



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Búsqueda de factores que regulan el sistema de dos componentes BarA/UvrY en
Escherichia coli

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Vázquez Ciros Oscar Jair

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Dimitris Georgellis

[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. José Luis Puente García

[Instituto de Biotecnología](#)

Dr. Luis Servín González

[Instituto de Investigación Biomédica](#)

Ciudad de México. Octubre, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular en el laboratorio 226 norte bajo la tutoría del Dr. Dimitris Georgellis.

Agradezco la asesoría del Dr. Adrián F. Álvarez.

Agradezco el apoyo técnico en el desarrollo de este trabajo de Tesis a la M en C. Claudia Rodríguez Rangel.

Agradezco el apoyo económico brindado a los proyectos:

- “Control de la expresión génica microbiana por estímulos extracelulares”. De la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), # IN207921.
- “Estudio de la organización, composición y función de microdominios membranales similares a balsas lipídicas en bacterias”. De la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), # IN208721.
- “Control del Sistema de Dos Componentes BarA/UvrY” del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), CF 19-514856.
- “Balsas lipídicas bacterianas y su impacto en procesos relacionados con virulencia” del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), CF 19-140614.

Agradezco también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo de Beca de Doctorado, #710668

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es la culminación de una gran etapa en mi vida, sin embargo, esto no habría sido posible sin la ayuda y apoyo de muchas personas:

A mis padres:

A Leticia Ciros y Patricio Vázquez, gracias por todo su apoyo y amor, por enseñarme que la vida siempre es mejor en compañía de los seres queridos y darme toda su confianza en todas las etapas de mi vida.

A Dimitris:

Porque hace ya varios años que me permitiste unirme al laboratorio 226N, lugar que se convirtió en mi segunda casa por varios años. Gracias por tus asesorías, comentarios y ayuda para poder llevar a buen término este trabajo.

A Claus:

Muchas gracias por toda tu ayuda durante mi estancia en el 226N. Gracias por ayudarme a ser mejor persona en todas las etapas que viví en el laboratorio, por siempre tener unas palabras de aliento cuando las cosas no salían bien o simplemente porque no estaba en mi mejor día. Gracias por hacerme creer en que podía ser mejor y lo más importante, gracias por tu amistad y cariño.

A Adrián:

Siempre estaré agradecido por ayudarme cuando tenía problemas con algunos temas del laboratorio. Gracias por tu amistad y confianza.

A mi comité tutorial: Dr. José Luis Puente García y Dr. Luis Servín González, gracias por todos sus consejos a lo largo de mis distintos tutorales.

Igualmente agradezco al jurado de examen:

Presidente: Dra. Bertha María Josefina González Pedrajo

Vocal: Dra. Herminia Loza Tavera

Vocal: Dr. Enrique Merino Pérez

Vocal: Dr. Rodolfo García Contreras

Secretaria: Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
ABREVIATURAS.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
Transducción de señales.....	4
Fosfodonadores de bajo peso molecular.....	7
Sistema BarA/UvrY/Csr.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento.....	14
Mutagénesis aleatoria.....	16
Ensayo de β -galactosidasa.....	17
Western blot.....	18
Análisis <i>in vivo</i> del estado de fosforilación de UvrY.....	19
Purificación de His ₆ -UvrY y ensayos de fosforilación <i>in vitro</i>	19
Cuantificación de nucleótidos Z.....	20
Separación de nucleótidos por HPLC.....	21
RESULTADOS.....	23
La interrupción del gen <i>purA</i> permite la activación del sistema BarA/UvrY en una cepa <i>csrA</i> ⁻ ..	23
La mutación <i>purA</i> induce la activación de UvrY.....	25
Modificación de la actividad cinasa de BarA en la cepa <i>purA</i> ⁻	26
Activación de UvrY en la cepa <i>purA</i> ⁻	27
Ni acetyl-P ni carbamoyl-P son los responsables de la activación de UvrY en la cepa <i>purA</i> ⁻	28
La acumulación de nucleótidos Z induce la activación de UvrY.....	29
Fosforilación de UvrY dependiente de nucleótidos Z.....	35
Los nucleótidos Z inducen la activación de RRs no relacionados.....	37
DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIONES.....	42
REFERENCIAS.....	43
APÉNDICE.....	52
Tabla 1. Cepas de <i>E. coli</i> y plásmidos usados en el presente trabajo.....	52
Artículo derivado.....	55

RESUMEN

Los sistemas de dos componentes (SDC) son mecanismos moleculares de estímulo-respuesta involucrados en la transducción de señales en organismos de todos los dominios de la vida. Estos sistemas normalmente se integran por una cinasa de histidina (CH) con la capacidad de percibir una señal específica, la cual una vez percibida, desencadena una serie de cambios conformacionales en la misma, induciendo de esta manera un proceso de autofosforilación, mediado por ATP, en un residuo conservado de histidina. Posteriormente, el grupo fosforilo es transferido al segundo componente, el regulador de respuesta (RR) cognado. En este estado el RR es activado, siendo en la mayoría de los casos como regulador transcripcional. Adicionalmente, los RRs en ausencia de la CH cognada o de cualquier otra proteína, son capaces de auto fosforilarse mediante la utilización de moléculas altamente energéticas llamadas fosfodonadores de bajo peso molecular (FBP). Esta activación *in vivo* normalmente tiene lugar cuando la concentración intracelular del FBP aumenta considerablemente y sobrepasa el umbral necesario para fungir como tal, aunque en la mayoría de los casos, esta activación solamente ha sido observada *in vitro*. En el presente trabajo, en la búsqueda de factores involucrados en la regulación del sistema BarA/UvrY/Csr en *E. coli*, se encontró que una mutación en el gen *purA*, el cual está involucrado en la vía de biosíntesis de purinas, induce la acumulación de los intermediarios ZMP y ZTP, los cuales tienen la capacidad de actuar como FBP para una amplia gama de RRs en *E. coli*.

ABSTRACT

Two component systems (TCS) are stimuli-response molecular mechanisms involved in signal transduction in all life domains. These systems are normally comprised by a histidine kinase (HK) with the capacity to sense a specific signal, thus triggering a series of conformational changes, promoting an ATP-dependent autophosphorylation at a conserved histidine residue. Thereafter, the phosphoryl group is transferred to the second component, the cognate response regulator (RR). In this state, the RR is activated, most of the times as a transcriptional regulator. In addition, RRs in the absence of their cognate HK or any other protein, have the capacity to induce its autophosphorylation by the use of highly energetic molecules known as low molecular weight phosphor donors (LMP). This activation *in vivo* normally takes place when the intracellular concentration of the specific FBP is significantly augmented and reaches the minimal umbral to act as a one, however, in most of the cases this activation has only been reported *in vitro*. In the present work, in an attempt to identify factors involved among the regulation of the BarA/UvrY/Csr system in *E. coli*, it was found that a disruption in the *purA* gene, which is involved in the biosynthesis of purines, induces the accumulation of the intermediates ZMP and ZTP, which have the capacity to act as a LMP of a wide range of RRs in *E. coli*.

ABREVIATURAS

~P: Grupo fosforilo

AMP: Adenosín monofosfato

ATP: Adenosín trifosfato

CH: Cinasa de histidina

CHH: Cinasa de histidina híbrida

DO: Densidad óptica

DR: Dominio de respuesta

DT: Dominio de transferencia

FBP: Fosfodonador de bajo peso molecular

F-ZMP: 5-formamido-1-(5-fosfo-D-ribosil)-imidazol-4-carboxamida

HIS: Histidina

Hpt: Dominio de fosfotransferencia

IGP: D-eritro-1-(imidazol-4-yl)-glicerol 3-fosfato

IMP: Inosín monofosfato

Pb: Pares de bases

PRFAR: Fosforibulosil-formimino-5-aminoimidazol-4-carboxamida ribótido fosfato

PRPP: 5-fosfo- α -D-ribosa 1-difosfato

Rpm: revoluciones por minuto

RR: Regulador de respuesta

S-AMP: Adenilosuccinato

SDC: Sistema de dos componentes

SUC: Sistema de un componente

S-ZMP: 5'-fosforibosil-4-(N-succinocarboxamida)-5-aminoimidazol

TBAH: Hidróxido de tetrabutilamonio

ZMP: 5-aminoimidazol-4-carboxamida-1-beta D-ribofuranosil 5'-monofosfato

ZTP: 5-aminoimidazol-4-carboxamida-1-beta D-ribofuranosil 5'-trifosfato

INTRODUCCIÓN

Transducción de señales

La transducción de señales es un proceso bioquímico en dónde un ligando extracelular interactúa o se une a un receptor que puede estar anclado a la membrana plasmática, desencadenando de esta manera una respuesta interna específica. La detección de dichos estímulos extracelulares es un factor esencial en la sobrevivencia y adaptación de los organismos, ya que estas señales pueden ir desde la presencia de alimentos o sustancias tóxicas hasta la concentración de iones u oxígeno. En procariontes, este proceso de señalización es principalmente llevado a cabo por mecanismos moleculares los que, basados en el número de sus integrantes, se dividen en sistemas de uno (SUC) o de dos componentes (SDC) (1). Siendo los primeros los más relevantes en el proceso de señalización en procariontes, lo cual se demuestra por la presencia, en promedio, de cuatro veces más proteínas de este tipo en comparación con las relacionadas a SDC (2).

Los SUC están conformados por una proteína citoplasmática con un dominio de entrada, en donde normalmente la señal específica es detectada, y uno de salida constituido principalmente por un dominio de unión a DNA tipo hélice-vuelta-hélice (1). Por su parte, los SDCs típicos están integrados por una proteína, que en la mayoría de los casos se encuentra anclada a la membrana citoplasmática, llamada cinasa de histidina (CH), la cual presenta un dominio de transferencia (DT) con un residuo de histidina altamente conservado y, por otro lado, el segundo componente es un regulador de respuesta (RR) citosólico, el cual presenta un dominio receptor (DR) con un residuo de aspartato altamente conservado (Imagen 1A). Debido a la ubicación de la CH, esta es capaz de percibir el espacio

extracelular, donde en la mayoría de los casos percibe su estímulo específico, desencadenando de esta manera una serie de cambios conformacionales en la proteína, induciendo así su autosforilación, mediada por ATP, en el residuo conservado de histidina. Posteriormente, el grupo fosforilo (\sim P) es transferido al residuo de aspartato conservado del RR cognado, activando así su actividad, que en la mayoría de los casos es como regulador transcripcional, aunque existen algunos casos en donde la actividad es de tipo enzimática o de unión a proteínas (3). Existen otro tipo de CH, las cuales presentan una arquitectura más elaborada en donde el flujo del \sim P exhibe una serie de pasos tipo His \rightarrow Asp \rightarrow His \rightarrow Asp, llamado fosforrelevo (Imagen 1B). Este tipo de CH son llamadas híbridas (CHH), los cuales quienes además de contener el DT, presentan un DR extra y un dominio de fosfotransferencia (Hpt) con una histidina conservada. Estos tres dominios pueden presentar diferentes organizaciones, ya que pueden estar fusionados en una misma proteína o existir y ser funcionales en proteínas independientes.

En ausencia del estímulo específico, tanto la CH \sim P como el RR \sim P pueden ser defosforilados, apagando así su actividad regulatoria. Este proceso es principalmente promovido por la actividad fosfatasa de la CH cognada, tanto con las proteínas canónicas como con las híbridas. En el caso de las CH canónicas, se ha observado que estas promueven la defosforilación del RR \sim P (Imagen 1C). Mientras que las CHHs llevan a cabo un proceso denominado fosforrelevo inverso, en donde el \sim P del RR migra hacia el DT de la CHH mediado por el Hpt, generando así un flujo del \sim P en un sentido Asp \rightarrow His \rightarrow Asp, para finalmente liberar Pi al ambiente (4, 5) (Imagen 1D). Otro proceso de defosforilación de los RRs, depende de la naturaleza lábil y altamente energética del enlace acil fosfato del RR \sim P,

ya que este puede sufrir un rompimiento espontáneo, o en algunos casos el mismo RR induce su propia defosforilación promovida por su actividad fosfatasa (6, 7).

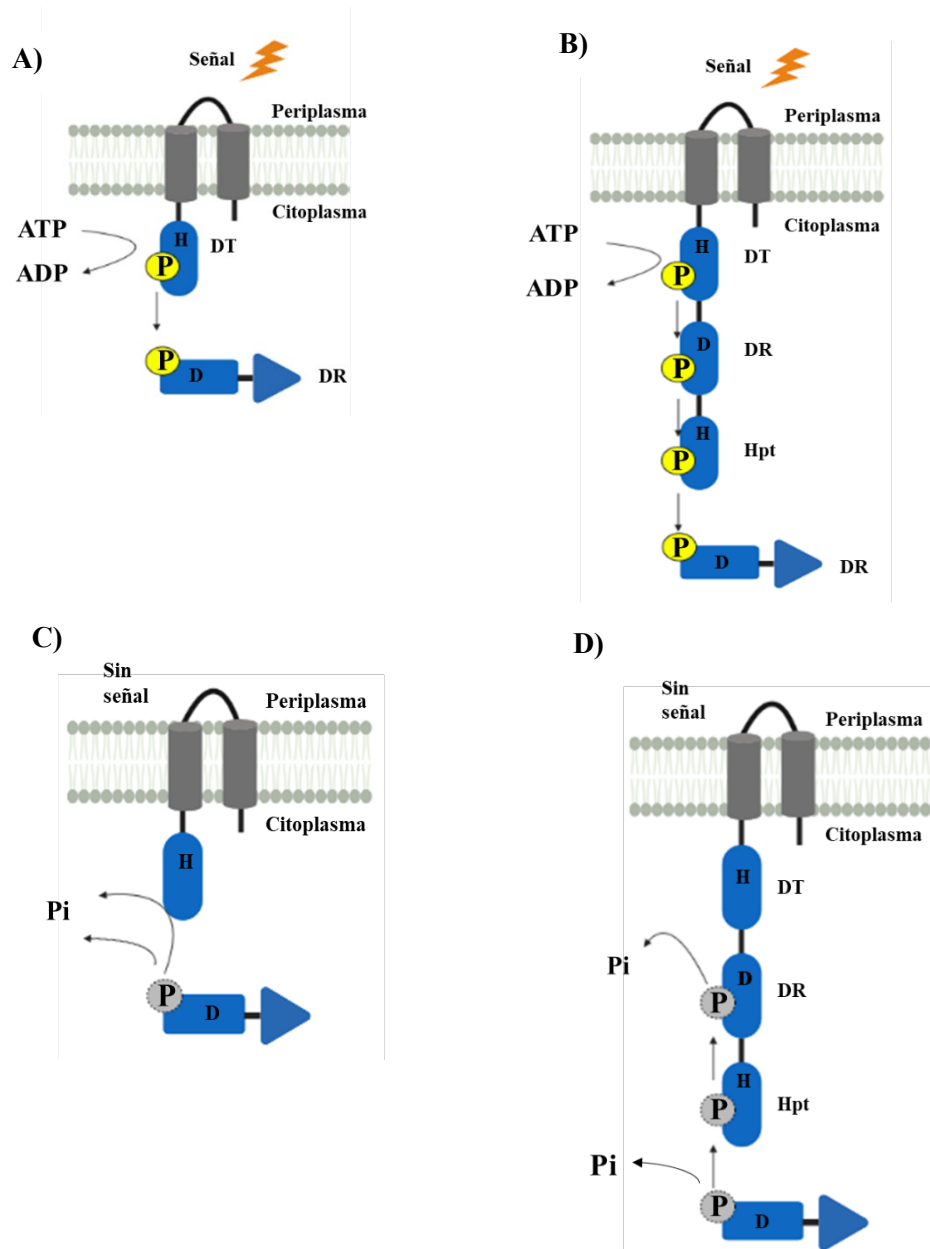


Imagen 1. Representación esquemática de los sistemas de dos componentes. A) En un sistema de dos componentes típico, la percepción del estímulo específico por parte de la cinasa de histidina canónica, induce su autofosforilación a expensas de ATP en el residuo de histidina (H) del dominio de transferencia (DT). Posteriormente, la CH~P transfiere el grupo fosforilo al residuo de aspartato (D) del dominio de respuesta (DR) del regulador de respuesta. B) Las CHHs consisten de un dominio de transferencia (DT), dominio de respuesta (DR) y un dominio de fosfotransferencia (Hpt). En estas CHH, el flujo del ~P es transferido a través de una serie de pasos His-Asp en un sentido DR → DT → Hpt → DR. C) En ausencia de la señal específica, las CHs canónicas inducen la defosforilación de su RR~P cognado. D) Representación del fosfo-relevo inverso (DR del RR → Hpt → DR → P_i), ocasionado por la actividad fosfatasa de las CHH en ausencia de su estímulo específico.

