



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
BIOQUÍMICAS  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA CELULAR Y BIOCATALISIS

Análisis preliminar de mutaciones ocurridas en genes reguladores  
seleccionadas durante evolución adaptativa por crecimiento rápido en  
glucosa, en una cepa de *Escherichia coli* carente del sistema PTS

T E S I S

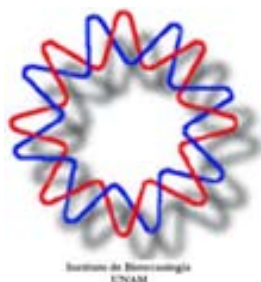
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Biol. César Augusto Aguilar Martínez

DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. Francisco Gonzalo Bolívar Zapata



2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

El presente trabajo se realizó en el departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Francisco Gonzalo Bolívar Zapata.

César Augusto Aguilar Martínez fue financiado económicamente por el CONACyT a través de su programa de becas de posgrado, así como por la Universidad Nacional Autónoma de México a través de su programa de becas “Fomento a la graduación 2009”



# Instituto de Biotecnología

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

## PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS


BIOL. CESAR AUGUSTO AGUILAR MARTINEZ  
P r e s e n t e.

Por este conducto me permito informarle que la Comisión Académica acordó asignarle el siguiente jurado de examen para obtener el grado de Maestro en Ciencias.

Presidente	Dr.	Enrique Merino Perez
Secretario	Dr.	Ricardo Oropeza
Vocal	Dr.	Juan Miranda Ríos
Suplente	Dra.	Katy Juárez López
Suplente	Dr.	Francisco G. Bolívar Zapata

Sin más por el momento me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuernavaca, Mor., a 22 de octubre de 2009



Dr. Enrique Rudiño Piñera  
Coordinador de Docencia

En un plazo máximo de **tres semanas**, contados a partir del momento en que el sinodal designado oficialmente reciba la tesis, éste deberá dar su voto fundamentado por escrito, el cual será comunicado al comité académico. Si considera que le será imposible cumplir con esta obligación deberá indicarlo al alumno para ser sustituido de inmediato.



**Miembros del jurado:**

Dr. Enrique Merino Pérez (Presidente)

Dr. Ricardo Oropeza Navarro (Secretario)

Dr. Juan Miranda Ríos (Vocal)

Dra. Katy Juárez López (Suplente)

Dr. Francisco Gonzalo Bolívar Zapata (Suplente)

Aprende de los fuertes, de los valientes, de los audaces; imita a los enérgicos, a los vencedores, a quienes no aceptan situaciones, a quienes vencieron a pesar de todo..... Agradezco a mis padres, porque aprendí de ellos. A mi madre por sus consejos, su amor, su comprensión y su aplomo. A mi padre por sus esfuerzos, por su cariño y su nobleza.

A Hugo, porque mis logros son tuyos también..... A Tere, porque me hace recordar que necesito estar cerca y no claudicar. A Froy, Kris y Furby por ser un motor extra en mi vida.

A Andrea, por lograr en mí aquello que pensé había perdido; gracias por hacerme sentir vivo.

“Haz solo lo que amas y serás feliz; el que hace lo que ama está condenado al éxito, que llegará cuando deba llegar, porque lo que debe ser será y llegará naturalmente. No hagas nada por obligación ni por compromiso, sino por amor; entonces habrá plenitud, y en esa plenitud todo es posible y sin esfuerzo, porque te mueve la fuerza natural de la vida. Recuerda que dentro de ti hay una fuerza que todo puede hacerlo.”

Agradecimientos:

-Al Dr. Francisco Bolívar; por permitirme formar parte de su grupo de trabajo; por su confianza, por sus invaluable comentarios y consejos, por su tiempo, por sus llamadas de atención, y por su interés en la ciencia, mismo que logró transmitirme mediante el día a día dentro del laboratorio.

-Al Dr. Juan Carlos Sigala Alanis, quien sigue siendo parte importante en mi formación académica; muchas gracias por tus comentarios, por tus consejos. Te agradezco, por ser la persona que necesito en el momento adecuado, muchas gracias amigo; muchas gracias maestro.

-Al Dr. José Luis Puente, y la Dra. Guadalupe Espín que fueron parte importante para conducir a buen puerto este proyecto; agradezco por la disposición que siempre tuvieron, por sus comentarios siempre positivos, que me ayudaron a comprender que de lo negativo, siempre se puede rescatar algo.

-Al Dr. Guillermo Gosset, porque sus críticas durante los seminarios me hicieron darme cuenta de las fallas y de los aciertos cometidos, lo que me ayudo a saber que corregir y que aprovechar.

-Al Dr. Adelfo Escalante, porque es parte importantísima para que este laboratorio funcione de manera tan eficiente; fue parte importante en mi formación, siempre dispuesto, siempre amable, ayudando y respondiendo incluso la más básica de mis preguntas; muchas gracias.

-A Mercedes Enzaldo, porque es el motor principal en el laboratorio; siempre trabajando incansablemente; sin su ayuda, todos los proyectos del laboratorio tardarían el doble de tiempo en ser llevados a cabo.

-A Sonia Patricia Caro, por las molestias que le doy, por su amabilidad y el buen trato que siempre dá.

-A todos mis compañeros del laboratorio, porque somos un grupo unido, que trabaja en armonía y que pretende siempre dar lo mejor de cada quién.

-A Hanna, su gran ayuda y disposición al trabajo hicieron que mi formación y este proyecto fuera más sencillo.

-A Ofelia, Adriana, Ale, Eugenio, Joyce y Mariana, excelentes compañeros que hicieron más llevadero el trabajo dentro del laboratorio.

-A la Universidad Nacional Autónoma de México.

## Índice:

1.- Resumen.....	1
2.- Introducción.....	3
3.- Antecedentes.....	6
I.    Sistemas de dos componentes.....	7
II.   Proteínas sensoras cinasas.....	8
III.  Proteínas reguladoras de respuesta.....	10
IV.  Sistema de dos componentes BarA/UvrY.....	13
V.   Papel de BarA en la respuesta a estrés.....	14
VI.  El sistema de regulación global Csr.....	15
VII. Relación entre el sistema de dos componentes BarA/UvrY sobre el sistema de regulación global Csr....	19
VIII. Funcionamiento del modelo de regulación del sistema Csr y sus implicaciones biológicas.....	21
IX.  Factor sigma S (RpoS).....	22
X.   El sistema fosfoenolpiruvato: carbohidrato fosfotransferasa (PTS).....	24
XI.  Generación de cepas PTS <sup>-</sup> y PTS <sup>-</sup> Glc <sup>+</sup> (Operón <i>ptsHIcrr</i> ).....	27
XII. Caracterización de las cepas PTS <sup>-</sup> y PTS <sup>-</sup> Glc <sup>+</sup> .....	28
4.- Objetivo general.....	32
5.- Objetivos específicos.....	33
6.- Hipótesis.....	33
7.- Resultados.....	34
I.    Selección y resecuenciación de genes reguladores.....	34
II.   Análisis de las mutaciones.....	35
III.  Clonación de las versiones silvestres de los genes <i>barA</i> , <i>yjjU</i> y <i>rssA</i> .....	37
IV.  Inactivación de los genes <i>barA</i> , <i>yjjU</i> y <i>rssA</i> en la cepa PB11 y PB12.....	38
V.   Posible efecto de la mutación en <i>barA</i> sobre el circuito regulatorio CsrA/CsrB.....	39



VI.	Determinación de las $\mu$ 's en las cepas derivadas de PB11 y PB12 relacionadas con el gen <i>barA</i> .....	42
VII.	Determinación de las $\mu$ 's en las cepas derivadas de PB11 y PB12 relacionadas con el gen <i>yjjU</i> .....	45
VIII.	Determinación de las $\mu$ 's en las cepas derivadas de PB11 y PB12 relacionadas con el gen <i>rssA</i> .....	47
<b>8.-</b>	<b>Conclusiones</b> .....	<b>48</b>
<b>9.-</b>	<b>Perspectivas</b> .....	<b>53</b>
<b>10.-</b>	<b>Materiales y metodología experimental</b> .....	<b>55</b>
I.	Cepas utilizadas en este estudio.....	55
II.	Plásmidos utilizados en este estudio.....	55
III.	Determinación y análisis de mutaciones relevantes en el genoma de la cepa PB12.....	56
IV.	Resecuenciación de los genes <i>barA</i> , <i>yjjU</i> y <i>rssA</i> .....	56
V.	Construcción de los plásmidos con los genes <i>barA</i> , <i>yjjU</i> y <i>rssA</i> silvestres.....	58
VI.	Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	58
VII.	Caracterización de las cepas.....	59
VIII.	Procesamiento de los datos obtenidos en las cinéticas de crecimiento.....	59
IX.	Determinación de actividades de b-galactosidasa.....	60
X.	Método Datsenko & Wanner.....	62
<b>11.-</b>	<b>Referencias</b> .....	<b>63</b>

## **Índice de Figuras:**

**Figura 1.-** Esquema del metabolismo central de carbono donde se muestra la utilización del PEP por las distintas vías.

*Página 4*

**Figura 2.-** Estructura secundaria de las moléculas CsrB y CsrC donde se muestran las repeticiones de secuencias imperfectas.

*Página 17*

**Figura 3.-** Esquema de regulación entre los sistemas BarA/UvrY y Csr.

*Página 20*

**Figura 4.-** Modelo de regulación del sistema de regulación global Csr.

*Página 22*

**Figura 5.-** Sistema de fosfotransferasa (PTS).

*Página 25*

**Figura 6.-** Esquema del metabolismo de *Escherichia coli*, que muestra las estrategias utilizadas para una mayor disponibilidad de PEP en la célula. (Tomado y modificado de Kao, K., *et. al.* 2005).

*Página 26*

**Figura 7.-** Operón *ptsHIcrr*.

*Página 27*

**Figura 8.-** Dominios estructurales que conforman a la proteína BarA (Tomado de Pernesting, *et. al.* 2001).

*Página 36*

## **Índice de gráficas:**

**Gráfica 1.-** Crecimiento y actividad de  $\beta$ -galactosidasa, obtenidas en las cepas JM101 y JM101 $\Delta$ barA.  
*Página 41*

**Gráfica 2.-** Crecimiento y actividad de  $\beta$ -galactosidasa, obtenidas en las cepas PB11 y PB11 $\Delta$ barA.  
*Página 41*

**Gráfica 3.-** Crecimiento de la cepa PB12 y derivadas.  
*Página 41*

**Gráfica 4.-** Actividad de  $\beta$ -galactosidasa, obtenidas en las cepas PB12 y sus derivadas.  
*Página 42*

## **Índice de Tablas:**

**Tabla 1.-** Genes con mutaciones en la cepa PB12. Esta clasificación se hizo de acuerdo a su función tomando como referencia la base de datos de Ecocyc (<http://ecocyc.org>).

*Página 32*

**Tabla 2.-** Resultados de cinco genes que cambian en PB12 enviados por la empresa NimbleGen.

*Página 35*

**Tabla 3.-** Velocidades específicas de crecimiento de varias derivadas de PB12 que involucran al gen *barA*.

*Página 42*

**Tabla 4.-** Velocidades específicas de crecimiento de la cepa PB11 y su mutante en el gen *barA*.

*Página 43*

**Tabla 5.-** Velocidades específicas de crecimiento de varias derivadas de PB12 que involucran al gen *yjjU*.

*Página 46*

**Tabla 6.-** Velocidades específicas de crecimiento de la cepa PB11 y su mutante en el gen *yjjU*.

*Página 47*

**Tabla 7.-** Velocidades específicas de crecimiento de varias derivadas de PB12 que involucran al gen *rssA*.

*Página 47*

**Tabla 8.-** Velocidades específicas de crecimiento de la cepa PB11 y su mutante en el gen *yjjU*.

*Página 48*

**Tabla 9.-** Cepas de *E. coli* utilizadas en este estudio.

*Página 55*

**Tabla 10.-** Plásmidos utilizados en éste estudio.

*Página 55*

**Tabla 11.-** Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

*Página 57*

## Resumen:

El fosfoenolpiruvato (PEP) es precursor de varias moléculas importantes para la sociedad, pues algunos de los metabolitos generados a partir del PEP en el interior celular tienen un alto valor comercial. La disponibilidad intracelular de este precursor siempre ha estado muy controlada; actualmente la ingeniería de vías metabólicas ha logrado aumentar dicha disponibilidad eliminando en una cepa silvestre de *Escherichia coli* (JM101) el operón *ptsHlcr*, el cual codifica para el sistema de fosfotransferasa (PTS). Este sistema consume más del 50% del PEP originado por la glicólisis (Flores, N., *et. al* 2005). A partir de esta cepa PTS<sup>-</sup> denominada PB11, y por un proceso de presión selectiva por crecimiento rápido en glucosa, se generó la cepa PB12, la cual recuperó parcialmente la capacidad de asimilar glucosa (PTS<sup>-</sup> Glc<sup>+</sup>). Mediante la expresión en plásmido de genes clave (*aroG<sup>fb</sup>* y *tktA*) se logró redirigir parte del PEP no utilizado por PTS hacia la síntesis de compuestos aromáticos a partir de glucosa con alto rendimiento, en la cepa PB12 (Flores, S., *et. al.* 2002; Flores, N. *et. al* 2005). Se ha demostrado que la cepa PB12 sobreexpresa la mayoría de los genes de la vía glicolítica, además de genes involucrados en el metabolismo del ppGpp (Flores *et. al.* 2005, 2007 y 2008). Con el objetivo de conocer a detalle, los cambios surgidos durante el proceso de evolución que dio origen a esta cepa, se envió su ADN cromosomal a la compañía Nimblegen (empresa dedicada entre otras cosas a identificar cambios en genomas completos; [www.nimblegen.com](http://www.nimblegen.com)). Gracias a este estudio se encontraron varias mutaciones que surgieron en éste proceso, y entre ellas, tres mutaciones en genes implicados en la regulación génica (factores de transcripción). Una de estas mutaciones se generó en el gen *barA* que codifica para la proteína BarA, la cual es una proteína sensora cinasa miembro de un sistema de dos componentes (Pernestig A.K, *et. al.* 2001). Una segunda mutación fue encontrada en el gen *yjjU*, el cual se reporta que codifica para un presunto regulador transcripcional (Serres, M.H., *et. al.* 2001). La tercera mutación se originó en el gen *rssA* al cual no se le ha asignado todavía alguna función sin embargo, éste se encuentra en el mismo operón que el gen *rssB*, que, codifica para la proteína RssB, la cual facilita y regula la degradación del factor sigma S por la proteasa ClpXP durante

condiciones normales de crecimiento (Muffler, A., *et. al.* 1996a; Pratt, L.A. & Silhavy, T.J. 1996; Stüdemann, A. *et. al.* 2003).

Para identificar posibles efectos de estas tres mutaciones en la cepa PB12, así como la relevancia de las mismas, se realizaron experimentos de complementación utilizando la copia silvestre de cada gen, las cuales fueron expresadas en la cepa PB12 de forma independiente y por separado en un plásmido de bajo número de copias. La presencia de los genes silvestres ocasionó disminuciones en la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de la cepa al complementar con *barA* y *yjjU*. Por otro lado, la inactivación de los genes *yjjU* y *rssA* en la cepa PB11 ocasionó incrementos en su  $\mu$  mayores al 20%. La inactivación del gen *barA* en las cepas PB11 y PB12, no modificó de manera significativa su crecimiento. También se analizó el posible efecto de la mutación en el gen *barA*, y sus implicaciones sobre el sistema de dos componentes BarA/UvrY y el sistema de regulación global Csr; lo anterior, se evaluó a través de la determinación de actividades de  $\beta$ -galactosidasa, utilizando el plásmido pCBZ1, dicho vector contiene la fusión *csrB-lacZ*. Los resultados indican menores concentraciones de *csrB* en la cepa PB12, motivo que podría explicar porque en ésta cepa se encuentra favorecida la glicólisis y no la gluconeogénesis. La cepa PB11 por su parte tendría aparentemente, concentraciones considerablemente mayores de CsrB en comparación con la cepa PB12, situación que explicaría a su vez, el estado fisiológico de la cepa PB11, ya que en esta cepa (contrario a lo que sucede en PB12), se favorece la gluconeogénesis y no la glicólisis.

## **Introducción:**

En las bacterias, se regula la expresión de los genes adaptándola a las necesidades ambientales. Un buen ejemplo de esta situación es la regulación de las enzimas implicadas en el metabolismo de los azúcares. Las bacterias pueden emplear para obtener energía distintas fuentes de carbono, como la glucosa, lactosa, galactosa, maltosa, ramnosa y xilosa. Existen enzimas capaces de introducir a la célula cada uno de éstos azúcares y enzimas capaces de metabolizarlos para obtener energía. Parecería un despilfarro energético producir simultáneamente todas las enzimas necesarias para metabolizar los diferentes azúcares mencionados en ausencia de éstos. Por consiguiente, sería más económico para la célula producir solamente las enzimas necesarias en cada momento, es decir, si en el medio en el que vive la bacteria la principal fuente de carbono es la lactosa, solamente se expresarían los genes necesarios para metabolizar la lactosa, mientras que los otros genes no se expresarían. Por tanto, es esencial que exista un mecanismo de regulación de la expresión génica, de manera que los genes se expresen cuando sea necesario. La regulación de la producción de proteínas (síntesis de proteínas) considerando el proceso en su conjunto, puede llevarse a cabo en varios niveles. Esta regulación se ha ido sofisticando a lo largo del proceso evolutivo; sin embargo, dicho control molecular sigue perfeccionándose de acuerdo a las condiciones y biología de cada organismo. La evolución es, desde un prisma darwinista, el resultado de la adaptación continua de un organismo a ambientes cambiantes o diferentes. Algunas modificaciones de la estructura génica de un individuo suponen la posibilidad de conquistar o sobrevivir en nuevos ambientes. Así, el proceso evolutivo de un microorganismo se aceleraría, cuanto mayor fuera la capacidad de un individuo, o de una población clonal aislada, para producir variabilidad genética. La evolución microbiana depende por tanto, de dos fuerzas contrapuestas: por un lado, el mantenimiento de la información genética, y por otro lado, un cierto nivel de variación genética les permite conquistar nuevos ambientes. Este equilibrio de fuerzas es la clave de la evolución y la supervivencia (Sniegowski, P., et. al. 2000).

Cualquier situación de estrés para la bacteria (falta de nutrientes, luz ultravioleta, antibióticos, etc.) rompe este equilibrio y aparentemente incrementa la tasa de mutación (Tenaillon O, *et. al.* 2004).

En *Escherichia coli*, el fosfoenolpiruvato (PEP) es uno de los precursores más importantes en la biosíntesis de distintos metabolitos, entre ellos, de los compuestos aromáticos. Sin embargo, solo una mínima parte del PEP producido mediante la glicólisis (alrededor del 3 - 4%), es canalizado a producir dichos compuestos, pues el 80% del PEP se transforma en piruvato por dos vías, un 14 % por la acción de las piruvato cinasas (PykA y PykF), y el restante 66% debido al funcionamiento del sistema de transporte de azúcares dependiente de PEP (PTS), mientras que el 16% se transforma en oxaloacetato por la acción de la fosfoenolpiruvato carboxilasa, Fig. 1. (Flores, N., 1995).

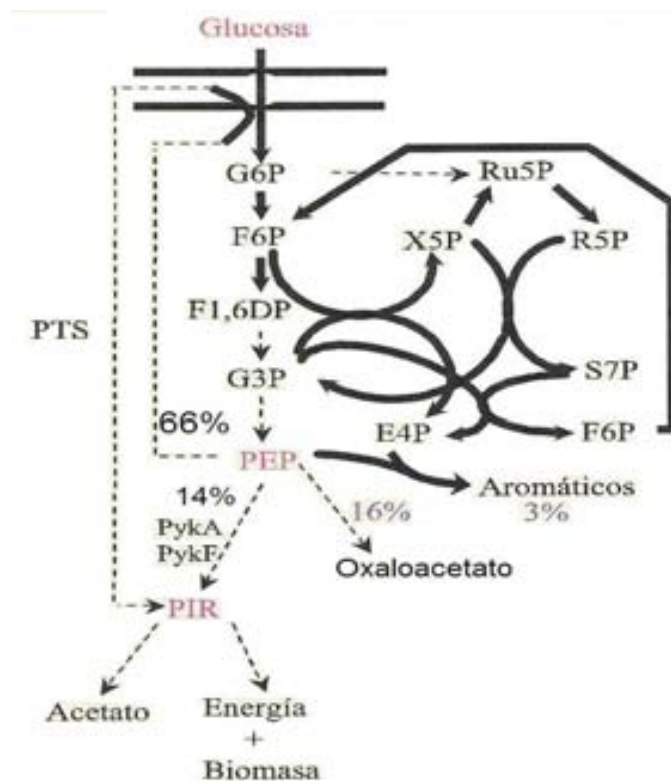


Fig 1.- Esquema del metabolismo central de carbono donde se muestra la utilización del PEP por las distintas vías (Tomado y modificado de Flores, N., 1995).



Esta capacidad en la célula impide tener una mayor cantidad de PEP para incrementar la síntesis de metabolitos de interés industrial derivados de este precursor cuando *E. coli* utiliza la glucosa como fuente de carbono. Por esta razón, desde hace ya algunos años, se han realizado una serie de esfuerzos encaminados a la comprensión y manipulación de las vías metabólicas (ingeniería de vías metabólicas) que tienen que ver con la síntesis, catabolismo y utilización del PEP en diferentes especies y variedades de bacterias. Una de las estrategias utilizadas en el laboratorio fue la eliminación del sistema PTS (codificado por el operón *ptsHlcr*) que en teoría duplicaría la disponibilidad de PEP para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (Flores, N., *et. al.* 1996; Liao, J., *et.al.*, 1996; Báez, J., *et.al.*, 2001). Sin embargo las cepas carentes del sistema PTS (como la PB11), obtenida a partir de la cepa silvestre JM101 mediante la inactivación en cromosoma del operón *ptsHlcr*, no son adecuadas para los propósitos de producción ya que su crecimiento en glucosa se ve afectado de manera importante (Flores N., *et. al.* 1996). A partir de la cepa PB11, y por un proceso de presión selectiva por crecimiento rápido en glucosa, se generó la cepa PB12, la cual recupera parcialmente su capacidad de asimilación de glucosa (PTS<sup>-</sup> Glc<sup>+</sup>) además de redirigir parte del PEP no utilizado por PTS hacia la síntesis de compuestos aromáticos a partir de glucosa con alto rendimiento mediante la expresión en plásmido de los genes *aroG<sup>fb</sup>* y *tktA* (Flores, S., *et. al.* 2002; Flores, N. *et. al.* 2005). Se ha demostrado que la cepa PB12 sobreexpresa la mayoría de los genes de la vía glicolítica, además de genes involucrados en el metabolismo del ppGpp (Flores, N., *et. al.* 2005, 2007 y 2008). Con el objetivo de conocer más al respecto de las mutaciones ocurridas en PB12, se envió el DNA cromosomal de ésta, a la compañía Nimblegen (empresa dedicada entre otras cosas a identificar cambios en genomas completos utilizando la técnica CGS Comparative Genome Sequencing; <http://www.nimblegen.com/products/cgr/index.html>) para la determinación de los cambios surgidos durante el proceso de evolución a la que fue sometida esta bacteria. Gracias a este estudio, se encontraron varias mutaciones surgidas durante el proceso (mutaciones puntuales que originaron principalmente cambios de aminoácidos en la proteína sintetizada); entre estas

mutaciones, tres se originaron en genes implicados en la regulación génica (factores de transcripción); una de ellas se sitúa en el gen *barA*, que codifica para la proteína sensora cinasa BarA. Dicha proteína sensora cinasa es parte de un sistema de dos componentes, y trabaja en conjunto con UvrY (su regulador transcripcional de respuesta), el cual actúa sobre el sistema de regulación global Csr (Suzuki, K., *et. al.* 2002; ver más adelante).

