(2): p. 207-13.
183. Klein, A., A. Eisenstadt, J. Eisenstadt, y P. Lengyel, *Inhibition of peptide-chain initiation in Escherichia coli by hydroxylamine and effects on ribonucleic acid synthesis*. Biochemistry, 1970. 9(23): p. 4542-9.
184. Nixon, P.F. y J.R. Bertino, *Inhibition of peptide chain initiation in Escherichia coli by hydroxylamine. Reaction of hydroxylamine with folate coenzymes*. Biochemistry, 1970. 9(25): p. 4833-8.
185. Whiteway, J., P. Koziarz, J. Veall, N. Sandhu, P. Kumar, B. Hoecher, y I.B. Lambert, *Oxygen-insensitive nitroreductases: analysis of the roles of nfsA and nfsB in development of resistance to 5-nitrofurantoin derivatives in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1998. 180(21): p. 5529-39.
186. Zenno, S., H. Koike, A.N. Kumar, R. Jayaraman, M. Tanokura, y K. Saigo, *Biochemical characterization of NfsA, the Escherichia coli major nitroreductase exhibiting a high amino acid sequence homology to Frp, a Vibrio harveyi flavin oxidoreductase*. J Bacteriol, 1996. 178(15): p. 4508-14.
187. Bryant, D.W., D.R. McCalla, M. Leeksa, y P. Laneuville, *Type I nitroreductases of Escherichia coli*. Can J Microbiol, 1981. 27(1): p. 81-6.
188. Zenno, S., H. Koike, M. Tanokura, y K. Saigo, *Gene cloning, purification, and characterization of NfsB, a minor oxygen-insensitive nitroreductase from Escherichia coli, similar in biochemical properties to FRase I, the major flavin reductase in Vibrio fischeri*. J Biochem (Tokyo), 1996. 120(4): p. 736-44.
189. Michael, N.P., J.K. Brehm, G.M. Anlezark, y N.P. Minton, *Physical characterisation of the Escherichia coli B gene encoding nitroreductase and its over-expression in Escherichia coli K12*. FEMS Microbiol Lett, 1994. 124(2): p. 195-202.
190. Evans, M.E., D.J. Feola, y R.P. Rapp, *Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria*. Ann Pharmacother, 1999. 33(9): p. 960-7.
191. Raetz, C.R. y C. Whitfield, *Lipopolysaccharide endotoxins*. Annu Rev Biochem, 2002. 71: p. 635-700.

192. Gunn, J.S., K.B. Lim, J. Krueger, K. Kim, L. Guo, M. Hackett, y S.I. Miller, *PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance*. Mol Microbiol, 1998. 27(6): p. 1171-82.
193. Gunn, J.S., S.S. Ryan, J.C. Van Velkinburgh, R.K. Ernst, y S.I. Miller, *Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of Salmonella enterica serovar typhimurium*. Infect Immun, 2000. 68(11): p. 6139-46.
194. Guo, L., K.B. Lim, C.M. Poduje, M. Daniel, J.S. Gunn, M. Hackett, y S.I. Miller, *Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides*. Cell, 1998. 95(2): p. 189-98.
195. Tanamoto, K. y S. Azumi, *Salmonella-type heptaacylated lipid A is inactive and acts as an antagonist of lipopolysaccharide action on human line cells*. J Immunol, 2000. 164(6): p. 3149-56.
196. Vaara, M., *Agents that increase the permeability of the outer membrane*. Microbiol Rev, 1992. 56(3): p. 395-411.
197. Vaara, M., T. Vaara, M. Jensen, I. Helander, M. Nurminen, E.T. Rietschel, y P.H. Makela, *Characterization of the lipopolysaccharide from the polymyxin-resistant pmrA mutants of Salmonella typhimurium*. FEBS Lett, 1981. 129(1): p. 145-9.
198. Helander, I.M., I. Kilpelainen, y M. Vaara, *Increased substitution of phosphate groups in lipopolysaccharides and lipid A of the polymyxin-resistant pmrA mutants of Salmonella typhimurium: a 31P-NMR study*. Mol Microbiol, 1994. 11(3): p. 481-7.
199. Soncini, F.C. y E.A. Groisman, *Two-component regulatory systems can interact to process multiple environmental signals*. J Bacteriol, 1996. 178(23): p. 6796-801.
