



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EFFECTO DEL REGULADOR GLOBAL CSRA SOBRE EL SISTEMA DE DOS-
COMPONENTES BARA/UVRY**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

MARTHA IRAIS CAMACHO HERNANDEZ

TUTOR PRINCIPAL

DR. DIMITRIOS GEORGELLIS
Instituto de Fisiología Celular

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. SOLEDAD FUNES ARGUELLO
Instituto de Fisiología Celular

DR. ENRIQUE MERINO PÉREZ
Instituto de Biotecnología, UNAM

MÉXICO, D. F. diciembre, 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.

Reconocimientos

Esta tesis de doctorado se realizó bajo la dirección del Dr. Dimitrios Georgellis en el laboratorio 226-Northe, 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 Argüello	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Enrique Merino Pérez	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. Dimitrios Georgellis	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

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

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

Se reconoce el apoyo de la Sra. Verónica Montes Trujillo auxiliar del laboratorio 226N.

Durante los estudios de doctorado la que suscribe, M. en C. Martha Iraís Camacho Hernández (matrícula 509021579), contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (Número de becario 226066) para la elaboración del presente trabajo. Este trabajo fue financiado por los proyectos: “*Bacterial plasma membrane microdomains: Control of two component system signaling and beyond*” CONACYT 178033 y “*Control of microbial gene expression by extra-cellular stimuli*” de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (PAPIIT-UNAM) IN209215.

Martha Iraís Camacho Hernández agradece al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el financiamiento económico para realizar una estancia de investigación en el laboratorio del Dr. Tony Romeo en la Universidad de Florida, Estados Unidos y para asistencia a Congresos.

El jurado de examen de doctorado estuvo conformado por:

Presidente	Dr. José Luis Puente García	Instituto de Biotecnología, UNAM
Secretario	Dra. Hermina Loza Tavera	Conjunto E, Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Bertha González Pedrajo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Otto Geiger	Centro de Ciencias Genómicas, UNAM
Vocal	Dr. Ismael Hernández Lucas	Instituto de Biotecnología, UNAM

Agradecimientos

Agradezco mucho al Dr. Dimitris Georgellis. En primer lugar, por aceptar ser mi tutor tanto de maestría como de doctorado y en segundo lugar, por todo su asesoramiento y guía para concluir satisfactoriamente mis estudios. Me falta mucho por aprender y aún el camino es largo, pero estos años bajo su constante asesoría me han dado la confianza para seguir en el área de la investigación. Me siento muy orgullosa de haber trabajado en un excelente laboratorio.

El haber hecho una maestría y un doctorado, no hubiera sido posible sin el impulso inicial de mi tutor de licenciatura en la Universidad Autónoma Metropolitana, el Dr. Octavio Loera Corral, recuerdo mucho mi proyecto de licenciatura, los seminarios, el apoyo para tomar varios cursos y también la oportunidad de participar en mi primer congreso, muchas gracias.

Al Dr. Adrián F. Álvarez por la asesoría y paciencia brindada a lo largo de estos años. A la M. en C. Claudia Rodríguez Rangel por todo su apoyo. A todos los miembros del laboratorio 226 -Norte: Brenda, Carlos, Diego, Eder, Enrique, Fernanda, Gerard, Gris, Hortencia, Luis, Mariana, Oscar, Quique, Ricardo... por todos los momentos compartidos.

Creo que no me alcanzaría para agradecer a todas las personas que he conocido y que simplemente me han que rido y he que rido, mis amigos un gran tesoro!! Desde la universidad: Donají López, Diania Lisbeth, Elida Amaya. En el posgrado a mis queridos amigos: Gris Salas, Diego Oronia, Eugenio del Valle, Paco Carmona y muchos más que no me alcanzaría a nombrarlos a todos!!

Pero también una parte fundamental para mí y que siempre han estado conmigo en todo momento apoyándome, son mi familia. Eso es lo más valioso que tengo y que tendré y no me alcanzan palabras para expresar todo mi agradecimiento y amor que les tengo. Mi abuelos, mis papás y mis hermanos son los mejores, gracias por formar parte mí.

Tabla de contenido

Reconocimientos.....	i
Agradecimientos	ii
Tabla de contenido	iii
Resumen.....	vi
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tablas	viii
Capítulo 1. Introducción	1
1. Sistemas de dos-componentes bacterianos.....	1
1.1 Sistemas de dos-componentes bacterianos y eucarióticos.....	1
1.2 Función y arquitectura	2
1.2.1 Histidina cinasas.....	3
1.2.2 Reguladores de respuesta	4
1.3 Mecanismo de acción.....	5
1.4 Especificidad de los sistemas de dos-componentes.....	6
1.4.1 Actividad fosfatasa de las histidina cinasas bifuncionales.....	6
1.4.2 Competición de los reguladores de respuesta.....	7
1.5 Integración de los sistemas de dos-componentes con otras vías de señalización	7
2. Circuito regulatorio BarA-UvrY-CsrA	8
2.1 La proteína CsrA y sus homólogos.....	9
2.1.1 Mecanismo de acción	10
2.1.2 Regulación de la expresión y la actividad de CsrA.....	10
2.2 Los RNAs pequeños no-codificantes CsrB/CsrC y sus homólogos	11
2.2.1 Regulación de la expresión de CsrB y CsrC	11
2.2.2 Expresión diferencial entre los sRNAs redundantes	12
2.2.3 Regulación de la estabilidad de CsrB y CsrC: CsrD y sus homólogos	12

2.3 El sistema de dos-componentes BarA-UvrY y sus homólogos	13
2.3.1 Mecanismo de acción	14
2.3.2 Regulación de la expresión de <i>barA</i> y <i>uvrY</i>	14
2.3.3 Regulación de la actividad del sistema BarA-UvrY	15
2.3.4 Regulación de la actividad del sistema GacS-GacA	15
Capítulo 2. Planteamiento	16
1. Antecedentes	16
2. Hipótesis	17
3. Objetivo general	17
4. Objetivos particulares	17
Capítulo 3. Metodología	18
1. Condiciones de cultivo, cepas y plásmidos	18
2. Extracción de RNA y Northern blot	19
3. Ensayo de actividad β -galactosidasa	20
4. Análisis de Western blot	20
Capítulo 4. Resultados y discusión	21
1. El acetato y formato son incapaces de activar a BarA en una mutante <i>csrA</i>	21
2. CsrA se necesita para la correcta expresión de UvrY	23
3. La sobreexpresión de UvrY, pero no la simultánea con BarA restaura la transcripción de CsrB en la mutante <i>csrA</i>	25
4. CsrA se requiere para la función de la actividad cinasa de BarA	27
5. Datos no publicados	31
Capítulo 5. Conclusiones	34
Capítulo 6. Perspectivas	35
Capítulo 7. Referencias	36
Apéndice A. Sistemas de Dos-Componentes en <i>Escherichia coli</i>	50
Apéndice B. Efecto de CsrA sobre el metabolismo y la fisiología de diferentes especies bacterianas	53

Apéndice C. Homólogos del circuito BarA-UvrY-CsrA	54
Apéndice D. Listas de cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	55
Apéndice E. Currículum Vitae.....	58

Resumen

La cinasa sensora hibrida BarA y su regulador de respuesta cognado UvrY, miembros del sistema de transducción de señales de dos-componentes, activan la transcripción de los RNAs no-codificantes CsrB y CsrC. Estos dos RNAs pequeños actúan secuestrando a la proteína de regulación global CsrA, la cual regula post-transcripcionalmente la traducción y/o estabilidad de mRNAs blanco. En este trabajo, evidenciamos que CsrA afecta positivamente, aunque indirectamente, la expresión de *uvrY*, tanto a nivel transcripcional como traduccional. También demostramos que CsrA se requiere para la apropiada activación de BarA como cinasa y como fosfatasa. Por lo tanto se expone la existencia de un mecanismo autoregulatorio que involucra a los sistemas regulatorios globales Csr y BarA/UvrY.

Lista de Figuras

Figura 1. Modelo prototípico del sistema de dos-componentes.....	2
Figura 2. Arquitectura prototípica de las HC.....	3
Figura 3. Modelo del circuito regulatorio BarA-UvrY-CsrA.	8
Figura 4. Efecto de <i>csrA</i> y <i>uvrY</i> sobre la transcripción de <i>csrB</i>	16
Figura 5. CsrA no afecta la síntesis del estímulo de BarA	22
Figura 6. CsrA se necesita para la correcta expresión de <i>uvrY</i>	24
Figura 7. El acetil-P, pero no BarA, es el responsable de la fosforilación de UvrY en la mutante <i>csrA</i>	26, 27
Figura 8. La expresión de <i>uvrY</i> independiente del control de CsrA, no es suficiente para la activación de la transcripción de <i>csrB</i> en una mutante <i>csrA</i>	28
Figura 9. Efecto de CsrA sobre la actividad de BarA.....	30
Figura 10. Efecto de mutantes relacionadas con balsas lipídicas sobre la expresión de <i>csrB</i>	32
Figura 11. Modelo para el circuito regulatorio BarA-UvrY-CsrA	34

Lista de Tablas

Tabla 1. SDC en el organismo modelo <i>E. coli</i>	50
Tabla 2. Ejemplos de transcritos blanco regulados directamente por CsrA en diferentes especies bacterianas.	53
Tabla 3. Homólogos del circuito regulatorio BarA-UvrY-CsrA de <i>E. coli</i>	54
Tabla 4. Lista de cepas.....	55
Tabla 5. Lista de plásmidos	56
Tabla 6. Lista de oligonucleótidos	57

Capítulo 1. Introducción

1. *Sistemas de dos-componentes bacterianos*

La percepción y el procesamiento de las señales ambientales, son procesos vitales para el crecimiento y la sobrevivencia de los organismos. Parte del éxito evolutivo de los procariontes se debe a que han generado una gran variedad de estrategias de señalización, que les han permitido adaptarse y colonizar nichos ambientales que pueden ser inaccesibles para la mayoría de los otros organismos. Una de las principales vías de señalización con las que cuentan los procariontes son los “sistemas de dos-componentes”. Estos sistemas efectúan una respuesta fisiológica apropiada frente a determinados estímulos ambientales, a través de reacciones de fosfotransferencia entre una “histidina cinasa”, anclada a la membrana y un “regulador de respuesta” en el citosol. A continuación se describen las generalidades de los sistemas de dos-componentes bacterianos, su arquitectura, mecanismo de acción, implicaciones fisiológicas, etc., tomando como referencia los estudios realizados en la bacteria modelo *Escherichia coli*.

1.1 *Sistemas de dos-componentes bacterianos y eucarióticos*

Tanto en eucariontes como en procariontes, la fosforilación de proteínas es la modificación covalente más común, usada como mecanismo de transducción de señales [Cohen, 2002]. Este proceso está catalizado por proteínas cinasas, las cuales con base en los residuos de aminoácidos que fosforilan se han clasificado en tres grupos principales: i) serina/treonina cinasas, ii) tirosina cinasas e iii) histidina cinasas [Kuriyan y Eisenberg, 2007]. Mientras que en los eucariontes, los primeros dos grupos de proteínas son los más usados en los sistemas de señalización, en los procariontes, las más importantes son las histidina cinasas (HC) [Alex y Simon, 1994]. Estas constituyen junto con la proteína llamada reguladora de la respuesta (RR), los sistemas de dos-componentes (SDC).

Aunque los SDC son la principal estrategia de señalización bacteriana, también están presentes en algunas arqueas [Ashby, 2006] y en unos pocos eucariontes. En las arqueas, están pobremente estudiados y en la mayoría de los casos no se les ha asignado un nombre funcional. Respecto a los eucariontes, a pesar de que no se han identificado en animales, se han encontrado en los microorganismos *Saccharomyces cerevisiae* [Maeda y col., 1994; Ota y Varshavsky, 1993], *Candida albicans* [Alex y col., 1998], *Neurospora crassa* [Alex y col., 1996], *Aspergillus nidulans* [Alex y col., 1998], *Dictyostelium discoideum* [Schuster y col., 1996], y en las plantas *Arabidopsis thaliana* [Chang y col., 1993] y *Lycopersicon esculentum* (tomate) [Wilkinson y col., 1995]. Existen varias características que diferencian a los SDC procarióticos de los eucarióticos.

En *E. coli* a excepción de CheA y NtrB, las 28 HCs restantes están ancladas a la membrana interna celular, mientras que en los eucariontes, a excepción de Sln1 de *N. crassa*, se encuentran en el citoplasma. Además, en los procariontes son poco frecuentes las HC de arquitectura híbrida (sección 1.2.1), mientras que en los eucariontes la mayoría presenta este tipo de arquitectura, la única excepción conocida es ERS de *A. thaliana* [Hua y col., 1995]. Los RR procarióticos funcionan como factores transcripcionales (en *E. coli* al menos 25 de 32), en los eucariontes solo SKN7 de *S. cerevisiae* presenta un dominio de unión a DNA [Brown y col., 1993]; es decir, en eucariontes otras proteínas son las encargadas de efectuar la regulación de la expresión genética.

1.2 Función y arquitectura

Las HC funcionan como sensor del ambiente celular, que en presencia de un estímulo específico se autofosforila de manera dependiente de ATP en un residuo His. Posteriormente, el grupo fosforilo se transfiere a un residuo Asp conservado en el RR. El RR fosforilado comúnmente funciona como factor transcripcional, regulando la expresión genética [Stock y col., 2000] (Figura 1). La actividad de los SDC depende de las fluctuaciones de l estímulo, así como de la actividad fosfatasa [Aiba y col., 1989] y autofosfatasa [Hess y col., 1988] de algunas HC bifuncionales. Similar a la mayoría de las vías de señalización, los SDC tienen una arquitectura modular, lo que les proporciona versatilidad ante necesidades regulatorias específicas y capacidad de integración en otros sistemas de señalización.

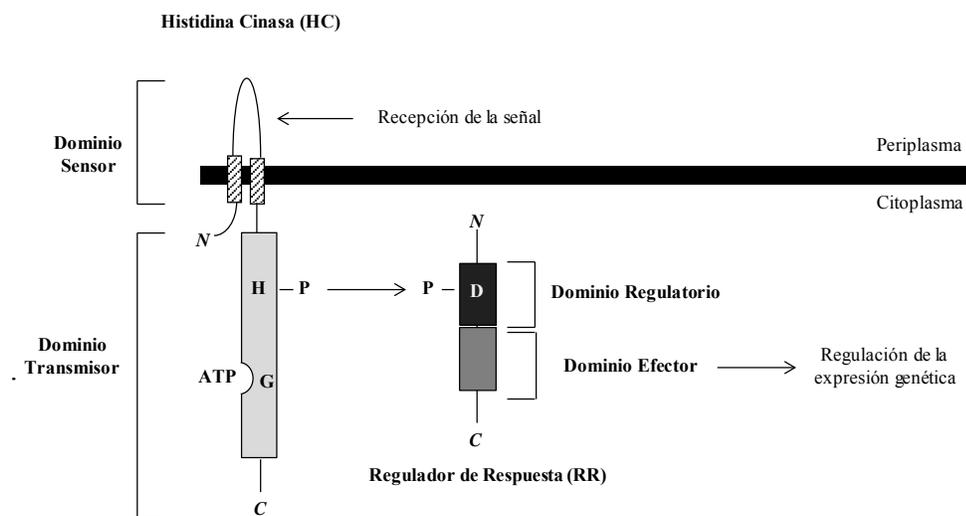


Figura 1. Modelo prototípico del sistema de dos-componentes. La histidina cinasa (HC) es una proteína transmembranal, que contiene en su extremo N-terminal un dominio sensor y en su extremo C-terminal un dominio transmisor, con un residuo de histidina (H) conservado. La proteína reguladora de la respuesta (RR), contiene en su extremo N-terminal un dominio regulatorio con un residuo de aspartato (D) conservado, seguido de un dominio efector con sitios de unión a DNA. En presencia de l estímulo ambiental específico, la HC sufre cambios conformacionales que le permiten su autofosforilación dependiente de ATP en el residuo H. Posteriormente el grupo fosforilo se transfiere al residuo D del RR, para activarse y funcionar como factor transcripcional. G representa el sitio de unión de ATP.

1.2.1 Histidina cinasas

Las HC constituyen una familia de proteínas cinasas altamente diversificadas. Su naturaleza modular ha dado lugar a la creación de elegantes sistemas de transducción de señales, a partir de la combinación de dominios sensores, catalíticos y auxiliares [Georgellis y col., 1997, 1999]. Las HC frecuentemente funcionan como proteínas transmembranales homodiméricas [Surette y col., 1996], que contienen en su extremo N-terminal un *dominio sensor* (localizado generalmente en la región periplásmica), y en su extremo C-terminal un *dominio transmisor* con un centro de cinasa conservado (localizado en el citoplasma) (Figura 2) [Dutta y col., 1999]. Sin embargo, no todas las HC son proteínas transmembranales, por ejemplo, las HC CheA y NtrB de *E. coli* (involucradas en la quimiotaxis y en la regulación del nitrógeno, respectivamente) son proteínas solubles, que están reguladas por estímulos intracelulares y/o por la interacción con dominios citoplasmáticos de otras proteínas (apéndice A).

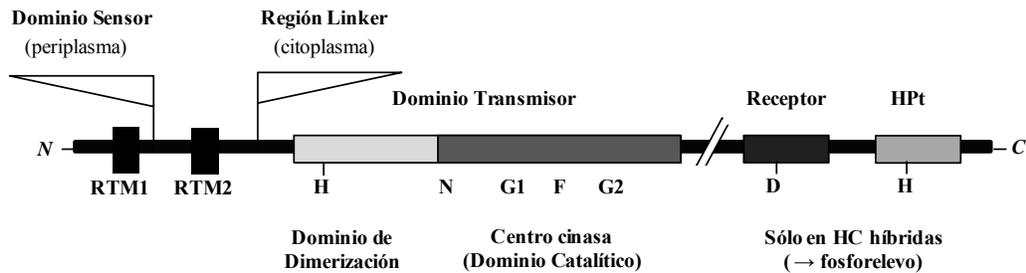


Figura 2. Arquitectura prototípica de las HC. La histidina cinasa (HC) es proteína transmembranal, que contiene en su extremo N-terminal un dominio sensor (que generalmente funciona como sitio de recepción de la señal), seguido de un dominio transmisor que contiene un dominio de dimerización con un residuo H fosforilable y un centro cinasa con las cajas N, G1, F y G2 conservadas, en donde se localiza el sitio de unión a ATP. Las HC híbridas poseen dos dominios adicionales, el dominio receptor con un residuo D conservado y el dominio Hpt con un residuo H conservado, los cuales están involucrados en las reacciones de fosforelevo.

El *dominio sensor* es el encargado de detectar el estímulo. Cuenta con secuencias primarias muy poco conservadas, pues está diseñado para interactuar con ligandos específicos. Estructuralmente se pueden clasificar en: i) con plegamientos α/β (dominios PDC), ii) con plegamientos α y iii) con plegamientos similares a los de las proteínas de unión periplásmicas. El término “dominio PDC” se ha dado a la clase de dominios sensores con estructura α/β , en referencia a las iniciales de tres dominios sensores extracelulares de *E. coli*, PhoQ [Cheung y col., 2008], DcuS [Cheung y Hendrickson, 2008] y CitA [Reinelt y col., 2003], de los cuales se determinaron sus estructuras previamente. Los dominios sensores PDC son los más prevalentes en esta familia de proteínas [Cheung y Hendrickson, 2010].

El *dominio transmisor* está compuesto por un centro de cinasa conservado (dominio catalítico) y por un dominio de dimerización (Figura 2). Su plegamiento α/β consiste de cinco láminas- β antiparalelas y tres α -hélices, y es similar al plegamiento de los dominios de las ATPasas de la chaperona Hsp90, en la DNA topoisomerasa B y en la proteína de reparación de DNA MutL [Bilwes y col., 1999; Tanaka y col., 1998]. El centro cinasa es el responsable de catalizar la autofosforilación dependiente de ATP en un residuo His. Tanto en procariontes, como en eucariontes hay cinco motivos conservados en el centro cinasa: la caja H, con un residuo His constante y las cajas N, G1, F y G2 [Parkinson y Kofoid, 1992], en donde se localiza el sitio de unión a ATP. Estas cajas están usualmente contiguas, pero el espacio entre los motivos puede variar, la región de la proteína que ocupan es altamente flexible, lo que quizá refleja los cambios conformacionales que acompañan la unión de ATP. El dominio de dimerización forma típicamente cuatro α -hélices antiparalelas que forman un homodímero simétrico con dos sitios activos His por unidad estructural [Tomomori y col., 1999].

Por otro lado, las HC híbridas presentes en procariontes (en *E. coli* BarA, EvgS, ArcB, TorS y Rc sC) y predominantemente en eucariontes, tienen dos dominios adicionales: un *dominio receptor* (similar al dominio receptor del RR) y un *dominio de fosfotransferencia* (Hpt) (Figura 2). Aunque estos dominios independientes no poseen actividad cinasa dependiente de ATP, ejercen un papel como intermediarios de la transferencia del grupo fosforilo entre el dominio transmisor de la HC y el dominio regulatorio del RR. Por lo tanto, las HC híbridas son más complejas [Alex y Simon, 1994; Parkinson y Kofoid, 1992] y debido a que contienen múltiples sitios fosfodadores y fosfoaceptores, en lugar de promover una sola transferencia fosforilo, usan sistemas de “fosforelevo” (sección 1.3).

