



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EFECTO DEL SISTEMA DE REGULACIÓN
GLOBAL CSR, SOBRE EL SISTEMA DE
DOS-COMPONENTES BARA/UVRY

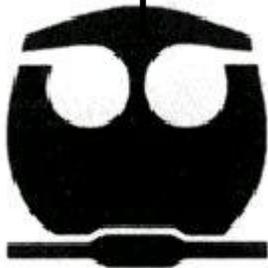
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

**MARTHA I. CAMACHO
HERNÁNDEZ**

Tutor: DR. DIMITRIS GEORGELLIS



MÉXICO, D. F.

Junio 2011



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.

EFFECTO DEL SISTEMA DE REGULACIÓN GLOBAL CSR, SOBRE EL SISTEMA DE DOS-COMPONENTES BARA/UVRY

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Dimitris Georgellis en laboratorio 226 - Norte, en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Soledad Funes	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Enrique Merino	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. Dimitris Georgellis	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica de la M. en C. Claudia Rodríguez Rangel en los experimentos a lo largo del proyecto.

Se reconoce la asesoría del Dr. Adrian F. Álvarez.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (80684), por ICGEB (CRPMEX008-02) y por DGAPA (IN219709). Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Otto Geiger	Centro de Ciencias Genómicas, UNAM
Vocal	Dr. Enrique Merino Pérez	Instituto de Biotecnología, UNAM
Secretario	Dr. José Luis Puente García	Instituto de Biotecnología, UNAM
Suplente	Dra. Bertha González Pedrajo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dr. Georges Dreyfus Cortés	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Dimitris Georgellis por confiar en mí y aceptar ser mi tutor. Muchas gracias, el haberme brindando la oportunidad de terminar la maestría en tu laboratorio, no solo sirvió para la conclusión satisfactoria de esta etapa profesional, sino que además, me dio la oportunidad de volver a creer en mí y la fortaleza para seguir mis sueños.

A la M. en C. Claudia Rodríguez por su asesoría técnica durante este trabajo, por regalarme un poco de su tiempo para poder realizar este trabajo, y sobre todo por su gran paciencia y su calidad humana, gracias Clau.

A los miembros de mi comité tutorial y del jurado del examen, Dra. Bertha González, Dr. Enrique Merino, Dr. Georges Dreyfus, Dr. José Luis Puente, Dr. Otto Geiger y Dra. Soledad Funes. Aprecio sus críticas, sus consejos y sus comentarios, respeto mucho su trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Adrián, Carlos, Claudia, Dana, Diego, Griselda y Ricardo, por formar parte de esta etapa de mi vida, por su apoyo en este trabajo y por los momentos compartidos en el laboratorio.

A mis amigas y amigos tan queridos, Ana Belén, “Dianis”, Donají, Tere y todos, por su amistad sincera y su apoyo incondicional. Ustedes son un pilar muy importante de mi vida y los quiero mucho.

A mi familia, porque simplemente los amo.

Y finalmente agradezco a la vida por permitirme experimentar.

INDICE

RECONOCIMIENTOS.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE.....	iii
RESUMEN.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABLAS.....	viii
INTRODUCCIÓN	
Capítulo I Introducción al Sistema de Dos-Componentes BarA/UvrY.....	1
1.1 Sistemas de Dos-Componentes bacterianos.....	1
1.2 Estructura del SDC BarA/UvrY.....	3
1.3 Circuito regulatorio BarA/UvrY y CsrA/CsrB, CsrC.....	4
1.4 Activación del SDC BarA/UvrY.....	5
1.5 Regulación de la expresión de <i>barA</i> y <i>uvrY</i>	6
1.6 Regulación de la actividad del SDC GacS/GacA en <i>P. aeruginosa</i>	6
Recapitulación.....	7
Capítulo II Introducción al Sistema de Regulación Global Csr.....	8
2.1 CsrA regula múltiples vías en <i>E. coli</i> y en otras especies bacterianas.....	8
2.1.1 CsrA regula el metabolismo central de carbono.....	9
2.1.2 CsrA participa en la regulación del quorum-sensing.....	9
2.1.3 CsrA regula la formación de biopelículas y la motilidad celular.....	10
2.1.4 CsrA regula la patogenicidad y virulencia.....	11
2.2 Mecanismo de acción.....	11
2.3 Regulación de la expresión de <i>csrA</i>	11
2.4 Regulación de la actividad de CsrA.....	12
Recapitulación.....	12
Capítulo III Función de los sRNAs bacterianos en circuitos de señalización.....	13
3.1 RNAs pequeños no-codificantes (sRNAs) bacterianos.....	13
3.2 Clasificación de los sRNAs bacterianos.....	14
3.2.1 sRNAs que actúan sobre proteínas.....	14
3.2.1.1 sRNAs CsrB/CsrC.....	14
3.2.1.2 sRNA 6S.....	15
3.2.1.3 sRNA GlmY.....	15

3.2.2	sRNAs que actúan sobre mRNAs.....	15
3.2.2.1	sRNAs que funcionan en <i>cis</i>	15
3.2.1.1	sRNAs que funcionan en <i>trans</i>	16
3.2.3	sRNAs que tienen actividad catalítica.....	16
	Recapitulación.....	16
Capítulo IV	Papel de Hfq en la actividad de los circuitos regulatorios.....	17
4.1	Proteína Hfq.....	17
4.2	Mecanismo de acción.....	17
4.2.1	Interacción de Hfq sobre sRNAs.....	18
4.2.2	Interacción de Hfq sobre mRNAs.....	19
4.2.3	Interacción de Hfq sobre proteínas.....	19
	Recapitulación.....	19
Capítulo V	Papel de SdiA en el circuito BarA/UvrY, CsrA/CsrB, CsrC.....	20
5.1	El quorum-sensing.....	20
5.1.1	Modelo de quorum-sensing en <i>V. harveyi</i>	20
5.1.2	Hfq participa en el quorum-sensing reprimiendo la traducción de <i>LuxR</i>	22
5.2	SdiA es la proteína homóloga de LuxR.....	22
	Recapitulación.....	23
ANTECEDENTES.....		25
1.1	En la mutante <i>csrA</i> no se activa el sistema BarA/UvrY.....	25
1.2	En la mutante <i>csrA</i> (pUY14) se restablece la expresión de <i>csrB</i>	26
HIPÓTESIS.....		28
OBJETIVOS.....		28
RESULTADOS.....		29
1.1	La expresión de <i>csrB</i> está aumentada en la fase estacionaria de crecimiento.....	29
1.2	CsrA no afecta la transcripción de <i>barA</i> y <i>uvrY</i>	30
1.3	En la mutante <i>csrA</i> los niveles de la proteína UvrY están disminuidos.....	32
1.4	SdiA y Hfq se necesitan para la expresión de <i>csrB</i>	35
1.5	En la mutante <i>hfq</i> los niveles de la proteína UvrY están disminuidos.....	36
1.6	En la mutante <i>csrA</i> los niveles de la proteína Hfq están disminuidos.....	37
1.7	Algunas de las mutantes de la colección Keio muestran diferentes patrones de expresión de <i>csrB</i>	38

DISCUSIÓN.....	41
MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
1.1 Condiciones de crecimiento.....	47
1.2 Extracción de RNA.....	48
1.3 Northern blot.....	49
1.4 RT-PCR.....	49
1.5 Western blot.....	50
1.6 Ensayos de movilidad.....	50
CONCLUSIONES.....	51
PERSPECTIVAS.....	52
REFERENCIAS.....	53

RESUMEN

En las células procariotas, la percepción y el procesamiento de las señales ambientales dependen principalmente de los sistemas de dos-componentes (SDC). Estos sistemas están constituidos por una *cinasa sensora* anclada a la membrana y un *regulador de respuesta* “cognado” en el citosol. El SDC BarA/UvrY de *Escherichia coli* está constituido por la cinasa sensora BarA y por su regulador de respuesta UvrY. En respuesta al acetato extracelular (acumulado en la fase exponencial tardía de crecimiento) BarA se autofosforila y transfiere el grupo fosfato a UvrY, de esta manera UvrY actúa como factor transcripcional y activa directamente la expresión de los RNAs pequeños no codificantes CsrB y CsrC, los cuales reprimen la actividad de la proteína de regulación global CsrA. CsrA se une a secuencias GGA localizadas en la región 5'-UTR de mRNAs blancos, para regular su traducción de manera positiva (estabilizando el transcrito) o negativa (bloqueando el sitio de unión a ribosomas). El circuito regulatorio BarA/UvrY, CsrA regula múltiples procesos fisiológicos en *E. coli*, entre ellos se encuentran: a) el metabolismo central del carbono, b) la patogenicidad y virulencia, c) la regulación positiva de la motilidad y d) la regulación negativa de la formación de biopelículas.

Previamente se había observado que en la mutante *csrA* la expresión de *csrB* estaba drásticamente disminuida, pero que al transformarla con el plásmido pUY14 (aumenta el número de copias de *uvrY*) la expresión de *csrB* se restablecía. Este dato sugirió que CsrA jugaba un papel positivo en la regulación directa o indirecta de la expresión de UvrY. En este trabajo se realizaron análisis de RT-PCR, Northern blot y Western blot, para determinar el nivel de regulación de CsrA hacia UvrY. Los resultados de estos experimentos evidenciaron que CsrA afecta la traducción de UvrY y que su efecto es indirecto.

En la búsqueda de otros componentes que pudieran intervenir en la vía de señalización CsrA/UvrY, se encontró a la chaperona de RNA Hfq; al igual que CsrA, Hfq se necesita para la expresión de *csrB* debido a que regula positivamente la traducción de UvrY. Por su parte, se encontró que la traducción de Hfq depende también de CsrA; de esta manera en el presente trabajo, se evidenció el papel de Hfq como el componente río abajo de CsrA que regula directa o indirectamente la traducción de UvrY.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo prototípico del sistema de dos-componentes.....	2
Figura 2. Estructura de la cinasa sensora BarA de <i>E. coli</i>	3
Figura 3. Circuito regulatorio entre BarA/UvrY y CsrA/CsrB, CsrC.....	4
Figura 4. Activación del SDC BarA/UvrY.....	5
Figura 5. Síntesis de sRNAs.....	13
Figura 6. La activación de la traducción de RpoS requiere a sRNAs y a Hfq.....	18
Figura 7. Modelo del sistema de quorum-sensing en <i>V. harveyi</i>	21
Figura 8. En la mutante <i>csrA</i> no se expresa <i>csrB</i>	25
Figura 9. En la mutante <i>csrA</i> (pUY14) se restablece la expresión de <i>csrB</i>	26
Figura 10. Cinética de la expresión de <i>csrB</i> en la cepa silvestre.....	29
Figura 11. Control de pureza del RNA.....	30
Figura 12. RT-PCR de <i>uvrY</i> y <i>barA</i> en la cepa silvestre y en la mutante <i>csrA</i>	31
Figura 13. Western blot de UvrY en la cepa silvestre y en la mutante <i>csrA</i>	32
Figura 14. Northern blot de la expresión de <i>csrB</i> en diferentes mutantes.....	35
Figura 15. Western blot de UvrY en la cepa silvestre y en la mutante <i>hfq</i>	36
Figura 16. Western blot de Hfq-HA en la cepa silvestre y en la mutante <i>csrA</i>	37
Figura 17. Ensayo de motilidad en algunas mutantes de la librería Keio.....	38
Figura 18. Dominios de proteínas posiblemente involucradas en la formación de balsas lipídicas.....	39
Figura 19. Northern blot de la expresión de <i>csrB</i> en mutantes posiblemente involucradas en la formación de balsas lipídicas.....	40
Figura 20. Modelo de las interacciones entre los componentes del circuito regulatorio BarA/UvrY, CsrA/CsrB, CsrC.....	44

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Genes blancos directos de CsrA.....	8
Tabla 2. Genes con función conocida regulados por SdiA en <i>E.coli</i>	24
Tabla 3. Activación diferencial del SDC BarA/UvrY en la cepa wt y <i>csrA</i>	27
Tabla 4. Lista de primers.....	47
Tabla 5. Lista de plásmidos.....	47
Tabla 6. Lista de cepas.....	47

Capítulo I

Introducción al Sistema de Dos-Componentes BarA/UvrY

1.1 Sistemas de Dos-Componentes bacterianos.

La habilidad para responder a una gran variedad de señales ambientales es vital para el crecimiento y la sobrevivencia de los microorganismos [Revisiones: Gao y Stock, 2009; Malpica y col., 2006, Stock y col., 2000]. En las células procariotas, la percepción y el procesamiento de estas señales dependen principalmente de los sistemas de dos-componentes (SDC). Estos sistemas están constituidos por una *cinasa sensora*, anclada a la membrana y un *regulador de respuesta* “cognado” en el citosol.

Una *cinasa sensora* prototipo es una proteína transmembranal, que contiene en su extremo amino un dominio periplásmico de aproximadamente 160 residuos de aminoácidos, que puede funcionar como sitio de recepción de la señal, seguido de un dominio transmisor citoplasmático en su extremo carboxilo. El dominio transmisor se caracteriza por poseer un núcleo de cinasa con un residuo de histidina altamente conservado. Por su parte, un *regulador de respuesta* es una proteína citoplasmática que en su extremo amino tiene un dominio receptor y en su extremo carboxilo un dominio de respuesta. El dominio receptor se caracteriza por poseer un residuo de aspartato conservado (Fig.1).

Se considera que la presencia de la señal, induce cambios conformacionales en la cinasa sensora, que le permiten la autofosforilación dependiente de ATP en el residuo de histidina del dominio transmisor. La cinasa sensora fosforilada transfiere su grupo fosforilo al residuo de aspartato del dominio receptor del regulador de respuesta, el cual se activa y funciona como regulador transcripcional. Cuando la señal decae, el sistema se inactiva por la desfosforilación de la cinasa sensora y del regulador de respuesta. El decaimiento de la señal ocurre ya sea a partir de la liberación hidrolítica espontánea de Pi del regulador de respuesta fosforilado, por un proceso catalizado por la cinasa sensora específica del SDC en cuestión, o por otra proteína.

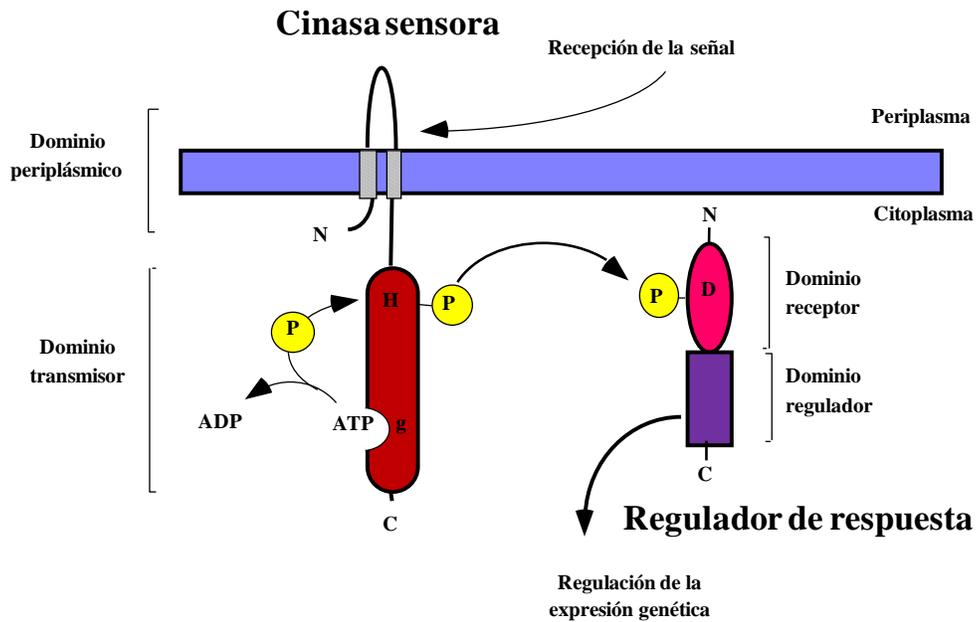


Figura 1. Modelo prototípico del sistema de dos-componentes. La cinasa sensora presenta un dominio periplásmico y un dominio transmisor en el citoplasma. El ATP se une a la caja G y el grupo fosfato se transfiere a la histidina (H) de la cinasa sensora y finalmente al aspartato (D) del regulador de respuesta.

Existen SDC más elaborados que el modelo descrito. Las proteínas sensoras híbridas o multipartitas tienen una arquitectura y funciones más complejas. Después de la autofosforilación inicial en el residuo de histidina del dominio transmisor, el grupo fosfato es transferido a un residuo de histidina del dominio de fosfotransferencia (HPT), vía un residuo de aspartato del dominio receptor, antes de transmitirse a la proteína reguladora. La razón de la existencia de los sensores híbridos no está clara, aunque se ha relacionado con una modulación adicional de la transducción de la señal a la proteína reguladora y/o con la habilidad para regular diferentes rutas.

1.2 Estructura del SDC BarA/UvrY.

El SDC BarA/UvrY de *E. coli* consiste del sensor cinasa híbrido BarA (*bacterial adaptative response*), y de su regulador de respuesta UvrY [Pernestig y col., 2001]. Este sistema es tripartita, ya que la cinasa sensora presenta tres dominios involucrados en las reacciones de fosfotransferencia (Fig. 2). Existen homólogos de BarA/UvrY en varias bacterias como BarA/SirA en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [Altier y col., 2000], ExpS/ExpA en *Erwinia carotovora* [Eriksson y col., 1998], GacS/GacA en *Pseudomonas fluorescens* y *P. aeruginosa* [Gaffney y col., 1994] y VarS/VarA de *Vibrio cholerae* [Wong y col., 1998].

