



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**BÚSQUEDA DE FACTORES QUE AFECTAN LA  
ACTIVIDAD DE LA CINASA SENSORA BARA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**EDUARDO TONATIUH RAMÍREZ AGUILERA**



**MÉXICO, D.F.**

**2015**



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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**                   **Profesor: Marisol López López**

**VOCAL:**                           **Profesor: Carmen Adriana Mendoza Rodríguez**

**SECRETARIO:**               **Profesor: Dimitrios Georgellis**

**1er. SUPLENTE:**           **Profesor: Euclides Ávila Chávez**

**2° SUPLENTE:**               **Profesor: Norma Angélica Camacho de la Rosa**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 226  
NORTE DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM**

---

**DR. DIMITRIOS GEORGELLIS**

**ASESOR DEL TEMA**

---

**EDUARDO TONATIUH RAMÍREZ AGUILERA**

**SUSTENTANTE**

# Índice

<b>Resumen .....</b>	<b>1</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>3</b>
<i>Capítulo I. Introducción al sistema de dos componentes BarA/UvrY. ....</i>	<i>3</i>
<i>Capítulo II. Sistema de regulación global Csr. ....</i>	<i>9</i>
<i>Capítulo III. Membranas celulares y balsas lipídicas .....</i>	<i>10</i>
<i>Capítulo IV. Proteína putativa arilsulfatasa, AsIA.....</i>	<i>15</i>
<b>Hipótesis .....</b>	<b>17</b>
<b>Objetivo .....</b>	<b>17</b>
<b>Objetivos particulares .....</b>	<b>17</b>
<b>Materiales.....</b>	<b>18</b>
<b>Métodos.....</b>	<b>24</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>34</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>42</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>44</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>45</b>

## Resumen

Debido a la gran diversidad de estímulos presentes en el ambiente, los organismos cuentan con sistemas de señalización que les permiten detectar y responder a las fluctuaciones de las condiciones en donde se encuentran. En células procariotas, estos sistemas están generalmente organizados en pares de proteínas, una cinasa sensora (CS) y una reguladora de la respuesta (RR), que conforman la gran familia de los sistemas de dos componentes (SDC). En particular, el SDC BarA/UvrY de *Escherichia coli* consta de la CS BarA, que se encuentra anclada a la membrana interna y contiene tres dominios catalíticos (cinasa tripartita o híbrida), y de UvrY, que es un RR citosólico típico, con un dominio receptor y un dominio efector de unión a DNA. La señal fisiológica que activa este sistema es el acetato (el formato y otros ácidos carboxílicos de cadena corta también son capaces de activarlo). En condiciones estimulantes BarA se autofosforila y posteriormente fosforila a UvrY, el cual activa la transcripción de los RNA pequeños no codificantes (sRNAs) CsrB y CsrC. Estos secuestran e inactivan a la proteína CsrA, la cual es un regulador post-transcripcional global, importante en la regulación del metabolismo del carbono, la formación de biopelículas, la motilidad, y la expresión de factores de virulencia. A este sistema en su conjunto se le conoce como sistema Csr (por *Carbon Storage Regulator*).

Interesantemente, una cepa mutante en *csrA* no es capaz de activar BarA, aún en la presencia del estímulo, lo cual representa un circuito autoregulatorio ya que la activación de BarA tiene como resultado la inactivación de CsrA. Teniendo en cuenta que cepas mutantes en *barA* y *csrA* presentan diferencias en la motilidad, que es evidenciada por el halo de nado en un medio semisólido, se analizaron las mutantes de la colección KEIO de *E. coli* con respecto a este fenotipo y se seleccionaron mutantes con motilidad reducida (como una mutante en *csrA*) o aumentada (como una mutante en *barA*), con el fin de identificar factores que afecten la actividad del sistema BarA/UvrY. Así, se ha encontrado

que la actividad de BarA es afectada por un número de proteínas, dentro de las cuales se encontraron YqiK, YbbK, HflK y HflC (flotilinas), así como también la proteína AsIA con probable actividad de aril sulfatasa.

En este trabajo se realizaron estudios de ensayos de motilidad, Western blot, Northern blot y determinación de actividad  $\beta$ -galactosidasa en cepas con reporteros *lacZ*, para determinar la relación que existe entre las flotilinas y AsIA con los sistemas de regulación globales Csr y BarA/UvrY.

Los resultados obtenidos demostraron que en una cepa mutante en *asIA* se ve afectada la expresión de CsrB, la cual disminuye drásticamente. Esto sugiere que AsIA estaría involucrada en la activación de BarA de modo aún no identificado. A su vez, encontramos que las flotilinas afectan también la expresión de CsrB, probablemente a través de la activación de BarA. Finalmente, determinamos que la proteína CsrA regula de manera negativa la expresión de HflC y YbbK. Se discuten las posibles implicaciones de esta regulación en el marco del circuito autoregulatorio CsrA-BarA/UvrY-CsrB/C.

## Introducción

### Capítulo I. Introducción al sistema de dos componentes BarA/UvrY.

#### 1.1 Sistema de dos componentes en bacterias

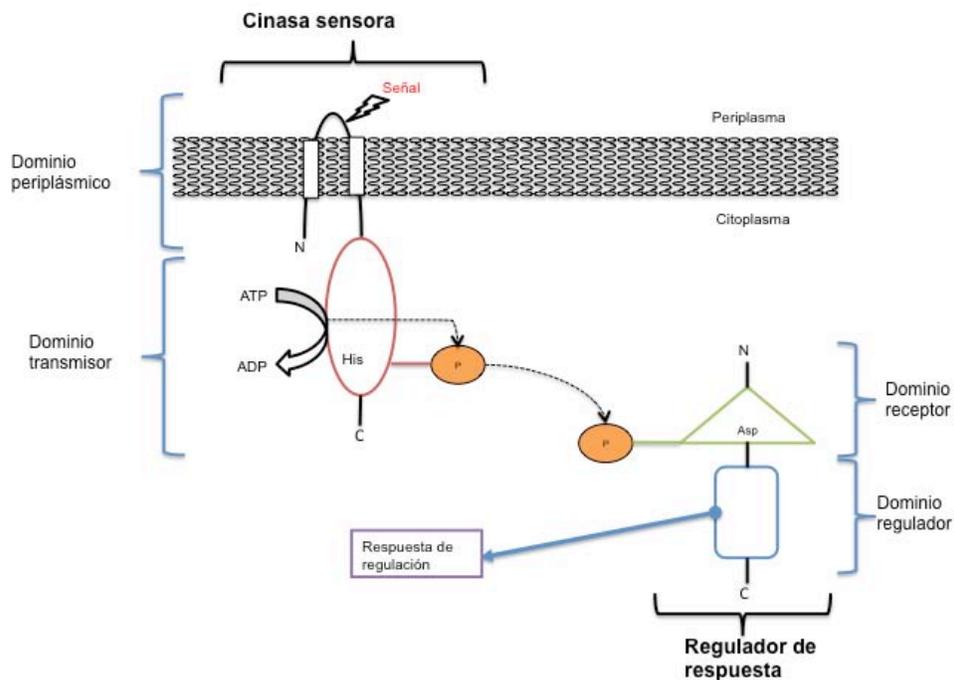
El crecimiento y supervivencia de los microorganismos depende de su habilidad para responder a una gran variedad de estímulos en el ambiente. Durante más de 20 años se han estudiado varios sistemas de dos componentes (SDC), los cuales son una de las vías de señalización presentes en los microorganismos. El interés del estudio de estos sistemas no sólo recae en conocer su funcionamiento, sino que debido a su importancia para la viabilidad del microorganismo, puede ser útil en la búsqueda de antibióticos novedosos que afecten la señalización mediante SDC que estén involucrados en la expresión de factores de virulencia o patogenicidad de ciertos microorganismos patógenos o bien, para mejorar la actividad de bacterias utilizadas en agricultura, remediación ambiental o procesos biotecnológicos (Gao & Stock, 2009; Malpica y col, 2006).

El fundamento de estos sistemas de señalización es la reacción de fosfotransferencia entre dos componentes conservados del sistema: una cinasa sensora (CS) y un regulador de respuesta (RR). La CS es el componente que detecta el estímulo y dirige la vía de señalización a seguir. Por su parte, el RR es el componente de salida, regulado por la cinasa sensora, y el cual efectúa la respuesta celular.

En el modelo prototipo de una SDC (Figura 1), la CS se encuentra anclada a la membrana con su dominio periplásmico situado en el extremo amino-terminal. En este extremo es en donde los estímulos son detectados, ya sea directa o indirectamente por la proteína; seguido del dominio transmisor situado cerca del extremo carboxi-terminal, el cual cuenta con un motivo de unión a nucleótidos y un residuo de histidina altamente conservado. Un pequeño porcentaje (5%) de

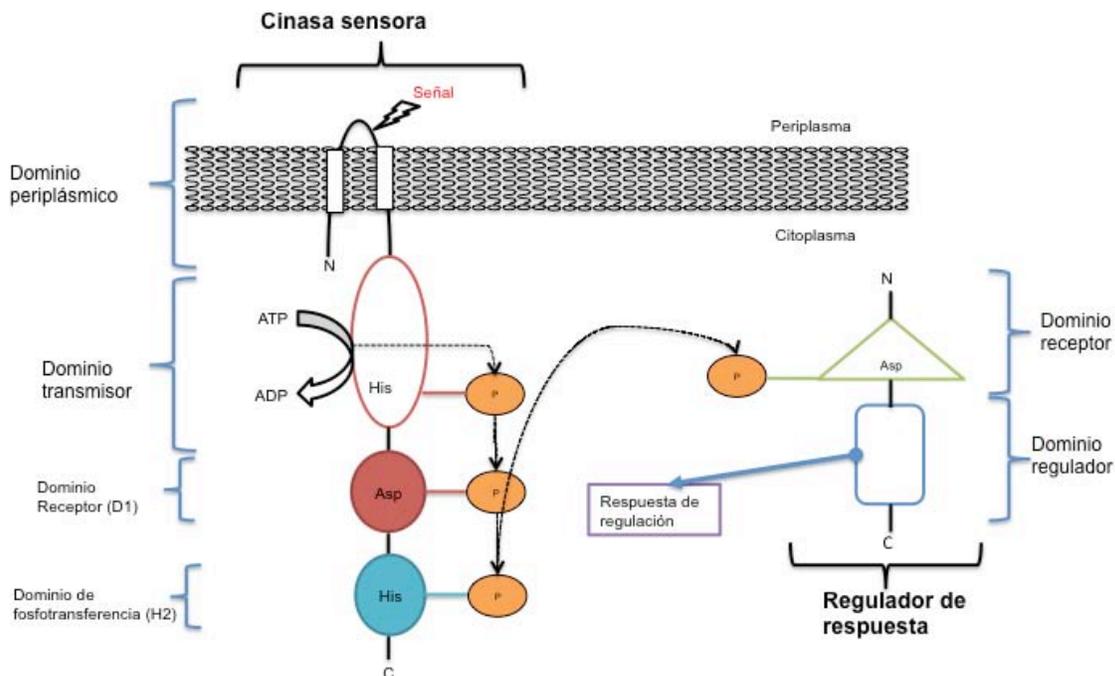
cinastas sensoras presentan una conformación distinta a la prototipo (Letunic, 2004). Por su parte, el RR es una proteína citoplasmática que presenta un dominio receptor y uno regulador. El primero, presenta como característica principal un residuo de aspartato altamente conservado que se encuentra en el extremo amino-terminal; en el extremo carboxi-terminal, está el dominio regulador, el cual es el responsable de producir la respuesta y por lo general es un dominio de unión al DNA.

Al percibir un estímulo específico, ocasiona cambios estructurales en la CS, lo cual permite la autofosforilación dependiente de ATP en el residuo de histidina del dominio transmisor. Posteriormente, el dominio receptor del regulador de respuesta actúa en la defosforilación de His-P en la CS para la transferencia del grupo fosforilo hacia el residuo de Asp en el regulador de respuesta. Por último, esta fosforilación activa al regulador de respuesta actuando como regulador transcripcional.



**Figura 1. Modelo prototípico de un SDC.** La presencia de una señal o estímulo provoca la autofosforilación del residuo de histidina de la CS en el dominio transmisor. El grupo fosforilo posteriormente se transfiere al residuo de aspartato en el RR (Modificado de Pernestig, 2003).

En los SDC bacterianos, existen variaciones con respecto al modelo prototípico. Una modificación frecuente es la presencia de CS híbridas, las cuales cuentan con tres dominios catalíticos. En estas cinasas híbridas, el grupo fosforilo del residuo de histidina en el dominio transmisor proveniente de la autofosforilación inicial, se transfiere a un aspartato conservado del dominio D1 y luego a la histidina del dominio H2 (Figura 2). A esta ruta del grupo fosforilo a través de residuos de aminoácidos adicionales se le conoce como fosforrelevo. La finalidad de esta transferencia adicional no es clara; sin embargo, se ha relacionado con un nivel de regulación adicional y con la habilidad de interactuar con otras vías de señalización (Gao, 2009).