Para determinar las posibles implicaciones de esta mutación sobre el sistema de regulación global Csr en la cepa PB12, se llevaron a cabo algunas aproximaciones experimentales iniciales que sugieren un papel importante del sistema de dos componentes BarA/UvrY y el sistema de regulación global Csr, sobre la modificación global del metabolismo de la cepa PB12, que en conjunto con todos los cambios sufridos (mejor asimilación de glucosa) pudo ayudar a la recuperación en el crecimiento de esta cepa. Del mismo modo, se evaluaron los posibles efectos de otras dos mutaciones en la cepa PB12, encontradas en los genes *yjjU* y *rssA*. Se utilizaron aproximaciones similares para ambos genes, realizando experimentos de complementación en plásmido de cada gen, en la cepa PB12 así como la inactivación de estos genes en la cepa PB11. La función de las proteínas producto de ambos genes, son hasta ahora desconocidas; sin embargo se presume puedan tener funciones de regulación.

## **Antecedentes:**

El genoma de *E. coli* contiene más de 3000 genes que codifican proteínas que se presume, tienen por función, unirse a promotores para modular la transcripción (Pérez-Rueda, E. & Collado-Vides, J., 2000; Babu & Teichman, 2003). No obstante, aún no se sabe nada de por lo menos 150 presuntos factores de transcripción en esta bacteria, donde la mayoría de ellos incluso, no han sido clasificados (Pérez-Rueda, E. & Collado-Vides, J., 2000). Muchas de estas proteínas aparentemente se unen a regiones de DNA de secuencia específica, lo que indica que su actividad está restringida a promotores específicos. Algunas de estas proteínas controlan la expresión de un gran número de genes, mientras que otras controlan solo uno o dos. Se ha estimado, que menos de diez factores de transcripción (CRP, FNR, IHF, Fis, ArcA, UvrY, NarL y Lrp) controlan el 50 % de los genes que son sometidos a regulación; por otra parte, alrededor de 60 proteínas reguladoras controlan un solo promotor (Martínez-António, A. & Collado-Vides, J., 2003). Los factores de transcripción modulan la expresión de los genes de acuerdo a señales intracelulares mediadas por circunstancias medioambientales. Algunos factores de transcripción funcionan solo como activadores o solo como represores, mientras que otros pueden tener una función dual según la secuencia reguladora a la que se unan (Pérez-Rueda, E. & Collado-Vides, J., 2000). Los activadores por lo general actúan optimizando la función de un promotor, facilitando las interacciones entre dicha secuencia y la RNA polimerasa. En contraparte, los factores transcripcionales que actúan como represores, reducen ó reprimen la transcripción y comúnmente lo hacen impidiendo la unión de la RNA polimerasa con la región promotora. Generalmente el mecanismo de represión involucra una sola proteína. La activación de varios factores de transcripción está mediada por complejas cascadas de señalizaciones, en donde los sistemas de dos componentes cobran relevancia.

### I. Sistemas de dos componentes:

El término “sistema de dos componentes” fue introducido para describir a un grupo de proteínas reguladoras encontradas en bacterias (Ninfa, A.J. & Magasanik, B., 1986; Nixon, B.T., *et. al.* 1986; Ronson, C.W., *et. al.* 1987). Actualmente cientos de éstos sistemas han sido encontrados en eubacterias, arqueas y algunos eucariontes como plantas y hongos. Un típico sistema de dos componentes comprende dos proteínas: una sensora cinasa y un regulador de respuesta, los cuales contienen dominios transmisores y receptores respectivamente. Los dominios transmisores de las proteínas sensoras cinasas contienen varias secuencias cortas altamente conservadas entre familias; constan de alrededor de 240 aminoácidos e invariablemente de residuos de histidina, los cuales se autofosforilan utilizando ATP. Los dominios receptores de las proteínas reguladoras de respuesta constan de alrededor de 120 aminoácidos, y tienen residuos conservados de aspartato en su parte media dicho residuo de aspartato puede adquirir el grupo fosfato desde la histidina fosforilada del dominio transmisor. La recepción de la señal que “activa” a la proteína sensora cinasa se presume es propagada debido a cambios conformacionales en la proteína, originando dicha autofosforilación. Cuando la proteína reguladora de respuesta es fosforilada, activará genes, ya sea directamente al interactuar con el DNA, ó a través de la activación de otros factores de transcripción. Cuando la señal cesa tanto la proteína sensora como su regulador de respuesta dejan de fosforilarse y el sistema “se apaga”.

Una típica proteína sensora cinasa, está anclada a membrana con dos dominios transmembranales que separan el dominio sensor en el periplasma del dominio transmisor en el extremo carboxilo terminal que se encuentra en el citoplasma. Por su parte, una típica proteína reguladora de respuesta consta de un dominio receptor en su extremo amino terminal y un dominio de salida ó transmisor en su extremo carboxilo.

Además de los dominios transmisores y receptores, se ha identificado recientemente otro componente común, que también está implicado en la cascada de señalizaciones; este dominio referido como Hpt (histidine containing phosphotransfer) consta de alrededor de 120 aminoácidos y

contiene secuencias consenso cortas donde se localiza un residuo invariablemente de histidina; este residuo adquiere su grupo fosfato de cualquiera de los componentes, y puede tanto recibir como donar su grupo fosfato. Las proteínas más evolucionadas involucradas en este tipo de transducción de señales en bacterias contienen todos estos dominios en una sola secuencia (proteínas híbridas o tripartitas; por contener los tres dominios; transmisor, receptor y Hpt), haciendo más sofisticado el mecanismo de transducción de señales. Este tipo de proteínas son conocidas como sensoras cinasas híbridas.

## II. Proteínas sensoras cinasas:

En un sistema de dos componentes típico, las proteínas sensoras cinasas monitorean estímulos externos y transmiten esta información a las proteínas reguladoras de respuesta mediante un evento de fosforilación. La actividad de una proteína sensora cinasa es modulada por estímulos captados por su dominio sensor; como ya se había mencionada, estas proteínas se trans-autofosforilan utilizando ATP en un residuo conservado de histidina en su dominio histidín cinasa (HK); la autofosforilación que se lleva a cabo es una reacción bimolecular entre homodímeros, en donde un monómero cataliza la fosforilación del residuo conservado de histidina en el segundo monómero (Surette M. G. *et. al.* 1996; Pan, S.Q. *et. al.* 1993; Yang Y. *et. al.* 1993; Wolfe, A.J. & Stewart, R.C. 1993; Ninfa, E.G. *et. al.* 1993; Swanson, R.V. *et. al.* 1993). A diferencia de una cascada común de fosforilaciones, en donde una proteína cinasa puede fosforilar múltiples blancos, en un sistema de dos componentes el regulador de respuesta que transfiere el grupo fosfato a partir del dominio histidin cinasa a un residuo conservado de aspartato en su dominio regulador es altamente específico. De este modo, el control en una vía que involucra un sistema de dos componentes se realiza mediante la habilidad de la proteína sensora cinasa de regular el estado de fosforilación de una proteína reguladora de respuesta específica. Además de la reacción de fosforilación, muchas proteínas sensoras cinasas poseen actividad fosfatasa, permitiéndoles desfosforilar a la proteína reguladora de respuesta (Keener, J. & Kustu, S. 1988; Aiba,

H., *et. al.* 1989; Lois A. F., *et. al.* 1993). Estas proteínas sensoras cinasas bifuncionales por lo regular están presentes en vías que necesitan ser “apagadas” rápidamente.

La característica principal de la familia HK, es su sitio activo; ésta región de la proteína incluye regiones independientes de dimerización y catalíticas, las cuales son esenciales para la unión del ATP y la posterior trans-fosforilación. Cinco regiones conservadas definen el sitio catalítico; la caja H contiene el residuo de histidina a fosforilar; las cajas N, G1, F y G2 comprenden el sitio de unión de ATP (Stock, J. B., *et. al.* 1989; Parkinson, J. S. & Kofoid, E. C. 1992; Alex, L. A. & Simon, M. I. 1994). En las HK's típicas, la histidina conservada está localizada dentro de la región de dimerización, adyacente a la región de unión de ATP. No todas las HK's tienen el mismo patrón de organización, aunque es posible describir un patrón de conformación. La región catalítica tiene un plegamiento  $\beta/\beta$ , que consiste de cinco láminas y tres hélices con una única conexión en su parte izquierda. La caja N está situada en la hélice central; la caja G1 esta adyacente a la caja N en una lámina  $\beta$ . Por otro lado la caja F y G2 son parte de una larga asa (loop) sin orden aparente, la cual se extiende fuera de la región de unión de ATP. (Ban, C., et. al. 1999; Brino, L., *et. al.* 2000) La conformación tridimensional de las HK's es intrigante, debido a que su plegamiento pareciera no favorecer del todo la fosforilación del residuo de histidina; tal parece que su plegamiento está adecuado para contender por un lado la unión de ATP, y por el otro, la fosforilación de dicha histidina (Ryazanov, A. G., et. al. 1999).

La segunda región conservada en estas proteínas, es la región de dimerización. En las HK's típicas esta región consta de dos hélices antiparalelas. El dímero de HK's se forma a través de una asociación inusual entre las dos regiones, formando una unión entre las cuatro hélices. El residuo de histidina conservado que se encuentra en esta región, se localiza justo en el centro de la cara expuesta de las hélices que se cruzan (Tomomori, C., et. al. 1999).

Como se describió previamente, los dominios Hpt, existen de forma independiente a las HK's y a su región catalítica; sin embargo constan de un arreglo similar: monómeros que interactúan para formar dímeros a través de cuatro hélices entrelazadas; dichas interacciones son irregulares debido a la

topología irregular de las hélices. Los residuos de histidina conservados reciben grupos fosfato tanto de HK's como de dominios reguladores de respuesta (RR's). Los residuos adyacentes a dicha histidina se sugiere están involucrados en la transferencia del grupo fosfato, así como al reconocimiento de la proteína receptora de dicho fosfato.

Una pregunta fundamental en lo que a sistemas de dos componentes se refiere, y que aún no es posible responder, es ¿Cómo la actividad de las HK's es regulada por los estímulos medioambientales?. Las HK's contienen una gran variedad de regiones sensoras extra e intracelulares y/o transmembranales, diseñadas para interacciones ligando/estímulo específicos; no obstante no se han encontrado regiones de identidad en los extremos amino de estas proteínas.

### III. Proteínas reguladoras de respuesta:

La mayoría de estas proteínas tienen dos dominios; un dominio regulador en su extremo amino terminal, y un dominio efector en su extremo carboxilo terminal. Las proteínas histidín cinasas median la fosforilación del aspartato conservado en el dominio regulador (RR) de la proteína activándola. La proteína reguladora es entonces capaz de llevar a cabo una respuesta intracelular, dicha respuesta por lo general se trata de la expresión de uno o varios genes. Algunas proteínas reguladoras tienen la capacidad de catalizar su propia inactivación, pues pueden hidrolizar el acil fosfato. El amplio rango en la vida media de las fosforilaciones de los dominios RR's (segundos-horas), refleja las necesidades específicas de cada vía de señalización. Los dominios RR's constan por lo general de 120 residuos aproximadamente. Aunque típicamente se encuentra en multidominios; los dominios reguladores no siempre se encuentran adjuntos a los dominios efectores; algunos existen como proteínas separadas al final de las vías donde median la regulación de respuestas celulares; mientras otros son usados en vías de fosforilación como intermediarios ó como dominios de proteínas sensoras cinasas híbridas. Su plegamiento de doble giro consta de cinco láminas beta paralelas que se distribuyen en el siguiente orden:  $\beta 2$ - $\beta 1$ - $\beta 3$ - $\beta 4$ - $\beta 5$ . Todos los dominios reguladores

que han sido estructuralmente caracterizados, comparten plegamientos similares: CheB, ETR1, FixJ, NarL, NtrC, PhoB, Spo0A y Spo0F (Djordjevic, S., *et. al.* 1998; Muller-Dieckmann, H.J., *et. al.* 1999; Gouet, P., *et. al.* 1999; Baikalov, I., *et. al.* 1998; Volkman, B.F., *et. al.* 1995; Solà, M., *et. al.* 1999; Lewis, R.J., *et. al.* 1999; Madhusudan, Z. J. *et. al.* 1996). El dominio regulador se caracteriza por unos cuantos residuos conservados, cuatro de éstos se encuentran agrupados en el sitio activo en el extremo carboxilo del dominio: el sitio de fosforilación (Asp), un par de residuos ácidos involucrados en la unión de metales y una lisina que interactúa con el fosfato. Este sitio activo cataliza la transferencia del fosfato desde las HK's; sin embargo en estudios in vitro se ha determinado la capacidad de los dominios RR's de tomar fosfatos de otras moléculas como lo son el acetil-fosfato y el fosforamidoato (Lukat, G. S., *et. al.* 1992).

La función más común de las proteínas reguladoras de respuesta es la modulación de la expresión génica; la mayoría de las RR's que funcionan como reguladores transcripcionales pueden ser divididas en tres subfamilias basándose en la homología de su dominio efector en el extremo carboxilo terminal. Estas subfamilias son designadas como OmpR, NarL y NtrC por ser éstos los principales representantes de cada subfamilia. De las 32 proteínas reguladoras de respuesta codificadas en el genoma de E. coli, el 78% pertenecen a estas tres subfamilias; 14 pertenecen a la subfamilia OmpR, 7 a la subfamilia NarL y 4 a la subfamilia NtrC y aunque todas las subfamilias contienen motivos hélice-vuelta-hélice (HTH), el plegamiento es distinto (Mizuno, T., *et. al.* 1996).

Una pregunta clave con respecto a las proteínas reguladoras de respuesta es, ¿Cómo el funcionamiento del dominio efector es modulado por la fosforilación del dominio regulador?; la explicación es aún desconocida, no obstante estudios al respecto comienzan a aclarar ciertos aspectos. Las proteínas reguladoras de respuesta se encuentran en equilibrio entre dos conformaciones predominantes, las cuales corresponden a su estado activo e inactivo. La fosforilación desplaza el equilibrio de la proteína hacia la forma activa; la activación altera una amplia superficie del dominio regulador de la molécula, específicamente aquella superficie encargada del



reconocimiento proteico y que lleva a cabo interacciones proteína-proteína que medían la respuesta. Estas interacciones proteína-proteína son diversas, con blancos que incluyen los dominios HK's de las proteínas sensoras cinasas, otros dominios reguladores para la formación de homodímeros, fosfatasas y dominios adjuntos. Estudios estructurales de estas proteínas en su forma activa (fosforilada), dan indicios de cambios conformacionales asociados con dominios reguladores activados (Zhou, H., *et. al.* 1995; Nohaile, M., *et. al.* 1997). Los dominios reguladores activados muestran cambios conformacionales que inicialmente involucran pequeños reposicionamientos de algunos elementos de la estructura secundaria que reajustan sus enlaces conforme al reacomodo de grupos específicos de algunas cadenas. La reorientación concertada de las cadenas crean un relevo estructural que se propaga a través de la molécula. Una vez que el dominio regulador se ha fosforilado, dos residuos conservados adicionales juegan papeles importantes durante el cambio conformacional; el primero se sitúa en la hoja  $\beta$ -4 y posee un grupo hidroxilo en su cadena lateral (Serina/Treonina); el segundo se sitúa en la hoja  $\beta$ -5 y se trata de un aminoácido aromático (Fenilalanina/Tirosina). La cadena  $\beta$ -4 que contiene el aminoácido conservado Serina/Treonina se reorienta hasta quedar lo suficientemente cerca como para generar un puente de hidrógeno entre dicho aminoácido conservado y el grupo fosfato; por su parte el aminoácido aromático conservado localizado en una superficie sobresaliente de la proteína definida por la hoja  $\beta$ -5 se gira hacia adentro rumbo al sitio de fosforilación, llenando la cavidad vacante que produjo el reposicionamiento del aminoácido Serina/Treonina. Estas configuraciones generadas por movimientos concertados en la molécula fue observado en cada una de las cuatro estructuras activas estudiadas (Stock, J.B., *et. al.* 1995). Estudios estructurales de proteínas mutantes activadas han indicado una correlación entre el giro orientado del aminoácido aromático y la activación de la proteína reguladora de respuesta (Zhou, H., *et. al.* 1995). Los movimientos observados de esta cadena en moléculas activadas proveen un mecanismo a través del cual el sitio de fosforilación se une con el residuo aromático conservado. La fosforilación induce cambios conformacionales que afectan una amplia superficie de la proteína; a

pesar de la uniformidad en los movimientos de cadenas específicas los cambios conformacionales muestran una variedad significativa con respecto a la magnitud del desplazamiento y a la extensión de la superficie alterada. En todos los casos, los cambios conformacionales son propagados casi exclusivamente hacia la mitad del extremo carboxilo terminal del dominio regulador, aunque en algunas proteínas los cambios son limitados a una subregión de este dominio.

Dado el número y diversidad de los dominios reguladores, no es sorprendente que existan varias estrategias de regulación; incluso para estas proteínas donde la mayoría funcionan como factores de transcripción. En algunos casos la fosforilación promueve la dimerización que es requerida para la unión a DNA, mientras que en otros casos, la fosforilación optimiza la unión a DNA cuando no existe dimerización. Algunas proteínas reguladoras de respuesta se unen a DNA aún sin estar fosforiladas; sin embargo requieren la fosforilación para optimizar las interacciones con la maquinaria de transcripción. El funcionamiento varía entre las diferentes proteínas reguladoras, las cuales involucran mecanismos como homodimerización, formación de heterocomplejos, regulación de la actividad enzimática, etc. En muchas de éstas proteínas, la modulación no se restringe al dominio regulador, pero requiere comunicación con su dominio efector adjunto. Datos bioquímicos sugieren que los cambios conformacionales inducidos con la fosforilación podrían estarse transmitiendo más allá del dominio regulador, alcanzando incluso el dominio efector.

#### IV. Sistema de dos componentes BarA/UvrY:

El gen *barA* codifica para la proteína BarA (Bacterial Adaptive Response Gene A); la cual consta de 918 aminoácidos; dicha proteína fue identificada por primera vez, debido a su habilidad de suprimir la inactivación de la proteína sensora cinasa EnvZ, que regula la expresión de proteínas de membrana externa en *E. coli* (Nagasawa, S., et. al. 1992). La secuencia de 918 aminoácidos de BarA es altamente homóloga a la familia de proteínas miembros de sistemas de dos componentes, que contienen tres dominios, tanto el cinasa y el regulador de respuesta, como un dominio Hpt. Como ya se había

mencionado, a éste tipo de proteínas sensoras cinasas se les conoce como híbridas ó tripartitas. En cepas de *E. coli* uropatogénicas, la transcripción del gen *barA* se induce después del contacto con la superficie de células epiteliales, y juega un papel muy importante en la colonización del tracto urinario durante la infección (Zhang, J. P. & Normark, S. 1996). Se ha reportado que BarA regula la expresión de RpoS; un factor sigma alternativo de la RNA polimerasa que se activa durante la fase estacionaria de crecimiento (Mukhopadhyay, S., *et. al.* 2000). Aunque la regulación de éste factor sigma es muy compleja y no está totalmente esclarecida, está comprobado que controla genes en respuesta a escasez de nutrientes, modulación de pH, cambios en osmolaridad y variación del oxígeno en el medio, así como también regula ciertos factores de virulencia.

Estudios recientes demuestran que BarA trabaja en conjunto con UvrY (su regulador transcripcional de respuesta); dicha interacción se da de forma muy específica y eficiente, como se demuestra con ensayos de competencia y especificidad (Pernesting *et. al.*, 2001; 2003). Así mismo, se han identificado homólogos de UvrY en otros microorganismos, y se propone que este sistema de dos componentes actúa sobre la expresión de genes del metabolismo del carbono, mediante la interacción con el sistema de regulación global Csr (Pernesting *et. al.*, 2003), tema que se abordará más adelante.

#### V. Papel de BarA en la respuesta a estrés:

*E. coli*, puede crecer en un rango bastante amplio de pH (4-9), y dependiendo la disponibilidad de nutrientes y aceptores de electrones, su metabolismo se adapta para compensar el pH externo (Foster, J.W. 2000). La inducción a la tolerancia ácida también provee protección contra otros factores de estrés como pueden ser osmolaridad, daño oxidativo y temperatura elevada (Spector, M.P. *et. al.* 1999). Varios genes reguladores han sido implicados en la inducción de la tolerancia ácida; entre ellos, el factor sigma S (RpoS), la proteína Fur y RssB que interactúa con RpoS, además de un sistema de dos componentes PhoPQ (Foster, J.W. 2000). Evidencia preliminar muestra que en presencia de ácidos débiles el nivel de expresión del gen *barA* se induce alrededor de cuatro veces;

aunque la razón de este incremento aún es desconocido. Existe también una estrecha relación entre el metabolismo del hierro y la respuesta al estrés oxidativo. El hierro es un elemento extremadamente importante para los organismos vivos, pues el hierro es utilizado por muchas enzimas como cofactor; el exceso de hierro sin embargo, provoca la generación de radicales libres (Imlay J.A., *et. al.* 1988). Para contender con los radicales libres, la maquinaria celular de *E. coli*, posee dos catalasas; la hidroxiperoxidasa I y II (HPI y HPII), codificadas por los genes *katE* y *katG* respectivamente. Ambas catalasas son reguladas en mayor parte por la vía RpoS-BarA. Se ha observado que la ausencia del gen *barA* disminuye los niveles de HPI; sin embargo, estos niveles se restituyen parcialmente con la adición de hierro al medio de cultivo, lo que sugiere que la proteína BarA no es la única implicada en la regulación de esta catalasa (Mukhopadhyay, S., *et. al.* 2000).

#### VI. El sistema de regulación global Csr:

El sistema de regulación global en *E. coli*, Csr (Carbon storage regulator), está involucrado en la represión de muchos genes de fase estacionaria y aparentemente también en la activación de algunos genes de fase exponencial (Romeo, T. 1998.; Baker, C. S., *et. al.* 2007). El sistema consta de cuatro componentes: Una proteína homodimérica de unión a RNA, CsrA; dos sRNA, antagonistas de CsrA, (CsrB y CsrC), y CsrD una proteína que se une específicamente a los sRNA antagonistas de CsrA para su posterior degradación a través de la RNasa E (Liu, M.Y., *et. al.* 1995; Suzuki, K., *et. al.* 2006; Weillbacher, T., *et. al.* 2003). El componente central de este sistema, CsrA, es una proteína de unión a RNA de 61 aminoácidos. Se ha demostrado que esta proteína inhibe la biosíntesis de glicógeno y su catabolismo, así como también inhibe la gluconeogénesis y formación de biofilm. Por otra parte, este sistema estimula la glicólisis, el metabolismo de acetato, la motilidad y la biosíntesis de flagelo (Jackson, D. W., *et. al.* 2002; Romeo, T., *et. al.* 1993; Sabnis N.A., *et. al.* 1995; Wei, B., *et. al.* 2000, 2001; Yang, H., *et. al.* 1996). CsrA es capaz de reprimir o activar genes de forma post-transcripcional dependiendo de cuál sea el mRNA blanco. Se ha demostrado que CsrA puede unirse en diferentes

sitios de un mismo RNA, reconociendo en ellos múltiples repeticiones de secuencias imperfectas, en las cuales no solo tiene que ver la estructura primaria sino también la estructura secundaria del mensajero (Dubey, A. K. *et. al.* 2005); a pesar de ello ha sido posible proponer una secuencia consenso: RUACARGGAUGU (con las bases subrayadas 100% conservadas; donde R equivale a A/G). Existen sitios potenciales de unión de CsrA en varios genes, que se sobrelapan con la secuencia Shine-Dalgarno (SD), sugiriendo que CsrA podría estar regulando el inicio en la traducción de los mensajeros. Recientemente se encontró un sitio de unión de CsrA en el mensajero del gen *hfq* de *E. coli*, el cual se traduce en una proteína homohexamérica de forma conocida como toroide (Franze de Fernandez, *et. al.* 1968; Sauter, C. *et. al.* 2003). Hfq está presente en una gran variedad de bacterias, y juega un papel importante en la regulación de la expresión génica global. Numerosos estudios han concluido que Hfq funciona como chaperona, promoviendo las interacciones entre mRNA's y sRNA's (Storz, G. *et. al.* 2004). También se ha determinado que Hfq activa la traducción del mRNA que codifica para RpoS promoviendo el apareamiento de dos sRNA's al transcrito del gen *rpoS*; dicho apareamiento aparentemente disocia una estructura secundaria en el mRNA que inhibe su traducción (Gottesman, S. 2004; Muffler, A. *et. al.* 1996b; Storz, G. *et. al.* 2004). El gen *csrA* está localizado entre los genes *alaS* y *serV* en el genoma de *E. coli* y consiste primordialmente de motivos KH (Liu, M. Y., *et. al.* 1995); los motivos KH caracterizan a un grupo de proteínas de unión a RNA eucariontes y procariontes (NusA, S3, etc.), y se sugiere que funcionen con RNAs de una sola cadena. CsrA, aparentemente no es homólogo a otro sRNA de unión a proteínas (Babitzke, P. 1997).