200. Kox, L.F., M.M. Wosten, y E.A. Groisman, *A small protein that mediates the activation of a two-component system by another two-component system*. Embo J, 2000. 19(8): p. 1861-72.
201. Groisman, E.A., J. Kayser, y F.C. Soncini, *Regulation of polymyxin resistance and adaptation to low-Mg<sup>2+</sup> environments*. J Bacteriol, 1997. 179(22): p. 7040-5.
202. Guina, T., E.C. Yi, H. Wang, M. Hackett, y S.I. Miller, *A PhoP-regulated outer membrane protease of Salmonella enterica serovar typhimurium promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides*. J Bacteriol, 2000. 182(14): p. 4077-86.
203. Breazeale, S.D., A.A. Ribeiro, y C.R. Raetz, *Oxidative decarboxylation of UDP-glucuronic acid in extracts of polymyxin-resistant Escherichia coli. Origin of lipid a species modified with 4-amino-4-deoxy-L-arabinose*. J Biol Chem, 2002. 277(4): p. 2886-96.
204. Trent, M.S., A.A. Ribeiro, W.T. Doerrler, S. Lin, R.J. Cotter, y C.R. Raetz, *Accumulation of a polyisoprene-linked amino sugar in polymyxin-resistant Salmonella typhimurium and Escherichia coli: structural characterization and transfer to lipid A in the periplasm*. J Biol Chem, 2001. 276(46): p. 43132-44.
205. Lee, H., F.F. Hsu, J. Turk, y E.A. Groisman, *The PmrA-regulated pmrC gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in Salmonella enterica*. J Bacteriol, 2004. 186(13): p. 4124-33.
206. Zhou, Z., S. Lin, R.J. Cotter, y C.R. Raetz, *Lipid A modifications characteristic of Salmonella typhimurium are induced by NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub> in Escherichia coli K12. Detection of 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, phosphoethanolamine and palmitate*. J Biol Chem, 1999. 274(26): p. 18503-14.
207. Nummila, K., I. Kilpelainen, U. Zahringer, M. Vaara, y I.M. Helander, *Lipopolysaccharides of polymyxin B-resistant mutants of Escherichia coli are extensively substituted by 2-aminoethyl pyrophosphate and contain aminoarabinose in lipid A*. Mol Microbiol, 1995. 16(2): p. 271-8.
208. Winfield, M.D. y E.A. Groisman, *Phenotypic differences between Salmonella and Escherichia coli resulting from the disparate regulation of homologous genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(49): p. 17162-7.
209. Rosenberg, E.Y., D. Ma, y H. Nikaido, *AcrD of Escherichia coli is an aminoglycoside efflux pump*. J Bacteriol, 2000. 182(6): p. 1754-6.

210. Prizant, E. y M. Kogut, *In vivo and in vitro binding of dihydrostreptomycin to Escherichia coli ribosomes*. FEBS Lett, 1975. 50(1): p. 37-42.
211. Taber, H.W., J.P. Mueller, P.F. Miller, y A.S. Arrow, *Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics*. Microbiol Rev, 1987. 51(4): p. 439-57.
212. Damper, P.D. y W. Epstein, *Role of the membrane potential in bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics*. Antimicrob Agents Chemother, 1981. 20(6): p. 803-8.
213. Kashiwagi, K., M.H. Tshako, K. Sakata, T. Saisho, A. Igarashi, S.O. da Costa, y K. Igarashi, *Relationship between spontaneous aminoglycoside resistance in Escherichia coli and a decrease in oligopeptide binding protein*. J Bacteriol, 1998. 180(20): p. 5484-8.
214. Shin, D. y E.A. Groisman, *Signal-dependent binding of the response regulators PhoP and PmrA to their target promoters in vivo*. J Biol Chem, 2005. 280(6): p. 4089-94.
215. Grainger, D.C., T.W. Overton, N. Reppas, J.T. Wade, E. Tamai, J.L. Hobman, C. Constantinidou, K. Struhl, G. Church, y S.J. Busby, *Genomic studies with Escherichia coli MelR protein: applications of chromatin immunoprecipitation and microarrays*. J Bacteriol, 2004. 186(20): p. 6938-43.