1.2.2 Reguladores de respuesta

Los RR bacterianos son una familia de proteínas extremadamente diversa. Contienen en su extremo N-terminal un *dominio regulatorio* (también conocido como dominio receptor o REC) altamente conservado y en su extremo C-terminal un *dominio efector*, que puede ser estructural y funcionalmente variable [Galperin, 2006]. Por un lado, el *dominio regulatorio* consiste de aproximadamente 120 residuos de aminoácidos, que forman cinco cadenas lámina- β paralelas rodeadas por dos α -hélices. Este dominio se caracteriza por tener varios residuos conservados: el Asp, el cual es el sitio activo de la fosforilación, un par de residuos ácidos, involucrados en la unión de metal, y una lisina (Lys) que forma un puente de sal con el fosfato. Además hay otros dos residuos conservados, una serina/treonina (Ser/Thr) en la lámina β -4 y una fenilalanina/tirosina (Phe/Tyr) en la lámina β -5, los cuales juegan papeles directos en la propagación de los cambios conformacionales que acompañan la fosforilación. El estado de fosforilación del dominio regulatorio, permite al dominio efector ejercer una respuesta específica (generalmente a través del control de la expresión genética), sin embargo este mecanismo aún no está bien entendido.

Por otro lado, en la mayoría de los RR el *dominio efector* contiene sitios de unión a DNA (esto no parece ser el caso en las Arqueas). Como se mencionó anteriormente en *E. coli* al menos 25 de 32 RR son de este tipo. De acuerdo con la homología de sus sitios de unión a DNA, el dominio efector se puede clasificar en tres subfamilias: i) la OmpR/PhoB (14 miembros en *E. coli*) que contiene dominios “Winged-Helix”, los cuales integran motivos tipo hélice-vuelta-hélice en un haz de al menos tres α -hélices, incluyendo además una pequeña lámina- β antiparalela; ii) la NarL/FixJ (7 miembros en *E. coli*) con dominios con cuatro α -hélices; y iii) la NtrC/DctD (4 miembros en *E. coli*) con dominios acoplados a la ATPasa hélice-vuelta-hélice [Stock y col., 2000]. Cabe mencionar que el resto de los dominios efectores, regulan la actividad celular a través de sitios de unión a ligandos específicos, de unión a proteínas, a transportadores de membrana y a una variedad de enzimas metabólicas y de señalización [Galperin, 2010].

1.3 Mecanismo de acción

La vía de transducción de señales de los SDC implica las siguientes reacciones:

- a) Autofosforilación: $\text{HC-His} + \text{ATP} \rightarrow \text{HC-His-P} + \text{ADP}$
- b) Fosfotransferencia: $\text{HC-His-P} + \text{RR-Asp} \rightarrow \text{HC-His} + \text{RR-Asp-P}$
- c) Desfosforilación: $\text{RR-Asp-P} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{RR-Asp} + \text{P}_i$

La autofosforilación de la HC es una reacción bimolecular que ocurre en *trans*, en la que un monómero cataliza la fosforilación de pendiente de ATP en el residuo His conservado en el segundo monómero [Swanson y col., 1993; Wolfe y Stewart, 1993]; también se ha observado autofosforilación *cis* para la HC 853_{CP} de *Thermotoga maritima* [Casino y col., 2009] y para ArcB de *E. coli* [Peña-Sandoval y Georgellis, 2010]. Después el RR cataliza la transferencia del grupo fosforilo del residuo His-P a un residuo Asp conservado en su dominio regulatorio, permitiendo al dominio efector ejercer una respuesta específica. Finalmente el grupo fosforilo se transfiere del residuo Asp-P a agua en una reacción de hidrólisis. Las tres reacciones requieren iones metálicos divalentes, en donde el Mg^{2+} es el catión relevante *in vivo*. En los SDC híbridos se involucran múltiples reacciones de fosfotransferencia, llamadas “fosforelevo”. En el fosforelevo antes de la fosforilación del RR, el grupo fosforilo se transfiere a un dominio regulatorio de la HC híbrida (con un residuo Asp conservado) y a un dominio subsecuente HPt [Georgellis y col., 1997; Kwon y col., 2000]. Sin embargo, en todos los casos se conserva la química de transferencia de $\text{His} \rightarrow \text{Asp} \rightarrow \text{His} \rightarrow \text{Asp}$. Un fosforelevo ofrece la posibilidad de regular reacciones de fosfotransferencia individuales en función de un estímulo ambiental adicional. Como consecuencia, varias señales de entrada pueden definir la respuesta final [Krell y col., 2010]. Finalmente, la regulación de la actividad de los SDC puede ocurrir en numerosos puntos y a menudo es compleja, implicando múltiples blancos de regulación. La regulación está dada principalmente por: i) las fluctuaciones del estímulo, ii) la actividad fosfatasa y autofosfatasa que presentan algunas HC y RR, respectivamente y iii) en algunos pocos sistemas, por fosfatasas auxiliares, que pueden influir en el nivel de fosforilación del RR.

1.4 Especificidad de los sistemas de dos-componentes

La conservación estructural y funcional de los SDC sugiere la probabilidad de una potencial fosfotransferencia entre HC y RR no específicos (señalización-cruzada). Sin embargo, debido a que en muchos casos este evento se ha observado solo después de la introducción de varias perturbaciones genéticas, es improbable que se dé, o sea fisiológicamente relevante en un organismo silvestre [Laub y Goulian, 2007; Skerker y col., 2008]. Se ha sugerido que los principales mecanismos que aseguran la especificidad de los SDC están dados, tanto por la actividad fosfatasa que exhiben algunas HC bifuncionales, como por la competencia de los RR [Georgellis y col., 1998; Peña-Sandoval y col., 2005].

1.4.1 Actividad fosfatasa de las histidina cinasas bifuncionales

La mayoría de las HC bacterianas son bifuncionales, lo cual significa que además de funcionar como cinasas, también funcionan como fosfatasas, desfosforilando en la ausencia del estímulo a su RR cognado. En la mayoría de los casos, se ha observado que el dominio transmisor es el responsable de catalizar ambas reacciones. De hecho, en las HC NarX [Huynh y col., 2010] y EnvZ [Dutta y col., 2000], involucradas en la respiración anaeróbica y en la osmoregulación de *E. coli*, respectivamente, un motivo conservado Gln-Asn-Thr (cerca del residuo fosfo-aceptor His) es esencial para la actividad fosfatasa de estas cinasas. Además se ha sugerido, que esta actividad es tá regulada por la conformación y el posicionamiento relativo de los subdominios de l dominio transmisor, lo cual depende de la presencia del estímulo [Zhu y col., 2000]. Sin embargo, el mecanismo de acción de esta actividad está en disputa. Datos obtenidos de la HC citoplasmática NtrB, son consistentes con un modelo de co-fosfatasa [Jiang y col., 2000], mientras que datos obtenidos de EnvZ son consistentes con un modelo de fosfotransferencia reversa [Zhu y col., 2000].

La actividad fosfatasa no solo es esencial para la regulación de la transducción de la señal, sino que también suprime el efecto de “señalización-cruzada”. Como ejemplos de esta función se encuentran estudios realizados en los SDC PhoR-PhoB y VanS-VanR. El SDC PhoR-PhoB de *E. coli* permite detectar y responder a cambios en la disponibilidad de fosfato, mientras que el SDC VanS-VanR regula la expresión de genes que confieren resistencia a vancomicina en enterococos y en otras bacterias Gram-positivas. Cuando se expresa el sistema VanS-VanR en *E. coli*, se puede observar señalización-cruzada entre VanS y PhoB, pero solo en la ausencia de PhoR [Fisher y col., 1995; Silva y col., 1998]. Este evento está ligado a la consecuencia de eliminar la actividad fosfatasa de PhoR sobre su RR cognado PhoB; por lo tanto, *in vivo*, cualquier señalización-cruzada entre una HC y un RR no cognado es eliminada por la habilidad de la HC específica, de desfosforilar a su RR.

1.4.2 Competencia de los reguladores de respuesta

La competición de los RR se ha estudiado en los sistemas CpxA-CpxR y EnvZ-OmpR de *E. coli*, involucrados en la activación de la expresión de las porinas OmpC y OmpF. Se ha mostrado que la señalización-cruzada entre la HC CpxA y el RR OmpR requiere de la ausencia tanto de EnvZ, como de CpxR; y viceversa, la señalización-cruzada entre EnvZ y CpxR requiere de la ausencia de CpxA y OmpR. El hecho de que no se observe señalización-cruzada cuando ambos RR están presentes, sugiere que el RR normalmente compite con RR no cognados, contribuyendo en la prevención de la señalización-cruzada. Este efecto está enriquecido por la poca abundancia *in vivo* de HC relativo a los RR, por ejemplo, en *E. coli* están presentes aproximadamente 100 y 3500 moléculas por célula de EnvZ y OmpR, respectivamente [Cai y Inouye, 2002]. La relación estequiométrica se debe probablemente a que el codón de inicio de *envZ* sobrelapa con el codón de paro de *ompR*, junto con un débil sitio de unión a ribosomas para *envZ*. Muchos de los otros genes de SDC tienen una estructura similar, sugiriendo que las HC están en menor concentración relativa que sus respectivos RR.

1.5 Integración de los sistemas de dos-componentes con otras vías de señalización

Frecuentemente los SDC participan en otras redes de regulación, que aseguran a las bacterias sobrevivir tanto en un modo de vida unicelular, como grupal. Este último, mejor conocido como *quorum-sensing*. El reto es entender, cómo interactúan los componentes que gobiernan el procesamiento de la información en las bacterias, para coordinar una serie de respuestas a múltiples señales ambientales. El SDC BarA/UvrY de *E. coli* y sus homólogos en las γ -proteobacterias, es un ejemplo de un sistema que parece ser un regulador maestro de varios fenotipos, principalmente de aquellos asociados a la patogenicidad y virulencia.

Este sistema controla positivamente la expresión de uno a cinco RNAs pequeños no-codificantes (sRNAs) que se caracterizan por poseer motivos GGA conservados, los cuales al ser sitios de unión para la proteína de regulación global CsrA (y sus ortólogos RsmA/E/F), funcionan como antagonistas de su actividad. CsrA, la cual también está conservada fuera de las γ -proteobacterias, es un homólogo que actúa predominantemente como repressor transcripcional de transcritos blanco que contienen motivos ACA-GGA-G ubicados dentro de estructuras tipo “tallo y asa” en su región líder [Dubey y col., 2005; Mercante y col., 2006; Schubert y col., 2007]. Los fenotipos de las mutantes nulas en los SDC homólogos de BarA/UvrY, varían considerablemente entre cada especie bacteriana, pero en todos los casos se caracterizan por la atenuación de la virulencia (apéndice C). Las características generales del circuito en *E. coli* se describen en la Figura 3 y en la sección 2.

2. Circuito regulatorio *BarA-UvrY-CsrA*

En respuesta al acetato y al formato extracelular (acumulados en la fase exponencial tardía de crecimiento), el sistema *BarA-UvrY* de *E. coli*, activa directamente la expresión de los sRNAs *CsrB* y *CsrC*, los cuales al poseer en su estructura varios sitios de unión a *CsrA*, antagonizan con la actividad de esta proteína de regulación global (Figura 3). Por lo tanto, el *SDCB* *BarA-UvrY* repercute de manera indirecta, en múltiples procesos fisiológicos que tienen lugar principalmente en la fase estacionaria de crecimiento (que es cuando el sistema está activo). Por otro lado, la estabilidad y vida media de *CsrB* y *CsrC* está regulada por la proteína *CsrD*, la cual a través de un complejo que involucra a la RNasa *E* degrada a estos sRNAs. A continuación se describirá cada uno de los componentes de este circuito y la manera en la que están interconectados.

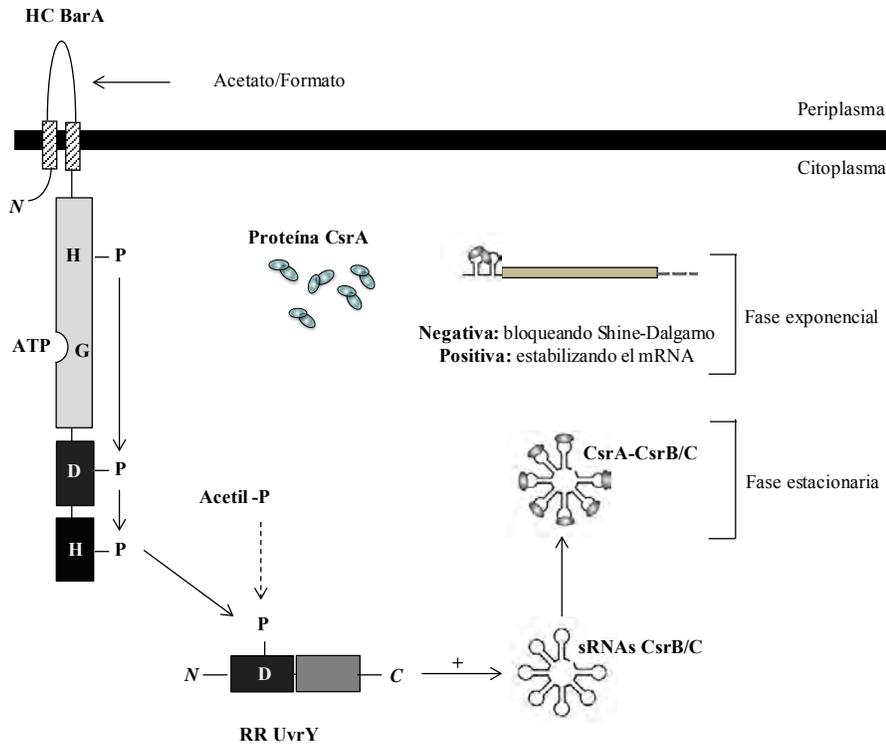


Figura 3. Modelo del circuito regulatorio BarA-UvrY-CsrA. El acetato, formato y otros ácidos grasos de cadena corta extracelulares funcionan como el estímulo de la *HC* híbrida *BarA* [Chávez y col., 2010]. La activación del sistema *BarA-UvrY* afecta de manera indirecta múltiples procesos celulares. Los únicos genes blancos identificados hasta el momento para este sistema, son los RNAs pequeños no -codificantes (sRNAs) *CsrB* y *CsrC*, los cuales al estar constituidos por múltiples sitios de unión a *CsrA* (una proteína de regulación global), regulan negativamente su actividad.

2.1 La proteína CsrA y sus homólogos

CsrA (carbon storage regulator) es una proteína homodimérica de 6.8 kDa, que se une selectivamente a moléculas de RNA. Su estructura y función se ha elucidado con considerable detalle, tanto en *E. coli* como en *Pseudomonas* [Gutierrez y col., 2005; Rife y col., 2005; Schubert y col., 2007]. CsrA se descubrió, mientras se buscaban factores que controlaran la expresión de los genes *glgCAP* y *glgBX*, los cuales codifican enzimas responsables de la biosíntesis del glucógeno [Romeo y col., 1993]. Posteriormente se observó que tiene un papel global en el metabolismo y en la fisiología tanto de *E. coli*, como de otras especies bacterianas. De manera general, CsrA reprime procesos que tienen lugar en la fase de crecimiento estacionaria, por ejemplo, la síntesis del glucógeno, la formación de biopelículas, etc., mientras activa procesos que tienen lugar en la fase de crecimiento exponencial, por ejemplo, el metabolismo del acetato, la motilidad celular, etc. (sección 2.1.1) [Wei y col., 2001; Wang y col., 2005].

Se han identificado homólogos de CsrA en otras γ -proteobacterias, por ejemplo, CsrA en *Salmonella* spp., [Altier y col., 2000], *Legionella pneumophila* [Molofsky y Swanson, 2003] y *Vibrio cholerae* [Lenz y col., 2005], RsmA (regulator of secondary metabolism) en *Pectobacterium carotovorum* (previamente conocida como *Erwinia carotovora*) [Chatterjee y col., 1995], RsmA [Pessi y col., 2001] y RsmF (o RsmN) [Morris y col., 2013] en *Pseudomonas aeruginosa*, y RsmA y RsmE en *P. fluorescens* [Reimann y col., 2005], los cuales tienen funciones redundantes. También se han encontrado homólogos de CsrA en las δ -proteobacterias (*Desulfovibrio*, *Geobacter*), en las ϵ -proteobacterias (*Helicobacter*, *Campylobacter*), en las espiroquetas (*Borrelia*, *Treponema*), en las bacterias Gram-positivas (*Bacillus*, *Clostridium*) y en *Thermotoga*. Sin embargo, en estas últimas, no se sabe cómo está regulada su actividad, debido a que los sRNAs que regulan a esta proteína, están presentes solo en las γ -proteobacterias [Kulkarni y col., 2006].

Los transcritos reprimidos por CsrA, se pueden clasificar en dos categorías; la primera consiste en blancos que tienen múltiples sitios de unión a CsrA en una región alrededor de la secuencia Shine-Dalgarno (SD), por ejemplo, *cstA*, *pgaABCD*, *glgC*, *cel*, *ydeH*, *sepL*, *grlR*, *nhaR*, *csrA*, *sdiA* en *E. coli*; *hcnA* en *P. protegens*, PA0081, PA0082, PA0277, PA3732 en *P. aeruginosa* y *hag* en *B. subtilis* y *flaB* en *B. burgdorferi*. Por otro lado, la segunda categoría consiste en blancos que tienen un solo sitio de unión, alrededor de la secuencia SD, por ejemplo, *hfq*, *ycdT* en *E. coli*, *stm1987* (*gcpA*), *yhdA* (*csrD*), *stm1697*, *ydiV* en *S. enterica* ssp. *Typhimurium* y PA4492, PA2541 y *pslA* en *P. aeruginosa*. Por otro lado, se conoce poco acerca de la regulación positiva de CsrA, por ejemplo, sobre el mRNA *flhDC* en *E. coli* (apéndice B). Cabe mencionar que un análisis *in silico* reciente, ha sugerido que existen más de 100 blancos directos de CsrA en *E. coli* [Kulkarni y col., 2014].

2.1.1 Mecanismo de acción

Cada dímero de CsrA contiene dos sitios de unión a RNA cargados positivamente, que se unen preferentemente a motivos (ACA-GGA-G), que se encuentran dentro de estructuras tipo “tallo y asa” en la región líder de sus mensajeros blanco (mRNAs) [Dubey y col., 2005; Mercante y col., 2006; Schubert y col., 2007]. Esta arquitectura permite la unión de un dímero de CsrA a dos motivos de unión, o en algunos casos, la unión de múltiples dímeros de CsrA a varios motivos en un mRNA [Mercante y col., 2009]; es decir, el reconocimiento de CsrA hacia sus blancos se encuentra tanto en la secuencia primaria, como en la estructura secundaria de los transcritos. CsrA usualmente actúa como un represor traduccional, aunque también puede funcionar como activador. La regulación negativa consiste en el bloqueo de los sitios de unión a ribosomas, dando lugar a la degradación del transcrito; mientras que la regulación positiva, implica la unión a la región líder, con efectos subsiguientes en la traducción y/o estabilidad del transcrito [Romeo y col., 2013].

2.1.2 Regulación de la expresión y actividad de CsrA

CsrA es una proteína abundante en *E. coli*, se ha reportado que su concentración incrementa aproximadamente de 6 μ M en la fase exponencial, a 17 μ M cuando las células entran a la fase estacionaria de crecimiento [Gudapaty y col., 2001]. Aunque la regulación de su expresión no está bien entendida, se ha observado que su transcrito cuenta con al menos cinco promotores, que regulan su transcripción dependiente del factor σ^{38} (o σ^S , el producto del gen *rpoS*) y de σ^{70} (*rpoD*) [Yakhnin *et al.* 2011]. A pesar de que RpoS regula la expresión genética durante la entrada a la fase estacionaria de crecimiento y en condiciones de estrés, la regulación de *csrA* solamente se ha observado cuando las células crecen en medio con glucosa como única fuente de carbono [Dong y Shellhorn, 2009; Patten y col., 2004; Rahman y col., 2006]. Adicionalmente, también se ha observado que CsrA se une a cuatro sitios en la región líder de su transcrito, resultando en la represión de su propia traducción [Yakhnin *et al.* 2011].

La regulación de su actividad está mejor entendida. CsrA está regulada negativamente por los sRNAs, CsrB y CsrC de *E. coli*, los cuales al estar compuestos por múltiples sitios de unión a CsrA (22 y 13, respectivamente) titulan a la proteína, inhibiendo su actividad [Babitzke y Romeo, 2007]. Además se ha observado que CsrA, a su vez, activa indirectamente la síntesis de algunos sRNAs a través de un mecanismo dependiente de UvrY [Suzuki y col., 2002; Weilbacher y col., 2003], resultando en un circuito autoregulatorio (capítulo 4). Cabe mencionar que la actividad de CsrA también puede estar moderadamente regulada por el sRNA McaS, pero solo posee dos sitios de unión a esta proteína [Jorgensen MG y col., 2013] y además, su expresión no depende de UvrY-P.

2.2 Los RNAs pequeños no-codificantes CsrB/CsrC y sus homólogos

El sRNA CsrB de *E. coli* se descubrió cuando CsrA se purificó como un complejo ribonucleoproteína CsrA-CsrB [Liu y col., 1997]; mientras que su sRNA homólogo, CsrC, se identificó mientras se buscaban factores que afectarían la biosíntesis del glucógeno [Weilbacher y col., 2003]. CsrB y CsrC antagonizan la actividad de CsrA, ya que contienen múltiples sitios de unión a esta proteína (motivos GGA)₂₂ y ₁₃, respectivamente [Babitzke y col., 2009] que les permiten secuestrarla. Se han encontrado homólogos de estos en otras γ -proteobacterias, por ejemplo, CsrB y CsrC de *S. enterica* [Fortune y col., 2006], RsmY y RsmZ de *P. aeruginosa* [Reimann y col., 1997], RsmY/RsmZ/RsmX de *L. pneumophila* [Hammer y col., 2002; Sahr y col., 2009] y de *P. fluorescens* [Kay y col., 2005], CsrB/CsrC/CsrD de *V. cholerae* [Lenz y col., 2005] y RsmB de *P. carotovorum* [Cui y col., 2001]. A pesar de que el número de estos sRNAs, puede variar de una especie a otra, ejercen el mismo mecanismo de acción sobre la actividad de los homólogos de CsrA.