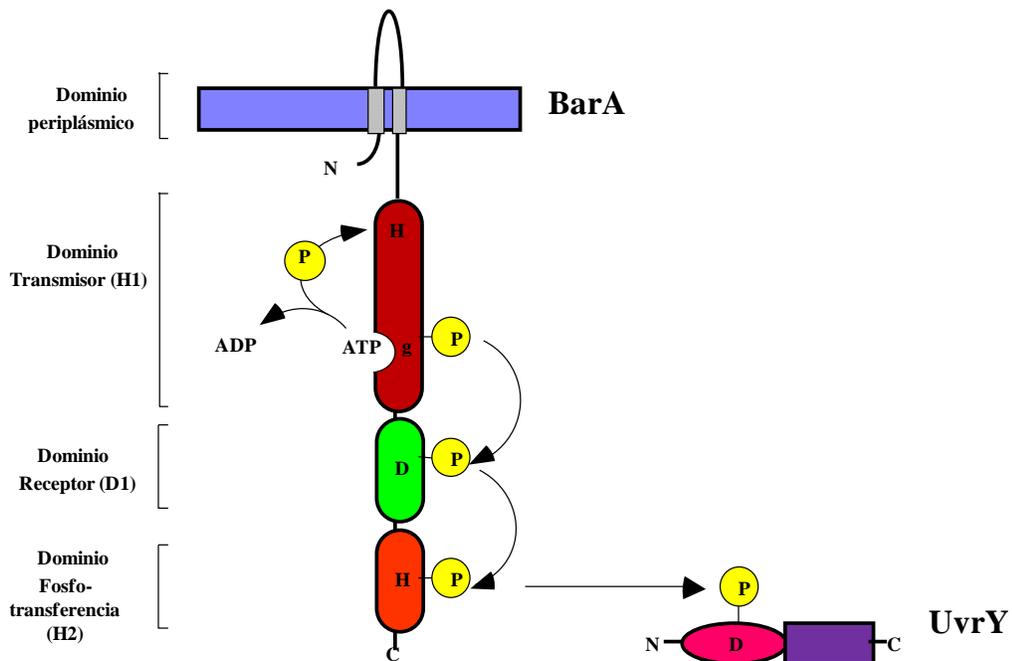


Figura 2. Estructura de la cinasa sensora BarA de *E.coli*. Dominio periplásmico y sus tres dominios citoplasmáticos involucrados en la fosfotransferencia: *dominio transmisor (H1)* con la His-302 conservada y el sitio catalítico de unión a ATP, *el dominio receptor (D1)* con el Asp-718 conservado y el *dominio de fosfotransferencia (H2)* con la His-816 conservada. Los residuos conservados se encuentran relacionados con el fosforrelevo [Pernestig y col., 2001].

1.3 Circuito regulatorio BarA/UvrY y CsrA/CsrB, CsrC.

El SDC BarA/UvrY controla numerosos procesos celulares (p. ej. virulencia, almacenamiento de glucógeno, motilidad, proteólisis, etc.), formando un circuito regulatorio con el sistema de regulación global Csr (*carbon storage regulator*). El principal componente del sistema Csr es la proteína CsrA, la cual se une a mRNAs blancos para regular su traducción de manera positiva o negativa (Cap. II). La manera en la que el SDC BarA/UvrY está vinculado con el sistema Csr se debe a que UvrY fosforilado (UvrY-P), activa directamente la expresión de los RNAs pequeños no-codificantes (sRNAs) CsrB y CsrC; los cuales regulan negativamente la actividad de CsrA (Fig.3) [Babitzke y Romeo, 2007; Pernestig y col., 2003; Suzuki y col., 2002]. Es importante mencionar que no se conocen otros genes blancos del SDC BarA/UvrY. En éste y otros trabajos se ha utilizado a *csrB* como reportero de la actividad del sistema.

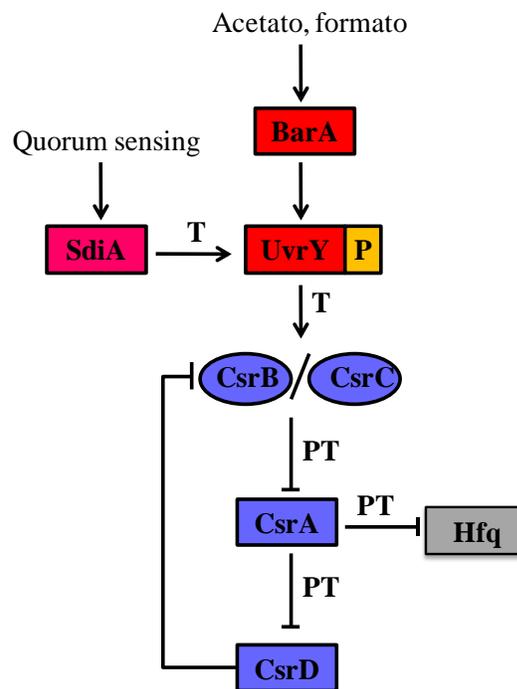


Figura 3. Circuito regulatorio entre BarA/UvrY y CsrA/CsrB, CsrC. (T) Transcripcional, (PT) Post-transcripcional. La activación del SDC BarA/UvrY conlleva a la regulación positiva de los sRNAs CsrB y CsrC, los cuales regulan la actividad de CsrA. La expresión de los sRNAs está regulada negativamente por CsrD. [Timmermans y Van Melderén, 2010].

1.4 Activación del SDC BarA/UvrY.

Previamente se había demostrado que el SDC BarA/UvrY se activa en la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria de crecimiento de *E. coli* [Pernestig y col., 2003; Suzuki y col., 2002]. También se había observado que la activación de este sistema es dependiente del pH externo y que a valores de pH menores de 5.5 está inactivo (mas no se afecta la transcripción ni la traducción de *barA* y/o *uvrY*) [Mondragón y col., 2006]. Recientemente Chávez y col (2010), observaron que a pesar de que a pH 5 el SDC BarA/UvrY está inactivo, la adición de glucosa al medio de cultivo induce su activación (después de aproximadamente 2 horas) (Fig. 4A). El hecho de que en presencia de glucosa el sistema se haya activado a las 2 horas, sugirió que un producto final del metabolismo de la glucosa es el responsable de la activación de la proteína BarA y/o UvrY, los autores demostraron que este sistema se activa por acetato, formato o por otros ácidos de cadena corta (Fig. 4B).

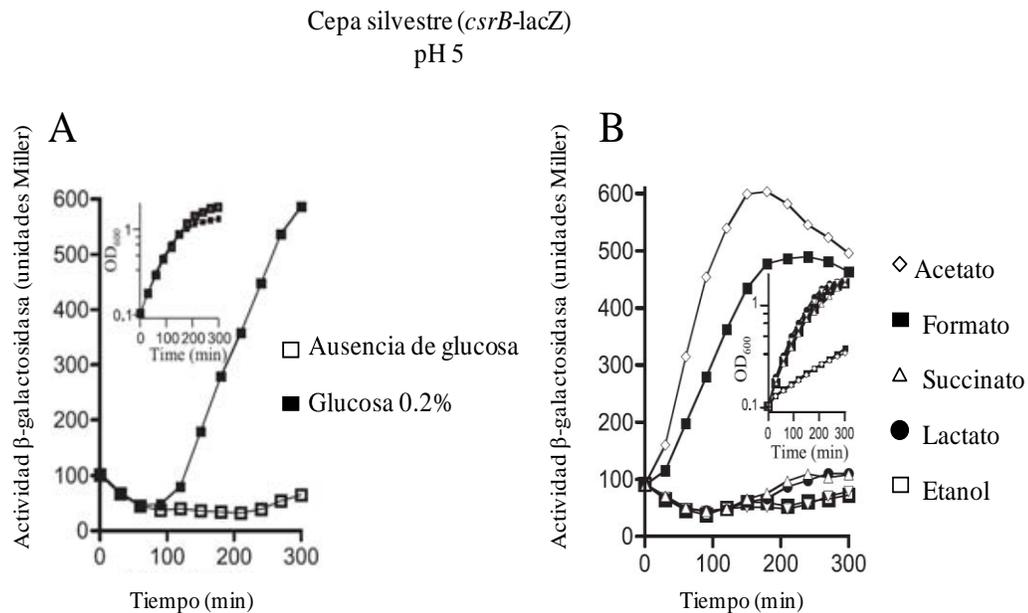


Figura 4. Activación del SDC BarA/UvrY. Crecimiento (O.D.₆₀₀) y actividad β -galactosidasa de la cepa silvestre, en medio LB en presencia y/o ausencia de diferentes sustratos. (A) La adición de glucosa al medio de cultivo es capaz de inducir la activación del SDC aún en pH 5. (B) Algunos ácidos grasos de cadena corta son el estímulo para BarA/UvrY. (A, B) En [Chávez y col., 2010].

Aunque no se ha demostrado el mecanismo por el cual el acetato es detectado por BarA, es interesante saber que el acetato es un metabolito predominante en *E. coli* y que se empieza a acumular en el medio de cultivo, en la transición a la fase estacionaria [Wolfe, 2005]. Cuando las células han agotado la glucosa u otros sustratos acetogénicos (en la fase exponencial), empiezan a asimilar el acetato extracelular acumulado a través de una reacción catalizada por las acetil-CoA sintetasas. A este cambio de la producción y excreción de acetato, y a su asimilación, se le conoce como el “switch de acetato” [Wolfe, 2005].

1.5 Regulación de la expresión de *barA* y *uvrY*.

La regulación de la expresión de *barA* y *uvrY* (y sus homólogos) está pobremente estudiada. Hasta el momento se ha observado en *E. coli*, que los niveles del transcrito de *uvrY* están regulados positivamente por la proteína SdiA [Suzuki y col., 2002; Wei col., 2001]. SdiA de *E. coli* es homóloga de la proteína LuxR del género *Vibrio* (involucrada en el *quorum-sensing*) [Suzuki y col., 2002; Waters y Bassler, 2005]. Por medio de análisis de microarreglos, se ha encontrado que la sobreexpresión de *sdiA* induce, a) la activación de la división celular, b) incremento en la resistencia a antibióticos, c) incremento en la transcripción de ~75 genes (entre ellos *uvrY*) y disminución de la transcripción de ~ 62 genes (incluyendo los de motilidad) [Dyszal y col., 2010; Van Houdt y col., 2006; Wei y col., 2001]. Además se ha encontrado que SdiA se necesita para reducir la formación de biopelículas en *E. coli*, en presencia de moléculas de señalización (autoinductores; AIs -ver Cap. V), así como también en la presencia de la señal de indol en la fase estacionaria [Lee y col., 2007].

1.6 Regulación de la actividad del SDC GacS/GacA en *P. aeruginosa*.

El SDC GacS/GacA de *P. aeruginosa* es homólogo de BarA/UvrY de *E. coli*. Al igual que BarA, GacS regula a través de GacA la expresión de RsmY y RsmZ (homólogos de CsrB y CsrC, respectivamente). Sin embargo, GacS regula junto con RetS la producción de factores de virulencia. RetS es una cinasa sensora (ausente en *E. coli*) inusual, ya que la misma cinasa

presenta dominios receptores del regulador de respuesta; es decir no existe para esta cinasa un regulador de respuesta como tal [Laskowski y Kazmierczak, 2006]. Recientemente se demostró que RetS modula el estado de fosforilación de GacS por una interacción directa y específica entre ambas cinasas sensoras, y además se observó que la interacción no requiere de residuos de fosfotransferencia [Goodman y col., 2009]. Aunque no se ha dilucidado el mecanismo de interacción entre ambos sensores, este hallazgo es interesante, pues abre una nueva perspectiva en cuanto a la regulación de las vías de señalización de los SDC. No se puede descartar la posibilidad de que BarA pueda estar regulado de manera similar a GacS.

Recapitulación.

El SDC BarA/UvrY de *E. coli* está constituido por la cinasa sensora BarA, anclada a la membrana y por el regulador de respuesta UvrY, en el citosol. En respuesta al acetato extracelular (acumulado en la fase exponencial tardía de crecimiento) el sistema Bar/UvrY activa directamente la expresión de los sRNAs CsrB y CsrC, los cuales reprimen la actividad de la proteína de regulación global CsrA. En el **capítulo II** se aborda con detalle la función de CsrA. Por otro lado, la expresión de *uvrY* está regulada positivamente por SdiA (homólogo de LuxR), interesantemente se ha reportado que SdiA participa entre otras cosas, en la regulación de la formación de biopelículas en la fase estacionaria. En el **capítulo V** se discute el papel de SdiA en el *quorum-sensing* y su participación en el circuito regulatorio BarA/UvrY, CsrA/CsrB, CsrC.

Capítulo II

Introducción al Sistema de Regulación Global Csr

2.1 CsrA regula múltiples vías en *E. coli* y en otras especies bacterianas.

CsrA es una proteína homodimérica de 61 aminoácidos que tiene un papel clave en el sistema de regulación global Csr. CsrA regula múltiples vías no relacionadas en *E. coli* y en otras especies bacterianas (ver más adelante) [Revisión, Timmermans y Van Melderren, 2010]. Se han identificado homólogos de CsrA en *Salmonella* spp, en *E. cartovora* y *P. aeruginosa* (RsmA o RsmE; repressor of secondary metabolites) [Blumer y col., 1999; Chantterjee y col., 1995], y en *P. fluorescens*, el cual contiene dos homólogos de CsrA (RsmA y RsmE) que parecen tener funciones redundantes [Reimmann y col., 2005]. En la tabla 1 se enlistan los mRNAs blancos de CsrA en diferentes especies bacterianas [Revisión, Timmermans y Van Melderren, 2010].

Tabla 1. Genes blancos directos de CsrA [Timmermans y Van Melderren, 2010].

Genes blanco	Función	Regulación	Especies
<i>glgCAP</i>	Metabolismo del glucógeno	Negativa	<i>E. coli</i>
<i>pgaABCD</i>	Desarrollo de biopelícula	Negativa	<i>E. coli</i>
<i>Hfq</i>	Proteína de unión a RNA	Negativa	<i>E. coli</i>
<i>cstA</i>	Transporte de péptidos	Negativa	<i>E. coli</i>
<i>ydeH</i>	Metabolismo c-di-GMP	Negativa	<i>E. coli</i>
<i>ycdT</i>	Metabolismo c-di-GMP	Negativa	<i>E. coli</i>
PA0081	Proteína scaffolding	Negativa	<i>P. aeruginosa</i>
PA0082	Proteína hipotética	Negativa	<i>P. aeruginosa</i>
PA4492	Proteína hipotética	Negativa	<i>S. typhimurium</i>
STM1987	Metabolismo c-di-GMP	Negativa	<i>S. typhimurium</i>
STM3375(<i>csrD</i>)	Metabolismo c-di-GMP	Negativa	<i>S. typhimurium</i>
STM1344	Metabolismo c-di-GMP	Negativa	<i>S. typhimurium</i>
STM1697	Metabolismo c-di-GMP	Negativa	<i>S. typhimurium</i>
<i>flhDC</i>	Regulador de motilidad	Positiva	<i>E. coli</i>
<i>sepLspADB</i>	Factores de virulencia	Positiva	<i>E. coli</i>
STM3611	Metabolismo c-di-GMP	Positiva	<i>S. typhimurium</i>

2.1.1 CsrA regula el metabolismo central del carbono.

La vía central del metabolismo del carbono comprende la glucólisis, el ciclo de Krebs y la ruta de las pentosas fosfato. Estas vías están interconectadas y dependen de la entrada de glucosa a través del sistema de fosfotransferas/fosfoenolpiruvato (PTS) y de la conversión a glucosa-6-fosfato. La glucogénesis representa una cuarta vía, en la que la glucosa-6-fosfato se convierte en glucógeno. En *E. coli* los genes *glgCAP* codifican enzimas responsables del anabolismo del glucógeno, mientras que los genes *glgPXS* codifican enzimas involucradas en su catabolismo [Revisión, Timmermans y Van Melderren, 2010]. CsrA regula negativamente la glucogénesis y la gluconeogénesis, a través de la inhibición de la traducción del transcrito *glgCAP* [Baker y col., 2002], además también afecta la expresión de los otros genes *glg* (excepto *glgX*) [Sabnis y col., 1995; Yang y col., 1996]. CsrA también regula positivamente el metabolismo del acetato [Wei y col., 2000] y la expresión del gen *cstA*, el cual codifica un posible transportador de péptidos que se induce en ausencia de carbono [Dubey col., 2003]. Cabe mencionar que en *S. typhimurium* CsrA no regula la síntesis del glucógeno; sino que regula otras vías como el metabolismo de la maltosa y el acetato [Lawhon y col., 2003].

2.1.2 CsrA participa en la regulación del *quorum-sensing*.

El *quorum-sensing* es un proceso de comunicación bacteriana inter-celular que les permite a las bacterias detectar la densidad de su población y coordinar la expresión genética grupal. La comunicación inter-celular en el *quorum-sensing* depende de moléculas señales (AIs; autoinductores) y de sistemas de transducción de señales. A altas densidades celulares las concentraciones de AIs aumentan y son detectados por los sistemas de traducción, los cuales, a través del regulador transcripcional LuxR inducen la expresión de genes blanco [Revisión, Waters y Bassler, 2005] (Cap. V). En varias especies incluyendo los géneros *Vibrio* y *Pseudomonas*, CsrA regula negativamente la producción de AIs, sin embargo no se conocen los mecanismos moleculares de este evento [Pessi y col., 2001; Cui y col., 1995]. Además, se ha observado en *E. carotovora*, que los AIs regulan negativamente la expresión de RsmA (homólogo de CsrA) [Chatterjee y col., 2002].

2.1.3 CsrA regula la formación de biopelículas y la motilidad celular.

Las bacterias a menudo forman comunidades multicelulares asociadas sobre superficies que se conocen como biopelículas; de esta manera se protegen en condiciones ambientales adversas [Revisión, Moons y col., 2009]. Uno de los primeros pasos para la formación de biopelículas implica la unión de la bacteria a su sustrato. El homopolímero PGA (poli- β -1,6-*N*-acetil-D-glucosamina) juega un papel importante en esta primera fase [Itoh y col., 2008], en *E. coli* PGA se produce y secreta a través de enzimas codificadas en el operón *pgaABCD*. Otro factor importante en la formación de biopelículas involucra al segundo mensajero c-di-GMP (bis-(3'-5')-monofosfato de guanosina cíclico), este segundo mensajero también controla la motilidad celular; altos niveles de c-di-GMP favorecen el estado sésil de las bacterias, mientras que bajos niveles promueven la motilidad [Jonas y col., 2008]. En *E. coli* las enzimas responsables para la síntesis de c-di-GMP son las diguanilato ciclasas (con un motivo GGDEF conservado), mientras que las enzimas responsables de su degradación son las fosfodiesterasas (con un motivo EAL conservado).