Fosfodonadores de bajo peso molecular

Adicionalmente a la activación de los RRs por su CH cognada, existen moléculas altamente energéticas capaces de activar de manera directa a diferentes RRs, sin la presencia alguna de otra proteína accesoria. Estas moléculas son llamadas fosfodonadores de bajo peso molecular (FBP) y estos son el acetil fosfato (acetil-P), carbamoil fosfato (carbamoil-P), γ -glutamil fosfato (γ -glutamil-P) y algunos fosforamidatos, como el fosfoimidazol (8). La activación de los RRs por parte de estos compuestos es un proceso cuya relevancia fisiológica no está totalmente entendida, ya que en la mayoría de los casos esta fosforilación principalmente ha sido observado *in vitro*, con la excepción de la fosforilación por acetil-P, cuya capacidad para activar a una amplia gama de RRs *in vivo* ha sido documentada (8–11). Sin embargo, en la mayoría de estos casos, es necesaria la ausencia de la CH cognada, a menos que el estímulo específico se encuentre presente, ya que, en caso de que la señal específica no esté presente, la CH presentará actividad fosfatasa y constantemente estará defosforilando al RR~P. Asimismo, se ha planteado que el acetil-P además de actuar como FBP, tiene la capacidad de influir en la actividad de la CH canónica EnvZ de *E. coli*, favoreciendo su actividad cinasa y posiblemente actuando como el donador del ~P para su autofosforilación (12, 13).

Cabe señalar que *E. coli* es capaz de sintetizar, con excepción del fosfoimidazol, todos los FBP antes mencionados, aunque solamente se ha observado que acetil-P es capaz de acumularse a una concentración intracelular suficiente para inducir la fosforilación de los RRs (3 mM) (14). Esto se debe a que acetil-P es un intermediario del metabolismo de acetato y es sintetizado a través de las enzimas AckA y Pta (15) (Imagen 2A). Cuando ambas enzimas son mutadas, la acumulación de este compuesto se ve mermada y esto puede repercutir en la generación de varios fenotipos (16), puesto que el acetil-P funge como molécula de

almacenaje de carbono así como de fosfatos (15). Por otro lado, se ha propuesto que el acetil-P (Imagen 2B) es una de las moléculas que pudieron haber participado en la química prebiótica y más importante aún, se le ha considerado como la moneda de energía metabólica previa a la formación de los genes (17). Con base en estas características, es de suponer que la concentración interna de acetil-P puede fluctuar dependiendo de las condiciones extracelulares y esto se demuestra por ejemplo, en su sobreacumulación cuando hay presencia de azúcares tales como glucosa o de otras fuentes de carbono como piruvato (14).

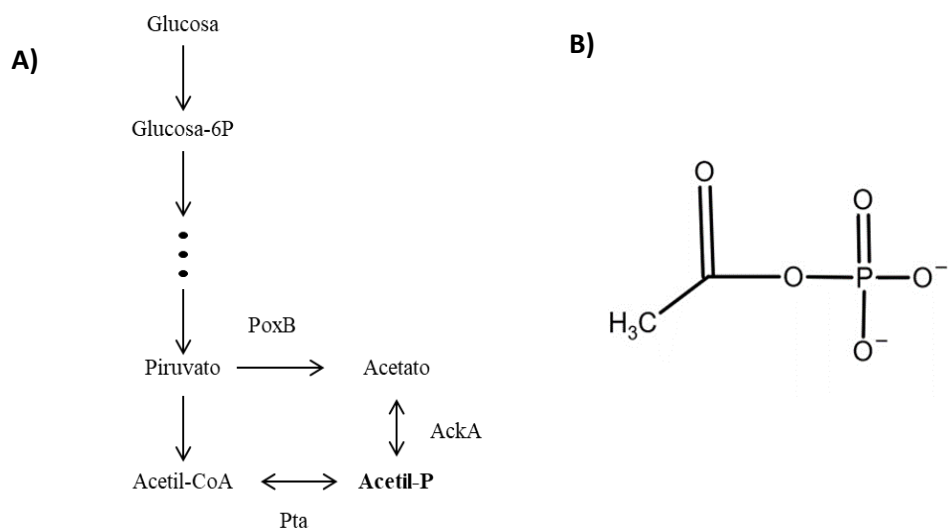


Imagen 2. Representación de la ruta metabólica donde acetil-P es sintetizado. Abreviaturas: Glucosa-6P, Glucosa-6-fosfato; Acetil-CoA, acetil coenzima A; Acetil-P, acetil fosfato, PoxB, piruvato deshidrogenasa; AckA, acetato cinasa; Pta, fosfato acetil transferasa. B) Representación de la estructura del acetil-P

Otra molécula capaz de donar su grupo fosforilo y activar RRs en ausencia de sus respectivas CH, es el carbamoil-P (Imagen 3A-B). Esta molécula, al igual que el acetil-P, presenta una larga historia evolutiva, ya que se le ha considerado como uno de los primeros compuestos que pudieron participar en la química prebiótica, específicamente, como pionero en la incorporación de nitrógeno al metabolismo (17). Sin embargo, no se ha demostrado que el

carbamoil-P pueda activar RRs *in vivo*, a diferencia del acetil-P. Esto a pesar de presentar una energía libre (ΔG°) (-39 kJ/mol) similar a la del acetil-P (-43 kJ/mol). Sin embargo, en experimentos *in vitro*, se ha observado que algunos RRs son activados por carbamoil-P (8, 18), sugiriendo de esta manera que la concentración *in vivo* de carbamoil-P no es capaz de alcanzar el umbral necesario para poder fosforilar de manera directa a los RRs, aunque esto no está comprobado. Otro FBP, es γ -glutamil-P (Imagen 3C-D), el cual se ha demostrado que es capaz de activar *in vivo* al RR DegU en *Bacillus subtilis*, aunque esto solamente se ha observado cuando la γ -glutamil cinasa, ProB, es sobreexpresada. Sin embargo, no se ha determinado si esta activación es directamente sobre el RR DgeU o si el γ -glutamil-P promueve la fosforilación de la CH cognada DgeS, aumentando así los niveles de DgeU~P (19). Además, no existe ningún reporte en donde γ -glutamil-P pueda fosforilar *in vitro* algún RR.

Por otro lado, existen los fosforamidatos, que debido a su naturaleza altamente energética, son lábiles y rápidamente se hidrolizan en condiciones ácidas, por lo que existen pocas moléculas en la naturaleza que los contengan y son raramente utilizados en los diferentes dominios de la vida (20). No obstante, existen algunos ejemplos en donde se generan fosforamidatos en condiciones muy específicas y que, debido a la energía contenida en sus enlaces, sus tiempos de vida son bastante cortos. Algunos de estos ejemplos son los fosfoimidazoles, los cuales son el resultado de la fosforilación por ATP del residuo conservado de histidina de la CH y llegan a tener un ΔG° de entre -50 y -58 kJ/mol (7, 21). Sobre la base de estos argumentos, es importante mencionar que los fosforamidatos capaces de actuar como FBP, son aquellos sintetizados de manera artificial (18, 22), por lo que al igual que con carbamoil-P, solamente en condiciones *in vitro*, se observó su capacidad de

activar a los RRs; siendo en algunos casos, el único FBP capaz de fosforilar a algunos RRs (8, 22).

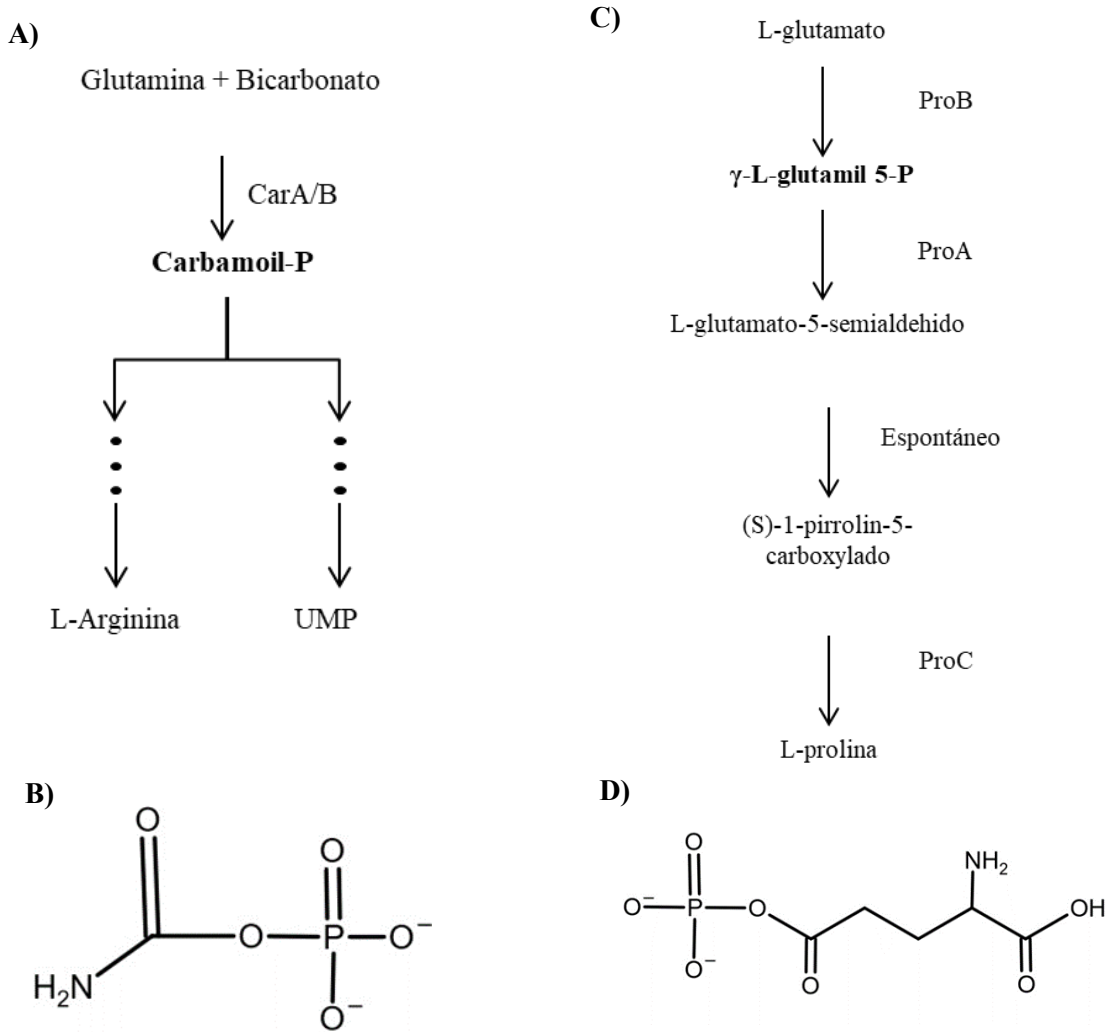


Imagen 3. A) Representación de la síntesis de carbamoil fosfato. Abreviaturas: Carbamoil-P, carbamoil fosfato; UMP, Uracil monofosfato; CarA/B, Complejo carbamoil sintetasa. B) Representación de la estructura molecular de carbamoil-P. C) Representación de la síntesis de γ -L-glutamil-5-fosfato. Abreviaturas: γ -L-glutamil-5-P, γ -L-glutamil-5-fosfato; ProB, glutamato 5- cinasa; ProA, glutamato-5-semialdehido deshidrogenasa; ProC, pirrolina-5-carboxilado reductasa. D) Representación de la estructura molecular de γ -L-glutamil-5-fosfato.

La capacidad de los FBP de fosforilar a los RRs en ausencia de cualquier otra proteína accesoria, recae en la presencia de un grupo fosforilo altamente energético, aunque no todos los compuestos con esta peculiaridad son capaces de activar RRs. Por ejemplo, moléculas tales como ATP, Pi, PPi o fosfoenol piruvato, este último con una ΔG° incluso mayor a la presentada por acetil-P o carbamoil-P (8), son incapaces de donar sus grupos fosforilo y activar a los RRs. Es por esta razón que los FBP se consideran moléculas específicas involucradas en la activación y regulación de los SDC en bacterias.

Sistema BarA/UvrY/Csr

El SDC BarA/UvrY en *Escherichia coli*, se compone de la CHH BarA y el RR UvrY (23). La activación de este sistema tiene lugar en la transición de la fase de crecimiento exponencial a la estacionaria, condición en la cual, la concentración de acetato ambiental aumenta, y debido a que este es la señal fisiológica de BarA, se induce así su actividad de cinasa (24). Posteriormente, BarA realiza el fosforrelevo hasta el DR de UvrY, que en este estado es capaz de inducir la expresión de los RNAs no traducibles CsrB y CsrC (Imagen 4) (25, 26). Estos RNAs presentan una estructura secundaria dominada por dominios tipo talloasa, los cuales interactúan con la proteína CsrA, que es un regulador global de la traducción en *E. coli* (Imagen 4) (26, 27). CsrA actúa en forma de dímero uniéndose a sus mRNAs blanco influyendo positiva o negativamente en su traducción, mediante la modificación en la estabilidad y elongación de los mismos (28, 29). Por lo tanto, la interacción de los RNAs CsrB y CsrC con CsrA, disminuye los niveles libres de esta última en la célula, al secuestrarla, afectando así la expresión de una amplia gama de genes y por lo tanto la

regulación de diversos procesos, tales como metabolismo del carbono (30), motilidad (31), factores de virulencia (32), y formación de biopelículas (33), entre otros.

De manera interesante, se ha observado que en una cepa deficiente en CsrA, la activación del sistema BarA/UvrY no se lleva a cabo de manera normal, lo que repercute en que los RNAs CsrB y CsrC no sean expresados, generando así un mecanismo de autorregulación. Esta falta de activación se debe a dos eventos independientes: i) BarA no se activa como cinasa y ii) la transcripción y traducción de *uvrY* se ven disminuidas (9). Como el modo de acción de CsrA es mediante su unión a mRNAs, la regulación de la transcripción de UvrY y la activación de BarA como cinasa deben ser mediadas por factores intermediarios regulados por CsrA, que aún no han sido identificados.