El segundo componente de este sistema de regulación global, es una cadena de RNA de alrededor de 366 nucleótidos llamado CsrB, el cual puede unir aproximadamente 18 subunidades de CsrA, formando un gran complejo multiproteico. CsrB funciona como un antagonista de CsrA secuestrando a ésta última impidiéndole su funcionamiento. Un aspecto fundamental en este sistema de regulación es que CsrA activa indirectamente la transcripción del gen *csrB*, lo cual es indicativo de un mecanismo de autoregulación que determina la actividad intracelular de CsrA sin afectar su nivel. La

característica más llamativa de la secuencia de la molécula de CsrB, es la presencia de 18 repeticiones de secuencias imperfectas (CAGGAu,c,a,G); estas repeticiones se encuentran en horquillas distribuidas a lo largo de la molécula de RNA (Fig 2). La observación de que alrededor de 18 proteínas CsrA interactúan con una sola molécula de CsrB, confirma los resultados en los análisis de la secuencia de ésta molécula. La búsqueda de homólogos de esta molécula en las bases de datos, revelan que el patógeno de plantas *Erwinia carotovora* posee una molécula muy similar, AepH (Activator of Extracelular Proteins H), que se encarga de impedir el funcionamiento de la proteína RsmA; similar a lo que ocurre en *E. coli* con CsrA y CsrB, de hecho, la sobreexpresión del gen *aepH* en *E. coli*, reduce la actividad de CsrA, lo que demuestra que esta molécula es estructural y funcionalmente homóloga a CsrB.

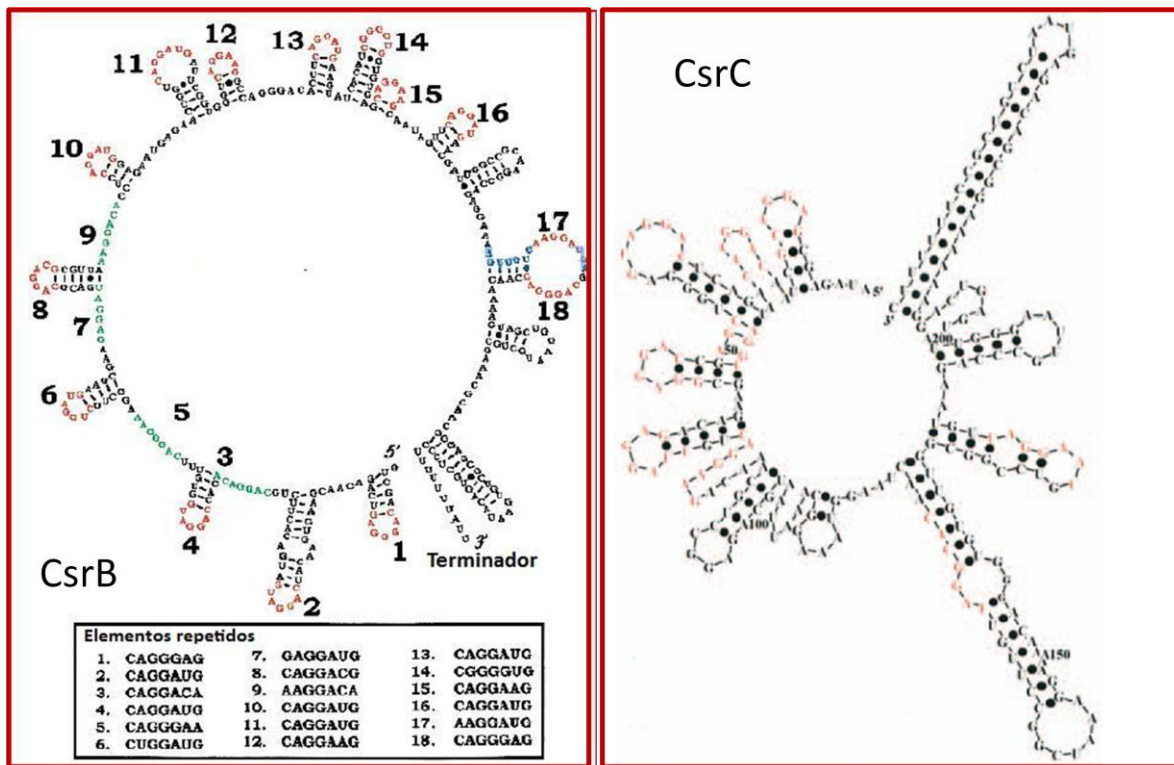


Fig. 2.- Estructura secundaria de las moléculas CsrB y CsrC donde se muestran las repeticiones de secuencias imperfectas (Tomado y modificado de Weilbacher, T., et. al. 2003; Romeo, I. 1998).

El tercer elemento de este sistema de regulación global es CsrC, la cual es una molécula de RNA de alrededor de 245 nucleótidos, y aunque es una molécula considerablemente más pequeña que CsrB, utiliza un mecanismo similar a ésta para impedir el funcionamiento de CsrA. Según estudios “in silico”, CsrC contiene nueve repeticiones imperfectas en su secuencia, generando una molécula con una estructura secundaria peculiar, similar a lo que ocurre en CsrB (Fig. 2); sin embargo la secuencia nucleotídica de estas dos moléculas no tiene ninguna similitud.

CsrA, CsrB y CsrC se acumulan conforme el cultivo entra en la fase estacionaria de crecimiento; y aunque el factor RpoS activa muchos genes que son inducidos en la fase estacionaria, éste no afecta las concentraciones de los elementos del sistema Csr (Gudapaty, S. *et. al.* 2001). En contraste, la transcripción de CsrB y CsrC, depende indirectamente de CsrA; una aparente consecuencia de éste mecanismo es que CsrB y CsrC, exhiban comportamientos de compensación; es decir, CsrB es al parecer, más activa y más eficiente que CsrC, no obstante, al inactivar CsrB, CsrC toma su lugar, transcribiéndose en mayor proporción para poder suplir la ausencia de CsrB (Weilbacher, T., *et. al.* 2003).

En *E. coli*, el recambio y procesamiento del RNAm involucra una enzima esencial; la RNasa E, una endoribonucleasa específica de cadena sencilla (Kushner, S.R. 2002). La RNasa E contiene un dominio catalítico en su extremo amino terminal, un dominio de unión a RNA y un dominio que sirve como andamio para la asociación de la 3' - 5' fosforilasa polinucleótido exonucleasa (PNPasa), la enzima glicolítica enolasa, y la helicasa de RNA RhlB que en conjunto, forman un complejo degradador de RNA llamado degradosoma. Alguna de estas proteínas podrían participar en el recambio de CsrB y CsrC. No obstante, tratando de establecer la posible molécula reguladora de estos RNA's se llegó a la identificación de un elemento más CsrD; una proteína de 647 residuos. Se sugiere que CsrD funciona uniéndose a CsrB y CsrC, convirtiéndolos en sustrato para degradación por la RNasa E; de este modo se sospecha que la unión de CsrD a éstos RNA's, podría cambiar sus

estructuras haciéndolos más accesibles a la RNasa E, puesto que ni CsrB ni CsrC contienen sitios de reconocimiento para la RNasa E o alguna otra molécula implicada en degradación. Al parecer la actividad de CsrD no es constante bajo cualquier condición, modulando en que momento CsrA es activo. Un aspecto que llamó la atención, fue que la sobreexpresión de *csrD* es modestamente reprimida con la sobreexpresión de CsrA, lo que indica que CsrD es parte de la vía regulatoria de señalización del sistema Csr. Tanto las concentraciones de CsrB como de CsrC disminuyen significativamente conforme avanza el crecimiento, sin embargo, aún no se ha podido establecer el papel de CsrD en ésta respuesta. Un dato importante es que CsrD se expresa a muy bajos niveles, mientras que CsrB y CsrC a niveles altos, lo que implica que esta proteína es activa sobre estos RNA's a concentraciones sub-estequiométricas (Suzuki, K. *et. al.* 2006).

#### VII. Relación entre el sistema de dos componentes BarA/UvrY sobre el sistema de regulación global Csr:

Estudios realizados (Suzuki, K. *et. al.* 2002), demostraron la fuerte relación que existe entre el sistema de dos componentes BarA/UvrY y el sistema de regulación global Csr. Estos estudios manifestaron que el sistema de regulación global Csr, es regulado por el sistema de dos componentes BarA/UvrY, a través de la estimulación transcripcional, de uno de los elementos del sistema Csr, la molécula CsrB. A partir de ese hallazgo, se demostraron una serie de interacciones entre estos dos sistemas, además de la aparición de nuevas moléculas, hasta llegar a proponer un modelo de regulación un tanto complejo, dado que involucra interacciones de varios tipos.

Para describir el modelo, podemos comenzar con la proteína CsrA; esta proteína de unión a RNA al parecer estimula la traducción de la proteína BarA. La proteína BarA a su vez se encarga de activar mediante fosforilación a UvrY; ésta última proteína activa la transcripción de los genes *csrB* y *csrC*, que codifican para las proteínas CsrB y CsrC. Ambas proteínas, como ya se había discutido, unen varias moléculas de CsrA impidiéndole funcionar (Fig. 3). No obstante a esta vía de regulación,



aparecen otras moléculas e interacciones hasta ahora no contempladas, como por ejemplo; se había establecido que CsrA al parecer incrementa la traducción de BarA, sin embargo aún no se conoce el mecanismo por el cual ejerce este efecto, bien podría ser a través de la unión directa con el mensajero ó a través de la estimulación de otra molécula, muy probablemente a nivel traduccional. Adicional a estos hallazgos, se encontró que la ausencia de *barA* resultaba también, aunque en menor grado, en la activación de UvrY, el regulador de respuesta de BarA; no obstante, esta respuesta se daba únicamente cuando CsrA se encontraba presente, lo que sugería que CsrA estaría estimulando directa o indirectamente, la traducción de alguna otra molécula, que al igual que BarA, estaría activando a *uvrY*. Así mismo, también se encontró que UvrY estimula la transcripción del gen *barA*, esto se demostró mediante la sobreexpresión de *uvrY*, lo que tuvo como consecuencia una mayor expresión del gen *barA*. También, se estableció un incremento de *uvrY* con la sobreexpresión de *sdiA* (Fig. 3). El gen *sdiA* codifica para la proteína SdiA; supresor de la división celular (Suppressor of the cell Division Inhibitor), pues regula genes involucrados en la división celular, quorum sensing y genes involucrados en regular los niveles de AMP cíclico (García-Lara, J., *et. al.* 1996; Sitnikov, D.M. *et. al.* 1996; Yamamoto, K. *et. al.* 2001; Wei, Y. *et. al.* 2001).

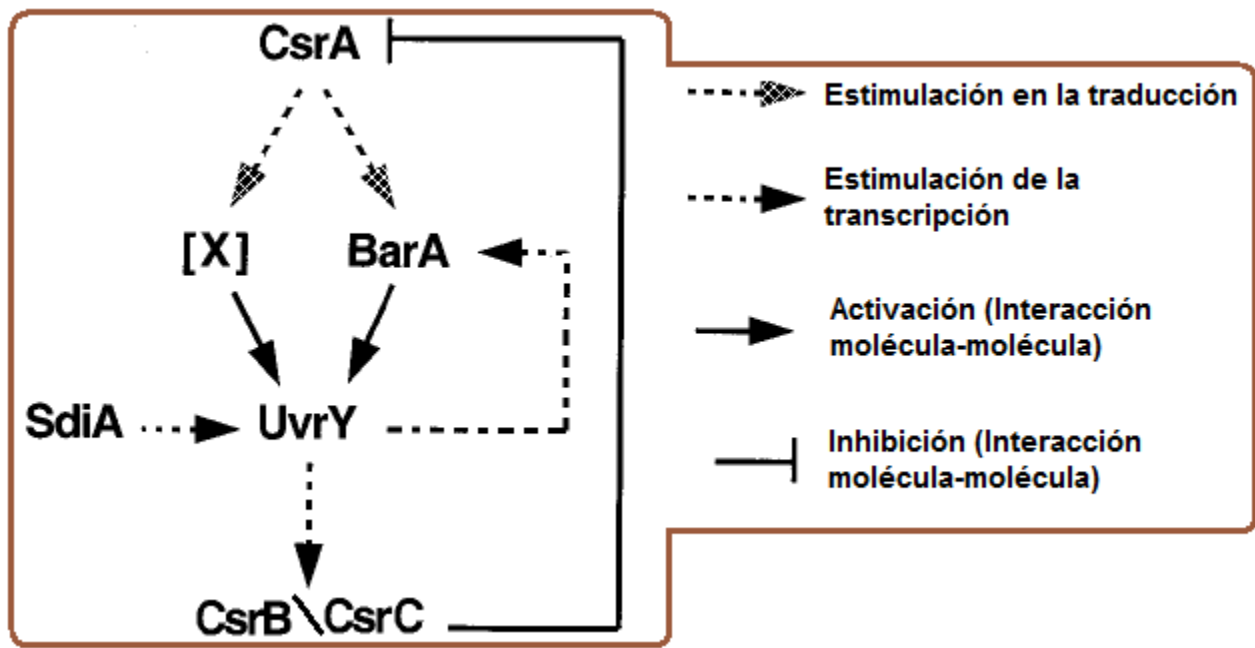


Fig 3. Esquema de regulación entre los sistemas BarA/UvrY y Csr (Tomado y modificado de Suzuki, K., *et. al.* 2002).

### VIII. Funcionamiento del modelo de regulación del sistema Csr y sus implicaciones biológicas:

Es muy probable que CsrA se una directamente a los transcritos de cuyos genes regula; la unión podría darse sobre o muy cerca del sitio de unión a ribosoma. La serie precisa de eventos moleculares que ocurren aún no se ha establecido en su totalidad, aunque para el caso de aquellos transcritos a los cuales regula negativamente, podría involucrar ataques endonucleolíticos al complejo CsrA-RNAm, conformación alterada del transcrito y ataques secundarios o inhibición de la traducción, resultando en la inhibición de la unión del ribosoma y degradación del mensajero (Romeo, T. 1998). En la figura 4 se muestran de manera esquemática las alternativas en cuanto a funcionamiento de éste modelo de regulación: 1. CsrA se une a su sustrato (RNAm), dicho complejo es blanco de ataques por endonucleasas, ó la unión de CsrA podría estar alterando la estructura del mensajero, haciéndolo blanco de dichos ataques. 2. La unión de CsrA podría estar inhibiendo la unión del ribosoma y por lo

tanto la traducción del mensajero, seguido de la exposición del mensajero para su degradación. Una combinación de los dos mecanismos anteriores también podría estar ocurriendo (Liu, M. Y. & Romeo, T. 1997). Se sugiere que la actividad de CsrA en la célula es controlada a través del equilibrio que existe entre el CsrB libre y el CsrB unido a CsrA; en éste modelo la acumulación de CsrB libre estaría secuestrando a CsrA, activando los genes reprimidos por CsrA, mientras que el recambio de CsrB podría liberar a CsrA, dándole la oportunidad de reprimir los genes correspondientes (Liu, M. Y. & Romeo, T. 1997).

El control positivo de CsrA sobre algunos otros transcritos (flhDC, enzimas glicolíticas, etc.) podría darse mediante la interacción con el mensajero, su posterior estabilización, seguido de una estimulación en su traducción ó, indirectamente vía regulación positiva ó negativa de algún factor de transcripción (Liu, M. Y. & Romeo, T. 1997).

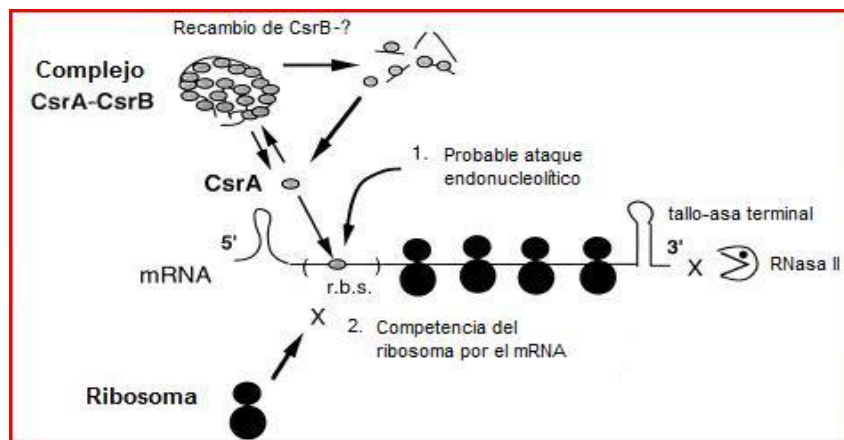


Fig. 4. Modelo de regulación del sistema de regulación global Csr (Tomado y modificado de [Romeo, T. 1998](#)).

Actualmente, la forma en la que el sistema Csr censa y responde al ambiente o la fisiología celular no se ha establecido; sin embargo, entre las ventajas de este modelo de regulación se encuentran los requerimientos de energía relativamente bajos y tiempos cortos para sintetizar cualquier regulador de RNA. La unión de una simple molécula de RNA a 18 subunidades de la proteína reguladora (CsrA)

amplifica estos beneficios. Por último, también podemos mencionar que el control post-transcripcional genera cambios rápidos en la expresión génica.

Aunque no se conoce otro sistema regulador, que trabaje como Csr, la reciente identificación de otros reguladores de RNA como DsrA, OxyS, MicF y RNA III de *Staphylococcus aureus*, (Delilhas, N. 1995; Morfeldt, E., *et. al.* 1995; Sledjeski, D., & Gottesman, S. 1995; Altuvia, S. *et. al.* 1997) nos dan pistas acerca de que los sistemas de regulación basados en moléculas de RNA quizá sean más comunes de lo que la literatura indica.

#### IX. Factor sigma S (RpoS):

Si bien es cierto que la regulación génica se da a distintos niveles, el componente central en la regulación transcripcional en bacterias es la RNA polimerasa, responsable de la transcripción. Para que la RNA polimerasa comience la transcripción en un promotor particular, debe interactuar primero con otras proteínas como el factor  $\sigma$  (sigma) y formar el complejo denominado holoenzima; además de la formación de este complejo y de su consiguiente interacción con la secuencia promotora en el DNA, es necesaria la formación de lo que se conoce como complejo abierto, en donde el DNA es desapareado alrededor del sitio de inicio de la transcripción. Una vez formado el complejo abierto, comienza la síntesis de la cadena de RNA por la polimerasa, que se mueve a lo largo de la cadena de DNA hasta concluir con el proceso de elongación, finalizando con la síntesis de una cadena de RNA. Entre las funciones principales del factor  $\sigma$  están el asegurar el reconocimiento de secuencias específicas; el posicionar a la RNA polimerasa en un promotor blanco, y facilitar la separación del DNA de doble cadena en el sitio de inicio de la transcripción. *Escherichia coli* contiene un factor sigma principal denominado  $\sigma^{70}$ , que reconoce la mayoría de los promotores; sin embargo existen otros seis factores  $\sigma$ , entre ellos el factor  $\sigma^{38}$ ; cada factor sigma reconoce diferentes grupos de promotores en respuesta a diferentes tipos de condiciones metabólicas y de estrés (Ishihama, A. 2000).

El factor  $\sigma^S$  (RpoS) en particular se activa en condiciones de crecimiento limitado; es decir, cuando hay escasez de glucosa, u otras condiciones de estrés en el medio, generalmente durante la fase estacionaria y en condiciones no óptimas de crecimiento (Hengge-Aronis, R. 2002). Está comprobado que en condiciones de crecimiento lento, el factor RpoS es responsable de la transcripción del 10% de los genes de *Escherichia coli* incluyendo los glicolíticos (Weber, H., *et. al.*, 2005; Flores, S., *et. al.* 2002; Flores, N., *et. al.* 2008). Evidencias recientes indican que al parecer, diversos genes glicolíticos poseen secuencias de promotores sobrelapados, mismos que estarían siendo reconocidos por diferentes factores sigma ( $\sigma^{70}$  y  $\sigma^{38}$ ), probablemente de acuerdo a las condiciones fisiológicas de la célula (Olvera, L. *et. al.* 2009).

Los promotores dependientes de RpoS requieren tetrafosfato de guanosina (ppGpp) para inducir la transcripción incluso en presencia de altos niveles del factor  $\sigma^S$ . Bajo condiciones favorables de crecimiento, los niveles de pppGpp (pentafofosfato de guanosina) y ppGpp se mantienen relativamente constantes en el citosol esencialmente por la actividad de cinco enzimas: RelA, Ndk, SpoT, Gpp y Ppa. Estas enzimas modifican su actividad y aumentan los niveles de ppGpp cuando hay escasez de aminoácidos o cuando decrecen las concentraciones de carbono en el medio (Cashel, M., *et. al.*, 1996; Lengeler, J. W., *et. al.* 1999). La relación que existe entre el ppGpp y la transcripción mediada por el factor  $\sigma^S$  es que aparentemente, el ppGpp inhibe la formación del complejo abierto durante el inicio de la transcripción y por tanto inhibe la elongación cuando la RNA polimerasa forma la holoenzima con el factor  $\sigma^{70}$ . Esta alteración en la transcripción podría incrementar la disponibilidad de la RNA polimerasa para unirse con el factor  $\sigma^S$ ; en consecuencia la transcripción de genes dependientes de RpoS se lleva a cabo (Lengeler, J. W., *et. al.*, 1999; Wagner, R., 2002; Artsimovich, I., *et. al.*, 2004).

La regulación del factor  $\sigma^S$  aún no se conoce de manera detallada, sin embargo se conocen algunas características en cuanto a este aspecto, una de ellas involucra a la proteína RssB, que es codificada por el gen *rssB*; dicho gen se encuentra en el operón *rssAB*. La proteína RssB regula la degradación del

factor  $\sigma^S$  por la proteasa ClpXP durante crecimiento óptimo (Muffler, A., *et. al.* 1996a; Pratt, L. A. & Silhavy, T. J. 1996). La proteína RssB se une directamente a la región 2.5 del factor sigma  $\sigma^S$ , cerca de la lisina 173 y al extremo amino terminal de la proteasa ClpXP, conectando de este modo al sustrato (factor  $\sigma^S$ ) con la proteasa, induciendo su degradación (Stüdemann, A. *et. al.* 2003; Becker, G. *et. al.* 1999). La proteína RssB no es degradada por la proteasa como resultado de la interacción (Klauck, E. *et. al.* 2001). Esta proteína es activada mediante fosforilación en su residuo de aspartato, en la posición 58 (Bouché, S. *et. al.* 1998), dicha activación podría estarse llevando a cabo por el sistema de dos componentes Arc A/B (Mika, F. & Hengge, R. 2005).

#### X. El sistema fosfoenolpiruvato: carbohidrato fosfotransferasa (PTS):

El sistema de fosfotransferasa (PTS) es un sistema enzimático que interviene en el transporte y fosforilación concomitante de muchos carbohidratos en numerosos géneros bacterianos y está formado por un conjunto de proteínas que intervienen en una cascada de fosforilaciones. En *E. coli* el sistema PTS permite el transporte de glucosa, manosa, fructosa y los polioles sorbitol y manitol, entre otros (Postma, P. W., *et. al.*, 1996).

La cascada inicia con la enzima I (EI), la cual se autofosforila utilizando fosfoenolpiruvato (PEP) y transfiere el grupo fosfato a la proteína Hpr. Estas dos proteínas solubles son los componentes generales del sistema. Posteriormente se transfiere el fosfato de la proteína Hpr al componente II (IIA), que a su vez lo transfiere al complejo formado por la proteína IIBC. Este complejo (al igual que el componente IIA) es azúcar- específico y funciona como permeasa, fosforilando de manera concomitante al carbohidrato transportado (Fig. 5). Además del transporte y fosforilación de azúcares, el sistema PTS lleva a cabo varias funciones de regulación metabólica y transcripcional en diversas bacterias; por ejemplo, este sistema es responsable de la represión catabólica que ejerce la glucosa (Postma, P. W., *et. al.*, 1996).