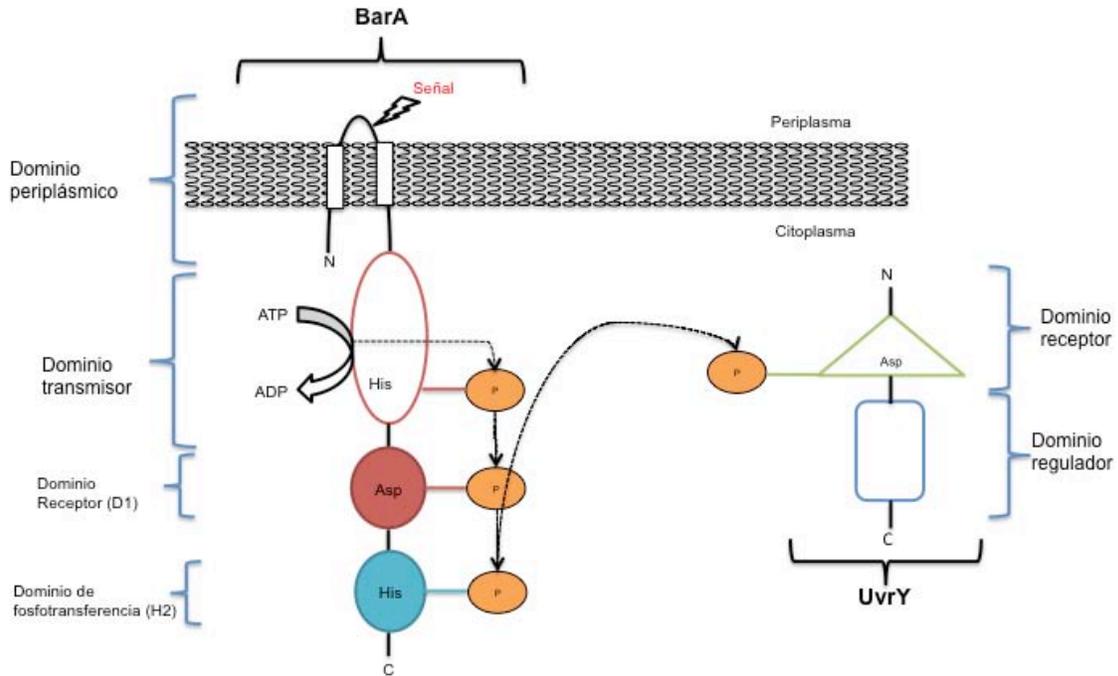
**Figura 2. Modelo híbrido de un SDC.** La transferencia del grupo fosforilo al dominio receptor (D1) y posteriormente al dominio de fosfotransferencia H2 es la diferencia principal entre los dos tipos de modelos de SDC (Modificado de Pernestig, 2003).

Se ha estudiado la actividad bioquímica y las estructuras tridimensionales de varios dominios conservados de las CS y los RR. Sin embargo, aún con los residuos conservados de histidina y aspartato, los cuales constituyen la base del

sistema de fosfotransferencia, existen excepciones y variaciones entre los modelos ya estudiados y, sin duda, estas diferencias seguirán en aumento en la medida en que más sistemas sean caracterizados.

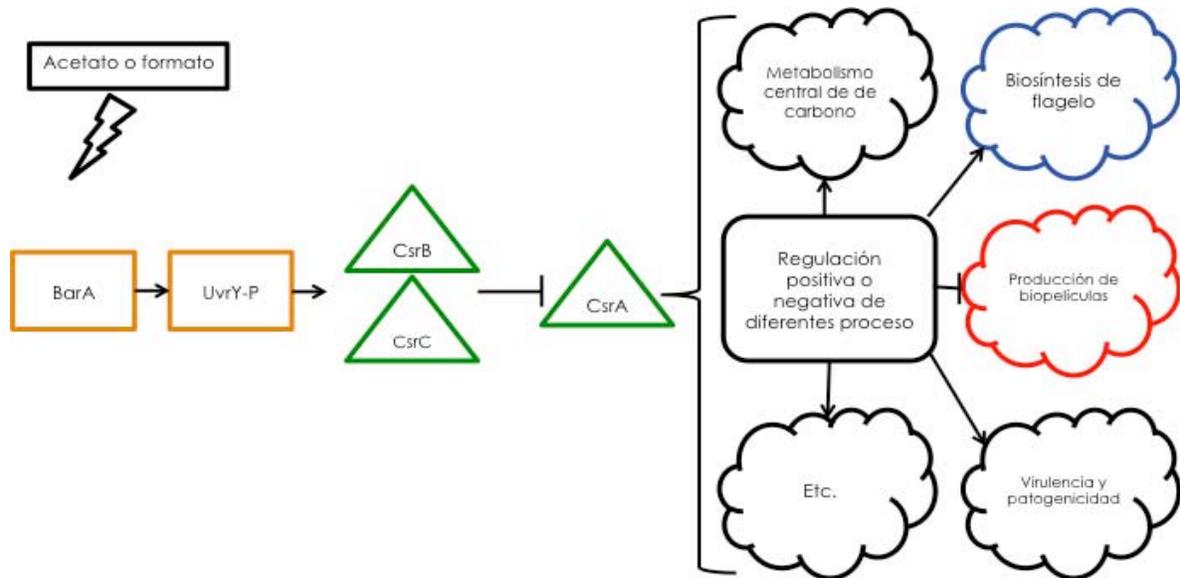
## 1.2 El SDC BarA/UvrY

Se conoce desde hace ya varios años la relación que presentan las proteínas BarA y UvrY que forman el SDC de *E. coli*, el cual se activa en la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria de crecimiento (Pernestig, 2002 y 2003). También, la activación de este sistema depende del valor del pH en el medio (a valores menores de 5.5 el sistema se encuentra inactivo) (Mondragon, 2006). Sin embargo, la adición de glucosa al medio de cultivo a pH 5 induce la activación del sistema tras 2 horas de incubación, lo cual sugirió que la presencia de productos metabólicos finales de la glucólisis activan el sistema. Estos metabolitos resultaron ser acetato y formato (Chavez, 2010). Este SDC presenta características de un modelo híbrido, ya que la proteína BarA cuenta con dominios involucrados en reacciones de fosforrelevo (Figura 3).



**Figura 3. SDC BarA/UvrY de *E. coli*.** La cinasa sensora BarA cuenta con los dominios especializados para las transferencias del grupo fosforilo previo a la fosforilación del regulador de respuesta cognado UvrY (Modificado de Pernestig, 2003).

Cuando la CS BarA se activa por la presencia de acetato, se inicia un fosforrelevo que culmina con la fosforilación del RR UvrY, el cual se activa como regulador transcripcional, activando la transcripción de CsrB y CsrC. A su vez, estos sRNAs secuestran y antagonizan la actividad de la proteína reguladora global CsrA. De forma autoregulatoria, CsrA activa indirectamente la expresión de *uvrY* y es necesaria para la activación de BarA (Suzuki, 2002; Camacho, 2015) (Figura 4).



**Figura 4. Regulación entre, BarA/UvrY; CsrA, CsrB y CsrC.** La activación BarA/UvrY activa a su vez la transcripción de CsrB y CsrC los cuales secuestran y por lo tanto inactivan a CsrA. CsrA se encuentra involucrada en diversos procesos metabólicos y es necesaria para la activación de BarA y la expresión de UvrY. Las flechas indican activación o regulación positiva del siguiente componente; las flechas truncoadas indican inactivación o regulación negativa; las flechas punteadas indican activación indirecta; X y Y son los componentes intermediarios entre la regulación que efectúa CsrA sobre BarA/UvrY.

El sistema BarA/UvrY no es exclusivo de *E. coli*, ya que hay sistemas homólogos en bacterias de otros géneros como son ExpS/ExpA en *Erwinia carotovora* (Eriksson, 1998), GacS/GacA en *Pseudomonas fluorescens* (Gaffney, 1994), BarA/SirA en *Salmonella entérica* serovar *typhimurium* (Altier, 2000) y VarS/VarA en *Vibrio cholerae* (Wong, 1998).

## Capítulo II. Sistema de regulación global Csr

### 2.1 La importancia y actividad de CsrA en el sistema Csr

La expresión de CsrA está regulada positivamente por el factor  $\sigma^{38}$  (factor involucrado en la transcripción de genes en fase estacionaria y en condiciones de estrés) (Timmermans, 2010). Esta proteína se une a mRNAs blancos, afectando su estabilidad y/o traducción. Regula de manera positiva la glucólisis y el metabolismo de acetato (Wei, 2000) y negativamente la glucogénesis y la gluconeogénesis (Baker, 2002); está involucrada en la formación de biopelículas (regulación negativa; en color rojo de la Figura 4), en la motilidad celular (regulación positiva involucrada en la síntesis de flagelos; en color azul de la Figura 4) (Moons y col, 2009; Wei, 2001; Jonas, 2010) y en el *quorum-sensing* (Waters y Bassler, 2005). CsrA también se ha relacionado con la regulación de patogenicidad y virulencia en *E. coli* enteropatógena, ya que esta proteína activa directamente la expresión de genes necesarios para la formación del pedestal de este microorganismo (Bhatt, 2009).

### 2.2 Actividad de CsrA regulada por CsrB y CsrC

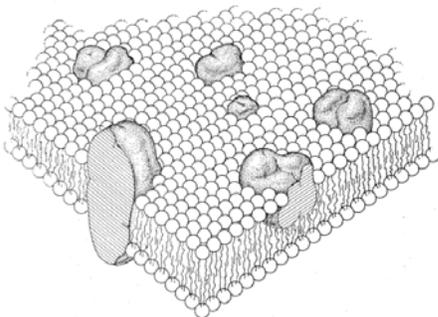
La regulación de la actividad de CsrA está dictaminada por la presencia de los sRNAs CsrB y CsrC (Dubey, 2005; Suzuki, 2002), los cuales secuestran a CsrA inhibiendo su actividad. La presencia de CsrB y CsrC depende de la transcripción de estos por parte del RR UvrY-P; sin embargo, CsrA activa indirectamente la transcripción de estos sRNAs a través de la regulación indirecta de la expresión de *uvrY* y la activación de BarA (Suzuki, 2002; Camacho, 2015).

## Capítulo III. Membranas celulares y balsas lipídicas

### 3.1 Modelo de mosaico fluido de las membranas celulares

El primer modelo aceptado para la estructura de la membrana de las células fue la del mosaico fluido de Singer (1972). En este modelo se plantea que existe una dispersión aleatoria entre proteínas y fosfolípidos en una bicapa lipídica a lo largo de la membrana. Diversos experimentos bioquímicos y propuestas termodinámicas, establecieron que este modelo es el más viable para representar las membranas celulares y otros tipos de membranas funcionales (mitocondria, cloroplasto, etc.). En este modelo, los fosfolípidos actúan como la matriz de la membrana, proporcionando fluidez, viscosidad y también la habilidad de mover sus componentes de manera libre. Las proteínas por su parte, presentan una estructura globular con una alta cantidad de regiones  $\alpha$ -hélice, se pueden encontrar como proteínas integrales (más del 70%) o periféricas, unidas a oligosacáridos o a lípidos especiales; pueden estar embebidas en la membrana de tal forma que cruzan hasta el citoplasma (Figura 5).

El modelo propuesto por Singer fue ampliamente aceptado; sin embargo, a falta de la tecnología necesaria para profundizar más en el tema, el modelo de mosaico fluido solamente comprendía la dispersión aleatoria de sus componentes y que existían proteínas exclusivas de la membrana externa de la célula.



**Figura 5. Modelo de mosaico fluido de la membrana celular.** Se esquematiza la bicapa lipídica rodeando proteínas integrales y periféricas de la membrana celular. Tomado de Singer, 1972.

### 3.2 Estructura de las membranas celulares. Balsas lipídicas

En años recientes se ha encontrado que debido a las interacciones presentes en la membrana celular, se pueden formar microdominios con funciones y composiciones específicas. Se cree que los lípidos son el componente más importante de la formación de estos microdominios o balsas lipídicas, lo cual añade complejidad al modelo de mosaico fluido y otorga características especiales para formar plataformas para proteínas membranales y procesos de endocitosis o tráfico intracelular (Doherty y McMahon, 2009).