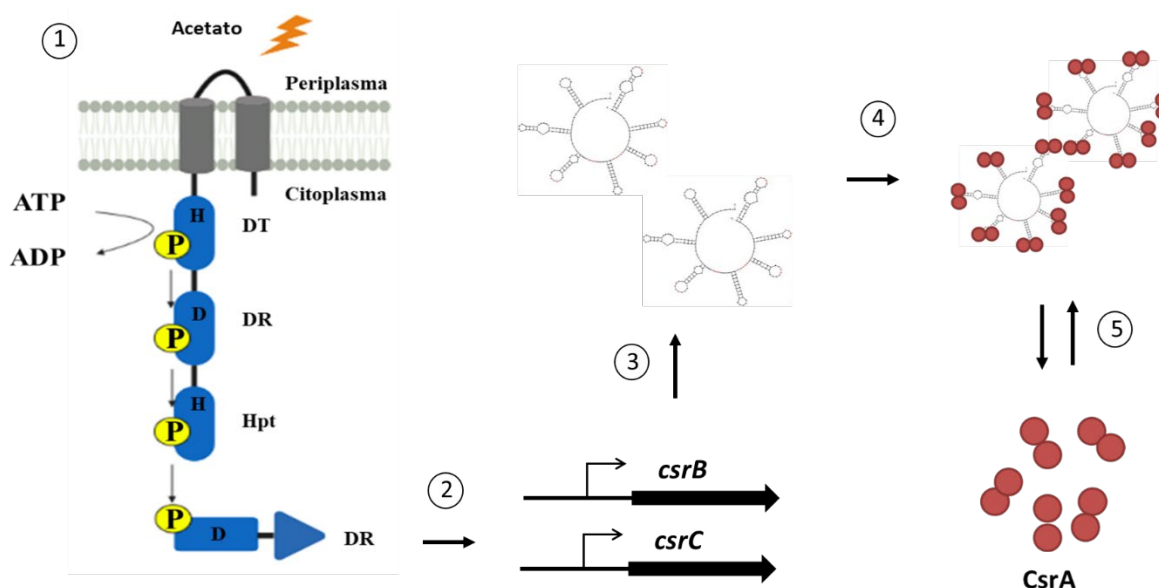


Imagen 4. Representación del sistema BarA/UvrY/Csr. (1) BarA es activado por su señal específica, acetato. Esto induce la autofosforilación de BarA para posteriormente realizar el fosforreo y así activar a UvrY. (2) UvrY induce la expresión de los RNAs CsrB y CsrC. (3) CsrB y CsrC son RNAs no traducibles con una estructura secundaria con varios dominios tallo-asa. (4) CsrB y CsrC, a través de sus dominios tallo-asa, secuestran al regulador global CsrA. (5) CsrA se une y libera constantemente de CsrB y/o CsrC.

El presente trabajo se desarrolló en un inicio con el propósito de identificar factores involucrados en la regulación del sistema BarA/UvrY/Csr en *E. coli*, sin embargo, se encontró que una mutante en el gen *purA*, el cual está involucrado en la vía de biosíntesis de purinas, genera la acumulación del intermediario ZMP (5-aminoimidazol-4-carboxamida-1-beta D-ribofuranosil 5'-monofosfato) y su contraparte trifosforilada ZTP. Y que estas moléculas pueden actuar *in vivo* e *in vitro* como FBP para varios RRs en ausencia de sus respectivas CHs. Además, se encontró que estos compuestos de alguna manera regulan la actividad cinasa de BarA, sin embargo, es necesario realizar más trabajos con el fin de determinar el papel de los nucleótidos Z en la regulación de BarA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento

Todas las cepas usadas en el presente trabajo están descritas en la tabla 1 (Apéndice). La cepa IFC6000 (*csrA::Kan^r purA::Tn10 csrB-lacZ*) se seleccionó a partir de la mutagénesis aleatoria usando un mini-Tn10 contenido en el plásmido pBSL181 (34), en la cepa IFC5010 (*csrA::Kan^r csrB-lacZ*) que contenía el plásmido pMX543 (9). La mutación *purA::Tn10* se transfirió a las cepas KSB837 (wt, *csrB-lacZ*) y CF7789 (wt) mediante transducción usando el fago P1, para así generar las cepas IFC6001 e IFC6015 respectivamente. Las mutaciones cromosomales de los genes *barA*, *uvrY*, *carB*, *hisF*, *purH*, *purR*, *cpxA*, *rscC* y *phoQ* fueron efectuadas mediante la transducción por fago P1 del marcador de selección (Kn^r) de las respectivas mutantes de la colección Keio (35) en las cepas receptoras correspondientes. Cuando fue necesario remover la resistencia de kanamicina de una mutación, esto se llevó a cabo mediante el uso de la FLP recombinasa termosensible contenida en el plásmido pCP20 (36). Las mutaciones cromosomales $\Delta arcB::Kan^r$, $\Delta arcA::Tet^r$ o *ackA::Tet^r::pta*, se obtuvieron a partir de las cepas ECL5013 (37), ECL5020 (38) o ECL5336 (39) respectivamente. Las cepas IFC6015 e IFC6019 con los reporteros transcripcionales *cydA-lacZ* y *cpxP-lacZ*, respectivamente, se construyeron mediante transducción por el fago P1 de los alelos $\lambda\phi(cydA'-lacZ)$ o $\lambda\phi(cpxP'-lacZ)$ a partir de las cepas ECL5003 (37) o TR50 (40), respectivamente, en la cepa CF7789. Por su parte, las cepas IFC6022 e IFC6025 con los reporteros transcripcionales *bdm-lacZ* e *iraM-lacZ*, respectivamente, unidos al gen de resistencia a ampicilina fueron construidos mediante el uso del sistema CRIM (41). El plásmido pAH-bdm, con la fusión *bdm-lacZ*, se generó a partir de la clonación de un producto de PCR de 402 pb, que contenía la región de regulación transcripcional del gen *bdm* (usando

los oligonucleótidos bdm-lacZfs-Fw [5'-GCCTGCAGCCACTCTCGGTGGATAC-3'] y bdm-lacZfs-Rv [5'-ATGGATCCGGTGTCTGCTACGGATC-3']) en los sitios PtsI-BamHI del plásmido pAH125-bla. Por su parte, el plásmido pAH-iraM con la fusión *iram-lacZ*, se generó a partir de la clonación de un producto de PCR de 308 pb, que contenía la región de regulación transcripcional del gen *iraM* (usando los oligonucleótidos iraM-lacZfs-Fw [5'-GCCTGCAGCCACACGTCCGTTTC-3'] e iraM-lacZfs-Rv [5'-GCGGATCCAAATTAATTAATAATGATGGC-3']) en los sitios PtsI-BamHI del plásmido pAH125-bla. Ambas fusiones transcripcionales se integraron en el cromosoma de la cepa CF7789 como ha sido descrito previamente (41), para así generar las cepas IFC6022 e IFC6025. La mutación cromosomal del gen *purC* se generaron mediante recombinación homóloga usando el sistema de recombinasa del fago *lambda red* (42). Para ello, un producto de PCR, usando como molde el plásmido pKD4 (42) y los oligonucleótidos del-purC-Fw (5'-AAAGACGTATGTGCGGTATTGTCGGTATCGCCGGTGTATTGTGTAGGCTGGAGCTGC-3' y del-purC-Rv (5'-AAGTCAGGGTGCCAGACCGGCACCCTCAGCGAAGGCATCAGAATATCCTCCTTAGTTCC-3'), se usaron para remplazar el gen *purC* con un gen de resistencia de kanamicina.

La construcción del plásmido pMX557, quien presenta el gen *uvrY*^{D54Q} bajo la regulación del promotor de *barA*, se llevó a cabo mediante la generación de un producto de PCR usando los oligonucleótidos *uvrY* (5'-CCCGGATCCCATATGATCAACGTTCTACTTGTGATGACCACG-3') y *UvrY-Rv-HindIII* (5'-CCC AAGCTTCCGTACCACCAGCATCG-3') y el plásmido pUY14D54Q como molde (43). El producto de PCR, que contenía el gen *uvrY*^{D54Q}, se clonó para remplazar el fragmente de restricción con las enzimas NdeI-HindIII del plásmido pMX543 con el fin de generar el plásmido pMX557. Para poder construir el

plásmido pMX558, el gen *purA* junto con su promotor se amplificó por PCR mediante el uso de los oligonucleótidos purA-Fw-BamHI (5'- CGGATCCTTGGCGGTGGACTTGTGG-3') y purA-Rv-SacI (5'- CGAGCTCTGGCTTACCCGACACAGC-3') y el DNA cromosomal de la cepa CF7789 como molde. El producto de PCR con el gen *purA* y su promotor se clonó entre los sitios de restricción ScaI-BamHI del plásmido pBR322 (44).

Todas las células, a menos que se indique lo contrario, se crecieron aeróbicamente con agitación constante a 37 °C en medio LB. Cuando fue necesario adicionar antibióticos, estos fueron a las siguientes concentraciones: cloranfenicol, 20 µg/ml; kanamicina, 50 µg/ml; ampicilina, 100 µg/ml; espectinomicina, 50 µg/ml; y tetraciclina, 10 µg/ml.

Mutagénesis aleatoria

La mutagénesis aleatoria se generó mediante la inserción del mini-Tn10 en el cromosoma de la cepa IFC5010 con el plásmido pMX543. Para ello, las células se crecieron hasta una DO_{600 nm} ~ 0.6 donde se recuperaron, lavadas y concentradas para ser transformadas con por electroporación con el plásmido pBSL181, el cual es incapaz de replicarse y presenta en transposón mini-Tn10 (34). Posterior a la electroporación, las células se incubaron con 1ml de LB suplementado con 1 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG), con el fin de inducir la transposasa durante 1 hora a 37 °C. Las células mutadas se seleccionaron mediante su esparcimiento sobre LB agar que contenía cloranfenicol, por la inserción del mini-Tn10, así como 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosido (X-gal) (40 µg/ml), para detectar la sobreexpresión del gen reportero *csrB-lacZ*. Posteriormente, para detectar la ubicación cromosomal de la inserción del mini-Tn10, se realizó una genoteca con el DNA cromosomal de las mutantes seleccionadas digerido con la enzima de restricción Sau3AI, los fragmentos

obtenidos se clonaron en el plásmido pUC18 digerido con la enzima BamHI. Los plásmidos generados fueron usados para transformar una cepa de *E.coli* quien se esparció sobre LB agar con cloranfenicol, para seleccionar así los plásmidos que contenían el mini-Tn10, quienes finalmente fueron purificados y secuenciados.

Ensayo de β -galactosidasa

Las células con el gen reportero *csrB-lacZ* se crecieron aeróbicamente en medio LB o LB ajustado a un pH 5 usando 0.1 M de homopiperazine-N, N'-bis-2-(ácido etanosulfónico) (HOMOPIPES), a 37 °C. Cuando es mencionado, se adicionó acetato a una concentración de 7 mM. Las células con el gen reportero *cydA'-lacZ* se crecieron aeróbicamente (condición no activante) en 10 ml de medio LB con 0.1 M MOPS (pH 7.4) en matraces de 250 ml con agitación constante o en anaerobiosis (condición activante) en tubos de rosca llenados con medio LB amortiguado (pH 7.4) y cultivados a 37 °C, con agitación por imán. Para evaluar la activación del sistema CpxA/CpxR, las células con el gen reportero *cpxP-lacZ* se crecieron aeróbicamente en medio LB suplementado con 100 mM de fosfato de sodio ajustado a un pH 8.0 (condición estimulante) o 5.5 (condición no estimulante) a 37 °C. Las células con el gen reportero *bdm-lacZ* se crecieron aeróbicamente en medio LB a 37 °C (condición no activante) o en medio mínimo M9 suplementado con 0.2 % (p/v) de glucosa. Una vez llegado a una DO_{600 nm} ~ 0.3, 500 mM de NaCl se adicionaron y el cultivo se incubó por otros 30 minutos (condición activante). Las células con el gen reportero *iraM-lacZ* se crecieron aeróbicamente en medio LB a 37 °C (condición no activante) o en medio mínimo M9 suplementado con 0.2 % (p/v) de glucosa. Una vez llegado a una DO_{600 nm} ~ 0.3, las células se recuperaron y resuspendieron en medio mínimo M9 sin magnesio y el cultivo se incubó por otros 30 min a

37 °C (condición activante). La actividad β -galactosidasa se evaluó y expresada en unidades Miller como previamente ha sido descrito (45).

Western blot

Las células deseadas se crecieron aeróbicamente a 37 °C, para posteriormente ser recuperadas por centrifugación durante las fases de crecimiento exponencial y estacionaria. La pastilla celular se resuspendió en buffer TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0), se lisó por sonicación y los restos celulares se removieron por centrifugación a 10,000 rpm por 10 minutos. La concentración de proteína de los diferentes extractos celulares se cuantificó por el método de Bradford, y 5 μ g de proteína total de cada muestra fue mezclado con buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, 4 % SDS, pH 6.8) y separado por SDS-PAGE (con un gel 15 % de poliacrilamida). Las proteínas fueron después transferidas a una membrana Hybond-ECL (Amersham Biosciences). La membrana posteriormente se equilibró en buffer TTBS (25 mM Tris, 150 mM NaCl, and 0.05 % Tween 20) durante 10 minutos y bloqueada mediante buffer de bloqueo (1 % de leche en TTBS) durante 1 hora. Anticuerpos policlonales para UvrY o monoclonales para DnaK (Enzo Life Sciences) se añadieron en una concentración de 1:10,000 e incubados durante 1 hora a temperatura ambiente. La unión de los anticuerpos se detectó mediante el uso de anticuerpos IgG contra conejo o IgG contra ratón fusionados con una peroxidasa de rábano en una dilución 1:10,000 y el uso del sistema de detección Immobilion (Millipore).

Análisis *in vivo* del estado de fosforilación de UvrY

Los niveles de fosforilación de UvrY se evaluaron mediante el uso de electroforesis de geles de poliacrilamida con el reactivo Phos-TagTM. Para ello, 1 ml de cultivo se centrifugó a las DO_{600 nm} indicadas y la pastilla resultante fue solubilizada en 100 µl de 1 M de ácido fórmico con el fin de estabilizar el residuo Asp~P. Las muestras se trataron como previamente se ha descrito (46, 47) con ligeras modificaciones. Las suspensiones celulares se agitaron por *vortex* durante 30 segundos para asegurar la ruptura de las células. A continuación, 10 µl de cada lisado se colocó en un tubo limpio de 1.5 ml y se le adicionaron 5 µl de buffer de carga, y se neutralizaron con la adición de 5 µl de 1 M de Bis-Tris y 3.1 µl de 2.5 N de NaOH. Las proteínas fueron después separadas en un gel 10 % de acrilamida con 37.5 µM de Phos-TagTM. La preparación del gel, así como la electroforesis y la transferencia a membranas de nitrocelulosa se llevaron a cabo con base en las indicaciones del fabricante (Waco Pure Chemical Industries, Japan). También se realizó el paso extra de EDTA para poder remover el Mn²⁺ del gel. La inmunodetección de UvrY se realizó como previamente fue descrito.

Purificación de His₆-UvrY y ensayos de fosforilación *in vitro*

La cepa de *E. coli* M15 transformada con los plásmidos pREP4 y pQE30UvrY (23) se cultivó a 37 °C y con agitación constante en 1 litro de medio LB, adicionado con ampicilina y kanamicina, hasta una DO_{600 nm} ~ 0.6. Posteriormente, se adicionó 1 mM de isopropil-β-D-thiogalactopiranosido (IPTG) con el fin de inducir la sobreexpresión de His₆-UvrY. Transcurridas 5 horas, las células se recuperaron por centrifugación y la pastilla resultante se disolvió en 10 ml de buffer de lisis (50 mM fosfato de sodio, pH 8.0, 300 mM NaCl y 10 mM imidazol). Finalmente, la purificación de proteínas se realizó a 4 °C en condiciones nativas

utilizando una cromatografía de afinidad por Ni-NTA–agarosa como ha sido descrito previamente (23).

Para el ensayo de fosforilación *in vitro*, His₆-UvrY purificado (10 µg), se incubaron con 100 µM de ZMP (AICAR fosfato ≥ 95 % por cromatografía líquida de alta presión por Toronto Research Chemicals) en una reacción de 40 µl que contenía 33 mM de 33 mM Hepes (pH 7.5), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA y 10 % glicerol, a temperatura ambiente. A los tiempos indicados, 5 µl de reacción fueron tomados y mezclados con 1 µl de ácido fórmico 1 M con el fin de detener la reacción y estabilizar el residuo de Asp~P. Las muestras fueron después mezcladas con 5 µl de buffer de carga, y se neutralizaron con la adición de 5 µl de 1 M de Bis-Tris y 3.1 µl de 2.5 N de NaOH, para posteriormente ser analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida con el reactivo Phos-TagTM y la inmunodetección de UvrY se llevó a cabo como previamente fue descrito.