La redundancia en la función de estos sRNAs hace que solo la inactivación de ambos genes (o los tres de *P. fluorescens*, *L. pneumophila* y de *V. cholerae*), tengan un fenotipo distinguible de la cepa silvestre [Fortune y col., 2006; Kay *et al.* 2005]. Además, no es sorprendente que los fenotipos de las mutantes nulas *csrB csrC* de *E. coli* y *rsmY rsmZ* de *P. aeruginosa*, sean opuestos a los observados en las mutantes *csrA* y *rsmA*, respectivamente [Wang y col., 2005; Jonas y col., 2008]; y en contraparte, sean similares a los de las mutantes del SDC BarA-UvrY y GacS-GacA, respectivamente [Kay y col., 2006; Weilbacher y col., 2003]. Esto último, debido a que el SDC BarA-UvrY de *E. coli* y sus homólogos, regulan positivamente la transcripción de estos sRNAs (sección 2.3).

2.2.1 Regulación de la expresión de CsrB y CsrC

Evidentemente UvrY-P (y sus homólogos) son esenciales para la transcripción de los sRNAs Csr/Rsm. Sin embargo existen reguladores globales que afectan también su expresión, curiosamente el efecto de algunos de estos parece estar evolutivamente conservado. Los ejemplos más claros son: la proteína CsrA/RsmA, el factor de integración al hospedero (IHF) y la proteína pausada a histonas (H-NS), los cuales pueden favorecer o reprimir la expresión general o exclusiva de estos sRNAs. Por un lado, observaciones tempranas sugirieron que en la mutante *csrA* de *E. coli*, los sRNAs *csrB* y *csrC* no se expresan [Suzuki y col., 2002]; debido a que CsrA no afecta la estabilidad y/o vida media de estos [Gudapaty y col., 2001; Suzuki y col., 2006], se sugirió que este efecto era probablemente vía UvrY (Capítulo 2).

Por otro lado, respecto al factor de integración al hospedero IHF, se ha observado en se une al promotor de *csrB* en *S. enterica* serovar Typhimurium y al promotor de *rsmZ* de *P. fluorescens*, para regular positivamente su transcripción [Martinez y col., 2014; Humair y col., 2010]. Además, la inactivación del gen *ihfA* en *S. enterica* disminuye severamente la expresión de *csrB*, similar a una mutante nula *sirA* (homólogo de *uvrY*), aunque no afecta la expresión de *csrC*. A pesar de que no se conoce el mecanismo de

acción de IHF sobre la expresión de *csrB* y *rsmZ*, es interesante notar que los ortólogos de la proteína H-NS, MvaT y MvaU en *P. fluorescens* se unen al promotor de *rsmZ* y reprimen su expresión [Brénic y col., 2009]. Consistentemente se ha observado que IHF antagoniza con el silenciamiento de la expresión genética dependiente de H-NS en *E. coli*, *Vibrio cholerae* y *S. enterica* [Queiroz y col., 2011; Stonehouse y col. 2008; Ogasawara y col., 2010]. Aunque no son claros los mecanismos de cómo IHF y H-NS regulan la expresión genética y aún no se determina si IHF antagoniza a MvaT/MvaU, estas proteínas altamente conservadas se encuentran asociadas al nucleoide (NAPs), y son reconocidas por modificar la arquitectura del DNA [Dillon y Dorman, 2010], ¿*UvrY-P* expresa a *csrB* y *csrC* a través de mecanismos que involucran fábricas de transcripción?

2.2.2 Expresión diferencial entre los sRNAs redundantes

La expresión de estos sRNAs también está influenciada una por otra y probablemente están regulados diferencialmente bajo ciertas condiciones. Estudios en *E. coli* y *S. enterica*, mostraron que la pérdida de *csrB* da lugar a un incremento en la expresión de *csrC* y viceversa, la inactivación de *csrC* regula positivamente la expresión de *csrB* [Fortune y col., 2006; Weilbacher y col., 2003]. También se ha observado que el nivel de expresión de *csrB* es más alto que el de *csrC* y que cuando se anula a *uvrY* hay una reducción de más de 10 veces la expresión de *csrB*, comparada con una reducción de 2.5 en *csrC* [Jonas y col., 2006]; es decir, la transcripción de *csrC* pareciera ser menos dependiente de UvrY. Además en *S. enterica*, el homólogo de UvrY, SirA se une solo al promotor de *csrB*, pero no al de *csrC* [Teplitski y col., 2003]. Esta interdependencia entre los componentes de Csr parece estar evolutivamente conservada. Un caso extraordinario ocurre en *Yersinia* spp., en donde a pesar de que se encuentran conservados los homólogos tanto de CsrB como CsrC, UvrY solo activa la expresión de CsrB. Además se ha observado que ambos sRNAs responden a diferentes estímulos ambientales y parámetros de crecimiento. Por ejemplo, cuando las células crecen en medio rico se han observado altos niveles de CsrC, mientras que en medio mínimo su transcripción está fuertemente reprimida y se induce al máximo durante la fase estacionaria de crecimiento a 25°C y durante la fase exponencial a 37°C [Heroven y col., 2008].

2.2.3 Regulación de la estabilidad de CsrB y CsrC: CsrD y homólogos

Respecto a los mecanismos de autoregulación que controlan la estabilidad y la vida media de CsrB y CsrC, se encuentra en primer lugar la proteína integral de membrana CsrD (y su homólogo MshH en *V. cholerae*). CsrD a pesar de tener dominios GGDEF y EAL, característicos de las diguanilato ciclasas y de las fosfodiesterasas, respectivamente, no sintetiza o degrada al segundo mensajero c-di-GMP. Aunque el mecanismo de acción de CsrD no se ha definido, se ha propuesto que su unión ocasiona cambios conformacionales en CsrB y CsrC, resultando en moléculas blanco de la RNasa E [Romeo y col., 2013].

CsrA reprime la expresión de *csrD* formando un circuito autoregulatorio adicional [Jonas y col., 2006, 2008]. Sin embargo este efecto es débil y CsrA tiene un nulo efecto sobre la vida media de CsrB y CsrC *in vivo* [Gudapaty y col., 2001; Suzuki y col., 2006]. Por lo tanto el significado biológico de esta autoregulación no está claro. Por otro lado, los homólogos de CsrD no son una característica de todas las γ -proteobacterias. En *P. fluorescens* RsmA (CsrA) aparentemente controla la estabilidad de los sRNAs Rsm, a través de un mecanismo que involucra la protección del corte de la RNasa E [Reimann y col., 2005]. Sin embargo, los detalles de este mecanismo son inciertos y debido a que en *E. coli* CsrA no afecta la estabilidad y vida media de los sRNAs CsrB y CsrC, es necesario realizar una comparación en tre la estabilidad de los sRNAs Csr/Rsm y la presencia o ausencia de los homólogos de *csrD* en varias especies bacterianas.

2.3 El sistema de dos-componentes BarA-UvrY y sus homólogos

El gen de *barA* (*bacterial adaptative response gene A*) (también llamado AirS) se identificó primeramente como un supresor multicopia de una mutante *envZ* osmóticamente comprometida. Debido a que EnvZ es la HC para el RR OmpR se pensó que BarA también regulaba la fosforilación de OmpR, sin embargo el cross-talk entre BarA y OmpR no se pudo demostrar *in vitro* [Nagasawa y col., 1992]. Posteriormente BarA se implicó en procesos fisiológicos asociados a la virulencia. En *E. coli* uropatogénica se reportó que la transcripción de *barA* se induce después del contacto con la superficie celular eucariótica, y que juega un papel clave en la colonización del tracto epitelial urinario durante la infección, así como para la adquisición de hierro [Zhang y Normak, 1996]. En *E. coli* K-12 y MC4100 *barA* induce la expresión del factor sigma RpoS [Mukhopadhyay y col., 2000], resultando en la hipersensibilidad al peróxido de hidrógeno [Pernestig y col., 2000]. Por otro lado, el gen de *uvrY* se identificó por su localización inmediatamente río-abajo del gen *uvrC*, pero nunca se pudo involucrar en mecanismos de reparación de DNA [van Sluis y col., 1983; Moolenaar, 1987].

Finalmente, Pernestig y col. (2001) a través de análisis genéticos y estudios de fosfotransferencia *in vitro* demostraron que UvrY es el RR cognado de BarA. Esta fue la primera evidencia de fosforilación *in vitro* para este SDC y sus homólogos en otras especies bacterianas. Este sistema está conservado en varias γ -proteobacterias, por ejemplo BarA-SirA de *S. enterica*, LetS-LetA de *L. pneumophila*, VarS-VarA de *V. cholerae*, GacS-GacA de *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* y ExpS-ExpA de *E. carotovora* ssp. *Carotovora*. Notablemente, en cada una de estas bacterias, mutaciones en este sistema dan lugar a una significativa reducción de la virulencia en la interacción con hospederos animales o plantas (apéndice C).

2.3.1 Mecanismo de acción

El sistema BarA/UvrY y sus homólogos controlan numerosos procesos celulares, formando un circuito regulatorio con la proteína CsrA. La manera en la que está vinculado con CsrA se debe a que UvrY fosforilado, activa directamente la expresión de los sRNAs CsrB y CsrC; los cuales regulan negativamente la actividad de CsrA (Figura 3). De manera importante, se ha observado que el fenotipo de la doble mutante *uvrY/barA*, es similar al fenotipo de la mutante *csrB/csrC*; lo que sugiere que este sistema, controla diversos procesos fisiológicos principalmente a través de la regulación de la expresión de los genes *csrB* y *csrC*. Sin embargo, la posibilidad de que regulen directamente otros genes no puede ser excluida, de hecho en *L. pneumophila*, se ha observado que LetA regula la expresión de genes flagelares por un mecanismo que parece ser independiente de *rsmY*, *rsmZ* y *rsmX* [Sahr y col., 2009]. Por otro lado, cabe mencionar que, UvrY también puede ser fosforilado por el acetil-fosfato, un intermediario metabólico que se produce por las enzimas AckA y Pta dentro de la vía glucolítica [Wolfe, 2005], pero este efecto solo tiene lugar en la ausencia de BarA, y cuando se adiciona glucosa al medio de cultivo [Tomenius y col., 2005].

2.3.2 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 afectados positivamente por la proteína SdiA (suppressor of division inhibition) [Suzuki y col., 2002; Wei y col., 2001b] (homóloga de la proteína LuxR de *Vibrio* spp, el regulador de la *quorum-sensing*), mientras que su traducción puede estar afectada positivamente por la RNA helicasa DeaD [Vakulskas y col., 2014].

El papel de SdiA en el *quorum-sensing* en *E. coli* y *S. enterica*, ha sido materia de debate por muchos años. Pues a diferencia de *Vibrio* spp., estas bacterias no codifican las enzimas responsables de la síntesis de AIs [Michael y col., 2001; Swift y col., 1999], en contraparte, SdiA detecta y responde a AIs generados por otras especies bacterianas. Por otro lado, parece que SdiA tiene un papel global en la fisiología de *E. coli*; por medio de análisis de microarreglos, se ha encontrado que su sobreexpresión induce la activación de la división celular, el incremento en la resistencia a antibióticos, el incremento en la transcripción de ~75 genes (entre ellos *uvrY*) y la disminución de la transcripción de ~62 genes (incluyendo los de motilidad) [Dyzel y col., 2010; Lee y col., 2007; Van Houdt y col., 2006]. Además se ha encontrado que SdiA se necesita para reducir la formación de biopelículas, en presencia de moléculas de AIs, así como también en la presencia de indol (un compuesto orgánico secretado por *E. coli* cuando crece en medio rico en fase estacionaria) [Lee y col., 2007]. Por otro lado, se ha observado que la RNA helicasa DeaD de *E. coli*, asociada con actividades para la maduración del RNA ribosomal a bajas temperaturas [Iost y col., 2013] puede modular la traducción de UvrY, probablemente al contrarrestar el efecto de la estructura de RNA inhibitoria que se forma entre el RNA líder de *uvrY* y la secuencia codificante proximal, este efecto es independiente de CsrA [Vakulskas y col., 2014].

2.3.3 Regulación de la actividad del sistema BarA-UvrY

Mondragón y col. (2006) demostraron que cuando las células crecen a valores de pH menores de 5.0 el SDC no se activa (a juzgar por la expresión del reportero *csrB*), sin embargo, cuando se adiciona glucosa al medio, la expresión de *csrB* se activa aproximadamente 2 horas después, sugiriendo que probablemente un producto final del metabolismo de la glucosa, era la molécula señal para la activación del sistema. Posteriormente se reportó que la síntesis de CsrB/C está afectada positivamente durante el crecimiento en medio mínimo y en presencia de aminoácidos, sugiriendo que probablemente el sistema de respuesta astringente que involucra a la hormona (p)ppGpp afectaba la activación del sistema BarA/UvrY [Jonas y Melchers, 2009], una condición que se había reportado previamente en *L. pneumophila* [Hammer y col., 2002]. Por otra parte, mutaciones en los genes *relA* y *spoT* de *E. coli*, los cuales son importantes para la producción de (p)ppGpp, no afectaron la expresión de *csrB* en medio LB [Jonas y col., 2006].

Chávez y col. (2010) demostraron que el acetato, el formato y otros ácidos grasos de cadena corta son el estímulo para la HC BarA, los cuales son metabolitos abundantes en el tracto gastrointestinal de los pederos mamíferos. Por lo tanto, pueden funcionar como potentes activadores de BarA durante la colonización o infección [Lawhon y col., 2002]. Aunque no se ha demostrado el mecanismo por el cual el formato y/o el acetato es detectado por BarA, es interesante saber que el acetato es un metabolito predominante en *E. coli*, que comienza a acumularse en el medio de cultivo, cuando se acerca la transición a la fase estacionaria de crecimiento. 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.

2.3.4 Regulación de la actividad del sistema GacS-GacA

Aunque no sea identificado la molécula señal específica que detecta el SDC GacA/GacS, hay reportes que sugieren que puede estar afectado a través del ciclo de Krebs [Takeuchi y col., 2009]. Este escenario es compatible con los estudios realizados en *E. coli* y en *S. enterica*. Por otra parte, en *P. aeruginosa*, este circuito incluye a los sensores RetS y LadS que actúan como antagonista y activador de GacS, respectivamente [Goodman y col., 2009; Ventre y col., 2006]. RetS puede formar heterodímeros con GacS, previniendo su autofosforilación y por lo tanto la fosforilación del RR GacA [Goodman y col., 2009]. Se ha mostrado que la actividad de RetS puede ser contrarrestada por la histidina cinasa PA1611 [Kong y col., 2013]. LadS se une a GacS y estimula su actividad a través de un mecanismo desconocido [Ventre y col., 2006; Workentine y col., 2009]. Se ha demostrado que una nueva proteína fosfotransferasa llamada HptB interactúa con RetS-P y que HptB, similar a RetS, reprime la expresión de RsmY [Hsu y col., 2008; Bordi y col., 2010]. Sin embargo, RetS y HptB regulan la expresión de RsmY a través de diferentes vías; mientras que RetS reprime la expresión tanto de RsmY como de RsmZ, HptB parece que solo controla la expresión de RsmY.

Capítulo 2. Planteamiento

1. Antecedentes

Se ha reportado que el acetato y el formato, así como otros ácidos grasos de cadena corta, actúan como el estímulo para la HCB arA [Chavez y col., 2010], dando lugar a su autofosforilación y la transfosforilación del RR cognado UvrY [Pernestig y col., 2001]. UvrY fosforilado (UvrY-P) activa la transcripción de los sRNAs CsrB y CsrC, los cuales secuestran a la proteína regulación global CsrA, antagonizando su actividad regulatoria [Suzuki y col., 2002, Weilbacher y col., 2003]. Curiosamente la activación de la transcripción de *csrB*, la cual tiene lugar en la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria de crecimiento, no ocurre en la mutante *csrA*, a juzgar por el análisis de Northern blot y por la expresión del reportero *csrB-lacZ*, a través de ensayos de actividad β -galactosidasa. Además, se encontró que la expresión de *csrB*, en una mutante *csrA*, se restauró completamente por la expresión ectópica de CsrA usando el plásmido pCsrA (pMX544) (Figura. 4A, B). Debido a que CsrA no afecta la estabilidad de *csrB* [Gudapaty y col., 2001] y debido a que la transcripción de *csrB* se activa únicamente por UvrY-P, estos resultados preliminares sugirieron que CsrA se requiere para la activación de la transcripción de *csrB*.

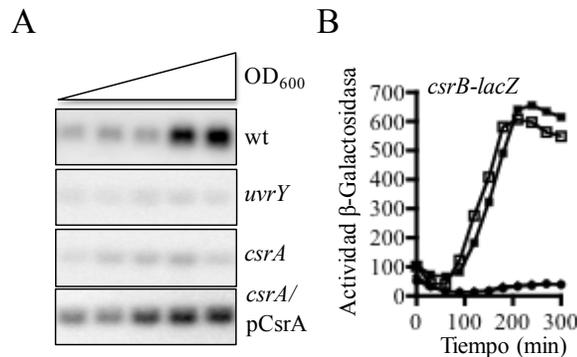


Figura 4. Efecto de *csrA* y *uvrY* sobre la transcripción de *csrB*. (A) Análisis de la expresión de *csrB* a través de Northern blot, en la cepa silvestre (KSB837) y en las mutantes isogénicas *uvrY* (UYKSB837), *csrA* (IFC5010) y *csrA* transformada con el plásmido pMX544 (indicado como pCsrA). Las células se crecieron en medio LB, y se aisló RNA total a partir de muestras tomadas a lo largo de la curva de crecimiento (OD_{600} 0.3 - 2.0), se utilizó como sonda el transcrito de CsrB. Los experimentos se repitieron tres veces, obteniéndose los mismos resultados. (B) Los cultivos de la cepa silvestre (cuadrados), de las mutantes isogénicas *uvrY* (círculos negros) y *csrA* (diamantes), y de la mutante *csrA* transformada con el plásmido pCsrA (cuadrados ne gros), conteniendo la fusión transcripcional *csrB-lacZ*, se diluyeron a una $OD_{600} \sim 0.05$ en medio LB y se siguió el ensayo de actividad β -galactosidasa por 300 minutos. Notar que los símbolos de círculos negros y diamantes se sobrelapan. Se muestra el promedio de cuatro experimentos independientes (las desviaciones estándar fueron menores al 5%).

2. *Hipótesis.*

CsrA se requiere para la producción del estímulo específico de BarA y/o CsrA afecta la expresión del sistema BarA-UvrY.

3. *Objetivo general.*

Determinar el efecto de CsrA sobre la producción de acetato y/o sobre la expresión de los componentes del sistema de señalización BarA/UvrY.

4. *Objetivos particulares.*

Determinar a través de análisis de Northern blot y ensayos de actividad β -galactosidasa, si la adición de acetato o formato restablece la expresión de *csrB* en la mutante *csrA*, cuando crece a pH 5.0.

Cuantificar la producción de acetato extracelular en la cepa silvestre y en la mutante *csrA*.

Comparar a través de análisis de Western blot la cantidad de las proteínas BarA y UvrY expresadas en la cepa silvestre y en la mutante *csrA*.

Capítulo 3. Metodología

1. Condiciones de cultivo, cepas y plásmidos.

Todas las cepas se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) a 37° C. Los medios se suplementaron con antibióticos, a las siguientes concentraciones: cloranfenicol (cam), 20 µg/ml; kanamicina (kan), 50 µg/ml; ampicilina (amp), 100 µg/ml; tetraciclina (tet), 15 µg/ml; estreptomycin (sm), 100 µg/ml; espectinomycin (sp), 50 µg/ml. La transducción con el bacteriófago P1_{vir} se llevó a cabo, de acuerdo al método de escrito por Miller [1972]. Las listas de cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este trabajo se pueden consultar en el apéndice D. El superíndice R utilizado a continuación, hace referencia a la resistencia de las cepas por diferentes antibióticos.

Las cepas IFC5010 (*csrA::kan^R*, *csrB-lacZ*) e IFC5016 (*uvrY::cam^R*, *csrA::kan^R*, *csrB-lacZ*), se construyeron a través de la transducción con el bacteriófago P1_{vir} del alelo *csrA::kan^R* de la cepa TR1-5, a las cepas KSB837 (*csrB-lacZ*) y UYKSB837 (*uvrY::cat^R*, *csrB-lacZ*), respectivamente. Por otro lado, la cepa IFC5015 (*ackA::tet^R::pta*, *csrA::kan^R*, *csrB-lacZ*) se construyó a través de la transducción del alelo *ackA::tet^R::pta* de la cepa ECL5336, a la cepa IFC5010. Finalmente, para la construcción de la cepa IFC5017 (*barA::cam^R*, *csrA::kan^R*, *csrB-lacZ*), se amplificó a través de PCR un fragmento de DNA, usando los oligonucleótidos barAdel-Fw y barAdel-Rv, y el plásmido pKD3 como templado, para reemplazar en la cepa IFC5010, el gen *barA* por un cassette de cloramfenicol [Datsenko y Wanner, 2000].