Existen varios modelos que explican la conformación de las balsas lipídicas. El principal de ellos menciona que estos microdominios están conformados principalmente por colesterol y esfingolípidos, en donde las proteínas se encuentran asociadas (Simons, 1997). Otro modelo propuesto es en el cual se forman pequeñas estructuras llamadas *lipid shell's*, los cuales son pequeños montajes dinámicos donde las proteínas que se encuentran en las balsas son preferentemente asociadas a determinados tipos de lípidos, en donde proteínas específicas de las balsas lipídicas se unen a ciertos lípidos que otorgan una estabilidad mayor que la de encontrarse dispersas en la membrana; posteriormente estos montajes de composición similar se unen entre si para formar la balsa lipídica (Anderson, 2002).

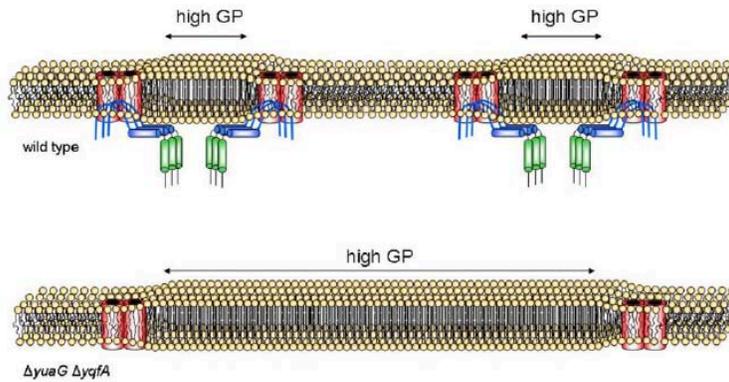
Los primeros estudios relacionados con balsas lipídicas se realizaron en células eucariotes. Los resultados obtenidos demostraron que al afectar la estabilidad de las balsas lipídicas se afectan las proteínas que se encuentran en estos sitios ocasionando defectos de señalización celular y vías de transducción de señales (Meile, 2006). También, se ha relacionado la disrupción de estas balsas con diferentes enfermedades en humanos como Alzheimer, Parkinson y enfermedades cardiovasculares (López, 2010).

No todas las proteínas pueden ser componentes de microdominios membranales, ya que se requiere una interacción específica entre lípidos y proteínas. Algunas de las proteínas relacionadas con la formación de balsas son:

caveolinas, proteolípido MAL, flotilinas, estomatinas y proteínas transmembranales. Estas proteínas se pueden combinar al formar la balsa y darle una estabilidad y resistencia a detergentes mucho mayor en comparación de otros sitios de la membrana celular.

Se han descubierto, mediante análisis bioinformáticos, genomas bacterianos que codifican proteínas cuya secuencia de aminoácidos es similar a la proteína flotilina-I, la cual se encuentra exclusivamente en balsas lipídicas de eucariotes. Todos los miembros de la familia de las flotilinas tienen un dominio único compuesto por regiones superenrolladas pero también contienen un dominio homólogo a prohibitina SPFH (stomatin/prohibitin/flotillin/HfIKC, por sus siglas en inglés) (Tavernarakis, 1999; Rivera-Milla, 2006). Se ha demostrado que las flotilinas y prohibitinas forman grandes complejos en la membrana, los cuales se pueden localizar fácilmente *in vivo* (Solomon, 2002). En *Bacillus subtilis*, mutaciones en la proteína FloT, afecta las vías de transducción de señales y la esporulación. La CS KinC de este microorganismo, así como FloT, se encuentra en balsas lipídicas (López, 2010; Donovan y Bramkamp, 2009).

Por último, los experimentos realizados por Bach (2013) confirman que la presencia de las flotilinas compartimentalizan secciones en la membrana en las cuales se encuentra un mayor orden y menor fluidez (Figura 6). Existen sistemas de secreción, como el que se encuentra en *B. subtilis*, que necesitan de tal separación. Bach (2013) también menciona que no necesariamente deben de encontrarse lípidos especializados en esta región.



**Figura 6. Compartimentalización de dominios en la membrana plasmática.** GP: *Generalized polarization*; La presencia de flotilinas (verde-azul) ayudan a separar regiones de la membrana, aumentando el orden y generando secciones especializadas para ciertos procesos celulares. Tomada de Bach, 2013.

### 3.3 Flotilinas

Estas proteínas fueron identificadas por primera vez en la regeneración de las células ganglionares de la retina de peces *goldfish* después de una lesión del nervio óptico (Schulte, 1997); años después se demostró que son necesarias para la regeneración de los axones de la retina del pez cebra (Munderloh, 2009). El grupo de familias flotilina-1 y flotilina-2 se han encontrado en todos los tipos de células de mamíferos estudiadas hasta el día de hoy. Estas proteínas se han encontrado en bacterias, plantas y hongos, pero no se han encontrado aún en levaduras.

Los dominios SPFH encontrados en las flotilinas tienen diversas funciones en diferentes organismos, tejidos y localización celular, pero comparten una característica común la cual consiste en comportarse como proteínas integrales de membrana que oligomerizan para formar microdominios. Estos microdominios demuestran insolubilidad en detergentes fríos no iónicos y flotabilidad en gradientes de densidad de sacarosa, los cuales son características clásicas de las balsas lipídicas (Otto, 2011). Las flotilinas por si solas, o en conjunto, se han visto implicadas en numerosos eventos de señalización, y se cree que están organizadas en balsas lipídicas (Babuke y Tikkanen, 2007). Otros estudios en

varios tipos de células han demostrado que los microdominios de flotilinas representan sitios de ensamblaje para plataformas de señalización que involucran la actividad de la familia de cinasas Src (en células T) (Slaughter, 2003).

## Capítulo IV. Proteína putativa arilsulfatasa, AsIA

### 4.1 Caracterización de *asIA*

El gen *asIA* en *E. coli* fue llamado de esta manera debido a que en la secuencia de aminoácidos contiene motivos sulfatasa I y II, los cuales son homólogos en un 55 y 70%, respectivamente, a los que se encuentran en la secuencia del gen *atsA* presente en el genoma de *Klebsiella pneumoniae* (antes *K. aerogenes*). Este gen se traduce en una aril sulfatasa involucrada en el metabolismo del sulfato (Hoffman, 2000). Esta proteína está formada por 427 aminoácidos con una masa molecular predicha de 52 kDa (Combet, 2000). Además, el análisis de la organización genómica de *asIA* indica que no se encuentra en un operón.

Mediante el análisis computacionales se predice que AsIA contiene dos segmentos que abarcan la membrana (Klein, 1985) y una secuencia de señal en el amino-terminal con un sitio de escisión putativo entre los aminoácidos 24 y 25 (Nielsen 1997). En *Salmonella* entérica serovar *typhimurium* se encontró que AsIA es modificada post-traduccionalmente y es secretada a la membrana citoplasmática por medio del sistema TAT (*Twin-arginine-translocase*) (Das, 2013).

### 4.2 Homología de *asIA* en otras especies

Mediante análisis informático se ha encontrado que en otras cepas de *E. coli*, como la K-1, existe también este gen. Entre la cepa K-1 y la K-12, existe una homología de un 94% en los nucleótidos y 97% en los aminoácidos de esta proteína. En *Salmonella* entérica serovar *typhimurium*, se detectó la expresión de AsIA en condiciones ácidas (pH 5.5), así como su actividad de sulfatasa en estas mismas condiciones, pero no a pH 7.0 (Das, 2013).

En otros estudios se ha caracterizado la actividad de sulfatasa en especies como *Klebsiella aerogenes* (Adachi, 1975), *Proteus rettgeri* (Fitzgerald, 1970), *Serratia marcescens* (Murooka, 1980) y *Salmonella* entérica serovar *typhimurium*

(Henderson, 1979); entre ellos, varios expresan aril sulfatasas como las descritas previamente.

### 4.3 Virulencia

En *E. coli* K-1 se detectó que la actividad de sulfatasa de este microorganismo le ayuda a atravesar la barrera hematoencefálica, siendo esta bacteria uno de los principales causantes de meningitis neonatal. Una mutante de *asIA* disminuye su virulencia hasta en treinta veces menos que la cepa silvestre y una cepa con un 50% de mutación hasta dieciséis veces menos; al complementar estas mutantes, la capacidad de infectar el cerebro regresa a sus valores normales. Diferentes estudios determinaron que esta mutación no afecta la cápsula, el lipopolisacárido O18, la fimbria S o la proteína OmpA (*Outer membrane protein A*), todas estas involucradas en la virulencia del microorganismo. Por otra parte, al momento de transformar *E. coli* K-12 con *asIA*, esta cepa no se vuelve invasiva (Hoffman, 2000), lo cual indica que la presencia de esta proteína contribuye a invadir pero no causa ningún efecto sobre una cepa no invasiva.

En *S. typhimurium*, los genes *envZ-ompR* y *phopQ*, son reguladores importantes de virulencia. Algunas de sus funciones son la de disminuir el pH del medio y lograr adaptarse a este cambio, además de activar la expresión de diferentes genes de patogenicidad. Se observó que estos genes están involucrados en la supervivencia y patogenicidad de este microorganismo así como la expresión y actividad de AsIA.

Finalmente, comparando la expresión de *asIA* en *E. coli* K-1 con la K-12, en esta última no se detectó su expresión por medio de Northern blot (Hoffman, 2000). La actividad nula de sulfatasa de esta proteína en *E. coli* K-12 (a pH5.5 y 7), arrojan resultados importantes para determinar que función puede tener tal proteína en este microorganismo (Das, 2013).

## Hipótesis

Las proteínas HflC, HflK, YbbK, YqiK y AsIA, están involucradas en la activación de BarA en *E. coli*.

## Objetivo

Determinar el papel de las proteínas HflC, HflK, YbbK, YqiK y AsIA en la activación del SDC BarA/UvrY, así como también el efecto regulatorio de CsrA sobre la expresión de las primeras.

## Objetivos particulares

- Predecir por medio de programas informáticos la localización de las regiones transmembranales de las flotilinas y de la proteína AsIA.
- Relacionar los fenotipos de motilidad de las cepas mutantes en flotilinas y *asIA* con los de las cepas mutantes en *csrA* y *barA*.
- Comparar por Northern blot los niveles de expresión de *csrB* en cepas mutantes en los genes *hflC*, *hflK*, *ybbK*, *yqiK* y *asIA* con una silvestre.
- Complementar la cepa mutante *asIA* y medir la actividad del reportero *csrB-lacZ* por medio de ensayos de  $\beta$ -galactosidasa.
- Comparar a través de Western blot, los niveles de expresión de las flotilinas y de AsIA en las cepas silvestre, *csrA* $\Omega$ Km y *csrA* $\Omega$ Km complementada con el plásmido pEXT21::*csrA*.

## Materiales

### Oligonucleótidos, plásmidos y cepas

En la Tabla 1 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la construcción de las diferentes cepas. Todos se elaboraron con ayuda del programa informático Serial Cloner y la base de datos Ecocyc de la cuál se tomaron las secuencias de los genes de interés. Para la construcción de fusiones cromosomales por el método de lambda-red (Datsenko, 2000) se diseñaron los oligonucleótidos con 40-50 nt homólogos al sitio de recombinación.