En *E. coli* CsrA actúa paralelamente para regular negativamente la formación de biopelículas y regular positivamente la motilidad celular. En el primer caso, CsrA regula negativamente la expresión del operón *pgaABCD* (inhibiendo la producción de PGA) [Wang y col., 2005] y en el segundo, regula negativamente la expresión de dos proteínas GGDEF (*yedT* y *ydeH*) (inhibiendo la producción de c-di-GMP) [Jonas y col., 2008]. Además, en cuanto al control de la motilidad celular, se ha observado que CsrA regula positivamente la síntesis de flagelos en *E. coli* y *S. typhimurium* [Wei col., 2001; Jonas y col., 2010]. Por otra parte, en *V. vulnificus* y *Campylobacter jejuni*, CsrA también regula negativamente la producción de biopelículas (aunque los mecanismos moleculares de este evento no se conocen) [Fields y Thompson, 2008; Jones y col., 2008], mientras que en *S. typhimurium* regula la expresión de dos proteínas GGDEF, dos proteínas GGDEF-EAL y cuatro proteínas EAL [Jonas y col., 2010].

2.1.4 CsrA regula la patogenicidad y virulencia.

La patogenicidad y virulencia se asocian con la habilidad de los microorganismos para adherirse a los tejidos del hospedero, colonizar y secretar factores de virulencia. Una gran cantidad de evidencia involucra a CsrA en el control de la virulencia en diferentes especies bacterianas, p. ej. CsrA activa directamente la expresión de genes necesarios para la formación del pedestal en *E. coli* enteropatógena [Bhatt y col., 2009 y referencias].

2.2 Mecanismo de acción.

CsrA se une a motivos GGA en la región 5'-UTR de sus mRNAs blancos, afectando su estabilidad y/o traducción [Mercante y col., 2009]. Aunque estos mecanismos no están totalmente claros, se ha observado que la regulación negativa de CsrA, consiste en el bloqueo del sitio de unión de ribosomas, dando lugar a la degradación del transcrito (p. ej. mRNAs *glgCAP*, *cstA*, *pgaABC*) [Baker y col., 2002; Dubey y col., 2003; Wang y col., 2005]. De manera interesante, se ha demostrado que CsrA también inhibe la traducción del mRNA *hfq* (Cap. IV) [Baker y col., 2007]. En contraparte, el mecanismo de regulación positiva por CsrA se relaciona con la estabilización del transcrito a través de su unión, permitiendo una eficiente traducción (p. e. mRNAs *flhDC*) [Wei y col., 2001].

2.3 Regulación de la expresión de *csrA*.

La expresión del gen *csrA* está regulada positivamente por el factor σ^{38} [revisión, Timmermans y Van Melder, 2010]; el cual regula la expresión de genes durante la entrada de la fase estacionaria y en condiciones de estrés [revisión, Klauck y col., 2007]. La regulación de *csrA* mediada por σ^{38} solamente se ha observado cuando las células crecen en medio con glucosa como única fuente de carbono [Dong y Schellhorn, 2009], pero en medio rico no parece ser el caso [Patten y col., 2004; Rahman y col., 2006].

2.4 Regulación de la actividad de CsrA.

La actividad de CsrA está regulada negativamente por los sRNAs (Cap. III) de función redundante CsrB y CsrC de *E. coli* [Dubey y col., 2005; Liu y col., 1997; Suzuki y col., 2002; Weilbacher y col., 2003]. Estos sRNAs están compuestos por múltiples sitios de unión a CsrA que les permiten unirse y secuestrar a la proteína, inhibiendo su actividad [Revisión, Babitzke y Romeo, 2007]. Por otra parte, CsrB y CsrC son susceptibles a la degradación por RNasaE, a través de un complejo formado con la proteína de unión a di-GMP CsrD [Suzuki y col., 2006]. Se ha demostrado, que el regulador de respuesta UvrY-P es capaz de activar directamente la transcripción de ambos sRNAs en la entrada de la fase estacionaria, incrementando sus efectos antagónicos sobre CsrA [Gudapaty y col., 2001; Suzuki y col., 2002]. Interesantemente, CsrA activa indirectamente la síntesis de ambos sRNAs a través de UvrY, resultando en un circuito autoregulatorio [Suzuki y col., 2002; Weilbacher y col., 2003]. Por otro lado, se ha reportado que Hfq estabiliza el sRNAs RsmY (homólogo de CsrB en *P. aeruginosa*) [Sorger-Domenigg y col., 2007]. La idea de que el circuito Csr está interconectado con otras redes de regulación global sugiere que CsrA gobierna la fisiología celular a una escala que no se ha entendido totalmente.

Recapitulación.

CsrA es una proteína de unión a RNA que regula múltiples procesos fisiológicos en *E. coli*, entre ellos se encuentran: a) el metabolismo central del carbono, b) la patogenicidad y virulencia, c) la regulación positiva de la motilidad y d) la regulación negativa de la formación de biopelículas. La actividad de CsrA está regulada negativamente por los sRNAs CsrB y CsrC, los cuales secuestran a la proteína y compiten con los mRNAs blancos de CsrA. Últimamente se ha reconocido el papel de los sRNAs como elementos de regulación importantes en las rutas de señalización global. Algunos sRNAs conectan un circuito con otro. En el **capítulo III** se describe la participación de los sRNAs en diferentes sistemas de regulación.

Capítulo III

Función de los sRNAs bacterianos en los circuitos de señalización

3.1 RNAs pequeños no-codificantes (sRNAs) bacterianos.

Los sRNAs son moléculas heterogéneas de RNA cuya longitud varía entre los 80 y 100 nucleótidos. Estas moléculas no se traducen y son relativamente estables (debido a su estructura secundaria de tallo y asa). Los sRNAs funcionan como reguladores de la expresión genética y se activan como parte de la respuesta de algunos sistemas de estrés bacterianos (Fig. 5). Es posible que todos los sistemas de respuesta a estrés incluyan como parte de su regulón al menos un sRNA [Gottesman, 2002, 2005; Waters y Stroz, 2009].

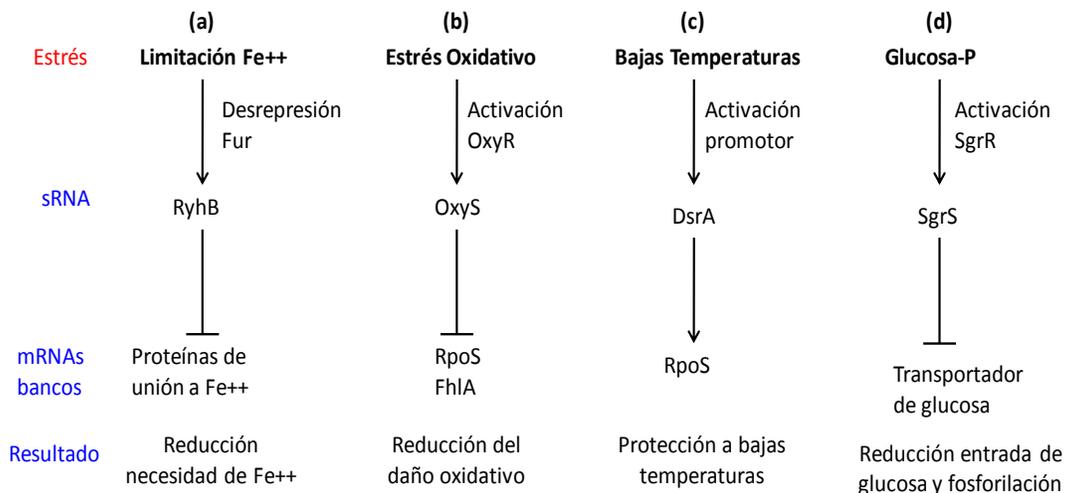


Figura 5. Síntesis de sRNAs. Línea vertical con punta de flecha: activación; línea vertical con punta de línea horizontal: represión. **(a) RyhB** se sintetiza en respuesta a la limitación de Fe; RyhB causa la degradación de mRNAs que codifican proteínas de unión a Fe no esenciales. **(b) OxyS** se sintetiza junto con OxyR en respuesta al estrés oxidativo; OxyS regula negativamente la síntesis de los mRNAs *rpoS* y *fhlA*, reduciendo la mutágenesis. **(c) DsrA** se activa a bajas temperaturas; DsrA incrementa los niveles de traducción de RpoS, aumentando la expresión de genes blanco (p.ej. osmoprotectores) **(d) SgrS** se sintetiza junto con SgrR en respuesta a la acumulación de glucosa-P (no es tolerada por la célula); SgrS causa la degradación del mRNA del transportador de glucosa, reduciendo la acumulación de glucosa-P [Gottesman, 2005].

3.2 Clasificación de sRNAs bacterianos.

En los últimos años se han identificado ~80 sRNAs en *E. coli* [Gottesman, 2005; Waters y Storz, 2009] los cuales se pueden dividir en dos grupos dependiendo de sus blancos: los que actúan sobre proteínas y los que actúan sobre mRNAs. Estos últimos son los más estudiados y a su vez, se pueden dividir en dos subgrupos: los que funcionan en *cis* y los que funcionan en *trans*. A continuación se describen con mayor detalle las características generales de cada grupo.

3.2.1 sRNAs que actúan sobre proteínas.

La mayoría de estos sRNAs antagonizan la actividad de su proteína cognado, mediante la imitación de estructuras o de ácidos nucleicos presentes en los mRNAs regulados por su proteína blanco [Waters y Storz, 2009]. Los ejemplos conocidos hasta el momento son: a) CsrB/CsrC, b) 6S y c) GlmY.

3.2.1.1 sRNAs CsrB/CsrC.

CsrB y CsrC modulan la actividad de CsrA (proteína de unión a RNA que forma parte de un sistema de regulación global) [Babitzke y Romeo, 2007]. Los dímeros de CsrA se unen a motivos GGA en la región 5'-UTR de sus mRNAs blancos, afectando su estabilidad y/o traducción (Cap. II). CsrB y CsrC contienen secuencias repetidas GGA (22 y 13 respectivamente) cuando su expresión aumenta, compiten con los mRNAs blancos de CsrA y secuestran a la proteína. La transcripción de los genes *csrB* y *csrC* se induce a través del SDC BarA/UvrY. Además su estabilidad depende de la proteína de unión a di-GMP CsrD, la cual recluta a la RNasa E para degradarlos [Suzuki y col., 2006]. Se ha encontrado el mismo mecanismo de acción de homólogos de CsrB y CsrC sobre la actividad de CsrA, en otras bacterias como *Salmonella*, *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Vibrio*; en ellas, impacta en el metabolismo secundario, el *quorum-sensing* y la invasión al epitelio intestinal [Revisiónes, Lapouge y col., 2008; Lucchetti-Miganeh y col., 2008].

3.2.1.2 sRNA 6S.

El sRNA 6S de *E. coli* imita a un promotor abierto para unirse y secuestrar a la subunidad σ^{70} de la RNA polimerasa [Revisión, Wassarman, 2007]. Cuando los niveles del sRNA 6S son abundantes (especialmente en fase estacionaria) son capaces de formar complejos con varias subunidades σ^{70} , inhibiendo la transcripción de promotores dependientes de este factor [Trotochaud y Wassarman, 2005]. Se han encontrado múltiples homólogos de 6S en una gran variedad de bacterias, incluyendo dos en *Bacillus subtilis*.

3.2.1.3 sRNA GlmY.

GlmY y su sRNA homólogo GlmZ promueven la acumulación de la glucosamina-6-fosfato sintasa (codificada por el gen *glmS*) a través de diferentes mecanismos. GlmZ se une al mRNA *glmS* y activa su traducción, por otro lado GlmY (que carece de la región complementaria al mRNA *glmS*) se une a la proteína YhbJ (necesaria para procesar y activar a GlmZ). La unión de GlmY a YhbJ ocasiona que GlmZ sea incapaz de activar la traducción de *glmS* [Reichenbach y col., 2008; Urban y Vogel., 2008].

3.2.2 sRNAs que actúan sobre mRNAs.

La mayoría de los sRNAs caracterizados hasta el momento, regulan la expresión genética a través del apareamiento de bases con mRNAs blancos, afectando su traducción y/o estabilidad [Waters y Stortz, 2009]. Entre éstos, se encuentran sRNAs que funcionan en *cis* y los que funcionan en *trans*.

3.2.2.1 sRNAs que funcionan en *cis*.

Moléculas de RNA que se encuentran en el mismo locus que controlan, pero en la cadena opuesta. Los ejemplos típicos de éstos son los sRNAs que controlan el número de copias de los plásmidos y aquellos que participan en la regulación de ciertos bacteriófagos.

3.2.2.2 sRNAs que funcionan en *trans*.

La mayoría de los sRNAs confirmados se encuentran en esta categoría [Zhang y col., 2003]; se expresan a partir de la codificación de sus blancos y contienen secuencias complementarias a ellos. Muchos de ellos requieren de la chaperona de RNA Hfq para su función (Cap. IV). Algunos sRNAs contienen secuencias que bloquean los sitios de unión a ribosomas y/o el codón de inicio de la traducción de su mRNA blanco, lo que resulta en la *inhibición de la traducción* [Aiba, 2007; Sharma y col., 2007]. Otros sRNAs (p.ej. DsrA y RprA) en condiciones de estrés, *activan la traducción* de RpoS con la ayuda de Hfq [Soper y col., 2010, Urban y col., 2007]. Por otro lado, la unión del sRNA a su blanco, también puede inducir la degradación del complejo a través de RNasas, como la RNasa E o RNasa III [Masse y col., 2003; Morita y col., 2005].

3.2.3 sRNAs que tienen actividad catalítica.

Por último se puede distinguir un grupo sRNAs que tienen actividad catalítica o que forman parte de complejos ribonucleoproteicos. Los dos únicos sRNAs que se conocen como esenciales en *E. coli* son el sRNA 10S que representa la parte catalítica de la RNasa P (procesa tRNAs y rRNAs) y el sRNA 4.5S, el cual forma parte de la maquinaria de reconocimiento de señales para la secreción de proteínas [Herskovits y col., 2000].

Recapitulación.

Los sRNAs son importantes elementos de señalización, que conectan diferentes circuitos de regulación (p. ej. el *quorum-sensing*, **capítulo V**). La mayoría de los sRNAs tienen como blanco a mRNAs y requieren de la proteína Hfq para facilitar la unión entre ambas moléculas. En el **capítulo IV** se describe la función y el mecanismo de acción de Hfq. Se ha reportado que la proteína CsrA se une a Hfq y reprime su traducción (bloqueando el sitio de unión a ribosomas). Otro reporte indica que Hfq es capaz de unirse a los sRNAs CsrB CsrC, promoviendo la actividad de CsrA (**capítulo II**), sin embargo esto no ha sido claro.

Capítulo IV

Papel de Hfq en la actividad de los circuitos regulatorios

4.1 Proteína Hfq.

Hfq es una proteína de estructura hexamérica, presente en la mayoría de las especies bacterianas [Moller y col., 2002; Wassarman, 2002]. Tiene homología con las proteínas Sm de eucariontes (y arqueas) [Brennan y Link., 2007; Sauter y col., 2003; Schumacher y col., 2002] las cuales participan en diversas reacciones de procesamiento de RNA (p.ej. splicing y degradación del mRNA) [Valentin-Hasen y col., 2004]. Hfq se identificó como un factor de hospedero requerido para la replicación del bacteriófago de RNA Q β . Ahora se sabe que también regula la traducción de mRNAs blancos de manera positiva (incrementando su estabilidad) o de manera negativa (a través de cambios en la estructura secundaria y/o accesibilidad a los ribosomas). La mutante nula *hfq* presenta fenotipos pleiotrópicos, en *Salmonella* se ha observado que la secreción de factores de virulencia, la capacidad de invadir células epiteliales, la motilidad celular, y la desregulación de más de 70 proteínas, están afectados en esta mutante [Sittka y col., 2008 y referencias].

4.2 Mecanismo de acción.

Hfq se une específicamente a moléculas de RNA de cadena sencilla ricas en secuencias AU [Soper y col., 2010]. Interactúa principalmente con: **a) sRNAs** (facilitando su unión a mRNAs blancos [Sittka y col., 2008; Zhang y col., 2003]); **b) mRNAs** (reprimiendo directamente su traducción [Vytvytska y col., 2000]) o estimulando indirectamente su poliadenilación ([Hajnsdorf y Regnier, 2000; Mohanty y col., 2004]; y **c) proteínas** [Baker y col., 2007; Brennan y Link., 2007]. Además se ha descrito que participa en la biogénesis de tRNAs [Lee y Feig., 2008; Scheibe y col., 2007]. A continuación se describen con mayor detalle las características generales de cada tipo de interacción.

4.2.1 Interacción de Hfq sobre sRNAs.

A pesar de ser el tipo de interacción más conocido de Hfq, este mecanismo no está totalmente claro. El ejemplo más estudiado es el de la expresión de *rpoS* dependiente de Hfq [Soper y col., 2010 y las referencias]. El gen *rpoS* codifica la subunidad σ^S de la RNA polimerasa, un importante factor de transcripción de genes involucrados en la respuesta a estrés. La traducción del mRNA *rpoS* está autoreprimida por una estructura secundaria de “tallo y asa” en la región 5'-UTR, que bloquea el acceso a los ribosomas (Fig. 6). Los sRNAs DsrA, RprA y ArcZ (expresados bajo diferentes condiciones de estrés) promueven, a través de Hfq la traducción de RpoS. Hfq se une a la región 5'-UTR del mRNA *rpoS*, incrementando el coeficiente de unión *rpoS*-sRNA de 30 a 50 veces y estabilizando el complejo final. La habilidad de Hfq de unirse fuertemente al mRNA *rpoS* y facilitar el apareamiento con el(los) sRNA(s) depende de dos cadenas sencillas de RNA con elementos ricos en A (A_6) y un elemento repetido $(AAN)_4$ que residen río arriba de la estructura secundaria autoinhibidora del blanco [Soper y col., 2010 y las referencias].

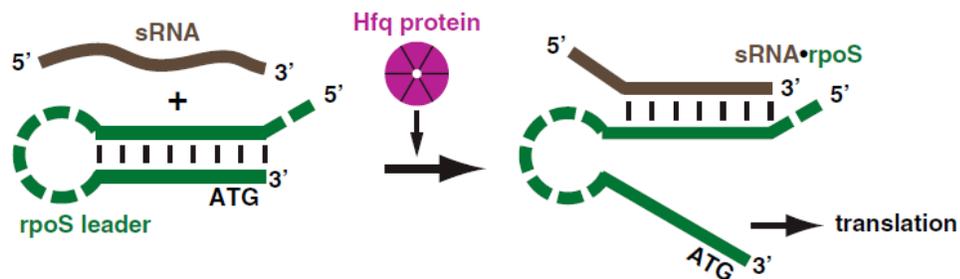


Figura 6. La activación de la traducción de RpoS requiere a sRNAs y a Hfq. El mRNA *rpoS* contiene una estructura secundaria autoinhibitoria, y esta estructura se libera a partir de la unión de DsrA, RprA o ArcZ, un mecanismo dependiente de Hfq [Soper y col., 2010].