Para construir las fusiones *lacZ*-Amp^R se generaron primeramente los plásmidos, pAH125-*bla* (*amp^R*) y pINT-*cat*, de integración (*cam^R*). Para el primero, se amplificó a través de PCR el producto *bla*, usando los oligonucleótidos Amp-Prom-Fw y Amp-Rv, y el plásmido pUC18 como templado, y a continuación se clonó en el plásmido pAH125, con los sitios de restricción NarI - NotI. Por otro lado, para el plásmido de integración, se digirió a pKD3 con la enzima HindIII, para obtener un producto correspondiente al gen *cat* (el cual se trató con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I), y a continuación se clonó con los extremos romos de los sitios XmnI - BsaI de pINT-ts. Una vez obtenidos los plásmidos anteriores, se construyeron los plásmidos: pAH-*uvrY* (fusión del operón *uvrY-lacZ*) y pUV-*uvrY22* (fusión traduccional *uvrY-lacZ* bajo el control del promotor constitutivo *lacUV5*). Para pAH-*uvrY*, se obtuvo a través de PCR una región de -409 a +12 nucleótidos, relativos al inicio de la traducción de *uvrY* (con los oligonucleótidos *uvrYP-fw-Pst* y *uvrYP-Rv-BamHI*), y a continuación se clonó en el plásmido pAH125-*bla*, con los sitios de restricción PstI - BamHI. Por otro lado, para pUV-*uvrY22*, se amplificó a través de PCR una región de -47 a +66 nucleótidos, relativos al inicio de la traducción de *uvrY* (con los oligonucleótidos *uvrY-lead-Fw* y *uvrY-lead22-Rv*), y posteriormente se clonó en el plásmido pUV5, con los sitios de restricción EcoRI - BamHI. Ambas fusiones se integraron al cromosoma de las cepas CF7789 y TR1-5 CF7789 [Haldimann y Wanner, 2001], para generar las cepas IFC5011 y IFC5014.

Los plásmidos pMX539 y pMX541, se construyeron a partir de la amplificación a través de PCR, del promotor y gen de *uvrY* (con los oligonucleótidos *uvrY*-Prom549-Fw y *uvrY*-Rv-HindIII), y su posterior clonación con los sitios de restricción *Sma*I del plásmido pACT13 y *Nde*I del plásmido pB A29, respectivamente. Por otro lado, el plásmido pMX540 que expresa al gen mutante *uvrY*^{D54Q}, se generó a través de mutagénesis dirigida del plásmido pMX539, usando el kit QuickChange (Stratagene) y los oligonucleótidos mutagénicos *uvrY*-D54Q-Fw y *uvrY*-D54Q-Rv; el reemplazamiento correcto de aminoácido se confirmó a través de secuenciación del DNA. Para construir el plásmido pMX544, se amplificó a través de PCR, el promotor y el gen de *csrA* (con los oligonucleótidos *csrA*1-Fw y *csrA*1-Rv) y a continuación se clonó con los sitios *Hind*III y *Pst*I del plásmido pEXT21. Por otro lado, el plásmido pMX543, el cual expresa a *uvrY*, bajo el control del promotor y la región líder de *barA*, se construyó a partir de la amplificación a través de PCR, del promotor y el líder de *barA* (con los oligonucleótidos *BarA*-Forwd1 y *BarA*-Forwd2) y su posterior clonación con los sitios de restricción *Eco*RI y *Xba*I del plásmido pEXT21, para generar el plásmido pMX542. Posteriormente, se amplificó a través de PCR, el gen de *uvrY* (con los oligonucleótidos *uvrY* y *uvrY*-Rv-HindIII), el cual se clonó con los sitios de restricción *Nde*I - *Hind*III de pMX542, para generar el plásmido pMX543. Finalmente, para construir el plásmido pMX545, se amplificó a través de PCR un fragmento de DNA conteniendo el gen *csrB* (con los oligonucleótidos *csrB*-Fw y *csrB*-Rv) y se introdujo al vector pGEMt-Easy a través de clonación T/A (Promega).

2. Extracción de RNA y Northern blot.

El RNA total se purificó a partir de muestras de 10 ml de cultivo tomadas a los tiempos indicados en las figuras, utilizando el método de extracción por fenol caliente [Georgellis y col., 1992]. La pastilla o botón celular de cada muestra, se resuspendió por pipeteo con 200 μ l de una solución de acetato de sodio 0.1 M, sacarosa 0.3 M, pH 4.5 a 4°C, y a continuación se lisó con otro volumen de una solución de acetato de sodio 0.01 M, SDS 2%, pH 4.5. Posteriormente, los tubos conteniendo las muestras, se incubaron por un minuto a 70°C y se adicionó a cada uno 400 μ l de fenol ácido caliente. Las muestras se agitaron vigorosamente a través de vórtex, se centrifugaron a máxima velocidad por 5 minutos, y se extrajo la fase acuosa. Este proceso se repitió tres veces más, en donde la última extracción se realizó a través de la adición de un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isomilico. 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 disolvió en aproximadamente 100 μ l de dH₂O estéril. La presencia del RNA ribosomal se verificó mediante la separación electroforética de las muestras y su 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.

El análisis de Northern blot se realizó mediante la separación electroforética de muestras de 5 µg de RNA purificado en geles de agarosa-formaldehído al 1.2%, y su posterior transferencia a membranas de nitrocelulosa (Amersham Biosciences), usando SSC 20X (SSC 1X es una solución de NaCl 0.15 M y citrato de sodio 0.015 M). Las membranas se dejaron secar al aire libre y se fijaron con luz UV (Stratalinker, Stratagene). Posteriormente se prehibridaron por 3 horas a 42°C en un amortiguador con solución Denhardt's 5X, SSC 5X, SDS 0.2%, formamida 50%, fosfato de sodio pH 6.5 0.01 M y DNA de esperma de salmón 10 mg/ml. La sonda *csrB* marcada radiactivamente se desnaturalizó a 95°C por 5 minutos y se añadió al amortiguador de prehibridación. Las membranas se incubaron toda la noche en agitación rotacional a 42°C. La sonda de *csrB* se obtuvo a través de la digestión del plásmido pM X545 con la enzima EcoRI. El fragmento se separó electroforéticamente y la banda específica se purificó con el Kit Agarose Purification (Qiagen). Para el marcado radiactivo de la sonda se usó [α -³²P]dCTP y el Kit Radprime (Invitrogen). Las membranas se lavaron dos veces con 50 ml de SSC 2X y SDS 0.1% a 37°C y dos veces con SSC 0.2X y SDS 0.1% a 42°C. La membrana se expuso en una pantalla para detectar radioactividad a través de su escaneo con el equipo Typhoon (Amersham Biosciences).

3. *Ensayo de actividad β -galactosidasa.*

La actividad β -galactosidasa de las cepas conteniendo las fusiones *lacZ*, se midió utilizando ONPG (*o*-nitrofenil- β -D-galactósido) y se detuvo mediante el método descrito por Miller, 1972. Las células se crecieron en medio LB pH 7.0 o amortiguado a pH 5.0, éste último se ajustó con 0.1 M de homopiperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulfonic acid) (HOMOPIPES). En determinados ensayos, se adicionó acetato o formato 7 mM.

4. *Análisis de Western blot.*

Los cultivos se crecieron aeróbicamente a 37°C y se tomaron muestras de 1 ml en la fase exponencial media. Las pastillas celulares se resuspendieron en 100 µl de amortiguador de lisis (Tris-HCl 100 mM, SDS 4%, 20% Glicerol, 10% β -Mercaptoetanol, pH 6.8) y se calentaron a 95°C por 5 minutos, con la finalidad de desnaturalizar a las proteínas. Alícuotas de 10 µl se resolvieron a través de SDS-PAGE (geles de poliacrilamida al 15% para UvrY y 8% para BarA) y posteriormente las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Hybond-ECL (Amersham Biosciences). Las membranas se equilibraron en el amortiguador TTBS (Tris-HCl 2.5 mM, NaCl 150 mM y Tween 20 0.05%) por 10 minutos y se incubaron 1 hora, a temperatura ambiente en solución de bloqueo (leche 5% en TTBS). Los anticuerpos policlonales contra UvrY y BarA (se obtuvieron a través de inmunización subcutánea de conejos con His₆-UvrY e His₆-BarA), se adicionaron a la membrana en diluciones 1:2.000 y 1:10.000, respectivamente y se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo unido se detectó a través del anticuerpo conjugado anti-conejo IgG con peroxidasa y por el sistema de detección ECL (Amersham Biosciences).

Capítulo 4. Resultados y discusión

1. El acetato y formato son incapaces de activar a BarA en una mutante *csrA*.

Considerando que un efecto de CsrA, una proteína de unión a RNA en el control de la cascada de fosforilación del SDC BarA-UvrY, es poco probable, se hipotetizó que CsrA podría requerirse tanto para la producción del estímulo específico de BarA -y por lo tanto para la activación de la cascada de señalización BarA-UvrY, como para la expresión de los genes *barA* y/o *uvrY*. Para probar la primera posibilidad, aprovechamos la observación de que aunque cuando las células crecen a pH 5.0, el SDC BarA-UvrY está inactivo [Mondragón *et al.* 2006], la adición de acetato o formato al medio, resulta en la activación inmediata del sistema y por lo tanto en la activación de la transcripción de *csrB* [Chávez *et al.* 2010]. Por lo tanto, la cepa silvestre (KSB837) y las mutantes isogénicas *csrA* (IFC5010) y *csrA/pCsrA* (pMX544, expresa a *csrA*) se crecieron en medio LB amortiguado a pH 5.0 en ausencia o presencia de acetato y formato, y a continuación se monitoreó la expresión de *csrB* a través de análisis de Northern blot y del reportero con la fusión transcripcional *csrB-lacZ*.

Como se esperaba, no se observó activación de la transcripción de *csrB* cuando las cepas crecieron a pH 5.0 (Fig. 5A, B y C). Sin embargo, la adición de acetato o formato al medio de cultivo, resultó en la inmediata activación de la transcripción de *csrB* en la cepa silvestre, pero no en la mutante *csrA* (Fig. 5A, B y C). Finalmente, la expresión ectópica de CsrA, usando el plásmido pCsrA (pMX544), en la mutante *csrA* restauró la transcripción de *csrB* a niveles similares a los observados en la cepa silvestre (Fig. 5A, B y C). Por lo tanto, pudimos concluir que una posible insuficiencia del estímulo específico de BarA, no es la causa de la falta de expresión de *csrB* en la mutante *csrA*. Consistente con lo anterior, cuando se monitorearon los niveles extracelulares de acetato en la cepa silvestre y en la mutante *csrA*, no se encontraron diferencias significativas en las cantidades de acetato a pH 7.0 y/o 5.0 (Fig. 5C). Concluimos que el requerimiento de CsrA en la cascada de señalización del sistema BarA-UvrY, no involucra la síntesis de acetato, el cual actúa como el estímulo fisiológico de BarA.

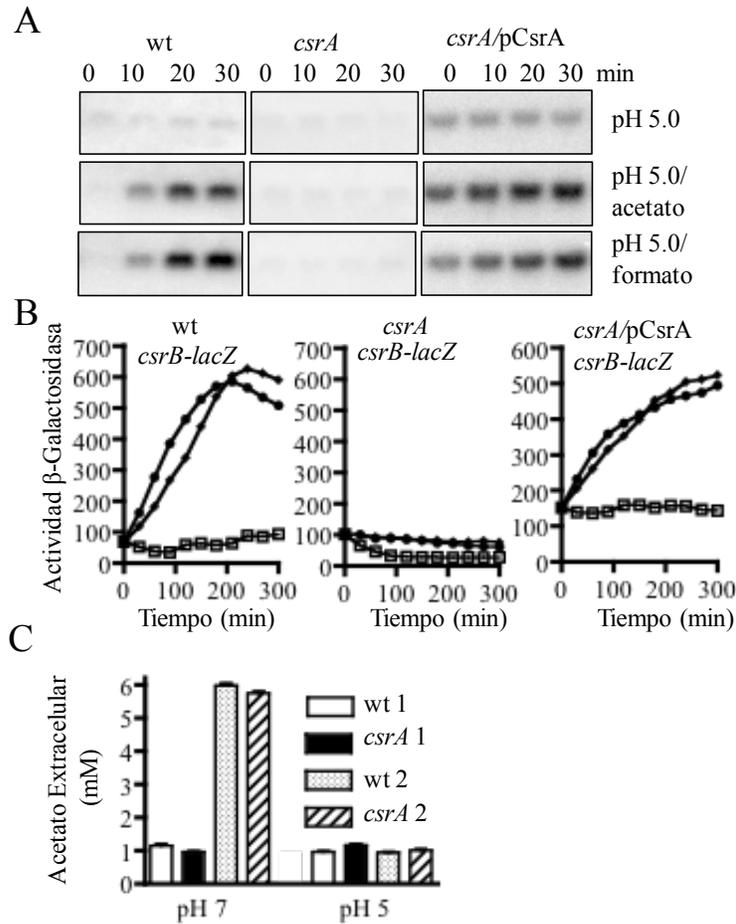


Figura 5. *CsrA* no afecta la síntesis del estímulo de *BarA*. (A) La cepa silvestre (KSB837) y las mutantes isogénicas *csrA* (IFC5010) y *csrA* transformada con el plásmido pMX544 (indicado como pCsrA) se crecieron en medio LB amortiguado a pH 5.0 con 0.1 M homopiperazine-*N,N*-bis(2-ethanesulfonic acid) (HOMOPIPES). Cuando las células llegaron a una OD₆₀₀ 0.2 se tomó el punto cero, y se agregó al medio 7 mM de acetato o formato, y después se tomaron muestras cada 10 minutos. Se aisló RNA total a partir de estas muestras y se analizó la expresión de *csrB* a través de Northern blot. El experimento se repitió tres veces, obteniéndose el mismo resultado. (B) Los cultivos de la cepa silvestre, de las mutantes isogénicas *csrA* y *csrA* transformada con el plásmido pCsrA, conteniendo la fusión transcripcional *csrB-lacZ* se diluyeron a una OD₆₀₀ ~ 0.05 en medio LB amortiguado a pH 5.0, como se describió en la Fig. 4B en la ausencia (cuadrados) o presencia (círculos negros) de acetato y formato (diamantes), se siguió el ensayo de actividad β-galactosidasa por 300 minutos. Se muestra el promedio de cuatro experimentos independientes (las desviaciones estándar fueron menores al 5%). (C) Concentración de acetato extracelular. La cepa silvestre y las mutantes isogénicas *csrA* y *csrA/pCsrA* se crecieron en medio LB amortiguado a pH 5.0 o 7.0. Se tomaron muestras de cultivo tanto en la fase exponencial de crecimiento (asignado con el número 1), como en la fase exponencial tardía (asignado con el número 2), y la concentración de acetato extracelular se determinó con el kit R-Biopharm Acetic Acid (Boehringer Mannheim). Se muestra el promedio de tres experimentos independientes, con las desviaciones estándar indicadas.

2. *CsrA* se necesita para la correcta expresión de *uvrY*.

Posteriormente, probamos la posibilidad de que *CsrA* estuviera afectando la expresión de los genes *barA* y/o *uvrY*. Comenzamos por comparar a través de análisis de Western blot la cantidad de las proteínas BarA y UvrY expresadas en la cepa silvestre y en la mutante *csrA*, utilizando anticuerpos policlonales e específicos para cada proteína. Por un lado encontramos que ambas cepas expresan cantidades similares de BarA (Fig. 6A). Sin embargo, encontramos que la cantidad de la proteína UvrY fue significativamente menor en la mutante *csrA*, respecto a la cepa silvestre (Fig. 6B). Además, la mutante *csrA* complementada con el plásmido p*CsrA* de bajo número de copias (derivado del pEXT21) que expresa a *csrA*, restauró la cantidad de la proteína UvrY a niveles similares a los observados en la cepa silvestre, indicando que *CsrA* afecta directa o indirectamente la expresión de *uvrY*. Debido al efecto de *CsrA* sobre la expresión de *uvrY*, nos preguntamos si ésta afectaba la transcripción, por ejemplo, modulando la expresión de un regulador transcripcional, o la traducción de *uvrY*. Para determinar lo anterior, se realizaron ensayos de actividad β -galactosidasa con la cepa silvestre y con la mutante *csrA*, conteniendo los reporteros cromosomales con la fusión transcripcional *uvrY'*-*lacZ* y con la fusión traduccional *lacUV5-uvrY'*-*lacZ*, en la cual se reemplazó el promotor *lacUV5* constitutivo, por el promotor nativo de *uvrY*. Respecto al efecto sobre la transcripción, se observó que la actividad β -galactosidasa en la cepa silvestre fue al menos 2 veces más alta que en la mutante *csrA* (Fig. 6C), sugiriendo que *CsrA* afecta indirectamente la transcripción de *uvrY*. En el caso de la traducción, se encontró que la actividad β -galactosidasa de la mutante *csrA* fue aproximadamente el 50% respecto a la cepa silvestre (Fig. 6D). Como se mencionó anteriormente, *CsrA* regula la traducción de mensajeros blanco, a través de su interacción con la región 5' UTR. Sin embargo el análisis *in silico* del transcrito de *uvrY*, no reveló ningún sitio aparente de unión a *CsrA* (datos no mostrados). Por lo tanto, estos resultados sugirieron que *CsrA* afecta indirectamente la expresión de *uvrY* tanto a nivel transcripcional, como a nivel traduccional.

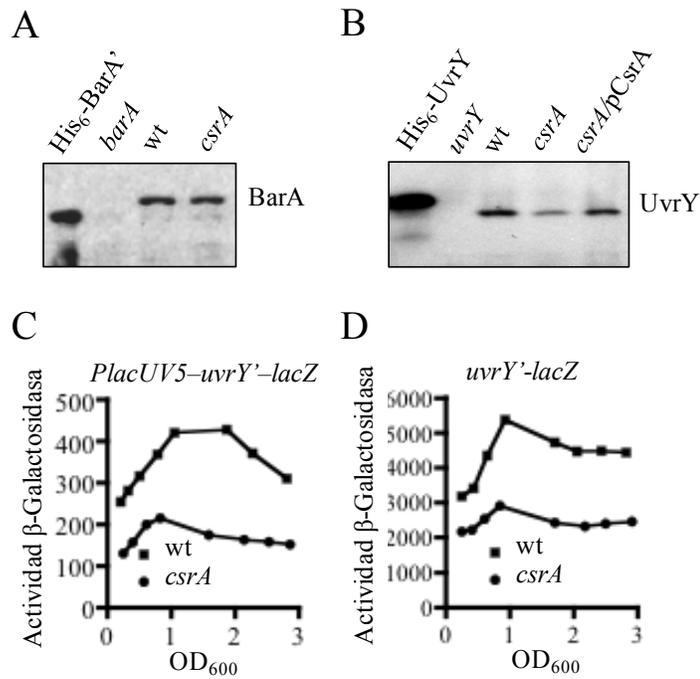


Figura 6. *CsrA* se necesita para la correcta expresión de *uvrY*. (A) Los niveles de la proteína BarA (PM 102.550 Da) en la cepa silvestre (KSB837) y en la mutante isogénica *csrA* (IFC5010) se determinaron a través de análisis de Western blot usando anticuerpos policlonales específicos. (B) Los niveles de la proteína UvrY (PM 23.890 Da) en la cepa silvestre y en las mutantes isogénicas *csrA* y *csrA* transformada con el plásmido pM X544 (indicado como pCsrA) se determinaron a través de análisis de Western blot usando anticuerpos policlonales específicos. La proteína BarA'-His₆ (PM 81.550 Da) cae desde sus primeros 198 aminoácidos, mientras la proteína UvrY-His₆ (PM 25.380) tiene residuos de aminoácidos adicionales, por la cadena de Histidinas. Se utilizaron extractos proteicos de las mutantes *barA* (BAKSB837) y *uvrY* (UYKSB837), en el primer carril de cada Western blot como controles negativos. (C-D) Efectos de *csrA* sobre la transcripción y la traducción de *uvrY*. Se tomaron muestras de cultivo de la cepa silvestre (cuadrados negros) y de la mutante *csrA* (círculos negros) conteniendo la fusión traduccional *PlacUV5-uvrY'-lacZ* (C) o la fusión del operón (*uvrY'-lacZ*) a diferentes tiempos a través de la curva de crecimiento y se ensayó su actividad β-galactosidasa. El ensayo de actividad β-galactosidasa se presenta en función del crecimiento (OD₆₀₀).