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')	Uso
<b>asIA-His-tag-Fw</b>	CCTGAAAAAATATCCACCAC GCGCGCAGATTAAATCTGAC CACCACCATCATCACCAT	Oligonucleótido <i>forward</i> para fusión con 6His
<b>asIA-HA-tag-fw</b>	CCTGAAAAAATATCCACCAC GCGCGCAGATTAAATCTGAC TATCCGTATGATGTTCC	Oligonucleótido <i>forward</i> para fusión con HA
<b>pFluor-asIA-Fw</b>	CCTGAAAAAATATCCACCAC GCGCGCAGATTAAATCTGAC ATGGTGAGCAAGGGCGAG	Oligonucleótido <i>forward</i> para fusión con mCherry
<b>asIA-3XFLAG<sup>®</sup>-Fw</b>	GATCCTGAAAAAATATCCAC CACGCGCGCAGATTAAATCT GACGACTACAAAGACCATGA C	Oligonucleótido <i>forward</i> para fusión con 3XFLAG <sup>®</sup>
<b>asIA-pKD-Rv</b>	GATTGCCGGATGCGGCGTA AACGCCTTATCCGGCCTACA TGATCGTATGAATATCCTCC TTAGTTC	Oligonucleótido <i>reverse</i> para fusiones cromosomales

<b>asIA-PstI-Fw</b>	CCCTGCAGTCGTTTATTATG CCACAGAG	Oligonucleótido <i>forward</i> para promotor de asIA
<b>asIA-EcoRI-Rv</b>	CCGAATTCTGGATAAGATGC GTCAGC	Oligonucleótido <i>reverse</i> para amplificar gen asIA
<b>ybbK-3XFLAG®-Fw</b>	CGAGCTGGTGAAAGACAGC GCCAACAAACGGACTCAGC CAGACTACAAAGACCATGAC	Oligonucleótido <i>forward</i> para fusión con 3XFLAG®
<b>pKD-ybbK-Rv</b>	GCCAGAAAATATGTGGATGA ACGACCATTA ACTCCATCAT ATGAATATCCTCCTTAG	Oligonucleótido <i>reverse</i> para fusiones cromosomales
<b>pKD-yqiK-Rv</b>	CCCCGGCTTTTTGGGCCAG GGATTATTCCTGGAAGAGG GTATGAATATCCTCCTTAGT TC	Oligonucleótido <i>reverse</i> para fusiones cromosomales
<b>yqiK-FLAG®-tag-Fw</b>	ACCCTTAACCTCAACA ACTC CCGT CGAAGAAAAGCAGA GGACTACAAAGATGACGAC	Oligonucleótido <i>forward</i> para fusión con FLAG®
<b>yqiK-3XFLAG®-Fw</b>	ACCCTTAACCTCAACA ACTC CCGT CGAAGAAAAGCAGAGG ACTACAAAGACCATGAC	Oligonucleótido <i>forward</i> para fusión con 3XFLAG®
<b>yqiK-HA-Fw</b>	ACCCTTAACCTCAACA ACTC CCGT CGAAGAAAAGCAGA GTATCCGTATGATGTTCTG	Oligonucleótido <i>forward</i> para fusión con HA

<b>hfIC-HA Fw</b>	TTTCTTCCGCTACATGAAGA CGCCGACTTCCGCAACGCG TTATCCGTATGATGTTCTG	Oligonucleótido <i>forward</i> para fusión con HA
<b>pKD-hfIC-Rv</b>	AGGATGCGGTGGCTTTATTG ACCTGTACCGCAGTCGTTAT AATGAATATCCTCCTTAGTT C	Oligonucleótido <i>reverse</i> para fusiones cromosomales

Dependiendo de la secuencia de alineamiento de los oligonucleótidos y la extensión del producto esperado, las condiciones de amplificación fueron distintas. El tamaño correcto de los productos de PCR se verificó mediante la separación electroforética del producto amplificado en un gel de agarosa 1% y amortiguador TBE (Tris-Bórico-EDTA) con un voltaje de 140 V. Posteriormente, el gel se sumergió en una solución de Bromuro de etidio 0.5 mg/mL para revelar el DNA y éste se observó en un transiluminador de luz UV.

En la Tabla 2 se muestran las cepas utilizadas a lo largo del estudio.

Tabla 2. Cepas utilizadas.

<b>Nombre</b>	<b>Descripción</b>	<b>Referencia u origen</b>
<b>MG1655</b>	<i>E. coli</i> K-12, F <sup>-</sup> λ <sup>-</sup> <i>rph-1</i> , cepa silvestre	Guyer, 1981.
<b>Top 10</b>	<i>F</i> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74 nupG recA1 araD139</i> Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galE15 galK16 rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1 λ<sup>-</sup></i> ,	Invitrogen.

<b>BW25113</b>	<i>E. coli</i> K12, <i>rrnB3</i> $\Delta$ <i>lacZ4787</i> <i>hsdR514</i> $\Delta$ ( <i>araBAD</i> )567 $\Delta$ ( <i>rhaBAD</i> )568 <i>rph-1</i> , cepa silvestre de colección KEIO	Colección KEIO (Baba, 2006)
<b>BW25113 <math>\Delta</math><i>asIA</i></b>	Mutante en gen <i>asIA</i>	
<b>BW25113 <math>\Delta</math><i>ybbK</i></b>	Mutante en gen <i>ybbK</i>	
<b>BW25113 <math>\Delta</math><i>yqiK</i></b>	Mutante en gen <i>yqiK</i>	
<b>BW25113 <math>\Delta</math><i>hflC</i></b>	Mutante en gen <i>hflC</i>	
<b>BW25113 <math>\Delta</math><i>hflK</i></b>	Mutante en gen <i>hflK</i>	
<b>MG1655 CsrA<math>\Omega</math>Km</b>	Gen <i>csrA</i> interrumpido con <i>cassette</i> de Km	Repertorio del laboratorio

En la Tabla 3 se muestran los plásmidos con los que se trabajó y la función que cumplen.

Tabla 3. Plásmidos utilizados.

Plásmido	Característica	Referencia
<b>pKD46</b>	Expresa el sistema Red ( $\lambda$ -Red) para recombinación homóloga	Datsenko, 2000
<b>pSUB11</b>	Templado para amplificar el epítipo de 3XFLAG y el <i>cassette</i> de resistencia a Km	Uzzau, 2001
<b>pSUB315</b>	Templado para amplificar el epítipo de HA y el <i>cassette</i> de resistencia a Km	Uzzau, 2001
<b>pCP20</b>	Eliminación de resistencia a antibióticos de cepas mutantes	Datsenko, 2000
<b>pBR322</b>	Plásmido de clonación, mediano número de copias	Bolivar, 1977
<b>pBR322::<i>asIA</i></b>	<i>asIA</i> con región promotora clonado entre sitios PstI y EcoRI de pBR322	Este estudio

<b>pMX544</b>	csrA con región promotora clonado en plásmido de bajo número de copias pEXT21	Camacho et al 2015
---------------	---	--------------------

En la Tabla 4 se presentan las diferentes cepas construidas en el laboratorio para la realización de los diferentes experimentos.

Tabla 4. Cepas construidas en el laboratorio.

<b>Nombre</b>	<b>Descripción</b>	<b>Uso</b>	<b>Método de construcción</b>
<b>MG1655 <i>csrB-lacZ</i></b>	WT con fusión transcripcional <i>csrB-lacZ</i>	$\beta$ -galactosidasa	Transducción por fago P1 para el reportero
<b>MG1655 <math>\Delta</math><i>asIA</i> <i>csrB-lacZ</i></b>	$\Delta$ <i>asIA</i> con fusión transcripcional <i>csrB-lacZ</i>	$\beta$ -galactosidasa	Transducción por fago P1 para el reportero y delección del gen
<b>MG1655 <math>\Delta</math> <i>asIA</i> pBR322::<i>asIA</i> <i>csrB-lacZ</i></b>	$\Delta$ <i>asIA</i> con fusión transcripcional <i>csrB-lacZ</i> portando el plásmido pBR322:: <i>asIA</i>	$\beta$ -galactosidasa	Por transducción para la delección del gen y reportero; por electroporación para el plásmido
<b><i>E. coli</i> <math>\Delta</math> <i>asIA</i> pBR322 <i>csrB-lacZ</i></b>	$\Delta$ <i>asIA</i> con fusión transcripcional <i>csrB-lacZ</i> portando el plásmido pBR322 (control negativo)	$\beta$ -galactosidasa	Por transducción para la delección del gen y reportero; por electroporación para el plásmido
<b>MG1655 <math>\Delta</math><i>asIA</i></b>	$\Delta$ <i>asIA</i> en fondo MG1655	Northern blot	Por transducción para la delección del gen

<b>BW25113</b> <b><math>\Delta</math>asIA P1</b>	$\Delta$ asIA en fondo BW25113	Northern blot	Por transducción para la delección del gen
<b>MG1655 HfIC- HA</b>	MG1655 con HfIC etiquetada con HA	Western blot	Recombinación homóloga para el epítotope
<b>MG1655 HfIC- HA CsrA<math>\Omega</math>Km</b>	MG1655 con HfIC etiquetada con HA con <i>csrA</i> interrumpido con <i>cassette</i> de Km	Western blot	Recombinación homóloga para el epítotope; por Fago P1 para la mutación en <i>csrA</i>
<b><i>E. coli</i> HfIC-HA CsrA<math>\Omega</math>Km pEXT21::<i>csrA</i></b>	MG1655 con HfIC etiquetada, con HA con <i>csrA</i> interrumpido con <i>cassette</i> de Km y complementación con pEXT21:: <i>csrA</i>	Western blot	Recombinación homóloga para el epítotope; por Fago P1 para la mutación en <i>csrA</i> ; y por electroporación para el plásmido
<b><i>E. coli</i> YbbK- 3XFLAG<sup>®</sup></b>	MG1655 con YbbK etiquetada con 3XFLAG <sup>®</sup>	Western blot	Recombinación homóloga para el epítotope
<b><i>E. coli</i> YbbK- 3XFLAG CsrA<math>\Omega</math>Km</b>	MG1655 con YbbK etiquetada con 3XFLAG <sup>®</sup> , con <i>csrA</i> interrumpido con <i>cassette</i> de Km	Western blot	Recombinación homóloga para el epítotope; por Fago P1 para la mutación en <i>csrA</i>
<b><i>E. coli</i> YbbK- 3XFLAG<sup>®</sup> CsrA<math>\Omega</math>Km pEXT21::<i>csrA</i></b>	MG1655 con YbbK etiquetada con 3XFLAG <sup>®</sup> , con <i>csrA</i> interrumpido con <i>cassette</i> de Km y complementación con pEXT21:: <i>csrA</i>	Western blot	Recombinación homóloga para el epítotope; por Fago P1 para la mutación en <i>csrA</i> ; y por electroporación para el plásmido

## Métodos

### Transducción por medio de fago P1 (Moore, 2011)

La construcción de ciertas cepas se realizó por medio de infección de células receptoras con fago P1.

Para la cepa donadora, se tomaron 50  $\mu\text{L}$  del cultivo con el gen o mutación de interés (conteniendo marcador de resistencia a antibiótico), se crecieron durante toda la noche (Overnight, ON) con los antibióticos necesarios y se inocularon en un tubo de ensayo con 5 mL de LB con 0.2% de glucosa y 5 mM de CaCl. El cultivo nuevo se dejó crecer durante 30 min a 37° C con agitación. Se agregó 1  $\mu\text{L}$  de fago P1 con actividad de transducción confirmada y se incubó durante 1-1.5 h más en las mismas condiciones hasta que se comenzara a observar la actividad lítica del fago (disminución de la turbidez del medio). En paralelo, se utilizó un control negativo (sin adición del fago) para confirmar que las células se lisan debido al fago. Se tomaron 3 alícuotas de 1 mL en microtubos, se adicionó 100  $\mu\text{L}$  de cloroformo, se agitaron con el vortex durante 10 s para romper las células restantes y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min y a 4° C para pasar la fase acuosa clarificada a tubos Eppendorf nuevos. Los lisados se conservaron en refrigeración

Para la cepa receptora se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de un cultivo y se inocularon en un tubo de ensayo con 5 mL de caldo Luria Bertani (LB) adicionado con 0.2% de glucosa. El cultivo se creció durante 3-4 h a 37° C con agitación hasta llegar a una  $\text{OD}_{600}$  aproximada de 0.4-0.5. Se tomaron alícuotas de 1 mL y se centrifugaron a temperatura ambiente a 5,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió con 300  $\mu\text{L}$  de solución de transducción (10 mM  $\text{MgSO}_4$ , 5 mM CaCl) se agregó 1, 10 y 100  $\mu\text{L}$  del lisado de la cepa donadora a cada una de las alícuotas y se incubaron durante 30 min sin agitación a 37° C. A continuación se agregó 100  $\mu\text{L}$  de citrato de sodio 1 M para detener la lisis celular, el cual actúa secuestrando el  $\text{Ca}^{2+}$  presente en el medio, y 500  $\mu\text{L}$  de LB y se incubó durante

una hora más en las mismas condiciones. El cultivo se centrifugó de igual manera que en los pasos anteriores para eliminar el sobrenadante y se resuspendió en 100  $\mu$ L citrato de sodio 1 M.

Se sembraron 100  $\mu$ L de las células infectadas en cajas de agar-LB con los antibióticos tanto de la célula receptora como la donadora. Las placas se incubaron ON a 37° C y al día siguiente se seleccionaron las colonias aisladas que tuvieran forma redonda, color crema y sin orillas irregulares (lo cual indicaría que aún existe fago en el medio y ocasiona que se continúen lisando las células). Estas se inocularon en tubos de ensayo con 5 mL de LB, los antibióticos necesarios y 500  $\mu$ l de citrato de sodio 1 M. Los cultivos ON se sembraron de nuevo en cajas de agar-LB y todos los antibióticos para asegurarse que son colonias puras, sin contaminación del fago o de otras bacterias.

En el caso de cepas donadoras del reportero *csrB-lacZ*, se agregó 25  $\mu$ L de X-gal 40 mg/mL (5-bromo-4cloro-3indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido) a la placas de agar para poder seleccionar las colonias de color azul.

### **Etiquetado de proteínas con epítotope (Uzzau, 2001)**

Esta técnica se utilizó para introducir al cromosoma, por recombinación homóloga, fragmentos de DNA etiquetados con un epítotope (región específica que es reconocida por un anticuerpo) para la detección de las proteínas correspondientes por medio de Western blot.