Cuantificación de nucleótidos Z

Los nucleótidos Z fueron cuantificados de acuerdo a Nagy *et al* (48), modificado por Bratton & Marshall (49) y Stetten & Fox (50), con ligeras modificaciones. Los cultivos deseados se crecieron aeróbicamente en LB y a los tiempos indicados, 100 µl de cultivos se mezclaron con 900 µl de una solución que contenía 0.9 % (p/v) de NaCl y 0.001 % (p/v) de SDS, y 15 µl de cloroformo. Las células fueron lisadas por agitación en *vortex* y se añadieron 500 µl de 0.4 N de HCl y 10 µl de 0.1 % (p/v) de NaNO₂. Transcurridos 3 minutos, se añadieron 10 µl de 0.5 % (p/v) de sulfamato de amonio con el fin de detener la reacción de diasotización. Finalmente, después de 2 minutos se adicionaron 10 µl de 0.1 % (p/v) de N-(1-naphtil) etilenodiamina y la reacción se dejó incubando 5 minutos más. El producto obtenido, fue

leído a 545 nm. Para cada muestra, se utilizó un blanco que contenía los mismos compuestos, salvo el NaNO_2 . La concentración de AICAR se obtuvo a partir de ϵ of $4.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (48).

Separación de nucleótidos por HPLC

La extracción de los nucleótidos y su posterior separación por HPLC, fue de acuerdo a Di Pierro (51) con ligeras modificaciones. Los cultivos deseados se crecieron aeróbicamente en medio LB a 37°C y una vez alcanzada una $\text{DO}_{600 \text{ nm}} \sim 0.6$, 5 ml de cultivo fueron tomados y centrifugados. La pastilla resultante se lavó 2 veces con 1 ml 0.9 % (p/v) de NaCl. Posteriormente, la pastilla celular fue disuelta en 80 μL lisozima (10 mg/ml) e incubada durante 10 minutos a 4°C . Transcurrido este lapso, la solución fue rápidamente congelada mediante el uso de nitrógeno líquido con el fin de poder lisar las células. A continuación, a las muestras se les adicionaron 375 μl 1.2 N HClO_4 y se incubaron durante 15 minutos, para posteriormente ser centrifugadas a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4°C . El sobrenadante obtenido se neutralizó mediante la adición de 40 μl 5M K_2CO_3 e incubado otros 5 minutos a temperatura ambiente. El pH de todas las muestras se comprobó mediante el uso de tiras reactivas. Los precipitados generados por la neutralización antes mencionada, se removieron mediante centrifugación a 5,000 rpm durante 2 minutos y el sobrenadante obtenido, se filtró mediante el uso de filtros con un tamaño de poro de 0.45 μM e inyectado (100 μl) en la columna para su análisis por HPLC. El protocolo de separación consistió en la generación de un gradiente serial iniciando con el buffer A (10 mM hidróxido de tetrabutilamonio (TBAH), 10 mM KH_2PO_4 y 0.25 % de metanol ajustado a pH 7) para al final ser sustituido por el buffer

B (2.8 mM TBAH, 100 mM KH_2PO_4 y 30 % (v/v) de metanol ajustado a pH 5) en un lapso de 60 minutos.

RESULTADOS

La interrupción del gen *purA* permite la activación del sistema BarA/UvrY en una cepa *csrA*⁻

Con el fin de identificar el factor o factores involucrados en la activación del sistema BarA/UvrY en una cepa *csrA*⁻, se procedió a realizar una mutagénesis aleatoria con el propósito de obtener una mutante en donde la actividad cinasa de BarA estuviera activa. Para ello se transformó un transposón derivado del Tn10 contenido en el plásmido pBSL181 (34) en la cepa IFC5010 (*csrA*⁻ *csrB-lacZ*), que contenía el plásmido pMX543, este último con la secuencia correspondiente al gen *uvrY* bajo la regulación del promotor de *barA* (9). La selección de mutantes en donde aumentara la expresión del gen reportero *csrB-lacZ*, se realizó mediante la detección visual de la degradación de X-gal sobre cajas de Petri. Con el fin de identificar la ubicación del transposón en las mutantes seleccionadas, se procedió a realizar una genoteca con el DNA de cada mutante y la subsecuente selección basada en la resistencia del transposón, para finalmente secuenciar los plásmidos resultantes. De entre las mutantes obtenidas, en dos de ellas se determinó que el transposón estaba interrumpiendo al gen *purA*. En uno de los casos, el transposón se había insertado en el codón correspondiente al residuo de Thr287, mientras que, en la otra mutante el codón interrumpido correspondía al residuo Leu291. PurA es una proteína involucrada en la síntesis *de novo* de AMP a partir de IMP, a expensas de L-aspartato y guanosin trifosfato (Honzatko & Fromm, 1999). Ambas mutantes obtenidas eran incapaces de crecer en medio mínimo M9 suplementado con 0.2% (p/v) de glucosa, a menos que se adicionara AMP e histidina al medio, lo cual concuerda con reportes previos (52–54).

Posteriormente se procedió a evaluar la actividad del gen reportero *csrB-lacZ*, cuya expresión únicamente depende del sistema BarA/UvrY, tanto en la cepa silvestre (KSB837), como en la mutante *csrA*⁻ (IFC5010) y su contraparte en la cepa con la mutación *purA::Tn10* (*purA*⁻) (IFC6000), y también ambas con el plásmido pMX543. Primeramente, la actividad β-galactosidasa de la cepa IFC5010 con el plásmido pMX543, no presentó expresión del gen reportero *csrB-lacZ*. Por otro lado, la cepa IFC6000 alcanzó valores cercanos al 60 % en comparación con la cepa silvestre (Fig. 1). Al momento de complementar la mutante *csrA*⁻ *purA*⁻ con un plásmido compatible y expresando una versión silvestre de *purA* (pMX558), los niveles de expresión del gen reportero fueron bajos, semejantes a los presentados por la cepa *csrA*⁻. Este resultado indica que una mutación en el gen *purA*, de alguna manera activa al sistema BarA/UvrY en una cepa *csrA*⁻ (Fig. 1).

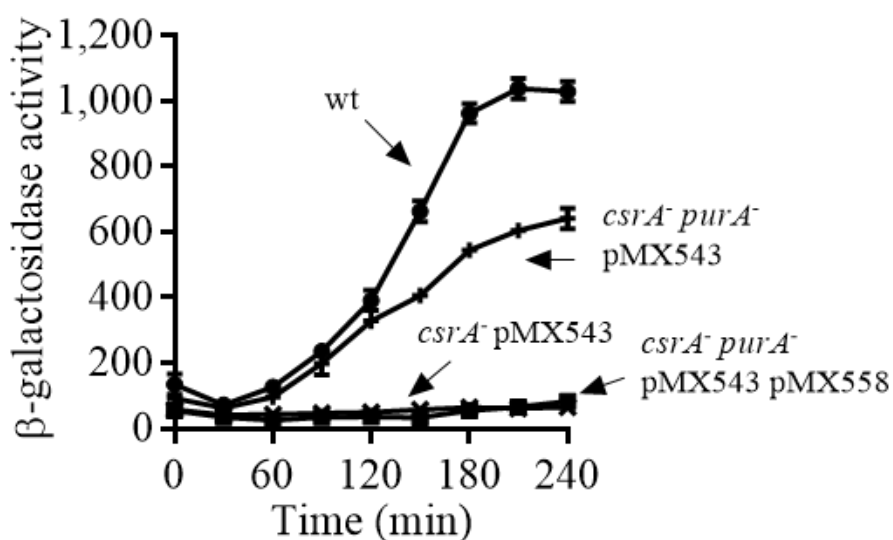


Fig. 1. La interrupción del gen *purA* recupera la activación del sistema BarA/UvrY. A) Seguimiento de la actividad β-galactosidasa de los cultivos KSB837 (wt) (círculos), *csrA*⁻ (IFC5010) con el plásmido pMX543 (taches), *csrA*⁻ *purA*⁻ (IFC6000) con el plásmido pMX543 (cruces) y *csrA*⁻ *purA*⁻ (IFC6000) con los plásmidos pMX543 y pMX558 (cuadros). Los cultivos fueron iniciados a una DO_{600 nm} ~ 0.01 y la toma de muestras se llevó a cabo cada 30 minutos durante 240 minutos una vez que alcanzaron una DO_{600 nm} ~ 0.15. Se muestran media y desviación estándar de 3 experimentos independientes.

La mutación *purA*⁻ induce la activación de UvrY

Posteriormente, y para definir el papel de la mutación *purA*⁻ en la activación de BarA/UvrY, se procedió a transducirla a una cepa silvestre y evaluar la expresión del gen reportero. Se encontró que los niveles de expresión de *csrB-lacZ* en la cepa IFC6001(*purA*⁻) alcanzaban valores incluso superiores a los presentados por la cepa silvestre, indicando así una sobre activación del sistema BarA/UvrY (Fig. 2). Para asegurar que la mutación *purA*⁻ aumentaba la expresión del gen *csrB-lacZ* a través de la activación del sistema BarA/UvrY, se construyeron las cepas IFC6004 (*barA*⁻ *purA*⁻) e IFC6005 (*uvrY*⁻ *purA*⁻) y la expresión del gen reportero fue seguida a través del tiempo. De manera sorprendente, cuando la mutación *purA*⁻ fue transducida a una cepa *barA*⁻, los valores alcanzados por el gen reportero fueron similares a los de una cepa silvestre, mientras que en la cepa *uvrY*⁻ *purA*⁻, no se detectó actividad del gen reportero. Indicando de esta manera que la mutación en el gen *purA* permite la activación de UvrY en ausencia de BarA (Fig. 2).

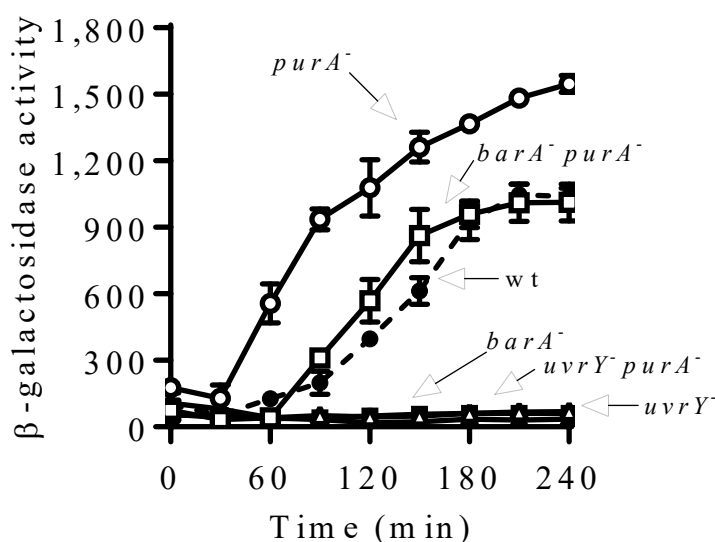


Fig.2. UvrY se activa de manera independiente a BarA en la cepa *purA*⁻. Cultivos de las cepas KSB837 (wt) (círculos), IFC6001 (*purA*⁻) (círculos abiertos), IFC6004 (*barA*⁻ *purA*⁻) (cuadros abiertos), IFC6002 (*barA*⁻) (cuadros), IFC6003 (*uvrY*⁻) (triángulos) e IFC6005 (*uvrY*⁻ *purA*⁻) (triángulos abiertos) fueron crecidos en medio LB y su actividad β-galactosidasa fue medida cada 30 minutos durante 240 minutos. Se muestran media y desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Modificación de la actividad cinasa de BarA en la cepa *purA*⁻

Posteriormente, partiendo de la base que el sistema BarA/UvrY no se activa a pH 5, debido a que no se alcanzan los niveles ambientales suficientes de acetato para inducir la actividad cinasa de BarA (24); se procedió a evaluar el efecto de la mutación *purA*⁻ en esta condición. Se encontró que tanto en la cepa IFC6001 (*purA*⁻) como en la IFC6004 (*barA*⁻ *purA*⁻), el gen reportero se expresaba en ausencia del estímulo específico y con valores incluso mayores a los presentados por la cepa silvestre cuando se adicionaba acetato (Fig. 3A-B), mientras que en las cepas *uvrY*⁻ y *uvrY*⁻ *purA*⁻ no se detectó actividad β -galactosidasa (Fig. 3A). Es importante recalcar que, en ausencia de su estímulo específico una CH presenta actividad de fosfatasa, lo cual parece no estar sucediendo en la cepa *purA*⁻ en pH 5, donde BarA debería de presentar dicha actividad y defosforilar a UvrY~P (Fig. 3A). Esto a menos que la mutación *purA*⁻ esté induciendo la actividad cinasa de BarA o suprimiendo su actividad fosfatasa.

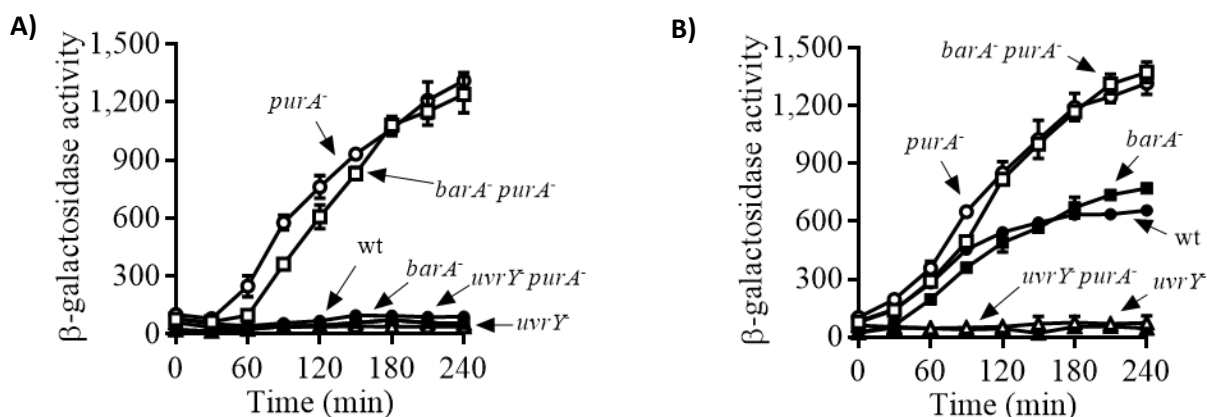


Fig. 3. Activación de BarA por la mutación *purA*. A y B) Cultivos de las cepas KSB837 (wt) (círculos), IFC6001 (*purA*⁻) (círculos abiertos), IFC6002 (*barA*⁻) (cuadros), IFC6004 (*barA*⁻ *purA*⁻) (cuadros abiertos), IFC6003 (*uvrY*⁻) (triángulos) e IFC6005 (*uvrY*⁻ *purA*⁻) (triángulos abiertos) fueron diluidos a una DO_{600 nm} ~ 0.005 en LB amortiguado a un pH 5 usando 0.1 M de homopiperazine-N, N'-bis-2-(ácido etanosulfónico). A una DO_{600 nm} ~ 0.15 los cultivos fueron divididos en 2 y se les adicionó 7 mM de acetato (B) o no (A) y sus actividades β -galactosidasa fueron medidas cada 30 minutos durante 240 minutos. Se muestran media y desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Activación de UvrY en la cepa *purA*⁻

En reportes previos se ha demostrado que en condiciones donde UvrY es sobre expresado y BarA se encuentra ausente, los niveles basales de acetil-P intracelular son capaces de inducir la fosforilación y por lo tanto la activación de UvrY (9). Debido a esto, se procedió a determinar si la mutación *purA*⁻ inducía de alguna manera la sobreexpresión de UvrY. Para ello, se evaluó la expresión de UvrY tanto en una cepa silvestre como en la mutante *purA*⁻. Encontrando que no existe diferencia en los niveles de expresión de UvrY entre la cepa silvestre y la *purA*⁻ (Fig. 4A). Por lo que, de esta manera se comprueba que la activación de UvrY en la cepa *purA*⁻, no se debía a su sobreexpresión.