3. *La sobreexpresión de UvrY, pero no la simultánea con BarA, restaura la transcripción de csrB en la mutante csrA.*

De acuerdo con los datos anteriores, nos preguntamos si en la mutante *csrA*, la expresión ectópica de *uvrY* y/o de *barA* a partir de los plásmidos pUvrY (pMX539, sobreexpresa a *uvrY*) y pBarA (pBA29) (derivados de l pB R322), restauraban la expresión de *csrB*. Encontramos de acuerdo a lo esperado, que la expresión de *uvrY*, pero no la de *barA*, puede reestablecer la expresión de *csrB* (Fig. 7 A, B). Además, cabe mencionar que la presencia del plásmido que sobreexpresa a *uvrY* en la mutante *csrA*, resulta en la expresión de cantidades elevadas del sRNA CsrB, incluso desde la fase exponencial de crecimiento (Fig. 7A), un efecto que atribuimos a la vasta sobreexpresión de UvrY (Fig. 7D). Por otro lado, observamos que la sobreexpresión de una proteína mutante UvrY^{D54Q} en la cual se sustituyó el residuo aspartato fosforilable, por un residuo de glutamina, usando el plásmido pUvrY^{D54Q} (pMX540), no fue capaz de restaurar la transcripción de *csrB*, indicando que para que UvrY pueda funcionar como factor transcripcional, éste tiene que estar fosforilado (Fig. 7A, B). Al respecto es importante mencionar que UvrY se puede fosforilar tanto por BarA-P, como por acetil-P. De manera inesperada se encontró que, en contraste con el plásmido que sobreexpresa a UvrY, pUvrY (pMX539), el plásmido pUvrY-BarA (pMX541), el cual sobreexpresa simultáneamente a BarA y a UvrY, fue incapaz de reestablecer la transcripción de *csrB*, en la mutante *csrA* (Fig. 7A, B). Para asegurarnos que UvrY y BarA expresados a partir del plásmido pUvrY-BarA (pMX541) fueran funcionales, examinamos la expresión del reportero *csrB-lacZ* a través de ensayos de actividad β -galactosidasa con las mutantes nulas *uvrY* y *barA* transformadas con este plásmido y encontramos que la expresión de *csrB* se restauró en ambas mutantes (Fig. 7C), indicando que el plásmido pUvrY-BarA expresa proteínas funcionales. Además, el análisis de Western blot, usando anticuerpos policlonales específicos para UvrY y para BarA, revelaron cantidades similares de UvrY expresados en los plásmidos pUvrY, pUvrY^{D54Q} y pUvrY-BarA, y de BarA expresados en los plásmidos pBarA y pUvrY-BarA (Fig. 7D). Por lo tanto, pudimos concluir que la expresión y la funcionalidad de BarA y UvrY expresados por el plásmido pUvrY-BarA no eran la causa del resultado anterior.

Los resultados anteriores, en combinación con el hecho que BarA, al igual que otros sensores tripartitas, que son capaces de tener tanto actividad cinasa, como fosfatasa sobre su regulador de respuesta cognado [Dutta y col., 2000; Huynh y col., 2010] nos hicieron pensar en la posibilidad de que BarA probablemente permanecía activo en su actividad fosfatasa y no como cinasa en la mutante *csrA*. En este escenario, la fosforilación de UvrY expresada por el plásmido pUvrY en la mutante *csrA*, podría deberse al acetil-P y no a BarA. Dado que la actividad fosfatasa de BarA expresado en el cromosoma no puede compensarse con la vasta sobreexpresión de UvrY, podría permitir la acumulación de cantidades significativas de UvrY-P, culminando en la activación de la transcripción de *csrB*. Por otro lado, cuando cantidades comparables de BarA y de UvrY se expresan, por ejemplo, cuando se usa el plásmido pUvrY-BarA, la actividad fosfatasa de BarA puede desfosforilar a UvrY-P dependiente de acetil-P, y por lo tanto cancelar la regulación transcripcional.

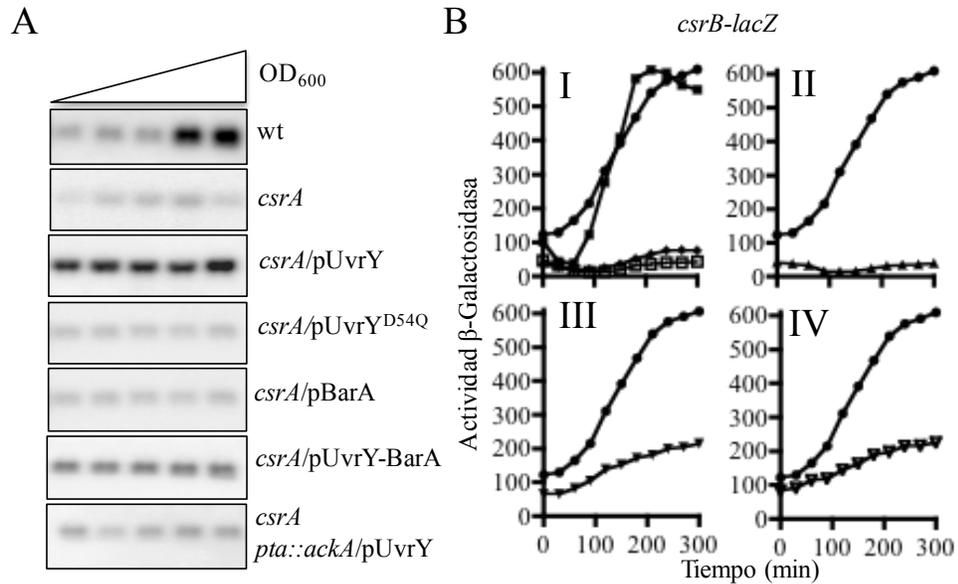


Figura 7. El acetil-P, pero no BarA, es el responsable de la fosforilación de UvrY en la mutante *csrA*. Efectos de la expresión ectópica de *uvrY*, *uvrY*^{D54Q}, *barA*, y *uvrY barA*, sobre la expresión de *csrB* en las mutantes isogénicas *csrA* y *csrA pta::ackA*. (A) Cultivos de la cepa silvestre (KSB837) y la mutante isogénica *csrA* (IFC5010) en presencia o ausencia de los plásmidos pMX539 (expresa a *uvrY* e indicado como pUvrY), pMX540 (expresa a *uvrY*^{D54Q}, teniendo Q sustituido por el D conservado fosforilable, e indicado como pUvrY *uvrY*^{D54Q}) pBA29 (expresa a *barA*, indicado por pBarA) o pMX541 (expresa a *uvrY* y a *barA*, indicado como pUvrY-BarA), y la triple mutante isogénica *csrA pta::ackA*, conteniendo el plásmido pMX539 (pUvrY) se crecieron en medio LB. Se aisló RNA total a partir de estas muestras tomado a lo largo de la curva de crecimiento (OD₆₀₀ de 0.3 a 2.0) y se analizó a través de Northern blot la expresión de *csrB*. El experimento se repitió tres veces, obteniéndose el mismo resultado. (B) Cultivos de la cepa silvestre conteniendo la fusión transcripcional *csrB-lacZ* (panel I, cuadrados negros), de la mutante *csrA* (panel I, cuadrados), y de la *csrA* transformada con los plásmidos pMX539 (pUvrY) (paneles I al IV, círculos), pBA29 (pBarA) (panel I, diamantes), pMX540 (pUvrY^{D54Q}) (panel II, triángulos), pMX541 (pUvrY-BarA) (panel III, triángulos), y la triple mutante isogénica *csrA pta::ackA* transformada con el plásmido pMX539 (pUvrY) (panel IV, triángulos) se diluyeron a una OD₆₀₀ ~ 0.05 en medio LB y se siguió el ensayo de actividad β-galactosidasa por 300 minutos. Se muestra el promedio de cuatro experimentos independientes (las desviaciones estándar fueron menores al 5%).

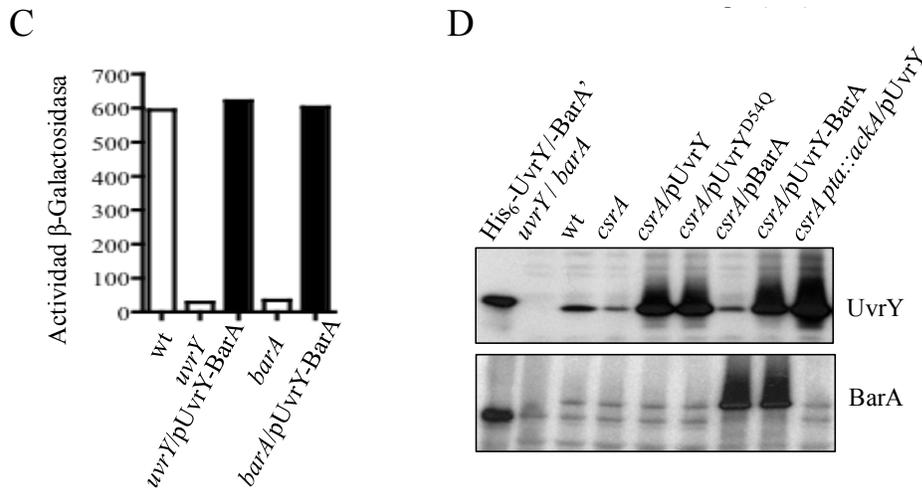


Figura 7 continuado. El acetil-P, pero no BarA, es el responsable de la fosforilación de UvrY en la mutante *csrA*. Efectos de la expresión ectópica de *uvrY*, *uvrY*^{D54Q}, *barA*, y *uvrY barA*, sobre la expresión de *csrB* en las mutantes isogénicas *csrA* y *csrA pta::ackA*. (C) La expresión ectópica de *uvrY* y *barA* a través de pMX541 (pUvrY-BarA) restaura la expresión de *csrB* en las mutantes *uvrY* y *barA*. Cultivos de la cepa silvestre (KSB837) y la mutantes isogénicas *uvrY* (UYKSB837) y *barA* (BAKSB837) con la fusión transcripcional *csrB-lacZ* y en presencia o ausencia del plásmido pUvrY-BarA (pMX541) se crecieron a una O.D₆₀₀ de ~2.0 en medio LB, y se llevó a cabo en ensayo de actividad β -galactosidasa. Se presenta el promedio de dos experimentos independientes. (D) Los niveles de la proteína UvrY (panel superior) y de BarA (panel inferior) en las cepas silvestre (KSB837), *csrA* (IFC5010) y *csrA* transformada con los siguientes plásmidos: pUvrY (pMX539), pUvrY^{D54Q} (pMX540), pBarA (pBA29), pUvrY-BarA (pMX541) y la triple mutante *csrA pta::ackA* (IFC5015) conteniendo el plásmido pUvrY (pMX539) se determinaron por análisis de Western blot. Las proteínas purificadas His₆-tag BarA' y UvrY y los extractos celulares de las mutantes *barA* (BAKSB837) y *uvrY* (UYKSB837) se utilizaron en las primeras líneas de cada Western blot.

4. *CsrA* se requiere para la función de la actividad cinasa de BarA

Para probar la hipótesis que en la mutante *csrA*, UvrY se fosforila a expensas del acetil-P y no es transfosforilado por BarA, realizamos lo siguiente. Se insertó la mutación *pta::ackA* en la mutante *csrA*, para bloquear la síntesis de acetil-P [Wolfe, 2005], y se probó el efecto de la sobreexpresión de UvrY con el plásmido pUvrY, sobre la expresión de *csrB*. Se encontró que aunque se expresan cantidades similares de UvrY en la triple mutante *csrA pta::ackA*/pUvrY y en la mutante *csrA*/pUvrY (Fig. 7D), no se activa la transcripción de *csrB*, a juzgar por el análisis de Northern blot y por el reportero con la fusión transcripcional *csrB-lacZ* (Fig. 7A, B). Estos resultados fueron consistentes con la idea de que en la mutante *csrA*, UvrY se fosforila exclusivamente a expensas del acetil-P y no a través de BarA.

Posteriormente, exploramos la posibilidad de que BarA permanece inactivo como cinasa, en la mutante *csrA*. Argumentamos que si la actividad de BarA **no** estaba afectada por CsrA, una vez que en la mutante *csrA* se restableciera la cantidad de la proteína UvrY, también se tendría que restablecer la transcripción de *csrB*. Por lo tanto, construimos el plásmido pUvrY_{PbarA} (pMX543), de bajo número de copias (derivado el pEXT21) que expresa a *uvrY*, en donde se reemplazó el promotor y el 5'-UTR nativo de *uvrY*, por el del gen *barA*, cuya expresión no está afectada por CsrA (Fig. 6 A). Este plásmido se transformó en una mutante *uvrY* y en una doble mutante *csrA uvrY*, y a continuación se examinó la cantidad de la proteína UvrY mediante análisis de Western blot (Fig. 8A). En acuerdo con lo esperado, se encontró que las mutantes transformadas con el plásmido pUvrY_{PbarA}, expresan cantidades similares a la cepa silvestre de la proteína UvrY (Fig. 8A). Sin embargo, este plásmido restauró la expresión de *csrB* solo en la mutante *uvrY*, no en la doble mutante *csrA, uvrY* (Fig. 8 B, C). Una explicación posible para esto es que CsrA se requiere también para la actividad cinasa de BarA.

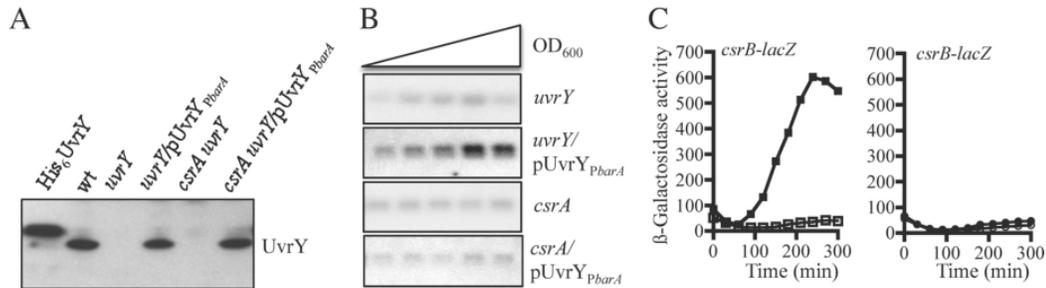


Figura 8. La expresión de *uvrY* independiente del control de CsrA, no es suficiente para la activación de la transcripción de *csrB* en una mutante *csrA*. A. Análisis de Western blot de extractos proteicos de la cepa silvestre y las mutantes isogénicas *uvrY*, *uvrY/pUvrY_{PbarA}*, (plásmido que expresa a *uvrY*, bajo el promotor y la región 5' UTR de *barA*), *uvrY, csrA* y *uvrY, csrA/pUvrY_{PbarA}*, usando el anticuerpo policlonal anti-UvrY. La proteína purificada His₆-tag UvrY se utilizó en la primera línea del Western blot. B. Análisis de Northern blot para determinar la expresión de *csrB* en las mutantes *uvrY*, *uvrY/pUvrY_{PbarA}*, *csrA* y *csrA/pUvrY_{PbarA}*. Se aisló RNA total a partir de muestras tomadas a lo largo de la curva de crecimiento (OD₆₀₀ 0.3 - 2.0). C. Ensayo de actividad β-galactosidasa con las mutantes con la fusión transcripcional *csrB-lacZ*, *uvrY* (cuadrados blancos), *uvrY/pUvrY_{PbarA}* (cuadrados negros), *csrA* (círculos blancos) y *csrA/pUvrY_{PbarA}* (círculos negros). Los experimentos se repitieron por triplicado, obteniéndose esencialmente los mismos resultados.

Tratando de argumentar estas conclusiones, pensamos que la expresión ectópica de UvrY, pero no la de la mutante UvrY^{D54Q} la cual es incapaz de fosforilarse, en una mutante *csrA* podría restablecer la expresión de *csrB* cuando las células crecen a pH 5.0 en presencia de acetato, el cual resulta en la producción de cantidades elevadas de acetil-P [Wanner y Wilmes-Riesenberg, 1992]. Por otro lado, la adición de formato, el cual actúa exclusivamente a través de BarA, no tendría efecto. Consistente con esta idea, la sobreexpresión de UvrY en la triple mutante *csrA pta::ackA*, la cual es incapaz de

convertir acetato a acetil-P, podría no restablecer la expresión de *csrB* cuando las células crecen a pH 5.0 en presencia tanto de acetato, como formato. En efecto, la transcripción de *csrB* en la mutante *csrA* a pH 5.0 se restauró por la expresión ectópica de UvrY solo en la presencia de acetato, pero no de formato, mientras que la sobreexpresión de UvrY^{D54Q} no tuvo efecto (Fig. 9 A, B). Además, no se observó activación de la transcripción de *csrB* en la triple mutante *csrA pta::ackA* transformada con el plásmido pUvrY (pMX539), cuando las células crecieron a pH 5.0 en presencia de acetato o formato (Fig. 9A, B). Por lo tanto, concluimos que cuando UvrY se sobreexpresa en la mutante *csrA*, la fosforilación de UvrY dependiente de acetil-P es la responsable de la activación de la transcripción de *csrB*.

Finalmente, razonamos que si CsrA se requiere para la adecuada actividad fosfatasa y cinasa de BarA, la sobreexpresión simultánea de UvrY y de BarA en la mutante *csrA* utilizando el plásmido pUvrY-BarA (pMX541) no debería restablecer la expresión de *csrB* cuando las células crecen a pH 5.0 en presencia de acetato y formato. El mismo resultado se esperaría en la mutante *csrA* transformada con el plásmido pUvrY_{pbarA}, (pMX543) que expresa a UvrY a niveles similares a los de la cepa silvestre. Esto porque BarA al estar permanentemente activo como fosfatasa, estaría desfosforilando a UvrY-P, dependiente de acetil-P y por lo tanto, anulando su efecto regulatorio. En efecto, no se detectó activación de la transcripción de *csrB* en la mutante *csrA* transformada con los plásmidos pUvrY-BarA y pUvrY_{pbarA} (Fig. 9A, B). Por otro lado, el restablecimiento de la expresión de la proteína UvrY a niveles similares a los de la cepa silvestre, a través del plásmido pUvrY_{pbarA} en la doble mutante *csrA barA*, donde no ocurre desfosforilación de UvrY a través de BarA, debería restaurar la expresión de *csrB* en presencia de acetato, pero no de formato. Efectivamente, la transcripción de *csrB* en la doble mutante *csrA barA/pUvrY_{pbarA}* en condiciones de crecimiento a pH 5.0 solo se restaura en presencia de acetato, pero no de formato (Fig. 9A, B). Todos los resultados anteriores indican que en la mutante *csrA*, BarA no puede activarse como cinasa, pero funciona como fosfatasa aún en la presencia de su estímulo. Por lo tanto, parece que uno o más genes cuya expresión está regulada a través de CsrA, pueden ser necesarios para la apropiada actividad de BarA.

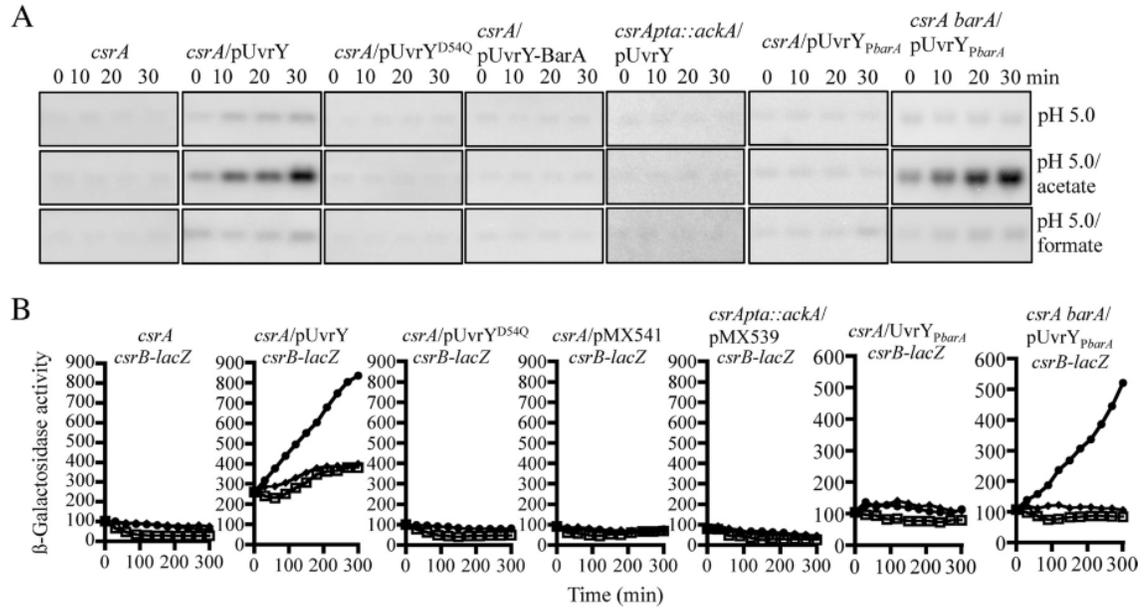


Figura 9. Efecto de CsrA sobre la actividad de BarA. (A) Análisis de Northern blot para determinar la expresión de *csrB* en las mutantes *csrA*, *csrA/pUvrY*, *csrA/pUvrY^{D54Q}*, *csrA/pUvrY-BarA*, *csrA pta::ackA/pUvrY*, *csrA/pUvrY_{PbarA}* y *csrA barA/pUvrY_{PbarA}*. El RNA se extrajo a partir de muestras de cultivos de LB amortiguado con 0.1 M homopiperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulfonic acid) (HOMOPIPES) a pH 5.0, tomadas a 0.2 de O.D₆₀₀ como el tiempo 0, después de agregar el estímulo de 7 mM de formate y/o 7 mM de acetato, se tomaron a los 10', 20', 30' y 40'. El experimento se repitió por triplicado, obteniéndose los mismos resultados. (B) Ensayo de actividad β-galactosidasa con la mutante con la fusión transcripcional *csrB-lacZ*, en las mutantes *csrA*, *csrA/pUvrY*, *csrA/pUvrY^{D54Q}*, *csrA/pUvrY-BarA*, *csrA pta::ackA/pUvrY*, *csrA/pUvrY_{PbarA}* y *csrA barA/pUvrY_{PbarA}* en medio LB amortiguado con HOMOPIPES a pH 5.0 con 6 mM de acetato o 6 mM de formate. (Cuadrados) sin tratamiento, (círculos) en presencia de acetato y (diamantes) en presencia de formate. Se presenta el promedio de cuatro experimentos independientes.