Se inocularon 50 mL de LB (L-arabinosa 1M y 100  $\mu$ g/mL Am finales) con 50  $\mu$ L de un cultivo ON a 30° C de la cepa con el plásmido helper pKD46 Am<sup>r</sup> sensible a temperatura. El cultivo se incubó a 30° C durante 2-3 h aproximadamente hasta una OD<sub>600</sub> aproximada de 0.5. A continuación se lavaron las células (3 veces) por medio de centrifugaciones a 4,000 rpm, a 10 min y a 4° C con agua-glicerol 10% frío. Después del último lavado, la pastilla de células se resuspendió en 1 mL de agua estéril fría. En tubos Eppendorf se agregó 100  $\mu$ L de

células lavadas y entre 1 y 5  $\mu\text{L}$  del producto de PCR purificado, el cual tiene la secuencia del epítipo, seguido por un marcador de resistencia a antibiótico, todo flanqueado por secuencias de 35-40 pb que son homólogas al sitio del cromosoma en donde se desea integrar (normalmente a las secuencias que flanquean el codón de *stop* del gen que se quiere etiquetar). La suspensión se dejó incubar 1 min sobre hielo e inmediatamente se agregó a una celda para electroporación. Se aplicó a las células una descarga de 1.8 kV en un electroporador Micropulser<sup>TM</sup> de BIORAD. Posteriormente las células se recuperaron con 1 mL de LB a temperatura ambiente y se incubaron a 37° C con agitación durante una hora. Por último, se centrifugó el cultivo a 5,000 rpm por 5 min a temperatura ambiente y se sembró el concentrado de células en placas de agar-LB con los antibióticos necesarios. Las placas se incubaron ON a 37° C y se seleccionaron colonias aisladas de forma redonda y color crema.

### **Lisis alcalina para extracción de plásmido (Birnboim, 1979)**

Después de incubar durante toda la noche el cultivo con el plásmido de interés, se tomaron 1.5 mL (hasta 5 mL si el plásmido es de bajo número de copias) y se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de solución GTE a 4° C (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, esterilizado en autoclave). Se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de una solución de SDS alcalina recién preparada (0.2 N NaOH, 1% SDS) y se mezcló por inversión entre 2-5 veces. Se agregaron 150  $\mu\text{L}$  de una solución alta en sales (60 mL de 5 M acetato de potasio, 11.5 mL de ácido acético glacial, 28.5 mL de agua destilada desionizada estéril) y se mezcló por inversión entre 2-5 veces. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se traspasó a un microtubo nuevo y se adicionó 1 mL de etanol 100% para precipitar el DNA. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó y el paquete de DNA se lavó con 1 mL de etanol 70%. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar

el paquete de DNA a temperatura ambiente durante 1 h. Por último, el paquete de DNA se resuspendió en amortiguador TE con RNAsa A (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA pH 8.0, esterilizado en autoclave; 20 µg/mL de RNAsa A) y se conservó a -20° C.

### **β-galactosidasa (Miller, 1972)**

Se comenzó el ensayo partiendo de cultivos inoculados con cultivos incubados ON a una OD<sub>600</sub> de 0.01. La toma de muestra se realizó al momento de llegar a la OD<sub>600</sub> deseada y posteriormente cada determinado tiempo (entre 20 y 30 min dependiendo el ensayo a realizar).

En tubos de ensayo se colocaron 900 µL de amortiguador Z (100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH7, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM β-mercaptoetanol, 0.001 % SDS) y 25 µL de cloroformo. Al momento de la toma de muestra se agregaron 100 µL de la muestra en cada tubo e inmediatamente se rompieron las células agitando en vortex. Cada muestra se tomó por duplicado para cada punto del experimento. Después de haber tomado todas las muestras necesarias, se agregaron 200 µL de ONPG (o-nitrofenil-β-galactósido; 4 mg/mL) y se incubó la reacción durante 20 min. La reacción se detuvo al agregar 500 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M.

Se midió la absorbancia de las muestras a 420 y 550 nm en celdas de vidrio.

Por último, utilizando la ecuación de Miller (1), se calcularon las unidades de actividad.

$$Unidades\ Miller = 1000 \left( \frac{OD_{420} - (1.75 * OD_{550})}{t * v * OD_{600}} \right) \dots\dots\dots(1)$$

En donde:

OD<sub>600</sub>: absorbancia a 600 nm

OD<sub>420</sub>: absorbancia a 420 nm

OD<sub>550</sub>: absorbancia a 550 nm

t: tiempo, en minutos

v: volumen, en mL

**Eliminación de resistencia a antibióticos flanqueados por sitios FRT (Datsenko, 2000)**

Del cultivo deseado a eliminar la resistencia, se lavó 1 mL del cultivo tres veces con 1 mL de agua destilada desionizada estéril a 4° C y, entre lavados, se centrifugó a 5,000 rpm durante 5 minutos y 4° C para compactar las células. Posteriormente se electroporó 1 µL del plásmido pCP20 (Am<sup>r</sup>) y se recuperó con 1 mL de LB, en agitación a 30° C. Las células recuperadas se sembraron en placas de LB con ampicilina (Am) y se incubaron ON. Al día siguiente, se seleccionó una colonia aislada para inocular un tubo de ensayo sin antibiótico y se creció a 30° C hasta una OD<sub>600</sub> aproximada de 0.1 y se realizó un cambio de temperatura a 42° C. Se incubó hasta una OD<sub>600</sub> aproximada de 0.8-1 (tres horas o más), se sembró en placas de LB-agar sin antibiótico y se incubó ON a 37° C. Al día siguiente se seleccionaron entre 15 y 30 colonias para resembrar en cajas de LB-agar con: Am (verificar la eliminación del plásmido pCP20), el o los antibióticos que se desean eliminar y otra sin antibiótico. Las colonias que no crecen en los antibióticos pero sí en LB se seleccionaron para inocular de nuevo un tubo de ensayo y guardar la cepa en glicerol a -70° C al día siguiente.

## **Cuantificación de proteína por el método de Bradford (Sigma-Aldrich)**

Antes de realizar la cuantificación, las células se lisaron por sonicación y se aclaró el lisado por centrifugación a 10,000 rpm 10 min a temperatura ambiente.

Se siguió el protocolo proporcionado por el proveedor del reactivo de Bradford. Brevemente, en microtubos nuevos se agregó 1 mL del reactivo de Bradford y 33.3  $\mu$ L de los stocks de albúmina sérica bovina para realizar una curva de calibración con los siguientes puntos: 1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL y 0.125 mg/mL de albúmina sérica bovina. El blanco utilizado fue agua destilada desionizada estéril.

Se agregó en la misma cantidad tanto de reactivo de Bradford como de muestra, una dilución 1:10 de cada muestra a cuantificar.

Se realizó una regresión lineal leyendo en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm para obtener la ecuación de la recta y poder calcular las concentraciones de las muestras.

## **Extracción de RNA (Georgellis, 1992)**

Se crecieron los cultivos a 37° C y se realizó la toma de muestras a diferentes fases de crecimiento iniciando a una OD<sub>600</sub> de 0.01. Después de alcanzar la OD<sub>600</sub> se tomaron 10 mL del cultivo y se colocaron en un baño de hielo en tubos con hielo molido. Las muestras se centrifugaron a 4,000 rpm 10 min a 4° C y posteriormente las pastillas de células se resuspendieron en la solución I (acetato de sodio 0.1M, sacarosa 0.3 M, pH 4.5) fría. Las células se lisaron añadiendo la solución II (acetato de sodio 0.01 M, SDS 2%, pH4.5). Las muestras se calentaron a 70° C durante 1.5 min. Se adicionó fenol a 65° C y, después de una agitación vigorosa en vortex durante un par de segundos, se incubaron nuevamente las muestras a 70° C durante tres minutos. Se centrifugaron las muestras durante a 14,000 rpm 10 min a 4° C y la fase superior se traspasó a microtubos nuevos con la precaución de no tomar la interfase; este proceso se repitió una vez más,

teniendo la precaución de mantener las muestras en el hielo o en el termobloque a 70° C y en ningún momento a temperatura ambiente. A continuación, a las muestras se les adicionó 400 µL de fenol-cloroformo, se mezcló en vortex durante un par de segundos y se centrifugó de igual manera que en la extracción anterior. Para eliminar restos de fenol, a la fase superior de la última extracción se le añadió 300 µL de cloroformo, se mezcló en vortex y se centrifugó de la misma manera que las extracciones anteriores. Por último, para precipitar la muestra, a la fase superior de la última extracción se le añadió 10% del volumen total (aproximadamente 10µL) de acetato de sodio 3M pH 4.5 y 600 µL de etanol puro frío. Se dejaron precipitando las muestras durante toda la noche a -20° C y al día siguiente se centrifugaron a 13,000 rpm 10 min a 4° C. Se eliminó por decantación el sobrenadante, las pastillas de RNA se secaron durante una hora a temperatura ambiente y se resuspendieron en 100-150 µL de H<sub>2</sub>O destilada desionizada estéril.

Se hicieron diluciones de 3µL de las muestras en 500 µL de H<sub>2</sub>O destilada desionizada estéril y se cuantificaron las muestras de RNA en el espectrofotómetro Thermo Scientific™ Genesys™ 10S UV-Vis en longitudes de onda de 260 y 280 nm.

Para determinar la integridad del RNA de las muestras, se mezclaron con amortiguador de carga (50% glicerol, 5 µg azul de bromofenol, 5 µg xilen cianol; cbp 1 mL de H<sub>2</sub>O libre de RNAasa) y bromuro de etidio 0.5 mg/mL, se realizó un gel de agarosa 1% con amortiguador de fosfato de sodio 0.5 M pH 6.5 y mediante separación electroforética (100V durante 30 min), se buscó en el gel teñido las bandas de los RNA ribosomales y los precursores de RNA así como indicios de degradación, como puede ser barrido de las bandas.

### **Northern blot (Sambrook, 1989)**

Con las muestras de RNA íntegras y cuantificadas previamente, se calculó una cantidad determinada de RNA para cargar. La cantidad calculada de RNA se adicionó a 15 µL de un *Master mix* (15 µL de RNA *sample buffer* (100 µL de

MOPS 10X (0.2 M MOPS, 50 mM acetato de sodio, 10 mM EDTA disódico), 500  $\mu$ L de formamida ultra pura, 170  $\mu$ L de formaldehído y 230  $\mu$ L de agua esterilizada, 5  $\mu$ L de *Formamide dye mix* (98% formamida, 10 mM EDTA, 0.025% xilen cianol, 0.025% azul de bromofenol) y 0.1  $\mu$ L de bromuro de etidio 0.5 mg/mL).

El gel desnaturalizante de formaldehído se preparó fundiendo 1.2 g de agarosa en 72 mL de agua destilada desionizada estéril, se dejó enfriar hasta aproximadamente 60° C y se añadió 10 mL de MOPS (10X) y 18 mL de formaldehído. La solución anterior se virtió en una cámara para geles previamente lavada con una solución de SDS 1% y agua destilada desionizada estéril caliente.

Se dejó gelificar durante 40 min en una campana de extracción de gases. El buffer de corrida se elaboró con agua destilada desionizada estéril y MOPS 1X, cbp 700mL.

Se cargó cada muestra en el gel de formaldehído, previamente desnaturalizadas a 95° C durante 2 minutos, con una concentración igual entre todas las muestras y se corrió a 70 V durante 1.5 h.

La transferencia del RNA, desde el gel a la membrana de nitrocelulosa (Hybond-N), se realizó por medio de capilaridad utilizando buffer SSC 20X (NaCl 3M, citrato de sodio 0.3M, pH 7.0) como solución de transferencia, durante toda la noche. La membrana se dejó secar en estufa a 60° C durante 20 min y se fijó con luz UV en el transiluminador durante 2 min. La membrana se incubó durante dos horas a 42° C con la solución de prehibridación (formamida 50%, Denhardt (100X: 2% Ficoll 400, 2% polivinilpirrolidona, 2% BSA fracción 5), SSC 5X, SDS 0.2%, fosfato de sodio pH 6.5 10 mM, DNA de esperma de salmón 10 mg/mL desnaturalizado a 95° C durante 10 min y se aforó a 10 mL con agua destilada desionizada estéril).

El marcaje radioactivo del mRNA se realizó siguiendo el protocolo del kit de Invitrogen™ RadPrime DNA Labeling System. Para la hibridación se incubó la sonda marcada radioactivamente durante toda la noche a 42°C y al día siguiente se realizaron lavados para eliminar la sonda y la solución de prehibridación. Dos

lavados de la solución 1 (SSC 2X y SDS 0.1% a 30° C) y dos lavados con la solución 2 (SSC 0.2X y SDS 0.1% a 42° C).

Por último, la membrana se expuso en una pantalla amplificadora para detectar radioactividad durante un día. La membrana se reveló en el Typhoon 9410 GE Healthcare, el cual detecta señales radioactivas.