4.2.2 Interacción de Hfq sobre mRNAs.

Se ha descrito que Hfq interfiere con el sitio de unión a ribosomas en el mRNA *ompA* de *E. coli* y que a diferencia de los represores traducionales canónicos, Hfq no protege un segmento contiguo del sitio de unión a ribosomas de *ompA* de endoribonucleasas (RNAsas) [Vytvytska y col., 2000]. Por otro lado, debido a que Hfq interactúa con las proteínas PAPI (Polimerasa-poliA) y PNPasa (RNasa II), participa en la estabilidad y vida media de los mRNA (regulando su poliadenilación) que contienen en su extremo 3' terminadores de la transcripción independientes de Rho [Hajnsdorf y Regnier, 2000; Mohanty y col., 2004].

4.2.3 Interacción de Hfq sobre proteínas.

Se ha encontrado que Hfq interactúa con la proteína ribosomal S1 (la cual media la unión de Hfq a la RNA polimerasa) [Le Derout y col., 2010; Sukhodolets y Garges, 2003]; con PAPI y PNPasa (componentes del degradosoma) [Mohanty y col., 2004]; con la RNasa E [Brennan y Link., 2007]; y también se ha reportado que CsrA se une a Hfq y ejerce un efecto negativo sobre su traducción [Baker y col., 2007]. Por otro lado, y de manera contraria, también se ha reportado que Hfq ejerce un efecto positivo sobre los transcritos de CsrA (observación a través de análisis de Northern blot) [McNealy y col., 2005].

Resumen.

Hfq es una proteína que regula la traducción de diversos mRNAs blancos, principalmente a través de los sRNAs. Además también regula otros procesos celulares mediante la unión a proteínas, entre las proteínas blanco se encuentra a CsrA. Se ha reportado que CsrA ejerce un efecto negativo en la traducción de Hfq. Algunos estudios han establecido interrelaciones entre CsrA y Hfq, sin embargo no han sido claros, y muchas veces son contradictorios. Debido a que ambas proteínas controlan globalmente diversos procesos celulares, es importante determinar el nivel en el que interactúan.

Capítulo V

Papel de SdiA en el circuito BarA/UvrY, CsrA/CsrB, CsrC

5.1 El *quorum-sensing*.

El término *quorum-sensing* hace referencia a un proceso de comunicación bacteriana inter-celular que implica la producción, secreción y detección de moléculas señales llamadas “autoinductores” (AIs) [Waters y Bassler, 2005]. Las bacterias usan el *quorum-sensing* para coordinar comportamientos grupales, a través de la regulación de la expresión genética colectiva. A bajas densidades celulares los niveles de AIs extracelulares no son detectables, pero cuando la densidad bacteriana incrementa, los AIs comienzan a acumularse hasta ser detectados. La detección de los AIs inducen cambios en la expresión genética [Tu y Bassler, 2007] que se reflejan por ejemplo, en la bioluminiscencia en *V. harveyi*, además del control de la expresión de factores de virulencia, la formación de biopelículas, la entrada de la fase estacionaria de crecimiento, la formación de esporas, etc [Ahmer, 2004]. A continuación se describe el sistema de *quorum-sensing* en una de las bacterias más estudiadas, *V. harveyi*.

5.1.1 Modelo de *quorum-sensing* en *V. harveyi*.

La bacteria marina *V. harveyi* produce y detecta tres AIs: HAI-1, CAI-1 y AI-2. HAI-1 (homoserina lactona) es una señal especie-específica y se sintetiza por LuxM. CAI-1 (S)-3-hidroxitridecano-4) es una señal específica de género y se sintetiza por CqsA. AI-2 (furanosil borato diéster) es una señal universal, ya que es detectada por una gran variedad de especies bacterianas y se sintetiza por LuxS (Fig. 7). Cada uno de los tres AIs se detecta por tres cinasas sensoras ancladas en la membrana. LuxN detecta HAI-1, CqsS detecta CAI-1 y LuxQ responde a AI-2 a través de la proteína periplásmica LuxP. En condiciones de baja densidad celular (cuando los niveles de AIs son indetectables), los tres sensores actúan como cinasas, y transfieren el fosfato (a través de LuxU) al regulador dependiente de σ^{54} LuxO. LuxO-P reprime indirectamente la expresión de los genes del operón *lux* (que codifican para la

luciferasa), a través de la represión directa de LuxR. Por otro lado, a altas densidades celulares, los niveles de AIs se acumulan e interactúan con los sensores cognado. La interacción conlleva a un cambio entre el modo cinasa y el modo fosfatasa de los sensores, dando lugar a la desfosforilación de LuxO. LuxO desfosforilado es inactivo y por lo tanto los genes *lux* (y otros) se expresan produciendo bioluminiscencia [Tu y Bassler, 2007].

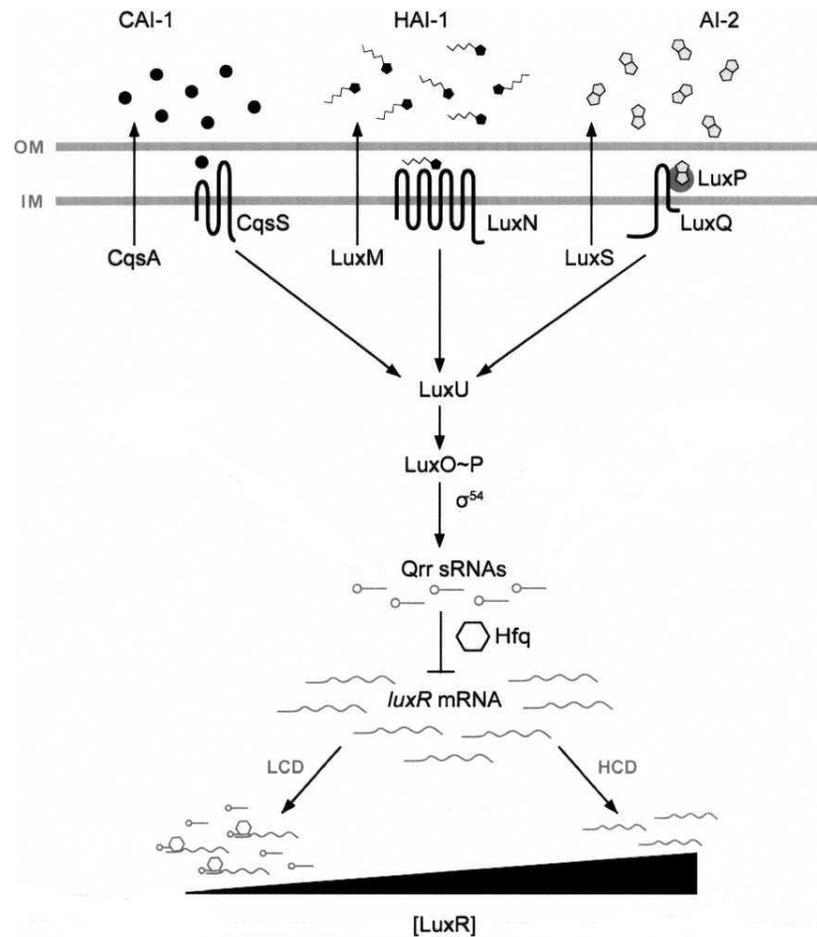


Figura 7. Modelo del sistema de *quorum-sensing* en *V. harveyi* [Tomado de, Tu y Bassler, 2007]

5.1.2 Hfq participa en el *quorum-sensing* reprimiendo la traducción de *luxR*.

Se ha descrito en los patógenos de humanos *V. cholerae* y *V. harveyi*, que LuxO-P activa la expresión de genes que codifican cuatro sRNAs (Cap. III) llamados Qrr 1-4 (*quorum regulatory RNA*). Estos sRNAs desestabilizan el mRNA *luxR* (*hapR* en *V. cholerae*), creando un circuito de autoregulación. Además, se ha observado en *V. cholerae* que los sRNAs Qrr dependen de Hfq para desestabilizar el mRNA *hapR*; de manera importante uno de los cuatro sRNA Qrr en *V. cholerae* es suficiente para el control de *hapR*, lo que sugiere que los cuatro sRNAs restantes tienen funciones redundantes [Lenz y col., 2004].

5.2 SdiA es la proteína homóloga de LuxR.

Organismos de los géneros *Escherichia* y *Salmonella* codifican la proteína SdiA (*suppressor of division inhibition*) la cual es homóloga de LuxR del género *Vibrio* [Ahmer, 2004]. El papel SdiA en el *quorum-sensing* en los miembros de estos géneros ha sido materia de debate por muchos años. A pesar de que estas bacterias codifican a SdiA, no codifican las enzimas responsable de la síntesis de AIs [Michael y col., 2001, Swift y col., 1999]. El papel de SdiA en el *quorum-sensing* fue elusivo por muchos años, hasta que se reportó que SdiA es capaz de responder a AIs generados por otras especies bacterianas [Michael y col., 2001]. Por otro lado, un estudio de la estructura de SdiA por resonancia magnética nuclear mostró que SdiA requiere de la unión con AIs (en particular con homoserina lactona) para plegarse y estabilizarse [Yao y col., 2006]; estos resultados son consistentes con la mayoría de los reportados para las proteínas LuxR, que usan a AIs como “cofactores” que permiten el plegamiento de la proteína (en ausencia de la señal, LuxR es blanco de degradación) [Park y col., 2002; Zhu y Winan, 2001]. Además se ha encontrado que SdiA se necesita para reducir la formación de biopelículas en *E. coli* en presencia de AIs, así como también en la presencia de la señal de indol en la fase estacionaria [Lee y col., 2007]. El indol es un compuesto orgánico no tóxico, que es secretado por *E. coli* cuando crece en medio rico en fase estacionaria.

5.3 Genes regulados por SdiA.

En *E. coli* se han estudiado los efectos de la sobreexpresión de *sdiA*, éstos incluyen: a) activación de la división celular, b) incremento en la resistencia a mitomicina C, c) resistencia a quinolonas, e) incremento en la transcripción de ~ 75 genes (incluyendo *uvrY*) y disminución de la transcripción de ~ 62 genes (incluyendo los de motilidad) [Dyszal y col., 2010; Van Houdt y col., 2006; Wei y col., 2001]; entre los genes regulados positivamente se encuentran: *ftsQAZ* (división celular) [Wang y col., 1991]; *acrAB* (resistencia a antibióticos) [Rahmati y col., 2002] y *uvrY* (SDC, activa directamente la expresión de los sRNAs CsrB y CsrC) [Suzuki y col., 2002; Wei y col., 2001]. En la Tabla 2 se enlistan los genes de función conocida regulados positiva o negativamente, a partir de la sobreexpresión de SdiA [Wei y col., 2001]. Cabe mencionar que algunos autores han realizado otros análisis de microarreglos pero a partir de la inducción de SdiA con AIs, encontrando ligeras diferencias [Van Houdt y col., 2006].

Recapitulación.

La proteína SdiA de *E. coli* regula positivamente la expresión de *uvrY*. SdiA es homóloga de LuxR de *Vibrio* spp., cuyo papel es reconocido en el *quorum-sensing*. LuxR regula la expresión de genes blanco en respuesta a señales extracelulares, conocidas como AIs (autoinductores). Los AIs son secretados por la misma bacteria, en función de su densidad poblacional. Se ha demostrado que en el género en *Vibrio* que la traducción del mRNA *luxR* está regulada negativamente por Hfq (a través de sRNAs). Por otro lado, SdiA es capaz de responder a AIs de otras especies bacterianas (*E. coli* no sintetiza estas moléculas), además se ha demostrado que también responde a indol para regular la producción de biopelículas. El indol es secretado por *E. coli* en la fase estacionaria de crecimiento. Es posible que la expresión y/o actividad de SdiA esté regulada de manera similar a la observada con LuxR.

Tabla 2. Genes con función conocida regulados por SdiA en *E. coli* [Wei y col., 2001]

Regulación positiva	Incremento	Regulación negativa	Disminución
SDC		Taxis y motilidad	
<i>uvrY</i>	11.9	<i>air</i>	4.6
División celular		<i>cheA</i>	3.7
<i>ftsA</i>	10.0	<i>cheB</i>	3.3
<i>ftsQ</i>	8.8	<i>chew</i>	5.3
<i>ftsZ</i>	11.0	<i>chey</i>	4.6
Elementos estructurales		<i>cheZ</i>	4.0
<i>ddlB</i>	4.6	<i>tar</i>	5.3
<i>lpxC</i>	3.4	<i>tsr</i>	5.9
Transporte de aminoácidos		Transporte de aminoácidos	
<i>glnH</i>	4.0	<i>sdaC</i>	3.9
<i>xylF</i>	3.8	<i>glpF</i>	3.6
<i>trkG</i>	4.1	<i>malE</i>	3.7
Degradación del DNA		<i>treB</i>	5.3
<i>mcrC</i>	3.5	<i>fecha</i>	3.5
<i>uvrC</i>	9.3	<i>fecE</i>	3.2
Replicación/replicación DNA		<i>kdpA</i>	3.5
<i>gidA</i>	4.1	Degradación de aminoácidos	
<i>mioC</i>	7.0	<i>sdaB</i>	3.2
<i>nei</i>	8.6	<i>tnaA</i>	4.0
<i>recN</i>	3.6	Metabolismo de energía	
Metabolismo central		<i>ackA</i>	3.1
<i>agaI</i>	3.3	<i>aldA</i>	3.3
<i>agaD</i>	4.5	Constituyente exterior celular	
<i>gcvA</i>	9.5	<i>nana</i>	3.7
<i>pntA</i>	10.4	Proteínas flagelares	
<i>pntB</i>	8.2	<i>flgB</i>	14.3
Degradan compuestos de carbono		<i>flgC</i>	16.7
<i>galE</i>	3.8	<i>flgD</i>	16.7
<i>galK</i>	4.1	<i>flgE</i>	16.7
<i>galT</i>	4.9	<i>flgF</i>	7.1
<i>gusR</i>	8.0	<i>flgG</i>	12.5
Metabolismo de energía		<i>flgH</i>	5.9
<i>dniR</i>	5.8	<i>flgI</i>	5.6
<i>pdhR</i>	4.4	<i>flgJ</i>	6.3
Resistencia a drogas		<i>flgK</i>	6.3
<i>acrA</i>	6.8	<i>flhA</i>	3.1
<i>acrD</i>	3.0	<i>fliA</i>	10.0
<i>acre</i>	14.0	<i>fliC</i>	14.3
<i>acrF</i>	6.3	<i>fliD</i>	4.6
<i>acrR</i>	4.5	<i>fliF</i> ; a <i>fliZ</i>	5.9; 8.3

ANTECEDENTES

1.1 En la mutante *csrA* no se activa el sistema BarA/UvrY.

Datos del laboratorio (no publicados) demostraron que el reportero *csrB-lacZ* (utilizado para medir la actividad del SDC BarA/UvrY) no se activa en la mutante *csrA* ni a pH 7 ni a pH 5 aún en presencia de glucosa (Fig. 8). Es decir, la ausencia de CsrA ocasiona que no se active el sistema BarA/UvrY, aún si la señal para BarA está presente en el medio de cultivo. *Estos resultados sugirieron que la transcripción, vida media y/o traducción de los mRNAs barA y/o uvrY estaba afectada positivamente por CsrA. En ese momento, quedaba pendiente determinar si el papel de CsrA sobre la expresión de barA y/o uvrY era directo o indirecto.*

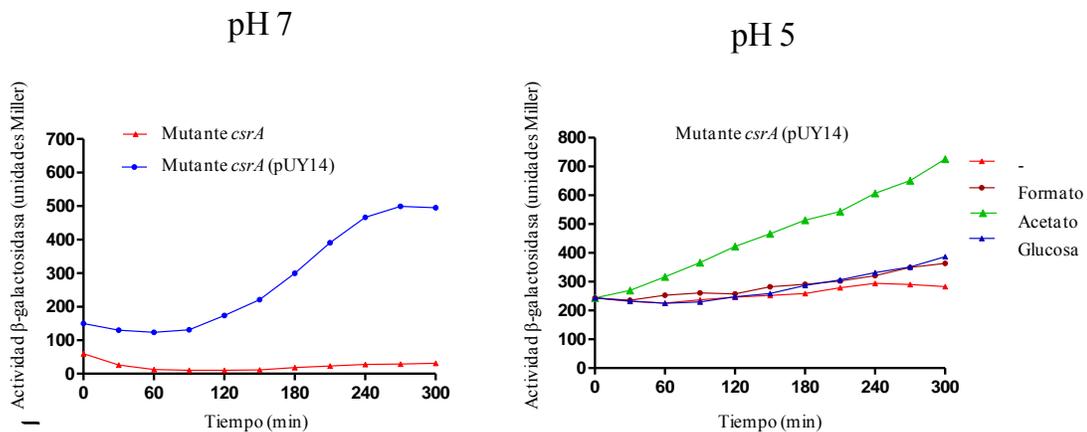


Figura 8. En la mutante *csrA* no se expresa *csrB*. Ensayos de actividad β -galactosidasa para medir la expresión del reportero *csrB-lacZ* en la mutante *csrA* y *csrA* (pUY14). (A) En condiciones de crecimiento a pH 7 en la mutante *csrA* no se expresa el reportero *csrB*, pero cuando se complementa con el plásmido pUY14 (expresa a *uvrY*) la expresión del reportero se restablece. (B) En condiciones de crecimiento a pH 5 el formato y el acetato actúan como el estímulo del SDC BarA/UvrY.

1.2 En la mutante *csrA* (pUY14) se restablece la expresión de *csrB*.

Para confirmar la idea de que CsrA afecta positivamente la expresión de *barA* y/o *uvrY*, se complementó la mutante *csrA* con los plásmidos de mediano número de copias, pBA29 y pUY14 (procedentes del laboratorio del Dr. Tony Romeo, Universidad de Florida), los cuales expresan a *barA* y a *uvrY*, respectivamente. A continuación, se realizaron ensayos de actividad β -galactosidasa, tanto a pH 7, como a pH 5 (en éste último adicionando glucosa, acetato y/o formato) (Fig. 9; Tabla 3) y se observó, que en la mutante *csrA* (pUY14) a pH7 la expresión del reportero *csrB-lacZ* se restablece (Fig. 9C) a niveles similares a los de la silvestre (comparar con la Fig. 8). Mientras que a pH 5 y en presencia de acetato, la cinética de activación del reportero en la mutante *csrA* (pUY14), fue parecida a la observada cuando un regulador de respuesta se activa directamente a través de acetil-P (Fig. 9D).