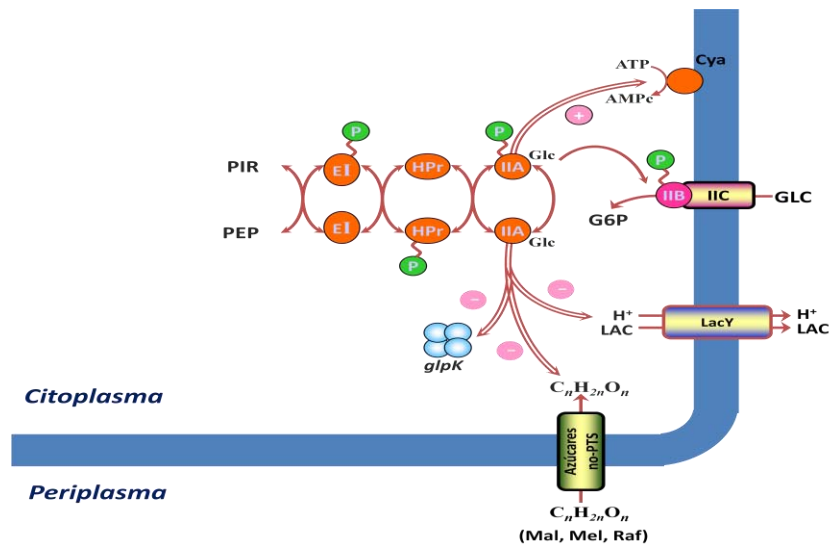


Fig 5.- Sistema de fosfotransferasa (PTS). Tomado y modificado de Sigala, J. C., 2008.

Cuando la glucosa está presente en el medio, la proteína  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  se encuentra principalmente desfosforilada, pues transfiere el grupo fosfato al complejo IIBC. La proteína  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  desfosforilada se une entonces a varias permeasas, inhibiendo la entrada de azúcares no PTS (lactosa, melobiosa, maltosa y glicerol) y en consecuencia impide su aprovechamiento; este fenómeno es conocido como exclusión del inductor (Postma, *et. al.*, 1993). En ausencia de glucosa, la forma fosforilada de la proteína  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  activa a la enzima adenilato ciclasa, aumentando los niveles de AMPc. El AMPc junto con la proteína CRP (CAP) activan la transcripción de un gran número de genes catabólicos. Este sistema PTS para el transporte y fosforilación de azúcares parece estar presente sólo en bacterias que utilizan la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), y está ausente en bacterias aeróbicas estrictas (Romano, A. H. & Conway, T. 1996; Lengeler, J. W., *et. al.* 1999).

En bacterias es frecuente encontrar varios sistemas de transporte para un mismo nutriente p. ej., *Escherichia coli* posee cinco sistemas para transportar la galactosa y tres sistemas para algunos de los aminoácidos. Los diversos sistemas se diferencian en cuanto a su requerimiento energético, su afinidad, su regulación, etc. Lógicamente a lo largo de la evolución se han seleccionado sistemas redundantes de transporte, con objeto de permitir que el microorganismo sobreviva bajo diversas circunstancias ambientales.

La mitad del PEP producido durante la glicólisis es consumido por el sistema PTS (Frankel, D. G., 1996). Esta limitante natural de las células impide tener una mayor cantidad de fosfoenol piruvato para la síntesis de metabolitos de interés industrial, derivados de este precursor cuando *E. coli* utiliza la glucosa como fuente de carbono. Por esta razón, desde hace ya algunos años, se han realizado una serie de esfuerzos encaminados a la comprensión y manipulación de las vías metabólicas que tienen que ver (directa o indirectamente) con la síntesis, catabolismo y utilización del PEP en diferentes especies y variedades de bacterias. Hasta ese entonces, las estrategias utilizadas consistían en la delección de las piruvato cinasas (cepas *PykA<sup>-</sup>* y *PykF<sup>-</sup>*) y/o delección de la piruvato carboxilasa (mutantes en *ppc*), además de la sobreexpresión de *ppsA* (Fig. 6).

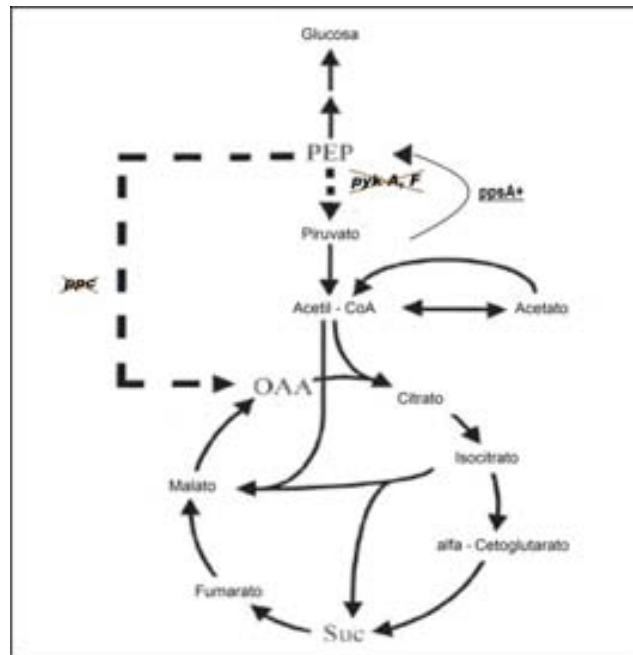


Fig. 6.- Esquema del metabolismo de *Escherichia coli*, que muestra las estrategias utilizadas para una mayor disponibilidad de PEP en la célula. (Tomado y modificado de Kao, K., *et. al.* 2005)

Otra estrategia es la eliminación del sistema PTS que en teoría duplicaría la disponibilidad de PEP para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (Flores, N., *et. al.* 1996; Liao, J., *et. al.*, 1996; Báez, J., *et. al.*, 2001). Recientemente, con el objeto de obtener una cepa con una mayor capacidad en cuanto a la disponibilidad del PEP, en nuestro laboratorio se lograron generar mutantes carentes del sistema



PTS, pero con una capacidad de asimilación rápida de glucosa (Flores N., *et. al.* 1996). De esta forma se buscó explotar al máximo la cantidad de PEP disponible, tratando de canalizarlo a vías de síntesis de distintos metabolitos. Sin embargo, la inactivación de PTS no fue fácil, debido a que este sistema de transporte es esencial en la fisiología celular.

XI. Generación de cepas PTS<sup>-</sup> y PTS<sup>-</sup> Glc<sup>+</sup> (Operón *ptsHlcr*):

En *E. coli*, los genes *ptsH*, *ptsI* y *crr*, que codifican para las enzimas HPr, EI y IIA<sup>Glc</sup> respectivamente, se encuentran adyacentes en el cromosoma formando un operón (Fig. 7), y el gen *ptsG* que codifica para la proteína IIBC se encuentra en otro locus (De Reuse, H., *et. al.* 1984). Mutantes en los genes *ptsI* y *ptsH* son incapaces de crecer en carbohidratos PTS, mientras mutantes en las proteínas IIA<sup>Glc</sup> y IIBC no crecen en el carbohidrato para el cual son específicos. En el caso de *E. coli*. y en general de todas las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, el gen *crr* se encuentra dentro del operón *pts*, cuyo producto (proteína IIA<sup>Glc</sup>), pudiera ser considerado una proteína general del sistema PTS.



Fig. 7.- Operón *ptsHlcr*

La delección del operón *ptsHlcr* en *E. coli* disminuye la capacidad de la bacteria para encontrar, seleccionar, transportar y metabolizar varios tipos de fuentes de carbono. Por este motivo, la primer cepa carente del sistema PTS (PB11 PTS<sup>-</sup>, obtenida a partir de la cepa silvestre JM101 mediante la inactivación en cromosoma del operón *ptsHlcr*), no es adecuada para los propósitos de producción ya que su crecimiento en glucosa se ve afectado de manera importante ( $\mu = 0.1 \text{ hr}^{-1}$ ); (Flores N., *et. al.*

1996; 2005). Posteriormente y mediante un método de adaptación basado en cultivo continuo, se lograron obtener dos cepas (PB12 y PB13) con la capacidad de asimilar más rápidamente la glucosa (PTS<sup>-</sup> Glc<sup>+</sup>). Lo anterior se llevó a cabo sometiendo a la cepa PB11 a un sistema de cultivo en lote durante 70 horas; lo que generó mutantes espontáneas. Dichas mutantes espontáneas se sometieron después a un sistema de cultivo continuo o quimiostato. Aumentando la tasa de dilución del quimiostato ( $D = 0.4 \text{ h}^{-1}$  hasta  $0.8 \text{ h}^{-1}$ ) se aislaron mutantes a partir de sus velocidades de crecimiento. Se escogieron dos mutantes, una de menor y otra de mayor velocidad, denominadas respectivamente PB12 ( $\mu=0.42 \text{ h}^{-1}$ ) y PB13 ( $\mu=0.49 \text{ h}^{-1}$ ) (Flores N., *et al.*, 1996). Se ha demostrado que el flujo de carbono que se dirige hacia la síntesis de compuestos aromáticos, es mayor en la cepa PB12 que en la silvestre JM101 (Flores, S., *et. al.* 2002; Báez-Viveros, J. L., *et.al.*, 2004).

## XII. Caracterización de las cepas PTS<sup>-</sup> y PTS<sup>-</sup> Glc<sup>+</sup>:

El fosfoenolpiruvato (PEP) es una molécula central en el metabolismo; su posición en la compleja red metabólica celular lo convierte en un metabolito precursor de muchas otras moléculas importantísimas no solo para el funcionamiento de la célula, sino también para la sociedad, pues algunos de los metabolitos generados a partir del PEP en el interior celular tienen un alto valor comercial. La disponibilidad intracelular de este precursor está controlada y actualmente la ingeniería de vías metabólicas ha logrado aumentar dicha disponibilidad eliminando en la cepa silvestre JM101 de *Escherichia coli* el operón *ptsHlcr*, el cual codifica para el sistema de fosfotransferasa (PTS). Este sistema consume más del 50% del PEP intracelular originado por la glicólisis (Postma, P. W., *et. al.* 1996; Flores, N., *et. al.* 2005).

A partir de esta cepa PTS<sup>-</sup> denominada PB11 que crece lentamente en glucosa ( $\mu = 0.10 \text{ hr}^{-1}$ ), y por un proceso de evolución adaptativa, se generó la cepa PB12 (PTS<sup>-</sup> Glc<sup>+</sup>), la cual recuperó parcialmente la capacidad de asimilar más rápidamente la glucosa ( $\mu = 0.42 \text{ hr}^{-1}$ ). Durante este proceso de selección aparecieron muchas mutaciones, algunas de las cuales ya han sido identificadas y varias mapean en

genes regulatorios como: *arcB*, *barA*, *rssA*, *yjjU*, *ypdA* y *rnaI*. (Flores, N., *et. al.*, 2005; Datos sin publicar). La cepa PB12 tiene además la capacidad de poder redirigir parte del PEP no utilizado por PTS hacia la síntesis de compuestos aromáticos a partir de glucosa con alto rendimiento (Flores, S. *et. al.* 2002; Flores, N. *et. al.* 2005; Báez, *et. al.* 2001; 2004). La ausencia de PTS en PB11 y PB12 es también la responsable de la pérdida de la represión catabólica en estas cepas. Por ello las cepas PTS-son capaces de utilizar glucosa y otras fuentes de carbono y en ellas coexisten la vía glicolítica y gluconeogénica (Flores, N., *et. al.* 2005).

Buscando identificar los cambios que permiten el crecimiento en glucosa en PB12, se demostró la sustitución del transportador de glucosa del sistema PTS (el complejo IIBC<sup>GlC</sup>) por la permeasa de galactosa, GalP, que además de transportar galactosa, es capaz de transportar otros azúcares como la glucosa. La fosforilación de la glucosa intracelular es llevada a cabo por la glucocinasa (Glk). Ambos genes, tanto el que codifica para la permeasa de galactosa (*galP*), como el que codifica para la glucocinasa (*glk*) se encuentran sobreexpresados en la cepa PB12. Otro aspecto trascendental en la cepa PB12, es una mutación en el gen *arcB*, que cambia un residuo de tirosina por una cisteína en la posición 71 del gen. Esto aparentemente ocasiona una disminución de las funciones del sistema de dos componentes Arc A/B, lo cual impide la represión de genes del ciclo de los ácidos tricarbixílicos (TCA) y del ciclo del glioxalato (Flores, S., *et. al.* 2002; Flores, N., *et. al.* 2005). Es importante resaltar que en la cepa PB12 además de las mutaciones previamente citadas, ocurre la sobreexpresión de varios genes como resultado del proceso de selección; entre ellos se encuentran genes de la glicólisis, gluconeogénesis, TCA y de la cadena respiratoria; también se sabe que se sobreexpresan varios genes que tienen que ver con el metabolismo del ppGpp (Flores, S., *et. al.* 2002; Flores, N., 2005, 2007 y 2008). Ciertamente como ya se mencionó la presencia de un sistema Arc A/B disfuncional en PB12 es aparentemente responsable de la sobreexpresión de los genes de TCA y de la cadena respiratoria; sin embargo, no se conocen aún las causas de la sobreexpresión de otros genes, incluyendo los que son parte del metabolismo del ppGpp y los genes glicolíticos.

Los estudios realizados en ambas cepas, gradualmente han mostrado los cambios sufridos; así, se ha detectado que en ausencia del sistema PTS y en particular en la cepa PB11 que crece muy lento en glucosa, las células inducen una condición de estrés permanente debido a la ineficiencia en la utilización de las fuentes de carbono; esto provoca la sobreexpresión del gen *rpoS*, que codifica para el regulador transcripcional RpoS, el cual puede reemplazar parcialmente al factor  $\sigma^{70}$  durante condiciones de crecimiento limitado (Webber, H., *et al.* 2005; Flores, S., *et al.* 2002; Flores, N., 2005; 2008). Lo anterior, aunado a reportes donde se indica que en cepas carentes del gen *crr* (como las cepas PTS-) la traducción del mensajero del gen *rpoS* no es reprimido por el componente IIA del sistema PTS, permite tener altos niveles de RpoS en la célula incluso durante la fase exponencial de crecimiento; en consecuencia, la transcripción de numerosos genes dependientes de  $\sigma^S$  en cepas PTS- son activados a lo largo de todo su crecimiento (Ueguchi, C., *et al.*, 2001; Flores, N., *et al.*, 2005). No obstante en la cepa PB12, se encontró una mutación en la posición 98 del gen *rpoS*, cambiando el codón TCG (serina) por un codón de término: TAG; como consecuencia de esta mutación se estaría produciendo una proteína incompleta de 32 aminoácidos en lugar de la proteína normal que cuenta con 228 residuos (Flores, N., *et al.*, 2008). Sin embargo, se sabe que la cepa parental JM101 contiene el gen *supE*, que suprime codones de término (mutaciones ámbar) originados por errores en la replicación (Bolívar, F., *et al.*, 1977). De esta manera, se pudiera estar generando menor cantidad de RpoS funcional en la cepa PB12, pero lo suficiente para activar genes altamente dependientes de este factor sigma (Flores, N., *et al.*, 2008).

Estudios posteriores, donde se inactiva el gen *rpoS* en las cepas JM101, PB11 y PB12 mediante la inserción de un cassette de resistencia a tetraciclina, arrojaron disminuciones en las velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ) únicamente en las cepas PTS-. La cepa PB11 disminuyó su  $\mu$  en un 50 % y la cepa PB12 en un 10% (Flores, N., *et al.*, 2008), lo que demuestra un mayor grado de dependencia hacia el factor  $\sigma^S$  en la cepa PB11. Una explicación razonable es que las mutaciones seleccionadas en la cepa PB12 le permitieron modular su grado de estrés, esto debido probablemente a una regulación

diferencial de su metabolismo en ausencia del sistema PTS; esto pudiera indicar que existen menores cantidades de ppGpp intracelular en esta cepa y por consiguiente menor dependencia hacia el factor  $\sigma^S$ . Adicionalmente, la mutación en el gen *rpoS* podría disminuir las concentraciones de este factor sigma, propiciando que muchos genes dependientes de RpoS sean transcritos ahora por el factor sigma 70, pues hay que recordar que numerosos promotores pueden ser afines a más de un factor sigma (Cashel, M., *et. al.* 1996; Artsimovich, I., *et. al.* 2004; Flores, N., *et. al.*, 2008). En este sentido, resulta interesante que los genes que codifican para las enzimas involucradas en el metabolismo del ppGpp se encuentran sobreexpresadas (entre 3 y 5 veces) en PB12.

Otro dato interesante derivado también de los estudios previamente citados, es el hecho de que en la cepa PB12 se encuentran sobreexpresados todos los genes glicólíticos, ya sea creciendo a esta cepa en fuentes ricas de carbono como lo es la glucosa, como en medios con fuentes de carbono pobres como es el acetato (Flores, N., *et. al.*, 2005; Sigala, J. C., *et. al.* 2008). Esto sugiere que durante el proceso de evolución al que fue sometida esta cepa, se generó una o varias mutaciones responsables de éste fenómeno de alta transcripción de este conjunto de genes.

Finalmente, con el objetivo de conocer más al respecto de las mutaciones ocurridas en PB12, se envió el DNA cromosomal de esta cepa, a la compañía Nimblegen (empresa dedicada entre otras cosas a identificar cambios en genomas completos) para la determinación de los cambios surgidos durante el proceso de evolución a la que fue sometida esta bacteria. Gracias a este estudio se identificaron 31 genes que sufrieron mutaciones, ya sea de un aminoácido por otro, cambios en el marco de lectura o generación de codones de término. Dentro de esta serie de 31 genes, seis están involucrados en regulación, cuatro son potenciales ORF's, cinco están relacionados con transporte, tres genes remanentes de profagos, uno de función adaptativa y 12 relacionados con el metabolismo del carbono (Tabla 1).

<b>Gen</b>	<b>Descripción básica</b>	
	<b>ORF's</b>	<b>Pos/Cambio</b>
<i>yafV</i>	Presunta hidrolasa de la familia de las amidasas, NAD(P)-binding	151 R-H
<i>gfcD</i>	Presunta lipoproteína	306 V-L
<i>yddV</i>	Proteína con presunta actividad ciclasa (diguanylate ciclasa)	
<i>rssA</i>	Proteína hipotética	258 R-H
	<b>Profagos</b>	
<i>ykfA</i>	Profago CP4-6; predicted GTP-binding protein	194 A-G
<i>yagN</i>	Presunta proteína del profago CP4-6	109 S-G
<i>ydfN</i>	Profago Qin	115 T-A
	<b>Transporte</b>	
<i>yagG</i>	Miembro no caracterizado de los transportadores de la familia GPH (galactose-pentose-hexuronide).	412 P-V
<i>zitB</i>	Probable transportador de Zinc	
<i>mdlB</i>	Presunta subunidad de un transportador de la superfamilia ABC: ATP-binding component	179 L-V
<i>dgoT</i>	Transportador de galactonato	218 D-G
<i>actP</i>	Permeasa de acetato	244 V-A
	<b>Metabolismo</b>	
<i>sucA</i>	Subunidad del componente E1(0) de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa	124 D-E
<i>moeA</i>	Biosíntesis de molibdopterina	190 Q-Q
<i>dhaM</i>	Subunidad de la dihidroxiacetona cinasa	346 W-stop
<i>ydiQ</i>	Presunta subunidad de la flavoproteína YdiQ-YdiR	73 V-A
<i>chbC</i>	Enzima IIC (Chb) del sistema PTS para la utilización de diacilcitobiosas	11 V-V
<i>glpT</i>	Proteína GlpT, transporte de glicerol	139 P-L
<i>arnT</i>	Monómero, 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa (L-Ara4N) transferasa	398 Y-C
<i>yrbK</i>	Proteína componente de transportadores de la superfamilia ABC (LptA/LptB/YrbK)	131 T-T
<i>dppF</i>	Subunidad de un dipeptido miembro de los transportadores del tipo ABC	227 H-R
<i>rfe</i>	undecaprenyl-phosphate $\alpha$ -N-acetylglucosaminyl transferase	80 A-T
<i>fdhD</i>	Proteína con función desconocida necesaria para la actividad de formato deshidrogenasa	218 S-G
<i>fimH</i>	subunidad menor de fimbrias, implicada en la unión con D-manosa en otros organismos	179 T-A
	<b>Regulación</b>	
<i>ypdA</i>	Supuesta proteína sensora cinasa de un sistema de dos componentes.	200 A-S
<i>barA</i>	Proteína sensora cinasa, trabaja en conjunto con UvrY	366 F-L
<i>rpoD</i>	Factor sigma 70 de la RNA polimerasa	582 V-I
<i>arcB</i>	Proteína sensora cinasa	71 Y-C
<i>yjjU</i>	Presunto regulador transcripcional	113 T-I
<i>rna</i>	Monómero de la RNasa I, rompe enlaces fosfodiéster entre 2 nucleótidos	90 A-T
	<b>Adaptación</b>	
<i>rspB</i>	Se activa en escasez de carbono en el medio, probable oxidoreductasa	

Tabla 1.- Genes con mutaciones en la cepa PB12. Esta clasificación se hizo de acuerdo a su función tomando como referencia la base de datos de Ecocyc (<http://ecocyc.org>).

### **Objetivo general:**

- Analizar mediante experimentos de complementación si las mutaciones puntuales en los genes *barA*, *yjjU* y *rssA* tuvieron algún efecto sobre el crecimiento de la cepa PB12. Para el caso específico del gen *barA*, buscar si la mutación surgida en este gen, tiene algún efecto sobre el sistema de regulación global Csr. Asimismo, se buscará identificar diferencias de crecimiento al inactivar los genes reguladores seleccionados en las cepas parentales JM101 y PB11.

### **Objetivos específicos:**

- Evaluar la importancia de los genes reguladores, así como la relevancia de sus mutaciones, para seleccionar los que se incluirán en este estudio.
- Re-secuenciar los cambios ocurridos en los genes seleccionados para corroborar sus mutaciones.
- Clonar y expresar los genes reguladores seleccionados en su versión silvestre en la cepa PB12, en un plásmido de bajo número de copias.
- Inactivar en cromosoma éstos genes reguladores en las cepas JM101, PB11 y PB12.
- Analizar el efecto de las mutaciones en la cepa PB12 utilizando diferentes estrategias:
  - Determinación de la  $\mu$  al complementar con los distintos genes silvestres a la cepa PB12.
  - Determinación de la  $\mu$  al inactivar los genes reguladores en las cepas parentales.
  - Determinación de actividades de  $\beta$ -galactosidasa utilizando el gen *lacZ* como gen reportero contenido en el plásmido pCBZ1 (Gudapaty S., *et. al.* 2001), el cual contiene la fusión *csrB-lacZ*, en las cepas JM101, PB11 y PB12, con el objetivo de establecer un posible efecto de la mutación en el gen *barA* sobre el sistema de regulación global Csr.

## **Hipótesis:**

- Al complementar a la cepa PB12 con los genes silvestres de aquellos en los que ocurrieron mutaciones, podría presentarse un impacto negativo en su crecimiento; esto sería posible si asumimos que las mutaciones en dichos genes le confirieron ventajas adaptativas a la cepa. Del mismo modo, si las mutaciones ocasionan deficiencias en las proteínas para las cuales codifican estos genes, la inactivación de éstos, debería permitir un mejor crecimiento en la cepa PB11. En cuanto a la determinación de actividades de  $\beta$ -galactosidasa, es probable encontrar diferencias significativas entre la cepa PB12 y las cepas parentales que pudieran deberse a los efectos de la mutación en el gen *barA*.