### **Western blot (Sambrook, 1989)**

La amplificación del epítipo y el *cassette* de resistencia para etiquetar la proteína de interés se realizó por PCR, utilizando *primers* que tienen una sección de entre 35 y 40 pares de bases homólogas río arriba y río abajo de la región carboxi-terminal del gen de interés y con la ayuda del método de la recombinasa lambda-red (Uzzau, 2001) se realizó la recombinación homóloga para introducir al cromosoma la resistencia al antibiótico amplificado y el epítipo.

Para la toma de muestra del Western blot, se incubaron matraces con medio LB y los antibióticos necesarios iniciando el cultivo a una OD<sub>600</sub> de 0.01. Se tomaron volúmenes de muestras de 1 mL si el Western blot era sólo para verificar que la recombinación se realizó adecuadamente y de 5 a 10 mL si se realizaría la cuantificación de proteína por el método de Bradford. El inicio de la toma de muestra se realizó después de alcanzar la OD<sub>600</sub> deseada (aproximadamente 0.4). Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm 5 min a 4° C y se eliminó el sobrenadante. Los paquetes celulares se guardaron en congelación para su tratamiento posterior. Las muestras se resuspendieron con buffer de carga (Tris-base 100 mM, SDS 4%, azul de bromofenol 0.02%, Glicerol 0.2%, β - mercaptoetanol 10%, H<sub>2</sub>O hasta 50 mL) según la OD que presentaron al momento de tomar la muestra. Si las muestras fueron cuantificadas, se agregó solamente la cantidad necesaria para tener una cantidad adecuada de muestra (entre 15-20 µL totales). Antes de cargar los extractos en el gel, estos se desnaturalizaron a 95° C durante 5 min.

Los extractos se cargaron en un gel de acrilamida al 12% y se corrieron con amortiguador SDS-PAGE 1X (10X Tris-base 0.25 M, glicina 1.9 M, SDS 1%, H<sub>2</sub>O hasta 1 L) a 50 V durante media hora y a 100 V hasta observar que el marcador se encontraba en la parte inferior del gel. La transferencia a la membrana de nitrocelulosa se realizó en cámara húmeda con buffer de transferencia 1X frío (10X: Tris-base 0.25 M, glicina 1.9 M, H<sub>2</sub>O hasta 1 L; para buffer de transferencia 1X: 100 mL buffer de transferencia 10X, 200 mL metanol, H<sub>2</sub>O cbp 1L) a 100 V durante una hora en un baño de hielo y agitación del buffer. Después de la transferencia, la membrana se bloqueó con una solución de 20 mL TBS-Tween (5X: Tris-base 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.1%, H<sub>2</sub>O hasta 1L) con 5% de leche en polvo baja en grasa durante toda la noche a 4° C. Se eliminó la solución de bloqueo y después de un lavado rápido con TBS-tween se incubó la membrana con 10 mL de TBS-Tween y 1 µL de anticuerpo primario (Anti-HA o Anti-FLAG<sup>®</sup>), el cual se dejó incubando durante una hora a temperatura ambiente con agitación. Transcurrida la hora, se realizaron tres lavados de 10 mL de solución TBS-Tween durante 10 min cada uno. A continuación se agregó 1 µL del anticuerpo secundario (Anti-ratón) en 10 mL de TBS-Tween y se incubó durante una hora a temperatura ambiente con agitación. Se realizaron lavados de la misma manera que con el anticuerpo primario.

El revelado se realizó en el cuarto oscuro, incubando la membrana con sustrato Immobilon quimioluminiscente de HRP (*horse radish peroxidase*) quimioluminiscentes de la marca Merck Millipore, con exposición en una película Kodak y tiempo dependiente de la quimioluminiscencia que presentaron las muestras.

En algunos geles se cargó también un marcador de peso molecular para proteína pre-teñido (New England Biolabs) para asegurarse que la señal era proveniente de la proteína marcada y no debido a uniones inespecíficas con el anticuerpo.

## Resultados

### Las flotilinas presentan cruces transmembranales; AsIA no.

Actualmente existen herramientas informáticas que permiten predecir si una proteína presenta cruces transmembranales (CT). Uno de ellos es el TOPCONS (<http://topcons.cbr.su.se>), el cual realiza predicciones consenso entre diferentes métodos diseñados para predecir estos cruces usando el modelo Hidden Markov (modelo estadístico) (Bernsel, 2009). Entre los otros modelos que utiliza este programa son: SCAMPI (Bernsel, 2008), OCTOPUS (Viklund, 2008),  $\Delta$ G-scale (Hessa, 2007), ZPRED (Granseth, 2006) y PRO/PRODIV-TMHMM (Viklund, 2004).

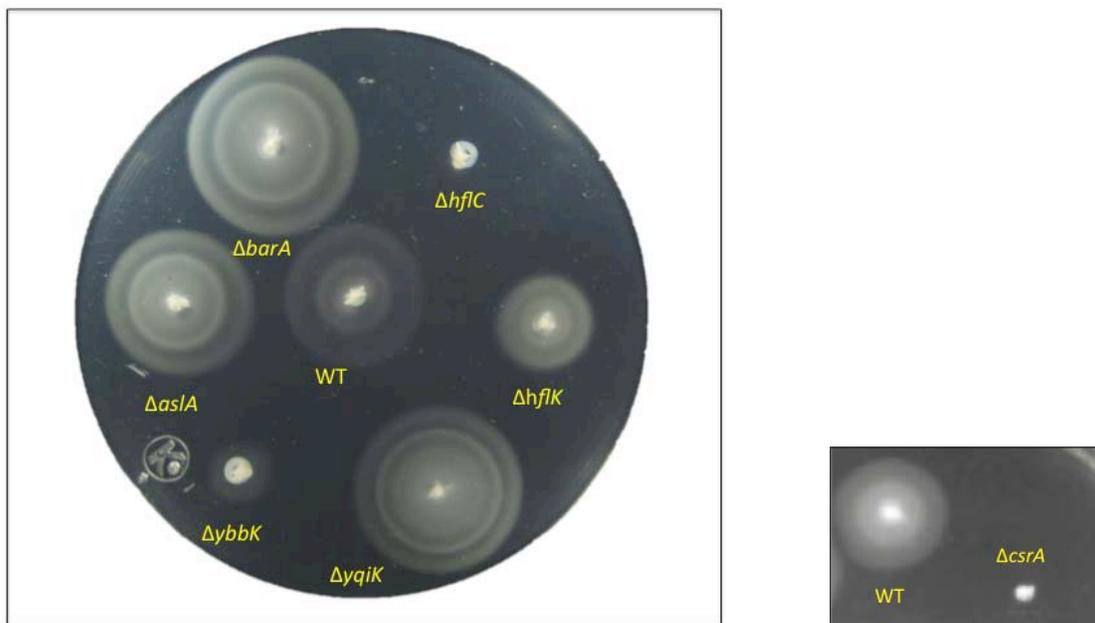
Este programa se utilizó para predecir la localización de las proteínas HflC, HflK, YbbK, YqiK (de ahora en adelante se les llamará flotilinas) y AsIA. El resultado obtenido para todas las flotilinas predice su ubicación en la membrana citoplasmática y presentaron solamente un CT en la región amino terminal; sin embargo, los cruces fueron en diferentes segmentos de aminoácidos (HflC en los aminoácidos 4-25, HflK en los aminoácidos 72-98, YbbK en los aminoácidos 2-23 y YqiK en los aminoácidos 10-31). La proteína AsIA solamente uno de los cinco programas determinó que existe un cruce transmembranal para esta proteína. Para poder comprobar la localización de esta proteína se deberá marcar e identificar por inmuno-detección en qué fracción se encuentra la proteína (en fracción citosólica o de membrana interna).

### Cepas mutantes en las flotilinas y *asIA* tienen afectada su motilidad.

Cepas mutantes en *barA* y *csrA* tienen fenotipos diferentes en motilidad que la cepa WT. Este fenotipo se puede observar mediante la formación de un halo en medio semisólido. Una cepa mutante en *barA* presenta un halo mayor que el de una WT, mientras que la cepa *csrA* no presenta halo. En la figura 7 se muestran

los fenotipos de motilidad que presentaron las mutantes, este fenotipo se puede observar como halos de nado alrededor del punto de inoculación

Para confirmar el efecto observado de un *screening* inicial de mutantes de la colección KEIO, se inocularon 2  $\mu$ L de un cultivo ON de las cepas *yqiK*, *ybbK*, *hflC*, *hflK* y *aslA*, utilizando *barA*, *csrA* y WT como controles. Se observó que las cepas *yqiK* y *aslA* nadan más que la cepa WT y estas presentan un fenotipo similar a *barA*. Las cepas *ybbK*, *hflC* y *hflK* tienen la motilidad significativamente reducida comparando con la cepa WT y es similar al fenotipo que presenta una *csrA*.

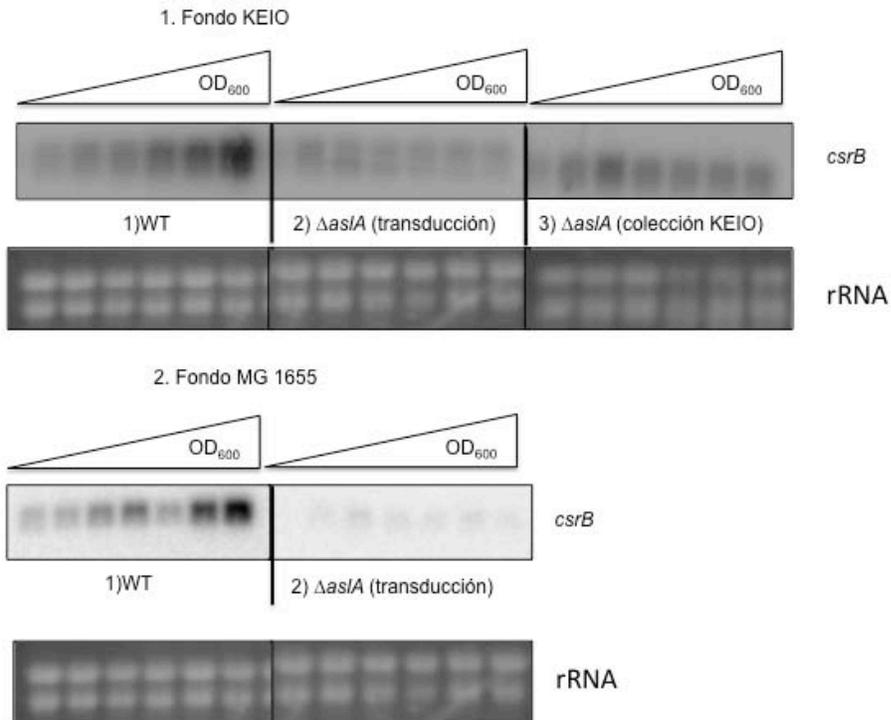


**Figura 7. Ensayo de motilidad de cepas mutantes de la colección KEIO.** Algunas de las mutantes presentaron fenotipos similares a *barA* (nada más que la WT) y otras a *csrA* (no nada).

### **En la cepa mutante de *aslA* la expresión de *csrB* está disminuida.**

Tomando como base los resultados obtenidos en el ensayo de motilidad, se realizaron Northern blots con la cepa de la colección KEIO *aslA* y con las cepas construidas en el laboratorio por transducción con el fago P1 en el fondo K-12 MG1655 y K-12 BW25113 (cepa silvestre de la colección KEIO).

En la Figura 8 se muestra como en una cepa mutante en *asIA* la expresión de *csrB* se encuentra reducida en comparación con la WT. Los resultados son compatibles con las cepas obtenidas por transducción tanto en el fondo MG1655 silvestre (WT) como en la cepa WT de la colección KEIO. La transducción del alelo conteniendo la mutación en *asIA* en el mismo fondo genético silvestre se realizó para descartar la posibilidad de que la cepa proveniente de la colección tuviera mutaciones adicionales que afectaran la expresión de *csrB*. Además, se construyó una cepa  $\Delta asIA$  en fondo MG1655 para asegurarse que el efecto observado es debido a *asIA* e independiente del fondo genético. Esta cepa no presentó diferencias con respecto al fondo genético utilizado.