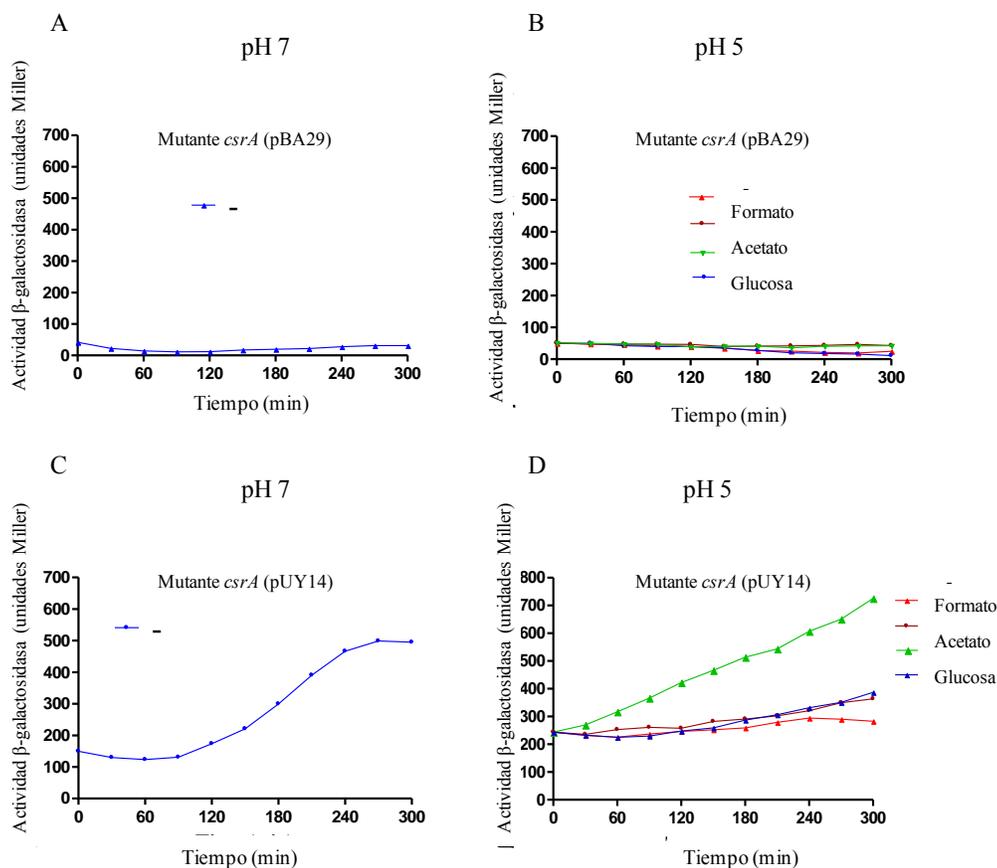


Figura 9. En la mutante *csrA* (pUY14) se restablece la expresión de *csrB*.

Tabla 3. Activación diferencial del SDC BarA/UvrY en la cepa wt y *csrA*.

Condiciones	Wt	<i>csrA</i>	<i>csrA</i> (pUY14)	<i>csrA</i> (pBA29)
pH 7	Activo	-	Activo	-
pH 5	-	-	-	-
pH5 + formato	Activo	-	-	-
pH 5 + glucosa	Activo	-	-	-
pH 5 + acetato	Activo	-	Activo	-

HIPÓTESIS

CsrA regula directa o indirectamente la expresión de *barA* y/o *uvrY*.

OBJETIVO GENERAL

Determinar a qué nivel CsrA regula a BarA y/o UvrY.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Comparar a través de ensayos de RT-PCR, los niveles de expresión de los transcritos *barA* y *uvrY* en la cepa silvestre y en la mutante *csrA*.
2. Comparar la vida media de los mRNAs *barA* y/o *uvrY*, en la cepa silvestre y en la mutante *csrA*, mediante ensayos tipo Northern blot.
3. Comparar a través de análisis de Western blot, los niveles de las proteínas BarA y UvrY en la cepa silvestre y en la mutante *csrA*.

RESULTADOS

Resultados del objetivo particular 1.

1.1 La expresión de *csrB* está aumentada en la fase estacionaria de crecimiento.

Debido a la importancia de *csrB* como reportero de la actividad del SDC BarA/UvrY, se decidió realizar su cinética de expresión en la cepa silvestre, a través de Northern blot. Se tomaron muestras de cultivo cada 15 minutos (a partir de que alcanzó una densidad óptica; O.D.₆₀₀ de ~0.2), y a continuación se extrajo el RNA por el método de fenol caliente [Georgellis y col., 1992]. La comprobación de la integridad del RNA se realizó mediante electroforesis y para el Northern blot se ajustó la concentración de las muestras a 5 µg/µl. En la figura 10 se presenta el resultado de este experimento, usando como sonda el producto amplificado de *csrB* (consultar tabla 4, lista de primers), en donde se observa que *csrB* se expresa en la fase estacionaria de crecimiento y que su activación está entre la O.D.₆₀₀ de 0.9 y 1.0. Por lo tanto, con base en estos resultados se decidió tomar muestras para el RT-PCR (y para los siguientes experimentos), tanto en fase exponencial como en fase estacionaria de crecimiento.

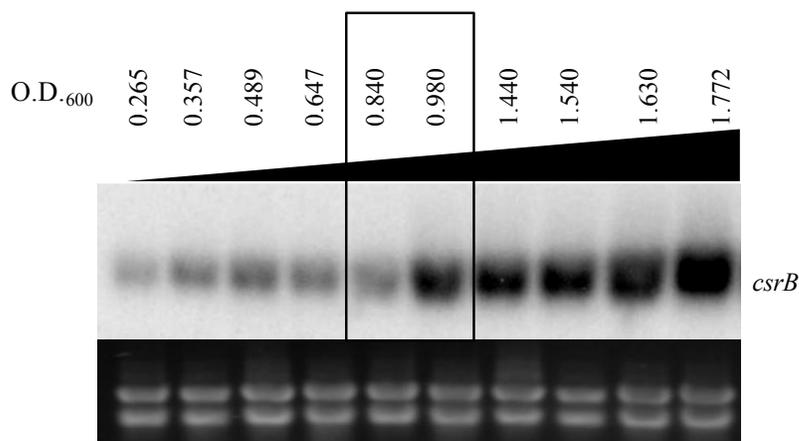


Figura 10. Cinética de la expresión de *csrB* en la cepa silvestre. Las muestras de cultivos se tomaron periódicamente (~15 min) a la O.D.₆₀₀ indicada en la figura, la activación de *csrB* se da entre una O.D.₆₀₀ de 0.9 y 1.0.

1.2 CsrA no afecta la transcripción de *barA* y *uvrY*.

Para distinguir si los niveles de expresión transcripcional de *barA* y/o *uvrY* estaban afectados en la mutante *csrA* se realizó un RT-PCR. Se extrajo RNA de muestras de cultivo de la cepa silvestre y de la mutante a una O.D.₆₀₀ de 0.6 y 1.2, que corresponden a muestras en fase exponencial y en fase estacionaria de crecimiento, respectivamente. Una vez que se comprobó la integridad del RNA a través de electroforesis, se realizó una reacción de PCR para confirmar la ausencia de DNA en estas muestras (Fig. 11). Los RNAs libres de DNA se utilizaron para la reacción de transcripción reversa (Promega).

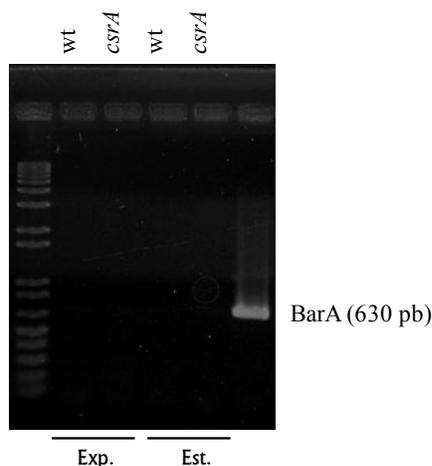


Figura 11. Control de pureza del RNA. PCR con RNA de la cepa silvestre y la mutante *csrA* como templado, y como control positivo de la reacción el plásmido pBA29 que amplifica un fragmento de BarA.

Posteriormente, con los cDNAs de la cepa silvestre y de la mutante *csrA* se realizó el RT-PCR utilizando en cada reacción, pares de primers que amplifican los productos de *barA*, *uvrY* y *rpoA* (éste último se utilizó como control de carga) (Tabla 4, lista de primers), y para evitar que la reacción se saturara, el RT-PCR se hizo a 20 y 30 ciclos. En la figura 12 se muestra el resultado de este experimento, en donde se observa que entre la cepa silvestre y la mutante *csrA*, no hay diferencias significativas en la expresión de los transcritos de *barA* y *uvrY*. Por lo tanto, se infiere que el efecto de CsrA hacia BarA y/o UvrY no es directo, y que está en otro nivel de regulación.

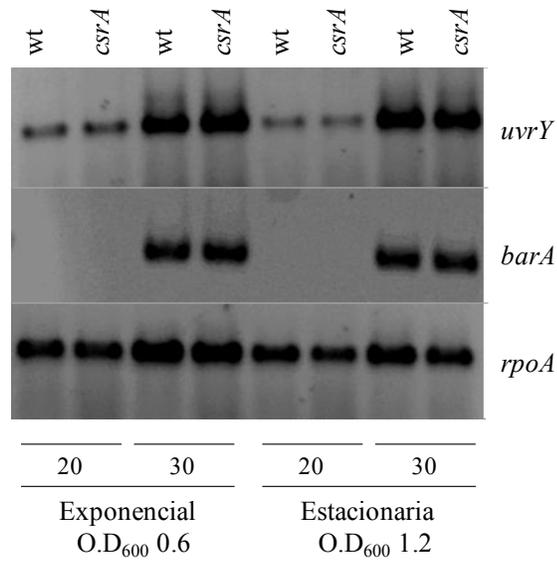


Figura 12. RT-PCR de *uvrY* y *barA* en la cepa silvestre y en la mutante *csrA*. No se observaron diferencias significativas en la expresión de *uvrY* y *barA* en las cepas. Los ciclos del PCR se hicieron a 20 y 30 para evitar que la reacción se saturara.

Resultados del objetivo particular 2.

Con este objetivo, se pretendía determinar la vida media y/o la estabilidad de los mensajeros de *barA* y *uvrY*, tanto en la cepa silvestre, como en la mutante *csrA*. Sin embargo, debido a que en ambas cepas los transcritos mostraron un nivel de expresión similar (Fig. 12), se optó por no continuar con este experimento.

Resultados del objetivo particular 3.

1.3 En la mutante *csrA* los niveles de la proteína UvrY están disminuidos.

Debido a que la transcripción de *uvrY* y *barA* no está afectada en la mutante *csrA* (Fig. 12), se decidió determinar mediante análisis por Western blot, si el efecto positivo de CsrA sobre la expresión de UvrY¹, se encontraba a nivel traduccional. El Western blot se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en la sección de materiales y métodos de este trabajo. Se tomaron muestras de cultivo de la cepa silvestre y de la mutante *csrA*, en fase exponencial y estacionaria de crecimiento y posteriormente, en relación a la O.D.₆₀₀ de cada muestra, se prepararon los extractos proteicos. Los extractos proteicos se separaron por SDS-PAGE al 12% y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, la cual se dejó bloqueando toda la noche a 4°C con TBS-Tween con 5% de leche. La hibridación se realizó con el anticuerpo policlonal anti-UvrY procedente de suero de conejo (obtenido previamente en el laboratorio), y se conjugó con el anticuerpo secundario anti-Fc (Amersham). En la figura 13 se muestra el resultado de este experimento, en donde se observa que en la mutante *csrA* los niveles de UvrY están disminuidos, confirmándose así el papel de CsrA en la traducción de esta proteína.

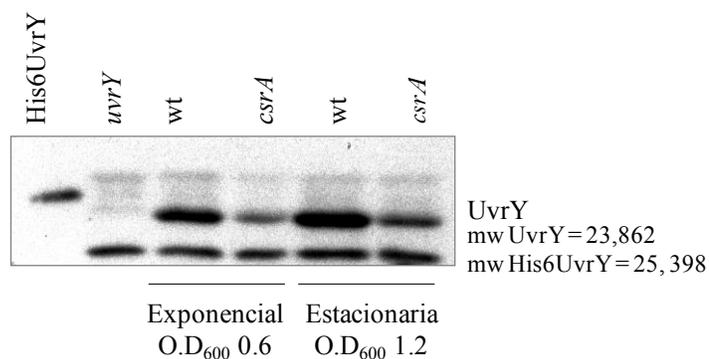


Figura 13. Western blot de UvrY en la cepa silvestre y en la mutante *csrA*. En la mutante *csrA* se observó una diferencia significativa en los niveles de expresión de la proteína UvrY. mw UvrY = 23,862, mw UvrY His6UvrY = 25,398.

¹ En ese momento sólo se contaba con los anticuerpos anti UvrY. Actualmente ya se tienen los anticuerpos anti BarA y se está trabajando en esta parte que queda como perspectiva del proyecto.

Aunque el análisis de Western blot para detectar los niveles de BarA en la cepa silvestre y en la mutante *csrA* está en proceso, los resultados anteriores (Figs. 12 y 13), junto con un análisis bioinformático realizado por el Dr. Enrique Merino (Instituto de Biotecnología, UNAM) (en donde no se encontraron sitios de unión a CsrA en la región 5'-UTR de los mensajeros de *barA* y *uvrY*), sugirieron la participación de uno o más componentes río abajo de CsrA que afectan la traducción de UvrY. En las siguientes páginas de este escrito, se presentan algunos de los avances encaminados a resolver el papel de otros componentes en la expresión y/o actividad de BarA y UvrY.

RESULTADOS ADICIONALES

Debido a los resultados resumidos en la Tabla 3, en donde se observó que en la mutante *csrA* no hay expresión de *csrB*, pero que al complementarla con el plásmido pUY14 la expresión de *csrB* se restablece, se hizo claro el efecto positivo de CsrA en la expresión y/o actividad de BarA y/o UvrY. Ante tal supuesto, había dos posibilidades: a) que CsrA regulara directamente la vida media y/o estabilidad de los mensajeros de *barA* y/o *uvrY* y b) que su efecto en la regulación de uno o ambos componentes era indirecto. Por otra parte, con los resultados presentados anteriormente, se concluyó que este efecto es indirecto y que posiblemente hay otro(s) componente(s) río abajo de CsrA, que regulan directamente la expresión y/o actividad de BarA y/o UvrY.

En la primera parte de los resultados adicionales, se estudió el efecto de SdiA y Hfq en la expresión de *csrB*. Se optó por estos componentes, pues por un lado se sabe que SdiA regula positivamente la transcripción de UvrY [Suzuki y col., 2002; Wei col., 2001], y por otro lado, se sabe que CsrA reprime directamente la traducción de la chaperona de RNA, Hfq [Baker y col., 2007] (Fig. 3). Se encontró que ambas proteínas son necesarias para la expresión de *csrB* (Fig. 14). Sin embargo, debido a que el efecto de SdiA sobre la expresión de *csrB* se debe a la transcripción de *uvrY*, pero que en la mutante *csrA* la transcripción de *uvrY* no está afectada (Fig. 12), el proyecto actualmente está centrado en estudiar el papel de Hfq sobre la traducción de UvrY (ver perspectivas).

En la segunda parte de los resultados adicionales, se estudió el papel de otras proteínas en la expresión del reportero *csrB* y sus implicaciones en la actividad de la cinasa sensora BarA. En este caso, aprovechando el fenotipo de nada de la mutante *barA* (nada más) y el de su contraparte *csrA* (no nada), se seleccionaron mutantes de la colección Keio que compartieran dichos fenotipos, en donde se encontró que algunas de éstas además de compartir y/o contrarrestar el fenotipo de BarA (Fig. 16), juegan un papel importante en la expresión de *csrB* (Fig. 18). Interesantemente, algunas de estas mutantes, están afectadas en proteínas que pertenecen a la familia Flotilina-1 de eucariontes, cuya participación en la formación de balsas lipídicas está ampliamente estudiada.

1.4. SdiA y Hfq se necesitan para la expresión de *csrB*.

El papel de SdiA y Hfq sobre la expresión de *csrB*, se determinó mediante Northern blot. Se extrajo el RNA de muestras de cultivo de las mutantes *sdiA* y *hfq* (procedentes de la colección Keio) en fase exponencial y estacionaria de crecimiento, y a continuación, se realizó el northern blot utilizando como sonda el producto amplificado de *csrB*. En la figura 14 se observa que la expresión del reportero en ambas mutantes está afectada negativamente.

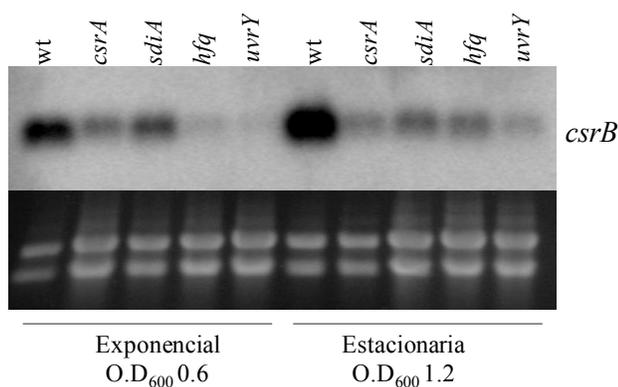


Figura 14. Northern blot de la expresión de *csrB* en diferentes mutantes. La expresión de *csrB* está afectada en las mutantes *sdiA*, *hfq* y *uvrY*, tanto en fase exponencial como en fase estacionaria de crecimiento.

Aunque en el experimento anterior se observó que ambas proteínas se requieren para la expresión de *csrB*, por un lado, el efecto de SdiA era el esperado de acuerdo a la literatura, debido a que incrementa los niveles del transcrito de *uvrY* [Suzuki y col., 2002; Wei col., 2001] y por lo que repercute directamente en la expresión de *csrB*. Además, el papel de SdiA es independiente del de CsrA, ya que en la mutante *csrA* los niveles del transcrito *uvrY* no están afectados (Fig. 12). Por otro lado, el efecto de Hfq nos pareció interesante y sugirió la posibilidad, de que esta proteína regula directa o indirectamente (a través de sRNAs - ver más adelante) la traducción de UvrY.