## Resultados:

### I. Selección y resecuenciación de genes reguladores:

Basándose en los genes que cambian en la cepa PB12 con respecto a su predecesora PB11 y la silvestre JM101, se seleccionaron aquellos genes cuyos productos pudieran estar actuando de manera directa o indirecta en la regulación de la expresión de genes. Como resultado de esta selección se analizaron cinco genes como potenciales candidatos a ser o colaborar en la regulación génica: *rssA*, *ypdA*, *barA*, *rna* y *yjjU* (Tabla 1). De ésta lista de cinco genes se llevó a cabo una segunda ronda de selección que se basó en el tipo y la posición de la mutación en el gen, así como el gen afectado; es decir, dentro de este grupo de genes se evaluó la probabilidad de que las mutaciones tuvieran un efecto sobre la función del gen; considerando también que papel desempeñaba la proteína codificada por ese gen. A raíz de esta nueva selección, la lista de genes se redujo a tres: *barA* (donde la mutación se origina entre las secuencias conservadas H y N de la proteína, la cual desempeña un papel fundamental en el metabolismo global de la célula), *yjjU* (donde la mutación se origina en el primer tercio de la proteína, y se presume tiene funciones reguladoras) y *rssA* (donde la mutación se origina en el último tercio de la proteína, y se encuentra dentro del operón *rssAB*). Cabe señalar que los datos estructurales que se tenían de la proteína codificada por el gen *rna*, indicaba que la mutación se habían originado fuera del sitio catalítico, principal razón por la cual se decidió no incluir en este estudio. Para el caso de la proteína codificada por el gen *ypdA*, no se conoce la red de regulación en la cual participa, situación que orilló a no incluirla en este estudio. No obstante no se descarta que dichas mutaciones puedan tener efecto sobre el crecimiento de la cepa PB12, por lo que se contempla la posibilidad de analizarlas en estudios futuros.

Los tres genes a analizar se amplificaron por PCR y se secuenciaron en la unidad de síntesis y secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM para verificar los resultados enviados por la empresa NimbleGen (Tabla 2). Dichos genes se clonaron en un plásmido de bajo

número de copias y se utilizaron para transformar a la cepa PB12 buscando esencialmente algún tipo de efecto en el crecimiento.

Gen	Posición en el genoma	Mutaciones				
		Silvestre	→	PB12	Nucleótido	Pos/Cambio
<i>barA</i>	2913079..2915835	TTC		cTC	1096	366 F-L
<i>yjjU</i>	4610434..4611507	ACT		gCT	338	113 T-I
<i>rssA</i>	1288429..1289373	CGC		CaC	773	258 R-H

Tabla 2.- Resultados de cinco genes que cambian en PB12 enviados por la empresa NimbleGen.

## II. Análisis de las mutaciones

- ♣ *barA*: El gen *barA* codifica para una proteína de 918 aminoácidos denominada BarA (bacterial adaptive responses). Como se ha señalado, BarA es una proteína sensora cinasa miembro de un sistema de dos componentes ([Nagasawa, S., et. al. 1992](#)). Dentro de las proteínas sensoras cinasas, BarA es parte de un grupo de cinasas tripartitas; esta proteína consta de un dominio citosólico en su extremo amino; un par de regiones transmembranales unidas entre sí por un puente periplásmico; un dominio transmisor el cual posee un residuo conservado de histidina, un dominio receptor central con un residuo conservado de aspartato y un dominio donador de fosfato con un residuo conservado también de histidina en su extremo carboxilo. Estudios recientes demuestran que BarA trabaja en conjunto con UvrY (su regulador de respuesta), el cual se propone actúa sobre genes del metabolismo del carbono ([Pernesting, A. K. et. al. 2001, 2003](#)). La cepa PB12 contiene una mutación en *barA*, en la cual cambia un residuo de fenilalanina por una leucina en la posición 366 de la proteína; esta mutación se localiza en el primer dominio ó dominio transmisor, relativamente cerca de dos regiones importantes para el funcionamiento de la proteína; la primera es el sitio donde se encuentra el residuo conservado de histidina esencial en este dominio, y la segunda región involucra los sitios necesarios para unir a la molécula de ATP, de la cual se toma el fosfato necesario para iniciar

la cascada de señalizaciones (Fig. 8). Por esta razón se llevaron a cabo aproximaciones experimentales, para determinar los posibles efectos de la mutación sobre el sistema de regulación global Csr, que está estrechamente ligado con el sistema de dos componentes BarA/UvrY.

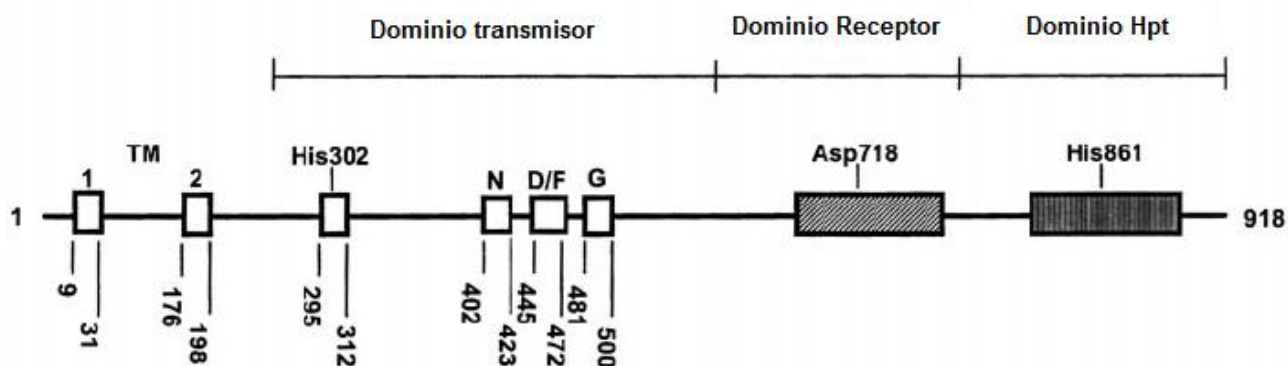


Fig 8. Dominios estructurales que conforman a la proteína BarA (Pernesting, *et. al.* 2001)

- ♣ *yjjU*: El gen *yjjU* codifica para una presunta proteína de 357 aminoácidos, a la cual le atribuyen funciones hipotéticas, todas ellas diferentes según la base de datos a la cual se acceda. Ecocyc (<http://ecocyc.org>) la reporta como un presunto factor de transcripción, Ecogene (<http://ecogene.org>) como una proteína hipotética y GenomeNet ([www.genome.jp](http://www.genome.jp)), al igual que RegulonDB (<http://regulondb.ccg.unam.mx>) como una presunta esterasa involucrada en el metabolismo de lípidos. No obstante a la variedad de funciones atribuidas a este gen, no se ha efectuado ninguna aproximación de forma experimental. Las funciones antes mencionadas se basan en un análisis informático a través del uso de software diseñado para comparar un número determinado de variables de genes desconocidos para posteriormente hacer un ejercicio de analogía (ontología es el término utilizado en informática) con los genes conocidos. De acuerdo a un estudio de anotación de genes en *E. coli* (Serres, M. H. *et. al.* 2001),

el gen *yjjU* se propone como un presunto factor de transcripción; por esta razón se incluyó a este gen como un candidato potencial para actuar de manera importante sobre los genes involucrados en el metabolismo del ppGpp o algunos otros genes que también se sobreexpresan en la cepa PB12. La mutación se originó en la posición 338 del gen, que corresponde al aminoácido 113 de la proteína, donde se sustituyó un residuo de treonina por una isoleucina.

- ♣ *rssA*: El gen *rssA* codifica para una proteína hipotética de 314 aminoácidos. Para el caso de este gen, existe unanimidad en todas las bases de datos, las cuales coinciden en señalar la funcionalidad incierta del mismo. La razón que llevó a elegir este gen como un candidato potencial, el cual pudiera arrojar diferencias en cuanto al nivel de transcripción génica en la cepa PB12, es que este gen se encuentra situado en el operón *rssAB* donde se localiza también el gen que codifica para la proteína RssB, el cual como ya se mencionó anteriormente, está implicado en la regulación de RpoS ([Mika F. & Hengge, R. 2005](#)). Es posible que el producto del gen *rssA* pudiera estar involucrado de algún modo en la degradación del factor de transcripción RpoS, situación que se repite frecuentemente en distintos operones, donde los genes que allí residen, se encuentran relacionados en la realización de un fin común. El estudio de este gen pudiera aportar información sobre las variaciones transcripcionales que se presentan en la cepa PB12, además de conducirnos a un eventual reconocimiento de las funciones de RssA.

### III. Clonación de las versiones silvestres de los genes *barA*, *yjjU* y *rssA*

Con la finalidad de evaluar el efecto de *barA*, *yjjU* y *rssA* en sus versiones silvestres sobre la cepa PB12, se decidió clonar estos genes por separado, en el plásmido pCL1920 (Sección de Materiales y metodología experimental) para después expresar cada gen en la cepa PB12, y así determinar en

primera instancia el efecto sobre su velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ); Ver sección VI. El pCL1920 es un vector de bajo número de copias (5 copias por célula). Se utilizó este vector debido a que creemos, que los genes seleccionados podrían tener funciones reguladoras, y por tanto podrían ser capaces de ejercer una modulación en la expresión génica; el tenerlos en un vector con alto número de copias pudiera ejercer efectos negativos sobre el crecimiento de la cepa y en consecuencia para llevar a cabo estudios posteriores. Es importante señalar que se inactivaron cada uno de los genes en las tres cepas receptoras antes de expresar la versión silvestre; lo anterior con la finalidad de eliminar el efecto que pudiera presentar el hecho de tener el gen mutado en cromosoma, cuando lo que se intenta es conocer el efecto del gen silvestre (en plásmido); no obstante no se descartó el estudio las cepas cuando se expresa en ellas la versión silvestre en plásmido sin eliminar los genes en cromosoma. Eventualmente se buscará integrar en el cromosoma los genes silvestres en la cepa PB12

#### IV. Inactivación de los genes *barA*, *yjjU* y *rssA* en la cepa PB11 y PB12

De manera opuesta a lo que sucede en la cepa PB12, su predecesora la cepa PB11 presenta dificultad en su crecimiento en glucosa; se ha propuesto por tanto que las mutaciones ocurridas en la cepa PB12 son responsables de la recuperación del crecimiento en esta cepa. Una manera indirecta de comprobar que las mutaciones en genes regulatorios pudieran ser las responsables en el cambio en los niveles de expresión en PB12 sería inactivar en la cepa PB11 y la cepa silvestre JM101, los genes *barA*, *yjjU* y *rssA* de forma independiente y evaluar el efecto que surten cada una de estas inactivaciones sobre la  $\mu$ , sin olvidar evaluar en estudios posteriores, los posibles efectos en los niveles de transcrito de genes del metabolismo central. Partiendo de esta idea los tres genes se inactivaron de manera independiente por la inserción de un cassette de resistencia a cloramfenicol en las cepas JM101, PB11 y PB12 mediante el método Datsenko-Wanner (Sección de materiales y metodología experimental). La inactivación de estos genes en la cepa PB12 se efectuó como ya se había mencionado, para tratar de obtener resultados más “limpios”, cuando se complementara con el

plásmido que carga la versión silvestre de cada gen, es decir, eliminando el efecto que pudiera darse al tener el producto del gen mutado en cromosoma en esta cepa. Después de la inactivación en cada gen, en cada una de las cepas, se determinarán las  $\mu$ 's.

#### V. Posible efecto de la mutación en *barA* sobre el circuito regulatorio CsrA/CsrB

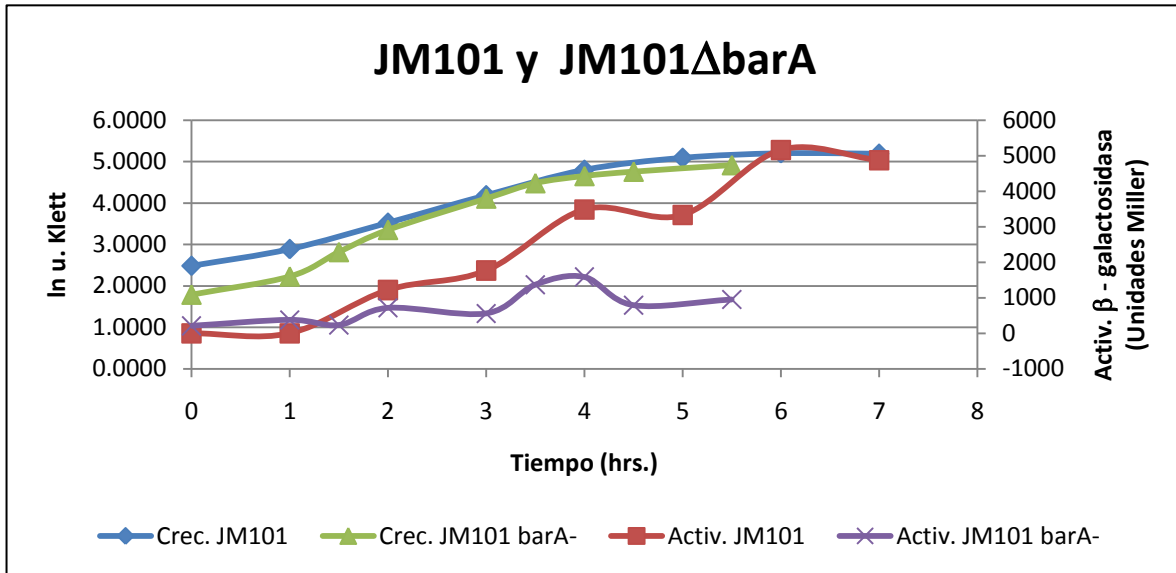
Para evaluar el posible efecto de la mutación en *barA* en la cepa PB12, y su relación con el circuito regulatorio CsrA/CsrB, se utilizó el plásmido pCBZ1 que contiene la secuencia promotora del gen *csrB* unida al gen *lacZ*. Los resultados de los ensayos de actividad de  $\beta$ -galactosidasa, que se muestran en las gráficas (1, 2, 3 y 4), indican que en la cepa PB12, el gen *lacZ* no se expresa a los niveles elevados de su predecesora PB11 ni de la cepa silvestre JM101. Por otro lado, los niveles de actividad de  $\beta$ -galactosidasa en las cepas JM101, PB11 y PB12 cuando *barA* se encuentra inactivo disminuyen drásticamente. En la cepa PB12, se observan niveles de actividad menores que las cepas PB11 y JM101 a lo largo de toda la cinética. La inactivación en cromosoma del gen *barA*, disminuye aún más los niveles de actividad detectados en la cepa PB12; por lo tanto si se asume que la mutación pudo originar una baja en el funcionamiento de la proteína BarA, dicha baja en el funcionamiento aparentemente no es total, dado que la inactivación del gen *barA* en cromosoma disminuye notablemente la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de la cepa (Gráfica 3 y 4).

Cuando la cepa PB12 se complementa con el plásmido pCL*barA* (que carga el gen *barA* silvestre), la actividad de  $\beta$ -galactosidasa se restituye e incluso supera los niveles de la cepa PB12, (Gráfica 3 y 4), llegando a niveles similares a los de la cepa silvestre (JM101). Cabe señalar que cuando se inactiva el gen *barA* en la cepa PB12, y luego se complementa con la versión silvestre del gen *barA* en plásmido (cepa PB12 $\Delta$ *barA*/pCL*barA*), la actividad detectada supera por poco, la actividad observada en la cepa PB12 $\Delta$ *barA* (Gráfica 3 y 4). Todos los resultados presentados, se derivan de al menos, dos experimentos independientes por duplicado.

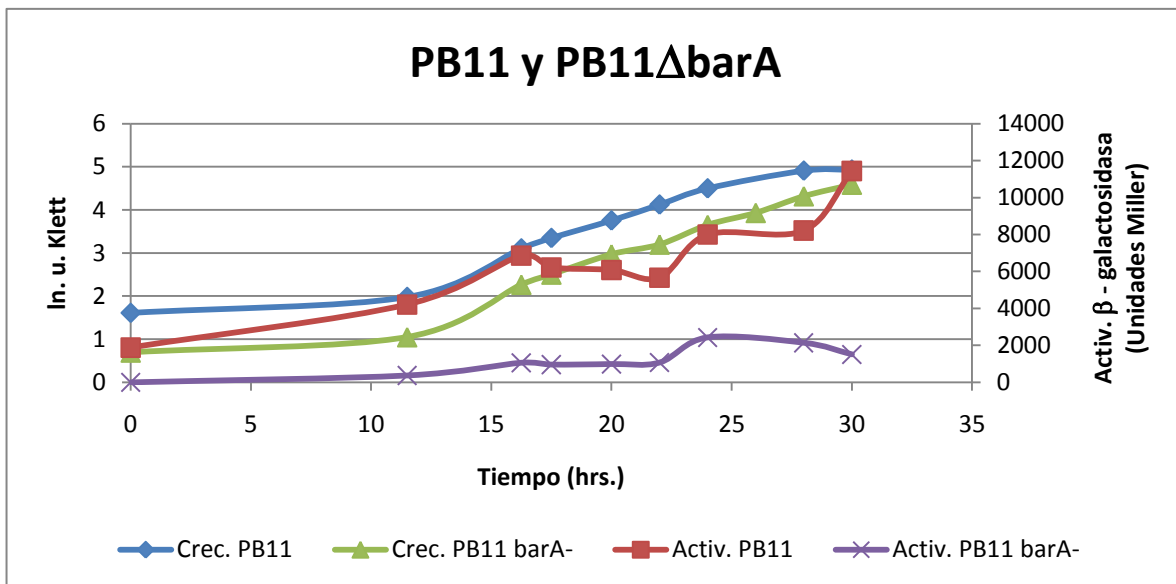
Con los datos anteriores no es posible establecer si las bajas concentraciones de CsrB (determinadas indirectamente a través de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa) encontradas en la cepa PB12 se deben al efecto de la mutación en el gen *barA*, sobre todo si se toma en cuenta que las cepas JM101 y PB11 poseen el gen *barA* íntegro en su cromosoma y ambas cepas difieren considerablemente en las concentraciones de ésta molécula en las condiciones de crecimiento utilizadas. Una posible explicación a los valores encontrados en ambas cepas podría atribuirse a su crecimiento, pues mientras la cepa JM101 tarda alrededor de 7 horas en llegar a la fase estacionaria, la cepa PB11 llega a esa misma fase en alrededor de 30 horas, lo que significaría que la cepa PB11 estaría produciendo proteína por más tiempo, y por ende mayor actividad de  $\beta$ -galactosidasa; por lo tanto, la posibilidad de que la disminución en las concentraciones de CsrB en la cepa PB12 tenga relación con la mutación localizada en el gen *barA* no se debe descartar, tomando en cuenta que el tiempo que tarda en crecer la cepa PB12 no es mucho mayor al de la cepa silvestre (PB12 tarda alrededor de 10 horas para llegar a fase exponencial).

En contraparte, si se asume que la mutación pudo ocasionar deficiencias a la proteína BarA, entonces al complementar a la cepa PB12 $\Delta$ *barA*, con el plásmido que expresa la versión silvestre del gen, lo esperado era que los niveles de CsrB se restablecieran y fueran similares a los observados en la cepa JM101; sin embargo, los niveles de actividad superan por muy poco los observados en la cepa PB12 $\Delta$ *barA* y son cercanos a los encontrados en la cepa PB12, lo cual sugiere que la mutación no tendría aparentemente ningún efecto; aunque tampoco es posible confirmarlo de manera categórica, dado que el tener al gen *barA* en plásmido pudiera estar ocasionando algún conflicto fisiológico en la célula. También existe la posibilidad de que cada cepa tenga niveles de expresión específicos (expresión de *csrB*); situación que impediría, por el momento, determinar los alcances de la mutación, en especial si consideramos que dichas variaciones pudieron ser resultado de diversos factores, que son propios del sistema y su compleja regulación, no se debe perder de vista que los

elementos de éste tipo de sistemas están inter-relacionados y lo que afecta la expresión y funcionamiento de cada elemento, repercute directa y/o indirectamente en los demás.

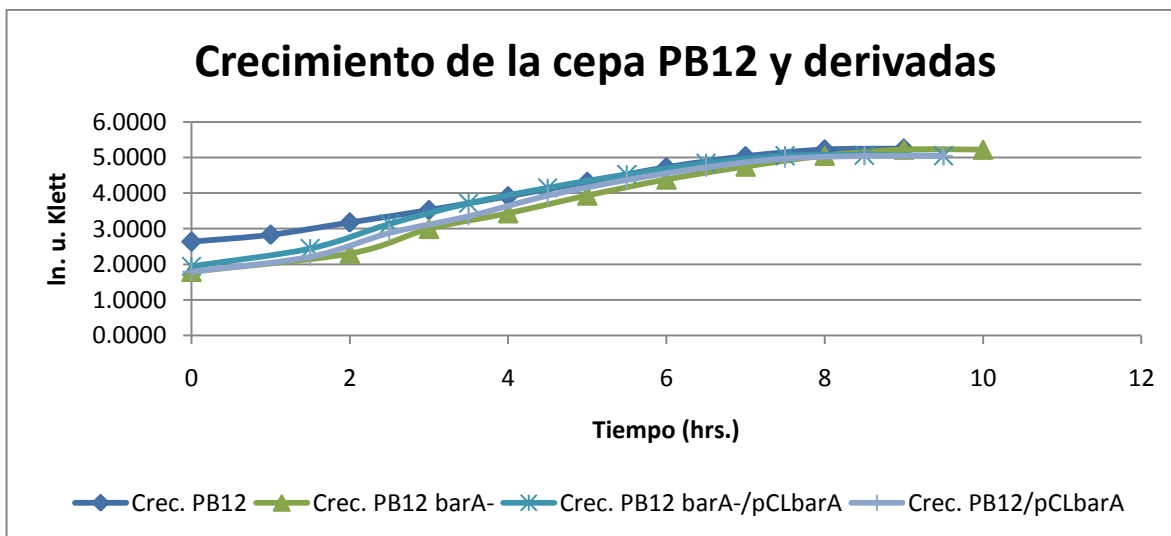


Gráfica 1.- Crecimiento y actividad de  $\beta$ -galactosidasa, obtenidas en las cepas JM101 y JM101 $\Delta$ barA.

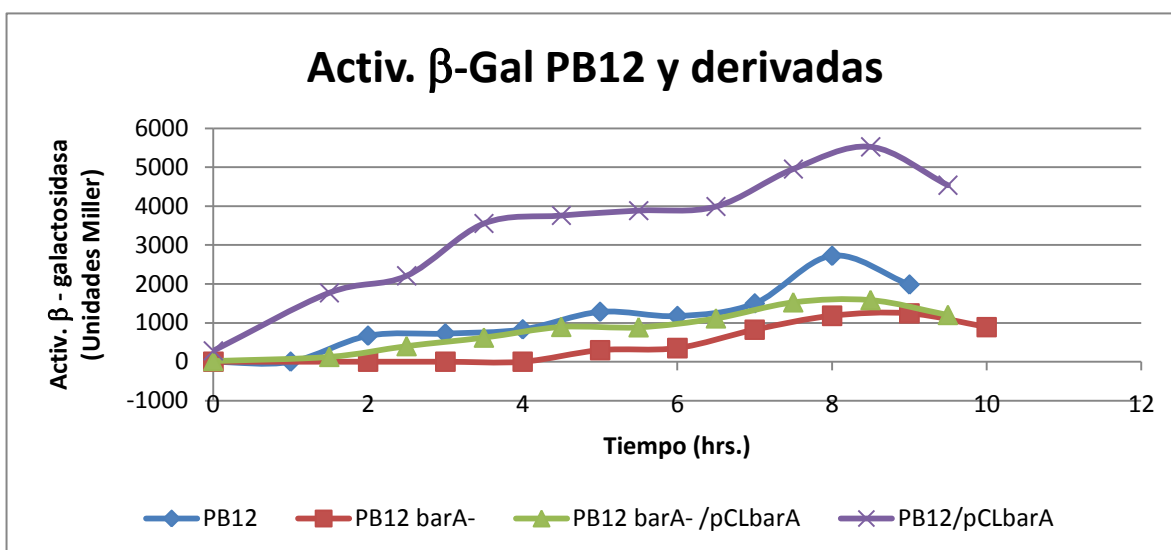


Gráfica 2.- Crecimiento y actividad de  $\beta$ -galactosidasa, obtenidas en las cepas PB11 y PB11 $\Delta$ barA.





Gráfica 3.- Crecimiento de la cepa PB12 y derivadas.