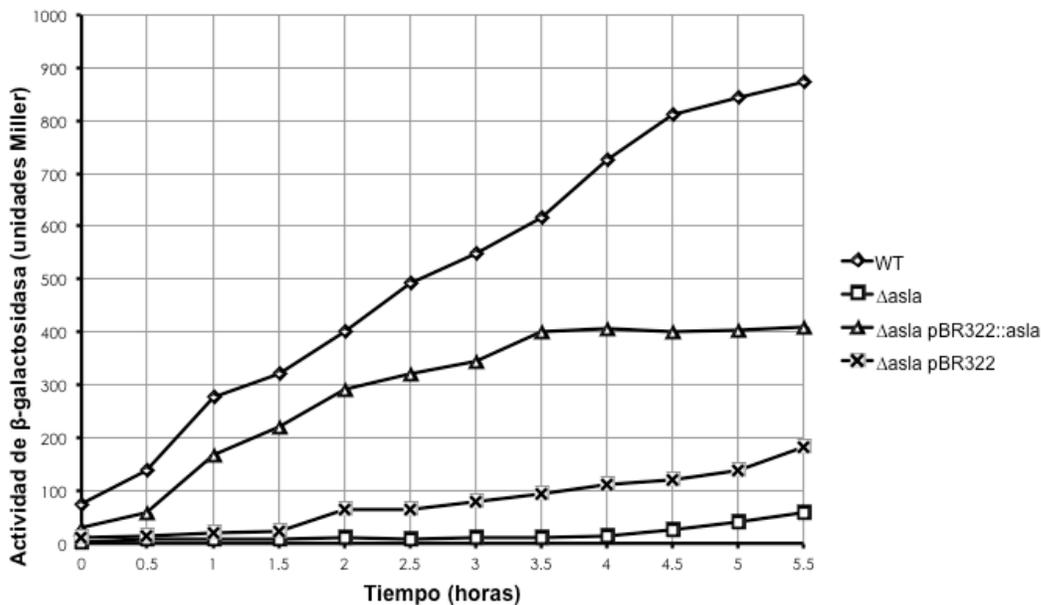


**Figura 8. Northern blot de la expresión de *csrB* en cepas mutantes de *asIA*.** 1. Northern blot de cepas de fondo KEIO; WT (1),  $\Delta asIA$  construida por transducción (2) y  $\Delta asIA$  de la colección KEIO (3). 2. Northern blot de cepas con fondo MG1655; WT (1) y  $\Delta asIA$  construida por transducción (2). En ambas imágenes se puede observar la disminución de la expresión de *csrB* en todas las cepas mutantes a medida que transcurre el tiempo de cultivo (aumento en  $DO_{600}$ ). Se muestran las bandas de RNA ribosomales como control de carga e integridad.

**Al complementar la cepa mutante de *asIA*, la expresión de *csrB* se recupera.**

Para confirmar el efecto observado en el Northern blot, se decidió determinar la expresión de *csrB* mediante la medición de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de una cepa con reportero *csrB-lacZ*.

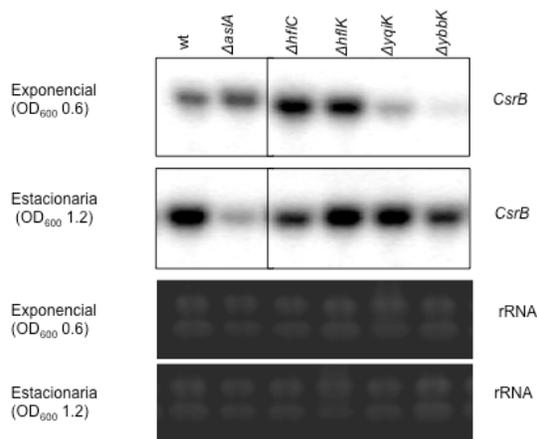
Posterior a la caracterización del crecimiento de las cepas, se realizó la medición de actividad de  $\beta$ -galactosidasa. Como se puede observar en la figura 9 y de acuerdo a lo reportado anteriormente (Chavez, 2010), la expresión de *csrB* aumenta cuando las células entran en fase estacionaria (para la WT ( $\diamond$ ) aproximadamente 2-3 horas posterior a la inoculación); además, confirmando lo observado en el Northern blot (Figura 8), la cepa mutante *asIA* ( $\square$ ) no se observó aumento de la expresión del reportero en el tiempo de duración del experimento. El efecto de la disminución de expresión de *csrB* fue parcialmente revertido mediante la expresión ectópica de *asIA* ( $\Delta$ ). Por el contrario, la cepa con plásmido vacío ( $\times$ ) no fue capaz de revertir el efecto sobre *csrB* en la cepa *asIA*.



**Figura 9. La expresión de *csrB* se restablece al complementar con el plásmido pBR322::*asIA*.**  $\diamond$ , WT;  $\Delta$ ,  $\Delta$ asIA + pBR322::asIA;  $\times$ ,  $\Delta$ asIA + pBR322;  $\square$ ,  $\Delta$ asIA. Todas las cepas anteriores tienen fondo MG1655.

## En la cepas mutantes en flotilinas la expresión de *csrB* se ve afectada.

Para evaluar si las diferencias en la motilidad de las cepas mutantes en flotilinas están asociadas con efecto directo al sistema BarA/UvrY, se realizaron ensayos de Northern blot para identificar el transcrito de *csrB* (Figura 10). Se observó que la expresión de *csrB* en las cepas mutantes *hflC* y *hflK* se ve afectada positivamente, sugiriendo que el sistema BarA/UvrY está activo aún en fase exponencial. Con respecto a *ybbK*, hay una pequeña disminución en *csrB* con respecto a la WT. Por último, la cepa *yqiK* no presentó una diferencia significativa en cuanto a la expresión de *csrB* en comparación de la cepa WT.



**Figura 10. Northern blot para las cepas mutantes en flotilinas y *asA*.** La expresión de *csrB* en *hflC* y *hflK* parece ser constitutiva en estas mutantes. El fenotipo para *yqiK* es similar a la WT y *ybbK* parece ser un poco menor que la WT. Se muestran las bandas de RNA ribosomales como control de carga e integridad.

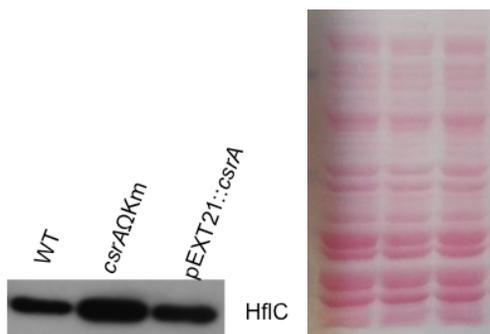
## CsrA regula la expresión de HflC y de YbbK.

Cepas mutantes en las flotilinas y en *asA* tienen un fenotipo de motilidad que se asemejan a lo observado en una cepa mutante *barA* o *csrA* (Figura 7). También, como se detalló anteriormente, pudimos confirmar la relación directa de *AsIA* con el funcionamiento del SDC BarA/UvrY, similar a lo que ocurre con una cepa mutante en *csrA*, en la cual no se expresa *csrB*. Por esto, nos propusimos determinar si existe una relación entre la proteína reguladora CsrA y la expresión de *hflC*, *hflK*, *ybbK* y *yqiK* y *asIA*. Para esto, construimos fusiones cromosómicas

del gen *hflC* con la secuencia codificante para el epítipo HA (hemaglutinina del virus de influenza) y del gen *ybbK* con la secuencia para 3XFLAG<sup>®</sup> (Fusión de 3 tándems de epítipes FLAG<sup>®</sup>) (Uzzau, 2001). Estas fusiones nos permitieron detectar a estas dos flotilinas con anticuerpos comerciales Anti-HA y Anti-Flag, respectivamente. Cabe mencionar que se intentaron construir fusiones similares con los genes que codifican a AslA y YqiK, sin poder obtener una cepa con una fusión detectable por WB.

Para determinar si la expresión de las flotilinas se ven afectadas al interrumpir el gen *csrA*, se tomaron muestras de los cultivos WT, mutante con el gen *csrA* interrumpido ( $\Omega$ ) y la mutante complementada con el plásmido pEXT21::*csrA*. El Western blot se realizó de acuerdo al protocolo descrito en la sección de materiales y métodos. Se cuantificó la proteína para cargar en el gel desnaturizante la misma cantidad de extracto proteico.

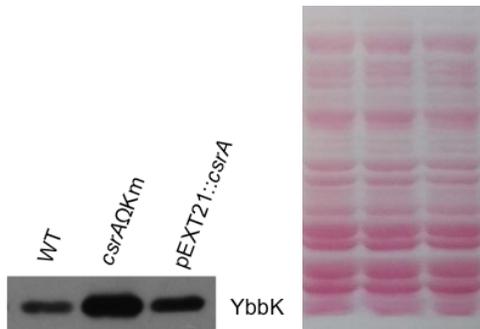
En la Figura 12 se muestran los resultados del Western blot, en donde se observa que los niveles de expresión para HflC se ven aumentados en la cepa mutante.



**Figura 12. Western blot de HflC-HA.** Se observa una mayor cantidad de proteína en la cepa mutante en comparación con la silvestre. Al complementar la mutación, la cantidad de proteína vuelve a ser similar a la de la cepa WT. De lado derecho se muestra el control de carga en la membrana de transferencia teñida con rojo Ponceau.

En la Figura 13 se muestran los resultados del Western blot, en donde se observa que los niveles de expresión para YbbK se ven aumentados en la cepa

mutante y que al complementar el gen la expresión de YbbK se vuelve similar a la WT.



**Figura 13. Western blot de YbbK-3XFLAG.** Se observa una mayor cantidad de proteína en la cepa mutante en comparación con la silvestre y al complementar la mutación, la cantidad de proteína vuelve a ser similar a la WT. De lado derecho se muestra el control de carga en la membrana de transferencia teñida con rojo Ponceau.

Los resultados obtenidos por parte de los estudios de Western blot arrojaron evidencia suficiente para determinar que CsrA regula de manera negativa la expresión de YbbK y de HflC. La expresión de estas proteínas se ve aumentada al momento de expresarse en una cepa mutante en *csrA* y la expresión se restaura a su forma silvestre al complementarla con el plásmido pEXT21::*csrA*.

La expresión de ambas proteínas se vio afectada de igual manera tanto en fase exponencial como en fase estacionaria (solamente se muestran los resultados de la fase estacionaria). Aunado a estos resultados, un fenotipo típico de las cepas mutantes *csrA* es la formación de aglomerados de células en una fase estacionaria tardía, ocasionados por la mutación, ya que CsrA regula negativamente la expresión de genes involucrados en la formación de biopelículas. Por lo tanto, al interrumpir *csrA* la expresión de estos genes no se controla y ocasiona que las bacterias se aglomeren; además, esta mutación ocasiona que la cepa crezca más lento en comparación de la cepa WT. La complementación de

esta mutante, restaura todas las características de la cepa WT, evitando la formación de aglomerados celulares y aumentando la velocidad de crecimiento.

El etiquetado de la proteína HflK no se realizó, debido a que como este gen se encuentra en el mismo operón que *hflC*, y está reportado que estas proteínas actúan formando heterodímeros, se espera que los resultados obtenidos para HflC pueden sugerir que ocurra el mismo efecto negativo sobre HflK.

Por último, no se logró etiquetar las proteína YqiK y AslA con ningún epítoto disponible en el laboratorio. Se intentó el etiquetado con HA, 3XFLAG<sup>®</sup>, 6XHis (cola de 6 histidinas) y mCherry; sin embargo, en ninguno de los experimentos realizados se obtuvo una señal al momento de realizar el Western blot.

## Discusión

El sistema BarA/UvrY, junto con el sistema Csr de *E. coli*, regulan la expresión de una gran cantidad de genes que afectan funciones fisiológicas de las células como son motilidad, formación de biopelículas, metabolismo central y expresión de factores de virulencia. Los componentes centrales de estos sistemas forman un circuito autoregulatorio (Figura 4) que tiene por objetivo modular la actividad del sistema en su conjunto. Así, la actividad de BarA antagoniza la acción de CsrA (a través de UvrY, CsrB y CsrC), mientras que CsrA es necesaria para la activación de BarA (aún en presencia del estímulo específico). Con la finalidad de identificar factores que medien la acción de CsrA sobre la actividad de la CS BarA, se realizó en el laboratorio un *screening* de mutantes de *E. coli* en todos los genes no esenciales, identificando mutantes con fenotipos de motilidad afectada, tal como se observa en cepas mutantes en *barA* o *csrA*. Así, se identificaron los genes que codifican para HflC, HflK, YbbK y YqiK (flotilinas de *E. coli*, homólogas a proteínas eucariotas asociadas a balsas lipídicas) así como también el gen que codifica para una probable aril sulfatasa (AsIA).

Este trabajo tuvo como principal objetivo confirmar los fenotipos de motilidad observados en el *screening* inicial de una cepa mutante en *asIA*, así como también en cepas mutantes en las flotilinas. Además, se intentó relacionar estos fenotipos con la actividad del sistema BarA/UvrY en todas estas mutantes, reflejado por la expresión de CsrB.