5. Datos no publicados

El punto crucial del circuito regulador BarA-UvrY-CsrA se encuentra en el balance entre la producción de los sRNAs CsrB y CsrC y la proteína libre CsrA. Los mecanismos que aseguran este equilibrio se pueden clasificar en dos grupos principales: los que modulan la activación y/o la fosforilación de los SDC y los mecanismos que regulan la expresión y/o estabilidad de los sRNAs Csr. A continuación se discutirá lo que se sabe de cada uno de éstos en *E. coli* y en diferentes especies bacterianas y la aportación en esta área con los resultados de este trabajo.

a) Mecanismos que modulan la activación/fosforilación del SDC.

La fosforilación del SDC está condicionada por la presencia y la detección de la señal específica a través de la HC. Si bien el estímulo específico no se ha determinado para todas las especies bacterianas, en el organismo modelo *E. coli*, la HC BarA se autofosforila en presencia de acetato, formato y otros ácidos grasos de cadena corta [Chávez y col., 2010], los cuales son metabolitos abundantes en el tracto gastrointestinal de hospederos mamíferos [Lawhon y col., 2002]. Consistentemente, en *P. fluorescens* el estatus del ciclo de Krebs influye en la señalización a través de GacS (homólogo de BarA) [Takeuchi y col., 2009]. Sin embargo, el estado de fosforilación de estos sistemas en *Pseudomonas*, depende también de las proteínas integrales de membrana RetS y LadS que actúan como antagonista y activador de GacS, respectivamente. Por un lado, RetS puede formar heterodímeros con GacS, previniendo su autofosforilación y por lo tanto la fosforilación del RR GacA [Goodman y col., 2009] y por otro, LadS se une a GacS y estimula su actividad a través de un mecanismo desconocido [Ventre y col., 2006; Workentine y col., 2009]. Aunque RetS y LadS parecen ser proteínas “especie-específicas”, en este trabajo reportamos que en *E. coli* la actividad cinasa y fosfatasa de BarA depende indirectamente de CsrA [Camacho y col., 2015]. Debido a que CsrA no afecta la producción del estímulo de BarA, es posible que una o más proteínas membranales, cuya expresión depende de CsrA modulen a través de un mecanismo similar al descrito en *P. aeruginosa* el estado de fosforilación de BarA, en respuesta a diferentes señales ambientales.

A través de una búsqueda utilizando las cepas de la colección Keio de *E. coli*, se identificaron mutantes que comparten un fenotipo similar al de una mutante *barA*, en cuanto a la producción de biopelículas y la motilidad celular. Se analizó la expresión de *csrB* en estas mutantes a través de Northern blot y nos llamó la atención la mutante *hflK*, la cual parece que expresa constitutivamente a *csrB* (Figura 10). De manera interesante, esta mutante codifica una proteína con un dominio flotilina, que en eucariotes son específicas para la formación de balsas lipídicas [Tavernarakis y col., 1999], involucradas en diferentes procesos de señalización como, transporte vesicular, establecimiento de la polaridad celular, regulación de canales iónicos, etc., [Browman y col., 2007]. HflK junto con las proteínas membranales HflC, YbbK y YqiK codifican este tipo de proteínas. Actualmente en el laboratorio trabajamos en investigar en efecto de estas proteínas sobre la activación del sistema BarA/UvrY y otros SDC. En procariontes, el papel de estas

proteínas 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 F lotilina) con KinC, la cinasa sensora que regula el estado de señalización [López y Kolter, 2010]. Respecto al sistema BarA/UvrY, se ha encontrado que al mutar estos genes la expresión de *csrB* se altera drásticamente (Figura 10). En el caso de las mutantes *hflC* y *hflK* la expresión parece estar constitutivamente inducida, mientras que en las mutantes *ybbk* y *yqik*, no parece haber expresión de *csrB*.

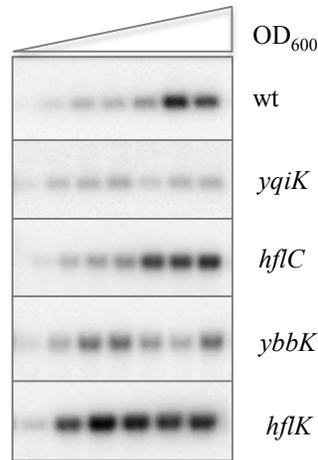


Figura 10. Efecto de mutantes relacionadas con balsas lipídicas sobre la expresión de *csrB*. (A) Análisis de Northern blot para determinar la expresión de *csrB* en las mutantes *yqiK*, *hflC*, *ybbK* y *hflK*. El RNA se extrajo a partir de muestras de cultivos de LB. El experimento se repitió por triplicado, obteniéndose los mismos resultados. **YqiK* se ha analizado por López y Kolter (2010), en donde se confirmó su participación en la formación de balsas.

b) Mecanismos que regulan la expresión y estabilidad sRNAs Csr/Rsm.

UvrY fosforilado es el único responsable de la activación de la expresión de CsrB y CsrC. Sin embargo, observaciones tempranas evidenciaron que en la mutante *csrA*, la expresión de estos está drásticamente afectada [Sukuki y col., 2002]. Debido a que CsrA no afecta la estabilidad y/o vida media de CsrB y/o CsrC [Sukuki y col., 2006], se sugirió que este efecto era vía UvrY. Se han encontrado hasta el momento dos proteínas que modulan positivamente la expresión de *uvrY* en *E. coli*. El factor transcripcional SdiA (suppressor of division inhibition) [Suzuki y col., 2002; Wei y col., 2001b], el cual es homólogo de LuxR de *Vibrio* spp., el regulador del *quorum-sensing* [Waters y Bassler, 2005], y la RNA helicasa DeaD [Vakulskas y col., 2014], asociada con actividades para la maduración del RNA ribosomal a bajas temperaturas [Iost y col., 2013], que afecta positivamente la traducción UvrY. Sin embargo, el papel de estas dos proteínas, no explica el efecto de una mutante *csrA*, en donde la expresión de *csrB* está drásticamente disminuida.

Por un lado, parece que SdiA afecta indirectamente la transcripción de *uvrY* en un mecanismo independiente de CsrA, ya que su traducción está reprimida directamente por CsrA [Yakhnin y col., 2011]. Y por otro, SdiA tiene efectos pleiotrópicos sobre múltiples aspectos fisiológicos de *E. coli* (sección 2.3.2). Por lo tanto pareciera que el efecto de CsrA sobre la traducción de SdiA está principalmente dirigido a regular otros fenotipos, más que al control de la expresión de *uvrY*. Respecto al efecto de DeaD, aunque se ha observado que puede modular positivamente la traducción de UvrY, este efecto es independiente de CsrA [Vakulskas y col., 2014].

Cabe mencionar que ninguna de las proteínas anteriores afectan el estado de fosforilación de UvrY, el cual es determinante para su activación como factor transcripcional. Con los resultados de este trabajo reportamos que el efecto de CsrA sobre la expresión de *csrB*, se debe a que CsrA modula indirectamente tanto la transcripción como la traducción de UvrY, pero además también regula indirectamente la actividad cinasa y fosfatasa de BarA [Camacho y col., 2015]. Estamos buscando a través de librerías genómicas el o los posibles reguladores transcripcionales y traduccionales que regulen a través de CsrA la expresión de UvrY. Sin embargo, es importante tener en mente que en la mutante *csrA* aún se sigue sintetizando a la proteína UvrY, por lo tanto es posible que además de la vía CsrA, hay otros factores que determinan su expresión.

Capítulo 5. Conclusiones

Debido a la observación de que en una mutante *csrA*, no se activa la transcripción de *csrB*, este proyecto estuvo enfocado en estudiar el efecto del regulador global CsrA, sobre la expresión y la actividad del SDCB *BarA-UvrY*. Los resultados presentados aquí, demuestran que la proteína CsrA se requiere para la correcta expresión del RR *UvrY*, y además para el adecuado funcionamiento de la HC bifuncional *BarA*. Respecto al efecto sobre la expresión de *UvrY*, se encontró que afecta tanto la transcripción, como la traducción. Respecto a la función de *BarA*, se mostró que afecta específicamente la modulación entre su actividad cinasa y fosfatasa. Este resultado es interesante ya que indica que en adición del estímulo de *BarA*, se necesita además, de una o más proteína(s) regulada(s) por CsrA, para la correcta actividad de *BarA* (Figura 11).

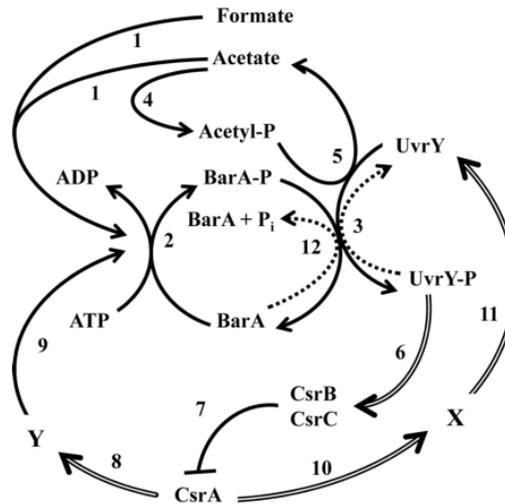


Figura 11. Modelo para el circuito regulatorio *BarA-UvrY-CsrA*. Bajo condiciones estimuladoras, el acetato y formate actúan como las señales específicas para activar a *BarA* (1), permitiendo su autofosforilación a expensas de ATP (2) y la transfosforilación de *UvrY* (3). *UvrY* también puede autofosforilarse a expensas del acetyl-P (5), el cual se produce a partir de acetato (4). *UvrY* fosforilado (*UvrY*-P) activa la expresión de los RNAs pequeños no-codificantes *CsrB* y *CsrC* (6), los cuales se unen y sequestran a la proteína *CsrA* (7) y por lo tanto antagonizan con sus efectos regulatorios sobre mRNAs blancas. Por otro lado, la proteína libre *CsrA* regula la expresión del factor *Y* (8), el cual se requiere para el apropiado funcionamiento entre la actividad cinasa y fosfatasa de *BarA* (9). Al mismo tiempo, *CsrA* afecta positivamente la expresión de *uvrY* (11) a través del control de la expresión del(os) regulador(es) (*X*) (10). Finalmente, bajo condiciones de crecimiento no estimuladoras, o en una mutante *csrA*, *BarA* actúa como fosfatasa de *UvrY*-P (12), dando lugar al silenciamiento del sistema. Las reacciones bajo condiciones estimuladoras y no estimuladoras están indicadas con líneas sólidas y punteadas, respectivamente. Las líneas dobles indican efectos sobre la expresión genética.

Capítulo 6. Perspectivas

1. Buscar a través de librerías genómicas, factores que afecten la expresión de *uvrY* y la actividad de BarA.
2. Determinar si en las mutantes *hlfC*, *hflK*, *ybbK* y *yqiK* el efecto sobre la expresión de *csrB* se debe a que el SDC BarA/UvrY está desregulado:
 - Confirmar a través de análisis de Western blot que estas mutantes NO afectan la síntesis de la proteína UvrY.
 - En las mutantes que sobreexpresan a *csrB* (*hflK*) anular a las enzimas responsables de la producción de acetil-P (Pta, AckA) y determinar si en esta triple mutante se continúa sobreexpresando a *csrB*.
 - En todas las mutantes, pero con particular énfasis en las que afectan negativamente la expresión de *csrB* (*ybbK*, *yqiK*) determinar a través de análisis de Western blot si la expresión de CsrA (la cual afecta la expresión de *csrB*) NO está afectada.
 - Determinar a través de análisis de Northern blot utilizando rimfampicina, si las proteínas HlfC, HflK, YbbK y YqiK NO afectan la vida media y/o estabilidad de CsrB y CsrC, debido a que pudieran interactuar con la proteína membranal CsrD.
 - Tratar de determinar si las proteínas HlfC, HflK, YbbK y YqiK interactúan con BarA, por ejemplo a través de análisis de colocalización mediante microscopía.
3. Para determinar si además el efecto de las mutantes *hlfC*, *hflK*, *ybbK* y *yqiK*, sobre la expresión de *csrB* se debe a que están reguladas directa o indirectamente de CsrA se propone lo siguiente:
 - Determinar si en la mutante *csrA* la síntesis de proteínas HlfC, HflK, YbbK y YqiK se encuentra afectada, por ejemplo a través de análisis de Western blot utilizando extractos proteicos de esta mutante con epítodos de las proteínas marcadas con anti-His o anti-HA.
 - Determinar a través de análisis de interacción proteína-RNA (EMSA) si CsrA se une a los transcritos *hlfC*, *hflK*, *ybbK* y *yqiK*. En este contexto es importante no olvidar incluir el control positivo del transcrito de *csrB*.

Capítulo 7. Referencias

- Abo-Amer AE, Munn J, Jackson K, Aktas M, Golby P, Kelly DJ, Andrews SC (2004) DNA interaction and phosphotransfer of the C₄-dicarboxylate-responsive DcuS-DcuR two-component regulatory system from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186: 1879-1889.
- Aiba H, Mizuno T y Mizushima S (1989) Transfer phosphoryl groups between two regulatory proteins involved in osmoregulatory expression of the *ompF* and *ompC* gene in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 264:8563-8567.
- Alex LA y Simon MI (1994) Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. *Trends Genet* 10:133-138.
- Alex LA, Borkovich KA y Simon MI (1996) Hyphal development in *Neurospora crassa*: Involvement of a two-component histidine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3416-3421.
- Alex LA, Korch C, Selitrennikoff CP, Simon MI (1998) COS1, a two-component histidine kinase that is involved in hyphal development in the opportunistic pathogen *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7069-7073.
- Alm E, Huang K y Arkin A (2006) The evolution of two-component systems in bacteria reveals different strategies for niche adaptation. *PLoS Comp Biol* 2:e143.
- Altier C, Suyemoto M y Lawhon SD (2000) Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion genes by *csrA*. *Infect Immun* 68:6790-6797.
- Ansaldi M, Jourlin-Castelli C, Lepelletier M, Théraulaz L, Méjan V (2001) Rapid dephosphorylation of the TorR response regulatory by the TorS sensor in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183:2691-2695.
- Ashby MK (2006) Distribution, structure and diversity of “bacterial” genes encoding two-component proteins in the Euryarchaeota. *Archaea* 2:11-30.
- Babitzke P y Romeo T (2007) CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr Opin Microbiol* 10:156-163.
- Babitzke P, Baker CS y Romeo T (2009) Regulation of translation initiation by RNA binding proteins. *Annu Rev Microbiol* 64:27-44.
- Baker CS, Eory 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.

- 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.
- Batchelor E, Walthers D, Kenny LJ, Goulian M (2005) The *Escherichia coli* CpxA-CpxR envelope stress response system regulates expression of the porins OmpF and OmpC. *J Bacteriol* 187:5723-5731.
- Beier D y Gross R. 2006. Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr Opin Microbiol* 9: 143-52.
- 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 of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 77:3552-3568.
- Bilwes AM, Alex LA, Crane BR y Simon MI (1999) Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell* 96:131-141.
- Bordi C, Lamy MC, Ventre I, Termine E, Hachani A, Fillet S, Roche B, Blevès S, Mejean V, Lazdunski A, Filloux A (2010) Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Mol Microbiol* 76:1427-1443.
- Brenic A y Lerooy S (2009) Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Mol Microbiol* 72:612-632.
- Browman DT, Hoegg MB, Robbins SM (2007) The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers. *Trends Cell Biol* 17:394-402.
- Brown JL, North S y Bussey H (1993) SKN7, a yeast multicopy suppressor of a mutation affecting cell wall beta-glucan assembly, encodes a product with domains homologous to prokaryotic two-component regulators and to heat shock transcription factors. *J Bacteriol* 175:6908-6915.
- Cai SJ e Inouye M (2002) EnvZ-OmpR interaction and osmoregulation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 277:24155-24161.
- Campbell TL, Ederer CS, Allali-Hassani A, Brown ED (2007) Isolation of the *rstA* gene as a multicopy suppressor of YjeE, an essential ATPase of unknown function in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 189:3318-332.
- Capra EJ y Laub MT (2012) Evolution of two-component signal transduction systems. *Annu Rev Microbiol* 66:325-347.
- Cariss SJL, Tayler AE y Avison MB (2008) Defining the growth conditions and promoter-proximal DNA sequences required for activation of gene expression by CreBC in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 190:3930-3939.

- Casino P, Rubio V y Marina A (2009) Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell* 139:325-336.
- 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 Environ Microbiol* 61:1959-1967.
- Chavez RG, Alvarez AF, Romeo T, Georgellis D (2010) The physiological stimulus for the BarA sensor kinase. *J Bacteriol* 192:2009–2012.
- Cheung J y Hendrickson W A (2008) Crystal structures of C₄-dicarboxylate ligand complexes with sensor domains of histidine kinases DcuS and DctB. *J Biol Chem* 283:30256-30265.
- Cheung J, Bingman CA, Reingold M, Hendrickson WA, Waldburger CD (2008) Crystal structure of a functional dimer of the PhoQ sensor domain. *J Biol Chem* 283:13762-13770.
- Clarke MB, Hughes DT, Zhu C, Boedeker EC, Sperandio V (2006) The QseC sensor kinase: A bacterial adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:10420–10425.
- Cohen P (2002) The origins of protein phosphorylation. *Nature Cell Biol* 4:E127-E130.
- Cui Y, Chatterjee A y Chatterjee AK (2001) Effects of the two-component system comprising GacA and GacS of *Erwinia carotovora* subs. *carotovora* on the production of global regulatory RsmB RNA, extracellular enzymes, and harpin_{ECC}. *Mol Plant Microbe Interact* 14:516-526.
- Datsenko KA y Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6640–6645.
- Davalos-Garcia M, Conter A, Toesca I, Gutierrez C, Cam K (2001) Regulation of *osmC* gene expression by the two-component system *rscB-rscC* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183: 5870-5876.
- Dillon SC y Dorman CJ (2010) Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nature Reviews Microbiology* 8:185-195.
- Dong T y Shellhorn HE (2009) Control of RpoS in global gene expression of *Escherichia coli* in minimal media. *Mol Genet Genomics* 281:19-33.
- Dubey AK, Baker CS, Romeo T, Babinzke P (2005) RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA-RNA interaction. *Rna* 11:1579-1587.
- Dubey AK, Baker CS, Suzuki K, Jones AD, Pandit P, Romeo T, Babinzke 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.

- Dutta R, Qin L y Inouye M (1999) Histidine kinases: diversity of domain organization. *Mol Microbiol* 34:633-640.
- Dutta R, Yoshida T e Inouye M (2000) The critical role of the conserved Thr247 residue in the functioning of the osmosensor EnvZ, a histidine kinase/phosphatase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 275:38645-38653.
- Dykxhoorn DM, St Pierre R, Linn T (1996) A set of compatible *tac* promoter expression vectors. *Gene* 177:133-136.
- Dyszel 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.
- Edwards AN, Patterson-Fortin LM, Vakulskas CA, Mercante JW, Potrykus K, Vinella D, Camacho MI, Fields JA, Thompson SA, Georgellis D, Cashel M, Babitzke P, Romeo T (2011) Circuitry linking the Csr and stringent response global regulatory systems. *Mol Microbiol* 80:1561-1580.
- Eguchi Y, Oshima T, Mori H, Aono R, Yamamoto K, Ishihama A, Utsumi R (2003) Transcription regulation of the drug efflux genes by EvgAS, a two-component system in *Escherichia coli*. *Microbiology* 149:2819–2828.
- Eisenbach M (1996) Control of bacterial chemotaxis. *Mol Microbiol* 20: 903–910.
- Feng J, Atkinson MR, McCleary W, Stock JB, Wanner BL, Ninf AJ (1992) Role of phosphorylated metabolic intermediates in the regulation of glutamine synthetase synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174:6061-6070.
- Fisher SL, Jiang W, Wanner BL, Walsh CT (1995) Cross-talk between the histidine protein kinase VanS and the response regulator PhoB. Characterization and identification of a VanS domain that inhibits activation of PhoB. *J Biol Chem* 270:23143-23149.
- Forst SA y Roberts DL (1994) Signal transduction by the EnvZ-OmpR phosphotransfer system in bacteria. *Res Microbiol* 145: 363–373.
- Fortune DR, Suyemoto M y Altier C (2006) Identification of CsrC and characterization of its role in epithelial cell invasion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* 74:331-339.
- Galperin MY (2005) A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: Bacterial IO, extroverts and introverts. *BMC Microbiol* 5:35.
- Galperin MY (2006) Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J Bacteriol* 188:4169-4182.
- Galperin MY (2010) Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Curr Opin Microbiol* 13: 150-159.

- 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* 174:5382-5390.
- Georgellis D, Kwon O y Lin ECC (1999) Amplification of signaling activity of the Arc two-component system of *Escherichia coli* by anaerobic metabolites: an in vitro study with different protein modules. *J Biol Chem* 274: 35950-35954.
- Georgellis D, Kwon O, De Wulf P, Lin EC (1998) Signal decay through a reverse phosphorelay in the Arc two-component signal transduction system. *J Biol Chem* 273:32864-32869.
- Georgellis D, Kwon O, Lin ECC (2001) Quinones as the redox signal for the Arc two-component system of bacteria. *Science* 292:2314-2316.
- Georgellis D, Lynch SA y Lin ECC (1997) In vitro phosphorylation study of the Arc two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179: 5429-5435.
- Goodman AL, Kulasekara B, Rietsch A, Boyd D, Smith RS, Lory S (2004) A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev Cell* 7:745-754.
- Goodman AL, Merighi 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
- Groisman EA (2001) The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol* 183:1835-1842.
- Gudapaty S, Suzuki K, Wang X, Bibitzke P, Romeo T (2001) Regulatory interactions of Csr components: the RNA binding protein CsrA activates *csrB* transcription in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183:6017-1027.
- Gutierrez P, Li Y, Osborne MJ, Pomerantseva E, Liu Q, Gehring K (2005) Solution structure of the carbon storage regulator protein CsrA from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187:3496-3501.
- Hagiwara D, Yamashino T y Mizuno T (2004) A genome-wide view of the *Escherichia coli* BasS-BasR two-component system implicated in iron-responses. *Biosci Biotechnol Biochem* 68:1758-1767.
- Haldimann A y Wanner BL (2001) Conditional-replication, integration, excision, and retrieval plasmid-host systems for gene structure-function studies of bacteria. *J Bacteriol* 183:6384-6393.
- Hammer BK, Tateda ES y Swanson MS (2002) A two-component regulator induces the transmission phenotype of stationary-phase *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* 44:107-118.