1.5 En la mutante *hfq* los niveles de la proteína UvrY están disminuidos.

Para determinar si Hfq actuaba sobre la traducción de UvrY, se prepararon extractos proteicos de muestras de cultivo de la cepa silvestre y de la mutante *hfq*, tomadas en fase exponencial y estacionaria de crecimiento y se realizó un Western blot con condiciones idénticas a las mencionadas anteriormente y se hibridó con el anticuerpo policlonal anti-UvrY procedente de suero de conejo, para después conjugarlo con el anticuerpo secundario anti-Fc (Amersham). Como se puede observar en la figura 15, al igual que en la mutante *csrA*, los niveles de UvrY en esta mutante están afectados negativamente. Por lo tanto, si Hfq era el componente río abajo de CsrA, se pensó que en la mutante *csrA* los niveles de la proteína Hfq deberían estar afectados negativamente (como lo están los niveles de UvrY, Fig. 13) y que eso explicaba que en la mutante *csrA* no hubiera expresión de *csrB*.

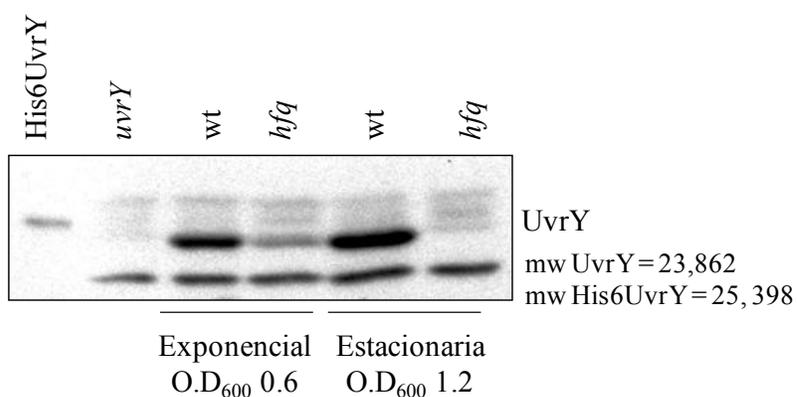


Figura 15. Western blot de UvrY en la cepa silvestre y en la mutante *hfq*. En la mutante *hfq* se observó una diferencia significativa en los niveles de expresión de la proteína UvrY.

1.6 En la mutante *csrA* los niveles de la proteína Hfq están aumentados.

Debido a que nos cuestionamos cómo estaban los niveles de la proteína Hfq en la mutante *csrA*, se tomaron muestras de cultivo de la cepa silvestre y de la mutante (ambas conteniendo una etiqueta HA río abajo del ORF de *hfq*) en fase exponencial y estacionaria de crecimiento, y se prepararon extractos proteicos para realizar un Western blot (el cual se hibridó con el anticuerpo anti-HA de Sigma-Aldrich, y posteriormente se conjugó con el anticuerpo secundario anti-ratón Fc de Amersham). Sin embargo, contrario a lo que se esperaba, el resultado de este experimento, reveló que CsrA ejerce un efecto positivo en la traducción de Hfq (Fig. 16), lo cual es consistente con lo reportado por Baker y col., 2007, en donde se observó que CsrA reprime directamente la traducción de Hfq (ver Discusión).

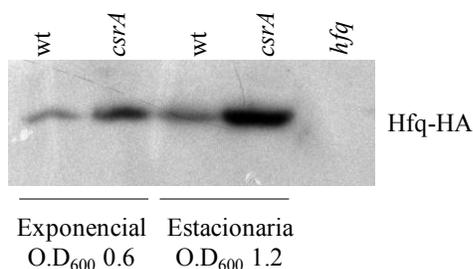


Figura 16. Western blot de Hfq-HA en la cepa silvestre y en la mutante *csrA*. En la mutante *csrA* se observó una diferencia significativa en los niveles de expresión de la proteína Hfq.

Respecto a ésta parte del proyecto, lo que ahora se contempla hacer es determinar si la regulación de Hfq hacia UvrY es directa o si es a través de sRNAs; cabe mencionar que este último mecanismo es el más conocido [Sittka y col., 2008; Zhang y col., 2003], sin embargo hasta el momento no se tiene un candidato para esto.

1.7 Algunas mutantes de la colección Keio muestran diferentes patrones de expresión de *csrB*.

Debido a que el SDC BarA/UvrY (y sus homólogos), afecta la expresión de genes flagelares y/o de la motilidad celular, a través de CsrA (Cap. II; 2.1.3) [Goodier y Ahmer, 2001], se aprovechó el fenotipo de nado de la mutante *barA* (nada más) y el de la mutante *csrA* (no nada), para encontrar nuevos componentes del circuito regulatorio BarA/UvrY, Csr, y/o que afectaran la actividad de BarA.

Se realizaron ensayos de motilidad en las mutantes de la colección Keio (excluyendo las mutantes que están afectadas en la síntesis de flagelos y/o motilidad celular) y se seleccionaron aquellas que presentaron un fenotipo parecido a los de mutante *barA* y *csrA*; posteriormente se realizó un Northern blot para determinar si en esas mutantes la expresión de *csrB* estaba afectada. Entre las primeras mutantes analizadas se encontró a *aslA* y a *ybbK*; la primera, presentó un fenotipo similar al de la mutante *barA* y la segunda uno similar al de *csrA* (Fig. 17), además ambas afectaron negativamente la expresión de *csrB* a lo largo del cultivo celular (Fig. 19).

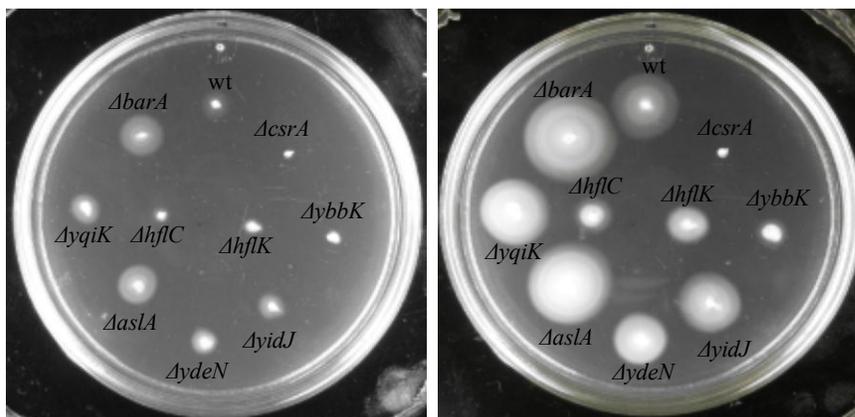


Figura 17. Ensayo de motilidad en algunas mutantes de la librería Keio. Izquierda: 4 horas de crecimiento; derecha: 8 horas.

AslA posee un dominio característico de las enzimas arilsulfatasas, las cuales en eucariontes son las responsables del reciclamiento de las estructuras sulfatadas [Nieuw

Amerogen, 1998] mientras que en procariontes su función es incierta. Por otra parte, YbbK contiene un dominio llamado banda 7 (también llamado SPFH; PHB) característico de las proteínas de la familia Flotilina-1 en eucariontes [Tavernarakis y col., 1999; Browman y col., 2007] y recientemente caracterizados también en procariontes [López y Kolter., 2010]. Las balsas lipídicas en eucariontes están involucradas en diferentes procesos de señalización como, transporte vesicular, establecimiento de la polaridad celular y regulación de canales iónicos [Browman y col., 2007]. Sin embargo en procariontes, su papel permanece incierto, aunque se sabe que son importantes para regular la producción de biopelículas, a través de la colocalización del producto del gen *yuaG* (39% de identidad con Flotilina) con KinC, la cinasa sensora que regula esta ruta de señalización. Debido al efecto interesante que presentaron las mutantes carentes de estas proteínas, se buscó en el genoma de *E. coli* otros genes que codificaran proteínas con estos dominios, de esta manera se encontró por un lado a *aslA*, *ydeN* y *yidJ* y por otro, *ybbK*, *hflC*, *hflK* y *yqiK* (Fig. 18).

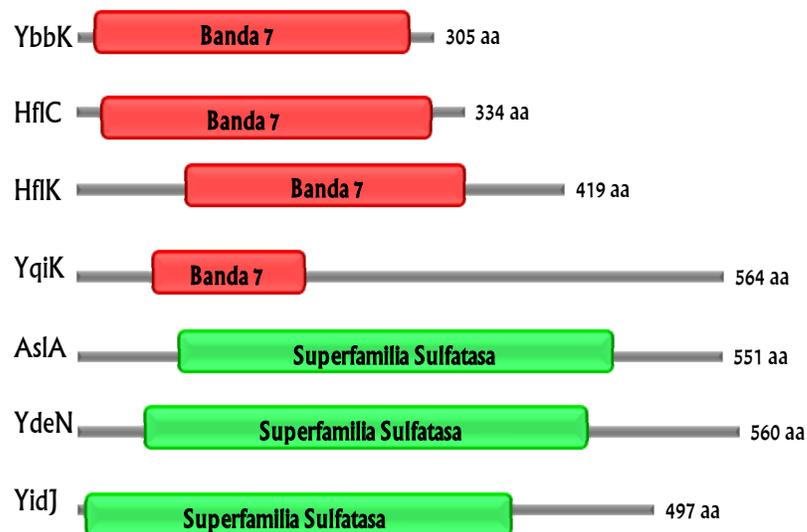


Figura 18. Dominios de proteínas posiblemente involucradas en la formación de balsas lipídicas. *YqiK se ha analizado por López y Kolter (2010), en donde se confirmó su participación en la formación de balsas lipídicas. Cuando se realizó el ensayo de natación en estas mutantes, se observaron fenotipos de natación diferentes incluso entre miembros de una familia (p.ej. *hflC* y *yqiK*) (Fig. 17) y también

se encontraron diferencias en los niveles de expresión del reportero *csrB* (Fig. 19). Sin embargo, en algunas de estas mutantes la expresión de *csrB* mostró perfiles de expresión diferentes a los observados en la cepa silvestre. Por ejemplo, se observa que en la mutante *aslA*, la expresión de *csrB* está afectada tanto en fase exponencial, como en fase estacionaria de crecimiento, en contraparte, en las mutantes *hflC* y *hflK* la expresión de *csrB* se activa desde la fase exponencial de crecimiento (como si la actividad y/o expresión del SDC BarA/UvrY estuviera desregulada).

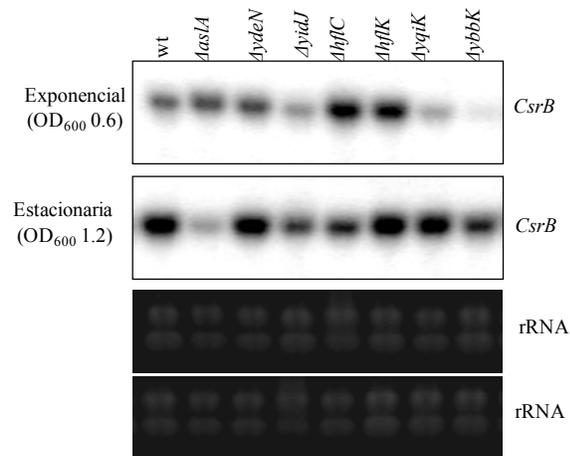


Figura 19. Northern blot de la expresión de *csrB* en mutantes posiblemente involucradas en la formación de balsas lipídicas. En la mutante *aslA* el reportero *csrB* no se expresa a lo largo del cultivo celular, mientras que en las mutantes *hflC* y *hflK* *csrB* se expresa desde la fase exponencial de crecimiento.

Debido al efecto en la expresión de *csrB* que presentaron algunas de las mutantes mencionadas anteriormente, y debido a que están afectadas en proteínas que posiblemente tienen un papel en la formación de balsas lipídicas, pensamos que la regulación correcta de la actividad de la cinasa sensora BarA, es a través de la localización en balsas lipídicas bacterianas.

DISCUSIÓN

Debido a ensayos previos de actividad β -galactosidasa, en donde se observó que en la mutante *csrA* la expresión de *csrB* estaba drásticamente disminuida, pero que al transformarla con el plásmido pUY14 (aumenta el número de copias de *uvrY*), la expresión de *csrB* se restablecía, se sugirió que CsrA jugaba un papel positivo en la regulación directa o indirecta de la expresión de BarA y/o UvrY. El primer enfoque de este trabajo estuvo centrado en determinar el nivel de regulación de CsrA hacia BarA y/o UvrY.

Si CsrA tenía un efecto sobre los transcritos de *barA* y/o *uvrY*, significaba que su regulación era directa y que (argumentado con ensayos de vida media) controlaba la estabilidad y/o vida media de los mensajeros. Sin embargo, en el RT-PCR no se observaron diferencias significativas en los niveles de estos transcritos, entre la cepa silvestre y la mutante *csrA* (Fig. 12). En los ensayos de vida media a través de Northern blot (datos no mostrados), tampoco se observó una disminución en la estabilidad de alguno de los mensajeros en la mutante *csrA*. Por otro lado, cuando se exploró el efecto de CsrA sobre la traducción de UvrY a través de western blot, se observó que en la mutante *csrA* los niveles de esta proteína estaban notablemente disminuidos (~ 50% de la expresión observada en la cepa silvestre), tanto en fase exponencial como en fase estacionaria de crecimiento (Fig. 13).

Con los resultados obtenidos hasta este punto del trabajo y con un análisis bioinformático realizado por el Dr. Enrique Merino (Instituto de Biotecnología, UNAM), en donde no se encontraron sitios de unión a CsrA en las regiones 5'-UTR de los mensajeros de *barA* y *uvrY*, se evidenció que el efecto de CsrA sobre la expresión (y/o actividad) de BarA y/o UvrY era indirecto, y que dependía de uno o más componentes río abajo de esta proteína. En la búsqueda de posibles candidatos que estuvieran interviniendo en esta vía, se siguieron dos estrategias experimentales diferentes:

1. Se exploró el papel de componentes, cuya participación en el circuito regulatorio se ha observado en estudios anteriores.

2. Con la intención de encontrar nuevos componentes del circuito y/o que estuvieran afectando la actividad de BarA, se exploró el papel de diversas mutantes de la colección Keio.

A continuación se discute con detalle los resultados obtenidos con la primera estrategia experimental:

Tanto SdiA, como Hfq se han involucrado en algún nivel del circuito regulatorio BarA/UvrY, Csr. Por un lado, se ha reportado que SdiA aumenta los niveles del transcrito *uvrY* [Suzuki y col., 2002; Wei col., 2001] (Cap. V) y por otro, también se ha reportado que CsrA reprime directamente la traducción de Hfq [Baker y col., 2007] (Cap. IV). Además en *Vibrio* ssp., se ha observado que Hfq modula de manera negativa el *quorum-sensing*, a través de la represión directa de la traducción de LuxR (homólogo de SdiA) [Lenz y col., 2004]. Para ver si SdiA o Hfq tenían un efecto sobre la expresión de *csrB*, se realizó un Northern blot usando muestras de RNA de las mutantes *sdiA* y *hfq*, y se observó, que en ambas la expresión de *csrB* estaba notablemente disminuida, tanto en fase exponencial, como en fase estacionaria de crecimiento (Fig. 14).

Por una parte, el efecto positivo de SdiA sobre la expresión de *csrB* era el esperado, pues depende directamente del papel de esta proteína sobre los transcritos de *uvrY*; por esta misma razón, se descartó la posibilidad de que SdiA fuera el componente río abajo de CsrA, pues como se observó en el RT-PCR (Fig. 12), en la mutante *csrA* los niveles del transcrito *uvrY* no están afectados. Sin embargo, el efecto positivo de Hfq sobre la expresión de *csrB* fue sorprendente, pero a la vez contradictorio con lo reportado por Baker y col. (2007) (ver más adelante); por lo tanto, en ese momento nos preguntamos dos cosas:

- 1.1 ¿A qué se debe que Hfq ejerza un efecto positivo en la expresión de *csrB*?
- 1.2 Siguiendo la lógica de lo reportado por Baker y col. (2007), ¿Cómo explicar el hecho, de que en la mutante *csrA* no haya expresión de *csrB*, si se supone que en esta mutante, los niveles de Hfq son mayores?

Tratando de responder la primera pregunta, en la literatura se encontró un reporte en donde se menciona que en *P. aeruginosa* Hfq es capaz de unirse directamente a CsrB, promoviendo así la actividad de CsrA [Sorger-Domenigg y col., 2007]. Aunque de primera impresión, pareciera que este reporte explica el efecto positivo de Hfq en la expresión de *csrB* (al promover la actividad de CsrA), las evidencias experimentales presentadas y la falta de discusión del evidente desequilibrio entre la producción y degradación de CsrB, no nos dejaron satisfechos con tal propuesta, e indagamos otras posibilidades por las que Hfq pudiera repercutir en la expresión de *csrB*.

Se pensó que Hfq tendría que estar afectando la traducción de UvrY, por lo tanto, se realizó un Western blot con extractos proteicos de muestras de la cepa silvestre y de la mutante *hfq* y se observó que en esta mutante, los niveles de UvrY estaban drásticamente afectados (Fig. 15). Con este resultado se confirmó que, efectivamente, Hfq ejerce un efecto positivo en la expresión de *csrB* debido a que actúa sobre la traducción de UvrY. Además se hizo clara, la posibilidad de que Hfq fuera el componente río abajo de CsrA, ya que en ambas mutantes, la expresión de UvrY está afectada a nivel traduccional.