A continuación, sabiendo que la activación de los RRs depende de un residuo de aspartato conservado, en el caso de UvrY este residuo corresponde al Asp54, se procedió a identificar si este residuo era importante en la activación de UvrY en la cepa *purA*⁻. Para definir esto, se decidió transformar la cepa IFC6005 (*uvrY purA*⁻) con los plásmidos pMX543 y pMX557, los cuales presentaban, de manera respectiva, una versión silvestre de UvrY y una versión de UvrY incapaz de ser fosforilada, donde el Asp54 se encuentra sustituido por un residuo de glutamina. Al evaluar la actividad β-galactosidasa de la cepa IFC6005 con el plásmido pMX543, esta alcanzaba valores similares a los presentados por la cepa *purA*⁻, mientras que en aquella donde se encontraba el gen *uvrY*^{D54Q}, no había expresión del gen reportero (Fig. 5B). Demostrando así que es necesario el residuo de Asp54 para la activación de UvrY en la cepa *purA*⁻.

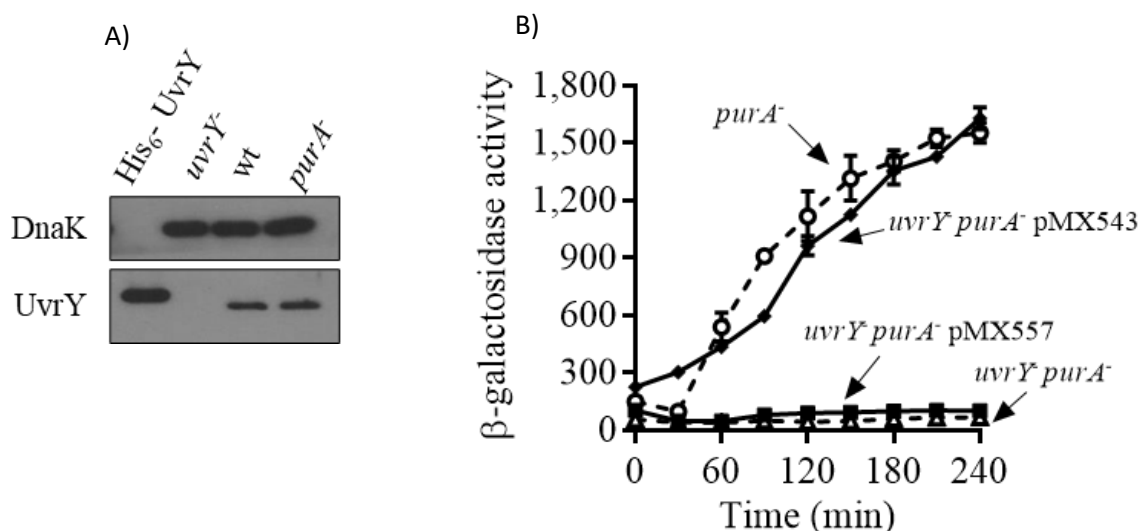


Fig. 5. Activación de UvrY por la mutación *purA* A) Niveles de UvrY en IFC6001 (*purA*⁻) y KSB837 (wt) fueron evaluados mediante *Western* blot utilizando anticuerpos policlonales de UvrY. His₆UvrY y el extracto de *uvrY*⁻ fueron cargados en los carriles 1 y 2. Como control de carga se utilizó DnaK y fue detectada mediante el uso de anticuerpos policlonales. B) El residuo Asp54 es necesario para la activación de UvrY en la cepa *purA*⁻. Cultivos de las cepas IFC6001 (*purA*⁻) (círculos abiertos) e IFC6005 (*uvrY*⁻ *purA*⁻) (triángulos abiertos) con el plásmido pMX543 (rombos) que presenta una copia silvestre del gen *uvrY* o el plásmido pMX557 (cuadrados) que presenta una copia del gen *uvrY*^{D54Q}, fueron crecidos en LB y sus actividades β-galactosidasa fueron medidas cada 30 minutos durante 240 minutos. Se muestran media y desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Ni acetil-P ni carbamoil-P son los responsables de la activación de UvrY en la cepa *purA*⁻

Los FBP son moléculas capaces de inducir la fosforilación de RRs en ausencia de su CH cognada (8). Con base en los fenotipos observados hasta ahora, surgió la hipótesis sobre la acumulación de alguna de estas moléculas y por consiguiente la activación de UvrY en la cepa *purA*⁻. Para comprobar esto, se bloquearon las vías de síntesis de acetil-P y/o carbamoil-P mediante la mutación de los genes *ackA-pta* y/o *carB* en la cepa *barA*⁻ *purA*⁻ (IFC6007), generando de esta manera las cepas IFC6006 (*barA*⁻ *purA*⁻ *ackA-pta*⁻), IFC6008 (*barA*⁻ *purA*⁻ *carB*⁻) e IFC6009 (*barA*⁻ *purA*⁻ *ackA-pta*⁻ *carB*⁻). Al comparar la expresión del gen reportero

en las cepas *barA⁻ purA⁻* y sus derivadas *ackA-pta⁻* y *carB⁻*, se encontró que en todos los casos la activación era prácticamente igual (Fig. 6). Indicando así que ni carbamoil-P ni acetil-P se están acumulando y no son los responsables de la activación de UvrY en la cepa *purA⁻*.

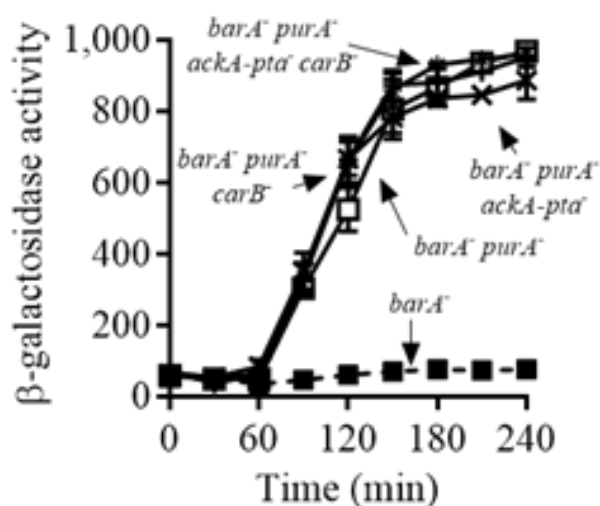


Fig. 6. La activación de UvrY no se debe a acetil-P o carbamoil-P en la cepa *purA⁻*. Cultivos de las cepas IFC6002 (*barA⁻*) (cuadros), IFC6007 (*barA⁻ purA⁻*) (cuadros abiertos), IFC6006 (*barA⁻ purA⁻ ackA-pta⁻*) (taches), IFC6008 (*barA⁻ purA⁻ carB⁻*) (cruces) e IFC6009 (*barA⁻ purA⁻ ackA-pta⁻ carB⁻*) (asteriscos) fueron crecidos en LB y sus actividades β -galactosidasa fueron medidas cada 30 minutos durante 240 minutos. Se muestran media y desviación estándar de 3 experimentos independientes.

La acumulación de nucleótidos Z induce la activación de UvrY

Con base en la activación directa de UvrY en ausencia de BarA en una cepa *purA⁻* y que esto no se debía a la sobreexpresión de UvrY o a la acumulación de los FBP, acetil-P o carbamoil-P, surgió la idea sobre la acumulación de algún intermediario de la vía de biosíntesis de purinas, que pudiera favorecer la activación de UvrY. Para comprobar esta hipótesis, se decidió bloquear diferentes pasos en la vía de biosíntesis de purinas, así como la reacción

llevada a cabo por el complejo HisFH de la vía de biosíntesis de histidinas, debido a que esta tiene como producto a ZMP, el cual es un intermediario de la vía de biosíntesis de purinas y se encuentra río arriba con respecto a la reacción llevada a cabo por PurA (Fig. 7A). Primeramente, se decidió mutar la síntesis de IMP, el cual es el sustrato de PurA para la síntesis de S-AMP (Fig. 7A), para ello se mutó el gen *purH* en la cepa IFC6007 (*barA⁻ purA⁻*) dando lugar a la cepa IFC6013. Al evaluar la expresión del gen reportero entre las cepas IFC6007 e IFC6013, no se encontró diferencia, descartando de esta manera que la acumulación de IMP es la responsable de la activación de UvrY (Fig. 7B). Posteriormente, se bloqueó la síntesis de ZMP mediante la mutación de los genes *purC* y/o *hisF* en la cepa IFC6007 (*barA⁻ purA⁻*). La mutación de *purC* fue seleccionada debido a que PurB, quien se encarga de la síntesis de ZMP en la vía de síntesis *de novo* de purinas, es esencial. Al seguir la expresión de *csrB-lacZ* en la cepa IFC6010 (*barA⁻ purA⁻ purC⁻*), se observó que esta disminuía casi cuatro veces en comparación con la cepa IFC6007, mientras que en la cepa IFC6011 (*barA⁻ purA⁻ hisF⁻*), la actividad β -galactosidasa fue aproximadamente la mitad de la presentada por la cepa *barA⁻ purA⁻*. Y cuando ambas vías (purinas e histidinas) fueron bloqueadas en la cepa IFC6012 (*barA⁻ purA⁻ purC⁻ hisF⁻*), la expresión de *csrB-lacZ* fue prácticamente abolida (Fig. 7B). Sugiriendo de esta manera, que ZMP o su forma trifosforilada ZTP, son los responsables de la activación de UvrY.

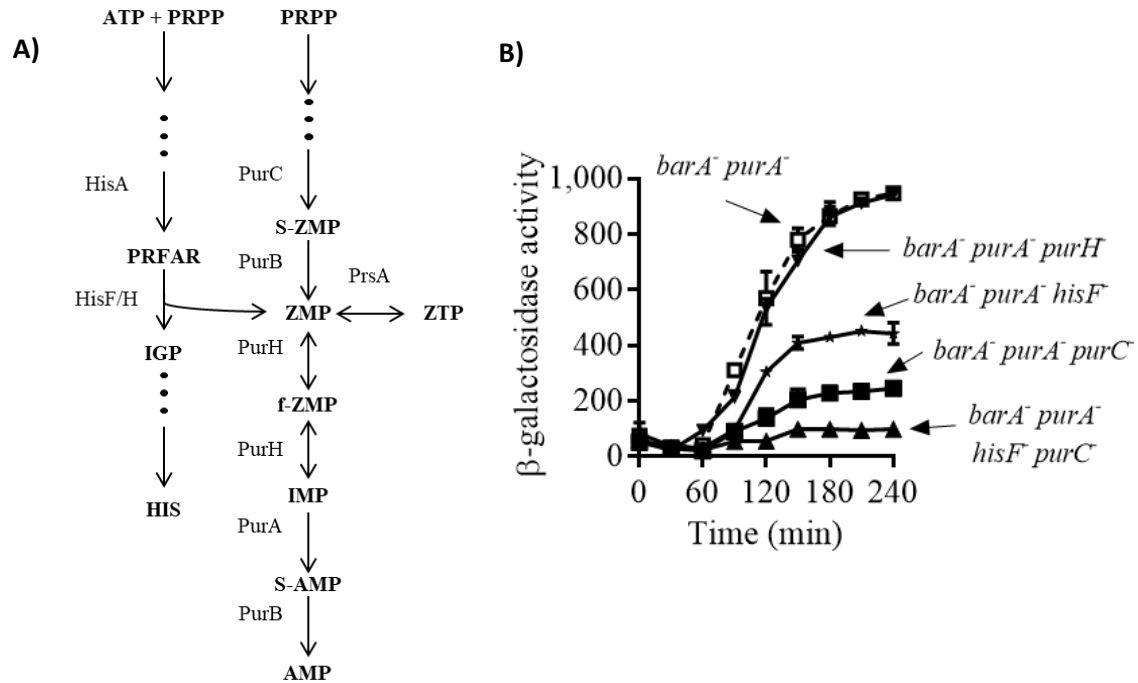


Fig. 7. (A) Representación de la vía de biosíntesis de purinas e histidinas en *E. coli*. Abreviaturas: PrsA: ribosa-fosfato difosfocinasa; PurH: IMP ciclohidrolasa; PurA: adenilosuccinato sintasa; HisF/H: Complejjo imidazol glicerol fosfato sintasa; HisA: 1-(5-fosforibosil)-5-[(5-fosforibosilamino) metilideneamino]imidazol-4-carboxamida isomerasa; PurB: adenilosuccinato liasa; PurC: fosforibosilaminoimidazol-succinocarboxamida sintasa; ATP: adenosín trifosfato; PRPP: 5-fosfo- α -D-ribosa 1-difosfato; PRFAR: fosforibulosil-formimino-5-aminoimidazol-4-carboxamida ribótido fosfato; IGP: D-eritro-1-(imidazol-4-yl)-glicerol 3-fosfato; S-ZMP: 5'-fosforibosil-4-(N-succinocarboxamida)-5-aminoimidazol; ZMP: 5-aminoimidazol-4-carboxiamida-1- β -D-ribofuranosil 5'-monofosfato; ZTP: 5-aminoimidazol-4-carboxiamida-1- β -D-ribofuranosil 5'-trifosfato; F-ZMP: 5-formamido-1-(5-fosfo-D-ribosil)-imidazol-4-carboxamida; IMP: inosín monofosfato; S-AMP: adenilosuccinato; AMP: adenosín monofosfato; HIS: histidina. (B) Cultivos de las cepas IFC6007 (*barA⁻ purA⁻*) (cuadros abiertos), IFC6013 (*barA⁻ purA⁻ purH⁻*) (rombos abiertos), IFC6010 (*barA⁻ purA⁻ purC⁻*) (cruces), IFC6011 (*barA⁻ purA⁻ hisF⁻*) (taches) e IFC6012 (*barA⁻ purA⁻ purC⁻ hisF⁻*) (círculos) fueron crecidos en LB y sus actividades β -galactosidasa fueron medidas cada 30 minutos durante 240 minutos. Se muestran media y desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Adicionalmente, debido a que las vías de biosíntesis de purinas e histidinas son reguladas negativamente por la concentración de AMP, esto mediante la inhibición de PrsA, quien se encarga de la síntesis de PRPP, o a través de la activación del regulador transcripcional PurR, el cual reprime la expresión de los genes de la vía de síntesis *de novo* de purinas (55–57), es de suponer que al adicionar AMP a un cultivo de una cepa *purA⁻*, la formación de ZMP se

vería afectada y por ende no se llevaría a cabo la activación de UvrY. Para evaluar esto, se procedió a cultivar la cepa IFC6007 (*barA⁻ purA⁻*) en presencia de AMP hasta una DO_{600 nm} ~ 0.7, situación en la cual UvrY ya se encuentra activo en la cepa *purA⁻*, y se encontró que la expresión de *csrB-lacZ* estaba totalmente abatida. Mientras que en la cepa IFC6014 (*barA⁻ purA⁻ purR⁻*), en donde el regulador transcripcional PurR se encontraba mutado con respecto a la cepa IFC6007, la expresión de *csrB* aumentaba considerablemente, y al adicionar AMP, esta expresión no se veía afectada. Demostrando así que la concentración de AMP en la cepa *purA⁻* se ve afectada y sugiere fuertemente que la acumulación de ZMP y/o ZTP influyen en la activación de UvrY (Fig. 8).