Gráfica 4.- Actividad de β-galactosidasa, obtenidas en las cepas PB12 y sus derivadas.

VI. Determinación de las  $\mu$ 's en las cepas derivadas de PB11 y PB12 relacionadas con el gen *barA*:

Se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento en las distintas cepas derivadas de la cepa PB12, tratando de establecer un posible impacto de la mutación en el gen *barA* en esta cepa. Las cepas evaluadas se muestran en la tabla 3, así como sus respectivas  $\mu$ 's.

Cepa	$\mu$	Porcentaje	n	Desv. Est.	Coef. De Var.

PB12	0.43	100	4	0.016	3.9
PB12 $\Delta$ barA	0.46	107	4	0.001	0.27
PB12 pCL1920	0.42	98	4	0.009	2.3
PB12 $\Delta$ barA/pCL1920	0.43	100	4	0.012	2.9
PB12 $\Delta$ barA/pCLbarA	0.38	88	4	0.005	1.5
PB12/pCLbarA	0.37	86	4	0.01	2.8

Tabla 3.- Velocidades específicas de crecimiento de varias derivadas de PB12 que involucran al gen *barA*.

Los resultados muestran una reducción de alrededor del 12% en la cepa PB12 $\Delta$ barA/pCLbarA y de un 14% en la cepa PB12/pCLbarA con respecto a la PB12. Por su parte, la cepa PB12 $\Delta$ barA no modifica su  $\mu$  de manera sustancial. Estos datos señalan que la complementación con el gen *barA* en plásmido en su versión silvestre en la cepa PB12 y PB12 $\Delta$ barA, tiene efectos negativos sobre el crecimiento de la cepa PB12. Dichos datos sugieren que la mutación seleccionada en el gen *barA* en esta cepa, pudieran ser parcialmente responsable de la recuperación en el crecimiento de la cepa PB12. Al parecer en el caso del gen *barA*, tal y como ocurrió en el gen *arcB*, se pudieran haber seleccionado mutaciones puntuales en genes reguladores que modifican la función moduladora original de estas las proteínas. Sin embargo, si se toman también en cuenta los datos de actividad de  $\beta$ -galactosidasa, y se complementan con las velocidades específicas de crecimiento, es posible observar que no existe relación aparente entre el nivel de expresión de *csrB* (determinado indirectamente a través de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa) en la cepa y su crecimiento; lo mismo sucede para el caso de la cepa PB11. Mientras la cepa PB11 presenta los mayores niveles de CsrB y tiene una  $\mu$  de  $0.13 \text{ h}^{-1}$  (Tabla 4), la cepa PB12 presenta los niveles más bajos de CsrB y su  $\mu$  es mayor ( $0.43 \text{ h}^{-1}$ ) que el de la cepa PB11, situación que en un principio sugeriría una relación indirecta entre crecimiento y concentración de CsrB; no obstante la inactivación del gen *barA* en la cepa PB11 redujo

los niveles de actividad de  $\beta$ -galactosidasa a valores similares a los encontrados en la cepa PB12 (Gráfica 2 y 3), sin encontrar diferencias significativas en el crecimiento entre las cepas PB11 y PB11 $\Delta$ *barA* (Tabla 4).

Cepa	$\mu$	Porcentaje	n	Desv. Est.	Coef. De Var.
PB11	0.13	100	4	0.001	1.5
PB11 $\Delta$ <i>barA</i>	0.12	92	4	0.001	1.5

Tabla 4.- Velocidades específicas de crecimiento de la cepa PB11 y su mutante en el gen *barA*

Los datos obtenidos de las complementaciones con el gen silvestre *barA* en plásmido en la cepa PB12 y PB12 $\Delta$ *barA* refuerzan lo anterior pues en este caso tampoco se encontró relación entre los niveles de CsrB y crecimiento, dado que la cepa PB12/pCL*barA* alcanzó niveles similares a los encontrados en la cepa JM101 (Gráfica 1 y 3) y su  $\mu$  disminuyó un 14% (Tabla 3) con respecto a la cepa PB12; por su parte, la cepa PB12 $\Delta$ *barA*/pCL*barA* también disminuyó su  $\mu$  en un 12% (Tabla 3) y las concentraciones de CsrB fueron menores a las de la cepa PB12/pCL*barA* (Gráfica 3 y 4).

De lo anterior no se descarta que la diferencia entre  $\mu$ 's entre las cepas (PB12 y derivadas), pueda deberse a la presencia, ausencia ó mutación en *barA*, puesto que es posible que el sistema de dos componentes BarA-UvrY no tenga que ver exclusivamente con la expresión de CsrB y CsrC y pudiera tener implicaciones sobre otros genes, situación que aún no se ha podido comprobar.

Un dato interesante que es necesario resaltar, es que la disminución en la  $\mu$  de estas cepas, se da cuando existen copias adicionales de *barA*; es decir, el crecimiento no se ve afectado en la PB12 (una copia de *barA* en cromosoma), PB12 $\Delta$ *barA* (Ninguna copia de *barA*), ni PB12/pCL1920 ó PB12 $\Delta$ *barA*/pCL1920 (Tabla 3). En cambio, vemos disminuciones del crecimiento, cuando existen copias adicionales del gen *barA*: PB12 $\Delta$ *barA*/pCL*barA* (5 copias), y PB12/pCL*barA* (6 copias), lo que

sugeriría que son las copias adicionales del gen *barA*, las que abaten el crecimiento. Dicho de otro modo, la restitución del gen silvestre per se, podría no ser la causa de la disminución del crecimiento. Es de llamar la atención, que la ausencia del gen *barA* no resulta en una desventaja en el crecimiento de PB12, situación que pone de manifiesto que los niveles de CsrA modulados a través de CsrB, no parecieran estar siendo cruciales en la recuperación del crecimiento de la cepa PB12, aunque también existe la posibilidad de que los niveles de CsrA difieran también entre cada cepa, siendo los niveles de CsrA en PB12 los más elevados, lo que a final de cuentas le rendiría ventajas a la cepa, y no los niveles de CsrB, independientemente de que dichos niveles pudieran verse afectados con la mutación. Con respecto a la cepa PB11 $\Delta$ *barA*, donde la  $\mu$  no se vio afectada, no necesariamente indicaría que la mutación sufrida en el gen *barA* no le haya dado ventajas a la cepa PB12, pues hay que recordar que al agregar en plásmido la versión silvestre de este gen tanto en cepa PB12 $\Delta$ *barA*, como en la cepa PB12 la  $\mu$  disminuye, es decir, la versión silvestre del gen ó copias adicionales al del cromosoma al parecer afectan negativamente el crecimiento de la cepa PB12.

#### VII. Determinación de las $\mu$ 's en las cepas derivadas de PB11 y PB12 relacionadas con el gen *yjjU*:

Para avanzar en la comprensión del posible impacto de la mutación en el gen *yjjU* surgida durante el proceso de evolución adaptativa, se generaron mutantes en este gen y posteriormente se complementó con la versión silvestre en plásmido. Los resultados muestran que cuando se elimina el gen *yjjU* en la cepa PB12, la  $\mu$  se ve afectada alrededor de un 20%. Por otra parte, la  $\mu$  también disminuye cuando se complementa a la cepa PB12 $\Delta$ *yjjU* con el gen *yjjU* silvestre en plásmido, reduciendo su crecimiento de forma acentuada, pues su  $\mu$  desciende alrededor de un 37% (Tabla 5). Cuando a la cepa PB12 se le complementa con el plásmido que carga la versión silvestre del gen *yjjU*, se observa una disminución de alrededor del 10% la  $\mu$ .

Tomando en consideración todos estos datos, se puede sugerir que la mutación pudiera haberse seleccionado durante el proceso de evolución, gracias a la ventaja otorgada a la cepa PB12, ya que los resultados podrían estar indicando que la mutación establece cierto nivel de adecuación en esta cepa, misma que le ayudo a crecer metabolizando de mejor forma la glucosa; sin embargo esto es solo una especulación, pues se desconoce la función del gen y el efecto de la mutación. De estos resultados, se puede resaltar la importancia del gen sobre el impacto en el crecimiento de la cepa, dado que tanto la ausencia, como la presencia del gen *yjjU* (en versión silvestre) afecta seriamente su  $\mu$ , sugiriendo a su vez que la mutación probablemente pudo modificar las funciones de la proteína; la cual podría tener funciones de regulación, generando ventajas en la cepa PB12. Esto significaría que el presunto factor de transcripción al modificar su funcionamiento probablemente pudiera haber ocasionado alteraciones en la transcripción de algunos genes que pudieron mejorar el crecimiento de la cepa. No es posible aún establecer qué clase de efecto pudo generar la mutación; sin embargo, estos resultados conducen a proponer la probabilidad de que la mutación en el gen *yjjU* pudo tener efecto sobre el crecimiento de la cepa PB12.

<b>Cepa</b>	<b><math>\mu</math></b>	<b>Porcentaje</b>	<b>n</b>	<b><i>Desv. Est.</i></b>	<b><i>Coef. De Var.</i></b>
PB12	0.43	100	4	0.016	3.9
PB12 $\Delta$ yjjU	0.34	79	4	0.003	0.9
PB12 pCL1920	0.42	98	4	0.009	2.3
PB12 $\Delta$ yjjU/pCL1920	0.34	79	4	0.006	1.8
PB12 $\Delta$ yjjU/pCLyjjU	0.27	63	4	0.014	5.4
PB12/pCLyjjU	0.39	91	4	0.010	2.6

Tabla 5.- Velocidades específicas de crecimiento de varias derivadas de PB12 que involucran al gen *yjjU*.

Si la mutación seleccionada en el gen *yjjU* ocasionara una disminución en el funcionamiento de la proteína para la cual codifica dicho gen, y esto hubiera permitido que la cepa PB12 creciera de mejor forma en un sustrato como la glucosa, una manera indirecta de comprobarlo sería inactivar el gen *yjjU* en la cepa PB11 y evaluar su  $\mu$  en glucosa, esperando que la inactivación aumente la  $\mu$ . Los resultados al inactivar el gen, indican un incremento del 23% en la  $\mu$  en la cepa PB11 $\Delta$ *yjjU* con relación a la cepa PB11 (Tabla 6) y esto sugiere que el efecto de la mutación en PB12, pudiera haber tenido que ver con la reducción en el funcionamiento de esta proteína. De ser el caso, esto sugeriría que genes probablemente regulados por YjjU pudieran estar reprimidos y/o activados con menor fuerza, generando diferencias transcripcionales en la cepa PB12 con respecto a sus cepas parentales, situación que encaja perfectamente para esta cepa; sin embargo como ya se mencionó anteriormente, se debe tener en cuenta, que no hay evidencias solidas que demuestren que la proteína YjjU lleve a cabo funciones de regulación.

Cepa	$\mu$	Porcentaje	n	Desv. Est.	Coef. De Var.
PB11	0.13	100	4	0.001	1.5
PB11 $\Delta$ <i>yjjU</i>	0.16	123	4	0.005	3.2

Tabla 6.- Velocidades específicas de crecimiento de la cepa PB11 y su mutante en el gen *yjjU*

#### VIII. Determinación de las $\mu$ 's en las cepas derivadas de PB11 y PB12 relacionadas con el gen *rssA*:

Para avanzar en la comprensión del posible impacto de la mutación en el gen *rssA* surgida durante el proceso de evolución adaptativa en la cepa PB12, se generaron mutantes en este gen y posteriormente se complementó con la versión silvestre en plásmido. Para este caso, ni la ausencia ni la presencia del gen, propiciaron cambios significativos en la velocidad específica de crecimiento de la cepa PB12 (Tabla 7); esta situación pudiera señalar por una parte, que la ausencia del gen no es

esencial por lo menos para el crecimiento de la célula, y que copias adicionales de éste tampoco afectan ni positiva ni negativamente al crecimiento.

Cepa	$\mu$	Porcentaje	n	Desv. Est.	Coef. De Var.
PB12	0.43	100	4	0.016	3.9
PB12 $\Delta$ rssA	0.43	100	4	0.018	4.2
PB12 pCL1920	0.42	98	4	0.009	2.3
PB12 $\Delta$ rssA/pCL1920	0.42	98	4	0.013	3.2
PB12 $\Delta$ rssA/pCLrssA	0.42	98	4	0.010	2.5
PB12/pCLrssA	0.4	93	4	0.017	4.4

Tabla 7.- Velocidades específicas de crecimiento de varias derivadas de PB12 que involucran al gen *rssA*.

Por otra parte, los resultados en la cepa PB11 indican que cuando se elimina el gen *rssA*, la  $\mu$  se incrementa en un 30% (Tabla 8), sugiriendo una ventaja selectiva al inactivar este gen. El hecho de que ya no se modificara la  $\mu$  en la cepa PB12 $\Delta$ rssA comparativamente con la cepa PB12 sugiere que quizá el efecto de inactivar el gen *rssA* ya esté presente aparentemente en la mutación puntual que apareció en la cepa PB12 en éste gen. Es importante recordar que en las cepas PTS<sup>-</sup> se encuentra sobreexpresado el gen *rpoS* que es responsable de la transcripción de muchos genes en condiciones de estrés; se sabe que el producto del gen *rssB* localizado en el mismo operón que el gen *rssA*, regula la degradación del factor  $\sigma^{38}$  por la proteasa ClpXP (Muffler, A., *et. al.* 1996a; Pratt, L. A. & Silhavy, T. J. 1996). No obstante, no se descarta que el gen *rssA* puede estar implicada en una ventaja selectiva que ayudó a incrementar la  $\mu$  en la cepa PB12.

Cepa	$\mu$	Porcentaje	n	Desv. Est.	Coef. De Var.
PB11	0.13	100	4	0.001	1.5
PB11 $\Delta$ rssA	0.17	130	4	0.003	2.2

Tabla 8.- Velocidades específicas de crecimiento de la cepa PB11 y su mutante en el gen *yjiU*

### Conclusiones:

Es relevante enfatizar que en la cepa PB12 existe un aumento en la expresión de varios genes del metabolismo central del carbono, en particular de la vía glicolítica, además de los genes involucrados en el metabolismo del ppGpp, de los cuales no se conocen las razones de su sobreexpresión, a diferencia de la sobreexpresión de muchos genes del TCA donde ésta se le atribuye muy probablemente a la mutación en *arcB* (Flores, N. *et. al.* 2005). Sin embargo en el proceso evolutivo de selección de PB12, aparecieron varias mutaciones puntuales en genes reguladores que pudieran estar involucrados en la sobreexpresión de los genes glicolíticos y que son las estudiadas en ésta tesis.

La mutación en el gen *barA* sufrida durante el proceso de evolución al que se sometió a la cepa PB12, pudiera estar involucrada en la activación de genes glicolíticos, ya que podría estar disminuyendo la eficiencia de activación del gen *csrB*, cuyo producto es el encargado de inhibir las funciones de la proteína codificada por el gen *csrA*. Como ya se había mencionado anteriormente, la proteína CsrA es responsable de regulación post-transcripcional de una gran cantidad de genes. Es bien sabido que entre los genes que regula de manera positiva se encuentran la mayoría de los genes glicolíticos; tal es el caso de genes como *tpi*, *pgi*, *pfkA*, *eno* y *pykF* (Sabnis, N. A., *et. al.* 1995), mismos genes que se ha comprobado se encuentran sobreexpresados en la cepa PB12, tanto en medio mínimo con glucosa ó en medio mínimo con acetato como únicas fuentes de carbono. Los resultados de las mediciones de actividad de  $\beta$ -galactosidasa, utilizando el plásmido pCBZ1 como reportero, muestran que el nivel de expresión del gen *csrB* se encuentra reducido en la cepa PB12, si comparamos a esta cepa con la cepa



silvestre JM101 y su predecesora PB11. Este dato pudiera indicar que al reducirse la inhibición que ejerce CsrB sobre CsrA, se podrían generar mayores concentraciones de CsrA activa en PB12, que a su vez pudiera incrementar la estabilidad de los transcritos de los genes glicolíticos. Por otra parte, la gluconeogénesis no se estaría favoreciendo en esta cepa, hecho que se respalda en estudios de crecimiento en medio mínimo con acetato como única fuente de carbono, donde esta cepa alcanza una  $\mu$  de  $0.13 \text{ hr}^{-1}$ , valor muy bajo si se compara con las cepas JM101 y PB11, las cuales alcanzan valores de  $\mu$  de  $0.29$  y  $0.23 \text{ hr}^{-1}$ , respectivamente (Sigala, J. C. *et. al.* 2008). Paradójicamente pero congruente a nuestras hipótesis, análisis de transcripción por RT-PCR en esta cepa creciendo en medio mínimo con acetato demuestran sobreexpresión de genes glicolíticos (Sigala, J. C. *et. al.* 2008). La mutación en el gen *barA* que ocurrió en la cepa PB12 en donde se modifica un residuo cercano a uno de los tres sitios de fosforilación de ésta proteína, aparentemente pudiera tener un efecto *in vivo*, ya que los niveles que se detectan de  $\beta$ -galactosidasa en el sistema utilizado, son bajos, aunque no nulos, como los que se detectan en las cepas en las que se ha inactivado *barA* por el método de Datsenko. Congruente con lo anterior, experimentos de complementación en PB12 con el gen silvestre de *barA*, reduce la  $\mu$  alrededor de un 12%, dato que sugiere que esta mutación pudo haberse seleccionado por la ventaja dada a esta cepa en la recuperación de su crecimiento. Otro dato importante que se desprende de las cinéticas realizadas en la cepa PB12 y derivadas, es que al inactivar completamente el gen *barA* en esta cepa, la  $\mu$  no se afecta y de hecho, la velocidad específica de crecimiento se ve ligeramente incrementada, aunque no considerablemente (7%). Lo anterior podría explicarse si conjeturamos, que tal vez la mutación en *barA* originó una baja en el funcionamiento de la proteína para la cual codifica, lo que a su vez pudiera ser responsable de una activación menos eficiente por su regulador de respuesta (UvrY), propiciando entonces una disminución en los niveles de CsrB y por ende una mayor actividad de CsrA. Lo anterior pudiera haberse traducido en beneficios para esta cepa en estas condiciones de crecimiento. Si la inactivación del gen *barA* en la cepa PB12 logra incluso aumentar la  $\mu$  de la cepa, esto sugiere que probablemente

la depleción total de la actividad de BarA podría beneficiar aún más el crecimiento en glucosa de la PB12, lo cual es congruente con la propuesta de que esta mutación haya mermado el funcionamiento de esta proteína sensora cinasa.

Por otra parte, también se observó que las  $\mu$ 's de las cepas PB12 y PB12 $\Delta$ *barA* no modifican de manera significativa su  $\mu$ , pero sí modifican el nivel de actividad de  $\beta$ -galactosidasa observado, siendo la cepa PB12 $\Delta$ *barA*, la que presenta los niveles más bajos. Esta misma situación se repite en las cepas PB11 y PB11 $\Delta$ *barA*, lo que muestra que efectivamente los niveles de CsrB se modifican, así como se modificarían todos los elementos en la casacada de sucesos de este sistema de regulación, que tendrían como último efecto la regulación diferencial de la transcripción génica. Sin embargo, al parecer esta situación no estaría modificando aparentemente la velocidad específica de crecimiento. Los resultados anteriores sugieren que las disminuciones en las  $\mu$ 's que se observan cuando se complementa a la cepa PB12 y PB12 $\Delta$ *barA* con el gen silvestre, pudieran ser producto de copias adicionales de *barA* en la célula, dado que los niveles de actividad observados en la cepa PB12 $\Delta$ *barA*/pCL*barA* son equiparables a los de la cepa PB12; es decir las concentraciones de CsrB aparentemente son parecidas entre estas dos cepas, pero su crecimiento es distinto.

Como ya se había mencionado, es posible que, independientemente de los niveles de *csrB* que pudieran modificarse ó no, con la mutación, sería posible que los niveles de *csrA* también sean variables en cada cepa (como sucede con las concentraciones de CsrB). La cepa PB12 pudiera tener niveles más altos, y esto pudiera traducirse en mayor expresión de genes glicolíticos y no expresión de genes gluconeogénicos, resultando en la ventaja de crecer más eficientemente en glucosa como única fuente de carbono.

Habrá que realizar análisis de expresión mediante RT-PCR en genes tales como *csrA*, además de los involucrados tanto en glicólisis como en síntesis de glicógeno entre otros, para poder establecer de manera más precisa si la mutación en *barA*, afectó en algún modo a la cepa PB12, o si son los niveles

intrínsecos de CsrA, los que le confirieron ó no a esta cepa, la capacidad de incrementar los transcritos de estos genes tal como se especula, dando como resultado una ganancia en la  $\mu$ . El análisis de expresión no se pudo realizar en el proyecto y forma parte de las perspectivas.

El alto nivel de actividad de  $\beta$ -galactosidasa en PB11 es de llamar la atención ya que esta cepa que se encuentra en condiciones de crecimiento no óptimo y el flujo glicolítico se encuentra reducido comparativamente con las cepas JM101 y PB12. Sin embargo, en esta cepa se encuentran incrementados los flujos gluconeogénicos y se sobreexpresan varios genes del metabolismo gluconeogénico y de reciclamiento de carbono como *poxB*, *acs*, *ppsA* y *sfcA* (Flores, N., *et. al.* 2005; Flores, S., *et. al.* 2002). Será interesante analizar la expresión de estos genes en una cepa PB11 carente del gen *barA*.

Con respecto a las complementaciones con el gen silvestre *yjjU* en la cepa PB12, los resultados sugieren que al parecer, la mutación en el gen *yjjU* pudo influir en parte para que la cepa aumentara su  $\mu$  en glucosa como única fuente de carbono, pues la  $\mu$  en la cepa PB12 $\Delta$ *yjjU*/pCL*yjjU* presentó un decremento de un 37%. De este resultado se desprende la propuesta de que ésta mutación se haya seleccionado durante el proceso de evolución adaptativa al que fue sometida la cepa PB12. Al analizar los resultados obtenidos en la cepa PB12 $\Delta$ *yjjU* es posible observar una disminución de alrededor del 20%; lo que indica que tanto la complementación con el gen silvestre en plásmido como la delección del gen mutado en cromosoma es perjudicial para el crecimiento de la cepa. Por otra parte, si se mantiene en cromosoma el gen *yjjU* propio de la cepa PB12 (mutado), y ahora se expresa en plásmido el gen silvestre, la  $\mu$  se afecta pero en menor proporción que los casos anteriores (alrededor del 10%). Los resultados sugieren que la mutación, como en el caso del gen *arcB*, pudiera haberse seleccionado en este gen *yjjU* para permitir una expresión modificada de los genes que pudieran estar bajo control de este regulador hipotético. De este modo, el gen mutante pudiera haber conferido cierta adecuación (ventaja), que sin embargo se pierde cuando se inactiva el gen en cromosoma ó se

expresa el gen silvestre; dicha ventaja se pierde de forma aún más evidente cuando no existe ninguna copia del gen mutado en cromosoma y además se expresa el gen silvestre en plásmido.

Para el caso de la cepa PB11 $\Delta$ yjjU, se puede observar un incremento del 23% en su  $\mu$ ; lo anterior es congruente con lo señalado previamente, ya que si la mutación le confirió cierto grado de adecuación a la PB12, y la inactivación de *yjjU* en la cepa PB11 tiene efectos positivos en cuanto a crecimiento, se puede sugerir que la mutación pudo haber disminuido el funcionamiento del producto de este gen, modificando su actividad para ofrecerle ventajas a la cepa PB12 en donde se seleccionó. Esta posible reducción en el funcionamiento del producto del gen en cuestión, podrían ser importantes y la ausencia total del gen que lo codifica y/o copias adicionales del gen en su forma silvestre son perjudiciales para la cepa PB12.

Con respecto a los experimentos del gen *rssA*, se puede señalar que ni la complementación, ni la inactivación del gen en la cepa PB12 trajo consecuencias en cuanto a crecimiento; sin embargo no se puede descartar que la mutación haya modificado, en algún grado también, la funcionalidad de la proteína para la cual codifica, lo que pudiera haber dado ventajas a la cepa PB12, sobre todo si se contemplan los resultados obtenidos en la cepa PB11 $\Delta$ rssA, donde la  $\mu$  aumentó un 30%, sugiriendo que la mutación pudiera haber disminuido la funcionalidad de la proteína. Probablemente como ya se mencionó, el hecho de no aparecer ventajas aparentes adicionales en la cepa PB12 cuando se inactiva el gen *rssA*, probablemente se pudiera deber a que en dicha cepa, ya no es posible generar mayores ventajas que las dadas por la mutación.