- Hermann R y Kirsten J (2010) The complexity of the simple two-component system KdpD/KdpE in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 304:97-106.
- Hess JF, Oosawa K, Kaplan N y Simon MI (1988) Phosphorylation of three proteins in the signaling pathway of bacterial chemotaxis. *Cell* 53:79-87.
- Hsu J L, Chen H C, Peng H L, Chang H Y (2008) Characterization of the histidine-containing phosphotransfer protein B-mediated multistep phosphorelay system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Biol Chem* 283:9933-9944.
- Hua J, Chang C, Sun Q y Meyerowitz EM (1995) Ethylene insensitivity conferred by *Arabidopsis* *ERS* gene. *Science* 269:1712-1714.
- Huynh T N, Noriega C E y Stewart V (2010) Conserved mechanism for sensor phosphatase control of two-component signaling revealed in the nitrate sensor NarX. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:21140-21145.
- Iost I, Bizebard T, Dreyfus M (2013) Functions of DEAD-box proteins in bacteria: current knowledge and pending questions. *Biochim Biophys Acta* 1829:866-977.
- Jiang P, Atkinson MR, Srisawat C, Sun Q, Ninfa AJ (2000) Functional dissection of the dimerization and enzymatic activities of *Escherichia coli* nitrogen regulator II and their regulation by the PII protein. *Biochemistry* 39:13433-13449.
- Jonas K, Edwards AN, Ahmad I, Romeo T, Romling U, Melefors O (2010) Complex regulatory network encompassing the Csr, c-di-GMP and motility systems of *Salmonella typhimurium*. *Environ Microbiol* 12:254-540.
- Jonas K, Edwards AN, Simm R, Romeo T, Romling U y Melefors O (2008) The RNA binding protein CsrA controls cyclic di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins. *Mol Microbiol* 70:236-257.
- Jonas K, Tomenius H, Romling U, Georgellis D, Melefors O (2006) Identification of YhdA as a regulator of the *Escherichia coli* carbon storage regulation system. *FEMS Microbiol Lett* 264:232-237.
- Jorgensen MG, Maureen K T, Havelund J, Valentin-Hansen P, Sartz G (2013) Dual function of the McaS small RNA in controlling biofilm formation. *Genes & Dev* 27:1132-1145.
- Kaspar S, Perozzo R, Reinelt S, Meyer M, Pfister K, Scapozza L, Bott M (1999) The periplasmic domain of the histidine autokinase CitA functions as a highly specific citrate receptor. *Mol Microbiol* 33:858-872.
- Kay E, Dubuis C y Haas D (2005) Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:17136-17141.

- Kay E, Humair B, Dénervaud V, Riedel K, Spahr S, Eberl, Valverde C, Hass D (2006) Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188:6026-6033.
- Kong W, Chen L, Zhao J, Shen T, Surette MG, Shen L, Duan K (2013) Hybrid sensor kinase PA1611 in *Pseudomonas aeruginosa* regulates transitions between acute and chronic infection through direct interaction with RetS. *Mol Microbiol* 88:784–797.
- Kulkarni PR, Cui X, Williams JW, Stevens AM, Kulkarni RV (2006) Prediction of CsrA-regulating small RNAs in bacteria and their experimental verification in *Vibrio fischeri*. *Nucleic Acids Res* 34:3361-3369.
- Kulkarni PR, Jia T, Kuehne SA, Kerkering TM, Morris ER, Searle MS, Heeb S, Rao J, Kulkarni RV (2014) A sequence-based approach for prediction of CsrA/RsmA targets in bacteria with experimental validation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res* 42:6811-6825.
- Kuriyan J y Eisenberg D (2007) The origin of protein interactions and allostery in colocalization. *Nature* 450:983-990.
- Kwon O, Georgellis D y Lin EC (2000) Phosphorelay as the sole physiological route of signal transmission by the Arc two-component system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 182:3858-3862.
- Kyriakidis DA, Theodorou MC, Filippou PS, Kyriakidis KD, Tiligada E (2008) Effect of histamine on the signal transduction of the AtoS-AtoC two component system and involvement in poly-(R)-3-hydroxybutyrate biosynthesis in *Escherichia coli*. *Amino acids* 35:45–52.
- Lapouge K, Schubert M, Allain FH-T, Hass D (2008) Gac/Rsm signal transduction pathway of γ -proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behavior. *Mol Microbiol* 67:241-253.
- 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.
- Lawhon SD, Maurer R, Suyemoto M, Altier C (2002) Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Mol Microbiol* 46:1451-1464.
- Leblanc SKD, Oates C W y Raiivo TL (2011) Characterization of the induction and cellular role of the BaeSR two-component envelope stress response of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 193:3367-3375.
- Lee B, Schramm A, Jagadeesan S y Higgs PI (2010) Two-component systems and regulation of developmental progression in *Myxococcus xanthus*. *Methods Enzymol* 471:253-278.

- Lee J, Jayaraman A y Wood TK (2007) Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. *BMC Microbiol* 7:42.
- Lenz DH, Miller MB, Zhu J, Kularni RV, Bassler BL (2005) CsrA and three redundant small RNAs regulate quorum sensing in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* 58:1186-1202.
- Leonhartsberger S , H uber A , L ottspeich F , B öck A (2001) T he *hydH/G* genes from *Escherichia coli* code for a zinc lead responsive two-component regulatory system. *J Mol Biol* 307:93-105.
- 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.
- Liu X , P eña-Sandoval GR, Wanner B L, J ung WS, G eorgellis D , K won O (2009) Evidence against the physiological role of acetyl phosphate in the phosphorylation of the ArcA response regulator in *Escherichia coli*. *J Microbiol* 47:657-662.
- López D y Kolter R (2010) Functional microdomains in bacterial membranes. *Genes & Development* 24:1893–1902.
- Lukat G S, M cCleary WR, S tock A M, S tock J M (1992) Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phosphor-donors. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:718-722.
- Maeda T, Wurgler-Murphy SM y Saito H (1994) A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* 369:242-245.
- Malpica R, Franco B, Rodriguez C, Kwon O, Georgellis D (2004) Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:13318-13323.
- Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Penny D (2002) Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:12246-12251.
- Martínez L C, Martínez-Flores I, Salgado H, Fernández-Mora M, Medina-Rivera A, Puente JL, Collado-Vides J, Bustamante V H (2014) In silico identification and experimental characterization of regulatory elements controlling the expression of the *Salmonella csrB* and *csrC* genes. *J Bacteriol* 196:325-36.
- McCleary WR, Stock JB y N infa A J (1993) Is a cetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*? *J Bacteriol* 175:2793-2798.
- Mercante J, Edwards AN, Dubey AK, Babitzke P, Romeo T (2009) Molecular geometry of CsrA (RsmA) binding to RNA and its implications for regulated expression. *J Mol Biol* 18:511528.

- Mercante J, Suzuki K, Cheng X, Babitzke P, Romeo T (2006) Comprehensive alanine-scanning mutagenesis of *Escherichia coli* CsrA defines two subdomains of critical functional importance. *J Biol Chem* 281:31832-31842.
- Michael B, Smith J N, Swift S, Heffron F, Ahmer B M (2001) SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities. *J Bacteriol* 183:5733-5742.
- Miller J H (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Molofsky AB y Swanson MS (2003) *Legionella pneumophila* CsrA is a pivotal repressor of transmission traits and activator of replication. *Mol Microbiol* 50:445-461.
- Mondragon V, Franco B, Jonas K, Suzuki K, Romeo T, Melefors O, Georgellis D (2006) pH-dependent activation of the BarA-UvrY two-component system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 188:8303-8306.
- Moolenaar GF, van Sluis CA, Backendorf C, van de Putte P (1987) Regulation of the *Escherichia coli* excision repair gene *uvrC*. Overlap between the *uvrC* structural gene and the region coding for a 24 kD protein. *Nucleic Acids Res* 15:4273-4289.
- Morris ER, Hall G, Li C, Heeb S, Kulkarni R V, Lovelock L, Silistre H, Messina M, Cámara M, Emmsley J, Williams P, Earle MS (2013) Structural rearrangement in an RsmA/CsrA ortholog of *Pseudomonas aeruginosa* creates a dimeric RNA-binding protein, RsmN. *Structure* 21:1659-1671.
- Nagasawa S, Tokishita S, Aiba H, Mizuno T (1992) A novel sensor regulator protein that belongs to the homologous family of signal-transduction proteins involved in adaptive responses in *E. coli*. *Mol Microbiol* 6: 799-807.
- Oshima T, Aiba H, Masuda Y, Kanaya S, Sugiura M, Wanner BL, Mori H, Mizuno T (2002) Transcriptome analysis of a full two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 46:281-291.
- Ota IM y Varshavsky A (1993) A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science* 262:566-569.
- Otto K y Silhavy TJ (2002) Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2287-2292.
- Outten FW, Huffman DL, Hale JA y O'Halloran TV (2001) The independent *cue* and *cus* systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 276:30670-30677.
- Pannuri A, Yakhnin H, Vakulskas CA, Edwards AN, Babitzke P, Romeo T (2012) Translational repression of NhaR, a novel pathway for multi-tier regulation of biofilm circuitry by CsrA. *J Bacteriol* 194:79-89.

Parkinson JS y Kofoid EC (1992) Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet* 26:71-112.

Patten CL, Kirchhof MG, Schertzberg MR, Morton RA, Shellhorb HE (2004) Microarray analysis of RpoS-mediated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Mol Genet Genomics* 272:580-591.

Peña-Sandoval GR y Georgellis D (2010) The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli* autophosphorylates by an intramolecular reaction. *J Bacteriol* 192:1735-1739.

Peña-Sandoval GR, Kwon O y Georgellis D (2005) Requirement of the receiver and phosphotransfer domains of ArcB for efficient dephosphorylation of phosphorylated ArcA in vivo. *J Bacteriol* 187:3267-3272.

Pernestig AK, Georgellis D, Romeo T, Suzuki K, Tomenius H, Normark S, Melefors O (2003) The *Escherichia coli* BarA-UvrY two-component system is needed for efficient switching between glycolytic and gluconeogenic carbon sources. *J Bacteriol* 185:843-853.

Pernestig AK, Melefors O y Georgellis D (2001) Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 274:35950-35954.

Pessi G, Williams F, Hindle Z, Heurlier K, Holden MT, Cámara M (2001) The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 183:6676-6683.

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.

Reichenbach B, Göpel Y y Görke B (2009) Dual control by perfectly overlapping σ^{54} - and σ^{70} -promoters adjuvants small RNA GlmY expression to different environmental signals. *Mol Microbiol* 74:1054-1070.

Reimann C, Valverde C, Kay E, Haas 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.

Reinelt S, Hofmann E, Gerharz T, Bott M, Madden DR (2003) The structure of the periplasmic ligand-binding domain of the sensor kinase CitA reveals the first extracellular PAS domain. *J Biol Chem* 278:39189-39196.

Rodrigue A, Quentin Y, Lazdunski A, Mejean V, Foglino M (2000) Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: Why so many? *Trends Microbiol* 8:498-504.

Romeo T, Gong M, Liu MY, Brun-Zinkernagel AM (1993) Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen

- biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *J Bacteriol* 175:4744-4755.
- Romeo T, Vakulskas CA, Babitzke P (2013) Post-transcriptional regulation on a global scale: form and function of Csr/Rsm systems. *Environ Microbiol* 15:313–324.
- 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.
- Sahr T, Brüggemann H, Jules M, Lomma M, Albert-Weissenberger C, Cazalet C, Buchrieser C (2009) Two small ncRNAs jointly govern virulence and transmission in *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* 72:741-762.
- Sahr T, Rusniok C, Dervins-Ravault D, Sismeiro O, Coppee JY, Buchrieser C (2012) Deep sequencing defines the transcriptional map of *L. pneumophila* and identifies growth phase-dependent regulated ncRNAs implicated in virulence. *RNA Biol* 9:503–519
- Schubert M, Lapouge K, Duss O, Oberstrass FC, Jelesarov I, Hass D, Allain FH (2007) Molecular basis of messenger RNA recognition by the specific bacterial repressing clamp RsmA/CsrA. *Nat Struct Mol Biol* 14:807-813.
- Schuster SS, Noegel AA, Oehme F, Gerisch G, Simon MI (1996) The hybrid histidine kinase DokA is part of the osmotic response system of *Dictyostelium*. *EMBO J* 15:3880-3889.
- Silva JC, Haldimann A, Prahalad MK, Walsh CT, Wanner BL (1998) In vivo characterization of the type A and B vancomycin-resistant enterococci (VRE) VanRS two-component system in *Escherichia coli*: a nonpathogenic model for studying the VRE signal transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11951-11956.
- Skerker JM, Perchuk BS, Siryaporn A, Lubin EA, Ashenberg O, Goulian M, Laub MT (2008) Rewiring the specificity of two-component signal transduction systems. *Cell* 133:1043-1054.
- Sola-Landa A, Moura RS, Martín JF (2003) The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:6133-6138.
- Stewart V (2003) Nitrate- and nitrite-responsive sensors NarX and NarQ of proteobacteria. *Biochem Soc Trans* 31:1–10.
- Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* 69:183-215.
- Surette MG, Levit M, Liu Y, Lukat G, Ninfa EG, Ninfa A, Stock JB (1996) Dimerization is required for the activity of the protein histidine kinase CheA that mediates signal transduction in bacterial chemotaxis. *J Biol Chem* 271:939-945.

Suzuki K, Babitzke P, Kushner SR, Romeo T (2006) Identification of a novel regulatory protein (CsrD) that targets the global regulatory RNAs CsrB and CsrC for degradation by RNase E. *Genes Dev* 20:2605-2617.

Suzuki K, Wang X, Weilbacher T, Pernestig AK, Melefors O, 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.

Swanson RV, Bourret RB, Simon MI (1993) Intermolecular complementation of the kinase activity of CheA. *Mol Microbiol* 8:435-441.

Swift S, Lynch M, Fisch L, Kirke DF, Tomas JM, Stewart GS, Williams P (1999) Quorum sensing-dependent regulation and blockage of the xop protease production in *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun* 67:5192-5199.

Takeuchi K, Kiefer P, Reimann C, Keel C, Dubuis C, Rolli J, Vorholt JA, Haas D (2009) Small RNA-dependent expression of secondary metabolism is controlled by Krebs cycle function in *Pseudomonas fluorescens*. *J Biol Chem* 284:34976–34985.

Tanaka T, Saha SK, Tomomori C, Ishima R, Liu D, Tong KI, Heiyoung P, Dutta R, Qin L, Swindells MB, Yamazaki T, Ono AM, Kainosho M, Inouye M, Ikura M (1998) NMR structure of the histidine kinase domain of the *E. coli* osmosensor EnvZ. *Nature* 396:88-92.

Tavernarakis N, Driscoll M, Kyripides NC (1999) The SPFH domain: implicated in regulating targeted protein turnover in stomatins and other membrane-associated proteins. *Trends Biochem Sci* 24:425-427.

Teplitski M, Goodier RI, Ahmer BM (2003) Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in Salmonella. *J Bacteriol* 185:7257-7265.

Timmermans J, Van Melderen L (2010) Post-transcriptional global regulation by CsrA in bacteria. *Cell Mol Life Sci* 67:2897-908.

Tomenius H, Pernestig AK, Mendez-Catala CF, Georgellis D, Normark S, Melefors O (2005) Genetic and functional characterization of the *Escherichia coli* BarA-UvrY two-component system: point mutations in the HAMP linker of the BarA sensor give a dominant-negative phenotype. *J Bacteriol* 187:7317-7324.

Tomomori C, Tanaka T, Dutta R, Park H, Saha SK, Zhu Y, Ishima R, Liu D, Tong KI, Kurokawa H, Qian H, Inouye M, Ikura M (1999) Solution structure of the homodimeric core domain of *Escherichia coli* histidine kinase EnvZ. *Nat Struct Biol* 6:729-734.

Vakulskas CA, Pannuri A, Cortés-Selva D, Zere TY, Ahmer BM, Babitzke P, Romeo T (2014) Global effects of the DEAD-box RNA helicase DeaD (CsdA) on gene expression over a broad range of temperatures. *Mol Microbiol* 92:945-958.

Ventre I, Goodman AL, Vallet-Gely I, Vasseur P, Soscia C, Molin S, Bleves S, Lazdunski A, Lory S, Filloux A (2006) Multiple sensors control reciprocal expression of

- Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:171–176.
- Walk ST, Alm EW, Gordon DM, Ram JL, Toranzos GA, Tiedje JM, Whittam TS (2009) Cryptic lineages of the genus *Escherichia*. *Appl Environ Microbiol* 75:6534-6544.
- Wang X, Dubey AK, Suzuki K, Baker CS, Babitzke P, Romeo T (2005) CsrA post-transcriptionally represses *pgaABCD*, responsible for synthesis of a biofilm polysaccharide adhesion of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 56:1648-1663.
- Wanner BL (1992) Involvement of phosphotransacetylase, acetate kinase, and acetate phosphate synthesis in control of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174:2124-2130.
- Wanner BL (1992) Is cross regulation by phosphorylation of two-component response regulator proteins important in bacteria? *J Bacteriol* 174:2053-2058.
- Waters CM y Bassler BL (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:319-346.
- Wei BL, Brun-Zinkernagel AM, Simecka JW, Pruss BM, Babitzke P, Romeo T (2001)a Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 40:245-256.
- Wei Y, Lee JM, Smulski DR, LaRossa RA (2001)b Global impact of *sdiA* amplification revealed by comprehensive gene expression profiling of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183:2265-2272.
- Weilbacher T, Suzuki K, Dubey AK, Wang X, Gudapaty S, Mirozov I, Baker CS, Georgellis D, Babitzke P, Romeo T (2003) A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 48:657–670.
- Wilkinson JQ, Lanahan MB, Yen H-C, Giovannoni JJ, Klee HJ (1995) A nethylene-inducible component of signal transduction encoded by *Never-ripe*. *Science* 270:1807-1809.
- Wolfe AJ (2005) The acetate switch. *Microbiol Mol Biol Rev* 69:12-50.
- Workentine ML, Chang L, Ceri H, Turner RJ (2009) The GacS-GacA two-component regulatory system of *Pseudomonas fluorescens*: a bacterial two-hybrid analysis. *FEMS Microbiol Lett* 292: 50-56.
- Wright JS y Kadner R (2001) The phosphoryl transfer domain of UhpB interacts with the response regulator UhpA. *J Bacteriol* 183: 3149-3159.
- Yakhnin H, Yakhnin AV, Baker CS, Sineva E, Berezin I, Romeo T, Babitzke P (2011) Complex regulation of the global regulatory gene *csrA*: CsrA-mediated translational repression, transcription from five promoters by $E\sigma^{70}$ and $E\sigma(S)$, and indirect transcriptional activation by CsrA. *Mol Microbiol* 81:689-704.

Yamamoto K e Ishihama A (2005) Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper. *Mol Microbiol* 56:215-227.

Yuanda S, Peisach D, Pioszak AA, Xu Z, Ninfa AJ (2004) Crystal structure of the C-terminal domain of the two-component system transmitter protein nitrogen regulator II (NR-II; NtrB), regulator of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 43:6670-6678.

Zhang JP y Normark S (1996) Induction of gene expression in *Escherichia coli* after pilus-mediated adherence. *Science* 273: 1234–1236.

Zhu Y, Qin L, Yoshida T, Inouye M (2000) Phosphatase activity of histidine kinase EnvZ without kinase catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7808-7813.

Apéndice A. Sistemas de Dos-Componentes en *Escherichia coli*

En el organismo modelo *E. coli*, cuyo hábitat es normalmente el tracto gastrointestinal de los animales de sangre caliente (aunque también se han encontrado así mismo en el ambiente) [Walk y col., 2009], se han encontrado aproximadamente 30 SDC, los cuales controlan diversos aspectos de su fisiología celular. En la siguiente tabla se resume brevemente la función de los SDC en la bacteria modelo *E. coli*, así como las condiciones ambientales que funcionan como su estímulo.

Tabla 1. SDC en el organismo modelo *E. coli*.