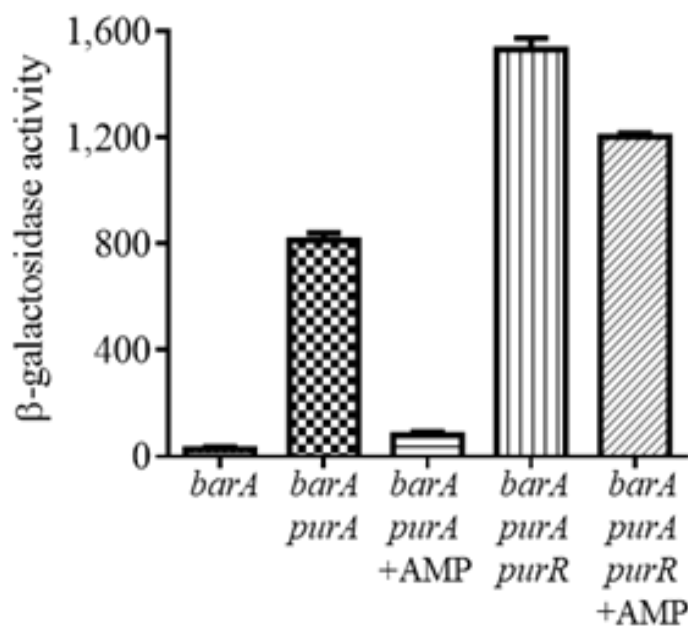


Fig. 8. La concentración de AMP intracelular reprime la activación de UvrY en la cepa *purA⁻*. Cultivos de las cepas IFC6002 (*barA⁻*), IFC6007 (*barA⁻ purA⁻*) e IFC6014 (*barA⁻ purA⁻ purR⁻*) fueron cultivados en LB en presencia o no de 100 μM AMP y se midió su actividad β-galactosidasa una vez que llegaron a una DO_{600 nm} ~ 0.7. Se muestran media y desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Con el fin de dar más evidencia sobre el papel de ZMP y/o ZTP en la activación de UvrY. Se procedió a cuantificar dichos nucleótidos mediante una aproximación colorimétrica, basada en la diasotización de las aminas aromáticas primarias, las cuales están presentes en ZMP y ZTP, y su posterior acoplamiento con N-(1-naftil) etilenodamina para finalmente detectar a una DO_{545 nm} el producto resultante. Es importante mencionar que este método no permite diferenciar entre ZMP, ZTP o sus derivados metabólicos, por lo que serán mencionados como nucleótidos Z. La cuantificación de dichos compuestos se realizó en las cepas IFC6002 (*barA*⁻), IFC6007 (*barA*⁻ *purA*⁻) e IFC6014 (*barA*⁻ *purA*⁻ *purR*⁻), en presencia o no de AMP. Al cuantificar los nucleótidos Z, se encontró que estos se acumulaban tanto en la cepa IFC6007 como en la IFC6014, encontrando mayor concentración en fases más tempranas del crecimiento en la cepa donde el regulador transcripcional PurR estaba mutado (IFC6014) (Fig. 9B). Mientras que en la cepa IFC6002, no se detectó acumulación de estos nucleótidos Z, así como en la cepa IFC6007 suplementada con AMP (Fig. 9B). Cabe resaltar que la acumulación de estos compuestos coincide con la activación de UvrY y la expresión de *csrB-lacZ* (Fig. 9A-B). Por lo tanto, es posible afirmar que los nucleótidos Z se acumulan en una cepa *purA*⁻ y que existe una relación entre su acumulación y la activación de UvrY.

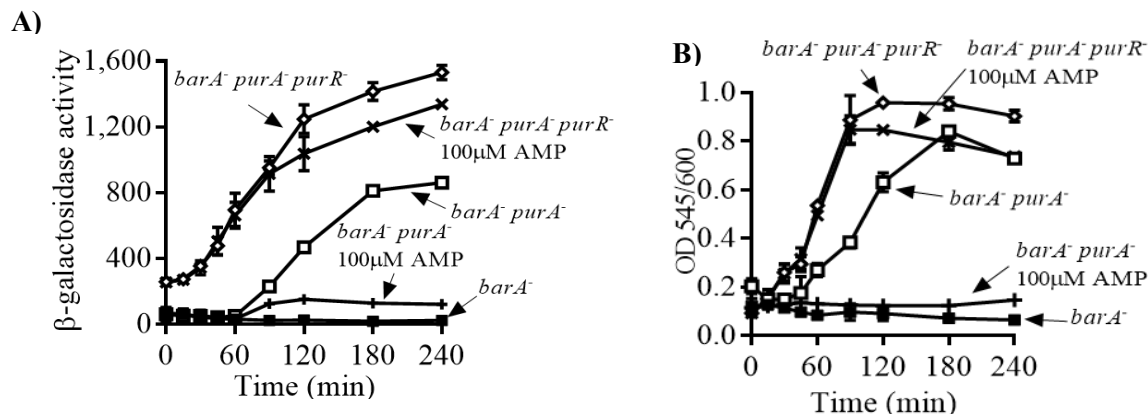


Fig. 9. Relación entre la acumulación de nucleótidos Z y la activación de UvrY. A) Cultivos de las cepas IFC6002 (*barA⁻*) (cuadros), IFC6007 (*barA⁻ purA⁻*) (cuadros abiertos) e IFC6014 (*barA⁻ purA⁻ purR⁻*) (rombos abiertos) fueron cultivadas en LB, cuando se indica, 100 μ M de AMP fueron suplementados a las cepas IFC6007 (cruces) e IFC6014 (taches). Las muestras fueron tomadas cada 15 o 30 minutos durante 240 minutos y sus respectivas actividades β -galactosidasa fueron determinadas. Se muestran media y desviación estándar de 3 experimentos independientes. B) Las muestras y cepas usadas corresponden a las mismas usadas en el inciso A). Los nucleótidos-Z fueron cuantificados mediante su diasotización y posterior acoplamiento con N-(1-naftil) etilenodamina. Se muestra la relación $OD_{545\text{ nm}}/OD_{600\text{ nm}}$ con el fin de normalizar los resultados. Se muestran media y desviación estándar de 3 experimentos independientes

Posteriormente, para definir si ZMP y/o ZTP se acumulaban, así como la relación de concentración entre los dos, se decidió separar e identificar por HPLC los nucleótidos de las cepas *barA⁻*, *barA⁻ purA⁻* y *barA⁻ purA⁻ hisF⁻ purC⁻*. Para poder determinar los tiempos de retención de ZMP y ZTP se utilizaron estándares de ambos compuestos. Como resultados, se encontró en la cepa *barA⁻*, una amplia diversidad de picos, siendo AMP el compuesto dominante, mientras que ZMP o ZTP no fueron identificados (Fig. 10A). Por otro lado, en la cepa *barA⁻ purA⁻*, la concentración de AMP fue significativamente menor a la presentada por la cepa *barA⁻*, mientras que las concentraciones tanto de ZMP como ZTP se veían aumentadas, siendo el primero de estos el nucleótido dominante (Fig. 10B). Y en la cepa *barA⁻ purA⁻ hisF⁻ purC⁻*, en la cual la síntesis de ZMP está bloqueada, no se identificaron los picos correspondientes a este compuesto o a su forma trifosforilada (ZTP) (Fig. 10C).

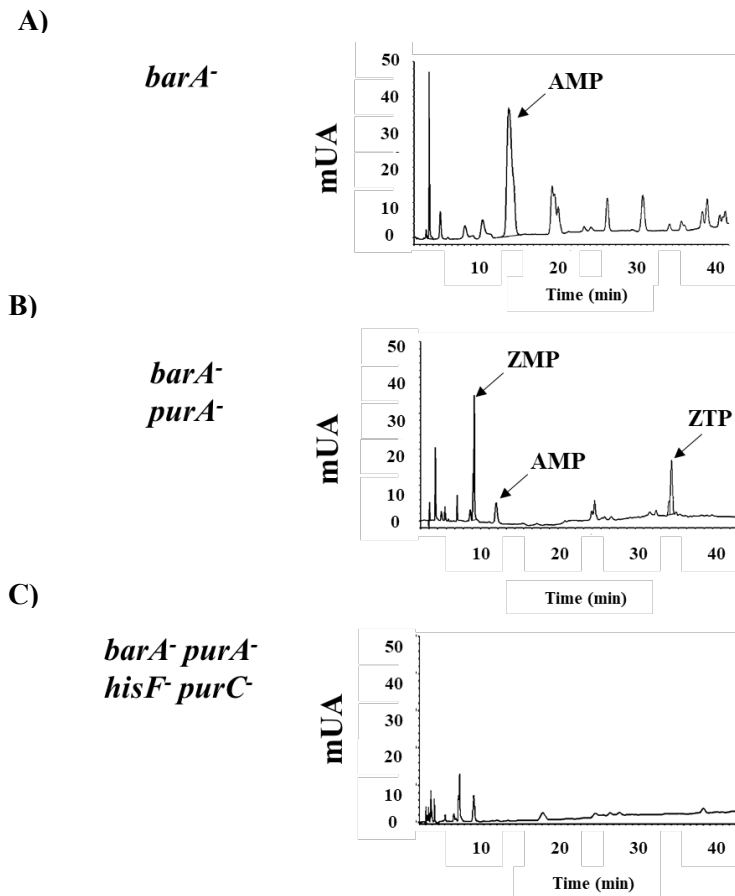


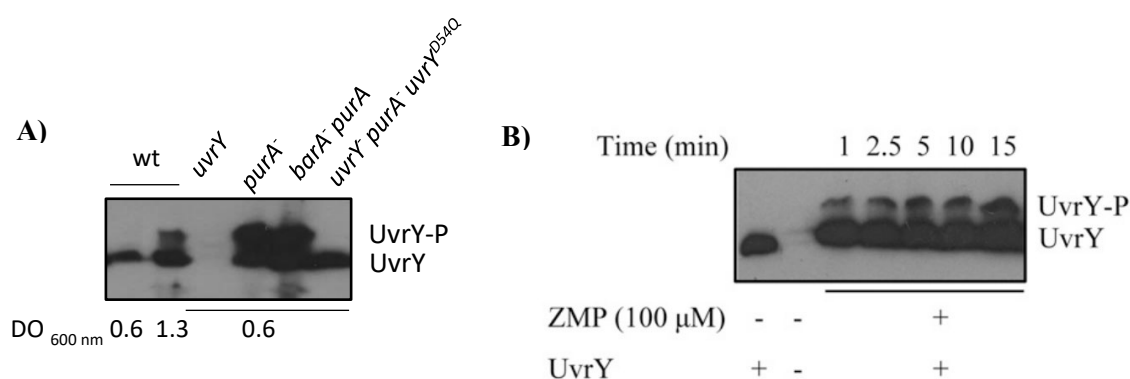
Fig. 10. Cromatogramas de nucleótidos intracelulares en cepas *purA⁻*. Cultivos de las cepas *barA⁻*, *barA⁻ purA⁻* y *barA⁻ purA⁻ purC⁻ hisF⁻* fueron cultivados en LB hasta una $DO_{600\text{ nm}} \sim 0.7$ donde fueron recuperadas las células para posteriormente ser tratadas con 1.2 N de ácido perclórico para poder separar los diferentes nucleótidos. Previo a la inyección en el HPLC, las muestras fueron neutralizadas con 5 M de K_2CO_3 . Para poder separar las muestras se utilizó una columna C18 a un flujo constante de 1 ml/min y un gradiente generado por el buffer A y el buffer B. Se muestra un cromatograma característico de cada cepa.

Fosforilación de UvrY dependiente de nucleótidos Z

Basado en la activación de UvrY dependiente de la acumulación de los nucleótidos Z y que el residuo Asp54 es necesario para su activación en la cepa *purA⁻*. Se procedió a evaluar el estado de fosforilación de UvrY en la cepa *purA⁻* mediante el uso de SDS-PAGE con el reactivo de Phos-TagTM, el cual permite separar una proteína fosforilada de una que no lo

esté (46, 58), y su posterior detección por *Western blot*. Para ello, y con el fin de obtener una imagen representativa de UvrY y su forma fosforilada (UvrY~P), extractos celulares de la cepa IFC6003 (*uvrY*⁻), así como de la cepa KSB837 (wt), la cual fue cultivada hasta una DO_{600 nm} ~ 0.6 (condición no activante) o hasta una DO_{600 nm} ~ 1.3 (condición en donde UvrY ya se encuentra parcialmente fosforilado), fueron analizadas por SDS-PAGE con Phos-Tag y posteriormente inmunodetectadas con anticuerpos específicos para UvrY. Como era de esperarse, no se detectó a UvrY en el extracto correspondiente a la cepa IFC6003, mientras que, en la cepa silvestre bajo condiciones no estimulantes, solamente se detectó una banda correspondiente a UvrY (Fig. 11A). Por otro lado, en el extracto de la cepa silvestre bajo condiciones activantes (DO_{600 nm} ~ 1.3), se detectaron dos bandas, una correspondiente a UvrY y otra a UvrY~P (Fig. 11A). A continuación, y bajo condiciones no activantes (DO_{600 nm} ~ 0.6), se analizaron los extractos celulares de las cepas IFC6001 (*purA*⁻), IFC6007 (*barA*⁻ *purA*⁻) e IFC6005 (*uvrY*⁻ *purA*⁻) con el plásmido pMX557, el cual presenta el gen *uvrY*^{D54Q}. Como resultado, tanto UvrY como UvrY~P fueron observados en los extractos correspondientes a las cepas IFC6001 e IFC6004. Adicionalmente, en el extracto de la cepa IFC6005 con el plásmido pMX557, solamente se pudo identificar a UvrY y no UvrY~P (Fig. 11A), demostrando de esta manera que la fosforilación de UvrY dependiente de los nucleótidos Z ocurre en el Asp54.

Para proporcionar más evidencia sobre la capacidad de los nucleótidos Z de donar su grupo fosforilo y activar a UvrY, se procedió a incubar His₆-UvrY en presencia de 100 μM de ZMP y su estado de fosforilación fue seguido mediante el análisis por SDS-PAGE con Phos-Tag y su posterior inmunodetección. Se encontraron cantidades crecientes de UvrY-P en presencia de ZMP, lo cual indica que al menos ZMP es capaz de donar su grupo fosforilo a UvrY y activarlo (Fig. 11B).



*Fig. 11. ZMP es capaz de fosforila de manera directa a UvrY. A) Carriles 1 y 2, KSB837 (wt); carril 3, IFC6005 (uvrY); carril 4, IFC6001 (purA⁻); carril 5, IFC6007 (barA⁻ purA⁻); carril 6, IFC6005 (uvrY⁻ purA⁻) con el plásmido pMX557 (expresando el gen *uvrY*^{D54Q}). Extractos celulares de los carriles 1 y 3-6 fueron obtenidos de cultivos celulares a una DO_{600 nm} ~ 0.6 (condición no activante) y el extracto celular del carril 2 fue obtenido a una DO_{600 nm} ~ 1.3 (condición activante). B) His₆-UvrY fue incubado en una reacción de 40 μl con 100 μM de ZMP y en los tiempos indicados, 5 μl de la reacción fueron separados y tratados con 1 μl de 1 M de ácido fórmico con el objetivo de para la reacción y estabilizar UvrY~P. Posteriormente las muestras fueron tratadas con 5 μl de 1M Bis-Tris, 5 μl de buffer de carga y finalmente neutralizadas con 3.1 μl de NaOH 2.5 N. Las muestras fueron resueltas en un gel 10 % de acrilamida y 37.5 μM de Phos-Tag. UvrY y UvrY~P fueron identificados por *Western blot* utilizando anticuerpos policlonales.*

Los nucleótidos Z inducen la activación de RRs no relacionados

A continuación, para comprobar que la fosforilación de UvrY por los nucleótidos Z no fuera única y por lo tanto otros RR también pudieran ser activados. Primeramente, se evaluó el

efecto de la mutación *purA*⁻ sobre el sistema ArcB/ArcA el cual se activa en condiciones de anaerobiosis (59). Para ello, se utilizó el gen reportero *cyd-lacZ*, cuya expresión está positivamente inducida por ArcA~P (60). La actividad β-galactosidasa fue seguida en las cepas *purA*⁻, *arcB*⁻ *purA*⁻ y *arcB*⁻ *arcA*⁻ *purA*⁻, encontrado que en aerobiosis (no activante) a una DO_{600 nm} ~ 0.3, condición en la cual los niveles de los nucleótidos Z se mantienen todavía bajos, no había expresión del gen reportero. Por otro lado, a una DO_{600 nm} ~ 0.6, situación en la cual la concentración de los nucleótidos Z ya ha alcanzado un umbral suficiente para inducir la fosforilación de UvrY, se observa un aumento significativo en la expresión de *cyd-lacZ* en la cepa *arcB*⁻ *purA*⁻ pero no en las cepas *purA*⁻ o *arcB*⁻ *arcA*⁻ *purA*⁻ (Fig. 12A). Como era de esperarse, cuando se adicionó AMP al cultivo, bloqueando de esta manera la acumulación de los nucleótidos Z, la expresión del reportero *cyd-lacZ* en la cepa *arcB*⁻ *purA*⁻, se vio abatida (Fig. 12A). Por lo tanto, se demuestra así que los nucleótidos Z son capaces de inducir la activación de ArcA, posiblemente mediante su fosforilación. Esto basado en la baja expresión del gen reportero en la cepa *purA*⁻, donde ArcB presenta actividad de fosfatasa bajo condiciones no activantes y por lo tanto defosforila a ArcA~P.