Sin embargo, nuestros resultados y el planteamiento anterior, eran inconsistentes con lo reportado por Baker y col. (2007), en donde los autores identificaron in silico un solo sitio de unión a CsrA (en la mayoría de sus blancos se han encontrado ~ 6 sitios) en el mensajero de *hfq*, y reportaron que CsrA reprimía directamente su traducción. Debido a esto, se decidió realizar un Western blot para determinar los niveles de la proteína Hfq, en la cepa silvestre y en la mutante *csrA*. En este experimento se observó, que en la mutante *csrA* los niveles de la proteína Hfq están drásticamente disminuidos, por lo tanto, de acuerdo a nuestros resultados, **CsrA regula positivamente la expresión de Hfq.**

La hipótesis actual del trabajo es que **CsrA regula positivamente la expresión de UvrY a través de Hfq.** Sin embargo, dentro de los experimentos que pensamos a corto plazo serían contundentes y necesarios para confirmar lo anterior, se encuentran: a) hacer una mutante *csrA* que contenga un plásmido que aumente el número de copias de *hfq* y determinar en esta mutante la expresión de *csrB* (si la hipótesis es correcta, esperaríamos que la expresión se restablezca); b) determinar a través de RT-PCR los niveles del transcrito *hfq* en la mutante

csrA (para ver si el efecto de CsrA en la expresión de Hfq es directo); y c) determinar si Hfq regula la traducción de UvrY de manera directa o indirecta (a través de algún(os) sRNAs). Con respecto a ésta última idea, ya se ha realizado una búsqueda en bases de datos de posibles secuencias que pudieran ser sRNAs, que mediaran la interacción entre Hfq y UvrY, pero hasta el momento no se ha encontrado ninguna; entonces, probablemente, se tendría que confirmar que Hfq regula directamente la traducción de UvrY. En la figura 20, un mapa de las interacciones conocidas hasta el momento de los componentes del circuito regulatorio BarA/UvrY, Csr, así como de las interacciones propuestas en este trabajo.

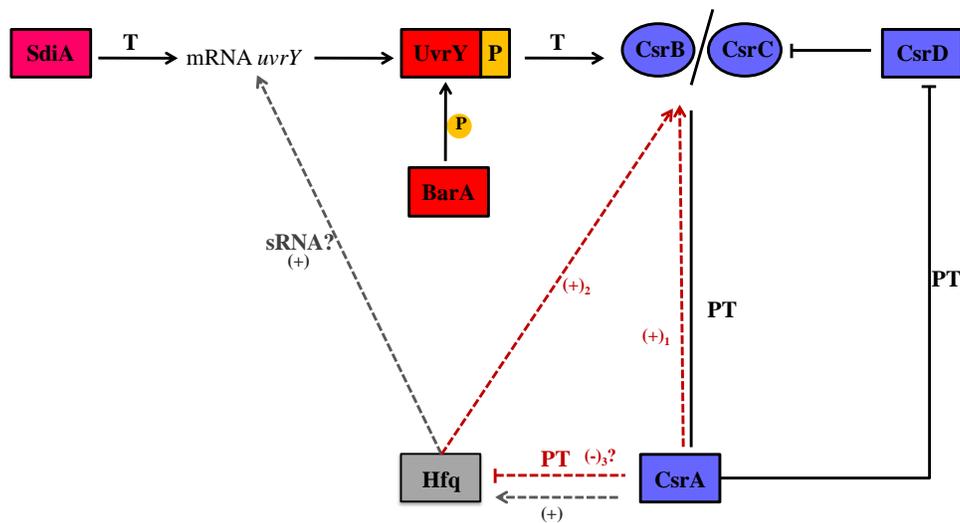


Figura 20. Modelo de las interacciones entre los componentes del circuito regulatorio BarA/UvrY, CsrA/CsrB, CsrC. (PT) Regulación post-transcripcional; (T) Regulación transcripcional. Flechas grises punteadas: interacciones propuestas en este trabajo. Flechas rojas punteadas: interacciones propuestas en: (+)₁ [Edwards y col., no publicado]; (+)₂ [Sorger-Domenigg y col., 2007]; (-)₃ [Baker y col., 2007].

A continuación se discute con detalle los resultados obtenidos con la segunda estrategia experimental:

Como no estábamos seguros de encontrar un efecto de Hfq en la regulación de la expresión de UvrY (y BarA?) a través de CsrA, se decidió realizar de manera paralela, ensayos de motilidad (datos no mostrados) con mutantes de la colección Keio. La finalidad de estos ensayos, fue la de encontrar otros componentes del circuito regulatorio que estuvieran afectando la actividad de BarA. Basándonos en el fenotipo de nado que exhibe la mutante *barA* (nada más que la cepa silvestre) y la mutante *csrA* (no nada), elegimos mutantes de la colección que compartieran dichos fenotipos (excluyendo las mutantes que están afectadas en la síntesis de flagelos y/o motilidad celular), y de éstas, se fueron seleccionando las mutantes que presentaron un efecto (positivo o negativo) en la expresión de *csrB*.

Entre las primeras mutantes analizadas se encontró a *aslA* y a *ybbK*; la primera, presentó un fenotipo de nado parecido al de la mutante *barA* y la segunda, un fenotipo parecido al de *csrA* (Fig. 17); además en ambas, la expresión de *csrB* se vió disminuida a lo largo del cultivo celular (Fig. 18). *AslA* contiene un dominio característico de las enzimas arilsulfatasas, presentes en eucariontes y procariontes (ver más adelante), mientras que *YbbK* contiene un dominio llamado banda 7 (también llamado SPFH; PHB) característico de las proteínas de la familia Flotilina-1 en eucariontes [Tavernarakis y col., 1999; Browman y col., 2007] y recientemente caracterizados también en procariontes [López y Kolter., 2010] (ver más adelante).

Por los efectos interesantes que mostraron ambas mutantes, tanto en el nado, como en la expresión de *csrB*, se buscó en las bases de datos otros genes en *E. coli* que codificaran proteínas con los dominios anteriormente mencionados. De esta manera se encontró por un lado a *AslA*, *YdeN*, *YidJ* (familia arilsulfatasas), y por otro a *YbbK*, *YqiK*, *HflC*, *HflK* (familia Flotilina-1). Lo siguiente que se realizó fue determinar en estas mutantes el fenotipo de nado y el efecto en la expresión de *csrB*; aunque en estos ensayos se observó una heterogeneidad entre ambas respuestas, hubo algunas mutantes que nos parecieron especialmente interesantes (además de *aslA*), p. ej., *hflC* y *hflK*, que a pesar de que no estuvieron afectadas en el nado (Fig. 17), mostraron un perfil de expresión de *csrB* que hasta

ahora no habíamos notado en ninguna otra. Pues al parecer en estas mutantes, la expresión de *csrB* se activa desde los inicios de la fase exponencial y se mantiene hasta la fase estacionaria de crecimiento (como si el SDC BarA/UvrY estuviera desregulado) (Fig. 18).

Recordando las actividades de las enzimas arilsulfatasas y de las proteínas Flotilina-1 reportadas anteriormente; se sabe que las primeras, en eucariontes se localizan típicamente en los lisosomas y son las responsables del reciclamiento de las estructuras sulfatadas [Nieuw Amerongen y col., 1998], mientras que en procariontes su función permanece incierta, sin embargo en algunos casos se han implicado en las interacciones patógeno/hospedero. Por ejemplo, la delección de *asIA* en *E. coli* K1 (responsable de la meningitis neonatal) redujo la habilidad de este organismo de invadir y causar lesiones microvasculares cerebrales. Curiosamente *asIA* no exhibe actividad arilsulfatasa in vitro [Hoffman y col., 2000] y en un estudio realizado por Edwards y col., (no publicado) en donde se muestra un listado de los posibles mensajeros blancos de CsrA, se encuentra *asIA*.

Por otro lado, las proteínas Flotilina-1 son un constituyente común de las balsas lipídicas en eucariontes que se localizan típicamente en la membrana externa celular (aunque también se han observado en las membranas de organelos celulares) y están involucradas en procesos como regulación de canales iónicos, vías de transducción de señales, transporte vesicular, establecimiento de la polaridad celular, etc [Browman y col., 2007]. Recientemente López y Kolter (2010) identificaron y caracterizaron balsas lipídicas en *Bacillus subtilis*, las cuales en este organismo son importantes para regular la producción de biopelículas, a través de la colocación del producto del gen *yuaG* (39% de identidad con Flotilina) con KinC, la cinasa sensora que junto con su regulador de respuesta, Spo0A, regula esta ruta de señalización.

Los datos y las evidencias experimentales presentadas en este trabajo, indican la participación de otros componentes en el circuito regulatorio BarA/UvrY, CsrA/CsrB, CsrC. El hecho de que *AsIA*, *YbbK*, *HflC* y *HflK* tengan un efecto sobre la expresión de *csrB*, cuya expresión está regulada río arriba por el SDC BarA/UvrY, sugiere que la regulación de este circuito probablemente está en diferentes niveles y depende quizá de más factores de los que anteriormente se habían previsto.

MATERIALES Y METODOS

1.1 Condiciones de crecimiento.

Todas las cepas se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) a 37°C. Las concentraciones de los antibióticos utilizados fueron de: ampicilina (Amp) 100 mg/ml; kanamicina (Kan) 50 mg/ml, cloranfenicol (Cm) 25 mg/ml y tetraciclina (Tet) 20 mg/ml. La densidad óptica (O.D.₆₀₀) considerada en fase exponencial fue de 0.6 y en fase estacionaria de 1.2. Los materiales y métodos que a continuación se describen están enumerados, de acuerdo al orden de los objetivos particulares.

Tabla 4. Lista de primers

Nombre	Secuencia	Secuencia que amplifican
csrB Fw	5'-GTC GAC AGG AGT CAG AAG-3'	sonda <i>csrB</i>
csrB Rv	5'-CCG GGA AGG CTG TGA ATC-3'	
Ba783F	5'-CCC GGA TCC CAT ATG CGC CTA CAA GCC TGG CAG-3'	BarA, RT-PCR
BarAhisRv	5'-CCC AAG CTT AGT GAT GGT GAT GGT GAT GCC CGA GAA TTT TGC TGG C-3'	
UvrY	5'-CCC GGA TCC CAT ATG ATC AAC GTT CTA CTT GTT GAT GAC CAC G-3'	UvrY, RT-PCR
UY149R	5'-CCC GGA TCC ATG CAT ACT GGC AAA TGG GCT-3'	
RpoA RT F	5'-GCA AGT GAG TTC GAC GCA-3'	RpoA, RT-PCR
RpoA RT R	5'-AGA AGC CGG CAC ATA ACC-3'	

Tabla 5. Lista de plásmidos

Plásmido	Característica	Referencia
pUY14	<i>uvrY</i> en extremos romos sitio <i>VspI</i> de pBR322, Tet ^r	Suzuki y col., 2002
pBA29	<i>barA</i> en extremos romos sitio <i>VspI</i> de pBR322, Tet ^r	Suzuki y col., 2002

Tabla 6. Lista de cepas

Nombre	Descripción	Referencia
wt, CF7789	MG1655 Δ <i>lacIZ</i> (MluI)	Michael Cashel
<i>csrA</i> , TR1-5 MG1655 ^a	<i>csrA::kanR</i>	Suzuki y col., 2002
<i>uvrY</i> , UY CF7789 ^a	CF7789 <i>uvrY::cam</i>	Suzuki y col., 2002
<i>barA</i> , BA MG1655 ^a	MG1655 <i>barA::kanR</i>	Suzuki y col., 2002
<i>hfg</i>	BW25113 <i>hfg::kan</i>	Baba y col., 2006

1.2 Extracción de RNA.

La extracción se hizo de acuerdo al protocolo de fenol caliente [Georgellis y col., 1992]. Se crecieron las células en agitación a 37°C, y después de alcanzar la O.D.₆₀₀ deseada, se centrifugaron en tubos con hielo molido y se resuspendieron en la solución I (acetato de sodio 0.1 M, sacarosa 0.3 M, pH 4.5). Después se lisaron con la solución II (acetato de sodio 0.01 M, SDS 2%, pH 4.5). Las muestras se calentaron a 75°C por 1.5 min. Se adicionó un volumen de fenol caliente equilibrado en agua e incubado a 75°C por 3 min; este proceso se repitió dos veces más pero incubando en hielo. Posteriormente las muestras se extrajeron dos veces con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. La fase acuosa de la última extracción se precipitó con 1/10 de volumen de una solución 3 M de acetato de sodio y 2.5 volúmenes de etanol. La pastilla se resuspendió en dH₂O estéril.

La presencia del RNA ribosomal se verificó mediante la separación electroforética a 75 V por 25 minutos en gel de agarosa al 1.2 %, la tinción con bromuro de etidio y la observación en el transiluminador con luz UV. La concentración y calidad del RNA se determinó por espectrofotometría, realizando lecturas a 260 y 280 nm. La pureza del RNA se evaluó mediante el cociente entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm obtenidas por espectrofotometría.

1.3 Northern blot.

El RNA se resolvió en un gel desnaturalizante al 1.2% de agarosa, con formaldehído y buffer MOPS 1X, y se corrieron electroforéticamente con amortiguador MOPS 1X a 60 V por 3 horas. La transferencia se realizó por capilaridad y la membrana se dejó secar al aire libre o en estufa a 50°C y se fijó con luz UV. Se incubó la membrana por dos horas con la solución de prehibridación (formamida 50%, Denhardt 2X, SSC 5X, SDS 0.2%, fosfato de sodio pH 6.5 10 mM, esperma de salmón 10 mg/ml, aforar con H₂O a 10 ml). La sonda marcada radioactivamente se desnaturalizó a 95°C y se añadió a la solución de prehibridación. Se incubó la sonda toda la noche en agitación rotacional a 42°C. Al día siguiente se realizaron los siguientes lavados (volumen por lavado 15 ml).

- 1) SCC 2X y SDS 0.1% (dos veces a Temperatura Ambiente; TA)
- 2) SCC 0.2X y SDS 0.1% (dos veces a 42°C)

Una vez realizados los lavados, se puso a exponer la membrana en una pantalla amplificadora para detectar radioactividad.

1.4 RT-PCR.

El RNA utilizado se trató previamente con DNasa I (RQ1, Promega) según el protocolo de la compañía. La reacción de transcripción reversa se realizó utilizando el sistema de Transcripción Reversa (Promega). En todos los casos se utilizaron 5 µg de RNA y random primers para cada reacción en un volumen total de 20 µl. Una vez generados los cDNAs se llevaron a cabo las amplificaciones por PCR utilizando 100 ng/µl totales de cada cDNA. Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %.

1.5 Western blot.

Los extractos proteicos totales se trataron con amortiguador de carga (Tris-base 100mM, SDS 4%, Azul Bromofenol 0.2%, Glicerol 20%, Beta-Me 10%, H₂O hasta 50 ml) y se desnaturalizaron a 95°C por 5 min. Los extractos se resolvieron en un gel de acrilamida al 12% y se corrieron con buffer 1X SDS-PAGE (10X: Tris-base 0.25 M, Glicina 1.92 M, SDS 1%, H₂O hasta 1 L.) a 10 mV por ~3 horas. La transferencia a la membrana de nitrocelulosa se hizo en cámara húmeda con amortiguador de transferencia 1X frío (10X: Tris-base 0.25 M, Glicina 1.92 M, H₂O hasta 1 L) a 100 V por 1 h, a 4°C.

Después de completar el SDS-PAGE y la transferencia electroforética, se bloqueó la membrana toda la noche con 5% leche en polvo baja en grasas en solución TBS Tween (5X: Tris-base 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.1%, H₂O hasta 1L). Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo primario anti-UvrY en dilución 1:2000 por 3 horas a T.A y se lavó tres veces con TBS Tween (cada lavado fue de 10 minutos). Se incubó la membrana con

el anticuerpo secundario anti-conejo Fc de Amersham en dilución 1:2500 en TBS Tween por 1 hora a TA y se realizaron otros tres lavados con la misma solución. El revelado se realizó en cuarto oscuro, incubando la membrana con las soluciones quimioluminiscentes (relación 1:1) con 3-10 min de exposición y se expuso en una película Kodak.

1.6 Ensayos de motilidad.

Se prepararon cajas de petri con medio M9 (Agar 0.3%, bactotripton 1.3%, NaCl 0.7%). Se inocularon las cajas con 2 µl de un cultivo crecido en medio líquido LB por toda la noche. Las cajas se incubaron de 4-8 horas a 30°C.

CONCLUSIONES

1. CsrA regula la expresión y/o actividad de BarA y/o UvrY de manera indirecta.
2. Hfq actúa río abajo de CsrA para regular de manera directa o indirecta la traducción de UvrY.
3. CsrA regula positivamente la traducción de Hfq.
4. La expresión de CsrB es atípica en las mutantes HflC y HflK, las cuales están involucradas en la formación de balsas lipídicas.

PERSPECTIVAS

Para poder evaluar el papel de Hfq en la regulación de la expresión de BarA y/o UvrY se piensa continuar el proyecto siguiendo fundamentalmente las siguientes líneas de investigación:

1. Determinar el nivel de proteína BarA en la mutante *csrA* y en la *hfq*.
2. Transformar a una mutante *csrA* con un plásmido de mediano número de copias que contenga la información del gen *hfq*.
3. Comparar los niveles y la vida media del transcrito *hfq* en la cepa silvestre y en la mutante *csrA*.
4. Sustituir del transcrito de *uvrY* la secuencia Shine-Dalgarno (para buscar posibles sRNAs).
5. Hacer una cinética de la expresión de *hfq*, *csrA*, *uvrY* y *barA* en la cepa silvestre.

Por otro lado, para evaluar si las balsas lipídicas juegan un papel relevante durante la regulación de la actividad de BarA, se plantean las siguientes estrategias experimentales:

1. Determinar si el efecto de las mutantes relacionadas con balsas lipídicas sobre la expresión de *csrB* es a través de BarA.
2. Identificar el tipo de lípidos que hay en las membranas resistentes a detergentes y determinar si estos lípidos están presentes en las mutantes relacionadas con balsas lipídicas.
3. Determinar si las proteínas con dominios flotilina colocalizan con la cinasa sensora BarA.

REFERENCIAS

1. **Ahmer BMM** (2004) Cell-to-cell signaling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **52**:933-945.
2. **Aiba H** (2007) Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. *Curr Opin Microbiol* **10**:134-139.
3. **Altier C, Suyemoto M, Ruiz A, Burnham K, Maurer R** (2000) Characterization of two novel regulatory genes affecting *Salmonella* invasion gene expression. *Mol Microbiol* **35**:635-646.
4. **Babitzke P y Romeo T** (2007) CsrA sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr Opin Microbiol* **10**:156-163.
5. **Baker CS, Eöry LA, 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**:5472-5481.
6. **Baker CS, Morozov I, Suzuki K, Romeo T, Babitzke P** (2002) CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of *glgC* in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **44**:1599-1610.
7. **Bhatt S, Edwards AN, Nguyen HT, Merlin D, Romeo T, Kalman D** (2009) The RNA binding protein CsrA is a pleiotropic regulator of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **77**:3552-3568.
8. **Blumer C, Heeb S, Pessi G, Haas D** (1999) Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci* **96**:14073-14078.
9. **Brennan RG y Link TM** (2007) Hfq structure, function and ligand binding. *Curr Opin Microbiol* **10**: 125-33.
10. **Browman DT, Hoegg MBy Robbins SM** (2007) The SPFH domain-containing proteins: mor tan lipid raft markers. *Trends Cell Biol* **17**:304-402.