Es interesante señalar que varias de las mutaciones que se seleccionaron en PB12 para conferir un crecimiento más rápido en glucosa, son mutaciones puntuales que mapean en genes reguladores: *arcB*, *rpoS*, *barA* ( $\Delta$ yjjU y *rssA*?). Pareciera que durante el proceso de evolución adaptativa al que fue

sometida la cepa PB11 para transformarse en la cepa PB12 que duró 100 horas, se seleccionaron cambios en genes que codifican para proteínas reguladoras que aparentemente modifican sutilmente, las actividades de esas proteínas, lo que a su vez se manifiesta en la generación de cambios igualmente sutiles en la expresión de los genes que regulan, y por tanto, se genera la posibilidad de un crecimiento más eficiente en glucosa.

## Perspectivas:

- Determinar las  $\mu$ 's en las cepas derivadas de JM101 en las que se inactiven los genes *yjjU*, *rssA* y *barA*, en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono.
- Sustituir de forma individual los genes mutados por los silvestres en la cepa PB12 y determinar las  $\mu$ 's de las tres cepas resultantes (PB12barwt, PB12yjjwt y PB12rswt).
- Determinar la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de la cepa PB12barwt (con el gen silvestre en cromosoma) utilizando el plásmido pCBZ1 para establecer los niveles de CsrB y compararla con la cepa PB12 y PB12 $\Delta$ barA.
- Sustituir de forma individual los genes silvestres por los genes mutados en la cepa PB11 y determinar las  $\mu$ 's de las tres cepas resultantes (PB11barM, PB12yjjM y PB12rssM).
- Determinar la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de la cepa PB11barM (con el gen mutado en cromosoma) utilizando el plásmido pCBZ1 para establecer los niveles de CsrB y compararla con la cepa PB11 y PB11 $\Delta$ barA.
- Generar una derivada de la cepa PB12 con los tres genes silvestres en el cromosoma y determinar su  $\mu$  en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono.
- Generar una derivada de la cepa PB11 con los tres genes mutados en el cromosoma y determinar su  $\mu$  en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono.
- Generar derivadas de las cepas de JM101, PB11 y PB12 mutantes en el gen *csrA*, así como la cepa PB11 cuando se sobreexpresa ese mismo gen en plásmido; determinar la  $\mu$  de cada cepa en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono. Mediante RT-PCR, analizar la expresión de diferentes grupos de genes (glicolíticos, gluconeogénicos, vía de las pentosas, TCA, ciclo del glioxalato, metabolismo del glicógeno, motilidad, metabolismo del ppGpp, además de *galP* y *glk*) en estas cepas.
- Analizar la expresión de varios grupos de genes que se sobreexpresan en la cepa PB12 (glicolíticos, metabolismo anaplerótico, metabolismo del acetato, metabolismo del ppGpp,

además de galP, glk entre otros) en las cepas JM101, PB11 y PB12 y sus derivadas mutantes en el gen *yjjU*.

- Con base en los resultados del punto anterior intentar establecer que genes podrían estar siendo regulados por este presunto factor de transcripción (YjjU) y analizar las posibles secuencias promotoras de dichos genes tratando de encontrar secuencias consenso (secuencias reconocidas por YjjU).
- Podría realizarse un estudio similar al señalado con el gen *yjjU* (análisis de transcripción de genes mediante RT-PCR), en las cepas JM101, PB11 y PB12 y derivadas mutantes en el gen *rssA*.
- Complementar la cepa PB12 con el gen *rpoS* silvestre para determinar el posible impacto de la mutación en este gen sobre la cepa. De acuerdo a los resultados, se podrían establecer conclusiones más sólidas acerca del uso alternativo de factores sigma en *E. coli* y sus causas en la cepa PB12; siempre y cuando la mutación le haya conferido ventajas, situación que aún no se ha establecido.

## Materiales y metodología experimental:

### I. Cepas utilizadas en este estudio:

<b>Cepa</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Referencia</b>
JM101	F' traD36 proA <sup>+</sup> proB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> lacZΔM15/supE thi Δ(lac-proAB)	Bolívar <i>et.al.</i> , 1977
PB11	JM101 Δ(ptsH, ptsI, crr)::kan	Flores <i>et.al.</i> , 1996
PB12	PB11, PTS-Glc <sup>+</sup>	Flores <i>et.al.</i> , 1996
JM101ΔbarA	JM101 barA::cm	Este trabajo
JM101ΔyjjU	JM101 yjjU::cm	Este trabajo
JM101ΔrssA	JM101 rssA::cm	Este trabajo
PB11ΔbarA	PB11 barA::cm	Este trabajo
PB11ΔyjjU	PB11 yjjU::cm	Este trabajo
PB11ΔrssA	PB11 rssA::cm	Este trabajo
PB12ΔbarA	PB12 barA::cm	Este trabajo
PB12ΔyjjU	PB12 yjjU::cm	Este trabajo
PB12ΔrssA	PB12 rssA::cm	Este trabajo

Tabla 9.- Cepas de *E. coli* utilizadas en este estudio

### II. Plásmidos utilizados en este estudio

<b>Plásmido</b>	<b>Características</b>	<b>Referencia</b>
pCL1920	Promotor pTrc, spc/spt y lacZ como marcadores de selección	Lerner e Inouye, 1990.
pCLbarA	pCL1920 + barA	Este trabajo
pCLyjjU	pCL1920 + yjjU	Este trabajo
pCLrssA	pCL1920 + rssA	Este trabajo
pCBZ1	pGE593Φ ( <i>csrB-lacZ</i> )	Gudapaty S., <i>et. al.</i> 2001
pKD3	Derivado del pANTSγ + cat flanqueado por sitios FRT del pSC140	Datsenko K.A., Wanner B.L. 2000
pKD46	Derivado del pBAD18 (araC-P <sub>araB</sub> y los genes γ, β y <i>exo</i> )	Datsenko K.A., Wanner B.L. 2000

Tabla 10.- Plásmidos utilizados en éste estudio



### III. Determinación y análisis de mutaciones relevantes en el genoma de la cepa PB12:

Para determinar los cambios en el genoma de la cepa PB12 se contrataron los servicios de la empresa NimbleGen. Esta empresa utiliza la metodología CGS (Comparative Genome Sequencing), la cual es capaz de identificar en la secuencia de DNA variaciones tales como: SNP's, inserciones, deleciones, duplicaciones, etc; esto lo hace mediante la comparación entre un DNA de referencia y el DNA a probar. Esta metodología se lleva a cabo en 2 fases: En la primera de ellas se hibridan ambas moléculas de DNA y se identifican los segmentos de la cadena que contienen las diferencias. En la segunda fase se secuencian mediante el mismo procedimiento (hibridización) aquellas regiones del cromosoma que contienen las diferencias identificadas previamente ([www.nimblegen.com](http://www.nimblegen.com)). La empresa sugiere una re-secuenciación de los genes por el método convencional (Sanger).

### IV. Resecuenciación de los genes *barA*, *yjjU* y *rssA*

Para la re-secuenciación de estos tres genes, se utilizaron oligos que empalman en los extremos de cada uno de los genes (Tabla 11) y se amplificaron por PCR. Los productos de PCR de cada gen se mandaron a la unidad de síntesis y secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Para el caso del gen *barA* se utilizaron dos oligos extra, los cuales empalman dentro del gen (Tabla 11); esto se hizo con la finalidad de tener una re-secuenciación completa ya que este gen es muy grande como para secuenciarlo completo en una sola corrida.

Oligo	Secuencia 5'— 3'	Empalma	Utilización
barA1 (Fw)	AAT CCG GGG ATA AAT AGC GT	Empalma 187pb antes del sitio de inicio del gen	Comprobación de la interrupción de <i>barA</i> . Amplificación de <i>barA</i> para su posterior clonación y secuenciación.
barA2 (Rv)	GCA AAA TAG CCT GTT GTG CT	Empalma 177pb después del final del gen	
barA3 (Fw)	TGT CGC TGG CTG CTT ATC AC	Empalma en la posición 733 (nucleótidos) del gen	Segunda corrida de secuenciación del gen <i>barA</i> .
barA4 (Rv)	CAG GCT TGT AGC GCA ACA AC	Empalma en la posición 2358 (nucleótidos) del gen	
yjjU1 (Fw)	GGC GCA GCT AAA ATT GTC TTT G	Empalma 199pb antes del sitio de inicio del gen	Comprobación de la interrupción de <i>yjjU</i> . Amplificación de <i>yjjU</i> para su posterior clonación y secuenciación.
yjjU2 (Rv)	CCA GGA TGC AAG CCC AAT GCG GC	Empalma 194pb después del final del gen	
rssA1(Fw)	CCA TTC AGT ATG CGC AAA TCC GGC C	Empalma 273 pb. antes del sitio de inicio del gen	Comprobación de la interrupción de <i>rssA</i> . Amplificación de <i>rssA</i> para su posterior clonación y secuenciación.
rssA2 (Rv)	GCA GTT TAA GCC CGT TCA TTC GTG GC	Empalma 299 pb. después del final del gen	
barA-cm1 (Fw)	GAG TCG AGG TCG TTG ACT GAA ACG GTT ATG ATC TGA CGC GTC GTC GTG CGG TGT AGG CTG GAG CTG CTT C	Los primeros 50 nt. Empalman dentro del gen <i>barA</i> (inicio) y los últimos 20 en el pKD3	Interrupción el gen <i>barA</i> por el método Datsenko-Wanner
barA-cm2 (Rv)	CCG GAT AAG GCG TTA ACG CCG CAT CCG GCA TAA ACA CAG GCA CTT TGT CAC ATA TGA ATA TCC TCC TTA G	Los primeros 50 nt. Empalman dentro del gen <i>barA</i> (final) y los últimos 20 en el pKD3	
yjjU-cm1 (Fw)	GAA AAT TTT ATC CAA AGC CAG TCC AGC GGA CTG GCT TTT GCG GTT TTA GCG TGT AGG CTG GAG CTG CTT C	Los primeros 50 nt. Empalman dentro del gen <i>yjjU</i> (inicio) y los últimos 20 en el pKD3.	Interrupción el gen <i>yjjU</i> por el método Datsenko-Wanner
yjjU-cm2 (Rv)	ACA TTT GTG ACG GCA CAG TGC GAA TGA CGA CCA ACG TTT TAG CGC CCT GCC ATA TGA ATA TCC TCC TTA G	Los primeros 50 nt. Empalman dentro del gen <i>yjjU</i> (final) y los últimos 20 en el pKD3.	
rssA-cm1 (Fw)	TGC GCT AAA AAA AGT GGG TAT TGA AAT TGA TAT CGT TGC AGG ATG TTG TGT AGG CTG GAG CTG CTT C	Los primeros 50 nt. Empalman dentro del gen <i>rssA</i> (inicio) y los últimos 20 en el pKD3.	Interrupción el gen <i>rssA</i> por el método Datsenko-Wanner
rssA-cm2	AGC GTG CGC GCG ATG GAA ATC AAG CGT AGA TAT TTG CGG GCA AAC AGG TTC ATA TGA ATA TCC TCC TTA G	Los primeros 50 nt. Empalman dentro del gen <i>rssA</i> (final) y los últimos 20 en el pKD3.	

Tabla 11.- Oligonucleótidos utilizados en este estudio

#### V. Construcción de los plásmidos con los genes *barA*, *yjjU* y *rssA* silvestres

Para la clonación de los genes *barA*, *yjjU* y *rssA* en su forma silvestre, cada uno de ellos se amplificó por PCR con la enzima Taq polimerasa de la compañía de Fermentas, usando como templado el DNA cromosomal de la cepa silvestre JM101 y sus respectivos oligos (*barA1*, *barA2*, *yjjU1*, *yjjU2*, *rssA1* y *rssA2*; estos oligos se muestran en la tabla 11). Una vez amplificados, los genes se clonaron en el vector PCR 2.1-TOPO y se transformaron en la cepa de *E. coli* Top10 siguiendo las especificaciones del kit TOPO TA Cloning® Five-minute cloning of *Taq* polymerase-amplified PCR products. Los genes se subclonaron bajo su propio promotor en el plásmido pCL1920, utilizando las enzimas BamHI y XbaI para el caso de los genes *barA* y *yjjU*; y HindIII y XbaI para el caso de *rssA*. Las clonaciones se comprobaron mediante análisis con enzimas de restricción y por PCR utilizando los oligos *barA1*, *barA2*, *yjjU1*, *yjjU2*, *rssA1* y *rssA2* (Tabla 11) según haya sido el gen.

#### VI. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento:

Las cepas se crecieron a 37°C con una agitación de 300 rpm en 25ml de medio mínimo M9 con glucosa 2g/L, utilizando matraces Klett bafleados de 125 ml y una incubadora con agitación orbital New Brunswick scientific classic series, mod. C24KC.

##### *Componentes del medio mínimo:*

Cada 25 ml de medio mínimo M9-Glc 2 g/L contiene:

2.5 ml de sales M9 10x; 22.2 ml de H<sub>2</sub>O; 50µl de MgSO<sub>4</sub> 1M.; 2.5µl de Vitamina B1 20mg/ml; y 2.5µl de CaCl<sub>2</sub> 1M.; y 0.25ml de glucosa al 20%.

Cada 100 ml de sales M9 10x contienen:

6gr. de  $\text{NaHPO}_4$ ; 3gr. de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0.5gr. de  $\text{NaCl}$  y 1gr. de  $\text{NH}_4\text{Cl}$

VII. Caracterización de las cepas:

- A partir del glicerol de respaldo, las células se crecieron en medio LB con sus respectivos antibióticos; las cepas PB11 y PB12 tienen resistencia a kanamicina, mientras que las mutantes generadas, tienen resistencia a kanamicina y cloramfenicol; el plasmido pCL1920 confiere resistencia a espectinomicina y el plásmido pCBZ1 confiere resistencia a carbenicilina. Ya crecidas en medio LB, se inocularon en medio mínimo M9 con glucosa 2g/L y se incubaron a 37°C a 300 rpm.
- Durante su crecimiento en medio mínimo M9 con glucosa se esperó a que los cultivos llegaran a la fase exponencial tardía (entre 160 y 180 unidades Klett aproximadamente), para poder inocular a medio mínimo M9 con glucosa 2 g/L.

Nota: Este procedimiento se realizó dos veces de forma independiente y en cada caso por duplicado para todas las cinéticas realizadas en este estudio.

VIII. Procesamiento de los datos obtenidos en las cinéticas de crecimiento:

- Para determinar la fase lag y la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), primero se determinó en los cultivos la densidad óptica en unidades klett (U.K.) a través de un Klett-summerson photoelectric colorimeter modelo 800-3, a lo largo de todo su crecimiento.

- Los valores determinados en (U.K.), fueron procesados (mediante el software de hoja de calculo excel, distribuido por Microsoft), para obtener a partir de cada valor en unidades klett el logaritmo natural y graficar estos valores con respecto al tiempo para generar una curva de crecimiento. Una vez generada la curva de crecimiento, se identificó la fase lag y la fase exponencial.
- La  $\mu$  se determinó tomando todos los valores que conformaron la fase exponencial, y llevando a cabo un análisis de regresión lineal a partir de la cual se calculó la pendiente de la recta. El valor de la pendiente representa la velocidad específica de crecimiento. Cabe señalar que la línea de regresión determinada por el valor de R (coeficiente de correlación lineal) siempre fue lo más cercano a 1.
- Con los valores obtenidos se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación. A partir de esos valores (promedio y desviación estándar) se calculó el coeficiente de variación; este último no debía ser mayor del 12% para tomar como confiables todos los valores experimentales.

#### IX. Determinación de actividad de $\beta$ -Galactosidasa

Las células mantenidas en glicerol al 50% a  $-70^{\circ}\text{C}$  se crecen en medio LB líquido a  $37^{\circ}\text{C}$  durante toda una noche con sus respectivos antibióticos de selección. Ya crecidas en medio LB, se inoculan en medio mínimo M9 con glucosa 2g/L y se incuban a  $37^{\circ}\text{C}$  a 300 rpm. Durante el crecimiento de las cepas en M9-Glc se espera a que lleguen a la mitad de la fase exponencial (alrededor de 0.5 D.O.); en ese momento se inoculan las células en otro matraz en el mismo medio (M9-Glc 2g/L) y se empieza la cinética a 0.1 de D.O. Se toma un mililitro de muestra en diferentes puntos a lo largo de toda la cinética, cada muestra se centrifuga a 10,000 rpm y se descarta el sobrenadante. Se resuspenden las

células en 1mL de amortiguador Z (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 60 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 40mM, KCl 10mM y β-mercaptoetanol 50 mM). Después de resuspender perfectamente el paquete de células se toman 20 µl de muestra y se agregan 710 µl de amortiguador Z (la reacción blanco ó control se preparó utilizando 730 µl de amortiguador Z). Las soluciones con células así como las reacciones control se procesan como sigue:

Se agrega 10µl de solución de lisozima (10 µg/ml). Los tubos se incuban 5 min a 37°C; inmediatamente después se le adiciona 10 µl de tritón al 10%; 100 µl de solución de ONPG (4.5mg/mL de agua) y los tubos se transfieren a un baño a 28°C. Inmediatamente después de haber agregado el sustrato se cronometra el tiempo de la reacción durante exactamente 15 min. La reacción enzimática se detiene adicionando 150 µl de solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>4</sub> 1.2 M. Las muestras se centrifugan durante un minuto para eliminar la interferencia del desecho celular y se lee la absorbancia a 420nm contra la reacción blanco.

Las unidades de β-Gal se calcularon con la sig. fórmula:

$$\text{Unidades de } \beta\text{-Gal} = \frac{(D.O.420nm)}{(T) (V) (D.O.600nm)} \times (1000)$$

Donde:

D.O.<sub>420nm</sub> = Lectura de las muestras al final de la reacción

D.O.<sub>600nm</sub> = Lectura de la densidad celular antes del ensayo

T = Tiempo de duración de la reacción en minutos

V = Volumen del cultivo en mililitros usado en el ensayo.

La actividad específica de  $\beta$ -Galactosidasa se reporta como unidades Miller, que se definen como la cantidad de enzima que hidroliza 1 nmol de ONPG por minuto a 28°C y a pH 7.0, liberando el compuesto colorido *o*-nitrofenol.

La determinación de las actividades se realizó en 2 experimentos independientes por duplicado para cada cepa.

#### X. Metodo Datsenko-Wanner:

Una vez diseñados y sintetizados los oligos de interrupción para cada gen, se amplifica el gen que confiere resistencia a cloramfenicol, utilizando como templado el plásmido pKD3 (Tabla de plásmidos) y los oligos correspondientes (barA-cm1, barA-cm2, yjjU-cm1, yjjU-cm2, rssA-cm1 y rssA-cm2; estos oligos se muestran en la tabla 11). Los productos de PCR se purifican por medio de un kit para extracción de DNA en gel.

Después de su purificación, se digiere el producto de PCR con la enzima *HindIII* para eliminar completamente el plásmido pKD3. La digestión se llevó a cabo a 37°C durante 45 minutos. Los productos de PCR se limpiaron de la enzima de restricción por kit. Al final el producto fue suspendido en H<sub>2</sub>O, para favorecer la electroporación.

Las células transformantes JM101, PB11 y PB12 con el plásmido PKD46, se crecieron en medio LB agar con Cb<sup>200</sup> a 30°C durante 24 horas. Se tomó una asada de las colonias y se crecieron en 25 ml de medio SOB con Cb<sup>200</sup> y 2.5 ml de arabinosa 1M a una temperatura de 30°C hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> equivalente a 0.6.

Las células se centrifugan durante 12 minutos a 4600 rpm. y 4°C para posteriormente ser lavadas con agua fría tres veces. Se toman 50  $\mu$ l de células transformantes y de entre 5 y 10 $\mu$ l de producto de PCR. Las células se electroporan y se incuban a 30°C y 300 rpm durante 3 horas en 1ml de medio SOC.

Posteriormente, se platean 200µl del cultivo en medio agar LB con  $\text{cm}^{25}$  y se incuban a 37°C para seleccionar las células transformadas.

Cuando no hay crecimiento de colonias en el medio con antibiótico en las 24 horas siguientes de haberlas sembrado, se repite el procedimiento del paso anterior con el cultivo restante, el cual fue incubado a temperatura ambiente.

Las células seleccionadas se crecen en medio LB sin antibiótico a 42°C durante por lo menos 14 horas para curar el plásmido pKD46. Para comprobar la pérdida del plásmido, las células se crecieron en medio LB agar con antibiótico ( $\text{Cb}^{200}$ ). De las células resultantes se hace un respaldo en glicerol a -70°C.



## Referencias:

Aiba, H., Mizuno, T., Mizushima, S. 1989. Transfer of phosphoryl group between two regulatory proteins involved in osmoregulatory expression of the ompF and ompC genes in Escherichia coli. J. of Biol. Chem., 264(15): 8563-67.

Alex, L. A. & Simon, M. I. 1994. Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. Trends Genet.; 10(4): 133-8.

Altuvia, S., Weinstein-Fischer, D., Zhang, A., Postow, L., Storz, G. 1997. A Small, Stable RNA Induced by Oxidative Stress: Role as a Pleiotropic Regulator and Antimutator Cell; 90(1): 43-53.

Ames, S. K., Frankema, N., Kenney, L. J. 1999. C-terminal DNA binding stimulates N-terminal phosphorylation of the outer membrane protein regulator OmpR from Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.; 96(21): 11792-97.

Anand, G. S., Goudreau, P. N., Lewis, J. K., Stoc, A. M. 2000. Evidence for phosphorylation-dependent conformational changes in methylesterase CheB. Protein Society 2000; 9(5):898-906.

Artsimovich, I., Patlan, V., Sekine, S., Vassylyeva, M. N., Hosaka, T., Ochi, K., Yokoyama, S., Vassylyeva, D. G. 2004. Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp. Cell; 117: 299-310.

[Babitzke, P.](#) 1997. Regulation of tryptophan biosynthesis: Trp-ing the TRAP or how Bacillus subtilis reinvented the wheel. [Mol. Microbiol.](#); 26(1): 1-9.

Babu, M. M. & Teichmann, S. A. 2003. Evolution of transcription factors and the gene regulatory network in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.*; 31: 1234–44.

Bález, J., Bolívar, F., Gosset, G., 2001. Determination of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate productivity and yield from glucosa in *Escherichia coli* devoid of the glucose phosphotransferase system. *Biotechnol. Bioeng.* 6: 530-35.

[Bález-Viveros, J. L., Osuna, J., Hernández-Chávez, G., Soberon, X., Bolívar, F., Gosset, G., 2004. Metabolic engineering and protein directed evolution increase the yield of L-phenylalanine synthesized from glucose in \*Escherichia coli\*. \*Biotechnol. Bioeng.\* 87: 516-24.](#)

[Baikalov, I., Schröder, I., Kaczor-Grzeskowiak, M., Cascio, D., Gunsalus, R. P., Dickerson, R. E. 1998. NarL dimerization? Suggestive evidence from a new crystal form. \*Biochemistry.\*; 37\(11\): 3665-76.](#)

[Baker, C. S., Eöry, L. A., Yakhnin, H., Mercante, J., Romeo, T., Babitzke, P. 2007. CsrA inhibits translation initiation of \*Escherichia coli\* hfq by binding to a single site overlapping the Shine-Dalgarno sequence \*J. Bacteriol.\*; 189\(15\): 5472-81.](#)

[Ban, C., Junop, M., Yang, W. 1999 Transformation of MutL by ATP binding and hydrolysis: a switch in DNA mismatch repair. \*Cell.\*; 97\(1\): 85-97.](#)

[Becker, G., Klauck, E., Hengge-Aronis, R., 1999. Regulation of RpoS proteolysis in \*Escherichia coli\*: the response regulator RssB is a recognition factor that interacts with the turnover element in RpoS. \*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.\* 96\(11\): 6439-44.](#)

Bolívar, F., Rodríguez, R., Greene, P., Betlach, M., Heyneker, H., Boyer, H., 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles II. A multipurpose cloning system. *Gene*. 2(2): 95-113.