Finalmente, el efecto de los nucleótidos Z fue evaluado en los SDCs CpxA/CpxR, PhoQ/PhoP y RcsC-RcsD/RcsB, usando de manera respectiva los reporteros *cpxP-lacZ*, *iraM-lacZ*, y *bdm-lacZ*. En todos los casos se obtuvieron valores de referencia para las cepas silvestres, bajo condiciones activantes y no activantes (40, 61, 62). Posteriormente, se evaluó la expresión de cada reportero en la cepa *purA*⁻ y en ausencia de su respectiva CH a una DO_{600 nm} de 0.3 y 0.6. Solamente se encontró activación de la expresión de los reporteros en ausencia de la CH cognada y el estímulo específico, a una DO_{600 nm} ~ 0.6 (Fig. 12B-D). Al igual que con los otros sistemas evaluados, cuando se adicionó AMP al cultivo, no se observó

expresión del gen reportero. De tal manera, se comprueba que los nucleótidos Z pueden actuar como FBP para una amplia gama de RRs en *E. coli* (Fig. 12A-D).

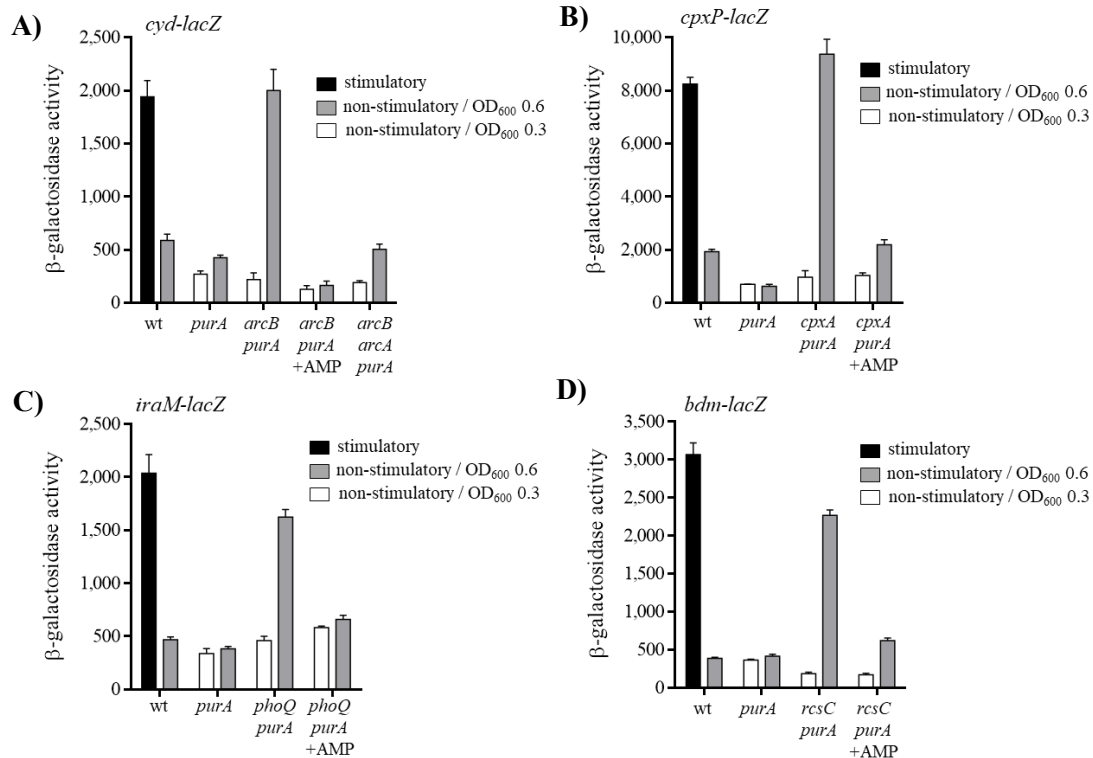


Fig. 12. Los nucleótidos Z son capaces de inducir la activación de RRs no relacionados entre sí, en ausencia de sus respectivas CH cognadas. (A) Cultivos de las cepas IFC6016 (wt), IFC6017 (*purA*⁻), IFC6018 (*arcB purA*⁻) e IFC6019 (*arcB arcA purA*⁻), todas con el gen reportero *cyd-lacZ* fueron cultivados aeróbicamente (no estimuladorio) en LB con 0.1 M MOPS (pH 7.4) hasta una DO_{600 nm} ~ 0.3 (barras blancas) o DO_{600 nm} ~ 0.6 (barras grises). Como control, la cepa IFC6016 (wt) fue crecida anaeróbicamente (condición estimuladorio) en el mismo medio. (B) Cultivos de las cepas IFC6020 (wt), IFC6021 (*purA*⁻) e IFC6022 (*cpxA purA*⁻), todas con el gen reportero *cpxP-lacZ* fueron cultivadas en medio LB pH 5.8 (no estimuladorio) hasta una DO_{600 nm} ~ 0.3 (barras blancas) o DO_{600 nm} ~ 0.6 (barras grises). Como control, la cepa IFC6020 (wt) fue cultivada en medio LB pH 8.8 (estimuladorio). (C) Cultivos de la cepa IFC6026 (wt), IFC6027 (*purA*⁻) e IFC6028 (*phoQ purA*⁻), todas con el gen reportero *iraM-lacZ* fueron cultivadas en medio LB (no estimuladorio) hasta una DO_{600 nm} ~ 0.3 (barras blancas) o DO_{600 nm} ~ 0.6 (barras grises). Como control, la cepa IFC6026 (wt) fue cultivada en medio mínimo M9 suplementado con 0.2 % (p/v) de glucosa hasta una DO_{600 nm} ~ 0.3, donde las células fueron recuperadas y transferidas a un medio M9 libre de Mg²⁺ e incubado 30 minutos más (estimuladorio). (D) Cultivos de las cepas IFC6023 (wt), IFC6024 (*purA*⁻) e IFC6025 (*rscC purA*⁻), todas con el gen reportero *bdm-lacZ* fueron cultivadas en medio LB (no estimuladorio) hasta una DO_{600 nm} ~ 0.3 (barras blancas) o DO_{600 nm} ~ 0.6 (barras grises). Como control, la cepa IFC6023 (wt) fue cultivada en medio mínimo M9 suplementado con 0.2 % (p/v) de glucosa hasta una DO_{600 nm} ~ 0.3, donde se adicionaron 500 mM de NaCl y se dejó incubar por 30 minutos más (estimuladorio). Para los incisos A-D, se midió la actividad β-galactosidasa y se muestran media y desviación estándar de 3 experimentos independientes.

DISCUSIÓN

En la búsqueda del factor o factores involucrados en la regulación del sistema BarA/UvrY y cuya(s) expresión(es) dependen del regulador global CsrA, se encontró que una interrupción en el gen *purA*, el cual está involucrado en la vía de biosíntesis purinas, permite la acumulación de los intermediarios ZMP y ZTP, quienes son capaces de actuar como FBP para una amplia variedad de RRs en *E. coli*. Los FBP, tales como el acetil-P, carbamoil-P, fosforamidatos y γ -glutamil-P (8, 18, 19) son moléculas capaces de donar su grupo fosforilo y activar RRs tanto *in vitro* como *in vivo*, aunque esta activación en la mayoría de los casos depende de la ausencia de la CH cognada. Sin embargo, se ha planteado que la fosforilación de los RRs por parte de los FBP permite mantener un nivel basal de los RR~P, esto con el fin de poder efectuar una pronta respuesta una vez que el estímulo específico es detectado por la CH cognada (8).

En el presente trabajo se encontró que los Z nucleótidos son capaces de activar *in vivo* a varios RRs en ausencia de sus respectivas CHs cognadas, aunque en el caso de UvrY, esta activación se llevó a cabo incluso en presencia de BarA y en ausencia de su señal específica (acetato). Lo cual indica que estos compuestos tienen un efecto sobre la actividad cinasa de BarA, ya que es bien sabido que, en ausencia de acetato ambiental, BarA presenta actividad de fosfatasa sobre UvrY~P (9). Por lo que es necesario llevar a cabo mayores estudios con el fin de determinar la relación entre la acumulación de los Z nucleótidos y la regulación en la actividad cinasa de BarA.

La activación de UvrY dependiente de los Z nucleótidos se determinó que se lleva a cabo en el residuo Asp54, el cual es el residuo fosforilado por BarA~P, adicionalmente, se comprobó

que esta activación podía llevarse a cabo directamente por la donación del \sim P de ZMP. Cabe mencionar que todos los FBP antes reportados se ha demostrado que presentan energías libres (ΔG°) considerablemente altas, como los son las de acetil-P (-43 kJ/mol) o de carbamoil-P (-39 kJ/mol), por lo que se ha tomado en cuenta esta particularidad para proponer a los Z nucleótidos como FBP. Sin embargo y debido a que no existen demostraciones experimentales de los valores de ΔG° tanto de ZMP o ZTP, la termodinámica en el flujo del \sim P de estas moléculas hacia los RRs no puede ser demostrada.

Los Z nucleótidos son moléculas con una larga historia evolutiva y gracias a esto se les ha postulado como moléculas antiguas (63). Esto se basa en varios factores, como la presencia tanto de la vía de biosíntesis de purinas como de histidinas en los tres dominios de la vida, asimismo, estas vías se han mantenido altamente conservadas desde su establecimiento (64). Adicionalmente, AICA quien es el precursor de ZMP puede ser sintetizado bajo condiciones prebióticas y tanto ZMP como ZTP pueden interactuar y regular diferentes RNAs (65, 66). Con base en estos datos, así como la hipótesis del origen de los RRs previo a las CHs (15), la cual sugiere que la activación de los RRs primitivos sucedía mediante un mecanismo posiblemente influenciado por la acumulación de los diferentes FBP, principalmente acetil-P. Se plantea un escenario en donde ZMP y/o ZTP, cuyas concentraciones intracelulares fluctúan dependiendo de factores ambientales, tales como estrés por ausencia de ácido fólico (67), son capaces de influir en la activación de diferentes RRs en *E. coli*.

CONCLUSIONES

La interrupción del gen *purA* induce la activación del sistema BarA/UvrY en una cepa *csrA*⁻

La actividad cinasa de BarA se ve afectada en una cepa *purA*⁻.

UvrY se activa de manera directa mediante la fosforilación de su Asp54 en una cepa *purA*⁻ y esto no se debe a su sobreexpresión o la acumulación de acetyl-P o carbamoyl-P.

La concentración de intermediarios de la vía de biosíntesis de purinas, ZMP y ZTP, aumenta en una cepa *purA*⁻ y la activación de UvrY coincide con dicha acumulación.

ZMP es capaz de fosforilar de manera directa a UvrY.

RRs de SDC no relacionados entre sí, son activados por los nucleótidos Z en ausencia de sus respectivas CH cognadas.

REFERENCIAS

1. L. E. Ulrich, E. V Koonin, I. B. Zhulin, One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol.* **13**, 52–56 (2005).
2. K. Wuichet, B. J. Cantwell, I. B. Zhulin, Evolution and phyletic distribution of two-component signal transduction systems. *Curr. Opin. Microbiol.*, 5–11 (2010).
3. J. A. Hoch, T. J. Silhavy, *Two-component signal transduction*, 1st Ed. (American Society for Microbiology (ASM), 1995).
4. D. Georgellis, O. Kwon, P. De Wulf, E. C. C. Lin, Signal decay through a reverse phosphorelay in the arc two-component signal transduction system. *J. Biol. Chem.* **273**, 32864–32869 (1998).
5. J. L. Teran-Melo, *et al.*, Routes of phosphoryl group transfer during signal transmission and signal decay in the dimeric sensor histidine kinase ArcB. *J. Biol. Chem.* **293**, 13214–13223 (2018).
6. L. J. Kenney, How important is the phosphatase activity of sensor kinases? *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 168–176 (2010).
7. A. M. Stock, V. L. Robinson, P. N. Goudreau, Two-component signal transduction. *Reactions* **69**, 183–215 (2000).
8. G. S. Lukat, W. R. McCleary, a M. Stock, J. B. Stock, Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 718–722 (1992).
9. M. I. Camacho, *et al.*, Effects of the global regulator CsrA on the BarA/UvrY two-

- component signaling system. *J. Bacteriol.* **197**, 983–91 (2015).
10. I. Schroder, C. D. Wolin, R. Cavicchioli, R. P. Gunsalus, Phosphorylation and dephosphorylation of the NarQ, NarX, and NarL proteins of the nitrate-dependent two-component regulatory system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**, 4985–4992 (1994).
 11. R. V. Swanson, M. G. Sanna, M. I. Simon, Thermostable chemotaxis proteins from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *J. Bacteriol.* **178**, 484–489 (1996).
 12. S. K. Kim, M. R. Wilmes-Riesenberg, B. L. Wanner, Involvement of the sensor kinase EnvZ in the in vivo activation of the response-regulator PhoB by acetyl phosphate. *Mol. Microbiol.* **22**, 135–147 (1996).
 13. M. Heyde, P. Laloi, R. Portalier, Involvement of carbon source and acetyl phosphate in the external-pH- dependent expression of porin genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**, 198–202 (2000).
 14. A. H. Klein, A. Shulla, S. A. Reimann, D. H. Keating, A. J. Wolfe, The intracellular concentration of acetyl phosphate in *Escherichia coli* is sufficient for direct phosphorylation of two-component response regulators. *J. Bacteriol.* **189**, 5574–5581 (2007).
 15. A. J. Wolfe, Physiologically relevant small phosphodonors link metabolism to signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 204–209 (2010).
 16. A. J. Wolfe, The acetate switch. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**, 12–50 (2005).