Sistema	Función	Inducción	Referencias
AtoS-AtoC	Activa la transcripción del operón <i>atoDAEB</i> , el cual codifica las enzimas catabólicas de los ácidos grasos	Acetoacetato, histamina, espermidina, e inhibidor de la calmodulina C48/80.	Kyriakidis y col., 2008.
BaeS-BaeR	Modula la resistencia a drogas mediante la expresión de los genes <i>mdtABC</i> , <i>acrD</i> , <i>spy</i> y <i>yegMNOP</i> , los cuales codifican sistemas de exportación multidrogas.	Indol y sobreexpresión de adhesina PapG.	Leblanc y col., 2011.
BasS-BasR	Participa en la respuesta a estrés por exceso de hierro en el medio. Regula la expresión del operón <i>yfbE</i> , el cual está involucrado en la modificación de lipopolisacáridos.	Hierro extracelular.	Hagiwara y col., 2004.
CheA-CheY	Participa en la quimiotaxis. El RR CheY~P interactúa directamente con el motor flagelar Flim para causar una rotación en el sentido de las manecillas del reloj.	Quimioattractantes como la serina y el aspartato.	Eisenbach, 1996.
CitA-CitB	Regulador maestro que activa la transcripción de <i>citCDEFXGT</i> , <i>citAB</i> y <i>mdh</i> , involucrados en el catabolismo anaeróbico del citrato.	Citrato en condiciones anaeróbicas.	Kaspar y col., 1999.
CpxA-CpxR	Regula la expresión de las porinas OmpC y OmpF.	Estrés de envoltura celular: pH alcalino, proteínas mal plegadas, perturbaciones físicas o químicas del ambiente.	Batchelor y col., 2005. Otto y Silhavy, 2002.

CreC-CreB	Controla la expresión del operón <i>creABCD</i> , el cual codifica proteínas de diversas, como enzimas intermediarias metabólicas.	Crecimiento en medio mínimo y aeróbico, cuando los productos de la fermentación se utilizan como fuentes de carbono.	Cariss y col., 2008.
CusS-CusR	Activa la expresión de los genes <i>cusCFBA</i> y <i>pcoE</i> en respuesta al incremento en el nivel de iones de cobre, y probablemente a iones de plata. Aumenta la expresión del operón <i>pcoABCD</i> para resistencia a cobre.	Incremento en los niveles de iones de cobre y probablemente de plata.	Outten y col., 2001.
DcuS-DcuR	Activa la expresión del operón <i>dcuB-fumB</i> (DcuB y fumarasa anaeróbica B) y del operón <i>frdABCD</i> , (fumarato/reductasa) y el gen <i>dctA</i> . Su regulón incluye otros 39 genes, de los cuales 13 participan en síntesis de lipopolisacáridos y 3 en la respiración anaeróbica del nitrato y nitrito.	Tri- y/o dicarboxilatos extracelulares.	Abo-Amer y col., 2004.
EnvZ-OmpR	Controla la transcripción de diversos genes, incluyendo los que codifican las porinas de membrana externa OmpC y OmpF.	Cambios útiles en la osmolaridad del medio.	Forst y Roberts 1994.
KdpD-KdpE	Activa la expresión del sistema KdpFABC de alta afinidad de K ⁺ .	Limitación de K ⁺ o estrés salino.	Hermann y Kirsten, 2010.
NarQ-NarP/ NarX-Nar	SDC homólogos que colaboran en el control de la respiración anaeróbica.	Ambas HCs responden al nitrato y nitrito	Stewart, 2003.
NtrB-NtrC	Activa la transcripción de <i>nifA</i> , <i>glnA</i> y otros operones involucrados en la fijación y asimilación de nitrógeno.	Proteína GlnB, que inhibe la actividad cinasa y activa la función fosfatasa.	Yuanda y col., 2004.
PhoP-PhoQ	Adaptación en ambientes limitantes de Mg ²⁺ , y a otras condiciones de estrés.	Responde a niveles de Mg ²⁺ y Ca ²⁺ .	Groisman, 2001.
PhoR-PhoB	Expresa 31 genes, involucrados en el transporte/degradación de fosfato.	Condiciones limitantes de fosfato.	Sola-Landa y col., 2003.
QseB-QseC	Activa la transcripción del operón <i>flhDC</i> , que codifica el regulador maestro de los genes flagelares y de motilidad. Probablemente participa en el metabolismo de metales.	Epinefrina, norepinefrina y la señal del <i>quorum-sensing</i> AI-3	Clarke y col., 2006.
RstB-RstA	Involucrado en la resistencia a pridinol, ketoprofeno y troleandomicina.	No determinado.	Campbell y col., 2007.

UhpA-UhpB	Promueve junto con el complejo CAP-cAMP la transcripción del gen <i>uhpT</i> , para el transporte y la utilización de azúcares.	Glucosa 6-P extracelular.	Wright y Kadner, 2001.
YedV-YedW	Su regulón está involucrado en la respuesta al incremento en el nivel de cobre extracelular.	Después de la exposición a cobre (de manera dependiente de CusR).	Yamamoto e Ishihama, 2005.
YehU-YehT	No determinado.	No determinado.	-
YfhK-YfhA (GlrK-GlrR)	Activa la transcripción del sRNA GlmY (promueve la acumulación de glucosamina-6-P sintasa).	Se activa cuando las células entran en la fase estacionaria. No se ha determinado el estímulo.	Reichenbach y col., 2009.
YpdA-YpdB	Involucrado en la síntesis flagelar.	No determinado.	Oshima y col., 2002.
ZraS-ZraR	Regula la expresión del gen <i>zraP</i> , (proteína periplásmica de unión a zinc).	Altas concentraciones de zinc extracelular.	Leonhartsberger y col., 2001.
^a ArcB-ArcA	Regulación de la expresión genética, en relación a diferentes condiciones respiratorias.	Estado redox de las quinonas.	Georgellis y col., 2001; Malpica y col., 2004.
^a BarA-UvrY	Regula positivamente la expresión de los sRNAs CsrB y CsrC, los cuales antagonizan con la actividad de la proteína de regulación global CsrA.	Formato, acetato, ácidos grasos de cadena corta.	Pernestig y col., 2003; Suzuki y col., 2002; Chavez y col., 2010.
^a EvgS-EvgA	Resistencia a múltiples drogas y resistencia ácida a células en crecimiento exponencial.	No determinado.	Eguchi y col., 2003.
^a RcsC-RcsB	Regulador de la síntesis del polisacárido capsular. Activa la expresión de los genes de la división celular y <i>osmC</i> , que codifica una proteína de función desconocida.	Desecación, shock osmótico, sobreexpresión de la chaperona DnaJ, y mutaciones que afectan la envoltura celular.	Davalos-García y col., 2001.
^a TorS-TorR	Activa la transcripción del operón <i>torCAD</i> , que codifica a TMAO, el principal sistema de respiración anaeróbica.	Trimetilamina N-óxido (TMAO) en el medio.	Ansaldi y col., 2001.

Nota 1. S ubíndices y abreviaturas. a. La cinasa de estos sistemas presenta una arquitectura híbrida. ~ P, fosforilado; sRNAs, RNAs pequeños no-codificantes.

Apéndice B. Efecto de CsrA sobre el metabolismo y la fisiología de diferentes especies bacterianas.

Tabla 2. Ejemplos de transcritos blanco regulados directamente por CsrA en diferentes especies bacterianas.

Genes blanco	Función	Regulación	Especies	Referencias
<i>csrA</i>	Proteína de regulación global.	Negativa	<i>E. coli</i> .	Yakhnin y col., 2011
<i>cstA</i>	Transporte de péptidos.	Negativa	<i>E. coli</i>	Dubey y col., 2003
<i>flhDC</i>	Regulador de motilidad.	Positiva	<i>E. coli</i>	Wei y col., 2001 ^a
<i>glgCAP</i>	Metabolismo glucógeno.	Negativa	<i>E. coli</i>	Baker y col., 2002
<i>Hfq</i>	Chaperona de RNA.	Negativa	<i>E. coli</i>	Baker y col., 2007
<i>nhaR</i>	Regulador transcripcional.	Negativa	<i>E. coli</i>	Pannuri y col., 2012.
<i>pgaABCD</i>	Formación de biopelículas.	Negativa	<i>E. coli</i>	Wang y col., 2005
<i>sdiA</i>	Regulador transcripcional.	Negativa	<i>E. coli</i>	Yakhnin y col., 2011.
<i>sepLspADB</i>	Factores de virulencia.	Positiva	<i>E. coli</i>	Bhatt y col., 2009
<i>ycdT</i>	Metabolismo c-di-GMP.	Negativa	<i>E. coli</i>	Jonas y col., 2008
<i>ydeH</i>	Metabolismo c-di-GMP.	Negativa	<i>E. coli</i>	Jonas y col., 2008
PA0081	Plegamiento de proteínas.	Negativa	<i>P. aeruginosa</i>	Brenic y Lerooy, 2009
PA0082	Proteína hipotética.	Negativa	<i>P. aeruginosa</i>	Brenic y Lerooy, 2009
PA4492	Proteína hipotética.	Negativa	<i>P. aeruginosa</i>	Brenic y Lerooy, 2009
STM1987	Metabolismo c-di-GMP.	Negativa	<i>S. typhimurium</i>	Jonas y col., 2010
<i>yhdA (csrD)</i>	Metabolismo c-di-GMP.	Negativa	<i>S. typhimurium</i>	Jonas y col., 2010
STM3611	Metabolismo c-di-GMP.	Positiva	<i>S. typhimurium</i>	Jonas y col., 2010

Nota 2: Análisis *in silico* han identificado a cientos de probables blancos de CsrA. Favor de ver Kulkarni y col., 2014.

Apéndice C. Homólogos del circuito BarA-UvrY-CsrA

El circuito regulatorio BarA-UvrY-CsrA se encuentra conservado en diferentes especies bacterianas. Notablemente en cada una de éstas, el circuito afecta la patogenicidad y virulencia.

Tabla 3. Homólogos del circuito regulatorio BarA-UvrY-CsrA de *E. coli*.

Especies	CsrA	sRNAs	SDC	Fenotipos	Referencias
<i>E. carotovora</i>	RsmA	RsmB	ExpS-ExpA	Virulencia e inpatógenos de plantas, <i>quorum-sensing</i> , exoproductos.	Cui y col., 2001.
<i>E. coli</i>	CsrA	CsrB CsrC	BarA-UvrY	Motilidad, formación de biopelículas, metabolismo del carbono, virulencia	Tomenius y col., 2005; Wang y col., 2005.
<i>L. pneumophila</i>	CsrA	RsmY RsmZ	LetS-LetA	Citotoxicidad, virulencia, motilidad.	Hammer y col., 2002; Molofsky y Swanson, 2003.
<i>P. aeruginosa</i>	RsmA	RsmY RsmZ	GacS-GacA	Motilidad, formación de biopelículas, virulencia, exoproductos, <i>quorum-sensing</i> .	Kay y col., 2006.
<i>P. fluorescens</i>	RsmA/RsmE	RsmX RsmY RsmZ	GacS-GacA	Motilidad, biocontrol, adherencia, <i>quorum-sensing</i> , exoproductos.	Lapouge y col., 2008; Kay y col., 2005.
<i>S. Typhimurium</i>	CsrA	CsrB CsrC	BarA-SirA	Motilidad, formación de biopelículas, invasión, virulencia.	Altier y col., 2000; Fortune y col., 2006; Teplitski y col., 2003.
<i>V. cholerae</i>	CsrA	CsrB CsrC CsrD	VarS-VarA	<i>Quorum-sensing</i> , otros fenotipos regulados por HapR.	Lenz y col., 2005.

Apéndice D. Listas de cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Tabla 4. Lista de cepas.

Cepa	Genotipo	Referencias
CF7789	MG1655 $\Delta lacIZ$ (<i>MluI</i>)	Michael Cashel
TR1-5CF7789	CF7789 <i>csrA::kan^r</i>	Suzuki y col., 2002.
KSB837	CF7789 Φ (<i>csrB-lacZ</i>)	Gudapaty y col., 2001.
IFC5010	KSB837 <i>csrA::kan^r</i>	Este trabajo.
BAKSB837	KSB837 <i>barA::kan^r</i>	Suzuki y col., 2002.
UYKSB837	KSB837 <i>uvrY::cam^r</i>	Suzuki y col., 2002.
ECL5336	MC4100 <i>ackA::tet^r::pta</i>	Liu y col., 2009
IFC5011	CF7789 Φ (<i>uvrY-lacZ</i>) fusión de operón	Este trabajo.
IFC5012	TR1-5CF7789 Φ (<i>uvrY-lacZ</i>) fusión de operón	Este trabajo.
IFC5013	CF7789 Φ (<i>PlacUV5-uvrY22[']-lacZ</i>) fusión líder	Este trabajo.
IFC5014	TR1-5CF7789 Φ (<i>PlacUV5-uvrY22[']-lacZ</i>) fusión líder	Este trabajo.
IFC5015	KSB837 <i>ackA::tet^r::pta csrA::kan^r</i>	Este trabajo.
IFC5016	KSB837 <i>uvrY::cat^r csrA::kan^r</i>	Este trabajo.
IFC5017	KSB837 <i>barA::cam^r csrA::kan^r</i>	Este trabajo.

Tabla 5. Lista de plásmidos.

Plásmidos	Características Generales	Referencias
pACT3	Vector de bajo número de copias, Cam ^r	Dykxhoorn y col., 1996.
pEXT21	Vector de bajo número de copias, Sm, Sp ^r	Dykxhoorn y col., 1996.
pBA29	<i>barA</i> clonado en el sitio de extremos romos <i>VspI</i> de pBR322, Tet ^r	Suzuki y col., 2002.
pAH125	Vector CRIM para las fusiones transcripcionales <i>lacZ</i> , Kan ^r	Haldimann y Wanner, 2001.
pINT-ts	Vector CRIM de integración, termosensible. Amp ^r	Haldimann y Wanner, 2001.
pUV5	Vector CRIM para las fusiones transcripcionales <i>lacZ</i> , Amp ^r	Edwards y col., 2011.
pAH125-bla	Vector CRIM para las fusiones transcripcionales <i>lacZ</i> , Amp ^r	Este trabajo.
pINT-cat	Vector CRIM de integración, Cam ^r	Este trabajo.
pMX539	<i>uvrY</i> clonado en el sitio <i>SmaI</i> de pACT3, Cam ^r	Este trabajo.
pMX540	<i>uvrY</i> ^{D54Q} clonado en el sitio <i>SmaI</i> de pACT3, Cam ^r	Este trabajo.
pMX541	<i>uvrY</i> clonado en el sitio de extremos romos <i>NdeI</i> de pBA29, Tet ^r	Este trabajo.
pMX542	Promotor de <i>barA</i> clonado en pEXT21, Sp ^r	Este trabajo.
pMX543	<i>uvrY</i> clonado bajo el control del promotor de <i>barA</i> en pEXT21, Sp ^r	Este trabajo.
pMX544	<i>csrA</i> clonado en los sitios <i>HindIII</i> y <i>PstI</i> de pEXT21, Sp ^r	Este trabajo.
pMX545	<i>csrB</i> clonado en, Amp ^r	Este trabajo.
pAH-uvrY	Fusión del operón <i>uvrY-lacZ</i> , Amp ^r	Este trabajo.
pUV-uvrY22	Fusión del líder (más 22 codones) de <i>uvrY-lacZ</i> , bajo el control del promotor constitutivo <i>lacUV5</i> , Amp ^r	Este trabajo.

Tabla 6. Lista de oligonucleótidos.

Nombre	Construcción	Secuencia
barAdel-Fw	Anulación <i>barA</i>	5'ATTTAACAGTGTGACCTTAATTGTCCCATAACGGAAC TCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'
barAdel-Rv	Anulación <i>barA</i>	5'CATAAACACAGGCACTTTGTCCACCAATCTGAAACCAG CGTATGAATATCCTCCTTAGTTCC-3'
Amp-Prom-Fw	Producto <i>bla</i>	5'-GCGGCGCCTTCAAATATGTATCCGCTCATG-3'
Amp-Rv	Producto <i>bla</i>	5'- GCGCGGCCGCGGTCTGACAGTTACCAATGC-3'
uvrYP-fw-Pst	Fusión TC <i>uvrY-lacZ</i>	5'-AACTGCAGGGCGGCGGAGTATAACCATAAG-3'
uvrYP-Rv-BamHI	Fusión TC <i>uvrY-lacZ</i>	5'- CGGGATCCAGAACGTTGATCAAAGGAATATC-3'
uvrY-lead-Fw	Fusión TD <i>uvrY-lacZ</i>	5'- GGAATTCAATGACTAACTATCAGTAGC-3'
uvrY-lead22-Rv	Fusión TD <i>uvrY-lacZ</i>	5'- CGGGATCCTCTTCCAGAATGCGTCG-3'
uvrY-Prom549-Fw	Clonación <i>uvrY</i>	5'- GGAATTCGCAGCATCAGCGTCAGC-3'
UvrY-Rv-HindIII	Clonación <i>uvrY</i>	5'- CCCAAGCTTCCGTACCACCAGCATCG-3'
uvrY-D54Q-Fw	Clonación <i>uvrY</i> ^{D54Q}	5'GTTGACGTGGTGCTAATGCAGATGAGTATGCCGGG3'
uvrY-D54Q-Rv	Clonación <i>uvrY</i> ^{D54Q}	5'GCCCGGCATACTCATCTGCATTAGCACCACGTCAAC3
csrA1-Fw	Clonación <i>csrA</i>	5'-CCCAAGCTTGCCAGTGTGAAAGGCTGG-3'
csrA1-Rv	Clonación <i>csrA</i>	5'-AACTGCAGGAATGAACGGGAGTAAGCG-3'
BarA-Forwd1	Prom/5'UTR <i>barA</i>	5'- GGAATTCCCGACCACACTGGCAGC-3'
BarA-Forwd2	Prom/5'UTR <i>barA</i>	5'TGCTCTAGAAGATCTGATCATATGGAGTTCCGTTGG3'
uvrY	ORF <i>uvrY</i>	5'CCCGGATCCCATATGATCAACGTTCTACTTGTGGAC3'
UvrY-Rv-HindIII	ORF <i>uvrY</i>	5'- CCCAAGCTTCCGTACCACCAGCATCG-3'
csrB-Fw	pGEM:: <i>csrB</i>	5' GCATTTAGCCTCAAATCTTGCGG-3'
csrB-Rv	pGEM:: <i>csrB</i>	5'- CTCGAAGCTTCCGCAAAAAGAGCATCCAG-3'

Nota 3: Abreviaturas. TC, transcripcional; TD, traduccional; Prom, promotor.

Apéndice E. Curriculum Vitae

Martha Iraís Camacho Hernández, MSc.

Address: Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, Circuito exterior s/n, Colonia Copilco, Delegación Coyoacán, 04510 México, D.F., México

Tel: +52 55-56225738

e-mail: mcamacho@email.ifc.unam.mx

Date of birth: April 11, 1987

Place of birth: Delegación Miguel Hidalgo, México, D.F.

Education/Training:

2004-2008 Bachelor of Science in Experimental Biology, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México, D.F., México.

2009-2011 M.Sc. in Biochemical Sciences, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., México.

2011- Ph.D in Biochemical Sciences, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., México.

Awards:

2009 Best poster prize for the poster “CpsA a protein with two adenylation domains is required for *Aspergillus nidulans* asexual development” presented in the X International Fungal Biology Conference & VIII National meeting in Biology.

2015 Scholarship as visiting research student at University of Florida, United States by CONACYT (The National Council For Science and Technology) and by UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México).

Professional Membership:

2011 Mexican Society of Biochemistry.

2015 Mexican Society of Microbiology.

Publication List:

1. Martínez LC, Yakhnin H, Camacho MI, Georgellis D, Babitzke P, Puente JL, Bustamante VH. 2011 Integration of a complex regulatory cascade involving the SirA/BarA and Csr global regulatory systems that controls expression of the *Salmonella* SPI-1 and SPI-2 virulence regulons through HilD. *Mol Microbiol* 80:1637-1656.
2. Edwards AN, Patterson-Fortin L, Vakulskas CA, Mercante JW, Potryskus K, Vinella D, Camacho MI, Fields JA, Thompson SA, Georgellis D, Cashel M, Babitzke P, Romeo T. 2011 Circuitry linking the Csr and stringent response global regulatory systems. *Mol Microbiol*. 80:1561-1580.
3. Camacho MI, Alvarez AF, Gonzalez-Chavez R, Romeo T, Merino E, Georgellis D. 2015 Effects of the global regulator CsrA on the BarA/UvrY two-component signaling system. *J Bacteriol*. 197:983-991.

Congress:

- 2008 Differential effects of the culture media on the production and quality of *Beauveria bassiana* conidia. XXXI National meeting in Biologic Control. Camacho Hernández M, Loera Corral O (oral presentation).
- 2009 CpsA a protein with two adenylation domains is required for *Aspergillus nidulans* asexual development. X International Fungal Biology Conference & VIII National meeting in Biology. Camacho Hernández M, Ramos Balderas J, Aguirre Linares J (poster presentation).
- 2011 The global regulators Hfq and CsrA are required for proper UvrY translation. Second Meeting of the BBMB (Biochemistry and Molecular Biology of Bacteria). Martha Irais Camacho Hernández (oral presentation).
- 2012 The global regulators Hfq and CsrA are required for proper UvrY translation. XXIX Meeting of the Mexican Society of Biochemistry. Martha I. Camacho, Adrián F. Álvarez, Dimitris Georgellis (poster presentation).
- 2013 The global regulators Hfq and CsrA are required for proper UvrY translation. III Meeting of the BBMB (Biochemistry and Molecular Biology of Bacteria). Martha I. Camacho, Adrián F. Álvarez, Enrique Guzmán, Dimitris Georgellis (poster presentation).
- 2014 The global regulator CsrA is required for proper BarA activation and UvrY translation. XXX Meeting of the Mexican Society of Biochemistry. Martha I. Camacho, Adrián F. Álvarez, Dimitris Georgellis (poster presentation).

2015 Effects of the global regulator CsrA on the BarA/UvrY two-component system. 39th Meeting of the Mexican Society of Microbiology. Martha Iraís Camacho Hernández, Alvarez Adrian F, Gonzalez Chavez Ricardo, Georgellis Dimitris (poster presentation).