[Bouché, S., Klauck, E., Fischer, D., Lucassen, M., Jung, K., Hengge-Aronis, R.](#) 1998. Regulation of RssB-dependent proteolysis in *Escherichia coli*: a role for acetyl phosphate in a response regulator-controlled process. *Mol. Microbiol.*; 27(4): 787-95.

[Brino, L., Urzhumtsev, A., Mousli, M., Bronner, C., Mitschler, A., Oudet, P., Moras, D.](#) 2000. Dimerization of *Escherichia coli* DNA-gyrase B provides a structural mechanism for activating the ATPase catalytic center. *J. Biol. Chem.*; 275(13): 9468-75.

Cashel, M., Gentry, D. R., Hernandez, V. I., Vinella, D. 1996. The stringent response; Neidhardt F. C. (ed). *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. Washington, American Society for Microbiology. Vol I.: 1458-96.

[Datsenko, K. A. & Wanner, B. L.](#) 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 97(12): 6640-5.

[De Reuse, H., Huttner, E., Danchin, A.](#) 1984. Analysis of the ptsH-ptsI-crr region in *Escherichia coli* K-12: evidence for the existence of a single transcriptional unit. *Gene*; 32(1-2): 31-40.

[Delibas, N.](#) 1995. Regulation of gene expression by trans-encoded antisense RNAs *Mol. Microbiol.*; 15(3): 411-4

[Djordjevic, S.](#), [Goudreau, P. N.](#), [Xu, Q.](#), [Stock, A. M.](#), [West, A. H.](#) 1998. Structural basis for methylesterase CheB regulation by a phosphorylation-activated domain. [Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.](#); 95(4): 1381-6.

Dubey, A. K., Baker, C. S., Suzuki, K., Jones, A. D., Pandit, P., Romeo, T., Babitzke, P. 2003. CsrA regulates translation of the *Escherichia coli* starvation gene, *cstA*, by blocking ribosome access to the *cstA* transcript. *J. Bacteriol*; 185: 4450–60.

Dutta, R. & Inouye, M. 2000. GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. [Trends Biochem. Sci.](#); 25(1): 24-8.

Dutta, R., Qin, L., Inouye, M. 1999. Histidine kinases: diversity of domain organization. [Mol. Microbiol.](#); 34(4): 633-40.

Flores, N., 1995. Construcción y caracterización de cepas de *Escherichia coli* mutantes en el sistema de transporte de carbohidratos PTS. Instituto de Biotecnología, UNAM. Tesis de Maestría

Flores, N., Xiao, J., Berry, A., Bolivar, F., Valle, F. 1996. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.*; 14: 620–23.

[Flores, N.](#), [Flores, S.](#), [Escalante, A.](#), [de Anda, R.](#), [Leal, L.](#), Malpica, R., Georgellis, D., [Gosset, G.](#), [Bolivar, F.](#), 2005. Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Metabol. Eng.*; 7: 70-87.

[Flores, N., Leal, L., Sigala, J. C., de Anda, R., Escalante, A., Martínez, A., Ramirez, O. T., Gosset, G., Bolivar, F. 2007. Growth Recovery on Glucose under Aerobic Conditions of an Escherichia coli Strain Carrying a Phosphoenolpyruvate:Carbohydrate Phosphotransferase System Deletion by Inactivating arcA and Overexpressing the Genes Coding for Glucokinase and Galactose Permease J. Mol. Microbiol. Biotechnol.; 13: 105-16.](#)

Flores, N., Escalante, A., de Anda, R., Báez-Viveros, J. L., Merino, E., Franco, B., Georgellis, D., Gosset, G., Bolívar, F. 2008. New insights on the role of the sigma factor RpoS as revealed in Escherichia coli strains lacking the Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. J. Mol. Microbiol. Biotechnol.; 14:176–92.

[Flores, S., Gosset, G., Flores, N., de Graaf, A., Bolivar, F., 2002. Analysis of carbon metabolism in Escherichia coli strains with an inactive phosphotransferase system by 13C labelling and NMR spectroscopy. Metabol. Eng. 4: 124-37.](#)

Foster, J. W. 2000. Microbial response to acid stress. In Bacterial Stress Responses ed. Storz, G. & Hengge-Aronis, R.; 99–115. Washington, DC: A.S.M. Press.

Frankel, D. G. 1996. Glycolysis. In *Escherichia coli* and *Salmonella* cellular and molecular biology. 2nd edition. Edited by: Neidhart F.C. A.S.M., Washington, D.C., U.S.A.; 189-198.

Franze de Fernandez, M. T., Eoyang, L., August, J. T. 1968. Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Q -RNA. Nature 219: 588–90.

Galperin, M. Y., Nikolskaya, A. N., Koonin, E. V. 2001. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. [FEMS Microbiol. Lett.](#); 203(1): 11-21

García-Lara, J., Shang, L. H., Rothfield, L. I. 1996. An extracellular factor regulates expression of sdiA, a transcriptional activator of cell division genes in Escherichia coli. *J. Bacteriol.*; 178(10): 2742–48.

Gottesman, S. 2004. The small RNA regulators of *Escherichia coli*: roles and mechanisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 58:303–28.

Gouet, P., Fabry, B., Guillet, V., Birck, C., Mourey, L., Kahn, D., Samama, J. P. 1999. Structural transitions in the FixJ receiver domain. [Structure](#); 7(12) 1517-26.

Grebe, T. W. & Stock, J. B. 1999. The histidine protein kinase superfamily. [Adv. Microb. Physiol.](#); 41: 139-227.

Gudapaty, S., Suzuki, K., Wang, X., Babitzke, P., Romeo, T. 2001. Regulatory interactions of Csr components: the RNA binding protein CsrA activates csrB transcription in Escherichia coli. [J. Bacteriol.](#); 183(20): 6017-27.

Hengge-Aronis, R. 2002. Signal transduction and regulatory mechanism involved in control of the sigma S (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol. Mol. Biol. Revs.*; 66: 373-95.

Hwang, I., Thorgeirsson, T., Lee, J., Kustu, S., Shin, Y. K., 1999. Physical evidence for a phosphorylation-dependent conformational change in the enhancer-binding protein NtrC. [Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.](#) 96(9):4880-5.

Imlay, J. A., Chin, S. M., Linn, S. 1988. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro Science; 240(4852): 640-2.

Ishige, K., Nagasawa, S., Tokishita, S., Mizuno, T. 1994. A novel device of bacterial signal transducers. [EMBO J.](#); 13(21): 5195-202.

Ishihama, A. 2000. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. Annu. Rev. Microbiol. 54: 499–518.

Jackson, D. W., Suzuki, K., Oakford, L., Simecka, J. W., Hart, M. E., Romeo, T. 2002. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 184: 290–301.

[Keener, J.](#) & [Kustu, S.](#) 1988. Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NTRB and NTRC of enteric bacteria: roles of the conserved amino-terminal domain of NTRC. [Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.](#); 85(14): 4976-80.

[Klauck, E.](#), [Lingnau, M.](#), [Hengge-Aronis, R.](#) 2001. Role of the response regulator RssB in sigma recognition and initiation of sigma proteolysis in *Escherichia coli*. [Mol. Microbiol.](#); 40(6): 1381-90.

Kushner, S. R. 2002. mRNA decay in *Escherichia coli* comes of age. J. Bacteriol.; 184(17): 4658-65.

Lengeler, J. W., Drews, G., Schlegel, H. G. 1999. Biology of Prokaryotes. Blackwell Science. N.Y.

Lewis, R. J., Brannigan, J. A., Muchova, K., Barak, I., Wilkinson, A. J., 1999. Phosphorylated aspartate in the structure of a response regulator protein J. Mol. Biol.; 294(1): 9-15.

Liao, J., Hou, S., Chao, Y., 1996. Pathway analysis, engineering, and physiological considerations for redirecting central metabolism. Biotechnol. Bioeng.; 52: 129-40.

[Liu, M. Y.](#), [Yang, H.](#), [Romeo, T.](#) 1995. The product of the pleiotropic Escherichia coli gene csrA modulates glycogen biosynthesis via effects on mRNA stability. [J. Bacteriol.](#); 177(10): 2663-72.

Liu, M. Y. & Romeo, T. 1997. The global regulator CsrA of Escherichia coli is a specific mRNA-binding protein. J. Bacteriol.; 179(14): 4639-42

Liu, M. Y., Gui, G., Wei, B., Preston III, J. F., Oakford, L., Yuksel, U., Giedroc, D. P., Romeo, T. 1997. The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in Escherichia coli. J. Biol. Chem.; 272: 17502-10.

[Lois, A. F.](#), [Weinstein, M.](#), [Ditta, G. S.](#), [Helinski, D. R.](#) 1993. Autophosphorylation and phosphatase activities of the oxygen-sensing protein FixL of Rhizobium meliloti are coordinately regulated by oxygen. [J. Biol. Chem.](#); 268(6): 4370-5.

Lukat, G. S., McCleary, W. R., Stock, A. M., Stock, J. B. 1992. Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.; 89(2): 718-22.



[Madhusudan, Z. J., Whiteley, J. M., Hoch, J. A., Xuong, N. H., Varughese, K. I.](#) 1996. Crystal structure of a phosphatase-resistant mutant of sporulation response regulator Spo0F from *Bacillus subtilis*. [Structure](#).; 4(6): 679-90.

Martinez-Antonio, A. & Collado-Vides, J. 2003. Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*; 6: 482–9.

[Mika, F. & Hengge, R.](#) 2005. A two-component phosphotransfer network involving ArcB, ArcA, and RssB coordinates synthesis and proteolysis of sigmaS (RpoS) in *E. coli*. [Genes Dev.](#); 19(22): 2770-81.

Mizuno, T., Kaneko, T., Tabata, S. 1996. Compilation of all genes encoding bacterial two-component signal transducers in the genome of the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *DNA Res.*; 3(6): 407-14.

Morfeldt, E., Taylor, D., Gabain, A von., Arvidson, S. 1995. Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII. *EMBO J.*; 14(18): 4569–77

[Muffler, A., Fischer, D., Altuvia, S., Storz, G., Hengge-Aronis, R.](#) 1996a. The response regulator RssB controls stability of the sigma(S) subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. [EMBO J.](#); 15(6):1333-9.

Muffler, A., Fischer, D., Hengge-Aronis, R. 1996b. The RNA-binding protein HF-1 plays a global regulatory role which is largely, but not exclusively, due to its role in expression of the sigma(s) subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179: 297–300.

Muller-Dieckmann, H. J., Grantz, A. A., Kim, S. H. 1999. The structure of the signal receiver domain of the Arabidopsis thaliana ethylene receptor ETR1. *Structure Fold. Des.*; 7: 1547–56.

[Mukhopadhyay, S.](#), [Audia, J. P.](#), [Roy, R. N.](#), [Schellhorn, H. E.](#) 2000. Transcriptional induction of the conserved alternative sigma factor RpoS in Escherichia coli is dependent on BarA, a probable two-component regulator. *Mol. Microbiol.*; 37(2): 371-81.

Muller-Dieckmann, H. J., Grantz, A. A., Kim, S. H. 1999. The structure of the signal receiver domain of the Arabidopsis thaliana ethylene receptor ETR1. *Structure.*; 7(12): 1547-56.

[Nagasawa, S.](#), [Tokishita, S.](#), [Aiba, H.](#), [Mizuno, T.](#) 1992. A novel sensor-regulator protein that belongs to the homologous family of signal-transduction proteins involved in adaptive responses in Escherichia coli. *Mol. Microbiol.*; 6(6): 799-807.

Ninfa, A. J. & Magasanik, B. 1986. Covalent modification of the glnG product, NRI, by the glnL product, NRIL, regulates the transcription of the glnALG operon in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 83: 5909–13.

Ninfa, E. G., Atkinson, M. R., Kamberov, E. S., Ninfa, A. J. 1993. Mechanism of autophosphorylation of Escherichia coli nitrogen regulator II (NRII or NtrB): trans-phosphorylation between subunits. I. *Bacteriol.*; 175(21): 7024-32.

Nixon, B. T., Ronson, C. W., Ausubel, F. M. 1986. 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.*; 83: 7850–4.

Nohaile, M., Kern, D., Wemmer, D., Stedman, K., Kustu, S. 1997. Structural and functional analyses of activating amino acid substitutions in the receiver domain of NtrC: Evidence for an activating surface. [J. Mol. Biol.](#); 273, (1): 299-316.

Olvera, L., Mendoza-Vargas, A., Flores, N., Olvera, M., Sigala, J. C., Gosset, G. Morett, E., Bolívar, F. 2009. Transcription analysis of central metabolism genes in *Escherichia coli*. Possible roles of  $\sigma$ 38 in their expression, as a response to carbon limitation. Aceptado en PLoS One.

[Pan, S. Q., Charles, T., Jin, S., Wu, Z. L., Nester, E. W.](#) 1993. Preformed dimeric state of the sensor protein VirA is involved in plant--Agrobacterium signal transduction. [Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.](#); 90(21): 9939-43.

[Parkinson, J. S. & Kofoid, E. C.](#) 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. [Annu. Rev. Genet.](#); 26: 71-112.

Pérez-Rueda, E. & Collado-Vides, J. 2000. The repertoire of DNA binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. [Nucleic. Acids. Res.](#); 28: 1838-47.

Pernestig, A. K., Melefors, O., Georgellis, D. 2001. Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli* [J. Biol. Chem.](#); 276(1): 225-31.

Pernestig, A. K., Georgellis, D., Romeo, T., Suzuki, K., Tomenius, H., Normark, S., Melefors, O. 2003. The *Escherichia coli* BarA-UvrY two-component system is needed for efficient switching between glycolytic and gluconeogenic carbon sources. [J. Bacteriol.](#); 185(3): 843-53.

Postma, P. W., Lengeler, J. W., Jacobson, G. R. 1993. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. Microbiol. Rev.; 57(3): 543-94.

Postma, P. W., Lengeler, J. W. & Jacobson, G. R. 1996. Phosphoenolpyruvate : carbohydrate phosphotransferase systems. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*; 1149–1174. Edited by F. C. Neidhardt and others. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Pratt, L. A. & Silhavy, T. J. 1996. The response regulator SprE controls the stability of RpoS. Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.; 93(6): 2488-92.

Romano, A. H. & Conway, T. 1996. Evolution of carbohydrate metabolic pathways. Res Microbiol.; 147(6-7):448-55.

Romeo T. 1998. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. Mol. Microbiol.; 29(6):1321-30

Romeo, T., Gong, M., Liu, M. Y., Brun-Zinkernagel, A. M. 1993. Identification and molecular characterization of csrA, a pleiotropic gene from Escherichia coli that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. J. Bacteriol. 175: 4744–55.

Romeo, T. 1998. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. Mol. Microbiol.; 29(6): 1321-30.

Ronson, C. W., Nixon, B. T., Ausubel, F. M. 1987. Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli. *Cell*; 49: 579–81.

Ryazanov, A. G., Pavur, K. S., Dorovkov, M. V. 1999. Alpha-kinases: a new class of protein kinases with a novel catalytic domain. *Curr. Biol.*; 9(2): 43-5

[Sabnis, N. A.](#), [Yang, H.](#), [Romeo, T.](#) 1995. Pleiotropic regulation of central carbohydrate metabolism in *Escherichia coli* via the gene *csrA*. *J. Biol. Chem.*; 270(49): 29096-104.

[Sahu, S. N.](#), [Acharya, S.](#), [Tuminaro, H.](#), [Patel, I.](#), [Dudley, K.](#), [LeClerc, J. E.](#), [Cebula, T. A.](#), [Mukhopadhyay, S.](#) 2003. 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.*; 253(1-2): 167-77.

Sauter, C., Basquin, J. & Suck, D. 2003. Sm-like proteins in eubacteria: the crystal structure of the Hfq protein from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*; 32: 4091–8.

[Serres, M. H.](#), [Gopal, S.](#), [Nahum, L. A.](#), [Liang, P.](#), [Gaasterland, T.](#), [Riley, M.](#) 2001. A functional update of the *Escherichia coli* K-12 genome. *Genome Biol.*; 2(9):RESEARCH0035.

[Sigala, J. C.](#) 2008. Metabolismo de acetato en cepas de *Escherichia coli* PTS- y PTS- Glc+: Evidencia de ciclos inútiles y de diferentes estrategias de utilización de carbono. Instituto de Biotecnología, UNAM. Tesis de Doctorado.

[Sigala, J. C., Flores, S., Flores, N., Aguilar, C., de Anda, R., Gosset, G., Bolívar, F.](#) 2008. Acetate Metabolism in Escherichia coli Strains Lacking Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate Phosphotransferase System; Evidence of Carbon Recycling Strategies and Futile Cycles. [J. Mol. Microbiol. Biotechnol.](#); 16(3-4): 224-35.

[Sitnikov, D. M., Schineller, J. B., Baldwin, T. O.](#) 1996. Control of cell division in Escherichia coli: regulation of transcription of ftsQA involves both rpoS and SdiA-mediated autoinduction. [Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.](#); 93(1): 336-41.

Sledjeski, D., & Gottesman, S. 1995. A small RNA acts as an antisilencer of the H-NS-silenced rcsA gene of Escherichia coli. [Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.](#); 92(6): 2003-7.

Sniegowsky, P., Gerrish, P., Johnson, T., Shaver, A. 2000. The evolution of mutation rates: separating causes from consequences. [Bio Essays](#); 22: 1057-66.

Solà, M., Gomis-Rüth, F. X., Serrano, L., González, A., Coll, M. 1999. Three-dimensional crystal structure of the transcription factor PhoB receiver domain. [J. Mol. Biol.](#) 285: 675-87.

Spector, M. P., Garcia del Portillo, F., Bearson, S.M., Mahmud, A., Magut, M., Finlay, B. B., Dougan, G., Foster, J. W., Pallen, M. J. 1999. The rpoS-dependent starvation-stress response locus stiA encodes a nitrate reductase (narZYWV) required for carbon-starvation-inducible thermotolerance and acid tolerance in Salmonella typhimurium. [Microbiology](#); 145(Pt 11): 3035-45.

Stock, J. B., Ninfa, A. J., Stock, A. M. 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. Microbiol. Rev.; 53(4): 450-90.

Stock, J. B., Surette, M. G., Levit, M., Park, P. 1995. Two-component signal transduction systems: structure-function relationships and mechanisms of catalysis. In: Two-Component Signal Transduction. Hoch, J. A. & Silhavy, T. J, eds. Washington D. C., American Society of Microbiology; 25-51.

Storz, G., Opdyke, J. A., Zhang, A. 2004. Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. Curr. Opin. Microbiol.; 7: 140-4

[Stüdemann, A., Noirclerc-Savoye, M., Klauck, E., Becker, G., Schneider, D., Hengge, R.](#) 2003. Sequential recognition of two distinct sites in sigma(S) by the proteolytic targeting factor RssB and ClpX. [EMBO J.](#); 22(16): 4111-20.

Surette, M. G., Levit, M., Liu, Y., Lukat, G., Ninfa, E., G., Ninfa, A., Stock, J. B. 1996. Dimerization is required for the activity of the protein histidine kinase CheA that mediates signal transduction in bacterial chemotaxis. J. Biol. Chem.; 271(2): 939-45.

Suzuki, K., Wang, X., Weilbacher, T., Pernestig, A. K., Melefors, O., Georgellis, D., Babitzke, P., Romeo, T. J. 2002. Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of Escherichia coli. Bacteriol.; 184(18): 5130-40.

Suzuki, K., Babitzke, P., Kushner, S. R., Romeo, T. 2006. Identification of a novel regulatory protein (CsrD) that targets the global regulatory RNAs CsrB and CsrC for degradation by RNase E. Genes Dev.; 20: 2605-17.

Swanson, R. V., Bourret, R. B., Simon, M. I. 1993. Intermolecular complementation of the kinase activity of CheA. Mol. Microbiol.; 8(3): 435-41.

Taylor, B. L., Igor, Z. B. 1999. PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light Microb. Mol. Biol. Rev.; 63(2): 479-506.

Taylor, B. L.; Rebbapragada, A., Johnson, M. S. 2001. The FAD-PAS domain as a sensor for behavioral responses in Escherichia coli. Antioxidants & redox signaling; 3(5): 867-79.

Tenaillon, O., Denamur, E., Matic, I. 2004. Evolutionary significance of stress-induced mutagenesis in bacteria. Trends Microbiol.; 12: 264-70.

Tomomori, C., Tanaka, T., Dutta, R., Park, H., Saha, S. K., Zhu, Y., Ishima, R., Liu, D., Tong, K. I., Kurokawa, H., Qian, H., Inouye, M., Ikura, M. 1999. Solution structure of the homodimeric core domain of Escherichia coli histidine kinase EnvZ. Nat. Struct. Biol.; 6(8): 729-34.



Ueguchi, C., Misonou, N., Mizuno, T. 2001. Negative Control of *rpoS* Expression by Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate Phosphotransferase System in *Escherichia coli*. J. Bacteriol.; 183: 520-7.

Volkman, B. F., Michael, J., Nancy, K., Sydney, K., David, E. 1995. Three-dimensional solution structure of the N-terminal receiver domain of NTRC. Biochemistry; 34(4): 1413-24.

Wagner, R. 2002 Regulation of ribosomal RNA synthesis in *E. coli*: effects of the global regulator guanosine tetraphosphate (ppGpp). J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 4: 331-40.

Webber, H., Polen, T., Hueveling, J., Wendisch, V. F., Hengge-Aronis, R. 2005. Genome wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigma S dependent genes, promoters and sigma factor selectivity. J. Bacteriol.; 187: 1591-1603.

Wei, B., Shin, S., LaPorte, D., Wolfe, A. J., Romeo, T. 2000. Global regulatory mutations in *csrA* and *rpoS* cause severe central carbon stress in *Escherichia coli* in the presence of acetate. J. Bacteriol.; 182: 1632-40.

Wei, B. L., Brun-Zinkernagel, A.-M., Simecka, J. W., Pru, B. M., Babitzke, P., Romeo, T. 2001. Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 40: 245-56.

[Wei, Y., Lee, J. M., Smulski, D. R., LaRossa, R. A.](#) 2001. Global impact of *sdiA* amplification revealed by comprehensive gene expression profiling of *Escherichia coli*. J. Bacteriol.; 183(7): 2265-72.

Weilbacher, T., Suzuki, K., Dubey, A. K., Wang, X., Gudapaty, S., Morozov, I., Baker, C. S., Georgellis, D., Babitzke, P., Romeo, T. 2003. A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 48:657–70.

Wolfe, A. J. & Stewart, R. C. 1993. The short form of the CheA protein restores kinase activity and chemotactic ability to kinase-deficient mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.; 90(4): 1518-22.

[Yamamoto, K.](#), [Yata, K.](#), [Fujita, N.](#), [Ishihama, A.](#) 2001. Novel mode of transcription regulation by SdiA, an *Escherichia coli* homologue of the quorum-sensing regulator. [Mol. Microbiol.](#); 41(5): 1187-98.

Yang, H., Liu, M. Y., Romeo, T. 1996. Coordinate genetic regulation of glycogen catabolism and biosynthesis in *Escherichia coli* via the CsrA gene product. J. Bacteriol.; 178: 1012–7.

[Yang, Y.](#), [Park, H.](#), [Inouye, M.](#) 1993. Ligand binding induces an asymmetrical transmembrane signal through a receptor dimer [J. Mol. Biol.](#); 232(2): 493-8.

Zhang, J. P. & Normark, S. 1996. Induction of gene expression in *Escherichia coli* after pilus-mediated adherence. Science; 273(5279): 1234–6.

Zhou, H., Lowry, D. F., Swanson, R. V., Simon, M. I., Dahlquist, F. W. 1995. NMR studies of the phosphotransfer domain of the histidine kinase CheA from *Escherichia coli*: assignments, secondary structure, general fold, and backbone dynamics. Biochemistry; 34: 13858–70.

Zhu, X., Rebello, J., Matsumura, P., Volz, K. 1997. Crystal Structures of CheY Mutants Y106W and T87I/Y106W: CheY activation correlates with movement of residue 106. J. Biol. Chem.; 272(8): 5000-

6.