17. W. Martin, M. J. Russell, On the origin of biochemistry at an alkaline hydrothermal vent. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **362**, 1887–1925 (2007).
18. D. R. Buckler, A. M. Stock, Synthesis of [³²P]Phosphoramidate for Use as a Low Molecular Weight Phosphodonor Reagent. *Anal. Biochem.* **283**, 222–227 (2000).
19. M. Ogura, M. Kawata-Mukai, M. Itaya, K. Takio, T. Tanaka, Multiple copies of the proB gene enhance degS-dependent extracellular protease production in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **176**, 5673–80 (1994).
20. J. J. Petkowski, W. Bains, S. Seager, Natural products containing “Rare” organophosphorus functional groups. *Molecules* **24** (2019).
21. P. V Attwood, M. J. Piggott, X. L. Zu, P. G. Besant, Focus on phosphohistidine Review Article. 145–156 (2007).
22. J. W. Zapf, J. A. Hoch, J. M. Whiteley, A phosphotransferase activity of the *Bacillus subtilis* sporulation protein Spo0F that employs phosphoramidate substrates. *Biochemistry* **35**, 2926–2933 (1996).
23. A. K. Pernestig, Ö. Melefors, D. Georgellis, Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **276**, 225–231 (2001).
24. R. G. Chavez, A. F. Alvarez, T. Romeo, D. Georgellis, The physiological stimulus for the BarA sensor kinase. *J. Bacteriol.* **192**, 2009–12 (2010).
25. T. Weilbacher, *et al.*, A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **48**, 657–670 (2003).

26. K. Suzuki, *et al.*, Regulatory Circuitry of the CsrA / CsrB and BarA / UvrY Systems of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**, 5130–5140 (2002).
27. S. Gudapaty, K. Suzuki, X. Wang, P. Babitzke, T. Romeo, Regulatory interactions of Csr components: The RNA binding protein CsrA activates *csrB* transcription in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**, 6017–6027 (2001).
28. T. Romeo, C. A. Vakulskas, P. Babitzke, Post-transcriptional regulation on a global scale: Form and function of Csr/Rsm systems. *Environ. Microbiol.* **15**, 313–324 (2013).
29. N. Figueroa-Bossi, *et al.*, RNA remodeling by bacterial global regulator CsrA promotes Rho-dependent transcription termination. *Genes Dev.* **28**, 1239–1251 (2014).
30. T. Romeo, M. Gong, Mu Ya Liu, A. M. Brun-Zinkernagel, 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 (1993).
31. B. L. Wei, *et al.*, Positive regulation of motility and flhDC expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **40**, 245–256 (2001).
32. D. R. Fortune, M. Suyemoto, C. Altier, Identification of CsrC and characterization of its role in epithelial cell invasion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect. Immun.* **74**, 331–339 (2006).
33. D. W. Jackson, *et al.*, Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**, 290–301 (2002).

34. M. F. Alexeyev, I. N. Shokolenko, Mini-Tn10 transposon derivatives for insertion mutagenesis and gene delivery into the chromosome of Gram-negative bacteria. *Gene* **160**, 59–62 (1995).
35. T. Baba, *et al.*, Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**, 2006.0008 (2006).
36. P. P. Cherepanov, W. Wackernagel, Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**, 9–14 (1995).
37. O. Kwon, D. Georgellis, A. S. Lynch, D. Boyd, E. C. Lin, The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli*: genetic exploration of the transmembrane region. *J. Bacteriol.* **182**, 2960–6 (2000).
38. D. Georgellis, O. Kwon, E. C. C. Lin, S. M. Wong, B. J. Akerley, Redox signal transduction by the ArcB sensor kinase of *Haemophilus influenzae* lacking the PAS Domain. *Microbiology* **183**, 7206–7212 (2001).
39. X. Liu, *et al.*, Evidence against the physiological role of acetyl phosphate in the phosphorylation of the ArcA response regulator in *Escherichia coli*. *J. Microbiol.* **47**, 657–662 (2009).
40. T. L. Raivio, T. J. Silhavy, Transduction of envelope stress in *Escherichia coli* by the Cpx two-component system. *Am. Soc. Microbiol.* **179**, 7724–7733 (1997).
41. A. Haldimann, B. L. Wanner, Conditional-replication, integration, excision, and retrieval plasmid-host systems for gene structure-function studies of bacteria. *J. Bacteriol.* **183**, 6384–6393 (2001).

42. K. a Datsenko, B. L. Wanner, One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 6640–6645 (2000).
43. H. Tomenius, *et al.*, 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**, 7317–24 (2005).
44. F. Bolivar, *et al.*, Construction and characterization of new cloning vehicle. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**, 95–113 (1977).
45. J. H. Miller, *Experiments in molecular genetics.*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed. (Cold Spring Harbor, NY, 1972).
46. C. M. Barbieri, A. M. Stock, Universally applicable methods for monitoring response regulator aspartate phosphorylation both in vitro and in vivo using Phos-tag-based reagents. *Anal. Biochem.* **376**, 73–82 (2008).
47. M. D. Rolfe, *et al.*, Transcript profiling and inference of *Escherichia coli* K-12 ArcA activity across the range of physiologically relevant oxygen concentrations. *J. Biol. Chem.* **286**, 10147–10154 (2011).
48. P. L. Nagy, A. Marolewski, S. J. Benkovic, H. Zalkin, Formyltetrahydrofolate hydrolase, a regulatory enzyme that functions to balance pools of tetrahydrofolate and one-carbon tetrahydrofolate adducts in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**, 1292–1298 (1995).
49. C. Bratton, E. K. Marshall, A new coupling component for sulfanilamide determination. *J. Biol. Chem.* **128**, 537–550 (1939).

50. M. R. Stetten, C. L. Fox, An amine formed by bacteria during sulfonamide bacteriostasis. *J. Biol. Chem.* **161**, 333–349 (1945).
51. D. Di Pierro, *et al.*, An ion-pairing high-performance liquid chromatographic method for the direct simultaneous determination of nucleotides, deoxynucleotides, nicotinic coenzymes, oxypurines, nucleosides, and bases in perchloric acid cell extracts. *Anal. Biochem.* **231**, 407–412 (1995).
52. E. I. Stepchenkova, S. G. Koz'min, V. V Alenin, I. I. Pavlov, Genetic control of metabolism of mutagenic purine base analogs 6-hydroxylaminopurine and 2-amino-6-hydroxylaminopurine in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetika* **45**, 471–7 (2009).
53. B. He, A. Shiau, K. Y. Choi, H. Zalkin, J. M. Smith, Genes of the *Escherichia coli pur* regulon are negatively controlled by a repressor-operator interaction. *J. Bacteriol.* **172**, 4555–62 (1990).
54. B. He, H. Zalkin, Regulation of *Escherichia coli purA* by purine repressor, one component of a dual control mechanism. *J. Bacteriol.* **176**, 1009–1013 (1994).
55. T. Shi, *et al.*, Deregulation of purine pathway in *Bacillus subtilis* and its use in riboflavin biosynthesis. *Microb. Cell Fact.* **13**, 101 (2014).
56. B. Daignan-Fornier, B. Pinson, 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranosyl 5'-monophosphate (AICAR), a highly conserved purine intermediate with multiple effects. *Metabolites* **2**, 292–302 (2012).
57. G. Zhou, J. L. Smith, H. Zalkin, Binding of purine nucleotides to two regulatory sites results in synergistic feedback inhibition of glutamine 5-

- phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase. *J. Biol. Chem.* **269**, 6784–6789 (1994).
58. E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, Y. Eguchi, T. Koike, Validation of Cis and Trans modes in multistep phosphotransfer signaling of bacterial tripartite sensor kinases by using Phos-Tag SDS-PAGE. *PLoS One* **11**, e0148294 (2016).
59. R. Malpica, G. R. P. Sandoval, C. Rodríguez, B. Franco, D. Georgellis, Signaling by the Arc two-component system provides a link between the redox state of the quinone pool and gene expression. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 781–795 (2006).
60. A. S. Lynch, E. C. C. Lin, Transcriptional control mediated by the ArcA two-component response regulator protein of *Escherichia coli*: Characterization of DNA binding at target promoters. *J. Bacteriol.* **178**, 6238–6249 (1996).
61. A. Francez-Charlot, M.-P. Castanié-Cornet, C. Gutierrez, K. Cam, Osmotic regulation of the *Escherichia coli* *bdm* (biofilm-dependent modulation) gene by the RcsCDB His-Asp phosphorelay. *J. Bacteriol.* **187**, 3873–7 (2005).
62. A. Battesti, Y. M. Tsegaye, D. G. Packer, N. Majdalani, S. Gottesman, H-NS Regulation of IraD and IraM antiadaptors for control of RpoS degradation. *J. Bacteriol.* **194**, 2470–2478 (2012).
63. A. Vázquez-Salazar, A. Becerra, A. Lazcano, Evolutionary convergence in the biosyntheses of the imidazole moieties of histidine and purines. *PLoS One* **13**, e0196349 (2018).
64. L. Delaye, A. Becerra, A. Lazcano, The Last Common Ancestor: What's in a name? *Orig. Life Evol. Biosph.* **35**, 537–554 (2005).

65. P. B. Kim, J. W. Nelson, R. R. Breaker, An ancient riboswitch class in bacteria regulates purine biosynthesis and one-carbon metabolism. *Mol. Cell* **57**, 317–328 (2015).
66. G. F. Joyce, RNA evolution and the origins of life. *Nature* **338**, 217–224 (1989).
67. B. R. Bochner, B. N. Ames, ZTP (5-amino 4-imidazole carboxamide riboside 5'-triphosphate): a proposed alarmone deficiency riboside for 10-formyl-tetrahydrofolate deficiency. *Cell* **29**, 929–937 (1982).

APÉNDICE

Tabla 1. Cepas de *E. coli* y plásmidos usados en el presente trabajo

Cepa o plásmido	Características relevantes	Referencia
Cepa		
CF7789	MG1655 $\Delta lacZ$ (MluI)	Michael Cashel
KSB837	CF7789 $\lambda\phi(csxB'-lacZ)$	Gudapaty <i>et al.</i> (27)
IFC5010	KSB837 <i>csrA::Kan^r</i>	Camacho <i>et al.</i> (9)
ECL5336	MC4100 <i>ackA::Tet^r::pta</i>	Liu <i>et al.</i> (39)
TR50	MC4100 $\lambda\phi(cpxP'-lacZ)$	Raivio & Silhavy(40)
ECL5003	MC4100 $\lambda\phi(cydA'-lacZ)$	Kwon <i>et al</i> (37)
ECL5013	MC4100 $\Delta arcB::Kan^r \phi(lldP-lacZ)$	Kwon <i>et al.</i> (37)
ECL5020	<i>ΔarcA::Tet^r</i>	Georgellis <i>et al.</i> (38)
JW2757	BW25113 $\Delta barA::Kan^r$	Colección Keio (35)
JW1899	BW25113 $\Delta uvrY::Kan^r$	Colección Keio (35)
JW2007	BW25113 $\Delta hisF::Kan^r$	Colección Keio (35)
JW0031	BW25113 $\Delta carB::Kan^r$	Colección Keio (35)
JW3970	BW25113 $\Delta purH::Kan^r$	Colección Keio (35)
JW1650	BW25113 $\Delta purR::Kan^r$	Colección Keio (35)
JW3882	BW25113 $\Delta cpxA::Kan^r$	Colección Keio (35)
JW5917	BW25113 $\Delta rcsC::Kan^r$	Colección Keio (35)
JW1115	BW25113 $\Delta phoQ::Kan^r$	Colección Keio (35)
IFC6000	IFC5010 <i>purA::Tn10</i> con el plásmido pMX543	Presente trabajo
IFC6001	KSB837 <i>purA::Tn10</i>	Presente trabajo

IFC6002	KSB837 $\Delta barA::Kan^r$	Presente trabajo
IFC6003	KSB837 $\Delta uvrY::Kan^r$	Presente trabajo
IFC6004	KSB837 $purA::Tn10 \Delta barA::Kan^r$	Presente trabajo
IFC6005	KSB837 $purA::Tn10 \Delta uvrY::Kan^r$	Presente trabajo
IFC6006	KSB837 $purA::Tn10 \Delta barA ackA::Tet^r::pta$	Presente trabajo
IFC6007	KSB837 $purA::Tn10 \Delta barA$	Presente trabajo
IFC6008	KSB837 $purA::Tn10 \Delta barA \Delta carB::Kan^r$	Presente trabajo
IFC6009	KSB837 $purA::Tn10 \Delta barA \Delta carB::Kan^r ackA::Tet^r::pta$	Presente trabajo
IFC6010	KSB837 $purA::Tn10 \Delta barA \Delta purC::Kan^r$	Presente trabajo
IFC6011	KSB837 $purA::Tn10 \Delta barA \Delta hisF::Kan^r$	Presente trabajo
IFC6012	KSB837 $purA::Tn10 \Delta barA \Delta hisF \Delta purC::Kan^r$	Presente trabajo
IFC6013	KSB837 $purA::Tn10 \Delta barA \Delta purH::Kan^r$	Presente trabajo
IFC6014	KSB837 $purA::Tn10 \Delta barA \Delta purR::Kan^r$	Presente trabajo
IFC6015	CF7789 $purA::Tn10$	Presente trabajo
IFC6016	CF7789 $\lambda\phi(cydA'-lacZ)$	Presente trabajo
IFC6017	CF7789 $\lambda\phi(cydA'-lacZ) purA::Tn10$	Presente trabajo
IFC6018	CF7789 $\lambda\phi(cydA'-lacZ) purA::Tn10 \Delta arcB::Kan^r$	Presente trabajo
IFC6019	CF7789 $\lambda\phi(cydA'-lacZ) purA::Tn10 \Delta arcB::Kan^r \Delta arcA::Tet^r$	Presente trabajo
IFC6020	CF7789 $\lambda\phi(cpxP'-lacZ)$	Presente trabajo
IFC6021	CF7789 $\lambda\phi(cpxP'-lacZ) purA::Tn10$	Presente trabajo
IFC6022	CF7789 $\lambda\phi(cpxP'-lacZ) purA::Tn10 \Delta cpxA::Kan^r$	Presente trabajo
IFC6023	CF7789 $\lambda\phi(bdm'-lacZ)$	Presente trabajo
IFC6024	CF7789 $\lambda\phi(bdm'-lacZ) purA::Tn10$	Presente trabajo
IFC6025	CF7789 $\lambda\phi(bdm'-lacZ) purA::Tn10 \Delta rcsC::Kan^r$	Presente trabajo
IFC6026	CF7789 $\lambda\phi(iraM'-lacZ)$	Presente trabajo

IFC6027	CF7789 $\lambda\phi(iraM'-lacZ) purA::Tn10$	Presente trabajo
IFC6028	CF7789 $\lambda\phi(iraM'-lacZ) purA::Tn10 \Delta phoQ::Kan^r$	Presente trabajo
Plásmidos		
pBR322	Vector de clonación, Amp ^r Tet ^r	Bolivar <i>et al.</i> (44)
pAH125-bla	Vector CRIM para fusión <i>lac</i> <i>Z</i> transcripcional, Amp ^r	Camacho <i>et al.</i> (9)
pINT-cat	Vector de integración CRIM, Cam ^r	Camacho <i>et al.</i> (9)
pMX543	<i>uvrY</i> bajo el control del promotor de <i>barA</i> en pEXT21, Sp ^r	Camacho <i>et al.</i> (9)
pUY14D54Q	<i>uvrY</i> ^{D54Q} en pBR322, Tet ^r	Tomenius <i>et al.</i> (43)
pQE30UvrY	<i>uvrY</i> en pQE30 bajo la regulación de un promotor inducible por IPTG	Pernestig <i>et al.</i> (23)
pMX557	<i>uvrY</i> ^{D54Q} bajo el control del promotor de <i>barA</i> en pEXT21, Sp ^r	Presente trabajo
pMX558	<i>purA</i> bajo su propio promotor en pBR322, Tet ^r	Presente trabajo
pAH-bdm	Fusión <i>bdm-lacZ</i> , Amp ^r	Presente trabajo
pAH-iraM	Fusión <i>iraM-lacZ</i> , Amp ^r	Presente trabajo

Artículo derivado

Vázquez-Ciros, Oscar J., Adrián F. Alvarez, and Dimitris Georgellis. 2020. “Identification of Z Nucleotides as an Ancient Signal for Two-Component System Activation in Bacteria.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117(52): 33530–39. <https://www.pnas.org/content/117/52/33530>