11. **Chatterjee A, Cui Y, Liu Y, Dumenyo CK, Chatterjee AK** (1995) Inactivation of *rsmA* leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases, and proteases in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the absence of the starvation/cell density-sensing signal, N-(3-oxohexanoyl)-l-homoserine lactone. *Appl Environl* **61**:1959-1967.
12. **Chavez RG, Alvarez AF, Romeo T, Georgellis D** (2010) The physiological stimulus for the BarA sensor kinase. *J Bacteriol* **192**:2009-2012.
13. **Cui Y, Chatterjee A, Liu Y, Dumenyo CK, Chatterjee AK** (1995) Identification of a global repressor gene, *rsmA*, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that controls extracellular enzymes N-(3-oxohexanoyl)-l-homoserine lactone, and pathogenicity in soft-rooting *Erwinia* spp. *J Bacteriol* **177**:5108-5115.
14. **Dong T, Schellhorn HE** (2009) Control of RpoS in global gene expression of *Escherichia coli* in minimal media. *Mol Genet Genomics* **281**:19-33.
15. **Dubey AK, Baker Cs, Romeo T, Babitzke P** (2005) RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA-RNA interaction. *RNA* **11**:1579-1587.
16. **Dubey AK, Baker CS, Suzuki K, Jones AD, Pandit P, Romeo T, Babitzke P** (2003) CsrA regulates translation of the *Escherichia coli* carbon starvation gene, *cstA*, by blocking ribosome access to the *cstA* transcript. *J Bacteriol* **185**:4450-4460.
17. **Dyszal JL, Soares JA, Swearingen MC, Lindsay A, Smith JN, Ahmer BMM** (2010) *E. coli* K-12 and EHEC genes regulated by SdiA. *PLoS ONE* **5**:e8946.
18. **Edwards A, Patterson-Fortin L, Vakulskas CA, Mercante J, Potrykus K, Camacho M, Fields J, Georgellis D, Cashel M, Romeo T** (2011) Circuitry Linking the Csr and Stringent Response Global Regulatory Systems, has been successfully. *Mol Microbiol*.
19. **Eriksson A, Andersson R, Pirhonen M, Palva E** (1998) Two-component regulators involved in the global control of virulence in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol Plan Microbe Interact* **11**:743-752.
20. **Fields JA y Thompson SA** (2008) *Campylobacter jejuni* CsrA mediates oxidative stress responses, biofilm formation, and host cell invasion. *J Bacteriol* **190**:3411-3416.

21. **Gaffney T, Lam S, Ligon J, Gates K, Frazelle A, Maio JD, y col** (1994) Global regulation of expression of antifungal factors by a *Pseudomonas fluorescens* biological control strain. *Mol Plant Microbe Interact* **7**:455-463.
22. **Gao R y Stock AM** (2009) Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol* **63**:133-154.
23. **Georgellis D, Arvidson S y von Gabain A** (1992) Decay of ompA mRNA and processing of 9S RNA are immediately affected by shifts in growth rate, but in opposite manners. *J Bacteriol* **174**:5382-5390.
24. **Goodier RI y Ahmer BM** (2001) SirA orthologs affect both motility and virulence. *J Bacteriol* **183**:2249-2258.
25. **Goodman AL, Merigui M, Hyodo M, Ventre I, Filloux A, Lory S** (2009) Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes Dev* **23**:249-259.
26. **Gottesman S** (2002) Stealth regulation: biological circuits with small RNA switches. *Genes & Dev* **16**:2829-2842.
27. **Gottesman S** (2005) Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends Genet* **21**:399-404.
28. **Gudapaty S, Suzuki K, Wang X, Babitzke P, Romeo T** (2001) Regulatory interactions of Crs components: the RNA binding protein CsrA activates *csrB* transcription in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**:6017-6027.
29. **Hajnsdorf E, Regnier P** (2000) Host factor Hfq of *Escherichia coli* stimulates elongation of poly(A) tails by poly(A) polymerase I. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 1501–150.
30. **Herskovits AA, Bochkareva ES y Bibi E** (2000) New prospects in studying the bacterial signals recognition particle pathway. *Mol Microbiol* **30**:737-749.
31. **Hoffman JA, Badger JL, Zhang Y, Haung S-H, Kim KS** (2000) *Escherichia coli* K1 *asIa* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cell in vitro and in vivo. *Infect Immun* **68**:5062-5067.
32. **Itoh Y, Rice JD, Goller C, Pannuri A, Taylor J, Meisner J, Beveridge TJ, Preston JJ 3rd, Romeo T** (2008) Roles of *pgaABCD* genes in synthesis, modification, and

- export of the *Escherichia coli* biofilm adhesion poly-beta-1,6-*N*-acetyl-d-glucosamine. *J Bacteriol* **190**:3670-3680.
33. **Jonas K, Edwards AN, Ahmad I, Romeo T, Romling U, Melefors Ö** (2010) Complex regulatory network encompassing the Csr, c-di-GMP and motility systems of *Salmonella typhimurium*. *Environ Microbiol* **12**:524-540.
 34. **Jonas K, Edwards AN, Simm R, Romeo T, Romling U, Melefors Ö** (2008) The RNA binding protein CsrA controls cyclic di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins. *Mol Microbiol* **70**:236-257.
 35. **Jones MK, Warner EB, Oliver JD** (2008) CsrA inhibits the formation of biofilms by *Vibrio vulnificus*. *Appl Environ Microbiol* **74**:7064-7066.
 36. **Klauck E, Typas A, Hengee R** (2007) The sigmaS subunit of RNA polymerase as a signal integrator and network master regulator in the general stress response in *Escherichia coli*. *Sci Prog* **90**:103-127.
 37. **Lapouge K, Schubert M, Allain FH, Hass D** (2008) Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: From RNA recognition to regulation of social behavior. *Mol Microbiol* **67**:241-253.
 38. **Laskowski MA y Kazmierczak BI** (2006) Mutational analysis of RetS, an unusual sensor kinase-response regulator hybrid required for *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Infect Immun* **74**:4462-4473.
 39. **Lawhon SD, Frye JG, Suyemoto M, Porwollik S, McClelland M, Altier C** (2003) Global regulation by CsrA in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **48**:1633-1645.
 40. **Le Derout J, Boni IV, Régnier P, Hajnsdorf E** (2010) Hfq affects mRNA levels independently of degradation. *BMC Mol Biol* **11**:17
 41. **Lee J, Jayaraman A, Wood TK** (2007) Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. *BMC Microbiol* **7**:42.
 42. **Lee T y Feig AL** (2008) The RNA binding Hfq interacts specifically with tRNAs. *Rna* **14**:514-523.

43. **Lenz DH, Mok KC, Lilley BN, Kulkarni RV, Wingreen NS, Bassler BL** (2004) The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholera*. *Cell* **118**:69-82.
44. **Liu M, Gui G, Wei B, Preston JF 3rd, Oakford L, Yüksel U, Giedroc DP, 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**:17502-17510.
45. **Lucchetti-Miganeh C, Burrowes E, Baysse C, Ermel G** (2008) The post-transcriptional regulator CsrA plays central role in the adaptation of bacterial pathogens to different stages of infection in animal host. *Microbiology* **154**:16-29.
46. **Malpica R, Sandoval G, Rodriguez C, Franco B, Georgellis D** (2006) Signaling by the *arc* two-component system provides a link between the redox state of the quinone pool and gene expression. *Antioxid Redox Signal* **8**:781-795.
47. **Masse E, Escorcia FE y Gottesman S** (2003) Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes & Dev* **17**:2374-2383.
48. **McNealy T, Forsbach-Birk, Shi C, Marre R** (2005) The Hfq homolog in *Legionella pneumophila* demonstrates regulation by LetA and RpoS and interacts with the global regulator CsrA. *J Bacteriol* **187**:1527-1532.
49. **Mercante J, Edwards A, Dubey A, Babitzke P, Romeo T** (2009) Molecular geometry of CsrA (RsmA) binding to RNA and its implications for regulated expression. *J Mol Biol* **392**:511-528.
50. **Michael B, Smith JN, Swift S, Heffron F, Ahmer BM** (2001) SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities. *J Bacteriol* **183**:5733-5742.
51. **Mohanty BK, Maples VF, Kushner SR** (2004) The Sm-like protein Hfq regulates polyadenylation dependent mRNA decay in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **54**: 905–92.

52. **Moller T, Franch T, Hojrup P, Keene DR, Ba-chinger HP, Brennan RG, Valentin-Hansen P** (2002) Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Mol Cell* **9**:23-30
53. **Mondragón V, Franco B, Jonas K, Suzuki K, Romeo T, Melfors Ö, Georgellis D** (2006) pH-dependent activation of the BarA-UvrY two-component system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**:8303-8306.
54. **Moons P, Michiels CW y Aertsen A** (2009) Bacterial interactions in biofilms. *Crit Rev Microbiol* **35**:157-168.
55. **Morita T, Maki K y Aiba H** (2005) RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes & Dev* **19**:2176-2186.
56. **Nieuw Amerongen AV, Bolscher JGM, Bloemena E, Veerman ECI** (1998) Sulfomucins in the human body. *Biol Chem* **379**:1-18.
57. **Park MK, Amichay P, Love E, Wick E, Liao F, Grinberg A, Rabin RL, Zhang HH, Gebeyehu S, Wright TM, Iwasaki A, Weng Y, De-Martino JA, Elkins KL, Farber JM** (2002) The CXC chemokine murine monokine induced by IFN-gamm (CXC chemokine ligand 9) is made by APCs targets lymphocytes including activated B cell, and supports antibody responses to a bacterial pathogen in vivo. *J Immunol* **169**:1433-1443.
58. **Patten CL, Kirchoff MG, Schertzberg MR, Morton RA, Schellhorn HE** (2004) Microarray analysis of RpoS-mediated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Mol Genet Genomics* **272**:580-591.
59. **Pernestig AK, Georgellis D, Romeo T Suzuki K, Tomenius H, Normark S, Melefors Ö** (2003) The *Escherichia coli* BarA-UvrY two-component system is needed for efficient switching between glycolytic and gluconogenic carbon sources. *J Bacteriol* **185**:843-853.
60. **Pernestig AK, Melefors Ö y Georgellis D** (2001) Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **276**:225-231.

61. **Pessi G, Williams F, Hindle Z, Heurlier K, Holden MT, Camara M, Hass D, Williams P** (2001) The global posttranscriptional regulators RsmA modulates production of virulence determinants and *N*-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**:6676-6683.
62. **Rahman M, Hasan MR, Oba T, Shimizu K** (2006) Effect of *rpoS* gene knockout on the metabolism of *Escherichia coli* during exponential growth phase and early stationary phase based on gene expression, enzyme activities and intracellular metabolite concentrations. *Biotechnol Bioeng* **94**:585-595.
63. **Rahmati S, Yang S, Davidson AL, Zechiedrich EL** (2002) Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum-sensing regulator SdiA. *Mol Microbiol* **43**:677-685.
64. **Reichenbach B, Maes A, Kalamorz F, Hajnsdorf E, Görke B** (2008) The small RNA GlmY acts upstream of the sRNA GlmZ in the activation of *glmS* expression and is subject to regulation by polyadenylation in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **36**:2570-2580.
65. **Reimann C, Valverde CKay E, Hass D** (2005) Posttranscriptional repression of GacS/GacA-controlled genes by the RNA-binding protein RsmE acting together with RsmA in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol* **187**:276-285.
66. **Sabnis NA, Yang H, Romeo T** (1995) Pleiotropic regulation of central carbohydrate metabolism in *Escherichia coli* via the gene *csrA*. *J Biol Chem* **270**:29096-29104.
67. **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* **31**:4091-4098.
68. **Scheibe M, Bonin S, Hajnsdorf E, Betat H, Mörl M** (2007) Hfq stimulates the activity of the CCA-adding enzyme. *BMC Mol Biol* **8**:92.
69. **Schumacher MA, Pearson RF, Møller T, Valentin-Hansen P, y Brennan RG** (2002) Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein. *EMBO J* **21**: 3546-3556.

70. **Sharma CM, Darfeuille F, Plantinga TH, Vogel J** (2007) A small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside and upstream of ribosome-binding sites. *Genes & Dev* **21**:2804-2817.
71. **Sittka A, Lucchini S, Papenfort K, Sharma CM, Rolle K, Binnewies TT, Hinton JCD, Vogel J** (2008) Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, Hfq. *PLoS Genetics* **4**:e1000163.
72. **Soper T, Mandin P, Majdalani N, Gottesman S, Woodson S** (2010) Positive regulation by small RNAs and the role of Hfq. *Proc Natl Acad Sci* **107**:9602-9607.
73. **Sorger-Domenigg T, Sonnleitner E, Kaberdin VR, Bläsi U** (2007) Distinct and overlapping binding sites of *Pseudomonas aeruginosa* Hfq and RsmA proteins on the non-coding RNA RsmY. *Biochem Biophys Res Commun* **352**:769-773.
74. **Stock AM, Robinson VL y Goudreau PN** (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**:183-215.
75. **Sukhodolets MV y Garges S** (2003) Interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase with the ribosomal protein S1 and the Sm-like ATPase Hfq. *Biochemistry* **42**:8022-8034.
76. **Suzuki K, Babitzke P, Kushner SR, Romeo T** (2006) Identification of a novel regulatory protein (CsrD) that targets the global regulatory RNAs CsrB y CsrC for degradation by RNase E. *Genes Dev* **20**:2605-2617.
77. **Suzuki K, Wang X, Weilbacher T, Pernestig AK, Melefors Ö, Georgellis D, Babitzke P, Romeo T** (2002) Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**:5130-5140.
78. **Swift S, Lynch MJ, Fisch L, Kirke DF, Tomas JM, Stewart GS, Williams P** (1999) Quorum sensing-dependent regulation and blockade of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun* **67**:5192-5199.
79. **Tavernarakis N, Driscoll M, Kyrpides NC** (1999) The SPFH domain: implicated in regulating targeted protein turnover in stomatins and other membrane-associated proteins. *Trends Biochem Sci* **24**:425-427.

80. **Timmermans J y Van Melderen L** (2010) Post-transcriptional global regulation by CsrA in bacteria. *Cell Mol Life Sci* DOI 10.1007/s00018-010-0381-z
81. **Trotochaud AE y Wassarman KM** (2005) A highly conserved 6S RNA structure is required for regulation of transcription. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 313-319.
82. **Tu KC y Bassler B** (2007) Multiple small RNAs act additively to integrate sensory information and control quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Genes & Dev* **21**:221-233.
83. **Urban JH y Vogel J** (2008) Two seemingly homologous noncoding RNAs act hierarchically to activate *glmS* mRNA translation. *PLoS Biol* **6**:e64.
84. **Valentin-Hansen P, Eriksen M, Udesen C** (2004) The bacterial Sm-like protein Hfq: A key player in RNA transactions. *Mol Microbiol* **51**:1525–1533.
85. **Van Houdt R, Aertsen A, Moons P, Vanoirbeek K, Michiels CW** (2006) *N*-acyl-L-homoserine lactone signal interception by *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **256**:83-89.
86. **Vytvytska O, Moll I, Kaberdin VR, von Gabain A, Bläsi U** (2000) Hfq (HF1) stimulates *ompA* mRNA decay by interfering with ribosome binding. *Genes & Dev* **14**: 1109–1118.
87. **Wang X, Dubey AK, Suzuki K, Baker CS, Babitzke P, Romeo T** (2005) CsrA post-transcriptionally repress *pgaABCD* responsible for synthesis of a biofilm polysaccharide adhesion of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **56**:1648-1663.
88. **Wang XD, Boer PA, Rothfield LI** (1991) A factor that positively regulates cell division by activating transcription of the major cluster of essential cell division genes of *Escherichia coli*. *EMBO J* **10**:3363-3372
89. **Wassarman K** (2002) Small RNAs in bacteria: diverse regulators of gene expression in response to environmental changes. *Cell* **109**:141-144.
90. **Wassarman KM** (2007) 6S RNA: A small RNA regulator of transcription. *Curr Opin Microbiol* **10**: 164-168.
91. **Waters CM y Bassler BL** (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**:319-346.
92. **Waters L y Storz G** (2009) Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* **136**:615-628.

93. **Wei B, Shin S, LaPorte D, Wolfe AJ, Romeo T** (2000) Global regulatory mutations in *csrA* and *rpoS* cause several central carbon stress in *Escherichia coli* in presence of acetate. *J Bacteriol* **182**:1632-1640.
94. **Wei BL, Brun-Zinkernagel AM, Simecka JW, Prüß BM, Babitzke P, Romeo T** (2001) Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **40**:245-256.
95. **Wei Y, Lee JM, Smulski DR, LaRossa RA** (2001) Global impact of *sdia* amplification revealed by comprehensive gene expression profiling of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**:2265-2272.
96. **Wei Y, Vollmer AC, LaRossa RA** (2001) In vivo titration of mitomycin C action by four *Escherichia coli* genomic regions on multicopy plasmids. *J Bacteriol* **183**:2259-2264.
97. **Weilbacher T, Suzuki K, Dubey AK, Wang X, Gudapaty S, Morozov I, Baker CS, Georgellis D, Babitzke P, Romeo T** (2003) A novel sRNA component of the carbon storage system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **48**:657-670.
98. **Wolfe AJ** (2005) The acetate switch. *Mol Biol Rev* **69**:12-50.
99. **Wong S, Carroll P, Rahme L, Ausubel F, Calderwood S** (1998) Modulation of expression of the TorxR regulon in *Vibrio cholerae* by a member of the two-component family of response regulators. *Infect Immun* **66**:5854-5861.
100. **Yang H, Liu MY, Romeo T** (1996) Coordinate genetic regulation of glycogen catabolism and biosynthesis in *Escherichia coli* via the *csrA* gene product. *J Bacteriol* **178**:1012-1017.
101. **Yao Y, Martinez-Yamout MA, Dickerson TJ, Brogan AP, Wright PE, Dyson HJ** (2006) Structure of the *Escherichia coli* quorum sensing protein SdiA: activation of the folding switch by acyl homoserine lactones. *J Mol Biol* **355**:262-273.
102. **Zhang A, Wassarman KM, Rosenow C, Tjaden BC, Storz G, Gottesman S** (2003) Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq. *Mol Microbiol* **50**:1111-1124

103. **Zhu J y Winans SC** (2001) The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. *Proc Natl Acad Sci* **96**:4832-4837.