Pudimos observar que en la mutante *asIA*, el fenotipo de nado es similar al que presenta la mutante *barA* (Figura 7). Posteriormente, el análisis de la expresión de *csrB*, tanto por Northern blot como por ensayos de  $\beta$ -galactosidasa en cepas con reportero *csrB-lacZ*, reflejó que la expresión de este se ve disminuido en las mutantes en *asIA*, independientemente del fondo genético utilizado (Figura 8). Estos resultados sugieren que la presencia de AsIA afecta la expresión de *csrB*, probablemente a nivel de la activación de BarA, y por lo tanto afecta la actividad de CsrA. Tomando en cuenta que una cepa mutante en *csrA*

nada menos que una silvestre, y que la presencia de *csrB* disminuye la actividad de CsrA, al momento de tener una mutación que afecte negativamente la expresión de *csrB*, habrá una mayor cantidad de CsrA, la cual está involucrada en la activación de la expresión de genes relacionados con la síntesis de flagelos y con la motilidad de la célula. Por lo tanto, esto explica el fenotipo de nado mayor al de una cepa WT.

Las mutantes de flotilinas presentaron fenotipos de motilidad y expresión de *csrB* diversos (Figura 7 y 9, respectivamente). Pudimos observar que la motilidad de las cepas *hflC* y *hflK* puede explicarse con una mayor y más temprana expresión de *csrB* en estas mutantes. Una cepa que exprese una mayor cantidad de *csrB* tendrá un efecto negativo directo sobre la actividad de CsrA, y por lo tanto su movilidad se verá disminuida. Por su parte, una cepa mutante en *yqiK* no exhibe un cambio significativo en la expresión de *csrB* en comparación con una cepa silvestre y tampoco tiene afectada su movilidad. En cambio, la motilidad reducida de una mutante en *ybbK*, no puede explicarse mediante un cambio en la expresión de *csrB* y por lo tanto en la actividad de BarA/UvrY.

Finalmente, se intentó determinar la relación entre CsrA y la expresión de las flotilinas y de AsIA, mediante la construcción de fusiones cromosomales de estos genes con epítopes detectables mediante Western blot. Desafortunadamente, no se logró obtener dichas fusiones con los genes *asIA* y *yqiK*. Sin embargo, al utilizar estas fusiones con *ybbK* y *hflC* nos permitieron determinar que el regulador global CsrA regula de manera negativa la expresión de ambas flotilinas, dejando abierta la posibilidad de que estas proteínas representen alguno de los intermediarios no identificados en el circuito autoregulatorio CsrA-BarA-UvrY-CsrB/C.

## Conclusiones

1. La proteína AsIA regula positivamente la expresión de CsrB.
2. La expresión de CsrB en la mutante *asIA* está disminuida y esto afecta la movilidad de la cepa.
3. La expresión de CsrB en las mutantes *hflC* y *hflK* está aumentada, la cepa *yqiK* no presentó un cambio significativo y la cepa *ybbK* presentó una ligera disminución en la expresión.
4. CsrA regula negativamente la expresión de HflC (probablemente la de HflK también).
5. CsrA regula negativamente la expresión de YbbK.

## Referencias

1. Adachi, T., Murooka, Y., Harada, T. (1975). Regulation of arylsulfatase synthesis by sulfur compounds in *Klebsiella aerogenes*. J Bacteriol, 121 (1), 29 –35.
2. Altier, C., Suyemoto, M., Ruiz, A., Burnham, K., Maurer, R. (2002). Characterization of two novel regulatory genes affecting *Salmonella* invasion gene expression. Mol Microbiol, 35 (3), 635-646.
3. Anderson, RG., Jacobson, K. (2002). A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. Science, 296 (5574), 1821-1825.
4. Baba, T., Ara, Takeshi, Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, KA., Tomita, M., Wanner, BL., Mori, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The KEIO collection. Mol Syst Biol, 2, 2006-2008.
5. Babuke, T., Tikkanen, R. (2007). Dissecting the molecular function of reggie/flotillin proteins. Eur J Cell Biol, 86 (9), 525-532.
6. Bach, JN. and Bramkamp, M. (2013). Flotillins functionally organize the bacterial membrane. Mol Microbiol, 88 (6), 1205-1217.
7. Baht, 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 (9), 3552-3568.
8. 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-Delgarno sequence. J Bacteriol, 189 (189), 5472-5481.
9. Bernsel, A., Viklund, H., Falk, J., Lindahl, E., von Heijne, G., Elofsson, A. (2008). Prediction of membrane-protein topology from first principles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105 (20), 7177-7181.

10. Bernsel, A., Viklund, H., Hennerdal, A., Elofsson, A. (2009). TOPCONS: consensus prediction of membrane protein topology. *Nucleic Acid Res*, 37 (Web Server Issue), W465-468.
11. Birnboim, H. C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7 (6), 1513-1523
12. Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach M.C., Heyneker H.L., Boyer, H.W., Crosa J.H., Falkow S. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2:95–113.
13. Camacho, M.I., Alvarez, A.F., Gonzalez, R., Romeo, T., Merino, E., Georgellis, D. (2015). Effects of the Global Regulator CsrA on the BarA/UvrY Two-Component Signaling System. *J Bacteriol*, 197 (5), 983-991.
14. Chavez, R.G., Alvarez, A.F., Romeo, T., Georgellis, D. (2010). The physiological stimulus for the BarA sensor kinase. *J Bacteriol*, 192 (7), 2009-2012.
15. Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., Deléage, G. (2000). NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci*, 25 (3), 147-150.
16. Das, S., Singh, S., McClelland, M., Forst, S., Gyaneshwar, P. (2013). Characterization of an acid-inducible sulfatase in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *Appl Environ Microbiol*, 79 (6). 2092-2095.
17. Datsenko, K.A., Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 (12), 6640-6645.
18. Donovan, C., Bramkamp, M. (2009). Characterization and subcellular localization of a bacterial flotillin homologue. *Microbiology*, 155 (Pt 6), 1768-1799.
19. Doherty, D.J., McMahon, H.T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem*, 78, 857-902.
20. Dubey, A.K., Baker, C., Romeo, T., Babitzke, P. (2005). RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA-RNA interaction. *RNA*, 11 (10), 1579-1587.

21. Ehrh, S., Schnappinger, D. (2003). Isolation of plasmid from *E. coli* by alkaline lysis. In: Casali, N. and Preston, A. eds. *Methods in Molecular Biology*. Totowa: Human Press, 75-78.
22. 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 Plant Microbe Interact*, 11 (8), 743-752.
23. Fitzgerald, J., Milazzo, F. (1970). Arylsulfatase multiplicity in *Proteus rettgeri*. *Can J Microbiol*, 16 (11), 1109 –1115.
24. Gaffney, T., Lam, S., Ligon, J., Gates, K., Frazelle, A., Maio, JD. (1994). Global regulation of expression of antifungal factors by *Pseudomonas fluorescens* biological control strain. *Mol Plant Microbe Interact*, 7 (4), 455-463.
25. Gao, R., Stock A. (2009). Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiology*, 63, 133-154.
26. Georgellis D., Arvidson, S., 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 (16), 5382-5390.
27. Granseth, E., Viklund, H., Elofsson, A. (2006). ZPRED: Predicting the distance to the membrane center for residues in alpha-helical membrane proteins. *Bioinformatics*, 22 (14), e191-196.
28. Guyer, MS., Reed, RR., Steitz, JA., Low, K.B. (1981). Identification of a sex-factor-affinity site in *E. coli* as gamma delta. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 45 (Pt. 1), 135-140.
29. Henderson, MJ., Milazzo, FH. (1979). Arylsulfatase in *Salmonella typhimurium*: detection and influence of carbon source and tyramine on its synthesis. *J Bacteriol*, 139(1)80–87.
30. Hessa, T., Meindl-Beinker, N., Bernsel, A., Kim, J., Sato, Y., Lerch, M., Lundin, C., Nilsson, I., White SH., von Heijne G. (2007) Molecular code for transmembrane-helix recognition by the Sec61 translocon.. *Nature* 450 (7172), 1026-1030.

31. Hoffman, JA., Badger, JL., Zhang, Y., Huang, SH., Sik Kim, KS. (2000). *Escherichia coli* K1 *aslA* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cell in vitro and in vivo. *Infect Immun*, 68 (9), 5062-5067.
32. 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 (2), 524-540.
33. Klein, P., Kanehisa, M., DeLisi, C. (1985). The detection and classification of membrane-spanning proteins. *Biochim. Biophys Acta*, 815(3), 468–476.
34. Letunic, I., Copley, RR., Schmidt, S., Ciccarelli, FD., Doerks. T., Schultz, J, Ponting, CP., Bork, P. (2004). SMART 4.0: towards genomic data integration. *Nucleic Acids Res*, 32 (Database issue), 142–44.
35. López, D., and Kolter R. (2010). Functional microdomains in bacterial membranes. *Genes Dev*, 24 (17), 1893-18902.
36. Meile, JC., Wu, LJ., Ehrlich, SD., Errington, J., Noirit, P. (2006). Systematic localisation of proteins fused to the Green fluorescent protein in *Bacillus subtilis*: identification of new proteins at the DNA replication Factory. *Proteomics*, 6 (7), 2135-2136.
37. Miller, JH. (1972).  $\beta$ -Galactosidase Assay. In: JH Miller ed. *Experiments in molecular genetics*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 352–355.
38. Mondragon, 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 (23), 8303-8306.
39. Moons, P., Michiels, CW., Aertsen, A. (2009). Bacterial interactions in biofilms. *Crit Rev Microbiol*, 35 (3) 157-168.
40. Moore, SD. (2011). Assembling New *Escherichia coli* Strains by Transduction Using Phage P1 En: Williams J ed. *Strain Engineering: Methods and Protocols*. New England: Humana Press, Cap. 10.
41. Munderloh, C., Solis, GP., Bodrikov, V., Jaeger, FA., Wiechers, M., Málaga-Trillo, E. and Stuermer, CA. (2009), Reggies/flotillins regulate retinal axons

- regeneration in the zebrafish optic nerve and differentiation of hippocampal and N2a neurons. *J Neurosci*, 29 (20), 6607-66-15.
42. Murooka, Y., Yim, M.H., Harada, T. (1980). Formation and purification of *Serratia marcescens* arylsulfatase. *Appl Environ Microbiol* 39 (4)812– 817.
43. Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng*, 10(1)1–6.
44. Otto, G.P., Nichols, B.J. (2011). The roles of flotillins microdomains—endocytosis and beyond. *J Cell Sci*, 124 (Pt 23), 3933-3940.
45. Pernestig, A., 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 Gluconeogenic Carbon Sources. *J Bacteriol*, 185 (3), 843-853.
46. Rivera-Milla, E., Stuermer, C.A., Málaga-Trillo, E. (2006). Ancient origin of reggie (flotillin), reggie-like, and other lipid-raft proteins: convergent evolution of the SPFH domain. *Cell Mol Life Sci*, 63 (3), 343-357.
47. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3d ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
48. Schulte, T., Paschke, K.A., Laessing, U., Lottspeich, F. and Stuermer, C.A. (1997). Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration. *Development*, 124 (2), 577-587.
49. Singer, S.J., Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175 (4023), 720-731.
50. Simons, K., Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387 (6633), 569-572.
51. Slaughter, N., Laux, I., Tu, X., Whitelegge, J., Zhu, X., Effros, R., Bickel, P., Nel, A. (2003). The flotillins are integral membrane proteins in lipid rafts that contain TCR-associated signaling components: implications for T-cell activation. *Clin Immunol*, 108 (2), 138-151.

52. Solomon, S., Masilamani, M., Rajendran, L., Bastmeyer, M., Stuermer, CA., Illges, H. (2002). The lipid raft microdomain-associated protein Reggie-1/flotillin-2 is expressed in human B cells and localized at the plasma membrane and centrosome in PBMCs. *Immunobiology*, 205 (1), 108-119.
53. Suzuki, K., Wang, X., Weilbacher, T., Pernestig, A., 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 (18), 5130-5140.
54. 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 (11), 425-427.
55. Timmermans, J., Van Melderen, L. (2010). Post-transcriptional global regulation by CsrA in bacteria. *Cell Mol Life Sci*, 67 (17), 2897-2908.
56. Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S., Bossi, L. (2001). Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (26), 15264–15269.
57. Viklund, H., Elofsson, A. (2004). Best alpha-helical transmembrane protein topology predictions are achieved using hidden Markov models and evolutionary information. *Protein Sci*, 13 (7), 1908-1917.
58. Viklund, H., Elofsson, A. (2008). OCTOPUS: improving topology prediction by two-track ANN-based preference scores and an extended topological grammar. *Bioinformatics*, 24 (15), 1662-1668.
59. Waters, CM., Bassler BL. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21, 319-346.
60. 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 (12), 5854-5861.
61. 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 (6), 1632-1640.

62. 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 (1), 245-256.